

UNIVERSITAT JAUME I

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA I CIÈNCIES EXPERIMENTALS

DEPARTAMENT DE CIÈNCIES AGRÀRIES I DEL MEDI NATURAL



UNIVERSITAT
JAUME•I

Aplicació de la metabolòmica a l'estudi de les respostes de les plantes a les condicions ambientals adverses

Tesi doctoral presentada per:

Rosa Argamasilla Martínez

Directors:

Dr. Aurelio Gómez Cadenas

Dr. Vicent Arbona Mengual

ELS DIRECTORS DE TESI:

Dr. Aurelio Gómez Cadenas, Catedràtic de l'Àrea de coneixement de Producció Vegetal del Departament de Ciències Agràries i del Medi Natural de la Universitat Jaume I de Castelló.

Dr. Vicent Arbona Mengual, Investigador de l'Institut Valencià d'Investigacions Agràries (IVIA).

FAN CONSTAR QUE:

La present memòria de Tesi Doctoral, presentada per Rosa Argamasilla Martínez, titulada “**Aplicació de la metabolòmica a l'estudi de les respostes de les plantes a les condicions ambientals adverses**” i realitzada en l'Àrea de Producció Vegetal de la Universitat Jaume I de Castelló, reuneix les condicions necessàries per a la seua defensa,

Dr. Aurelio Gómez Cadenas

Dr. Vicent Arbona Mengual

Part dels resultats d'aquesta tesi s'han publicat en:

Common and divergent physiological, hormonal and metabolic responses of *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila* to water and salt stress.

Arbona, V., Argamasilla, R. i Gómez-Cadenas, A.

Journal of Plant Physiology (2010) 167: 1342-1350

Agraïments

En primer lloc he d'agrair als meus directors de tesi, Aurelio i Vicent, per donar-me l'oportunitat de dur a terme aquest treball i per ajudar-me sempre que ha segut necessari.

Moltes gràcies a tots els meus companys de laboratori i àrea, amb els que he compartit tantes coses i que sense ells no haguera segut el mateix: Maria, Merche, Rosa, Salva, Marta, Valeria, Carlos i Tico; i als antics companys: Alba, Adriana, Claudia, Jalel i Carlos.

Gràcies també al grup de Fisiologia Vegetal, a Cristian, del Servei Central d'Instrumentacions Científiques, i a Sergio i Pilar, de l'hivernacle.

Per últim voldria dedicar aquest treball a la meua família i als meus amics, molt en especial a les meues 'agüeles', als meus pares, a la meua germana i a Hamdi.

Abreviatures

[M]	massa exacta
ABA	àcid abscísic
ACC	àcid 1-aminociclopropà-1-carboxílic
ACN	acetonitril
ANOVA	anàlisi de la variància
ATP	trifosfat d'adenosina
CE	electroforesi capil·lar
ESI	electrosprai
EST	marcador de seqüència expressada
FA	àcid fòrmic
FLD	detector de fluorescència
FT-ICR	espectrometria de masses de transformada de Fourier
FT-IR	espectroscòpia d'infraroig de transformada de Fourier
GC	cromatografia de gasos
HCA	anàlisi clúster jeràrquic
HPLC	cromatografia líquida d'alta eficàcia
IAA	àcid 3-indolacètic
JA	àcid jasmònic
LC	cromatografia líquida
LOX	lipoxigenasa
m/z	relació massa càrrega
MEP	metileritritol fosfat
MS	espectrometria de masses
MVA	àcid mevalònic
NIR	espectroscòpia d'infraroig proper
PAL	fenil alanina amoni liasa
PCA	anàlisi de components principals
pf	pes fresc
pKa	constant d'acidesa
PLS	mínims quadrats parcials
PTFE	politetrafluoroetilè

Q	quadrupol
RMN	ressonància magnètica nuclear
ROS	espècies reactives d'oxigen
RSD	desviació estàndard relativa
rt	temps de retenció
SA	àcid salicílic
SAM	S adenosil metionina
sd	desviació estàndard
std	estàndard
TOF	temps de volada
uma	unitats de massa arbitràries
UV	ultraviolat
v/v	volum/volum
w/v	pes/volum

Índex

1. INTRODUCCIÓ GENERAL	1
1.1. Estrès en plantes	3
1.1.1. Sequera	5
1.1.2. Salinitat	6
1.1.3. Inundació	8
1.2. Plantes model	9
1.2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i>	9
1.2.2. <i>Thellungiella halophila</i>	11
1.3. Cítrics	13
1.3.1. Mandarí Cleopatra (<i>Citrus reshni</i> Hort. ex Tan.)	14
1.3.2. Citrange Carrizo (<i>Citrus sinensis</i> L. Obs. x <i>Poncirus trifoliata</i> L. Raf.)	15
1.4. Fitohormones	16
1.4.1. Àcid salicílic	17
1.4.2. Àcid 3-indolacètic	18
1.4.3. Àcid abscísic	19
1.4.4. Àcid jasmònic	20
1.4.5. Altres hormones	21
1.5. Metabolisme secundari	25
1.5.1. Definició	25
1.5.2. Rutes i metabòlits principals	26
1.6. Metabolòmica	29
1.6.1. Descripció	29
1.6.2. El procés de l'anàlisi metabolòmica	32
2. OBJECTIUS I PLA DE TREBALL	37
3. MATERIALS I MÈTODES	41
3.1. Material vegetal i sistemes experimentals	43
3.1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> i <i>Thellungiella halophila</i>	43
3.1.2. Excisió de la rosseta basal	43
3.1.3. Salinitat	44
3.1.4. mandarí Cleopatra i citrange Carrizo	44
3.1.5. Inundació	45
3.1.6. Sequera	45

3.2. Mesures de pèrdua d'aigua	46
3.3. Determinació d'ions clorur	46
3.4. Determinació de la concentració de prolina	47
3.5. Determinació de fitohormones	47
3.6. Perfilats metabolòmics	49
3.6.1. Extracció dels metabòlits	49
3.6.2. Anàlisi instrumental	50
3.6.3. Tractament de les dades	51
3.6.4. Anàlisi estadística	54
4. OPTIMITZACIÓ DE LA PLATAFORMA METABOLÒMICA	55
4.1. Resultats i discussió	57
4.1.1. Extracció de metabòlits i anàlisi instrumental	58
4.1.2. Tractament de dades	59
4.1.3. Reproductibilitat i Linealitat	63
4.1.4. Anàlisi estadística	75
5. RESPOSTES FISIOLÒGIQUES, HORMONALS I METABÒLIQUES, COMUNES I DIVERGENTS ENTRE <i>Arabidopsis thaliana</i> I <i>Thellungiella halophila</i> SOTMESES A ESTRÈS HÍDRIC I SALÍ	87
5.1. Resultats	91
5.1.1. Excisió de la rosseta basal – experiments de dessecació	91
5.1.1.1. Pèrdua d'aigua	91
5.1.1.2. Concentració de prolina	92
5.1.1.3. Concentració d'ABA i JA	93
5.1.1.4. Perfilats metabolòmics	95
5.1.2. Experiments d'estrès salí	98
5.1.2.1. Concentració d'ions clorur	98
5.1.2.2. Concentració de prolina	99
5.1.2.3. Concentració d'ABA i JA	100
5.1.2.4. Perfilats metabolòmics	101
5.2. Discussió	106

6. CANVIS HORMONALS I METABÒLICS EN ARRELS DE CÍTRICS SOTMESOS A ESTRÈS PER INUNDACIÓ I ESTRÈS PER SEQUERA	111
6.1. Resultats	114
6.1.1. Experiments d'inundació	114
6.1.1.1. Concentració de prolina	114
6.1.1.2. Concentració de fitohormones	115
6.1.1.3. Perfilats metabòlics	120
6.1.2. Experiments de sequera	124
6.1.2.1. Concentració de prolina	124
6.1.2.2. Concentració de fitohormones	126
6.1.2.3. Perfilats metabòlics	131
6.2. Discussió	135
7. CONCLUSIONS	143
8. BIBLIOGRAFIA	149

1. Introducció general

1. INTRODUCCIÓ GENERAL

1.1 Estrès en plantes

En 1980, Levitt va definir l'estrès com "Qualsevol factor ambiental potencialment desfavorable per als organismes vius". L'ecofisiòleg vegetal Larcher (1987) va descriure l'estrès en vegetals com "un estat en el qual les creixents demandes fetes a una planta condueixen a una desestabilització de funcions, seguida per la normalització i per una resistència millorada", a més a més "si els límits de la tolerància són excedits i es sobrepassa la capacitat adaptativa, el resultat pot ser el dany permanent o inclús la mort". Lichtenthaler (1998) indicà que l'estrès en els vegetals és "qualsevol condició desfavorable per al creixement i desenvolupament dels vegetals" i també va subratllar que en la major part dels casos "les plantes es poden recuperar quan desapareixen els agents estressants". Quan una planta està sotmesa a unes condicions significativament diferents de les òptimes per a la vida es diu que està sotmesa a estrès, si bé les diferents espècies o varietats difereixen en els seus requeriments òptims i per tant en la seua susceptibilitat a un determinat estrès (Valladares i Niinemets, 2008). A més a més, hi ha períodes o etapes del desenvolupament, com l'estadi de plàntula, on les espècies poden ser particularment sensibles (o insensibles) a un estrès determinat. Les plantes responen a l'aparició d'una situació d'estrès segons un model seqüencial de quatre fases. Quan es presenta l'estrès, les plantes reaccionen alentint o aturant les seues funcions biològiques bàsiques i reduint el seu vigor. Aquesta reacció s'anomena fase d'alarma i és concomitant amb l'activació dels mecanismes per a fer front a l'estrès. Si les plantes no tenen mecanismes adequats de defensa o de resposta, o si la situació d'estrès és molt intensa, experimenten danys irreversibles i moren. L'activació d'aquests mecanismes condueix a l'acomodació del metabolisme cel·lular a les noves condicions, activant processos de reparació de la maquinària danyada. En aquesta fase de resistència, els canvis que es produeixen permeten a la planta assolir un nou estat fisiològic òptim. Quan la situació d'estrès es manté durant un temps excessiu, la capacitat de resistència s'esgota i la planta atura novament les seues funcions. Aquesta fase d'esgotament de la resistència culmina amb la

mort de la planta si la situació d'estrès no desapareix a temps. Si l'estrès desapareix, les funcions fisiològiques es poden regenerar assolint, per tant, la fase de regeneració (Azcón-Bieto i Talón, 2008). L'estudi de les respostes de les plantes a l'estrès és un aspecte fonamental de la fisiologia ambiental o ecofisiologia, la qual es proposa conèixer com les plantes funcionen en els seus ambients naturals i quins són els patrons que determinen la seua distribució, supervivència i creixement (Kramer i Boyer, 1995; Ackerly *et al.*, 2002; Lambers *et al.*, 2008). El senyal de l'estrès posa en marxa una sèrie d'accions fins que es manifesten les respostes en les plantes. Aquestes accions comprenen la percepció per part de la planta de l'estímul estressant, el processament del senyal i la regulació de l'expressió gènica.

Segons el tipus de factor mediambiental advers, l'estrès en els vegetals es pot classificar com biòtic o abiòtic. L'estrès biòtic el causen els essers vius, com animals, altres plantes i agents patògens (bactèries, fongs, virus). L'estrès abiòtic, depenent de la natura de l'agent causal, pot ser físic (dèficit hídric, salinitat en la seua component osmòtica, temperatures extremes, radiació, inundació i estrès mecànic) o químic (salinitat en la seua component iònica, carència de nutrients i agents contaminants ambientals). El creixement de les plantes així com la seua productivitat estan greument afectats per tots aquests estressos ambientals.

Les plantes responen i s'adapten als estressos ambientals a nivell molecular, cel·lular, fisiològic i bioquímic (Yamaguchi-Shinozaki i Shinozaki, 2006). Alguns d'ells estan units pel fet que el resultat sol ser la disrupció de l'estatus hídric de la planta (Verslues *et al.*, 2006). El coneixement dels mecanismes de resistència a l'estrès permet comprendre els processos evolutius implicats en l'adaptació de les plantes a un ambient advers i predir fins cert punt la resposta vegetal a l'increment de l'adversitat associada en molts casos al canvi climàtic global. A més a més, poden ser aplicats per a millorar les característiques de les plantes tant en la seua fase de cultiu com en la selecció de varietats que s'ajusten a uns requeriments ambientals determinats o, simplement, en millorar la productivitat d'una espècie (Valladares *et al.*, 2008). Existeixen diversos tipus de mecanismes per a fer front a l'estrès, i apareixen depenent de la planta,

tipus i intensitat d'aquest, com per exemple la síntesi i acumulació de prolina, poliols, compostos antioxidants i fenòlics, així com la biosíntesi de proteïnes enzimàtiques i la seua activitat. A més a més, com a resposta a l'estrès, les plantes varien els balanços de distintes hormones vegetals que retornen a valors normals quan les condicions adverses desapareixen. Les hormones vegetals alteren l'expressió de gens que codifiquen proteïnes implicades en les respostes i adaptacions a les condicions estressants, o en la seua recuperació quan han desaparegut.

En el context del treball descrit en aquesta memòria es relaten els efectes que provoquen en les plantes l'estrès salí, l'estrès per sequera i l'estrès derivat de la inundació del substrat.

1.1.1 Sequera

La sequera es podria definir com a un període en el que les precipitacions estan per baix de les mitjanes estacionals habituals per a la zona, i que limita la productivitat en un sistema natural o agrícola (Boyer, 1982). Es tracta d'un dèficit hídric prolongat, entenent per dèficit hídric qualsevol limitació al funcionament òptim de les plantes imposada per una insuficient disponibilitat d'aigua. La sequera pot ser permanent, originant el que s'anomena aridesa; estacional; impredecible; i no aparent, originada per vents forts, altes temperatures o baixa humitat. El dèficit hídric pot presentar-se amb diferents intensitats i durades, de manera que les plantes respondran atenent al caràcter i magnitud de l'estrès. Les plantes responen i s'adapten per tal de sobreviure a condicions de sequera mitjançant la inducció de respostes morfològiques, bioquímiques i fisiològiques. Segons (Lambers *et al.*, 2008) es distingeix entre respostes immediates, aclimatació i adaptació. Durant el període de sequera algunes de les respostes immediates de les plantes són el tancament dels estomes, la reducció de l'expansió foliar, canvis en el creixement de les arrels o l'activació de mecanismes de dissipació tèrmica en les fulles. L'aclimatació fa referència a respostes a l'estrès que ocorren en temps més llargs, compensant les disminucions de l'activitat fisiològica que són conseqüència de les respostes immediates. Alguns exemples d'aclimatació són la reducció de la grandària de

les fulles, la senescència foliar i l'ajust osmòtic, acumulant soluts compatibles tals com la prolina per tal de mantenir el potencial hídric i evitar així la deshidratació (Verslues *et al.*, 2006). A més a més, es sintetitzen proteïnes protectores com les dehidrines i antioxidants, restringint així el dany a altres proteïnes i membranes cel·lulars i reduint els nivells d'espècies reactives d'oxigen perjudicials. Les plantes també redueixen el seu creixement com a estratègia per a salvar i redistribuir els recursos que es limiten en aquestes condicions extremes (Granier i Tardieu, 1999; Skirycz *et al.*, 2010). Per últim, l'adaptació a l'estrès hídric és un concepte evolutiu que fa referència a modificacions genètiques i morfològiques que ocorren a escala temporal de diverses generacions, afavorint la supervivència i creixement de l'espècie. Alguns dels canvis que es produeixen a causa de l'estrès afecten a la fenologia de l'espècie, a les arrels profundes, als mecanismes fotosintètics...

La disponibilitat d'aigua en el món comença a estar limitada i la creixent demanda d'aliments podria empitjorar la situació en un futur pròxim (Somerville i Briscoe, 2001). Actualment no existeixen tecnologies econòmicament viables que faciliten la producció dels cultius en condicions de sequera, però el desenvolupament de plantes tolerants a aquest estrès podria ser una aproximació que ajudaria molt a suplir la demanda d'aliment. Els efectes de l'estrès per sequera es podrien reduir emprant els genotips adequats i ajustant les pràctiques agronòmiques a la disponibilitat d'aigua (Farooq *et al.*, 2009).

1.1.2 Salinitat

La salinització es l'acumulació en el sòl de sals solubles en aigua. Es classifica segons l'origen de les sals presents al substrat; s'anomena salinització primària a aquella que deriva de l'acumulació de sals d'origen mineral. El dipòsit de sals d'origen oceànic en zones costaneres, la intrusió marina als estuaris, rierols i a la capa freàtica constitueixen altres aportacions de sals als ambients continentals. Quan les sals procedeixen de l'aigua de reg, de residus procedents de l'adob (geps, sofre, etc...), de fertilitzants químics i de l'aplicació de fangs de depuradora, la salinització s'anomena secundària o antropogènica (Tanji i Keyes, 2002). Aquesta ve associada a l'evolució de l'agricultura tant a nivell de les tècniques d'irrigació com a canvis en l'ús i distribució de l'aigua.

L'acumulació de sals és una de les principals amenaces no biològiques per als ecosistemes. Les sals redueixen l'absorció de nutrients de les plantes i disminueixen la qualitat de l'aigua, afectant al desenvolupament vegetal. Al nostre planeta, la major reserva d'aigua la constitueixen els oceans (aproximadament un 96.5% del total). La resta són aigües d'origen continental: llacs, rius, etc...de les quals un 1.7% està en forma de gel i un altre 1% presenta un elevat grau de salinització; aleshores, sols un 0.8% de l'aigua del planeta està disponible per al consum humà i agrícola. El creixement de l'àrea de regadiu junt amb el de les poblacions humanes fan preveure problemes d'abastament d'aigua en un futur pròxim (Pitman i Läuchli, 2002).

L'efecte de la salinitat sobre la planta es manifesta per una marcada reducció del creixement i de l'efectivitat funcional de la mateixa, provocant canvis dràstics en la seua fisiologia que inclús poden desembocar en la mort d'aquesta si la salinitat persisteix (Storey i Walker, 1999). La fisiologia de la planta es veu afectada per la sal degut a l'estrès osmòtic al que està sotmesa, a la toxicitat dels ions i al desequilibri nutricional que es produeix (Al-Yassin, 2004). L'acumulació de sals en l'entorn de l'arrel afecta a la funcionalitat de la planta per produir-se un dèficit d'aigua i un trastorn en l'homeòstasis d'ions (Munns, 2002; Zhu, 2003). Aquest procés dificulta l'absorció d'aigua i nutrients per el que la planta posa en funcionament diversos mecanismes per a restablir el balanç osmòtic existent entre ella i el seu entorn. La planta inicia una absorció de les sals i les incorpora als seus teixits desencadenant un efecte iònic, que pot variar considerablement depenent del genotip sotmès a l'estrès i de l'espècie iònica que s'acumula. Per tant, dins de la salinitat es distingeixen dues components: un factor osmòtic inicial i un factor iònic posterior (Storey i Walker, 1999; Munns i Tester, 2008).

Al llarg de milions d'anys, les plantes han desenvolupat diferents mecanismes i estratègies per tal de poder sobreviure sota diferents condicions de salinitat que es poden classificar segons el grau de contacte amb la salinització (Breckle, 2002). Aquests mecanismes de les plantes es poden classificar en mecanismes per a evitar l'estrès salí, processos d'evasió i adaptació i mecanismes de tolerància. Aquestes estratègies impliquen l'acció de diversos mecanismes (transport de soluts compatibles, senyalització de processos de

desenvolupament, etc...) que intervenen per a aconseguir que la planta creixi, es desenvolupi i arribi a produir en condicions de salinitat. La relativa capacitat d'unes espècies vegetals respecte d'altres de dur a terme aquests processos bàsics en condicions de salinitat és el que anomenem tolerància (Breckle, 2002). Actualment, en aquelles àrees afectades per la salinització s'empren espècies tolerants i a banda s'apliquen tècniques de cultiu específiques encarades a la reducció dels efectes de la salinitat sobre la producció. En els últims anys l'interès per millorar la tolerància dels cultius ha anat creixent, emprant mètodes de millora i selecció genètica tradicionals o bé produint organismes modificats genèticament. En aquest últim cas, s'han incorporat gens amb expressions que modifiquen mecanismes bioquímics i fisiològics involucrats en la tolerància a salinitat (Kasukabe *et al.*, 2004; Sanan-Mishra *et al.*, 2005).

1.1.3 Inundació

Els constants canvis climatològics, deguts en part a l'acció humana, estan desencadenant en un augment en la freqüència de fortes precipitacions i de l'activitat ciclònica tropical. Aquest augment de precipitacions comporta, en la majoria dels casos, llargs períodes d'inundació del substrat, que modifiquen les condicions òptimes de desenvolupament de la planta i per tant generen variacions en la seua fisiologia (Bailey-Serres i Voeselek, 2008).

Algunes espècies de plantes tenen una gran capacitat per a suportar aquestes condicions, i altres inclús poden créixer vigorosament en resposta a la inundació. Aquesta variació interespecífica té un fort impacte en l'abundància de les espècies i la seua distribució en ecosistemes propensos a la inundació (Blom i Voeselek, 1996). En aquestes condicions d'inundació, la difusió dels gasos a través de les partícules del sòl es veu dificultada per l'elevada acumulació d'aigua; aleshores l'O₂ disponible és consumit en poc de temps per les arrels de les plantes i pels microorganismes mentre es produeix una acumulació de gasos d'origen biològic (Jackson *et al.*, 2003). La inundació del substrat provoca també l'acumulació de CO₂ i la formació de bicarbonats, que contribueixen a augmentar el pH, que afavoreix la solubilització de distints minerals de Fe i Mn contribuint a l'aparició de símptomes de clorosi fèrrica

(Schaffer, 1998). Les condicions d'anaerobiosi en combinació amb temperatures elevades contribueixen a accelerar els processos químics i biològics que provoquen l'aparició de substàncies tòxiques a partir de matèria orgànica: aquests processos alhora limiten la disponibilitat de nutrients per a la planta. En aquestes condicions, diversos microorganismes presents al substrat poden emprar altres compostos inorgànics com a acceptadors d'electrons. Aleshores es produeix l'acumulació de nitrits, òxid nítrós i, fins i tot, nitrogen gas quan els organismes empen NO_3^- (procés de desnitrificació) o H_2S , que és altament tòxic per al metabolisme radicular quan empen SO_4^{2-} com a acceptador final d'electrons (Jackson *et al.*, 2003). A més a més, les condicions d'embassament afavoreixen l'aparició de diverses malalties criptogàmiques, de fet, les espècies del gènere *Phytophthora* són capaces de tolerar baixes concentracions d' O_2 i, en aquestes condicions, veuen afavorides la producció i la dispersió de les zoòspores que són atretes pels exsudats produïts per les arrels (Kozłowski, 2000). L'efecte de la inundació del substrat no sols es limita a efectes químics i/o biològics de l'entorn sobre la planta sinó que també provoca disfuncions del metabolisme que, conjuntament amb els altres factors esmentats abans, poden contribuir al dany provocat per la inundació. Es pot millorar el comportament dels cultius front a aquest factor ambiental mitjançant diverses tècniques culturals que afavoreixen el drenat de l'excés d'aigua, la instal·lació de sistemes de drenatge (solen ser operacions costoses a nivell econòmic i material) i també altres operacions que es poden realitzar sobre els cultius i que estan relacionades amb la fertilització o amb l'ús de cultivars tolerants als efectes de la inundació (Jackson *et al.*, 2003).

1.2 Plantes model

1.2.1 *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana és una planta dicotiledònia menuda amb flors, nativa d'Europa, Àsia i el nord-est d'Àfrica. Pertany a la família de les Brassicaceae. Va ser descoberta per Johannes Thal, d'ací el seu nom, en les muntanyes de Harz en el segle XVI. Des de ja fa algun temps, *Arabidopsis thaliana* ha sigut adoptada com a model genètic de plantes vasculars, jugant un paper crucial en

la identificació de gens i les seues funcions biològiques, encara que no té cap interès agronòmic. Les característiques que primer atragueren als genetistes van ser la seua grandària, l'auto fecunditat i un cicle de vida curt, que es completa en poques setmanes, des de la germinació de les llavors, el desenvolupament de la rosseta, la floració, el desenvolupament de les síliques i la maduració de les llavors. Aquestes qualitats han permès la compactació dels experiments en l'espai i en el temps. Una altre avantatge important d'aquesta espècie és el seu genoma menut, amb cinc cromosomes, que està totalment seqüenciat en l'actualitat, el que ha permès que es desenvolupen nombroses tècniques per a l'estudi de la funció gènica. La capacitat de transformar *A. thaliana* amb gens exògens de forma relativament senzilla ha afavorit l'ampliació dels estudis genètics i moleculars, i ha situat a *A. thaliana* al capdamunt dels models vegetals en investigació bàsica (Bressan *et al.*, 2001). Per tots aquests motius, *Arabidopsis thaliana* ha esdevingut el model vegetal per excel·lència per a estudis fisiològics de resposta a l'estrès. En aquest sentit, els camps que major desenvolupament han experimentat són la salinitat i l'estrès hídric per la seua implicació en la productivitat de les espècies cultivades. Ambdós tipus d'estrès tenen una component comú que és la de limitació de la disponibilitat d'aigua; en el cas de l'estrès hídric, per raons òbvies, i en el cas de l'estrès salí com a conseqüència de l'efecte osmòtic que l'elevada concentració de sals té sobre la mobilitat de l'aigua, tal i com s'ha descrit anteriorment. Les plantes d'*Arabidopsis* responen a aquest estímul tancant de forma ràpida els seus estomes (Yoshida *et al.*, 2002) i reduint el seu potencial hídric per tal d'evitar la deshidratació i seguir mantenint el flux d'aigua des de les arrels cap a la part aèria (Inan *et al.*, 2004; Verslues i Bray, 2006). Aquesta regulació del potencial hídric es du a terme mitjançant la biosíntesi de soluts compatibles com la prolina (Gómez-Cadenas *et al.*, 1996; Gómez-Cadenas *et al.*, 1998; Verslues i Bray, 2006) i l'acumulació de sals procedents del substrat en els òrgans fotosintètics. Aquestes respostes estan sotmeses a control hormonal en les plantes d'*Arabidopsis thaliana* així com en la resta de plantes superiors. No obstant, en condicions d'estrès salí, les plantes d'*Arabidopsis* experimenten una reducció en el creixement vegetatiu que no està directament relacionada amb el manteniment del potencial hídric i de turgència, la qual cosa suggereix l'existència d'altres factors, potser també

hormonals, que regulen aquest important aspecte de tolerància (Inan *et al.*, 2004). En situacions en les que l'habilitat fotosintètica i el creixement vegetatiu es veuen compromesos també existeix un conflicte energètic que pot desembocar en la producció massiva de ROS. En les plantes superiors, es considera que la capacitat d'eliminar efectivament les ROS està directament relacionada amb la tolerància a una determinada situació ambiental (Perl-Treves i Perl, 2002). *Arabidopsis thaliana* es considera doncs una espècie mesòfila que no tolera bé situacions extremes de temperatura, sequera, salinitat, etc...Per aquest motiu, la recerca duta a terme en *Arabidopsis* encarada a trobar factors implicats en la tolerància a l'estrès no ha rendit, fins la data, els resultats esperats. Emprant la genètica inversa com a estratègia, s'han desenvolupat diversos mutants amb una resposta deficient front a l'estrès abiòtic associats amb funcions gèniques relacionades amb la biosíntesi hormonal (Inan *et al.*, 2007) o la senyalització molecular de les respostes a l'estrès (Huang *et al.*, 2008). Donada l'aparent importància de l'acumulació de prolina com a osmolit compatible i per a corroborar la seua implicació en la tolerància a l'estrès, en un treball recent es va comparar un mutant d'*Arabidopsis* amb major capacitat de sintetitzar i acumular prolina (eskimo-1) amb el corresponent genotip silvestre. Els resultats descartaren la implicació d'aquest solut compatible en la tolerància a l'estrès (Ghars *et al.*, 2008). No obstant això, existeix una gran variabilitat en la resposta front a l'estrès abiòtic entre els ecotips d'*Arabidopsis* descrits (Lefebvre *et al.*, 2009) i això ha conduït als investigadors a buscar nous models vegetals per a l'estudi de la tolerància a les condicions ambientals adverses.

1.2.2 *Thellungiella halophila*

En Setembre de 2004, un grup d'investigadors es reuniren en París per a discutir les possibilitats que oferia una menuda planta crucífera per a convertir-se en una nova espècie model per a la investigació molecular en el camp de la tolerància a l'estrès abiòtic (Inan *et al.*, 2004). Són dos els genotips que s'estan utilitzant per a la investigació, anomenats Yukon, originari de Canadà, i Shandong, de Xina. Ambdós ecotips són capaços de tolerar concentracions de NaCl en l'aigua de reg de fins i tot 500 mM. La planta en qüestió era

Thellungiella halophila, molt semblant a *A. thaliana* en termes de grandària, règim de creixement i fisiologia. A més a més, comparteix molts dels aspectes que la feren popular entre biòlegs i genetistes, incloent un cicle de vida curt, un genoma menut, i una gran producció de llavors. Al contrari que *A. thaliana*, *T. halophila* és capaç de tolerar diferents condicions d'estrès abiòtic. Encara que *T. halophila* és una espècie propera a *A. thaliana*, aquesta no es troba en el mateix gènere, i tenint 7 cromosomes, no es pot creuar amb *A. thaliana*. Mitjançant citometria de flux s'ha vist que *T. halophila* té un genoma d'una grandària menys del doble que la d'*A. thaliana*, i l'anàlisi de ESTs de diversos centenars de clons de *T. halophila* ha revelat nivells de similitud entre el 90 i el 95 % (Bressan *et al.*, 2001; Zhu, 2001).

La diferent tolerància a la salinitat entre ambdues espècies s'ha atribuït, en part, a la homeòstasis d'ions. Al contrari que *Arabidopsis*, *Thellungiella* restringeix l'acumulació de Na^+ en els brots a l'hora que manté la capacitat d'absorció de K^+ superior (Volkov *et al.*, 2004; Inan *et al.*, 2007). A més a més, estudis de l'expressió gènica diferencial en *Arabidopsis* i *Thellungiella* van revelar una sobreexpressió *SOS1* en plantes no estressades d'aquesta última respecte d'*Arabidopsis*. Aquest gen codifica per a una proteïna antiportadora de Na^+/H^+ associada a membrana que recull i carrega ions Na^+ des de i cap al xilema. El patró d'expressió es va veure correlacionat amb una dinàmica d'acumulació de Na^+ a la saba xilemàtica més lenta que en el cas d'*Arabidopsis* (Kant *et al.*, 2006). Sota les mateixes condicions control, *Thellungiella* presenta nivells endògens de prolina superiors que *Arabidopsis* en la part aèria (Inan *et al.*, 2004; Kant *et al.*, 2006), associats a una sobreexpressió constitutiva de P5CS, gen clau en la biosíntesi de prolina, i a la repressió del gen PDH implicat en el catabolisme d'aquest metabòlit (Kant *et al.*, 2006). Existeix, doncs, una diferència en el grau d'expressió gènica així com dels gens expressats i/o reprimits tant en condicions basals com d'estrès en les dues espècies: *Arabidopsis* i *Thellungiella*. Les principals diferències destacades en la literatura són la síntesi proteica massiva en *Arabidopsis*, associada a la inducció *de novo* d'activitats enzimàtiques de resposta específica a l'estrès, mentre que en *Thellungiella* la resposta és la inducció de proteïnes vinculades a la modificació post-traduccional, plegament i redistribució d'altres proteïnes preexistents

(Gong *et al.*, 2005). En l'actualitat, s'està caracteritzant l'expressió gènica en *Thellungiella* en condicions d'estrès per a identificar funcions gèniques que podrien ser claus en la tolerància com TsVP que codifica per a una pirofosfatasa vacuolar (Li *et al.*, 2008), ThCBL9, que codifica per a una proteïna similar a calcineurina-B (Sun *et al.*, 2008) o ThHSC70 que codifica per a una chaperona (Zhang *et al.*, 2004)). La sobreexpressió d'aquests gens en tabac i *Arabidopsis* va incrementar la tolerància a l'estrès salí i osmòtic a través de diferents vies. Les dades d'expressió gènica de plantes de *Thellungiella* sotmeses a diferents condicions adverses indiquen que aquesta espècie ajusta el patró d'expressió a les diferents situacions ambientals (Amtmann, 2009). Tot plegat indica que *Thellungiella* organitza de forma adequada les eines de les que disposa mentre que *Arabidopsis* ha de sintetitzar-les de nou, incorrent en una despesa d'energia que, a llarg termini, pot ser decisiva (Amtmann, 2009). L'estratègia emprada per *Thellungiella* es pot desglossar en tres punts clau, segons (Amtmann, 2009): (1) especificitat, *Thellungiella* regula un grup específic de gens per a cada situació d'estrès; (2) anticipació, existeix una preparació constitutiva en *Thellungiella* front a l'estrès; (3) sensibilitat, la dosi d'estrès necessària per a induir una resposta transcripcional en *Thellungiella* és major que en *Arabidopsis*.

1.3 Cítrics

Els cítrics es coneixen des de fa més de 4000 anys, i es pensa que són originaris del sud-est asiàtic. Les espècies comercials de cítrics i altres gèneres afins són, majoritàriament, espècies de fulla perenne que poden créixer tant en condicions de clima tropical com subtropical. Són el cultiu fruital de fulla perenne més important del món. Pertanyen a la família Rutaceae dins l'ordre Geraniales i, en general, presenten quatre característiques fonamentals: (i) posseeixen glàndules d'olis essencials, (ii) l'ovari creix sobre un disc floral o nectari, (iii) les fulles presenten taques translúcides i (iv) els fruits presenten una placentació axil·lar (Davies i Albrigo, 1994). Un cas particular el constitueix el *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. o taronger trifoliat, únic catalogat dins el seu gènere. El seu limbe foliar està dividit en tres folíols i s'ha emprat en distintes

ocasions com a parental per a l'obtenció de portaempelts tolerants a distints factors ambientals adversos.

La incidència del virus de la Tristeza sobre la citricultura va obligar a la implantació en l'ús de portaempelts tolerants a aquesta malaltia, entre els més utilitzats actualment estan el citrange Carrizo i el mandarí Cleopatra, que són molt més restrictius al seu ús que l'antic taronger amarg, pel que fa al tipus de sòl, climatologia i qualitat de l'aigua, al mateix temps que difereixen en el seu vigor i compatibilitat amb diferents varietats. Per la qual cosa, la introducció i desenvolupament de nous patrons en la citricultura és un procés que encara avui en dia continua. La selecció del patró és un factor clau en l'èxit de la plantació, ja que aquest aportarà el sistema radicular i li conferirà a la planta resultant una sèrie de característiques de tolerància, vigor i qualitat de fruita. Avui en dia és fàcil trobar quasi qualsevol combinació varietat-patró als vivers de cítrics autoritzats, encara que algunes combinacions han resultat ser incompatibles. A continuació es descriuen de forma breu els patrons utilitzats en aquesta tesi, mandarí Cleopatra i citrange Carrizo:

1.3.1 Mandarí Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.)

És una espècie tolerant al virus de la Tristeza, exocortis, psoriasi i xiloporosi, també tolera la clorosi fèrrica i és notablement tolerant a la salinitat. És sensible a l'asfíxia radicular provocada per la inundació del substrat (Arbona *et al.*, 2009). El període en planter pot durar fins els dos anys i açò contribueix a allargar de forma considerable la producció de planta comercial. Tot açò junt amb el reduït vigor que confereix als arbres i el desenvolupament irregular que atorga, provoca un retard en l'entrada en producció (Agustí, 2003). No s'han observat incompatibilitats amb cap varietat coneguda i els arbres que hi són empeltats solen assolir gran mida a l'estat de maduresa i els fruits que produeixen són d'una elevada qualitat encara que, en algunes varietats, el calibre final del fruit es veu reduït (Castle *et al.*, 1993).

1.3.2 Citrange Carrizo (*Citrus sinensis* L. Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.):

Aquest patró és, com la gran majoria que s'empren actualment, tolerant al virus de la Tristeza, però també ho és a xiloporosi, psoriasi, nematodes i a l'atac de *Phytophthora spp.* No obstant, presenta certa sensibilitat a l'exocortis i quan es conrea en sòls calcaris desenvolupa símptomes de clorosi fèrrica (Agustí, 2003). A més a més, és sensible a l'elevada salinitat en l'aigua de reg. El seu nom deriva de la contracció de 'citrus' i 'orange', referint-se a l'híbrid intergenèric de taronger trifoliat i taronger dolç. Els primers foren obtinguts per Swingle a finals del segle XIX amb la intenció de produir plantes resistents al fred (Castle *et al.*, 1993). Foren dos els híbrids introduïts: el citrange Troyer i el Carrizo. Malgrat que són agronòmica i morfològicament indistingibles, actualment és el citrange Carrizo el que s'usa amb més profusió. Aquest sol presentar una major productivitat i els fruits són de qualitat superior. Tant el citrange Troyer com el Carrizo indueixen gran vigor en els arbres que hi són empeltats i no presenten incompatibilitats amb la majoria de varietats de taronja.

Els cítrics en general, i els patrons emprats en el desenvolupament d'aquesta tesi en particular, presenten un mecanisme molt efectiu de reajustament osmòtic per tal de combatre el dèficit hídric causat per l'estrès salí, que aconsegueixen sintetitzant soluts compatibles com la prolina i absorbint ions del substrat. Però, s'ha observat com, al contrari que en moltes espècies vegetals, els cítrics són sensibles als ions clorur, i la diferent tolerància observada entre plantes de cítrics es deu a la capacitat del peu per a excloure'ls (Gómez-Cadenas *et al.*, 2003). A més a més, la tolerància a l'estrès salí està directament relacionada amb la capacitat de mantenir l'aparell fotosintètic en condicions òptimes de funcionament, com és el cas de mandarí Cleopatra, més tolerant a l'estrès per salinitat que citrange Carrizo (López-Climent *et al.*, 2008). En quant a l'estrès provocat per la manca d'aigua, les fulles dels cítrics responen tancant els estomes per tal d'evitar la deshidratació, augmentant el desenvolupament radicular i reduint la massa foliar, on novament el peu juga un paper clau en la tolerància de la planta front al dèficit hídric (Rodríguez-Gamir *et al.*, 2010). Els cítrics, i les espècies relacionades, són sensibles a

l'embassament del substrat, encara que es troben diferències entre genotips. En condicions d'inundació l'híbrid citrange Carrizo mostra major tolerància mentre que Cleopatra sembla ser molt sensible. La diferent tolerància que exhibeixen els patrons s'ha associat a la distinta capacitat per a eliminar ROS (Arbona *et al.*, 2008), i per a mantenir el funcionament de la maquinària fotosintètica (Arbona *et al.*, 2009).

1.4 Fitohormones

Les fitohormones, també conegudes com a hormones vegetals, són substàncies químiques produïdes per moltes cèl·lules vegetals i són capaces de regular de manera predominant els fenòmens fisiològics de les plantes. Les hormones vegetals controlen un gran nombre de processos, entre ells el creixement de les plantes, la caiguda de les fulles, la floració, la formació del fruit i la germinació, i les respostes de les plantes en situacions d'estrès tant biòtic com abiòtic (Gómez-Cadenas *et al.*, 2002; Howe i Jander, 2008). Una fitohormona intervé en diversos processos, i de la mateixa manera cada procés està regulat per l'acció de diverses fitohormones. S'estableixen fenòmens d'antagonisme i balanç hormonal que condueixen a una regulació precisa de les funcions vegetals. Les fitohormones exerceixen els seus efectes mitjançant complexos mecanismes moleculars, que desemboquen en canvis de l'expressió gènica, en el citoesquelet, regulació de les vies metabòliques i canvis de fluxos iònics. La constant pressió evolutiva dels estressos abiòtics i biòtics ha portat a les plantes a desenvolupar mecanismes de percepció i resposta al dany produït per l'estrès (Howe i Jander, 2008). En aquest punt les hormones constitueixen un paper central regulant una resposta dinàmica i adaptativa (Pieterse *et al.*, 2009; Santner *et al.*, 2009). Des del punt de vista químic, les hormones vegetals són un grup de compostos de gran diversitat estructural i que poden classificar-se en classes: auxines, citoquinines, ABA, gibberel·lines, etilè, JA, hormones peptídiques, estrigolactones, SA i brassinoesteroides (Santner *et al.*, 2009). De forma breu es descriuen a continuació els compostos amb activitat hormonal que s'han implicat de forma més o menys directa amb les respostes de les plantes front a l'estrès abiòtic.

1.4.1 Àcid salicílic

L'àcid salicílic, o àcid 2-hidroxibenzoic, es troba àmpliament distribuït en el regne vegetal (Raskin *et al.*, 1990). La paraula salicílic deriva de la paraula llatina *salix*, que significa salze, nom donat per Rafacle Piria en l'any 1938. L'àcid salicílic s'ha caracteritzat en 36 plantes pertanyents a diversos grups (Raskin *et al.*, 1990). Aquest compost està considerat com a una hormona vegetal molt potent ja que actua com a regulador en el metabolisme de les plantes (Popova *et al.*, 1997). És un compost de naturalesa fenòlica que conté un anell aromàtic amb un grup hidroxil (Figura 1.1). En estat lliure és una pols cristal·lina amb un punt de fusió de 157-159 °C i pKa de 2.4 (Raskin, 1992b). Aquest àcid es sintetitza en les plantes a partir de l'àcid cinàmic mitjançant la ruta dels fenilpropanoides, i també mitjançant l'isocorismat. Aquesta hormona s'ha caracteritzat pel seu paper en processos de defensa de les plantes front a patògens biòtrofs, ja que està implicada en l'activació de defenses locals i en la resistència sistèmica adquirida (Durrant i Dong, 2004; Grant i Lamb, 2006). Encara que la resposta de defensa varia en funció de les espècies, s'ha descrit que la interacció del SA inhibeix la resistència induïda per JA front l'atac d'alguns lepidòpters en *Arabidopsis* (Cipollini *et al.*, 2004). En altres casos les evidències genètiques estableixen que el JA és un antagonista de la via de senyalització del SA (Glazebrook, 2005). També s'ha descrit un augment dels nivells d'aquesta hormona en plantes sotmeses a irradiació ultraviolada o ozó (Surplus *et al.*, 1998; Rao *et al.*, 2000). En els últims anys s'ha proposat al SA com a regulador en la senescència de fulles (Morris *et al.*, 2000) i com a regulador en la transició a la floració de plantes d'*Arabidopsis* sotmeses a estrès (Martínez *et al.*, 2004). L'àcid salicílic juga un paper clau en la regulació del creixement i desenvolupament de les plantes, en la interacció amb altres organismes i en les respostes als estressos mediambientals (Raskin, 1992a; Yalpani *et al.*, 1994; Senaratna *et al.*, 2000). A més a més, el seu paper és evident en la germinació de les llavors, en la glicòlisi, en la floració de les plantes termogèniques (Klessig i Malamy, 1994), en l'absorció i transport d'ions, en la taxa fotosintètica, conductància estomàtica i transpiració (Khan *et al.*, 2003). En quan a la seua relació amb l'estrès abiòtic, s'ha descrit com el SA està involucrat en la tolerància de les plantes exposades a estrès hídric,

sequera i inundació (Hayat *et al.*, 2008), i a estrès salí (Tari *et al.*, 2002). (Ahmed *et al.*, 2010) suggereixen que el SA augmenta la tolerància a la salinitat de la tomata afavorint el subministrament de K^+ limitant el transport de Na^+ i Cl^- a les fulles.

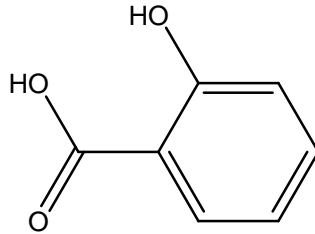


Figura 1.1 Estructura química de l'àcid salicílic (SA)

1.4.2 Àcid 3-indolacètic

Les auxines foren la primera classe de fitohormones identificada (Mander, 2003), sent l'IAA l'auxina primària en la majoria de les plantes. És una molècula de caràcter indòlic amb una cadena lateral $-CH_3COOH$ com a substituent (Figura 1.2). En la planta es troba tant en forma lliure com conjugada, permetent el seu emmagatzematge com a reserva d'auxina inactiva i evitant així la necessitat de sintetitzar de novo. Es conjuga majoritàriament amb glucosa, mio-inositol i aminoàcids sent els més comuns els conjugats constituïts per derivats tipus ester o amida (Normanly *et al.*, 2004). L'àcid 3-indolacètic és també una molècula important en la interacció planta patògen per la seua acció sobre el creixement (Jameson, 2000; Gravel *et al.*, 2007). El seu paper fisiològic és molt divers i engloba processos tan diferents com el control de la dominància apical i de l'abscisió foliar (junt amb l'etilè), el desenvolupament i maduració del fruit, creixement i desenvolupament de les gemmes florals, desenvolupament de l'arrel (diferenciació del teixit vascular i emissió d'arrels adventícies), etc... Aquesta diversitat en les seues funcions es reflexa en la extraordinària complexitat de les rutes biosintètiques, de transport i de senyalització. L'IAA es sintetitza a partir del triptòfan mitjançant dues vies diferents: la de la triptamina i la del àcid 3-indolpirúvic (Strader i Bartel, 2008). Es postula que els llocs més importants de síntesi de l'IAA són els teixits joves en general, on els nivells endògens hi són més alts que en la resta. Generalment, s'ha descrit la seua interacció amb altres hormones com és el

cas de les gibberel·lines, sobre les que exerceix una acció positiva activant la seua síntesi en tabac i pèsols (Normanly *et al.*, 2004). En el camp de la jardineria i de l'agricultura ha segut una ferramenta molt important, ja que el seu estudi ha facilitat la síntesi d'auxines sintètiques. com el 2,4-D o àcid naftalenacètic, emprades per a propagar plantes facilitant el seu arrelament, i com a herbicida. Posteriorment aquestes auxines també s'han introduït en el camp del cultiu *in vitro* amb el mateix i altres objectius.

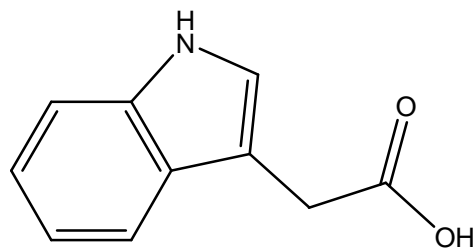


Figura 1.2 Estructura química de l'àcid 3-indolacètic (IAA)

1.4.3 Àcid abscísic

L'ABA pertany a un grup de metabòlits denominats isopropanoides, és un sesquiterpé derivat de la ruta de l'àcid mevalònic que, en les plantes superiors, es sintetitza a partir de les xantofil·les (Figura 1.3). Es pot trobar en forma conjugada amb diverses molècules orgàniques: sucres, aminoàcids, etc. La seua forma activa és la lliure i la conjugació amb diferents lligands constitueix una forma de desactivar l'acció fisiològica de l'ABA (Sauter *et al.*, 2002; Wilkinson i Davies, 2002; Lee *et al.*, 2006). L'ABA juga un paper important en diversos processos de la planta, incloent la maduració de l'embrió, la dormància i germinació de les llavors, el creixement de les arrels i els brots, la transpiració, i la tolerància a l'estrès (Mishra *et al.*, 2006). El seu efecte com a mediador entre la percepció de l'estrès i la promoció de la resposta a través de la inducció d'altres fitohormones li dóna un paper clau en la regulació de les respostes de les plantes front als factors ambientals (Srivastava, 2002). Regula el tancament estomàtic, mitjançant l'activació de l'acció dels canals iònics situats a les cèl·lules oclusives dels estomes, i l'activitat fotosintètica per tal d'ajustar ambdós paràmetres a l'estat hídric de la planta (Wilkinson i Davies, 2002; Levchenko *et al.*, 2005). Els nivells d'ABA regulen la resposta adaptativa

característica a molts tipus d'estrès en els que es produeix tancament estomàtic, activació de gens implicats en l'ajust osmòtic, compartimentalització d'ions, regulació del creixement de l'arrel i de la tija i modificacions en les propietats hidràuliques de l'arrel (Ruggiero *et al.*, 2004; Verslues i Zhu, 2005). Mitjançant anàlisis genètiques s'ha identificat el paper crucial que juga l'ABA en el fenomen de dormició de les llavors que va unit a la seua interacció amb les gibberel·lines (Koornneef *et al.*, 2002; Ho *et al.*, 2003). L'aplicació exògena d'ABA propicia una millor resposta de la planta front a estressos ambientals (Gómez-Cadenas *et al.*, 2002). Aquesta resposta beneficiosa estaria propiciada per un correcte ajust metabòlic per part de la planta (Kempa *et al.*, 2008).

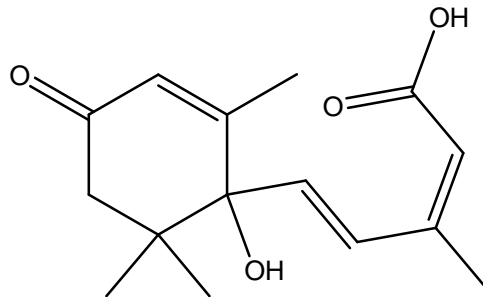


Figura 1.3 Estructura química de l'àcid abscísic (ABA)

1.4.4 Àcid jasmònic

Els jasmonats són un grup de compostos que deriven de l'àcid linoleic, coneguts globalment com a oxilipines. En concret, els jasmonats deriven de la ciclopentanona a través de la ruta octadecanoica (Wasternack, 2007). En l'actualitat, està àmpliament acceptada la idea de que les oxilipines produïdes per aquesta via tenen una gran varietat de funcions essencials en el cicle de vida de la planta (Blée, 2002; Feussner i Wasternack, 2002; Howe i Schilmiller, 2002; Browse, 2009). Els jasmonats, que s'anomenen així per la seua principal molècula activa, el JA (Figura 1.4), inclouen, a més a més als esters conjugats d'aquest àcid amb isoleucina, ACC, etc... així com el corresponent metil ester que és una hormona de caràcter gasós. Els nivells de JA augmenten ràpidament en resposta a pertorbacions mecàniques, atacs d'insectes i a infeccions per patògens. A més a més, s'ha demostrat que el JA també està involucrat en respostes de defensa de plagues, patògens, i estressos abiòtics, i

en la maduració de les llavors, producció de pol·len, creixement d'arrels i altres desenvolupaments vegetals (Hyun *et al.*, 2008; Katsir *et al.*, 2008). El JA s'ha estudiat des de fa molt de temps per la seua relació amb la resposta de la planta a l'estrès biòtic, ja que s'ha demostrat que la seua interacció amb el SA activa un mecanisme de defensa front a l'atac de patògens (Xu *et al.*, 1994; Lorenzo *et al.*, 2003). S'ha relacionat la seua acció amb la senyalització de la resposta d'algunes plantes front a diversos estressos de tipus abiòtic com la inundació (Arbona i Gómez-Cadenas, 2008) i l'estrès hídric (Mahouachi *et al.*, 2007), entre altres.

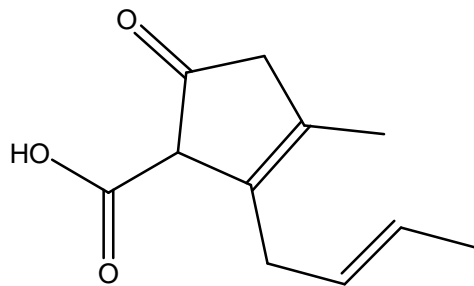


Figura 1.4 Estructura química de l'àcid jasmònic (JA)

1.4.5 Altres hormones

Etilè

La seua característica general és la de ser una hormona vegetal gasosa, al tractar-se d'un hidrocarbur insaturat amb dos àtoms de carboni (C₂H₄). En les plantes s'origina a partir del ACC que és oxidat per l'enzim ACC oxidasa (Wang *et al.*, 2002). El seu caràcter gasós li permet actuar sobre teixits allunyats de la zona de síntesi i inclús en algunes ocasions sobre plantes del voltant. El precursor de la via de biosíntesi és la SAM que es produeix a partir de L-metionina mitjançant addició d'un grup adenosil de l'ATP dut a terme per l'enzim adenosilmetionina sintetasa. Posteriorment SAM és transformat mitjançant l'ACC sintasa en ACC i a l'hora, mitjançant l'ACC oxidasa, a etilè (McKeon *et al.*, 1996). Aquesta hormona està implicada en nombrosos fenòmens, tals com l'abscisió, el creixement de la tija i l'arrel, la senescència, etc... Però, on més àmpliament ha segut estudiat el seu efecte és en els canvis que produeix sobre la maduració de fruits climatèrics, que es caracteritzen per

que durant la maduració pateixen un augment de la taxa de respiració unit a un augment en la producció d'etilè. Aquests canvis acceleren mecanismes relacionats amb la maduració com la degradació de clorofil·les i d'estructures de paret, la producció de substàncies volàtils i l'increment del contingut en sucres (Adams-Phillips *et al.*, 2004; Giovannoni, 2004). En els cítrics, en resposta a la salinitat o a l'estrès hídric, l'etilè actua regulant l'abscisió foliar, de forma que la seua interacció amb l'ABA desencadena una intensificació del fenomen d'abscisió (Gómez-Cadenas *et al.*, 1996; Gómez-Cadenas *et al.*, 1998; Gómez-Cadenas *et al.*, 2000). Fenòmens característics de les plantes sotmeses a inundació com són la formació d'aerènquima o la generació d'arrels adventícies estan lligats a variacions en la síntesi d'etilè (Dat *et al.*, 2004). Les interaccions de l'etilè amb altres hormones són molt variades, per exemple la interacció amb les gibberel·lines regula l'expansió radicular en cítrics (Tadeo *et al.*, 1997) i amb les auxines promou la formació d'arrels laterals en *Arabidopsis* (Ivanchenko *et al.*, 2008). També s'han descrit nombroses interaccions tant positives com negatives amb JA, a nivell fisiològic i molecular (Rojo *et al.*, 2003; Howe, 2004).

Poliamines

Són molècules nitrogenades alifàtiques que contenen dos o més grups amino en la seua estructura molecular. En la naturalesa existeixen diverses molècules amb aquestes característiques però, les més estudiades, presents en plantes superiors són: la putrescina, l'espermidina i l'espermina. Totes elles es sintetitzen de forma consecutiva en la mateixa ruta metabòlica a partir de l'arginina. Aquesta pateix diversos processos de descarboxilació, desaminació i transferència de grups propil-amino procedents de SAM. Degut al seu caràcter policatiònic poden unir-se i formar complexos amb molècules polianióniques, tals com algunes proteïnes, fosfolípids, pectines, entre altres components de paret cel·lular, com les lignines. Les poliamines estan implicades en nombrosos aspectes fisiològics com el desenvolupament, la senescència i la resposta a estrès. A nivell cel·lular són capaces d'interaccionar amb diverses proteïnes, formant complexos estables amb els àcids nuclèics i regulant així la síntesi de macromolècules. Les poliamines desenvolupen un ampli espectre d'accions, tant a nivell cel·lular com de planta completa. En plantes de tabac s'ha observat

que la sobreexpressió de gens relacionats amb la biosíntesi de putrescina incrementa la seua tolerància a la salinitat (Kumria i Rajam, 2002). S'acumulen front a deficiències en magnesi o bor (Tytti i Seppo, 2002; Camacho-Cristóbal *et al.*, 2005), a causa de l'estrès per altes o baixes temperatures (Pillai i Akiyama, 2004; Alcázar *et al.*, 2010), sequera (Seki *et al.*, 2007), tractaments amb UV (An *et al.*, 2004) o per la presència de metalls pesants (Zhao i Yang, 2008). En els últims anys, s'ha postulat que les poliamines podrien posseir un paper antioxidant davant certes situacions d'estrès demostrant la seua capacitat protectora front a l'estrès oxidatiu induït per diversos factors ambientals adversos (Ahn i Jin, 2004).

Giberel·lines

L'àcid giberèl·lic es va aïllar per primera vegada en els anys 50, a partir d'un extracte del fong *Gibberella fujikuroi* (Malonek *et al.*, 2004). La seua estructura està formada per un àcid diterpenoide tetracíclic natural, derivat d'un anell ent-giberelà. A partir d'aquesta estructura i mitjançant una sèrie d'hidroxilacions i metilacions s'obtenen les diferents giberel·lines. Existeixen una gran varietat d'aquestes, encara que només unes poques tenen activitat en la regulació del desenvolupament de la planta (Kobayashi *et al.*, 2000), controlant aspectes tals com la germinació de les llavors, l'elongació de la tija, l'expansió foliar, la floració i el desenvolupament de la llavor. En tots aquests processos les giberel·lines actuen com a intermediàries entre la percepció de l'estímul extern i la resposta. S'ha observat que tenen un paper important en la germinació de cereals, on interactuen de forma antagonista amb l'ABA (Peng i Harberd, 2002). Estudis recents també mostren un efecte sinèrgic de les giberel·lines amb l'etilè, les auxines, el SA i els brassinoesteroides, promovent l'elongació cel·lular i la tolerància a l'estrès en *Arabidopsis* (Symons i Reid, 2003; Alonso-Ramírez *et al.*, 2009). Mitjançant l'ús de mutants, s'ha observat que les giberel·lines tenen una funció essencial en el procés de fotomorfogènesi (Alabadí *et al.*, 2004). Els processos de desenvolupament i creixement de fruits estan regulats en gran mesura per aquestes fitohormones (Iglesias i Talón, 2008).

Citoquinines

Caracteritzades per promoure la divisió y proliferació cel·lular, son molècules derivades de l'adenina amb una cadena lateral unida al grup amino 6 de l'anell purínic. La cadena lateral pot ser de naturalesa isoprenoide o aromàtica constituint un compost natural distint però amb activitat de citoquinina (Mok i Mok, 2001). La seua biosíntesi està mediada per l'enzim isopentenil transferasa (Hirose *et al.*, 2008), però la seua activitat no està únicament regulada a nivell de biosíntesi ja que també són importants les seues vies de degradació i conjugació (Argueso *et al.*, 2009). Estudis recents mostren que plantes sotmeses a sequera presenten un descens en els nivells de citoquinines del tipus isoprenoide (com la zeatina) en el xilema, però sorprenentment els nivells de les aromàtiques augmenten (Alvarez *et al.*, 2008). Açò podria estar relacionat amb un augment en la inhibició de la senescència de la fulla durant aquestes condicions d'estrès o bé amb un increment en la concentració de prolina (Alvarez *et al.*, 2008), que actuaria com osmolit protector en resposta a l'estrès hídric.

Brassinoesteroides

Són un grup de compostos esteroides, similars als de humans i animals, dels quals en l'actualitat hi ha més de 70 tipus aïllats en plantes. Poden trobar-se tant en forma lliure com conjugats amb sucres o greixos, a més a més de distribuir-s'hi per tota la planta. En 1979 s'aïllà el primer brassinoesteroide en pol·len de *Brasica* sp. i des d'aleshores s'han trobat multitud d'aquestos. La seua diversitat es deu a menudes diferències en els substituents de dos dels anells, els quals s'oxiden i redueixen durant la seua biosíntesi. Existeixen rutes de biosíntesi distintes en funció de l'espècie (Choe, 2006). Aquestos compostos estan implicats en múltiples processos fisiològics de la planta com la divisió cel·lular, elongació cel·lular, diferenciació vascular, inhibició del creixement de l'arrel, etc. Estan relacionats amb la resposta de detoxificació del sistema front a diversos estressos (Bajguz i Hayat, 2009). En llavors de sorgo sotmeses a estrès osmòtic s'ha observat que els brassinoesteroides són capaços de disminuir els efectes de l'estrès (Vardhini i Rao, 2003). Estudis moleculars han aportat noves evidències de la interacció dels brassinoesteroides amb altres hormones. En *Arabidopsis* s'ha establert un efecte sinèrgic amb auxines i

giberel·lines generant un increment en l'elongació de l'hipocotil (Tanaka *et al.*, 2003). A més a més influeixen en la biosíntesi de JA, alterant, per tant, la resposta a l'estrès (Schaller *et al.*, 2000).

1.5 Metabolisme secundari

1.5.1 Definició

El conjunt de reaccions químiques que tenen lloc en un organisme viu constitueix el metabolisme. La major part del carboni, del nitrogen i de l'energia acaba en molècules comunes a totes les cèl·lules, necessàries per al seu funcionament, que són aminoàcids, sucres, nucleòtids i lípids, anomenats metabòlits primaris. A més a més dels processos metabòlics primaris, en les plantes es poden desenvolupar altres processos que condueixen a la formació de compostos peculiars de determinats grups taxonòmics. Aquestes rutes constitueixen el metabolisme secundari, i els seus productes s'anomenen metabòlits secundaris. Aquests metabòlits es sintetitzen en quantitats menudes i no de forma generalitzada, estant la seua producció limitada a un determinat gènere de plantes, a una família, o inclús a algunes espècies (Ávalos i Pérez-Urria, 2009; Azcón-Bieto i Talón, 2008). Els metabòlits secundaris deriven biosintèticament de determinats compostos primaris, de forma que ambdós metabolismes estan interconnectats en una extensió que fa difícil establir una clara divisió entre ells. Molts metabòlits secundaris estan implicats en relacions ecològiques, com per exemple en els pigments de les flors que atrauen als insectes pol·linitzadors, i els compostos que inhibeixen el creixement d'altres organismes vegetals, o que protegeixen a la planta d'infeccions o dels depredadors. En general, es pot afirmar que els metabòlits secundaris constitueixen la via mitjançant la qual les plantes es relacionen amb el seu voltant. La biosíntesi de molts dels metabòlits secundaris deriven del metabolisme primari del carboni, el qual proporciona un nombre de molècules menudes entre les quals destaquen l'àcid shikímic, l'acetat o els aminoàcids, que constitueixen els materials de partida de les principals rutes del metabolisme secundari (Figura 1.5).

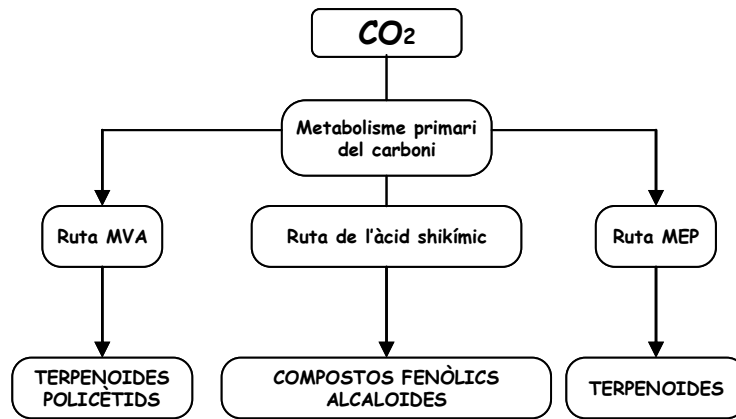


Figura 1.5 Esquema de les principals rutes i productes del metabolisme secundari en plantes

1.5.2 Rutes i metabòlits principals

Terpenoides – rutes MVA i MEP

També anomenats terpens o isoprenoides, constitueixen un dels grups més àmpliament estesos en el regne vegetal. Poden sintetitzar-s'hi per dos rutes metabòliques, la de l'àcid mevalònic (en el citosol) i la del metileritritol fosfat (en els cloroplasts), donant lloc en els dos casos tant a metabòlits primaris (giberel·lines i ABA) com secundaris de gran importància per al creixement i supervivència de les plantes. La biosíntesi dels isoprenoides comença amb la condensació de l'isopentil difosfat i/o l'isòmer dimetilalil difosfat per tal de formar els precursors dels terpens (Cao *et al.*, 2010). Els terpens solen ser insolubles en aigua i deriven tots ells de la unió d'unitats d'isoprè, encara que presenten una gran diversitat estructural. Inclouen hormones, pigments carotenoides, esterols, derivats de l'esterol, làtex i olis essencials. Molts terpenoides són comercialment interessants per el seu ús com aromes i fragàncies en alimentació i cosmètica, com a insecticides naturals, per la seua importància en la qualitat de productes agrícoles i per la seua aplicació en medicina, ja que tenen propietats anticancerígenes, antiulceroses... (Ávalos i Pérez-Urria, 2009). La seua implicació en l'estrès abiòtic sembla ser cada vegada més evident, doncs investigacions recents afirmen que les plantes sintetitzen terpens volàtils per tal d'evitar el dany oxidatiu (Schnitzler *et al.*, 2010).

Compostos fenòlics – ruta de l'àcid shikímic

Els compostos fenòlics, polifenols o fenilpropanoides deriven del fenol, compost amb un anell aromàtic i un grup hidroxil, i estan presents en tots els teixits vegetals. La majoria dels compostos fenòlics en plantes es sintetitzen per la ruta de l'àcid shikímic. A partir de l'eritrosa 4-P i d'àcid fosfoenolpirúvic s'inicia una sèrie de reaccions que condueixen a la síntesi de l'àcid shikímic i, derivats d'aquest, aminoàcids aromàtics (fenilalanina, triptòfan i tirosina). La majoria dels compostos fenòlics deriven de la fenilalanina. A partir d'ací, l'enzim PAL catalitza la formació d'àcid cinàmic, que continuarà amb la formació dels àcids *trans*-cinàmic i *p*-cumàric, que a l'hora es metabolitzen per formar els àcids ferúlic i cafèic amb la funció principal de ser precursors d'altres derivats complexes: cumarines, flavonoides, tanins, isoflavonoides i lignines (Ávalos i Pérez-Urria, 2009). Les cumarines són una àmplia família de lactones que actuen com agents antimicrobians i inhibidors de la germinació. Els flavonoides tenen una gran diversitat de funcions, entre les que es troben la defensa, protecció UV, inhibició del transport d'auxines, al·lelopatia i coloració de les flors (Buer *et al.*, 2010). Els flavonoides són els metabòlits secundaris més bioactius i es poden dividir en diferents classes: flavones, flavanones, flavonols, flavonones, isoflavones, flavanes i antocianidines (Djoukeng *et al.*, 2008). Els flavonoides juguen un paper important en la prevenció de malalties infeccioses i degeneratives, fet pel qual reben el qualificatiu de substàncies nutraceutiques. A més a més presenten propietats antioxidants degut a la seua estructura química (Tripoli *et al.*, 2007). Els tanins són compostos fenòlics polimèrics. Aquests poden ser hidrolitzables i condensats, sent aquests últims derivats dels flavonoides. Els tanins reaccionen amb les proteïnes salivars i les glucoproteïnes de la boca exercint un efecte astringent, que fa que actuen com disuasoris alimentaris per als depredadors. Els isoflavonoides també són derivats dels flavonoides, com per exemple la genisteïna, substància estrogènica aïllada del trèvol (Azcón-Bieto i Talón, 2008). Les lignines són polímers presents en les parets cel·lulars de les plantes. La biosíntesi d'aquestes comença amb la desaminació de la fenilalanina mitjançant l'acció de l'enzim PAL, per tal de formar l'àcid cinàmic (Figura 1.6), el qual patirà a continuació reaccions d'hidroxilació, metilació i reducció, formant així els monòmers principals per a la biosíntesi de lignines: els àcids cumàric i cafèic

(Figures 1.7 i 1.8), entre altres (Meyermans *et al.*, 2000; Humphreys i Chapple, 2002). L'activitat de la PAL està influenciada per l'acció de distintes hormones vegetals, com l'etilè que incrementa la seua activitat en teixits vegetals danyats per a la producció de lignines que cicatritzen la zona afectada. La biosíntesi de lignines és el resultat d'una complicada xarxa genètica on els enzims involucrats responen de manera diferent segons es tracte de factors biòtics o abiòtics (Rogers i Campbell, 2004). Quan la planta està sotmesa a estrès biòtic, les lignines es dipositen en les parets cel·lulars que rodegen la zona infectada per tal d'incrementar la seua rigidesa i resistència, mantenint així als patògens aïllats. No obstant, (Matsuura *et al.*, 2009) han descrit l'acumulació d'aquestos compostos i altres relacionats en resposta a estrès abiòtic. No es coneix, però, el paper d'aquestes substàncies en la resposta a l'estrès ambiental, encara que es creu que podrien tindre una funció com a antioxidants conjugats a altres metabòlits, com les poliamines.

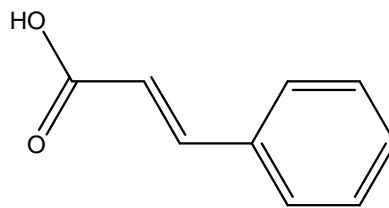


Figura 1.6 Estructura química de l'àcid cinàmic

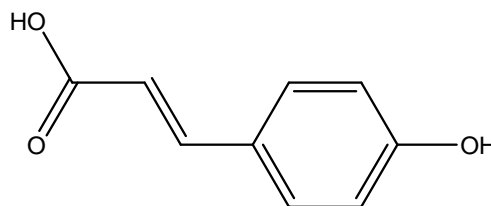


Figura 1.7 Estructura química de l'àcid cumàric

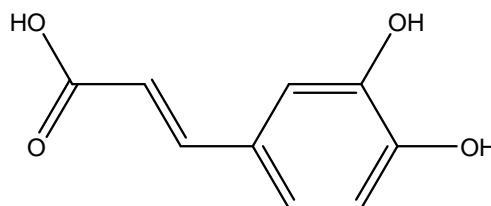


Figura 1.8 Estructura química de l'àcid cafèic

1.6 Metabolòmica

1.6.1 Descripció

La metabolòmica va nàixer al final de la dècada dels 90 com la tercera via principal de la genòmica funcional, al costat de la transcriptòmica i la proteòmica (Ducruix *et al.*, 2008). La metabolòmica és una disciplina dedicada al estudi global del metaboloma, és a dir, del conjunt de metabòlits sintetitzats per un organisme, la seua dinàmica, composició, interaccions i respostes a canvis en el seu medi natural, com a última expressió del seu genotip (Oliver *et al.*, 1998). S'estima que en el regne vegetal hi ha al voltant de 200.000 metabòlits, o inclús més (Oksman-Caldentey i Saito, 2005). *Metabolomics* és la identificació i quantificació de tots el metabòlits presents en una mostra biològica específica d'una planta en unes determinades condicions (Fiehn, 2002). La metabolòmica busca una anàlisi veritablement imparcial, quantitativa i qualitativa de tots els compostos presents en una mostra. No s'ha de restringir per propietats fisicoquímiques dels metabòlits, com el pes molecular, polaritat, volatilitat, càrrega elèctrica, estructura química, entre altres.

Desafortunadament, els metabòlits presenten molta més variabilitat que els gens i les proteïnes en quan a àtoms i subgrups es refereix, no es poden seqüenciar, ni tampoc existeix cap plataforma capaç d'analitzar tots els metabòlits presents en una mostra, de manera que s'han dissenyat diverses estratègies per tal d'aconseguir respostes a qüestions específiques, mitjançant l'aplicació de diferents mètodes i tècniques analítiques complementaries (Fiehn, 2002). Com que actualment no existeix una única tecnologia disponible que permeti tal anàlisi exhaustiva, la metabolòmica es caracteritza per l'ús de múltiples tècniques. La metabolòmica també utilitza la quantificació relativa, i ha d'incloure, a més a més, un fort enfocament en la identificació de nous metabòlits. Entre totes les tècniques metabolòmiques, el *metabolite profiling* i el *metabolic fingerprinting* són les més utilitzades en la investigació (Dettmer *et al.*, 2007; Shulaev *et al.*, 2008).

Metabolic fingerprinting

Aquesta estratègia està sent àmpliament utilitzada per a identificar patrons metabòlics associats a una resposta determinada a l'estrès sense la necessitat d'identificar ni de quantificar tots els metabòlits de la mostra. El *metabolic fingerprinting* es centra en replegar i analitzar dades de mescles crues de metabòlits per a classificar mostres en lloc de separar els metabòlits segons els seus paràmetres químics (Weckwerth, 2003). El *fingerprinting* es pot dur a terme amb una gran varietat de tècniques analítiques, incloent-hi l'RMN (Krishnan *et al.*, 2005), MS (Goodacre *et al.*, 2003), FT-ICR-MS o FT-IR (Johnson *et al.*, 2003). La millor tècnica en quant a sensibilitat, poder de resolució i baix límit de detecció es refereix, és MS, però presenta el desavantatge que genera gran quantitat d'adductes i espectres molt complexos. Els *metabolic fingerprints* poden ser analitzats amb una gran varietat de tècniques estadístiques multivariants (Sumner *et al.*, 2003), entre elles: PCA, PLS i ANOVA i les seues combinacions; que s'utilitzen en aplicacions metabolòmiques per tal de disminuir les variables i obtenir així dades correlacionades.

Metabolite profiling

El *metabolite profiling* és la més emprada per a la quantificació relativa de determinats metabòlits presents en una mostra biològica. Aquesta tècnica es pot orientar tant per a anàlisi *targeted* com *untargeted*. El *target analysis* utilitza protocols especialitzats per a anàlisis concrets, i s'utilitza principalment amb fins de selecció i anàlisis que requereixen una sensibilitat molt elevada tals com el seguiment de fitohormones. Aquests compostos diana solen ser quantificats de manera absoluta mitjançant l'ús de corbes de calibratge i d'isòtops estables com a estàndards interns (Durgbanshi *et al.*, 2005). El *untargeted metabolite profiling* s'empra particularment per a obtenir una visió global del metabolisme d'estudi o per a identificar nous metabòlits. En general, tant per a anàlisis dirigits com per als no dirigits, el procediment analític es restringeix a la identificació i quantificació d'uns quants metabòlits, de manera que l'extracció i purificació de la mostra s'orienta segons les propietats químiques d'eixos compostos, reduint així la interferència d'altres compostos que no són d'interès. Moltes són les tècniques que poden ser emprades per a realitzar perfilats, entre

elles, RMN, GC-MS, LC-MS, CE-MS i FT-IR. Alguns exemples en aquest sentit poden constituir l'anàlisi de carotenoides per HPLC-UV, així com l'anàlisi de carbohidrats acoblant la detecció per índex de refracció, l'anàlisi d'aminoàcids mitjançant LC-FLD després de derivatització o anàlisi d'intermediaris del cicle dels àcids tricarboxílics mitjançant GC-MS, hormones vegetals acídiques per LC-MS/MS (Fiehn, 2002; Durgbanshi *et al.*, 2005).

Basant-se en l'objectiu específic de l'anàlisi i la manipulació de les dades, els estudis metabolòmics es poden classificar en: discriminadors, informatius i predictius. Les anàlisis de tipus discriminador es centren en diferenciar mostres sense la necessitat de crear models estadístics per a identificar vies que permeten caracteritzar tals diferències. Per exemple, el vi s'ha classificat per varietat de raïm i àrea de producció mitjançant tècniques metabolòmiques (Son *et al.*, 2008), i s'han realitzat perfilats metabolòmics per tal de distingir entre genotips de cítrics (Arbona *et al.*, 2009). La discriminació s'aconsegueix mitjançant l'ús de tècniques d'anàlisi multivariant, sent la ferramenta més utilitzada per a aquest fi la PCA seguida d'HCA. Aquesta i altres tècniques s'han descrit àmpliament en revisions recents (Van Der Werf *et al.*, 2005; Kemsley *et al.*, 2007). Per una altra banda, les anàlisis metabolòmiques de tipus informatiu persegueixen la identificació i quantificació de metabòlits per tal d'obtenir informació més exhaustiva de la mostra. La metabolòmica informativa s'ha utilitzat en el desenvolupament i actualització de bases de dades tals com la base de dades del metaboloma humà (Wishart, 2007). La investigació de possibles rutes metabòliques, nous compostos bioactius, biomarcadors, la creació de bases de dades especialitzades i l'estudi de funcionalitat de metabòlits també es poden dur a terme mitjançant la metabolòmica informativa (Böttcher *et al.*, 2008b). Finalment trobem la metabolòmica predictiva. En aquest cas, els models estadístics es creen per a predir una variable que és molt difícil de quantificar per altres vies, com per exemple, s'han desenvolupat alguns models per a predir la qualitat sensorial del te verd (Ikeda *et al.*, 2007). Aquests models es realitzen normalment mitjançant tècniques tals com la PLS (Lisec *et al.*, 2008), i correlacions canòniques (Hannah *et al.*, 2006).

1.6.2 El procés de l'anàlisi metabòlica

La metabòlica és una poderosa eina per a l'estudi dels sistemes biològics, que inclou no només l'anàlisi química i tractament de dades, sinó també el disseny experimental, el preprocessament de les dades, així com la seua posterior interpretació biològica. L'anàlisi metabòlica consisteix en una seqüència de passos que inclouen la preparació de la mostra, l'extracció dels metabòlits, la derivatització, la separació dels metabòlits, la detecció i el tractament de les dades (Figura 1.9).

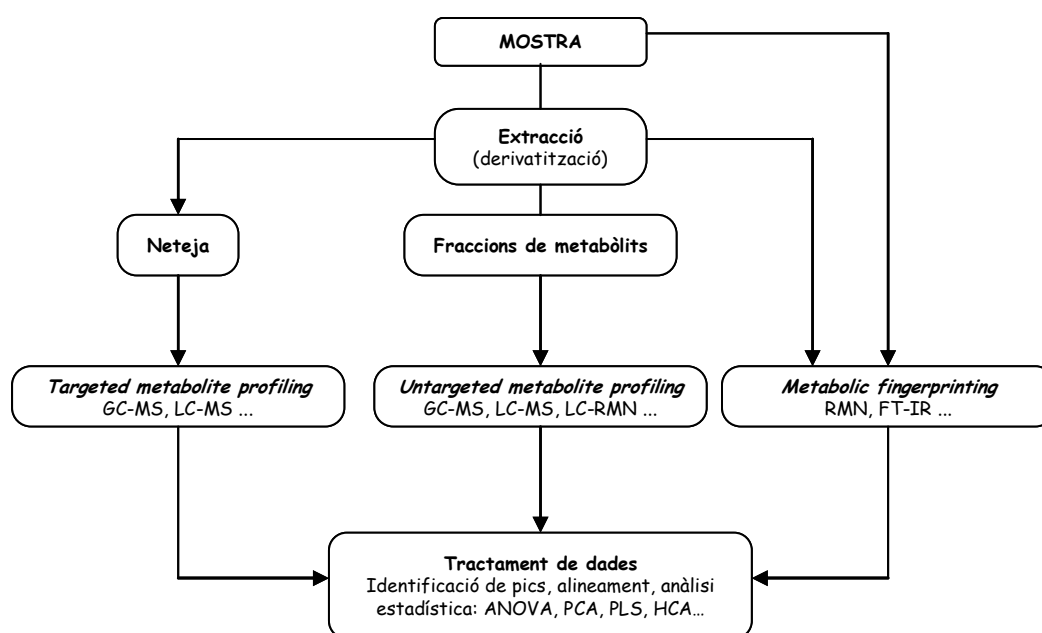


Figura 1.9 Representació esquemàtica del procés de l'anàlisi metabòlica

- Preparació de la mostra: Quan es tracta de detectar simultàniament tots els metabòlits presents en un teixit vegetal és molt important el pas de preparació de la mostra, ja que és necessari parar ràpidament l'activitat enzimàtica inherent de les mostres biològiques per tal de mantenir la integritat metabòlica del teixit en qüestió. Açò es pot aconseguir mitjançant congelació amb immersió en nitrogen líquid (Fiehn, 2002). Però, hi ha que tindre en compte la possible descongelació parcial de les mostres que pot causar l'evaporació de metabòlits termolàbils en el moment de l'extracció, i que es pot evitar mitjançant la liofilització del material vegetal congelat. Una altra estratègia comú per tal de

parar l'activitat enzimàtica és mitjançant la modificació extrema del pH (Mashego *et al.*, 2007).

- Extracció dels metabòlits: Aquest pas, és probablement el més crític que pot afectar directament a la qualitat de les dades finals, ja que l'objectiu és maximitzar les quantitats i concentracions dels compostos d'interès. Normalment es realitzen les extraccions amb solvents orgànics com el metanol, mesclades de metanol-aigua, metanol-aigua-cloroform o etanol, afegits directament sobre les mostres congelades (Johansen *et al.*, 1996; Gullberg *et al.*, 2004). A l'anàlisi de poliamines, per exemple, l'extracció es du a terme en medi àcid (Meijón *et al.*, 2010). A més a més, l'extracció es sol completar, amb l'objectiu d'augmentar l'eficiència, mitjançant calor o tècniques com l'extracció líquid-líquid, extracció amb fluids supercrítics i sonicació, entre altres (Fiehn, 2002).

- Derivatització: La derivatització pot ser utilitzada per tal d'aconseguir nombrosos objectius, per exemple per a augmentar l'eficiència de la ionització, per a destacar i localitzar funcions químiques, o per a modificar la polaritat dels compostos. En alguns casos, sobre tot quan la tècnica de separació és GC, és molt comú la derivatització dels metabòlits per tal de fer-los volàtils o termostables (Gullberg *et al.*, 2004).

- Separació i detecció: Les tècniques de separació més utilitzades han segut la LC, la GC i la CE, acoblades en la majoria dels casos a detectors del tipus MS, RMN i NIR (Rochfort, 2005; Bedair i Sumner, 2008; Wishart, 2008). Totes aquestes tècniques són complementàries entre elles, i la seua elecció dependrà del tipus de metabòlits objecte d'estudi. Per exemple, quan es volen analitzar compostos amb polaritat elevada o volàtils s'ha de recórrer a la GC. Aquesta tècnica ofereix una cromatografia molt robusta i una molt bona eficiència en la separació, que resulta amb una major reproductibilitat dels temps de retenció que en el cas de la LC. A més a més, existeix una gran disponibilitat de llibreries amb compostos de referència (Fiehn *et al.*, 2000; Roessner *et al.*, 2001). Però, la separació mitjançant LC acoblada a espectròmetres de masses híbrids del tipus Q-TOF és una de les tècniques

més versàtils per a realitzar perfilats, ja que la LC és la tècnica més compatible per a analitzar biomolècules. A més a més, la exactitud en la mesura de la massa, el reconeixement del patró isotòpic vertader i la gran sensibilitat del Q-TOF fan possible calcular la composició elemental de les senyals detectades (von Roepenack-Lahaye *et al.*, 2004).

- Tractament de dades: Una vegada s'han adquirit les dades metabolòmiques, es procedeix a l'extracció dels senyals cromatogràfics, que es pot dur a terme amb diferents programes bioinformàtics. Alguns exemples d'aquests programes són: MetAlign (De Vos *et al.*, 2007), MzMine (Katajamaa i Oresic, 2005) o XCMS (Smith *et al.*, 2006), que realitzen automàticament l'extracció, alineament i correcció del temps de retenció dels senyals cromatogràfics adquirits. Aquests programes generen una matriu de dades que s'ha de reduir per tal d'interpretar els resultats. En el cas del *target analysis* les mostres es solen comparar amb compostos de referència. Si es tracta de *untargeted analysis*, les dades es tracten amb mètodes multivariants, com la PCA, per tal d'agrupar-les. Degut a que els canvis en el metaboloma objecte d'estudi poden ser més o menys dràstics, la tècnica estadística adequada dependrà en cada cas en particular. Per exemple, la PCA crea noves variables mitjançant combinació lineal dels metabòlits detectats a l'hora que maximitza les diferències entre mostres, facilitant així la interpretació dels resultats, que continuarà amb la classificació de les mostres i amb la identificació dels metabòlits d'interès. L'anàlisi de clústers, i en particular HCA, serveix per a classificar les dades en grups i observar similituds entre elles.

La metabolòmica està ampliant les seues aplicacions, que ja van des de l'alimentació fins a la medicina i l'ecologia (Wishart, 2008; Bundy *et al.*, 2009). En la biologia vegetal, la metabolòmica s'ha aplicat àmpliament a l'estudi de plantes model com *Arabidopsis thaliana* o cultius com la tomata i la creïlla (Catchpole *et al.*, 2005; Keurentjes *et al.*, 2006; Moco *et al.*, 2006), i s'està estenent també a l'estudi de plantes silvestres (Kunin *et al.*, 2009; Leiss *et al.*, 2009). En particular, s'està aplicant àmpliament per a l'estudi de les respostes de les plantes a l'estrès. Per exemple, (Johnson *et al.*, 2003) utilitzaren el *metabolic fingerprinting* per tal d'identificar canvis metabòlics en fruits de

tomata sotmeses a estrès salí, mitjançant espectroscòpia FT-IR. Els acoblaments LC-MS i GC-MS s'han emprat per a realitzar un *profiling* en plantes d'*Arabidopsis* sotmeses a estrès salí, amb eines bioinformàtiques com la PCA (Kim *et al.*, 2007).

La metabolòmica s'està convertint en una de les ferramentes més poderoses per a estudiar les respostes de les plantes a l'estrès. La seua combinació amb altres de les disciplines 'òmiques' oferirà possiblement nous descobriments sobre el metabolisme, i la forma d'activar-lo per tal d'augmentar la tolerància de les plantes i cultius a les condicions ambientals adverses.

2. Objectius i pla de treball

2. OBJECTIUS I PLA DE TREBALL

L'objectiu principal d'aquest treball és el desenvolupament d'una plataforma d'anàlisi metabòlica per a abordar estudis sobre els canvis bioquímics associats al metabolisme secundari vegetal en resposta a condicions mediambientals adverses. Dins d'aquest objectiu general, la plataforma desenvolupada s'aplicarà a dos models vegetals: per una banda, el tàndem *Arabidopsis thaliana* i *Thellungiella halophila*; i els patrons de cítrics citrange Carrizo i mandarí Cleopatra, per una altra. Els objectius específics es detallen a continuació:

I. Optimització d'una plataforma metabòlica

En aquesta part de la tesi l'objectiu perseguit és el desenvolupament i optimització d'una plataforma d'anàlisi metabòlica per a la seua aplicació en extractes vegetals. El desenvolupament d'aquesta plataforma implica el disseny d'una metodologia analítica instrumental robusta que permeta l'anàlisi no esbiaixat de gran quantitat de mostres. Per a dur a terme aquesta tasca, s'han seleccionat dos grups d'estudi: un de comparació entre genotips i un altre d'anàlisi d'una sèrie temporal; amb la intenció d'establir el que serà, posteriorment, la metodologia a seguir en tots els experiments d'estrès ambiental que es descriuran en aquesta memòria.

II. Respostes fisiològiques, hormonals i metabòliques, comunes i divergents entre *Arabidopsis thaliana* i *Thellungiella halophila* sotmeses a estrès hídric i salí

En un segon bloc d'estudis, es pretén estudiar les respostes fisiològiques, hormonals i metabòliques d'*Arabidopsis* i *Thellungiella* front a l'estrès salí i per dessecació, i definir quines respostes són claus en la tolerància i/o sensibilitat a l'estrès. Per a dur a terme aquesta tasca, es planteja definir dos grups d'experiments: excisió de la roseta basal per a simular una situació de sequera i la irrigació de les plantes amb NaCl dissolta en l'aigua de reg fins una concentració de 200 mM. La pèrdua d'aigua així com l'acumulació de clorurs es

mesuraran com a respostes fisiològiques importants, i es realitzaran determinacions d'ABA, JA i prolina. A més a més, s'aplicarà la tècnica d'anàlisi metabòmic per a avaluar canvis en els metabòlits secundaris d'ambdós grups d'experiments en resposta a l'estrès imposat. Els canvis observats es discutiran en termes de diferències en el genotip així com tipus i pressió de l'estrès.

III. Canvis hormonals i metabòlics en arrels de cítrics sotmesos a estrès per inundació i estrès per sequera

En aquesta tercera part, es proposa caracteritzar les variacions hormonals i bioquímiques en plantes de dues espècies de cítrics sotmeses a estrès hídric i a embassament radicular, centrant-se en les arrels com a òrgans clau en la interacció amb l'ambient. Per a dur a terme tal tasca, es planteja analitzar la concentració radicular de prolina, així com de distintes hormones vegetals (ABA, JA, SA, IAA) i d'àcids fenòlics precursors de lignines. A més a més, es pretén abordar estudis dels canvis en el metabolisme secundari emprant la plataforma metabòmica desenvolupada. Les espècies esmentades s'han descrit com a tolerants i sensibles a les condicions d'estrès proposades, llavors les diferències observades es relacionaran amb la relativa tolerància del genotip així com el tipus d'estrès i la pressió exercida sobre l'òrgan radicular.

3. Materials i mètodes

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1 Material vegetal i sistemes experimentals

3.1.1 *Arabidopsis thaliana* i *Thellungiella halophila*

Abans de sembrar, les llavors d'*Arabidopsis thaliana* Columbia-0 (*Arabidopsis*) i de *Thellungiella halophila* Shandong (*Thellungiella*) foren esterilitzades superficialment mitjançant immersions en etanol al 70 %, durant 10 minuts, i d'hipoclorit sòdic (0.2 % w/v), durant 3 minuts. Seguidament, aquestes llavors es llavaren repetidament amb aigua destil·lada estèril i es deixaren estratificar a 4 °C durant 4 i 10 dies per a *Arabidopsis* i *Thellungiella*, respectivament. Després de l'estratificació, les llavors es sembraren en pastilles de torba premsada prèviament hidratades (Jiffy Productos España S.L.U, València) de 41 mm de diàmetre, es deixaren germinar i créixer durant dues setmanes aproximadament, i aleshores es trasplantaren individualment a noves pastilles de torba. Les plantes d'*Arabidopsis* s'utilitzaren per als experiments d'excisió de la rosseta basal i salinitat a l'estadi 3.70 (4 setmanes d'edat), segons (Boyes *et al.*, 2001). Per al cas de *Thellungiella* els experiments es realitzaren dues setmanes després, coincidint amb un estadi similar al d'*Arabidopsis*, tenint en compte el seu retard en el creixement (Inan *et al.*, 2004). Durant tot el període de creixement i també en el període experimental es va emprar un fotoperíode de 9:15 hores (dia/nit) i temperatures diürna i nocturna de 26.0 ± 2.0 °C i 18.0 ± 2.0 °C, respectivament, amb una humitat relativa mitjana del 70 %. Les plantes es regaren de forma alternada amb aigua desionitzada o solució nutritiva de Hoagland tal i com es descriu a (Bañuls i Primo-Millo, 1992).

3.1.2 Excisió de la rosseta basal

Amb l'objectiu de simular l'estrès hídric, es van sotmetre plantes d'*Arabidopsis* i *Thellungiella* a experiments d'excisió de la rosseta basal i posterior dessecació. Les plantes es tallaren amb un bisturí per sobre de l'arrel i es deixaren assecar durant un període màxim de quatre hores (experiments preliminars mostraren que els canvis hormonal i fisiològics més importants es produeixen en aquest

període de temps) a la cambra de cultiu, prenent mostres representatives a diferents temps dins d'aquest període (0, 20, 40, 60, 120 i 240 minuts). El procediment per a calcular la pèrdua d'aigua es descriu a l'apartat 3.2. Al final de cada període de dessecació, les mostres es congelaren amb nitrogen líquid i s'emmagatzemaren a -80 °C fins la seua posterior anàlisi.

3.1.3 Salinitat

Per a dur a terme els experiments d'estrès salí, les plàntules d'*Arabidopsis* i *Thellungiella* es disposaren de forma espaiada en safates de 30x60 cm, per tal d'evitar el contacte entre fulles de diferents rossetes. El conjunt de plantes de cada espècie es va dividir en dos grups, un es va regar tal i com es descriu a l'apartat 3.1.1, que va ser el control, i l'altre grup es va regar de la mateixa manera però complementant la solució de reg amb NaCl a una concentració final de 200 mM. Mostres representatives de cada grup i de cada espècie es recolliren després de 5, 9, 13 i 20 dies de tractament. Les rossetes basals es processaren i congelaren immediatament en nitrogen líquid. El material vegetal congelat es va emmagatzemar a -80 °C fins la seua posterior anàlisi.

3.1.4 mandarí Cleopatra i citrange Carrizo

Plàntules de quatre mesos d'edat de citrange Carrizo (*Citrus sinensis* L. Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) i de mandarí Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) procedents d'un viver de cítrics autoritzat, es trasplantaren a cossiols de 2 L de capacitat emprant perlita com a substrat per als experiments d'estrès hídric i una mescla de torba, perlita i vermiculita en proporció 80:10:10 per als experiments d'inundació. Aquestos dos grups de plantes es mantingueren en condicions naturals de fotoperíode a l'hivernacle durant aproximadament 2 mesos abans de l'inici dels tractaments, per tal de permetre l'aclimatació al nou ambient. Durant aquest temps, la humitat relativa fou entre el 70 i 90 %, la temperatura diürna 26.0 ± 4.0 °C i la temperatura nocturna 18.0 ± 3.0 °C. Els experiments es realitzaren durant els mesos de Maig i Juny, durant els quals el fotoperíode natural s'aproximà a 16 hores de llum i 8 de foscor. Durant el temps d'aclimatació i també durant els experiments, els grups de plàntules que ho

requeriren es regaren tres vegades per setmana de forma alternada amb aigua destil·lada i solució nutritiva de Hoagland modificada per a cítrics (Bañuls i Primo-Millo, 1992).

3.1.5 Inundació

Per a dur a terme els experiments d'inundació del substrat, plantes de mandarí Cleopatra i citrange Carrizo d'uns sis mesos d'edat al final del període d'aclimatació, se seleccionaren atenent a la homogeneïtat en aspecte i estat de desenvolupament. Per a imposar el tractament d'inundació, mantenint la mescla de substrat original (com es descriu a l'apartat 3.1.4), els cossiols foren introduïts en bosses opaques de plàstic i, posteriorment, en cossiols de major capacitat (al voltant de 4 L) que s'ompliren amb aigua de l'aixeta fins cobrir completament el substrat. Un altre grup de plantes sense inundar es va regar tal i com es descriu a l'apartat 3.1.4 a mode de control. En aquest grup d'experiments, l'objectiu fou investigar els canvis hormonals i metabòlics que tenen lloc a la part radicular, per la qual cosa es prengueren mostres representatives de les arrels després de 1, 3, 6 i 8 dies de tractament. Es seleccionaren arrels fines secundàries i es congelaren immediatament en nitrogen líquid. Les mostres congelades es conservaren a -80 °C fins la seua posterior anàlisi.

3.1.6 Sequera

Plàntules de citrange Carrizo i mandarí Cleopatra, seleccionades de forma idèntica a l'apartat anterior s'empraren per als experiments d'estrès hídric. De forma aleatòria, les plàntules es dividiren en dos grups: control i estrès hídric i es trasplantaren a cossiols nous de 2 L emprant en aquesta ocasió perlita com a substrat, que permet un control més estricte del contingut hídric com a conseqüència de la seua baixa capacitat de retenció, a diferència de la torba. Les plantes del grup control es regaren de forma regular tal i com es descriu a l'apartat 3.1.4 mentre que el grup d'estrès simplement es va deixar de regar. El període de tractament es va allargar fins els 14 dies, moment en el qual els símptomes foliars foren evidents. Al llarg d'aquest període es recolliren mostres

d'arrels fines secundàries (a dies 3, 5, 7, 12 i 14) que es congelaren immediatament en nitrogen líquid i es conservaren a -80 °C fins la seua posterior anàlisi.

3.2 Mesures de pèrdua d'aigua

En els experiments de dessecació realitzats en *Arabidopsis* i *Thellungiella* es va avaluar la pèrdua d'aigua com a paràmetre fisiològic de rellevància (Verslues *et al.*, 2006). Aquest paràmetre es va estimar mitjançant la pesada de la rosseta basal immediatament després de l'excisió (T_0) i al cap del període de dessecació (T_1) determinat en cada cas (20, 40, 60, 120, i 240 minuts). La diferència entre ambdues pesades (T_0-T_1) constituïria la pèrdua en pes d'aigua. Per tal de permetre la comparació entre rossetes de diferent pes el resultat es va expressar en percentatge $((T_0-T_1) \cdot 100 / T_0)$ i el resultat final com a percentatge de pes fresc resultant o pèrdua d'aigua: $100 - [(T_0-T_1) \cdot 100 / T_0]$.

3.3 Determinació d'ions clorur

La determinació de la concentració foliar d'ions clorur en rossetes basals d'*Arabidopsis* i *Thellungiella* es va dur a terme mitjançant valoració potenciomètrica automàtica amb un clorímetre Sherwood Model 926 (Sherwood Scientific Ltd. Cambridge, Regne Unit), mitjançant la metodologia descrita a (Gómez-Cadenas *et al.*, 1998). El teixit foliar es va homogeneïtzar manualment en nitrogen líquid amb un morter i una massa prèviament refredats fins aconseguir una pols fina. D'aquest material homogeneïtzat es prengueren 0.25 g per cada rèplica biològica i es van incubar amb 25 mL d'una solució freda de HNO_3 0.1 N (Panreac, Barcelona, Espanya) i àcid acètic glacial al 10 % (Panreac). La mescla es va agitar suaument durant tota una nit a temperatura ambient, i a l'endemà l'extracte es va filtrar a través de paper de filtre tipus Whatman n°1 i el filtrat resultant (0.5 mL) es va emprar directament per a les determinacions. Els resultats s'expressaren en mg de $\text{Cl}^- \text{g}^{-1}$ pf.

3.4 Determinació de la concentració de prolina

Per a la determinació de la concentració de prolina en el teixit foliar de plantes model i radicular de cítrics es prengueren 0.05 g de material vegetal homogeneïtzat i es va suspendre en 5 mL d'una solució d'àcid sulfosalicílic al 3 % (Panreac) emprant un dispersador (Ultra-Turrax, IKA-Werke, Staufen, Alemanya). L'homogenat resultant es va centrifugar a 4000 x g, a 4 °C i durant 45 min, després dels quals es va recuperar 1 mL de sobrenadant per a l'assaig descrit en (Bates *et al.*, 1973). De forma breu, el sobrenadant es va combinar amb 2 mL d'una mescla d'àcid acètic glacial i reactiu de ninhidrina (preparat al laboratori amb ninhidrina comercial, àcid acètic glacial i H₃PO₄) en proporció 1/1 (v/v). Aquesta mescla es va deixar incubar a 100 °C en un bany termòstat durant 1 hora; passat aquest temps es deixà refredar en bany de gel abans de mesurar l'absorbància a 520 nm (Espectrofotòmetre Thermo, USA). El valor obtingut es va interpolar en una corba estàndard que es va elaborar emprant prolina comercial (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanya) seguint el mateix procés que s'ha descrit en aquest apartat.

3.5 Determinació de fitohormones

Als experiments realitzats en *Arabidopsis* i *Thellungiella* s'analitzaren les concentracions endògenes d'ABA i JA seguint el protocol descrit en (Durgbanshi *et al.*, 2005), i als experiments realitzats en cítrics, a més a més, s'analitzaren el SA, l'IAA i distints precursors de lignines (àcids cumàric, cinàmic i cafèic) mitjançant una modificació del protocol abans esmentat. Breument, el teixit vegetal homogeneïtzat (0.4 g) es va extraure en 5 mL d'aigua destil·lada després de fortificar amb estàndards interns: [²H₆]-ABA (100 ng, preparat segons es descriu en (Gómez-Cadenas *et al.*, 2002)), àcid dihidrojasmonic (100 ng, sintetitzat al laboratori per hidrogenació catalitzada segons (Kristl *et al.*, 2005)), [²H₂]-IAA (10 ng, Sigma-Aldrich) i [²H₄]-SA (100 ng, Sigma-Aldrich). Els extractes es centrifugaren a 4000 x g, a 4 °C i durant 45 min. Posteriorment, el sobrenadant es va recollir en tubs nets i s'ajustà el pH a 3.0 emprant una solució d'àcid acètic al 30 % (v/v). Els extractes acidificats es van particionar dues vegades amb 3 mL d'èter etílic (grau ACS, Scharlau,

Barcelona, Espanya). La fase orgànica superior es va recuperar en un vial net, combinant ambdues particions i dessecant-les al buit emprant una centrífuga d'evaporació acoblada a trampa freda (RC 10.22 i RT 10.90, Jouan, Saint-Herblain Cedex, França). El residu sec es va suspendre afegint 100 μL de metanol (grau HPLC, Scharlau) als tubs d'assaig i submergint-los en un bany d'ultrasons durant 10 min. Posteriorment es va completar el volum fins 1 mL amb aigua pura (MilliQ). Les solucions resultants es van filtrar a través de filtres de cel·lulosa regenerada de 0.2 μm de diàmetre de porus abans de la seua anàlisi.

L'anàlisi es va dur a terme mitjançant un equip HPLC (Alliance 2860, Waters Corp., Milford, USA) acoblat a un espectròmetre de masses en tàndem amb interfície d'electrosprai (Quattro LC, Micromass, Manchester, UK). Per a la qual cosa s'injectaren alíquotes de 20 μL i es separaren en una columna de fase reversa (Kromasil 100, C18, 5 μm , 100 \times 2.0 mm, Scharlau) emprant un gradient lineal de metanol i aigua ultrapura complementada amb àcid acètic fins una concentració final de 0.01 % (v/v) i un flux de 0.3 mL/min. La discriminació i detecció de cada analit es va aconseguir seguint el patró de fragmentació i temps de retenció característics. Les condicions pròpies d'ionització i col·lisió per a cada compost es van optimitzar mitjançant infusió directa d'estàndards purs concentrats (aproximadament 5 mg/L). La quantificació dels analits d'interès es va dur a terme atenent al factor resposta ($\text{àrea}_{\text{analit}}/\text{àrea}_{\text{std}}$) interpolat en una corba de calibrat injectada de forma alternada amb les mostres. El processat dels cromatogrames, la integració i la quantificació es va dur a terme emprant el software propi de l'instrument, MassLynx 4.0.

3.6 Perfilats metabòlics

La metodologia general es representa en el següent esquema, Figura 3.1, i es detalla a continuació.

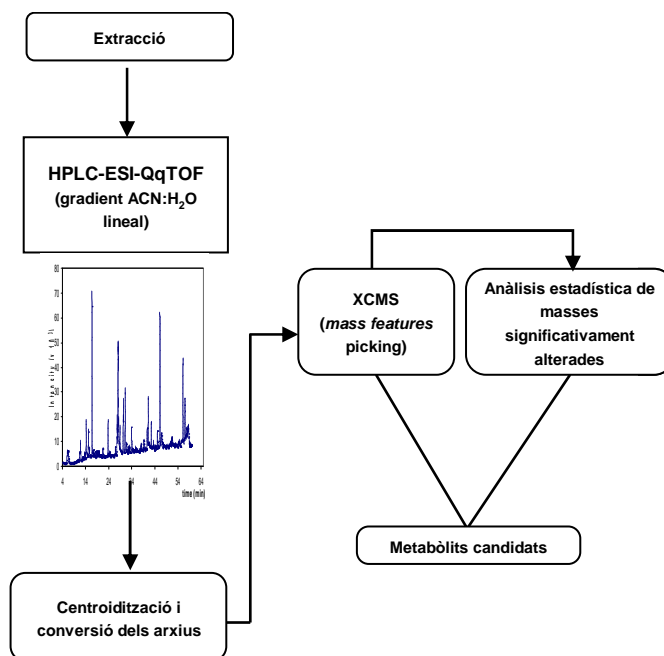


Figura 3.1 Esquema de la metodologia general del perfilat metabòlic

3.6.1 Extracció dels metabòlits

Per tal de dur a terme l'extracció del major nombre de metabòlits secundaris de les mostres, es pesaren 100 mg de material vegetal congelat a -80 °C tal i com s'ha descrit en els apartats anteriors, i es suspengueren dues vegades amb 200 µL de metanol al 80 % mitjançant incubació en bany d'ultrasons durant 10 minuts. Després de cada extracció els extractes es van centrifugar a 10000 x g, a 4 °C i durant 10 minuts. Els extractes metanòlics de cada mostra es combinaren i filtraren a través de filtres de membrana PTFE de 0.45 µm de diàmetre de porus. Abans de l'extracció es van afegir 400 ng (concentració final d'1 mg/L després de les dilucions) dels analits següents per tal de fer-los servir com a estàndards interns, per a l'avaluació de les variacions en el temps de retenció i sensibilitat de l'equip: kinetina, biochanina A, rutina, àcid o-anísic, àcid ferúlic i N-(3-indolilacetil)-L-fenilalanina (tots comprats a Sigma Aldrich).

Els extractes obtinguts es diluïren convenientment amb metanol al 80 % d'acord amb els resultats de linealitat.

3.6.2 Anàlisi instrumental

Les mostres filtrades i diluïdes s'injectaren a un HPLC Waters Alliance 2965 per dur a terme la separació amb un gradient de fase mòbil lineal aigua ultrapura-acetonitril (Taula 3.2) complementats amb àcid fòrmic fins una concentració del 0.1 % en els dos casos, amb un flux de 0.3 mL/min. La separació es va dur a terme sobre una columna amb farcit de C18 (XTerraTM MS, C18, 5 µm, 2.1 x 100 mm, Waters, Milford, MA, USA). Els eluents de la columna foren introduïts a l'espectròmetre de masses, un QTOF I de Micromass Ltd. (Manchester, UK), mitjançant una interfície d'ESI ortogonal operada en mode d'ionització positiu. Com a gas de nebulització i desolvatació es va utilitzar nitrogen a fluxos de 100 i 800 unitats arbitràries, respectivament. El voltatge del capil·lar fou de 4 kV, i les energies del con i de l'extractor foren 25 i 3 eV, respectivament. La temperatura de la font es va fixar a 120 °C i la del gas de desolvatació a 350 °C. Abans de cada anàlisi es va calibrar l'espectròmetre infusionant una mescla de NaOH i HCOOH a un flux de 0.025 mL/min. A més a més, durant tot el temps d'adquisició de les dades, es va injectar post-columna una dissolució de Leucina encefalina (pèptid opioide de fórmula molecular C₂₈H₃₇N₅O₇ i relació massa/càrrega [M+H]⁺=556.2771) com a compost de referència. L'adquisició es va realitzar en mode continu en un rang de masses comprès entre 50 i 900 uma.

Taula 3.1 Gradient utilitzat en la separació cromatogràfica dels perfilats metabòlics

t (min)	H2O (0.01 % FA)	ACN (0.01 % FA)
0	95	5
4	95	5
55	5	95
60	95	5
65	95	5

3.6.3 Tractament de les dades

Una vegada adquirides les dades, s'extragueren els senyals cromatogràfics amb el software *xcms* (Smith *et al.*, 2006), que permet processar les dades per tal de dur a terme anàlisis estadístiques i quantificacions relatives. A continuació es detallen tots els passos relatius al tractament de dades, que es poden visualitzar en la Figura 3.2.

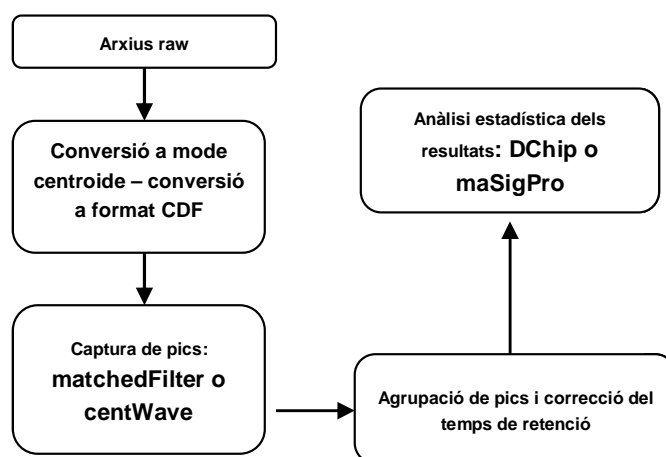


Figura 3.2 Esquema de la metodologia general del tractament de dades per al perfilat metabolòmic

Preparació dels arxius raw

Per tal de poder analitzar les dades amb el software *xcms* és necessari convertir les dades procedents de l'adquisició a un format compatible amb el software *xcms*. Les dades foren centroiditzades emprant el compost de referència, Leu-encefalina, convertides a format netCDF i a continuació s'organitzaren en carpetes diferents segons el tipus de mostra. Aquest pas és important per tal que l'*xcms* utilitze informació del tipus de mostra per a la selecció de pics durant el procés d'alineament.

Captura de pics

Durant el desenvolupament d'aquesta tesi, es provaren dos algoritmes diferents dissenyats per a l'*xcms*: el *matchedFilter* (Smith *et al.*, 2006) i el *centWave* (Tautenhahn *et al.*, 2007), que es descriuen a continuació.

-matchedFilter

Per tal de processar les dades provinents de múltiples arxius de LC-MS, l'*xcms* genera un objecte de classe *xcmsSet*, on es guardaran les llistes de pics així com els mètodes utilitzats per a agrupar-los i alinear-los. Per tal de crear aquest objecte a partir d'un grup d'arxius netCDF s'utilitza la funció *xcmsSet()*.

Els arguments per defecte que gesta aquesta funció solen treballar bé en la majoria dels casos, encara que és possible optimitzar-los si és necessari per a un instrument en particular o grup de mostres. Cada carrera o arxiu LC/MS és retallada pel software en una sèrie de fraccions delimitades pel valor de l'*step* (determina la grandària d'aquestes fraccions i va ser fixat a 0.05 m/z). A continuació es determina el senyal prenent el valor màxim d'intensitat en cada punt temporal de la fracció, i sobre aquesta s'aplica la funció de filtrat amb la segona derivada Gaussiana. El model Gaussià d'amplària de pic utilitzat per a la filtració, que és una part integral de l'algoritme de detecció de pics, pot ser especificat amb el paràmetre *fwhm* (amplària màxima del pic a meitat de la seua altura), que va ser fixat a 30 segons. La selecció de pics posterior es du a terme emprant la relació senyal/soroll com a límit inferior (*snthresh* = 10). Una vegada s'han detectat els pics en mostres individuals, aquestes s'han de fer coincidir al llarg de totes les mostres incloses a l'anàlisi, per tal de realitzar el càlcul de la desviació del temps de retenció i la comparació de la intensitat relativa de cada ió. Per a dur a terme la comparació s'empren capses que van solapant-se en intervals de 0.1 m/z, i es el que es determina amb el paràmetre *mzdiff*.

-centWave

Aquest algoritme es basa en la detecció de regions d'interès dins del rang m/z (ROI) junt amb la resolució dels pics cromatogràfics aplicant un algoritme anomenat *Continuous Wavelet Transform* (Tautenhahn *et al.*, 2007). Els paràmetres a definir foren els següents: *peakwidth*, *ppm*, *snthresh* i *prefilter*, que s'ajustaren a (6,30), 60, 10 i (6,70), respectivament. Aquests arguments corresponen, de forma anàloga a l'algoritme anterior, a amplària de pic, desviació de m/z en ppm, relació senyal/soroll i intensitat dels senyals. Per definició, *centWave* busca regions de l'espectre on m/z és estable, i és per això

que és més sensible a les variacions entre *scans* per a una determinada relació massa/càrrega.

Alineament i correcció del temps de retenció

Una vegada que els pics són detectats, el programa els agrupa segons el seu temps de retenció, de forma que aquells que representen al mateix analit formen part del mateix grup. Aquesta part també es pot optimitzar per a ajustar a les condicions experimentals modificant els paràmetres fins aconseguir una bona tolerància del temps de retenció. Per a cada grup, l'algoritme calcula la mediana del temps de retenció i la desviació de la mediana per a cada mostra dins del grup, de forma que aproxima diferències entre desviacions i interpola en seccions on no hi ha grups de pics ben correlacionats. El motiu d'ajustar el *bw* (*bandwidth*) és el de maximitzar el nombre de grups de pics proporcionant així un millor substrat a l'algoritme per a procedir a la correcció del temps de retenció. En aquest cas l'agrupament es va dur a terme en tres passos consecutius modificant el *bw* de 30 a 5 s, amb un *minfrac* = 1 (cada analit ha de trobar-se present en al menys tots els arxius d'un grup). Quan hi ha pics no trobats es substitueix el buit per NA. Una vegada finalitzada la correcció l'*xcms* genera un arxiu amb tots els pics que s'han capturat i alineat al llarg de les mostres, incloent la relació massa/càrrega mitjana, el temps de retenció i l'àrea integrada per a cada pic i mostres. En la Taula 3.2 es pot veure un exemple.

Taula 3.2 Exemple de tipus d'arxiu que genera el software quan s'ha completat l'anàlisi

mz	rt	AT CT 9D 1	AT CT 9D 2	AT CT 9D 3	AT ST 9D 1	AT ST 9D 2	AT ST 9D 3
112.095278	3500.889438	5248.660932	7140.983017	7226.705205	4242.892740	5437.849631	5624.029341
114.047948	760.686484	55.025179	63.219842	1136.822730	NA	NA	NA
124.094244	3502.689239	4257.233547	5391.130636	5090.421477	3070.412537	1407.984119	3633.390563
135.048835	825.460684	5612.537402	6336.501204	7062.741977	4983.024172	3722.427643	4468.008095
136.056460	825.793655	230.045708	295.771915	384.422685	195.667576	116.088419	189.236244
139.157535	3417.094514	NA	94.431458	79.016805	NA	NA	NA
140.152655	3416.783235	36.362976	50.761119	39.701594	NA	23.812498	NA
143.066092	3497.896561	2974.929836	6733.472656	4094.382900	1491.869599	3183.201855	2672.893220
151.116895	1686.304548	6541.995504	5583.948296	6728.053975	5621.937182	3638.508459	3502.180413
152.125794	1685.410592	526.132640	377.949202	467.553007	428.379095	251.556200	169.262139
152.150452	3416.983271	133.092313	256.549072	274.632711	NA	136.337313	NA
153.058664	825.480617	6168.832748	6954.486147	7825.447163	5978.727250	4296.586076	5072.138041
153.120404	3500.763387	2603.039263	3541.308257	3370.527816	1947.311582	2712.248841	2940.301130

3.6.4 Anàlisi estadística

PCA

Per tal d'avaluar la variabilitat existent en el conjunt de dades multivariant que proporciona el processat amb l'xcms, on el conjunt de variables són els distints pics cromatogràfics, els individus, les distintes mostres i les rèpliques injectades; la primera opció és l'anàlisi PCA. Aquest procés matemàtic transforma un nombre elevat de variables possiblement correlacionades en un nombre més petit de variables no correlacionades anomenades components principals. D'aquesta manera és possible agrupar la variabilitat existent, generalment milers de variables, a unes poques fonts que poden ajudar a explicar el sistema experimental. Per tal de dur a terme l'anàlisi de components principals es va utilitzar el programa Ginkgo, (Bouxin, 2005), amb les dades d'àrea prèviament normalitzades amb el logaritme en base dos. La PCA es va representar en tres dimensions, i normalment bona part de la variabilitat es podrà explicar amb només tres components.

Anàlisi estadística dels resultats – obtenció de les relacions m/z significativament alterades

En qualsevol tècnica d'anàlisi no dirigit és necessari incloure un apartat d'anàlisi estadística suficientment robusta com per a poder extraure les variables (m/z a un temps de retenció en concret) que són significatives i que, per tant, cal estudiar amb més profunditat. Per tal de facilitar l'anàlisi estadística en aquest tipus de dades es va optar per emprar dos programes informàtics per a l'anàlisi de dades de xips de cDNA: DChip (Li i Hung Wong, 2001) i maSigPro (Conesa *et al.*, 2006). En els experiments descrits, el software DChip es va emprar per a la comparació entre distints grups de mostres, així com en el cas de sèries temporals on sols hi havia un punt com a control, tal com es veurà més endavant. Pel contrari, maSigPro es va emprar en aquells experiments amb disseny tipus sèrie temporal amb tants punts control com tractament.

4. Optimització de la plataforma metabolòmica

4. OPTIMITZACIÓ DE LA PLATAFORMA METABOLÒMICA

4.1 Resultats i discussió

En l'actualitat, l'estudi de les variacions quantitatives i qualitatives del metaboloma ha esdevingut una part essencial en estudis que aborden l'efecte de les condicions ambientals adverses sobre la fisiologia vegetal i també en aquells estudis que pretenen caracteritzar la variabilitat genotípica existent entre diversos tipus de plantes (Roessner *et al.*, 2001; Keurentjes *et al.*, 2006; Robinson *et al.*, 2007). El metaboloma de les plantes es pot considerar com la unió entre el genotip i el fenotip de tal forma que reflecteix veritablement les diferències biològiques resultants del procés d'expressió gènica. En aquest sentit, alguns metabòlits coneguts han sigut analitzats com a biomarcadors nutricionals i agronòmics per a classificar les diferents varietats o optimitzar les condicions de cultiu. Un pas endavant en aquesta línia és el que es coneix com a metabolòmica, que consisteix en la identificació i quantificació de tots els compostos de baix pes molecular (<1000 mDa) presents en un teixit o òrgan, sota unes condicions ambientals i estadi de desenvolupament concrets. Desafortunadament, açò no és possible en l'actualitat a causa de que no existeix una sola tècnica analítica exhaustiva i que proporcioni informació estructural completa. A més a més, l'enorme varietat de compostos naturals existents fa impossible l'elucidació completa de tots ells. En aquest sentit, la majoria de les tècniques utilitzades, conegudes com a perfilats metabolòmics, consisteixen en analitzar el màxim nombre de metabòlits (Fiehn *et al.*, 2000). D'aquestes, les més emprades són aquelles que combinen l'ús d'una tècnica separativa tal com LC, GC, o CE amb l'espectrometria de masses (De Vos *et al.*, 2007). De les combinacions esmentades, l'acoblament instrumental LC amb espectròmetres de masses híbrids QTOF-MS a través d'interfície d'ESI és molt adequat per a l'anàlisi no dirigida de biomolècules (Böttcher *et al.*, 2008a). Per una banda, la LC permet l'anàlisi de metabòlits d'interès biològic sense una prèvia derivatització, com ocorre amb GC, i a més a més, la tècnica suau d'ionització ESI genera principalment ions pseudomoleculars ($[M+H]^+$ ó $[M-H]^-$, segons la polaritat), a l'hora que un baix nombre de fragments; la qual cosa unida a l'exactitud de la massa i al reconeixement del patró isotòpic vertader

del TOF, permet el càlcul de la composició elemental de la molècula candidata amb una elevada precisió. A més a més, la presència d'una cel·la de col·lisió entre el quadrupol i l'analitzador TOF permet la fragmentació dirigida dels candidats i així, la corroboració de les hipòtesis elaborades ((Von Roepenack-Lahaye *et al.*, 2004; Böttcher *et al.*, 2007; Böttcher *et al.*, 2008a; Böttcher *et al.*, 2008b).

L'objectiu principal en aquest quart capítol fou el desenvolupament i optimització d'una plataforma d'anàlisi metabolòmica per a la seua aplicació en extractes vegetals. El desenvolupament d'aquesta plataforma implica el disseny d'una metodologia analítica instrumental robusta que permeta l'anàlisi no esbiaixat de gran quantitat de mostres. A més a més, aquesta tecnologia està orientada a l'alt rendiment i això obliga a l'establiment d'eines bioinformàtiques que, a l'hora, s'han d'adaptar i optimitzar. Per a dur a terme aquesta tasca, s'han seleccionat dos grups d'estudi, amb la intenció d'exemplificar el que serà, posteriorment, la metodologia a seguir en tots els experiments d'estrès ambiental que es descriuran en aquesta memòria. Com s'ha dit abans, l'optimització de la plataforma metabolòmica abasta l'extracció de tots els compostos possibles, l'anàlisi instrumental, el tractament de les dades obtingudes i la seua posterior interpretació. Un factor molt important a tenir en compte és el nombre de senyals detectats en cada anàlisi, per tant, els passos de recol·lecció del material vegetal i extracció dels metabòlits presents són crucials i poden, en molts casos, determinar els resultats obtinguts. Per a minimitzar aquestos problemes s'inclouen proves de reproductibilitat i linealitat per a cada tipus de material vegetal emprat en la realització d'aquest treball (Böttcher *et al.*, 2007; Böttcher *et al.*, 2008b).

4.1.1 Extracció de metabòlits i anàlisi instrumental

De cadascun dels genotips i teixits objecte d'estudi, es prengueren tres mostres de 100 mg cadascuna (es consideren tres rèpliques en cada cas) i es va realitzar una doble extracció amb 200 µL de metanol al 80 %, sonicant en bany d'ultrasons i centrifugant en cada ocasió. La separació cromatogràfica es va dur a terme en fase reversa sobre columna de C18, emprant ACN i H₂O

(complementats ambdós amb àcid fòrmic fins una concentració del 0.1 %), tal i com s'indica a l'apartat 3.6.2. L'adquisició es va realitzar amb un espectròmetre de masses tipus QTOF en mode ESI positiu, en continu i en un rang de masses comprès entre 50 i 900 uma, obtenint cromatogrames com els que es mostren la Figura 4.1.

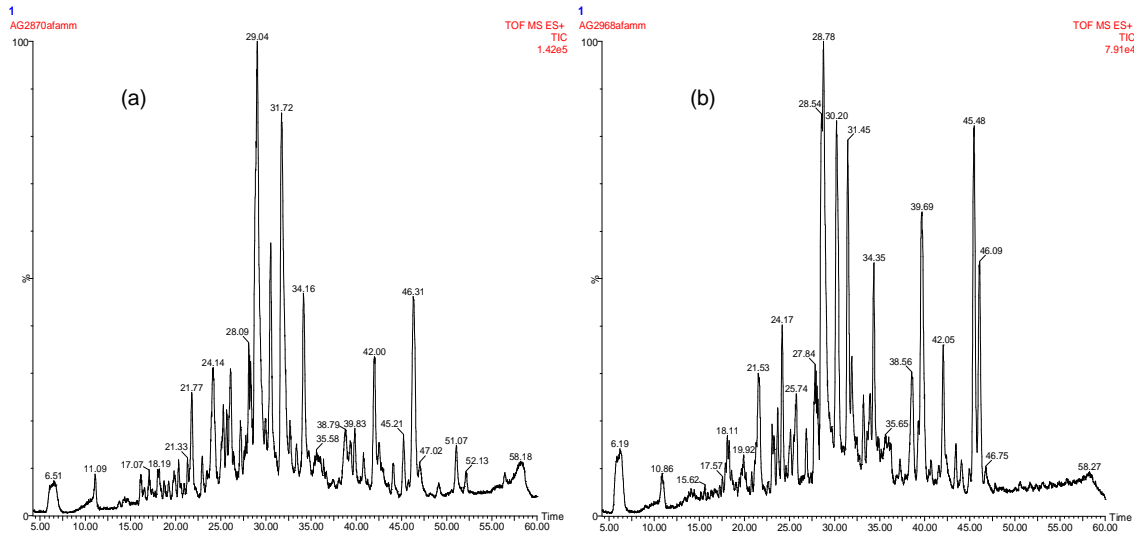


Figura 4.1 Cromatogrames TIC d'extractes d'arrel de: (a) mandarí Cleopatra, (b) citrange Carrizo

4.1.2 Tractament de dades

Hi han diversos factors que poden afectar la fiabilitat en la mesura de la massa exacta dels compostos, entre altres la intensitat del senyal és un factor clau. Per la qual cosa, les dades adquirides en mode continu es centroiditzaren emprant com a referència el compost que s'injectà de forma continua a l'eixida de la columna cromatogràfica, tal i com s'explica en l'apartat 3.6.2 de materials i mètodes. Aquesta operació pren el valor del centroide de cada ió a l'espectre de masses al 80 % de la intensitat del mateix, considerant la resolució pròpia de l'instrument (5000) i combinant 10 *scans* per a obtenir la mitjana. Al valor que s'obté se li aplica de forma automàtica la correcció pel compost de referència. Els arxius resultants es reanomenaren automàticament afegint el sufix AFAMM i subseqüentment es convertiren a format netCDF emprant el convertidor dins del paquet MassLynx. Aquest preprocessat de les dades proporciona per una banda arxius en format compatible amb l'*xcms*, a l'hora

que s'alleugereix la grandària de cada arxiu i es calcula de forma més acurada la massa exacta.

Tal i com es descriu de forma més detallada a l'apartat 3.6.3, per a procedir a la captura de pics, es va emprar el software *xcms* (Smith *et al.*, 2006) escrit per a ser executat dins l'entorn estadístic R. Per a realitzar tal tasca, s'han codificat dos algorismes: *matchedFilter* (Smith *et al.*, 2006) que pot processar dades en mode continu o centroide, i *centWave* (Tautenhahn *et al.*, 2007) que sols pot processar dades en mode centroide. Els detalls tècnics i computacionals sobre els algorismes esmentats es descriuen de forma breu a l'apartat 3.6.3 de materials i mètodes i més detalladament en les corresponents publicacions. L'objecte d'aquesta tesi no és investigar aquestos aspectes i sols es considera la seua aplicabilitat al sistema instrumental descrit en aquesta memòria.

Dins l'esquema bioinformàtic establert, la captura de pics va seguida del seu alineament atenent al valor de massa/càrrega i al temps de retenció. Per a procedir a l'alineament, l'algoritme agrupa una sèrie de pics amb un comportament més estable (atenent al temps de retenció) al llarg de tots els cromatogrames (*anchors* o *well-behaved peaks*), que després emprà per a corregir el temps de retenció de la resta. Per a optimitzar el nombre d'*anchors* aquest procediment es va dur a terme en tres passos reduint el valor de tolerància per al temps de retenció (*bw*) gradualment de 30 a 5 s. El rang de tolerància per al valor de masses s'estableix de forma fixa en 25 mDa (*mzwid* = 0.025). Al final, es seleccionà el pas que va rendir major nombre de grups i una menor desviació del temps de retenció, que foren *bw* = 10 per al *matchedFilter* i *bw* = 5 per al cas de l'algoritme *centWave* (Figures 4.2 i 4.3).

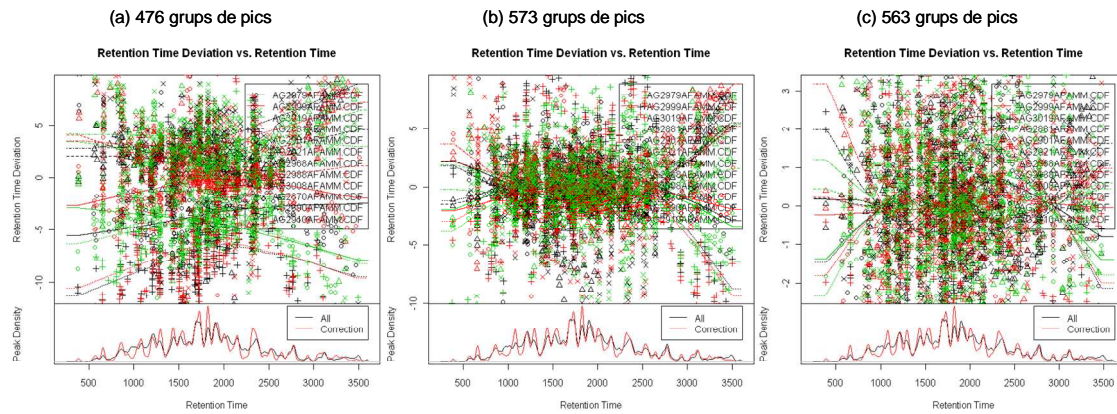


Figura 4.2 Representació de la desviació del temps de retenció front al temps de retenció de tres alineaments consecutius després de realitzar l'extracció de pics amb l'algoritme *matchedFilter*: (a) $bw = 30$, (b) $bw = 10$, (c) $bw = 5$

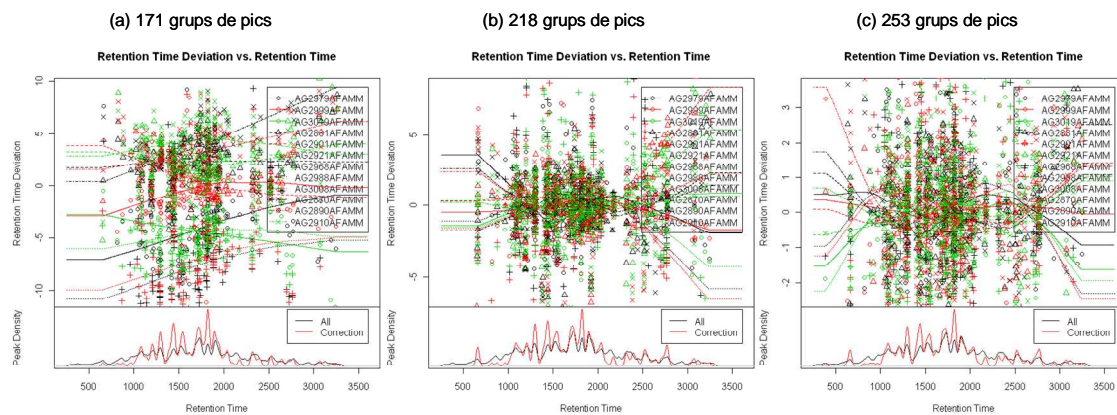


Figura 4.3 Representació de la desviació del temps de retenció front al temps de retenció de tres alineaments consecutius després de realitzar l'extracció de pics amb l'algoritme *centWave*: (a) $bw = 30$, (b) $bw = 10$, (c) $bw = 5$

Per a l'avaluació de cadascun dels algorismes es consideraren el màxim nombre d'*anchors*, el nombre de pics cromatogràfics, les àrees màxima i mínima, les senyals exclusives de cada grup proporcionades per cada algoritme i el nombre de grups de correlació proporcionats pel software CAMERA (Taula 4.1).

Taula 4.1 Paràmetres, nombre de grups de pics, senyals i grups de correlació dels dos algoritmes utilitzats per a la optimització

Algoritme	Paràmetres	Alineament (grups de pics)	Senyals (àrea max. i min.)	Senyals exclusives	CAMERA (grups de correlació)
matchedFilter	fwhm=30				
	snthresh=10 step=0.05 mzdiff=0.1 bin	mzwid=0.025 bw=10 (573)	3480 (1657739, 75)	2132	1715
centWave	peakwidth=(6,30)				
	ppm=60	mzwid=0.025	1642	299	745
	snthresh=10 prefilter(6,70)	bw=5 (253)	(762074, 409)		

Per a triar els paràmetres interns de cada algoritme es van considerar les característiques intrínseques (amplària de pic, variació del valor de massa exacta per al mateix compost entre *scans*, capacitat resolutive del sistema cromatogràfic, relació senyal/soroll, etc...) determinades de forma empírica als cromatogrames originals. En les condicions descrites en aquesta memòria, l'algoritme *matchedFilter* va capturar un total de 3480 pics després de l'alineament envers els 1642 capturats pel *centWave*, un valor 2.26 vegades superior (Annex 1). Aquesta disparitat en el nombre de pics entre els dos algoritmes aplicats podria estar relacionada amb el propi funcionament de cadascun d'ells: *matchedFilter* genera una llista d'intensitats d'ions/temps de retenció i filtra aquestes aplicant una funció matemàtica per tal de definir que és un pic, mentre que el *centWave* assumeix que per a una m/z concreta la dispersió del valor centroide és més elevada en una regió del cromatograma on no hi ha pic, llavors, es generen regions d'interès amb valors de relació massa/càrrega amb una baixa dispersió. La qual cosa pot no ser certa per a tots els equips emprats, més si es té en compte que, en el cas estudiat en aquesta tesi, es parteix de dades en mode continu, que són centroiditzades posteriorment. Depenent dels paràmetres emprats al centroiditzat, la dispersió

dels valors pot ser massa gran com per a permetre la diferenciació de les regions d'interès de les regions 'buides' al cromatograma, seguint l'assumpció de l'algoritme *centWave*. En el nostre estudi *matchedFilter* semblà ser menys sensible a aquestes variacions.

Després d'avaluar els resultats obtinguts, es va determinar que l'algoritme *matchedFilter* és el més adequat per al tipus de dades que s'empraven en aquest estudi. Les variables que es van considerar clau foren, per una banda el nombre de pics marcadors (o *anchors*) així com el nombre final de senyals i les àrees màxima i mínima, i el nombre de grups de correlació. A la vista dels resultats, l'algoritme *centWave* semblà més restrictiu que el *matchedFilter* pel que fa a la intensitat dels ions i, sobretot, a la variació en els valors de massa exacta per a un mateix compost entre *scans* que apareix com al punt clau en aquest algoritme. El major nombre de pics capturats pel *matchedFilter* proporcionà un millor substrat per a la correcció del temps de retenció així com per a l'anotació i agrupació de senyals duta a terme pel software CAMERA. Per aquest motiu i els esmentats anteriorment, en aquestos experiments i posteriors l'algoritme seleccionat per a la captura de pics va ser el *matchedFilter*.

4.1.3 Reproductibilitat i Linealitat

Com ja s'ha esmentat abans, un dels grans problemes associats a les tecnologies -òmiques és la variabilitat derivada de l'anàlisi de múltiples (de vegades milers) variables a l'hora. Abans d'abordar qualsevol aproximació en aquesta línia cal fer un estudi preliminar per tal de determinar quin és el grau de variabilitat existent. Per a la qual cosa, en el desenvolupament d'aquesta plataforma metabolòmica, es van realitzar estudis de reproductibilitat mitjançant l'extracció repetida dels metabòlits d'un mateix material vegetal (n=16) seguida d'anàlisi amb LC-ESI-QTOF-MS en mode positiu i anàlisi múltiple d'un mateix extracte vegetal (n=16) seguint el mateix procediment. Els cromatogrames generats es centroiditzaren prenent com a referència el *lockmass* (tal i com es descriu a l'apartat 3.6.3 de materials i mètodes) i, posteriorment, es convertiren a format netCDF emprant l'eina de conversió dins del paquet MassLynx. A

continuació, els arxius s'introdueixen a una mateixa carpeta i es processen amb el paquet *xcms* (Smith *et al.*, 2006) seguit de la identificació de grups de correlació (relacions massa/càrrega que pertanyen al mateix pic cromatogràfic o compost) i anotació automàtica dels ions amb el paquet CAMERA (Kuhl *et al.*, 2010). D'aquesta manera, s'assegura que se seleccionen compostos reals i no qualsevol senyal aleatòria que s'hagi pogut generar bé durant el procés instrumental d'adquisició o bé durant el processat bioinformàtic. El resultat que proporciona aquest paquet és una llista de relacions massa/càrrega i temps de retenció molt pareguda a l'eixida pròpia de l'*xcms*, però incloent-hi tres columnes addicionals: una columna amb l'anotació de cada ió (sempre que sigui possible), una columna amb la identificació de sèries isotòpiques i una tercera amb els grups de correlació generats per als pics cromatogràfics. Llavors, combinant la informació que proporcionen aquestes columnes es seleccionen ions representatius de cada hipotètic metabòlit de tal forma que cobren bona part de la carrera cromatogràfica (Taules 4.2, 4.5, 4.8 i 4.11). En aquesta prova es tracta d'avaluar la metodologia analítica tal i com es descriu a (Böttcher *et al.*, 2008b). Per a tal comesa, s'analitzen sèries de rèpliques d'injecció (repetides injeccions d'una mateixa extracció de material vegetal, n=16), i sèries de rèpliques d'extracció (extraccions repetides del mateix material vegetal injectades una sola vegada, n=16). Les dades es tracten com s'ha explicat a l'apartat 3.6.3 dels materials i mètodes, i es va realitzar també una identificació dels grups de correlació i anotació dels senyals amb CAMERA (<http://bioconductor.org/packages/2.4/bioc/html/CAMERA.html>). Per a dur a terme les proves de reproductibilitat s'integren amb el software de l'equip, MassLynx v4.0, els marcadors esmentats prèviament, tant per a les rèpliques d'injecció com per a les d'extracció, i es calculen les diferències entre aquestes en quant a temps de retenció i àrea, per tal d'estudiar l'estabilitat del sistema cromatogràfic.

Un altre dels problemes associats a qualsevol metodologia analítica consisteix a determinar el rang de dilució de la mostra dins del qual les variacions en la concentració dels analits segueixen un comportament lineal. Per a tractar de determinar aquest punt, es preparen dilucions seriades d'un extracte concentrat, diluint al 50 % en cada pas. Seguint aquest procediment s'obtingueren fins 5 dilucions (1:2, 1:4, 1:8; 1:16 i 1:32) que s'injectaren al

sistema cromatogràfic. Després de l'anàlisi s'integraren els pics de cadascun dels analits seleccionats i l'àrea resultant es va representar en funció del grau de dilució, tal i com es mostra a les Figures 4.4-4.7.

A continuació es mostren els resultats de les proves de reproductibilitat i linealitat per a cada tipus de material vegetal: fulles d'Arabidopsis i Thellungiella, i arrels de mandarí Cleopatra i citrange Carrizo (les llistes de pics i les anotacions es poden consultar a l'Annex 2).

Taula 4.2 Analits seleccionats en Arabidopsis: relació massa/càrrega, adducte, temps de retenció i massa molecular

ordre d'analit	m/z	adducte	rt (min)	[M]
1	454.345878	[M+Na] ⁺	14.31	431.357348
2	598.417186	[M+Na] ⁺	15.67	575.426083
3	243.171988	[M+H] ⁺	17.78	242.165198
4	342.276641	[M+H] ⁺	18.47	344.222751
5	329.243788	[M+H] ⁺	18.94	328.237029
6	523.254897	[M+Na] ⁺	22.44	500.264479
7	285.254962	[M+H] ⁺	24.67	284.247514
8	325.238512	[M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺	30.67	486.284489
9	345.228409	[M+H] ⁺	41.29	344.222751
10	307.230273	[M+H] ⁺	42.00	306.223048

Una vegada seleccionats els analits d'interès s'integraren per a cada rèplica mitjançant el programa MassLynx, i es calcularen les desviacions existents en quant al temps de retenció i les àrees dels pics corresponents per tal d'avaluar l'estabilitat del sistema cromatogràfic. Com es pot observar en la Taula 4.3, la desviació del temps de retenció és similar en els dos casos. Les desviacions en les àrees dels pics foren sempre majors en el cas de les rèpliques d'extracció (Taula 4.4) a causa de que són més els factors que contribueixen a la dispersió dels valors, tals com la pesada de les mostres i la pròpia extracció, la qual cosa justifica la normalització de les dades de forma prèvia a qualsevol anàlisi estadística (Van den Berg *et al.*, 2006).

Taula 4.3 Desviació del temps de retenció per a cada analit de la Taula 4.2 en Arabidopsis

ordre d'analit	rèpliques d'extracció (n=16)	rèpliques d'injecció (n=16)
	RSD rt (%)	RSD rt (%)
1	0.10	0.07
2	0.10	0.11
3	0.09	0.11
4	0.05	0.06
5	0.09	0.07
6	0.10	0.10
7	0.06	0.06
8	0.06	0.04
9	0.05	0.06
10	0.08	0.06
<i>mitjana ± sd</i>	<i>0.08 ± 0.02</i>	<i>0.07 ± 0.02</i>

Taula 4.4 Desviació de l'àrea de pic de cada analit de la Taula 4.2 en Arabidopsis

ordre d'analit	rèpliques d'extracció (n=16)	rèpliques d'injecció (n=16)
	RSD àrea (%)	RSD àrea (%)
1	38.01	8.57
2	23.43	5.23
3	20.93	9.79
4	13.21	7.18
5	20.42	8.18
6	18.99	7.76
7	43.87	8.10
8	26.60	8.40
9	55.92	8.35
10	19.84	7.92
<i>mitjana ± sd</i>	<i>28.12 ± 13.45</i>	<i>7.95 ± 1.16</i>

La desviació mitjana en les rèpliques d'extracció de l'àrea de pic dels analits seleccionats presenta un valor del 28.12 %, al qual contribuïren de forma

important els analits 1, 7 i 9 amb RSD's de 38.01, 43.87, i 55.92, respectivament. Pel contrari, la desviació relativa estàndard mitjana en les rèpliques d'injecció va presentar un valor mitjà de 7.95, molt lluny del límit establert del 20 %. A més a més, la desviació estàndard d'aquest valor fou molt baixa (Taula 4.4), la qual cosa reflecteix la estabilitat i reproductibilitat del sistema instrumental. Tot en conjunt evidencia que la baixa reproductibilitat ve associada a l'elevada variabilitat introduïda pel procés d'extracció.

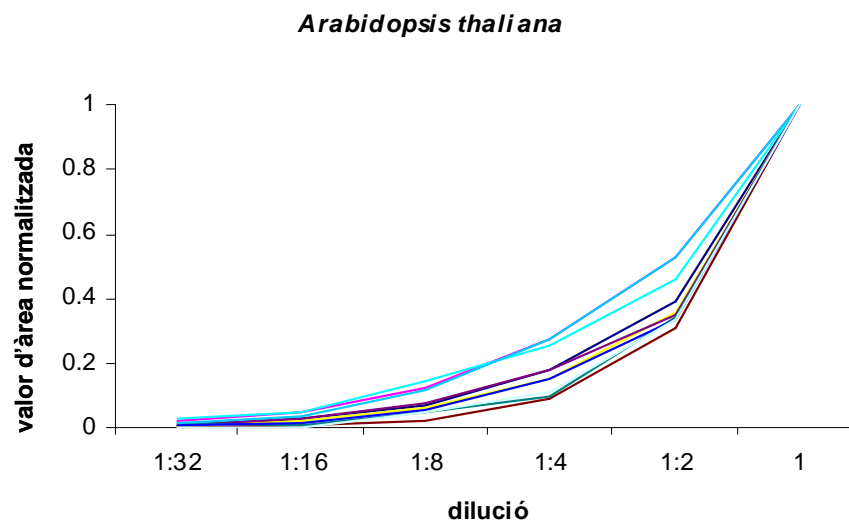


Figura 4.4 Representació dels valors d'àrea normalitzada per a cadascun dels analits de la Taula 4.2 en les diferents dilucions

La determinació de la dilució òptima es va dur a terme de forma manual, integrant les àrees de cada analit i escalant-les a 1. Açò es va fer dividint cada valor d'àrea pel més gran de totes les dilucions per a cada analit. Els resultats es representaren tal i com es pot veure a la Figura 4.4.

Per al cas de *Thellungiella* es seleccionaren els analits que es mostren en la Taula 4.5, i es realitzaren els mateixos passos que en el cas anterior.

Taula 4.5 Analits seleccionats en Thellungiella: relació massa/càrrega, adducte, temps de retenció i massa molecular

ordre d'analit	m/z	adducte	rt (min)	[M]
1	475.322849	[M+Na] ⁺	14.31	452.332038
2	340.753761	[M+H] ⁺	16.77	339.747635
3	331.141299	[M+H] ⁺	19.77	330.134411
4	717.491884	[M+Na] ⁺	21.03	694.502874
5	325.236676	[M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺	30.65	486.283541
6	699.355908	[M+Na] ⁺	31.36	676.366638
7	327.254334	[M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺	32.63	488.299921
8	353.268302	[M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺	34.11	514.314666
9	363.219576	[M+H] ⁺	38.21	362.213498
10	344.219759	[M+H] ⁺	41.25	343.217332

Taula 4.6 Desviació del temps de retenció per a cada analit de la Taula 4.5 en Thellungiella

ordre d'analit	rèpliques d'extracció (n=16)	rèpliques d'injecció (n=16)
	RSD rt (%)	RSD rt (%)
1	0.08	0.11
2	0.06	0.12
3	0.06	0.04
4	0.08	0.13
5	0.08	0.12
6	0.11	0.15
7	0.07	0.12
8	0.11	0.18
9	0.03	0.04
10	0.07	0.09
<i>mitjana ± sd</i>	<i>0.07 ± 0.02</i>	<i>0.11 ± 0.04</i>

Com es pot observar en la Taula 4.6, la desviació del temps de retenció no presentà diferències importants entre rèpliques d'extracció i rèpliques d'injecció. Pel que fa a la desviació de l'àrea dels analits seleccionats, aquesta sempre fou

superior en les rèpliques d'extracció que en les rèpliques d'injecció (Taula 4.7), tal i com s'ha discutit per al cas d'*Arabidopsis*.

Taula 4.7 Desviació de l'àrea de pic de cada analit de la Taula 4.5 en *Thellungiella*

ordre d'analit	rèpliques d'extracció (n=16)	rèpliques d'injecció (n=16)
	RSD àrea (%)	RSD àrea (%)
1	14.95	5.62
2	24.60	4.51
3	82.78	9.12
4	19.02	5.40
5	32.83	6.86
6	11.16	9.18
7	9.84	9.64
8	22.12	5.68
9	18.65	9.78
10	13.24	10.31
<i>mitjana ± sd</i>	<i>19.10 ± 7.11</i>	<i>7.50 ± 2.14</i>

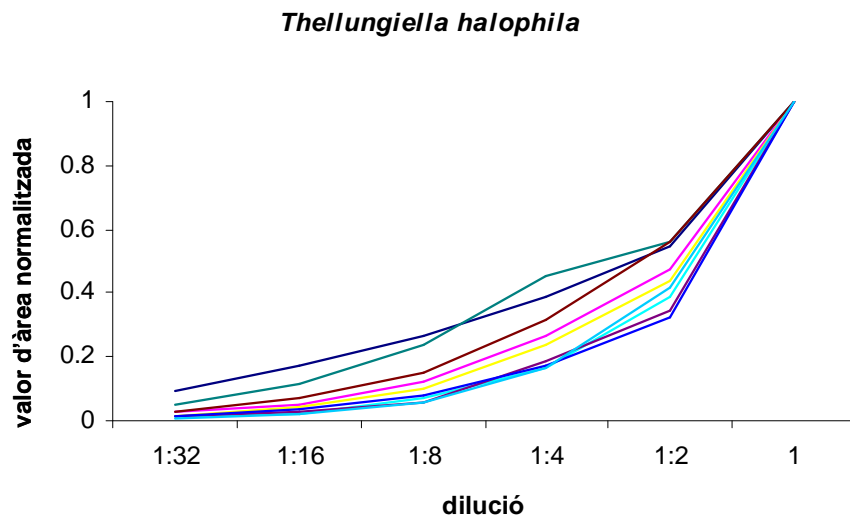


Figura 4.5 Representació dels valors d'àrea normalitzada per a cadascun dels analits de la Taula 4.5 en les diferents dilucions

La determinació de la dilució de treball, que es va dur a terme de forma manual al igual que en cas anterior, es va fer integrant les àrees de cada analit i normalitzant-les a 1, com en el cas d'Arabidopsis.

El mateix procediment aplicat a Arabidopsis i Thellungiella es va emprar amb les mostres procedents de cítrics. Tal i com es mostra en la Taula 4.8, es seleccionaren 10 analits mitjançant l'ús seqüencial dels paquets *xcms* i CAMERA. Aquests analits s'integraren en les rèpliques d'injecció i d'extracció rendint resultats semblants als anteriors en plantes model; el temps de retenció presenta en ambdós casos similars desviacions mentre que, pel contrari, les desviacions d'àrea de pic en les rèpliques d'extracció foren més altes que en les d'injecció.

Taula 4.8 Analits seleccionats en mandarí Cleopatra: relació massa/càrrega, adducte, temps de retenció i massa molecular

ordre d'analit	m/z	adducte	rt (min)	[M]
1	501.151951	[M+H] ⁺	10.85	500.147534
2	258.110940	[M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺	14.07	419.158536
3	549.211246	[M+H] ⁺	18.11	548.207069
4	286.108025	[M+H] ⁺	21.60	285.102808
5	272.128563	[2M+H] ⁺	25.98	135.562651
6	410.157896	[M+Na] ⁺	30.45	387.171134
7	346.146471	[M+H] ⁺	32.01	345.139557
8	245.098915	[M+H] ⁺	32.60	244.089788
9	310.179948	[M+H] ⁺	33.26	309.175340
10	286.140344	[2M+H] ⁺	34.10	142.568808

Taula 4.9 Desviació del temps de retenció per a cada analit de la Taula 4.8 en mandarí Cleopatra

ordre d'analit	rèpliques d'extracció (n=16)	rèpliques d'injecció (n=16)
	RSD rt (%)	RSD rt (%)
1	0.40	0.27
2	0.19	0.15
3	0.10	0.13
4	0.14	0.09
5	0.12	0.09
6	0.08	0.05
7	0.09	0.06
8	0.10	0.06
9	0.08	0.04
10	0.08	0.05
<i>mitjana ± sd</i>	<i>0.14 ± 0.10</i>	<i>0.10 ± 0.07</i>

Taula 4.10 Desviació de l'àrea de pic de cada analit de la Taula 4.8 en mandarí Cleopatra

ordre d'analit	rèpliques d'extracció (n=16)	rèpliques d'injecció (n=16)
	RSD àrea (%)	RSD àrea (%)
1	37.91	19.28
2	11.01	2.74
3	12.81	2.29
4	13.22	4.08
5	16.33	4.48
6	10.81	2.41
7	8.92	4.25
8	3.68	1.75
9	13.12	2.79
10	8.91	5.06
<i>mitjana ± sd</i>	<i>13.67 ± 9.17</i>	<i>4.92 ± 5.17</i>

A continuació s'avaluaren les anàlisis realitzades sobre dilucions seriades d'un mateix extracte d'arrels de mandarí Cleopatra amb l'objectiu de determinar la dilució adequada per als estudis posteriors. Es normalitzaren les àrees de cada analit seleccionat com en els casos anteriors i es representaren front a les dilucions, obtenint el gràfic que es mostra en la Figura 4.6.

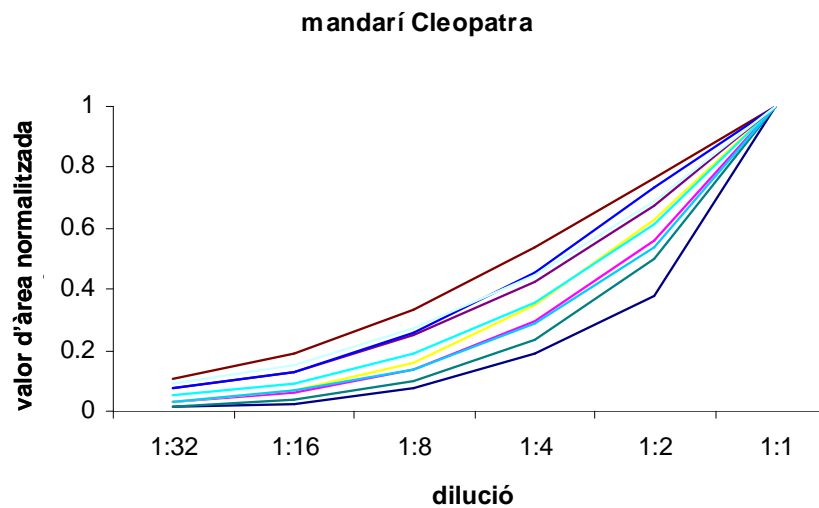


Figura 4.6 Representació dels valors d'àrea normalitzada per a cadascun dels analits de la Taula 4.8 en les diferents dilucions

Finalment, es repetiren totes les proves de reproductibilitat i linealitat amb els analits de la Taula 4.11, per a mostres d'arrels de citrange Carrizo, seguint el procediment descrit anteriorment. Els resultats obtinguts foren lleugerament diferents als anteriors pel que fa a la desviació de l'àrea dels analits seleccionats, tal i com es mostra més endavant.

Taula 4.11 Analits seleccionats en citrange Carrizo: relació massa/càrrega, adducte, temps de retenció i massa molecular

ordre d'analit	m/z	adducte	rt (min)	[M]
1	324.156108	[M+H] ⁺	24.13	323.151571
2	326.170719	[M+H] ⁺	27.73	325.165668
3	517.190215	[M+H] ⁺	30.30	516.186671
4	410.158861	[M+NH ₄] ⁺	30.44	392.127828
5	284.126649	[M+H] ⁺	31.55	283.122721
6	310.176274	[M+H] ⁺	33.22	309.174377
7	376.154043	[M+Na] ⁺	34.40	353.163458
8	390.169333	[M+Na] ⁺	39.73	367.181889
9	762.413895	[M+H] ⁺	45.57	761.410347
10	444.213265	[M+Na] ⁺	45.58	421.227821

Taula 4.12 Desviació del temps de retenció per a cada analit de la Taula 4.11 en citrange Carrizo

ordre d'analit	rèpliques d'extracció (n=16)	rèpliques d'injecció (n=16)
	RSD rt (%)	RSD rt (%)
1	0.05	0.07
2	0.03	0.07
3	0.06	0.13
4	0.06	0.08
5	0.12	0.14
6	0.04	0.07
7	0.08	0.11
8	0.23	0.15
9	0.06	0.09
10	0.09	0.09
<i>mitjana ± sd</i>	<i>0.08 ± 0.06</i>	<i>0.10 ± 0.03</i>

Al contrari que en mandarí Cleopatra, en citrange Carrizo tant les rèpliques d'extracció com les rèpliques d'injecció presentaren valors molt similars d'RSD's (9.90-10.55) d'àrea, la qual cosa no descarta completament la

normalització de les dades de forma prèvia a l'anàlisi estadística ja que en el cas de Cleopatra (13.67) si que seria necessària, i per tant, per tal de comparar entre els dos genotips s'ha de seguir en ambdós casos el mateix procediment de tractament de dades.

Taula 4.13 Desviació de l'àrea de pic de cada analit de la Taula 4.11 en citrange Carrizo

ordre d'analit	rèpliques d'extracció (n=16)	rèpliques d'injecció (n=16)
	RSD àrea (%)	RSD àrea (%)
1	13.96	12.84
2	19.37	11.29
3	17.32	10.01
4	6.60	9.63
5	9.31	8.17
6	10.54	11.73
7	3.76	10.46
8	2.15	9.32
9	12.81	10.55
10	3.17	11.46
<i>mitjana ± sd</i>	<i>9.90 ± 6.00</i>	<i>10.55 ± 1.34</i>

El comportament lineal dels analits presents en extractes d'arrels es va avaluar d'idèntica manera que en els anteriors casos, realitzant dilucions seriadades d'extractes concentrats de teixit radicular de citrange Carrizo. Tal i com es pot observar a la Figura 4.7 el perfil seguit fou molt semblant al corresponent per a mandarí Cleopatra llevat que, en bona part dels analits seleccionats, la tendència lineal es va poder observar en tot el rang considerat.

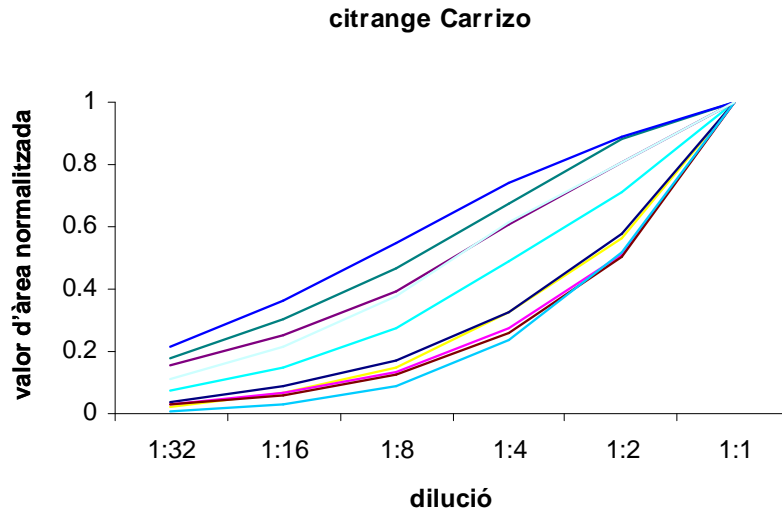


Figura 4.7 Representació dels valors d'àrea normalitzada per a cadascun dels analits de la Taula 4.11 en les diferents dilucions

Per tal d'arribar a un compromís per a tots els tipus de material vegetal inclosos a l'estudi, i analitzant amb cadascuna de les gràfiques presentades, es va optar per prendre la dilució 1:4 com a la més adequada, ja que està situada al mig del rang lineal.

4.1.4 Anàlisi estadística

En un primer grup d'estudi s'exemplifica el cas en el que es pretén comparar dos o més grups de mostres i identificar quins metabòlits són els responsables de les diferències existents. En aquest cas, es disposa de sols un punt temporal, i s'han seleccionat mostres radiculars de dos genotips de cítrics: citrange Carrizo i mandarí Cleopatra sota condicions control en dos dies diferents, encara que, en aquest cas, sols es va fixar el factor genotip per a l'anàlisi de la variància.

- Cas 1: Comparació de genotips

Per tal d'avaluar la variabilitat existent en el conjunt de dades multivariant que proporciona el processat amb l'*xcms*, on el conjunt de variables són els distints pics cromatogràfics i cadascuna de les mostres, els individus; la primera opció

és l'anàlisi PCA. Les dades en qüestió foren dos grups de mostres de dos genotips distints de cítrics, Cleopatra (mc 1 i mc 2) i Carrizo (cc 1 i cc 2), amb tres rèpliques de cadascuna, obtenint un total de dotze mostres, on els nombres indiquen dues dates de mostreig. La llista de pics resultant de l'anàlisi per *xcms* es pot veure a l'Annex 1.

El primer problema que es va haver d'enfrontar fou la existència de pics no alineats o absents (NA) en el conjunt de dades. La presència d'aquests buits pot alterar de forma notable el resultat de l'anàlisi estadística, o simplement, fer-la impossible. Per a tractar de solucionar aquest problema, existeix una funció dins del paquet *xcms* anomenada *fillPeaks()*, que afegeix valors d'àrea per a aquells pics no alineats o absents en una mostra determinada. Aquesta funció estima de forma correcta la intensitat base per a aquests pics, prenent com a referència el valor d'intensitat de regions adjacents del cromatograma, però en molts casos introdueix zeros que no són desitjables per a l'anàlisi estadística. Quan açò ocorre, els zeros s'han de substituir manualment per valors d'intensitat molt baixa, generalment 0.01. Una altra opció és dur a terme tot el procés de forma manual, emprant el valor d'àrea mínim en cada conjunt de dades. En un full Excel, i de forma automàtica, se substitueixen les cel·les que contenen NA per un valor aleatori entre el valor mínim i un 10 % d'aquest. La dispersió de les dades es pot observar en la Figura 4.8 (en format de diagrama de caixes i bigots). En estadística descriptiva, un diagrama de caixes i bigots és una manera molt convenient de representar gràficament grups de dades numèriques mitjançant cinc mesures descriptives d'aquestes: la mediana, el primer quartil, el tercer quartil i els valors màxim i mínim. Presenta al mateix temps, informació sobre la tendència central, dispersió i simetria de les dades d'estudi. A més a més, permet identificar amb claredat i de forma individual, observacions que s'allunyen de la resta. A estes observacions se les coneix com a valors atípics. Per la seua facilitat de construcció i interpretació, permet també comparar a la vegada diversos grups de dades sense perdre informació.

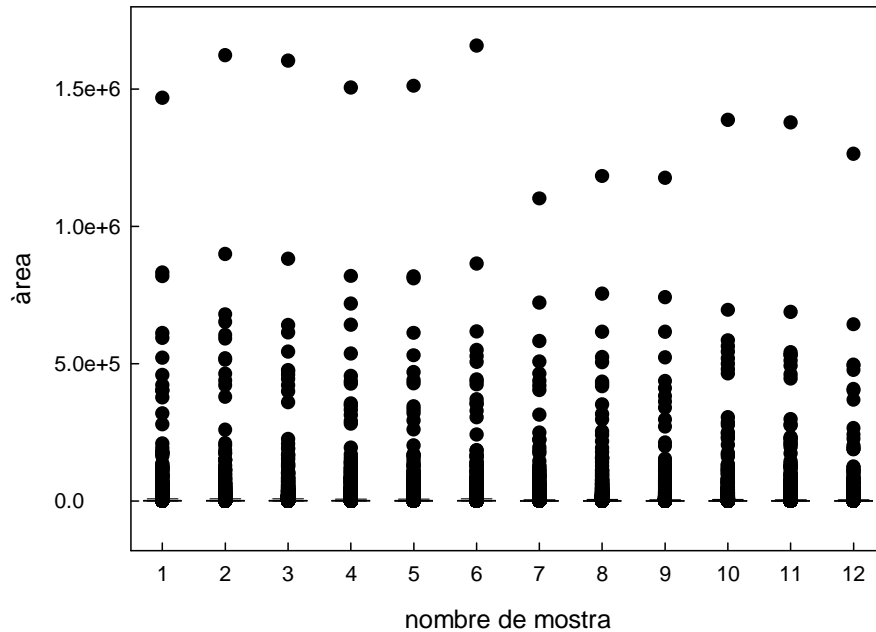


Figura 4.8 Diagrama de caixes i bigots de les dades sense normalitzar de Cleopatra (1-6) i Carrizo (7-12)

En l'anàlisi d'aquest tipus de dades, la pròpia natura de la mesura física presenta variacions de fins i tot tres o més ordres de magnitud que no necessàriament estan associades a la rellevància biològica del metabòlit en qüestió (van den Berg *et al.*, 2006). Per a reduir aquestes variacions al mateix temps que es manté la estructura de les dades es proposen tota una sèrie de mètodes de normalització descrits en (van den Berg *et al.*, 2006) dels quals, finalment es va seleccionar la transformació logarítmica que corregeix la heteroscedasticitat a l'hora que redueix la magnitud de l'escala (Figura 4.9).

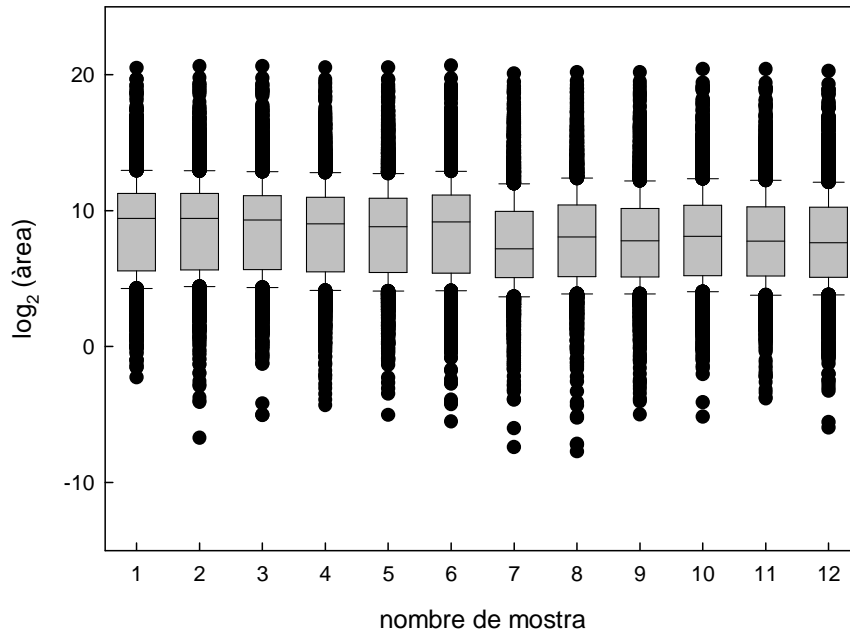


Figura 4.9 Diagrama de caixes i bigots de les dades normalitzades de Cleopatra (1-6) i Carrizo (7-12)

Després d'aquest pretractament inicial de les dades, es va realitzar l'anàlisi de components principals sobre aquest grup de dades transformades. El resultat, tal i com es mostra a les Figures 4.10 i 4.11, revelà que amb tan sols tres components es podia explicar un 74 % de la variabilitat existent en el grup de dades procedent de l'anàlisi de mostres radiculars de Cleopatra i Carrizo. La primera component (55 %) es va associar a la variabilitat introduïda pel genotip, mentre que la segona component (10 %) es va relacionar amb la variabilitat existent entre diferents dies de mostreig. Gairebé de la mateixa magnitud, la component tres (9 %) es va relacionar amb la variabilitat introduïda pel desenvolupament experimental. Les dades presentades apunten a que la plataforma desenvolupada és capaç de distingir extractes procedents de distintes fonts de material vegetal, en aquest cas, distintes genotips de cítrics. No obstant, també resulta evident que el sistema és susceptible a variacions ambientals. Els resultats coincideixen amb previs publicats per (Arbona *et al.*, 2009). A més a més, l'anàlisi de components principals demostrà ser un excel·lent mètode per a distingir grups de mostres diferents dins d'un conjunt de dades multivariants (Figura 4.11a). Pel contrari, l'avaluació de la contribució relativa de cada variable a les diferències observades (*loadings plot*, Figura

4.11b) no mostrarà cap variable amb una contribució significativa a la variabilitat observada. Aquest resultat podria ser conseqüència de la enorme quantitat de variables existent en el conjunt de dades. Per aquest motiu, es va haver de triar un altre sistema per a seleccionar les variables que contribueixen a les diferències existents entre grups de mostres.

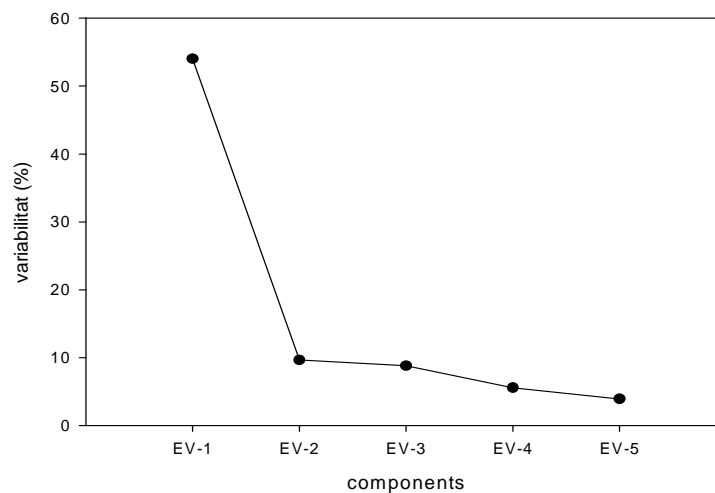


Figura 4.10 Gràfic de cimentació de les components que expliquen la variabilitat en les dades normalitzades de Cleopatra i Carrizo

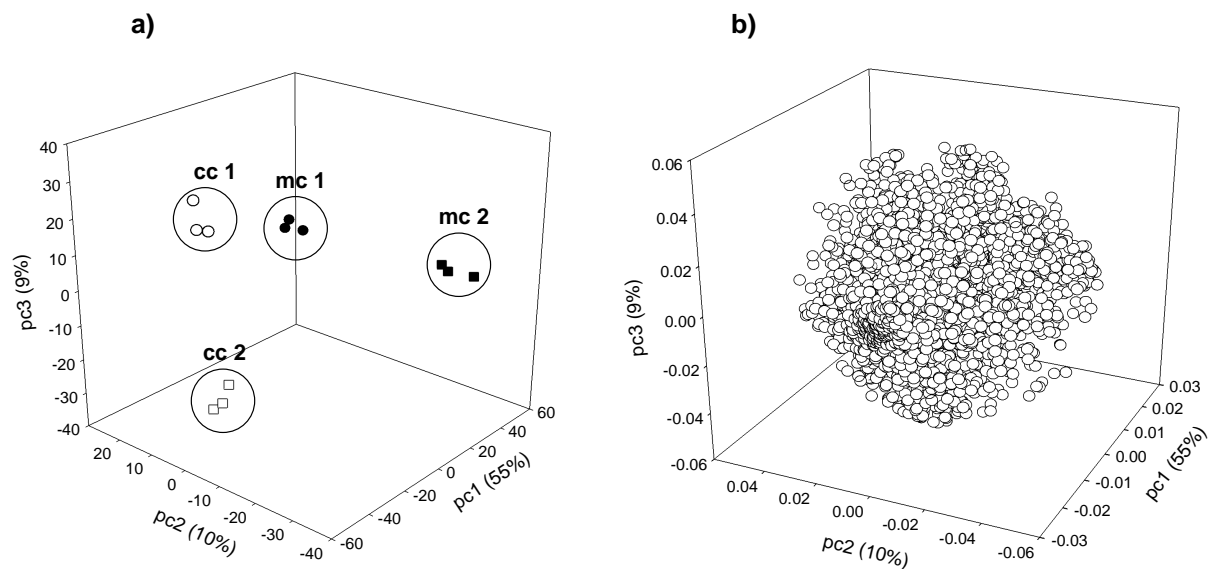


Figura 4.11 Representacions gràfiques de l'anàlisi PCA de Cleopatra i Carrizo, (a) *components plot* i (b) *loadings plot*. (○, □, ● i ■ corresponen als grups de plantes 1 i 2 de Carrizo, i 1 i 2 de Cleopatra, respectivament)

La tècnica seleccionada fou l'anàlisi ANOVA, que permet esbrinar quines variables són significativament diferents en els conjunts de dades seleccionats, atenent al factor genotip: Cleopatra i Carrizo. Per a dur a terme aquesta anàlisi es va emprar el software DChip (Li i Hung Wong, 2001), que realitza la tasca avaluant cada variable de forma individual. A més a més permet la visualització dels resultats en forma de *heatmap* tal i com es pot veure a la Figura 4.12.

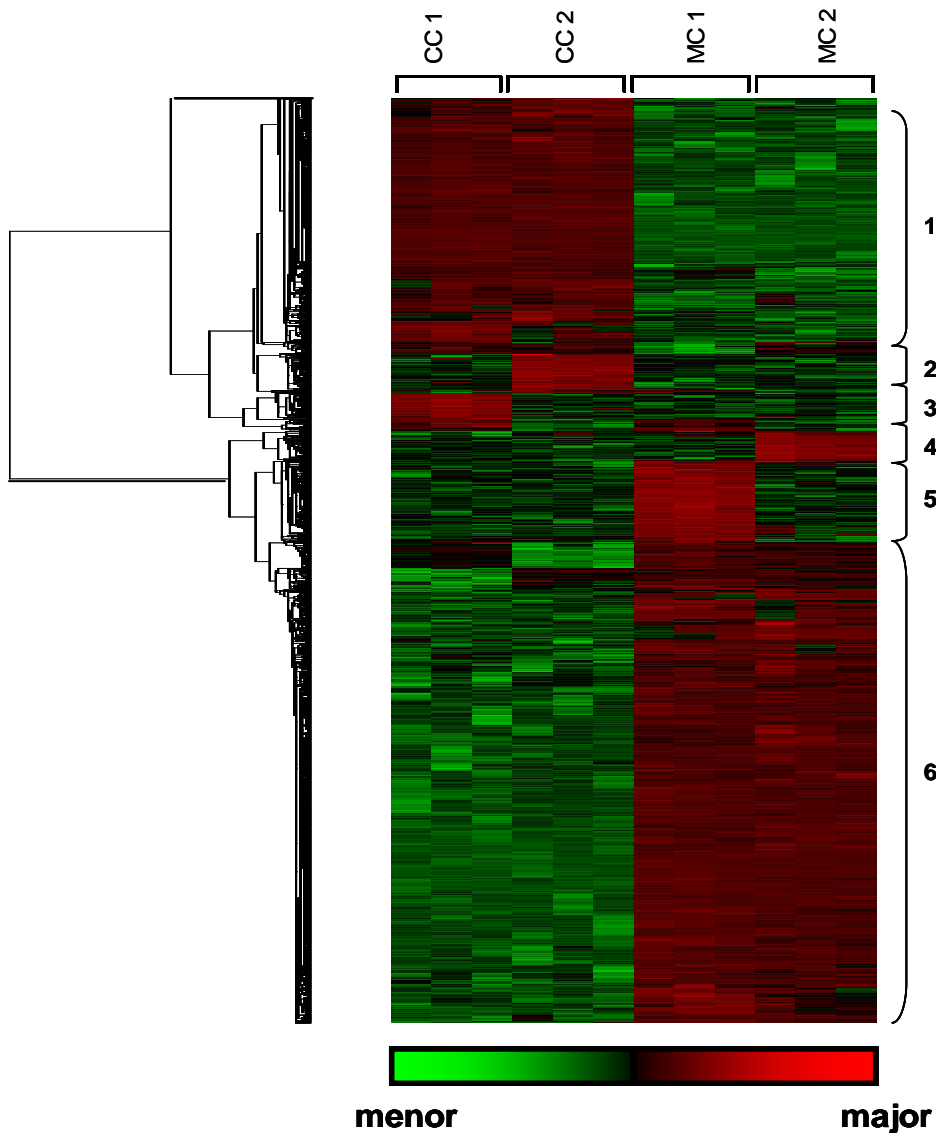


Figura 4.12 *Heatmap* amb els senyals significativament alterats després d'ANOVA ($p \leq 0.05$) entre plantes de mandarí Cleopatra i citrango Carrizo (mc i cc) agrupades segons la seua tendència. Els nombres de la dreta de la figura fan referència als diferents clústers

Per a realitzar l'anàlisi, s'introduïren les dades al programa i se seleccionaren 'cleopatra' i 'carrizo' com a nivells dins del factor 'genotip' i com a p valor es va establir 0.05. L'anàlisi va rendir un total de 2728 senyals diferencialment alterats, dels 3480 inicials, agrupats en 6 clústers principals (indicats a la part dreta de la Figura 4.12). Posteriorment, el conjunt de variables resultant es va analitzar mitjançant anàlisi HCA per tal d'agrupar-les segons la seua tendència. El valor relatiu de cada variable es mostra al *heatmap* en diferents colors dins l'escala roig-verd (més alt-més baix). D'aquesta forma és possible seguir la tendència que mostra una determinada variable (metabòlit) al llarg de les mostres.

- Cas 2: Anàlisi d'una sèrie temporal

Aquest segon grup d'estudi s'ha desenvolupat per a dur a terme anàlisis d'una sèrie temporal. L'exemple que s'ha seleccionat per a tal fi ha segut un experiment de salinitat dut a terme amb *Arabidopsis thaliana*, on trobem grups de mostres control i estressades, de forma que el que s'intenta analitzar són les variacions provocades pel factor d'estrès al llarg d'un temps determinat. Per a tal tasca, s'han realitzat perfilats metabolòmics complets d'extractes vegetals d'*Arabidopsis* en condicions control i tractades amb NaCl (la llista de pics resultant de l'anàlisi per *xcms* es pot veure a l'Annex 3).

L'anàlisi de components principals, de les dades d'àrea normalitzades amb el logaritme en base dos (Figura 4.13), per a aquest tipus d'experiment sols és capaç de diferenciar entre mostres control i estressades (pc1 35%) i entre diferents dates de mostreig (pc2 13%) (Figura 4.14a). No obstant no revelà cap tendència clara pel que fa als metabòlits (Figura 4.14b). Aquest tipus d'estudi requereix, per tant, una anàlisi dirigida que permeta assumir les fonts de variabilitat que afecten al sistema experimental, en aquest cas: tractament i durada del tractament (considerats com a factors que interaccionen: tractament x temps). Per la qual cosa, s'optà per emprar el software DChip per a una primera aproximació. Es va procedir doncs, a l'anàlisi amb DChip de forma similar a l'apartat anterior. Els resultats es mostren en forma de *heatmap* a la Figura 4.15.

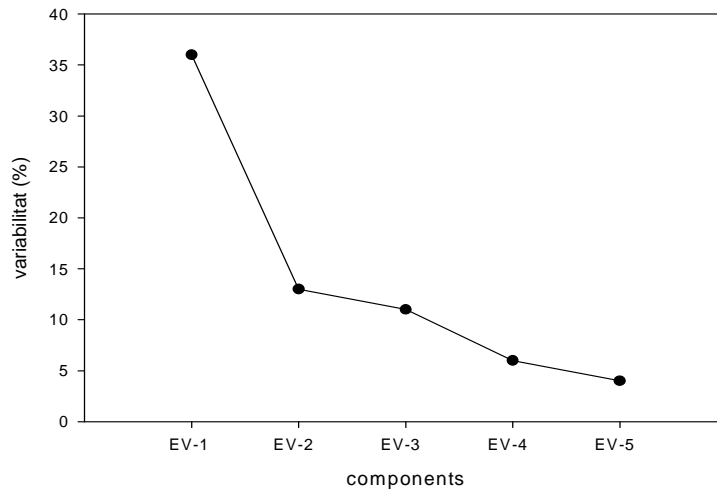


Figura 4.13 Gràfic de cimentació de les components que expliquen la variabilitat en les dades normalitzades per \log_2 d'Arabidopsis

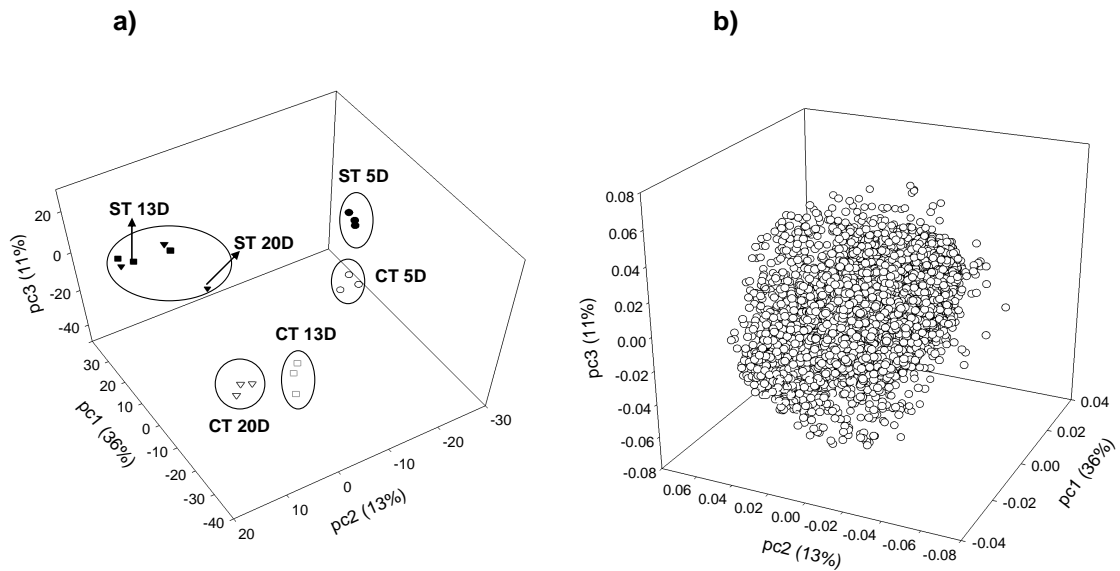


Figura 4.14 Representacions gràfiques PCA per a plantes control i tractades d'Arabidopsis. (a) *components plot* i (b) *loadings plot*. (\circ , \square , Δ , \bullet , \blacksquare i \blacktriangle corresponen als grups de plantes control 5, 13 i 20 dies, i estressades 5, 13 i 20 dies, respectivament)

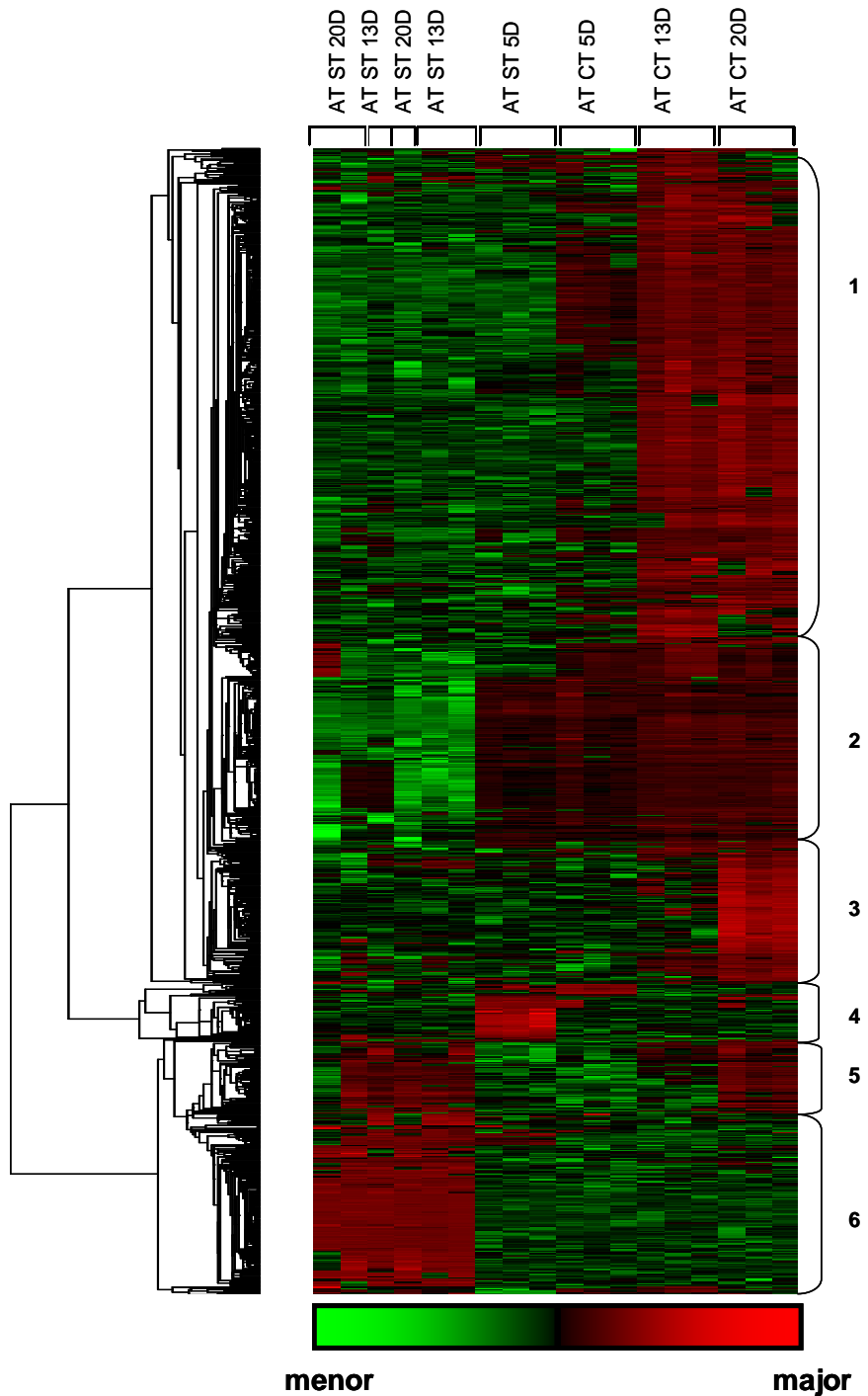


Figura 4.15 *Heatmap* dels senyals significativament alterats en plantes d'*Arabidopsis* sotmeses a estrès salí. Dades normalitzades amb \log_2 . Els nombres de la dreta de la figura fan referència als distints clústers

Utilitzant el programa DChip, establint un p valor de tall menor o igual que 0.05, s'obtingueren 882 senyals diferencials (dels 1442 inicials) que pogueren ser agrupats en 6 clústers de forma manual. Els clústers identifiquen tendències en

l'evolució dels metabòlits al llarg de la sèrie temporal podent agrupar senyals relacionats cromatogràficament. La identificació dels clústers, però, s'ha de fer de forma manual la qual cosa disminueix la capacitat d'identificar tendències significatives a mesura que incrementa el nombre de punts temporals. Per això, es va recórrer a un altre paquet d'anàlisi de *microarrays* de cDNA, i especialment experiments tipus sèrie temporal, maSigPro (Conesa *et al.*, 2006).

En la Figura 4.16 es representa el gràfic HCA resultant quan s'utilitza com a eina d'anàlisi multivariant el paquet maSigPro (Conesa *et al.*, 2006). En aquest cas, s'ha realitzat també una normalització de les dades mitjançant el logaritme en base dos de l'àrea de cada pic, necessari per a alleugerir el procés de càlcul. Aquest algoritme realitza una estratègia de regressió en dos passos per tal de trobar canvis temporals significatius en les senyals així com diferències entre grups experimentals, a més és possible analitzar la magnitud d'aquestes diferències. Al final de la regressió els coeficients obtinguts es poden agrupar en clústers com els de la figura 4.17 per a visualitzar els resultats.

Utilitzant l'algoritme maSigPro s'obtingueren 596 senyals, 286 menys que amb el DChip. Les aproximacions basades en regressions, tals com l'algoritme maSigPro són la opció més senzilla i flexible per a l'anàlisi de sèries temporals, ja que tracten a la variable temps com a quantitativa i detecten, a més dels senyals diferencialment alterats, canvis en les tendències i la magnitud d'aquests mitjançant l'anàlisi dels coeficients del model (Conesa *et al.*, 2006). L'algoritme maSigPro és una poderosa eina per a la selecció i anàlisi de senyals que presenten diferents tendències amb el temps, a més a més, permet analitzar dades heterogènies i inclús absents, i controla els falsos positius. És per tot això que amb aquest algoritme s'extrauen menys senyals que amb el DChip, ja que és més restrictiu a l'hora de detectar quins senyals es troben dins de les tendències reals. En estudis posteriors duts a terme durant el desenvolupament d'aquesta tesi es va emprar el software maSigPro per a l'anàlisi de sèries temporals que incloguin dos o més grups de mostres, amb la excepció d'aquelles sèries temporals en les que el punt inicial sigui considerat control, com es veurà més endavant.

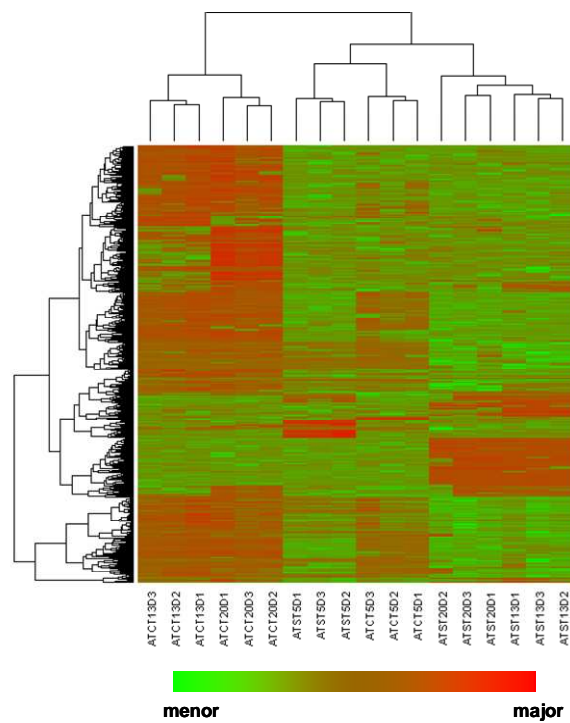


Figura 4.16 *Heatmap* dels senyals significativament alterats en plantes d'Arabidopsis sotmeses a estrès salí, amb l'algoritme maSigPro. Dades normalitzades amb \log_2

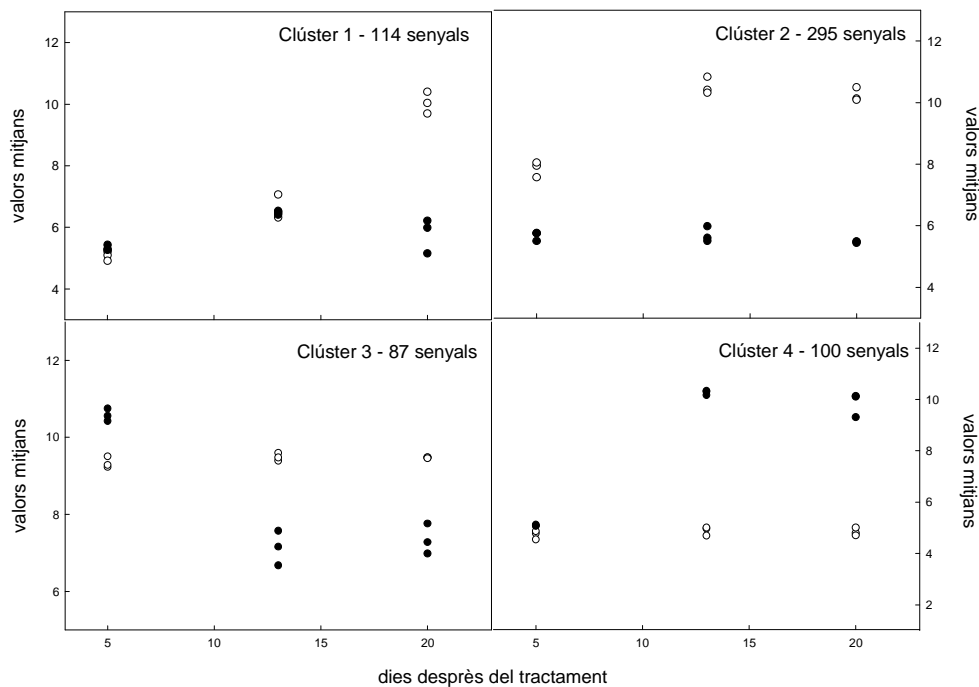


Figura 4.17 Perfils dels clústers del *heatmap* de la figura 4.16 (○ i ● representen els valors mitjans control i estrès, respectivament, de les àrees normalitzades de totes les senyals de cada clúster)

5. Respostes fisiològiques, hormonals i metabòliques, comunes i divergents entre *Arabidopsis thaliana* i *Thellungiella halophila* sotmeses a estrès hídric i salí

5. RESPOSTES FISIOLÒGIQUES, HORMONALS I METABÒLIQUES, COMUNES I DIVERGENTS ENTRE *Arabidopsis thaliana* I *Thellungiella halophila* SOTMESES A ESTRÈS HÍDRIC I SALÍ

Thellungiella halophila s'ha proposat recentment com a nova espècie model per a estudis moleculars i fisiològics de tolerància a l'estrès abiòtic (Inan *et al.*, 2004). En l'actualitat són dos els ecotips que s'estan utilitzant per a la investigació, anomenats Yukon, originari de Canadà, i Shandong, de Xina. Ambdós ecotips són capaços de tolerar concentracions salines en l'aigua de reg de fins i tot 500 mM de NaCl. Aquesta espècie té moltes característiques per a ser utilitzada com a model genètic: cicle de vida curt, auto fertilització, transformabilitat i genoma menut. Particularment, l'alta similitud fenotípica amb *Arabidopsis* junt amb el fet que la major part dels gens estudiats en ambdues espècies presenten una semblança a nivell de seqüència entre el 90-95 %, fan possible utilitzar moltes de les ferramentes desenvolupades en *Arabidopsis* per a estudiar l'alta tolerància a l'estrès abiòtic de *Thellungiella*. Molts dels estudis realitzats han intentat desxifrar els trets genètics responsables de la tolerància de *Thellungiella* a l'estrès per baixes temperatures i per salinitat. En aquest sentit, alguns autors han indicat l'existència de rutes metabòliques i gens de resposta a estrès en *Thellungiella* que no estan activats en *Arabidopsis* (Wong *et al.*, 2006). L'estudi dut a terme per (Wong *et al.*, 2006) va mostrar que, en resposta a estrès salí, ambdues espècies presenten un major nombre de gens reprimits que induïts. Entre tots els gens diferencialment expressats, (Alemán *et al.*, 2009) trobaren diferències significatives entre ambdues espècies en l'expressió de gens que codifiquen per a transportadors de K⁺ que contribueixen a disminuir l'absorció de l'ió en condicions salines en *Thellungiella*. A més a més, algunes característiques fisiològiques de les cèl·lules de *Thellungiella* tals com la baixa permeabilitat de la membrana plasmàtica de l'arrel al Na⁺, la selectivitat en el transport d'ions i la capacitat per a intercanviar Na⁺ per K⁺ (Volkov i Amtmann, 2006), podrien constituir la base de la major tolerància de *Thellungiella* a l'estrès salí, mentre que la capacitat per a acumular prolina en resposta a l'estrès va ser descartada com a tret de tolerància al comparar amb el mutant hiperacumulador de prolina d'*Arabidopsis* eskimo-1 (Ghars *et al.*, 2008). Particularment, l'estudi de respostes fisiològiques

i moleculars, comunes i divergents amb genotips sensibles com *Arabidopsis* a l'estrès abiòtic pot ajudar a trobar mecanismes susceptibles de modificació biotecnològica per a la millora de la tolerància a l'estrès.

En l'actualitat, està acceptat que totes les respostes de les plantes als estímuls ambientals estan regulades mitjançant la interacció entre hormones vegetals, que modulen la intensitat de les respostes fisiològiques a la pressió de l'estrès. En un treball recent, plantes d'*Arabidopsis* sotmeses a estrès per sequera exhibiren un augment en la concentració d'ABA endogen, correlacionat amb el 66.5% dels gens induïts per l'estrès (Huang *et al.*, 2008). En estudis previs, l'aplicació exògena d'ABA a plantes de cítrics també va augmentar la tolerància a l'estrès salí mitjançant la reducció de la conductància estomàtica i, paral·lelament, l'absorció de clorurs (Gómez-Cadenas *et al.*, 2002; Arbona *et al.*, 2006). La implicació d'altres factors hormonals, com el JA, en la regulació de les respostes fisiològiques a l'estrès abiòtic no està tan clara, encara que hi ha una evidència creixent que recolza la hipòtesi del JA com a disparador inicial de la resposta dels vegetals a l'estrès, actuant com a interruptor que alternaria entre l'estat basal i d'estrès (Mahouachi *et al.*, 2007; Arbona i Gómez-Cadenas, 2008). A més a més, també s'han suggerit interaccions entre el JA i altres reguladors del creixement (tals com ABA, SA i etilè) dins de les diferents xarxes de senyalització en cítrics sotmesos a estrès per inundació del substrat (Arbona i Gómez-Cadenas, 2008) i en plantes d'*Arabidopsis* sotmeses a infecció per patògens (Adie *et al.*, 2007).

Tal i com s'ha comentat en l'apartat 1.1 de la Introducció, l'estrès ambiental indueix canvis dràstics en la expressió gènica, en els balanços hormonals i en la concentració d'alguns metabòlits secundaris. Però, fins fa poc, no ha segut possible avaluar l'impacte de l'estrès abiòtic sobre el metabolisme secundari de forma global, sense fer distincions entre classes de metabòlits. Les tècniques metabolòmiques permeten realitzar una avaluació més exhaustiva del metaboloma, definit com al conjunt de compostos de baix pes molecular en una espècie vegetal determinada, en un estadi de desenvolupament concret, i en unes condicions ambientals específiques. El metaboloma representa el resultat final de la expressió gènica i està íntimament relacionat amb el fenotip (Fiehn,

2002). (Gong *et al.*, 2005) estudiaren les diferències i similituds entre *Arabidopsis* i *Thellungiella* en resposta a estrès salí, en termes d'expressió gènica i canvis al conjunt de metabòlits polars, i els resultats mostraren que *Thellungiella* havia patit canvis més acusats en la concentració de metabòlits que *Arabidopsis* en resposta a l'estrès. Tot i la creixent abalança d'informació en aquest aspecte, els canvis en els metabòlits secundaris en espècies model en resposta a l'estrès no han segut descrits fins recentment. En aquest treball, s'han estudiat les respostes fisiològiques, hormonals i metabòliques de plantes d'*Arabidopsis* i *Thellungiella* a l'estrès salí i per dessecació. Per a dur a terme aquesta tasca, es realitzaren dos grups d'experiments que incloïen l'excisió de la rosseta basal i la irrigació de les plantes amb dissolucions de 200 mM de NaCl. La pèrdua d'aigua així com l'acumulació de clorurs es mesuraren com a respostes fisiològiques importants, i es realitzaren determinacions d'ABA, JA i prolina. A més a més, s'aplicà la tècnica d'anàlisi metabolòmic descrita en el capítol 4 per a avaluar canvis en els metabòlits secundaris d'ambdós grups d'experiments.

5.1 Resultats

5.1.1 Excisió de la rosseta basal – experiments de dessecació

5.1.1.1 Pèrdua d'aigua

Tal i com s'ha descrit a l'apartat 3.2 de materials i mètodes, amb l'objectiu de simular l'estrès hídric, plàntules d'*Arabidopsis* i *Thellungiella* foren sotmeses a experiments d'excisió de la rosseta basal i posterior dessecació durant un període màxim de quatre hores. Finalitzat l'experiment es va calcular la pèrdua d'aigua en percentatge de variació del pes inicial, i va resultar ser molt similar en ambdues espècies. Tant en plantes d'*Arabidopsis* (Figura 5.1a) com de *Thellungiella* (Figura 5.1b), la major taxa de deshidratació es va donar dins de les primeres dues hores amb reduccions en la massa inicial del 17.2 i 20.6 %, respectivament. Com es pot observar a la Figura 5.1 dues hores més de dessecació sols disminueixen els valors en 4.8 i 1.7 % en plantes d'*Arabidopsis* i *Thellungiella*, respectivament.

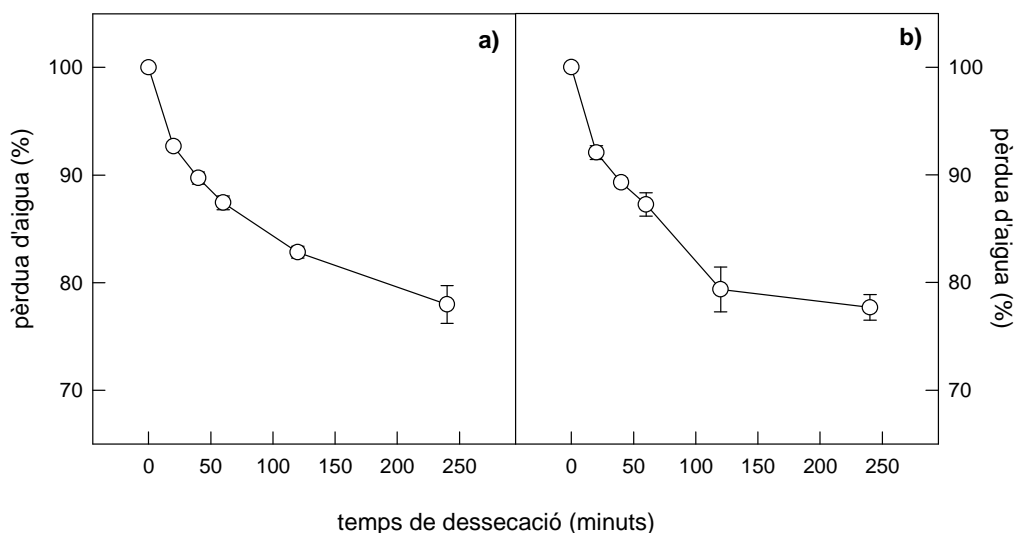


Figura 5.1. Percentatges de pèrdua d'aigua de rossetes de: a) Arabidopsis i b) Thellungiella sotmeses a dessecació

5.1.1.2 Concentració de prolina

Tot i l'absència de diferències pel que fa a la pèrdua d'aigua en Arabidopsis i Thellungiella, l'acumulació de prolina mostrarà perfils molt diferents en aquestes espècies. Al llarg les quatre hores que va durar l'experiment, el contingut de prolina foliar de les plantes d'Arabidopsis (Figura 5.2a) quasi no va mostrar canvis significatius respecte al valor basal, que va ser de $2.7 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ pf}$, mentre que els nivells d'aquest aminoàcid en plantes de Thellungiella (Figura 5.2b) augmentaren progressivament durant tot l'experiment fins arribar a valors de $14.9 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ pf}$, 5.5 vegades superiors als d'Arabidopsis en el mateix punt. A més a més, els nivells basals de prolina foren 3.2 vegades superiors en les plantes de Thellungiella que en les d'Arabidopsis.

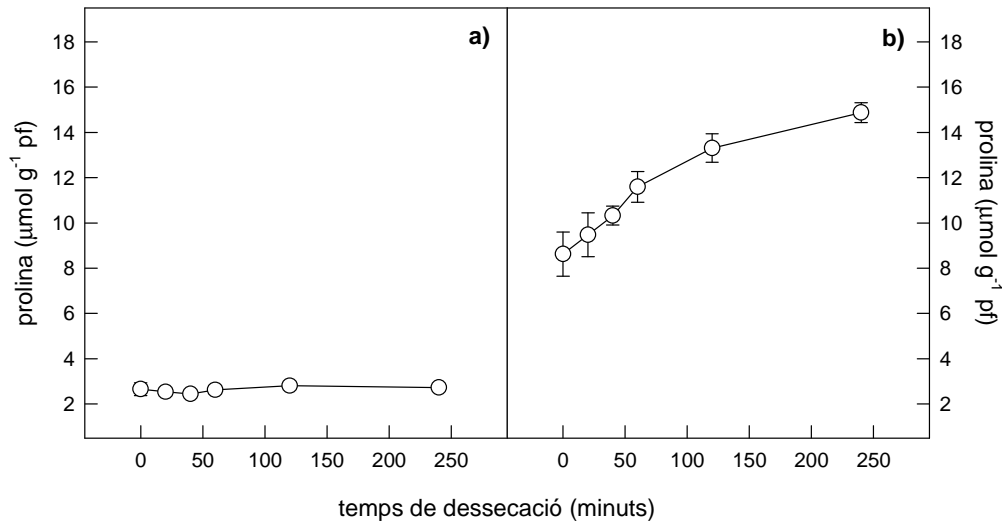


Figura 5.2. Concentració de prolina en rossetes de: a) Arabidopsis i b) Thellungiella sotmeses a dessecació

5.1.1.3 Concentració d'ABA i JA

Es va determinar la concentració d'aquestes fitohormones als extractes de rossetes d'Arabidopsis i Thellungiella sotmeses a estrès per dessecació mitjançant el mètode descrit a l'apartat 3.5 de material i mètodes, i els patrons de regulació hormonal resultaren ser bastant similars en ambdues espècies (Figura 5.3). Els nivells basals d'ABA foren dos vegades superiors en plantes d'Arabidopsis (Figura 5.3a) que en les de Thellungiella (Figura 5.3b), i a penes mostraren canvis durant els primers 40 minuts d'experiment en ambdues espècies. A partir d'aquest punt, la concentració d'aquesta hormona va incrementar progressivament fins arribar a valors de 115.5 i 84.8 $\text{ng g}^{-1} \text{ pf}$ en els teixits foliars de plantes d'Arabidopsis i Thellungiella, respectivament.

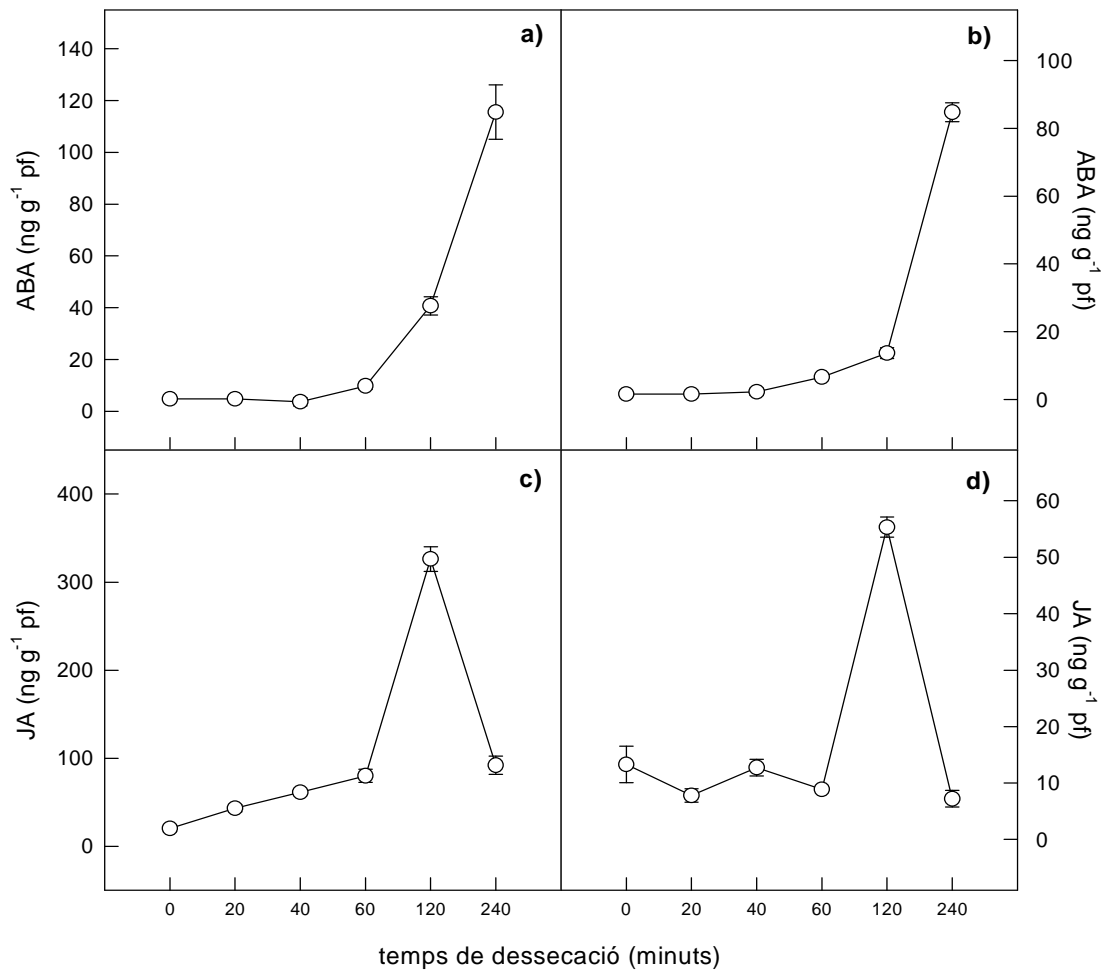


Figura 5.3. Concentració d'ABA i JA en rossetes de: a) i c) Arabidopsis i b) i d) Thellungiella sotmeses a dessecació

La concentració de JA va presentar increments aïllats després de dues hores de dessecació en ambdues espècies estudiades, mentre que durant la resta de període assajat no va presentar variacions significatives. En el cas de les rossetes d'Arabidopsis (Figura 5.3c), els nivells de JA patiren un increment lleuger entre l'inici de l'experiment i 60 minuts després. A les dues hores d'excisió de la rosseta basal es presentaven els canvis més acusats (326.2 ng g⁻¹ pf), coincidint amb l'increment d'ABA (Figura 5.3a), tornant després a valors més semblants als de la primera hora d'estrès (92.0 ng g⁻¹ pf). En el cas de les plantes de Thellungiella (Figura 5.3d) la concentració d'aquesta hormona va variar entre 13.3 i 8.9 ng g⁻¹ pf durant la primera hora de tractament. A les dues hores, però, la concentració de JA va assolir valors de 55.3 ng g⁻¹ pf, reduint-

s'hi després fins valors basals. L'augment transitori en la concentració de JA sempre va precedir a l'inici de l'acumulació d'ABA en les rosetes escindides.

5.1.1.4 Perfilats metabolòmics

Per tal d'avaluar l'impacte de la dessecació sobre el conjunt de metabòlits semipolars en les plantes d'*Arabidopsis* i *Thellungiella*, es va realitzar l'anàlisi metabolòmic de les rosetes basals sotmeses a dessecació continuada (Annex 4). El material vegetal es va processar per a l'extracció de metabòlits tal i com s'indica a l'apartat 3.6.1. Els extractes s'analitzaren tal i com es descriu a l'apartat 3.6.2, i l'extracció dels senyals cromatogràfics significativament alterats es va dur a terme mitjançant ANOVA emprant un p valor de 0.01 i utilitzant com a factor de selecció el temps de dessecació. L'anàlisi estadística de les dades referents a les rosetes d'*Arabidopsis* (Figura 5.4) va desvetllar la existència de 115 senyals cromatogràfics significativament alterats d'un total de 1932 detectats, mentre que en les rosetes de *Thellungiella* (Figura 5.5) només 40 senyals de 1982 passaren l'anàlisi de la variància. En les plantes d'*Arabidopsis*, els 115 senyals significativament alterats s'agruparen en cinc clústers depenent de la tendència seguida pels senyals al llarg del temps. El clúster més nombrós va ser el tercer, i contenia 76 senyals que incrementaren la seua concentració de forma lineal al llarg del període experimental. En el cinquè clúster la tendència fou una repressió en resposta primerenca a l'estrès, ja que els 11 senyals que el contenien es mantingueren constants una vegada iniciada l'excisió, disminuint els seus valors considerablement al comparar-los amb els del minut zero. Els clústers 1 (8 senyals), 2 (8 senyals) i 4 (12 senyals), mostraren comportaments similars entre ells, ja que només presentaren augments en la concentració dels possibles metabòlits en moments puntuals de l'experiment, a 40, 120 i 20 minuts, respectivament. En *Thellungiella*, els 40 senyals alterats s'agruparen en quatre clústers de comportament. El primer, amb 14 senyals, va mostrar un increment progressiu fins el final del període d'estudi. En el tercer clúster, amb 7 senyals, els canvis aparegueren entre la primera i la segon hora, mentre que en el quart (7 senyals) els valors foren més elevats dins dels primers 40 minuts que en la resta de punts, on es mantingueren similars al punt control.

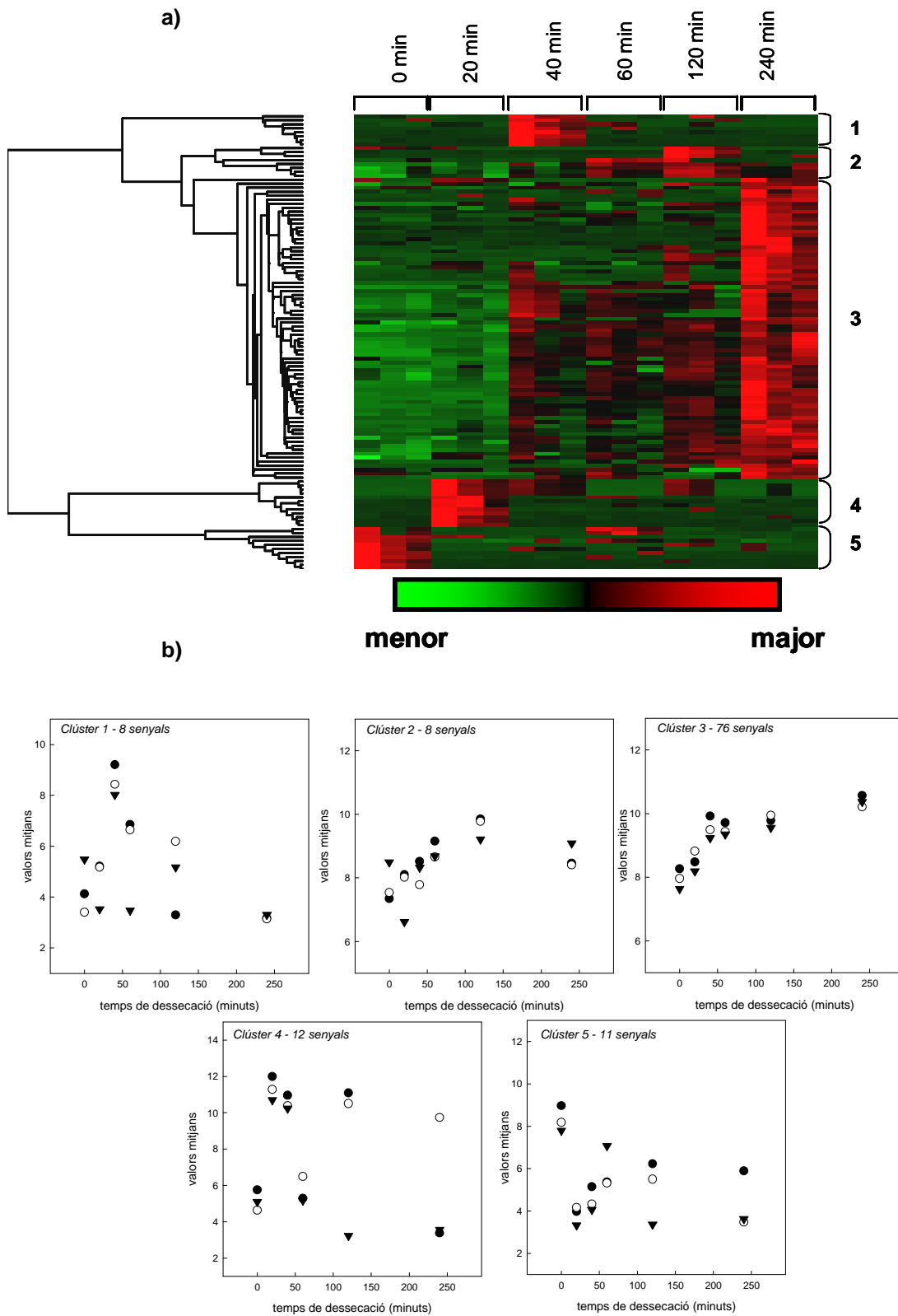


Figura 5.4 (a) HCA dels senyals significativament alterats en rossetes d'Arabidopsis sotmeses a estrès per dessecació ($p \leq 0.01$) (els nombres de la dreta de la figura fan referència als diferents clústers) i (b) perfils dels clústers obtinguts. En cada gràfic, (\circ , \bullet i \blacktriangledown) representen diferents rèpliques d'extracció

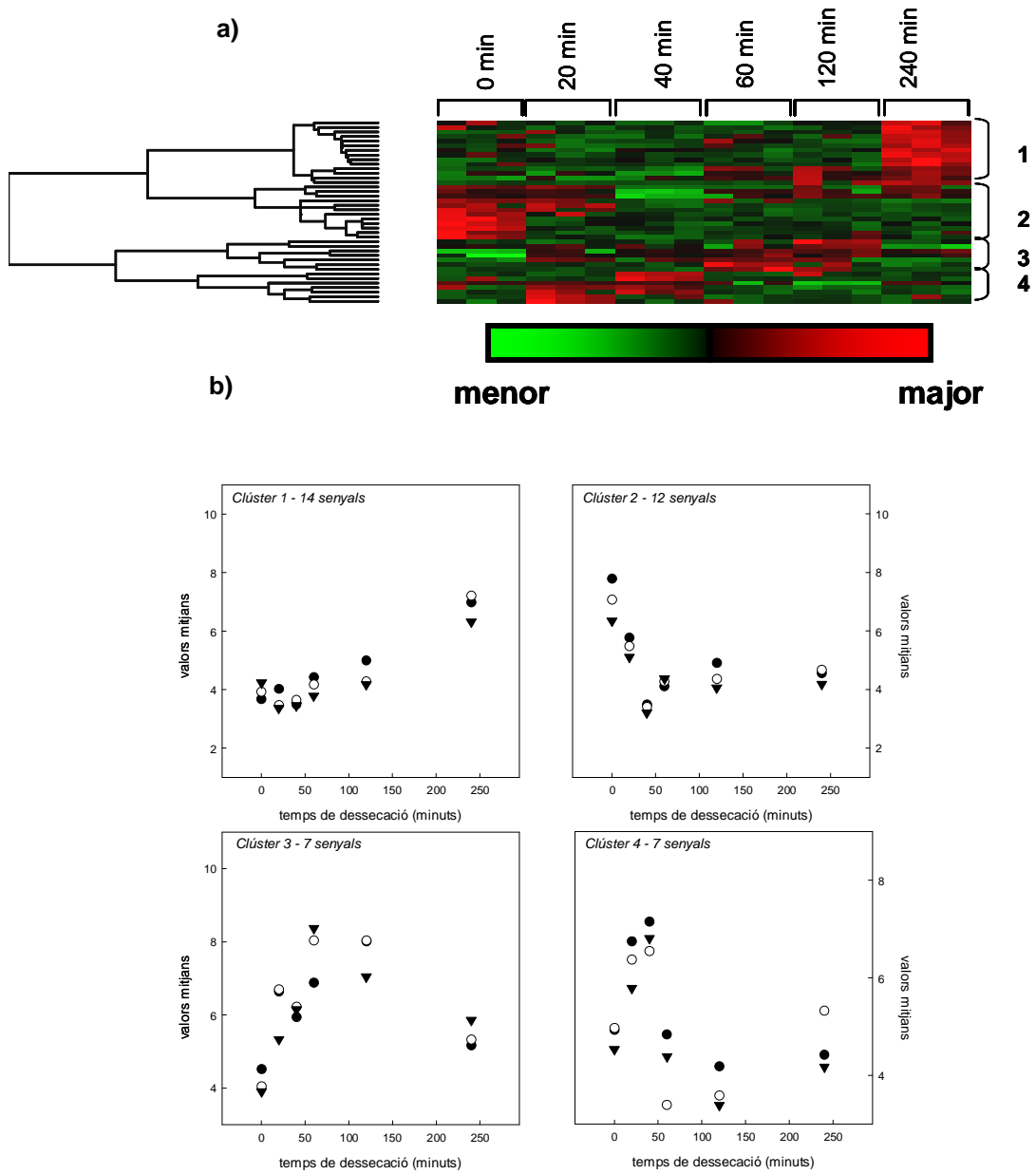


Figura 5.5 (a) HCA dels senyals significativament alterats en rosetes de *Thellungiella* sotmeses a estrès per dessecació ($p \leq 0.01$) (els nombres de la dreta de la figura fan referència als diferents clústers) i (b) perfils dels clústers obtinguts. En cada gràfic, (○, ● i ▼) representen diferents rèpliques d'extracció

Al comparar els senyals significativament alterats en condicions de dessecació provinents d'una espècie o l'altra tan sols es va trobar un en comú (Figura 5.6). Aquest resultat indica el baix grau de solapament existent entre ambdues espècies pel que fa al tipus de metabòlits secundaris que es venen alterats per l'estrès per dessecació.

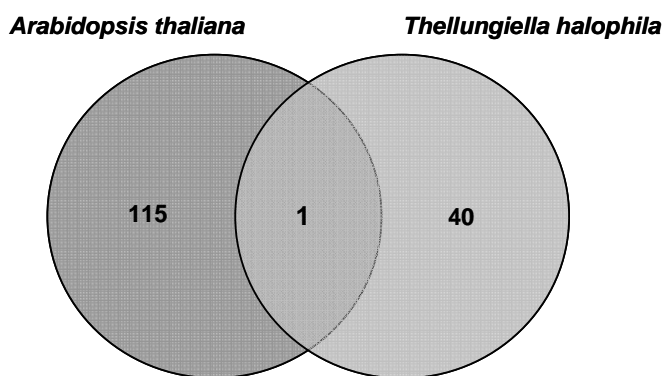


Figura 5.6 Diagrames de Venn que representen el solapament dels senyals significativament alterats de plantes d'*Arabidopsis* i *Thellungiella* sotmeses a estrès per dessecació

5.1.2 Experiments d'estrès salí

5.1.2.1 Concentració d'ions clorur

La concentració d'aquests ions en les rossetes de les plantes recol·lectades va augmentar progressivament amb el temps d'experiment en ambdós genotips, arribant a valors molt més elevats en les plantes estressades d'*Arabidopsis*, considerat el genotip més sensible a la salinitat. Tal i com es pot observar a la següent figura, les plantes d'*Arabidopsis* (Figura 5.7a) van acumular el triple d'ions clorurs en les seues fulles que les de *Thellungiella* (Figura 5.7b) en condicions salines, assolint després de 20 dies d'experiment, valors de $56.1 \text{ mg g}^{-1} \text{ pf}$, mentre que en les rossetes de *Thellungiella* es van sobrepassar els nivells basals amb valors de tan sols $16.1 \text{ mg g}^{-1} \text{ pf}$ al final del tractament salí.

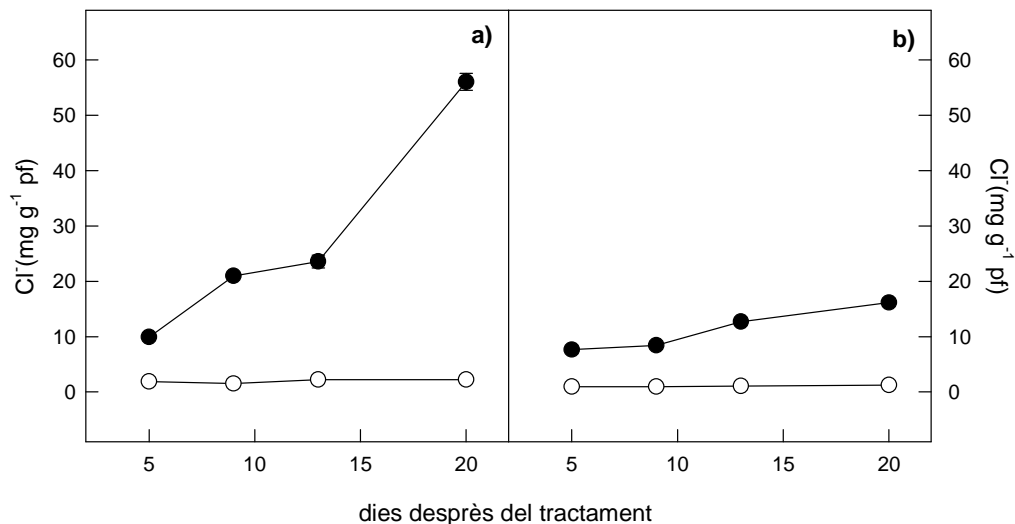


Figura 5.7 Concentració d'ions clorur en rossetes de: a) *Arabidopsis* i b) *Thellungiella* sotmeses estrès salí. En cada gràfic, (○) representa a les plantes control i (●) a les estressades

5.1.2.2 Concentració de prolina

A diferència dels resultats observats en els experiments d'estrès per dessecació, les concentracions de prolina foliar de les plantes estressades al llarg dels 20 dies que va durar el tractament salí en *Arabidopsis* (Figura 5.8a) i *Thellungiella* (Figura 5.8b) presentaren perfils molt similars. Després de cinc dies d'estrès, les concentracions de prolina foliar es situaren en 20.8 i 18.4 $\mu\text{mol g}^{-1}$ pf en plantes d'*Arabidopsis* i *Thellungiella*, respectivament. Al cap de 20 dies, la concentració de l'aminoàcid en les plantes estressades d'*Arabidopsis* fou 22.0 vegades superior a la de les plantes control, mentre que en *Thellungiella* el increment només va ser de 3.3. Al igual que en l'experiment anterior, els nivells control de prolina foren sempre superiors en les plantes de *Thellungiella* que en les d'*Arabidopsis*.

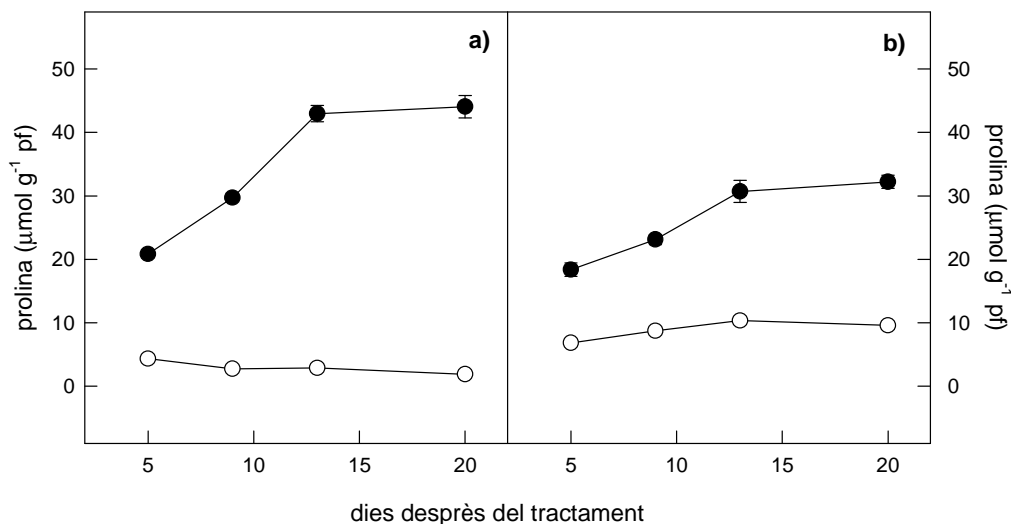


Figura 5.8 Concentració de prolina en rossetes de: a) Arabidopsis i b) Thellungiella sotmeses a estrès salí. En cada gràfic, (○) representa a les plantes control i (●) a les estressades

5.1.2.3 Concentració d'ABA i JA

Es va dur a terme la determinació d'hormones vegetals als extractes de rossetes d'Arabidopsis i Thellungiella sotmeses a estrès salí mitjançant el mètode descrit a l'apartat 3.5 de material i mètodes, i els patrons d'acumulació hormonal, al contrari que en el cas anterior, presentaren diferències notables entre ambdues espècies (Figura 5.9). En resposta a l'increment de la salinitat en l'aigua de reg, les plantes d'Arabidopsis (Figura 5.9a) van acumular més quantitat d'ABA que les de Thellungiella (Figura 5.9b), encara que en condicions control la concentració d'aquesta hormona semblà lleugerament superior en Thellungiella. Per una altra banda, el JA es va acumular en les plantes d'Arabidopsis exposades a l'estrès salí (Figura 5.9c), mostrant un augment important al cap dels 20 dies de tractament, amb una concentració de 482.3 ng g⁻¹ pf, mentre que en les fulles de Thellungiella (Figura 5.9d) no es trobaren canvis significatius en la concentració hormonal durant tot l'experiment, observant-s'hi nivells de JA entre 0.5 i 3.5 ng g⁻¹ pf.

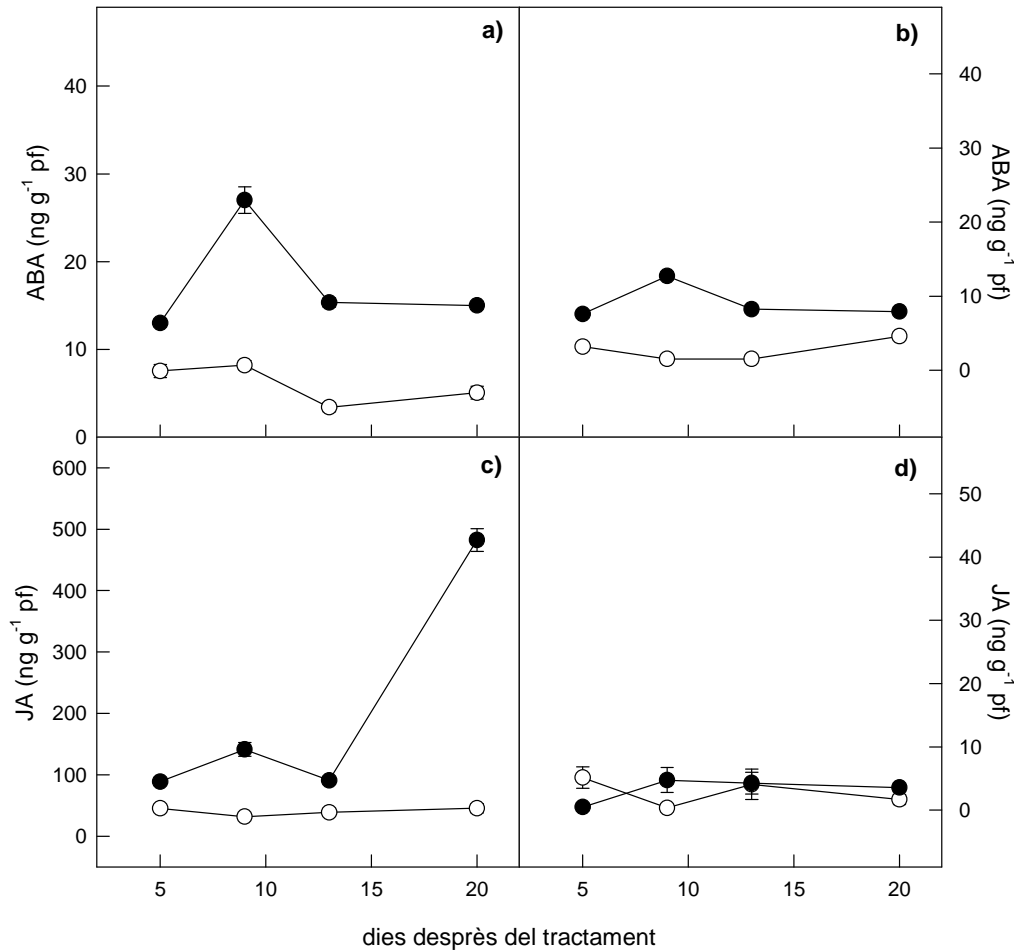


Figura 5.9 Concentració de ABA i JA en rossetes de: a) i c) *Arabidopsis* i b) i d) *Thellungiella* sotmeses a estrès salí. En cada gràfic, (○) representa a les plantes control i (●) a les estressades

5.1.2.4 Perfilats metabolòmic

L'anàlisi estadística per a l'extracció dels senyals cromatogràfics significativament alterats es va dur a terme amb el paquet maSigPro (Conesa *et al.*, 2006), tal i com es descriu a l'apartat 3.6.3 de materials i mètodes. L'anàlisi estadística de les dades extretes pel *xcms* va trobar un total de 1688 senyals significativament alterats dels 4467 detectats pel software en *Arabidopsis* (Figura 5.10). En *Thellungiella* foren 1178 els senyals amb valors diferencials, d'un total de 3680 (Figura 5.11)(Annex 5).

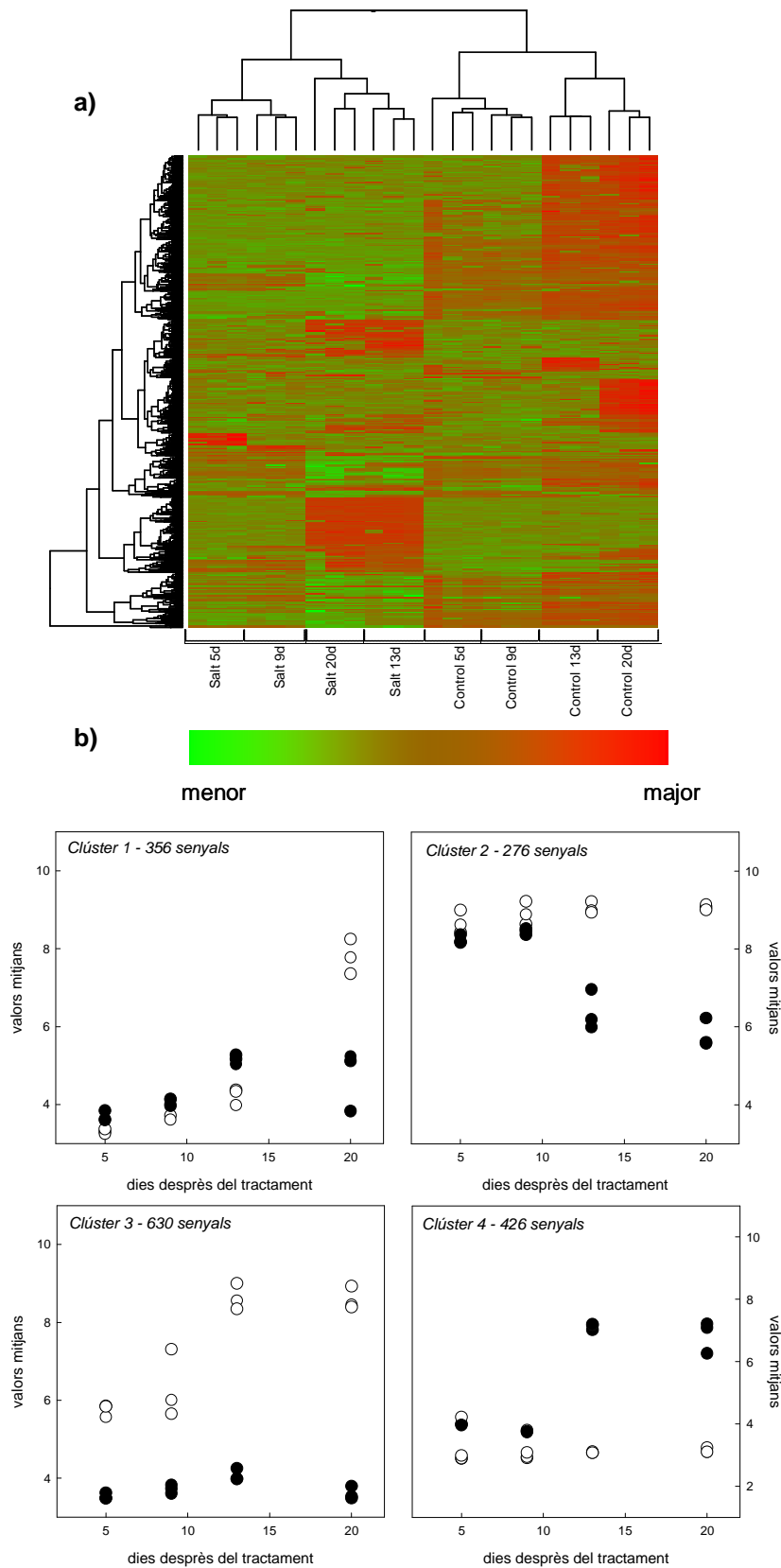


Figura 5.10 (a) HCA dels senyals significativament alterats en rosetes d'Arabidopsis sotmeses a estrès salí ($p \leq 0.01$) i (b) perfils dels clústers obtinguts. En cada gràfic, (○) representa les plantes control i (●) les estressades

Tant en l'anàlisi resultant en *Arabidopsis* com en *Thellungiella*, els senyals significativament alterats donats pel maSigPro es pogueren agrupar en quatre clústers segons el seu comportament, és a dir, segons la seua variació característica i significativa al llarg del temps. En aquest software, les variacions de les mostres tractades es compararen sempre amb els seus corresponents controls, de forma que per a que un clúster tingués un significat biològic es va considerar com a condició necessària que les mostres control mostraren una tendència més estable que les tractades. Tenint en compte aquesta consideració, sols 2 dels quatre clústers d'*Arabidopsis* tenien un comportament amb significat biològic, els clústers 2 i 4, reduint-se a 702 el nombre total de metabòlits alterats a causa de l'estrès salí. En el cas de *Thellungiella* tots els clústers calculats pel sistema estadístic mostraren significat biològic, i per tant, un total de 1179 senyals diferencialment alterats, casi 500 més que en *Arabidopsis*.

Els gràfics HCA mostren una clara separació entre les plantes tractades i les control en el cas de les plantes d'*Arabidopsis*. Pel contrari, en el cas de *Thellungiella*, la separació s'observà després de cinc dies de tractament, ja que en eixe punt les plantes d'ambdós grups apareixien solapades. Aquest resultat podria indicar que les plantes de *Thellungiella* sotmeses a estrès salí durant cinc dies tenen similars perfils de metabòlits secundaris que les plantes control, i que, per tant, les variacions més significatives apareixen a partir d'aquest moment. En general, els canvis metabòlics en les plantes d'*Arabidopsis* es podrien classificar com a respostes fisiològiques a termini mitjà, importants a partir dels 13 dies després del tractament, mentre que en les de *Thellungiella* poden identificar-se respostes inicials (clústers 2 i 4), a termini mitjà (clúster 1) i a llarg termini (clúster 3). En aquesta espècie, els augments en els nivells dels metabòlits foren més predominants que els descensos, amb sols 147 senyals disminuïts en resposta a l'estrès salí.

L'estudi del solapament va revelar un total de 50 senyals comuns a plantes d'ambdues espècies del total de senyals significativament alterats (Figura 5.12).

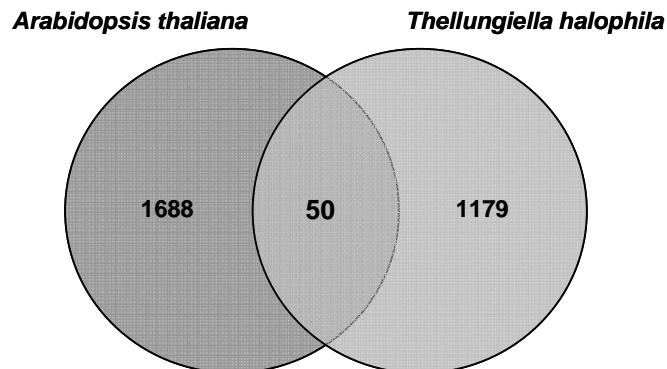


Figura 5.12 Diagrames de Venn que representen el solapament dels senyals significativament alterats de plantes d'*Arabidopsis* i *Thellungiella* sotmeses a estrès salí

Quan es compararen els perfils metabolòmics de les plantes no estressades d'*Arabidopsis* i *Thellungiella* es va trobar un alt grau de solapament, amb un total de 332 senyals comuns, dels quals 109 presentaren diferències significatives en intensitat entre ambdues espècies (Figura 5.13). Dels 109 senyals alterats, 5 foren majors en les plantes control d'*Arabidopsis* i 104 en les de *Thellungiella*.

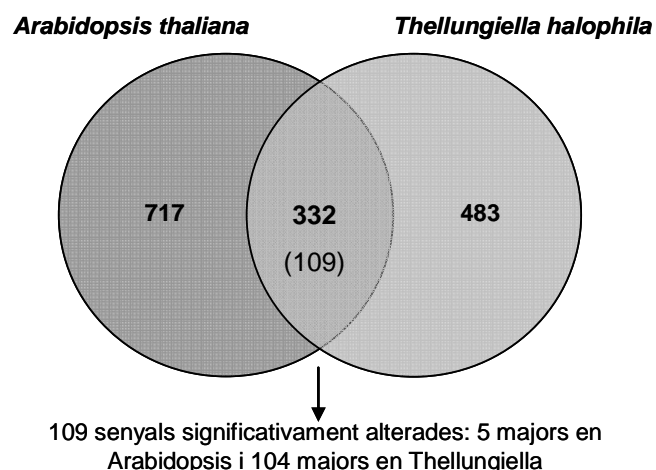


Figura 5.13 Diagrames de Venn que representen el solapament dels senyals entre plantes d'*Arabidopsis* i *Thellungiella* en condicions control

5.2 Discussió

En aquest capítol, s'han estudiat les respostes fisiològiques i metabòliques, comunes i divergents entre *Arabidopsis thaliana* i *Thellungiella halophila* quan es sotmeten a condicions d'estrès abiòtic. Aquestes respostes poden ser agrupades com a anticipades o regulades a causa de l'estrès, de les quals són les primeres les que pareixen tindre major importància en la tolerància a l'estrès salí i per dessecació. D'acord amb els resultats exposats anteriorment, les plantes de *Thellungiella* tenen un gran avantatge comparades amb les d'*Arabidopsis* quan es sotmeten a estrès salí, ja que són capaces de reduir la quantitat d'ions clorur transportats a les seues fulles. Aquesta menor acumulació d'ions tòxics ve acompanyada d'una menor concentració d'ABA i JA comparat amb *Arabidopsis*. En quant a l'estrès causat per l'excisió de la roseta basal i posterior dessecació, les fulles d'ambdues espècies exhibiren les mateixes taxes de pèrdua d'aigua, que es relacionen amb perfils de canvis similars per les hormones ABA i JA, encara que els augments de les concentracions d'aquests compostos foren més acusats en les fulles d'*Arabidopsis* que en les de *Thellungiella*, el que podria indicar una major pressió de l'estrès en les plantes del genotip sensible.

La possible implicació de la prolina en la tolerància a l'estrès salí i per sequera ha segut estudiat i discutit en diferents espècies de plantes; per exemple, (Ghars *et al.*, 2008) conclouen que la capacitat per a sintetitzar prolina no estava associada a la tolerància a l'estrès salí al comparar amb el mutant hiperacumulador de prolina d'*Arabidopsis eskimo-1* i *Thellungiella*. Hi ha autors que han descrit que *Thellungiella* té majors nivells basals de prolina que *Arabidopsis*, conferint-li així una major tolerància front a l'estrès salí (Kant *et al.*, 2006). A més a més, (Claussen, 2005) va suggerir que la relació $[\text{prolina}]_{\text{estrès}}/[\text{prolina}]_{\text{control}}$ podria ser un bon indicador de la pressió de l'estrès. En altres treballs es mostraren com dos genotips de cítrics, un més sensible que l'altre a l'estrès abiòtic, acumularen prolina en el mateix grau però els nivells basals foren sempre majors en el genotip tolerant (Arbona *et al.*, 2008). En el treball presentat en aquest document, l'acumulació de prolina no va semblar estar aparentment relacionada amb l'acumulació de clorurs ni amb el

grau de dessecació. Les dos espècies exhibiren el mateix perfil de pèrdua d'aigua; però, sols les plantes de *Thellungiella* van mostrar acumulació de prolina en les seues fulles en resposta a l'excisió de la rosseta basal. Pel contrari, baix condicions salines, les plantes de *Thellungiella* van acumular menor quantitat de ions clorur que les d'*Arabidopsis*, tot i que mostraren augments similars en el contingut de prolina. En els dos grups d'experiments, els nivells basals de prolina foren sempre majors en les rossetes de *Thellungiella* que en les d'*Arabidopsis*, el que recolza la importància d'aquest aspecte com a tret de tolerància, protegint a la planta front a l'estrès des de l'inici. A més a més, els nostres resultats estarien també en concordança amb les conclusions de (Ghars *et al.*, 2008), suggerint que l'augment de la capacitat per a sintetitzar prolina no implica un augment en la tolerància a l'estrès. En quant a l'acumulació d'ions tòxics en les fulles, (Inan *et al.*, 2004) i (Kant *et al.*, 2006) també descrigueren una menor acumulació de Na^+ en plantes de *Thellungiella* al comparar-les amb *Arabidopsis*. La qual cosa sembla ser certa també per als ions Cl^- , i coincideix amb resultats obtinguts en altres espècies del gènere *Citrus*. En aquestos treballs, la major tolerància a l'estrès salí està associada a una menor concentració d'ions Cl^- als òrgans fotosintètics (Bañuls i Primo-Millo, 1995; Arbona *et al.*, 2006; López-Climent *et al.*, 2008). (Stepien i Johnson, 2009) han descrit recentment resultats similars en termes de paràmetres fotosintètics i acumulació de Na^+ per a plantes d'*Arabidopsis* i *Thellungiella* cultivades en medis salins.

És ben sabut que l'adaptació de les plantes a les condicions ambientals adverses es regula mitjançant una xarxa intricada d'hormones vegetals. El paper de l'ABA en condicions d'estrès salí i/o hídric ha segut àmpliament estudiat tant en plantes model com en cultius, mentre que el paper del JA és menys conegut. Alguns autors han estudiat la funció de l'ABA en el tancament estomàtic (Gómez-Cadenas *et al.*, 2002; Arbona *et al.*, 2006), en la síntesi de proteïnes de resposta a estrès (Wong *et al.*, 2006), en l'activació del sistema antioxidant (Jiang i Zhang, 2001) així com la seua interacció amb altres hormones vegetals com l'etilè (Gómez-Cadenas *et al.*, 1996) en la inducció de l'abscisió foliar. La funció del JA en la regulació de les respostes front a l'estrès abiòtic no està tan clara encara que alguns autors indiquen un solapament de

respostes fisiològiques induïdes per el JA o l'ABA tals com el tancament estomàtic (Acharya i Assmann, 2009) o la producció de ROS (Saito *et al.*, 2008) en condicions d'estrès abiòtic. Però, les funcions específiques de les fitohormones en l'adaptació de les plantes a algunes condicions mediambientals, i com s'associen en la capacitat per a tolerar l'estrès, no estan massa clares. En relació a aquesta tesi, en les condicions experimentals d'escissió de la rosseta basal, les fulles d'*Arabidopsis* i de *Thellungiella* exhibiren perfils d'acumulació d'ABA i JA molt similars, encara que els valors foren sempre més elevats en les plantes d'*Arabidopsis*. Per contra, en condicions salines, el comportament d'aquestes hormones va ser diferent en les plantes d'ambdós genotips. En les rossetes d'*Arabidopsis* els nivells d'ABA i JA augmentaren molt amb l'aplicació de l'estrès, mentre que en les de *Thellungiella* tan sols la concentració d'ABA es va veure lleugerament incrementada. Aquests resultats suggereixen que les plantes d'*Arabidopsis* i *Thellungiella* no pateixen la mateixa pressió en les mateixes condicions d'estrès, sent aquesta sempre superior en el cas d'*Arabidopsis*. Pareix ser, tal i com han apuntat altres autors, que el JA actua com a disparador de la senyal, mentre que l'ABA és el que modula les respostes fisiològiques per a aclimatar-se a les noves condicions d'estrès (Mahouachi *et al.*, 2007; Arbona i Gómez-Cadenas, 2008).

Atenent als perfilats metabolòmics realitzats en *Arabidopsis* i *Thellungiella*, en les condicions descrites en aquest treball, pareix ser que les variacions en els metabòlits secundaris en fulles d'ambdues espècies no estan associades a cap regulació hormonal específica. Quan es sotmeten a dessecació, aquestes plantes tenen perfils hormonals similars, però el metabolisme secundari mostra diferents respostes. Les plantes d'*Arabidopsis* mostraren un gran nombre de metabòlits alterats quan es van sotmetre a dessecació, el que es podria relacionar amb els majors increments en els nivells hormonals, al comparar amb *Thellungiella*. El clúster 3 d'*Arabidopsis* (amb 76 senyals) mostrà una tendència compatible amb la inducció depenent del temps d'estrès, que presumiblement es podria associar amb una inducció depenent d'ABA. Les rossetes de *Thellungiella* només van mostrar un pocs metabòlits alterats a causa de la dessecació. D'aquests, els 7 senyals del clúster 1 es podrien

relacionar amb l'augment de la concentració d'ABA. Aquestes diferències es poden deure possiblement al diferent estat del metabolisme basal d'ambdues espècies, recolzat pel fet que només comparteixen un metabòlit alterat en resposta a la dessecació. Pel contrari, en condicions d'estrès salí, va ser *Thellungiella* l'espècie que més canvis va mostrar en el seu metabolisme secundari, tot i que va ser *Arabidopsis* la que va patir variacions hormonals més fortes. A més a més, les plantes de *Thellungiella* sotmeses a estrès salí començaren a notar els canvis en el seu metabolisme secundari a partir del novè dia de tractament, ja que en els primers cinc dies tant les plantes control com les estressades mostraren perfils de metabòlits secundaris molt similars. Les rossetes d'*Arabidopsis* sotmeses a elevada salinitat en aigua de reg patiren canvis respecte als corresponents controls des del inici del tractament. Ambdues espècies compartiren 50 metabòlits alterats en resposta a la salinitat, molt pocs si es té en compte la quantitat de senyals detectats, que foren 4467 i 3680 per a *Arabidopsis* i *Thellungiella*, respectivament. Tal i com s'ha comentat en els resultats, al comparar els metabòlits existents en plantes d'*Arabidopsis* i de *Thellungiella* en condicions control, es va trobar un alt grau de solapament, i d'aquests, els metabòlits diferencialment alterats entre ambdues espècies foren 109, dels quals 104 es trobaven amb nivells més elevats en *Thellungiella*, i 5 en *Arabidopsis*, suggerint que és *Thellungiella* l'espècie amb un metabolisme secundari més preparat per a afrontar les condicions adverses.

En general, les respostes del metabolisme secundari semblen ser específiques del genotip, i a més a més, no pareixen estar relacionades amb les regulacions hormonals que presenten. (Gong *et al.*, 2005) ja mostraren que en condicions salines, els canvis en el perfil de transcripció en plantes de *Thellungiella* foren menors que en *Arabidopsis*. A més a més, els transcrits induïts en *Thellungiella* codifiquen per a elements involucrats en el plegament de proteïnes, en modificacions post-traslacionals i en la distribució de proteïnes, més que en la inducció de proteïnes específiques contra l'estrès. Totes aquestes evidències són compatibles amb l'existència d'una preparació anticipada a l'estrès en *Thellungiella*.

Les dades presentades en aquest treball estan d'acord amb aquesta hipòtesi: en condicions basals, les plantes de *Thellungiella* mostraren nivells d'alguns metabòlits més alts (prolina i metabòlits secundaris) que les d'*Arabidopsis*; són menys els metabòlits que es veuen significativament alterats en les plantes de *Thellungiella* en resposta a la sequera, però hi són més els metabòlits afectats quan es tracta d'estrès per salinitat.

A mode de resum, les dades presentades en aquest treball són compatibles amb l'existència de diferents condicions metabòliques basals entre les plantes de *Thellungiella* i *Arabidopsis*, i que són aquestes condicions les responsables de la diferent tolerància a l'estrès abiòtic que mostren ambdues espècies. Aquestes diferències no pareixen estar relacionades amb la regulació hormonal, més bé amb diferents respostes del metabolisme primari i secundari quan les plantes es sotmeten a estrès. Les respostes fisiològiques observades en *Arabidopsis* estan induïdes post-estrès mitjançant una regulació hormonal, mentre que *Thellungiella* té una configuració metabòlica basal millor preparada per a les condicions ambientals adverses. Aquest metabolisme prevé les posteriors modificacions fisiològiques induïdes per les fitohormones, a diferència d'*Arabidopsis* on totes aquestes respostes estan directament regulades per l'estrès, mitjançant una forta regulació hormonal.

***6. Canvis hormonal i metabòlics en
arrels de cítrics sotmesos a estrès per
inundació i estrès per sequera***

6. CANVIS HORMONALS I METABÒLICS EN ARRELS DE CÍTRICS SOTMESOS A ESTRÈS PER INUNDACIÓ I ESTRÈS PER SEQUERA

En l'actualitat, els peus o patrons de cítrics més utilitzats són el citrange Carrizo i el mandarí Cleopatra, i és per això que l'estudi fisiològic de cítrics s'ha realitzat en aquests dos genotips. Mandarí Cleopatra és una espècie tolerant a la tristesa, exocortis, psoriasi i xiloporosi, també tolera la clorosi fèrrica i és notablement tolerant a la salinitat. Citrange Carrizo és, com tots els patrons de cítrics utilitzats actualment, tolerant a la tristesa però també ho és a xiloporosi, psoriasi, nematodes i a l'atac de *Phytophthora spp.* És, però, sensible a la exocortis i desenvolupa clorosi fèrrica en sòls calcaris. El gènere *Citrus* i algunes espècies afins es classifiquen com a sensibles a l'estrès per inundació del substrat i a l'estrès per sequera. Sota condicions d'inundació citrange Carrizo mostra una tolerància relativament alta mentre que el mandarí Cleopatra és molt sensible. Aquesta diferent tolerància s'ha associat amb la diferent habilitat per a eliminar les espècies reactives d'oxigen (Arbona *et al.*, 2008). Però, en condicions de dèficit hídric, és Cleopatra l'espècie més tolerant (Pérez-Pérez *et al.*, 2010). En general, les plantes responen i s'adapten a l'estrès per tal de sobreviure en diverses condicions ambientals, i ho fan mitjançant l'adquisició de mecanismes de tolerància que promouen canvis fisiològics i bioquímics (Urano *et al.*, 2010). S'ha demostrat prèviament que existeixen mecanismes específics i probablement connectats entre ells, que podrien ser la base de les diferents toleràncies existents entre genotips, tals com l'ajustament de la maquinària fotosintètica (López-Climent *et al.*, 2008), senyals hormonals específiques (Arbona i Gómez-Cadenas, 2008), i, particularment, la capacitat per a prevenir el dany oxidatiu induït per l'estrès mitjançant l'activació d'enzims i de metabòlits antioxidants (Arbona *et al.*, 2003). En aquest capítol de la tesi, l'objectiu ha segut completar els coneixements descrits fins el moment, amb l'estudi de les respostes hormonals i metabòliques en arrels dels dos patrons indicats anteriorment quan han estat sotmesos a estrès per inundació i dèficit hídric, contribuint així, a desxifrar el complicat metabolisme que presenten les espècies vegetals. Per a dur a terme tal tasca, s'han realitzat mesures de la concentració radicular de prolina, d'hormones

vegetals i d'alguns precursors de lignines, així com estudis dels canvis en el metabolisme secundari mitjançant perfilats metabolòmics.

6.1 Resultats

6.1.1 Experiments d'inundació

6.1.1.1 Concentració de prolina

Es realitzaren determinacions de la concentració de prolina radicular de plantes d'ambdós genotips de cítrics estudiats, mandarí Cleopatra i citrange Carrizo, i es trobaren algunes diferències entre ells. La concentració del metabòlit en les arrels de Cleopatra augmentà lleugerament en resposta a l'estrès, presentant valors compresos entre 17.6 i 17.8 $\mu\text{mol g}^{-1}$ pf en les plantes sotmeses a inundació (Figura 6.1a), però, en el tercer punt d'estudi, l'increment relatiu de les plantes inundades respecte del control sí que va ser acusat (veure gràfica inserida de la Figura 6.1a), amb un augment del 50 %. En les arrels de les plantes inundades de Carrizo les quantitats de prolina foren superiors que en les de Cleopatra, mostrant valors que anaven des de 26.4 fins 49.9 $\mu\text{mol g}^{-1}$ pf, el primer dia i últim d'inundació, respectivament (Figura 6.1b). En condicions control les concentracions de prolina oscil·laren entre 10.9 i 6.4 $\mu\text{mol g}^{-1}$ pf durant tot el període d'estudi. Fixant-se en la corresponent gràfica inserida es pot apreciar com la concentració de prolina augmenta dràsticament al final del tractament d'inundació.

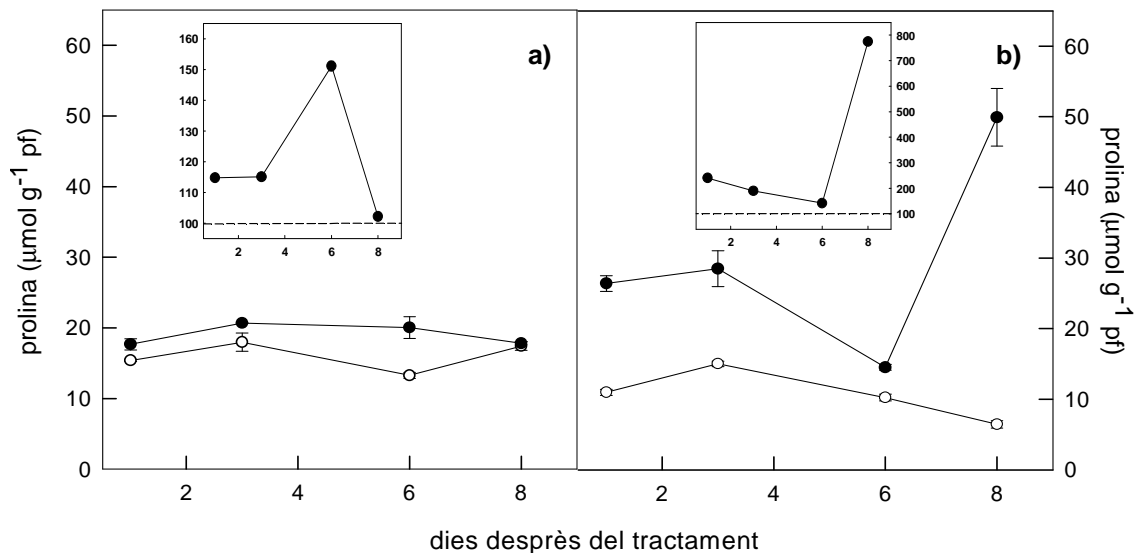


Figura 6.1 Concentració de prolina en arrels de (a) mandarí Cleopatra i (b) citrango Carrizo sotmeses a estrès per inundació. En cada gràfic, (○) representa les plantes control i (●) les estressades. Les gràfiques inserides mostren la variació percentual del metabòlit en les plantes estressades

6.1.1.2 Concentració de fitohormones

Es va dur a terme la quantificació de la concentració d'hormones vegetals i d'alguns precursors de lignines als extractes d'arrels de Cleopatra i Carrizo sotmeses a estrès per inundació, tal i com es descriu a l'apartat 3.5 dels materials i mètodes. En aquest cas es quantificaren els següents compostos: IAA, SA, JA, ABA, àcids cinàmic, cumàric i cafèic. Els resultats d'aquestes determinacions es mostren a les Figures 6.2, 6.3 i 6.4, tant per a les plantes controls com per a les inundades.

En el cas de Cleopatra, la concentració de SA va ser lleugerament superior en les arrels de les plantes inundades que en les control, al voltant de 1.2 vegades en tots els dies analitzats (Figura 6.2a). Pel contrari, les plantes de citrango Carrizo respongueren a aquest estrès mitjançant una disminució en els nivells de SA durant tot l'experiment (Figura 6.2b). Les arrels de les plantes control mostraren valors del metabòlit entre 18.3 i 11.8 ng g⁻¹ pf en el primer i últim dia, respectivament, mentre que les estressades mantingueren la concentració entre 13.1 ng g⁻¹ pf el primer dia d'inundació i 10.0 ng g⁻¹ pf en l'últim. Per altra

banda, la concentració d'IAA es va veure incrementada en ambdós genotips sotmesos a estrès per inundació. Els nivells d'aquest metabòlit en les plantes de mandarí Cleopatra (Figura 6.2c) sotmeses a embassament del substrat mostraren un increment progressiu al llarg del període experimental arribant a valors 4.2 vegades superiors que en condicions control; les arrels de citrange Carrizo (Figura 6.2d) també respongueren a l'estrès sintetitzant l'auxina, però de forma transitòria als 6 dies d'experiment, amb valors de 20.1 ng g⁻¹ pf, que es veren reduïts fins valors control posteriorment (5.6 ng g⁻¹ pf).

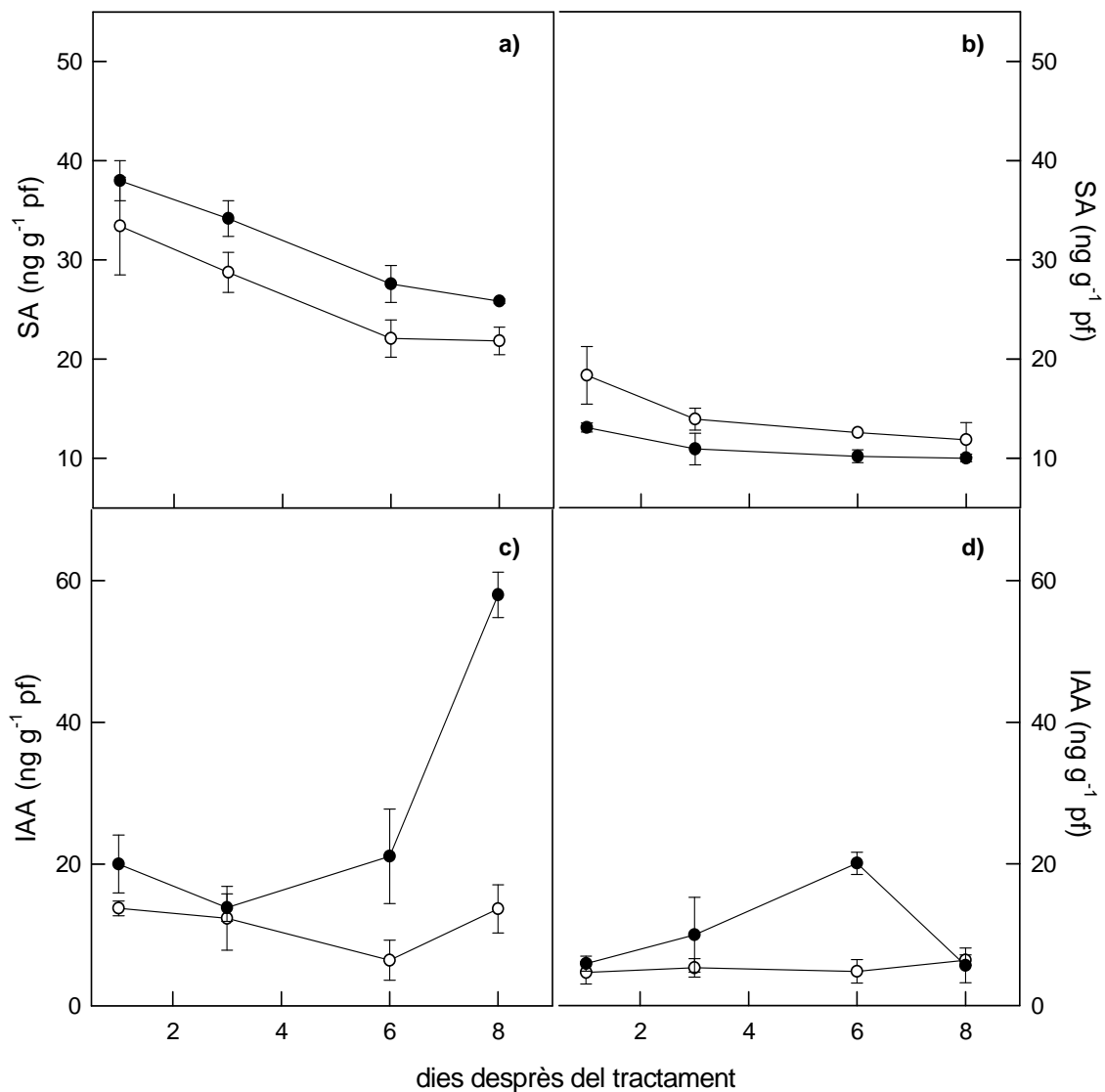


Figura 6.2 Concentració de SA i IAA en arrels de (a,c) mandarí Cleopatra i (b,d) citrange Carrizo sotmeses a estrès per inundació. En cada gràfic, (○) representa a les plantes control i (●) a les estressades

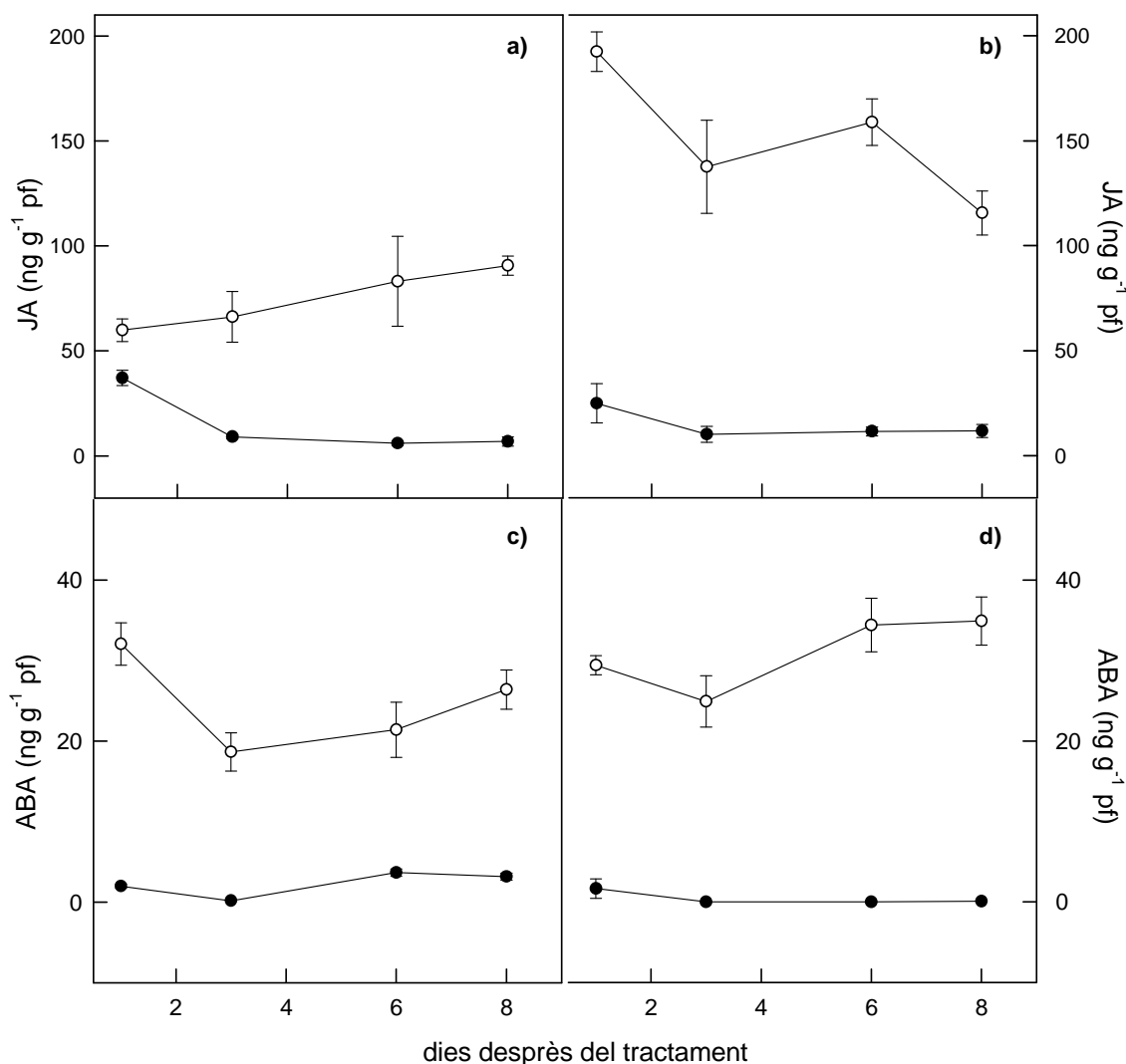


Figura 6.3 Concentració de JA i ABA en arrels de (a,c) mandarí Cleopatra i (b,d) citrange Carrizo sotmeses a estrès per inundació. En cada gràfic, (○) representa a les plantes control i (●) a les estressades

Fixant-nos en les variacions en la concentració de les hormones JA i ABA al sotmetre a les plantes a estrès per inundació, s'observaren patrons de canvis molt diferents als que s'han vist en els experiments anteriors en plantes model, ja que els nivells d'aquestes hormones es veren reduïts considerablement des del primer dia del tractament, arribant a nivells tan baixos que casi foren impossibles de detectar (Figura 6.3). Aquestos resultats estan en concordança amb estudis recents duts a terme en arrels de cítrics sotmesos a inundació del substrat (Arbona i Gómez-Cadenas, 2008). Les concentracions de JA en les arrels de les plantes control de Cleopatra es trobaren entre 59.9 i 90.7 ng g^{-1} pf al llarg dels 8 dies d'experiment, mentre que en les plantes estressades els

nivells d'aquest metabòlit es veren reduïts a valors de $6.9 \text{ ng g}^{-1} \text{ pf}$ al final del període experimental (Figura 6.3a). En el cas de Carrizo (Figura 6.3b), encara que el perfil de comportament va ser molt semblant, es van notar diferències al comparar-lo en Cleopatra, ja que els nivells en condicions control de JA foren superiors en tots els punts, arribant a valors de $192.4 \text{ ng g}^{-1} \text{ pf}$ front als $90.7 \text{ ng g}^{-1} \text{ pf}$ de Carrizo. En quant a l'ABA, la concentració en les arrels de plantes de Cleopatra inundades (Figura 6.3c) no va superar els $3.7 \text{ ng g}^{-1} \text{ pf}$, mentre que les plantes control assoliren concentracions en aquest àcid que oscil·laven entre 32.1 i $26.4 \text{ ng g}^{-1} \text{ pf}$ al inici i final de l'experiment, respectivament, aproximadament un 90 % superiors a les trobades en plantes inundades. Les arrels de les plantes inundades de Carrizo (Figura 6.3d) mostraren un perfil d'ABA molt similar al de Cleopatra, encara que en aquest cas no sobrepassaren els $1.6 \text{ ng g}^{-1} \text{ pf}$. Les concentracions d'aquesta hormona en arrels de plantes control de Carrizo es mantingueren entre 29.4 i $34.9 \text{ ng g}^{-1} \text{ pf}$ durant tot el període experimental.

El tractament d'inundació va provocar l'acumulació de l'àcid cinàmic en arrels de Cleopatra (Figura 6.4a) i Carrizo (Figura 6.4b), encara que en aquest últim en menor grau. Les plantes control de Cleopatra mostraren valors de $193.7 \text{ ng g}^{-1} \text{ pf}$ d'àcid cinàmic el primer dia d'experiment, mentre que en les arrels de plantes inundades la concentració va ser de $871.0 \text{ ng g}^{-1} \text{ pf}$ després d'un dia de tractament, 4.5 vegades superiors. Els increments relatius entre les plantes control i les inundades es mantingueren fins l'últim dia d'experiment, en el qual la concentració d'àcid cinàmic va ser 10.6 vegades superior en les arrels de les plantes inundades de mandarí Cleopatra que en les control. En el genotip Carrizo el tractament d'inundació va induir també un increment de la concentració radicular d'àcid cinàmic que després de 24 hores d'experiment fou de $659.6 \text{ ng g}^{-1} \text{ pf}$, al voltant de 13 vegades superior als valors control en la mateixa data ($52.7 \text{ ng g}^{-1} \text{ pf}$). Posteriorment, els valors es reduïren fins 432.9 i $330.7 \text{ ng g}^{-1} \text{ pf}$ als 3 i 6 dies, respectivament. Al final del període experimental, la concentració radicular de d'àcid cinàmic fou de $463.6 \text{ ng g}^{-1} \text{ pf}$ en plantes de Carrizo sotmeses a estrès per embassament del substrat, aproximadament 9 vegades superiors als valors de plantes control.

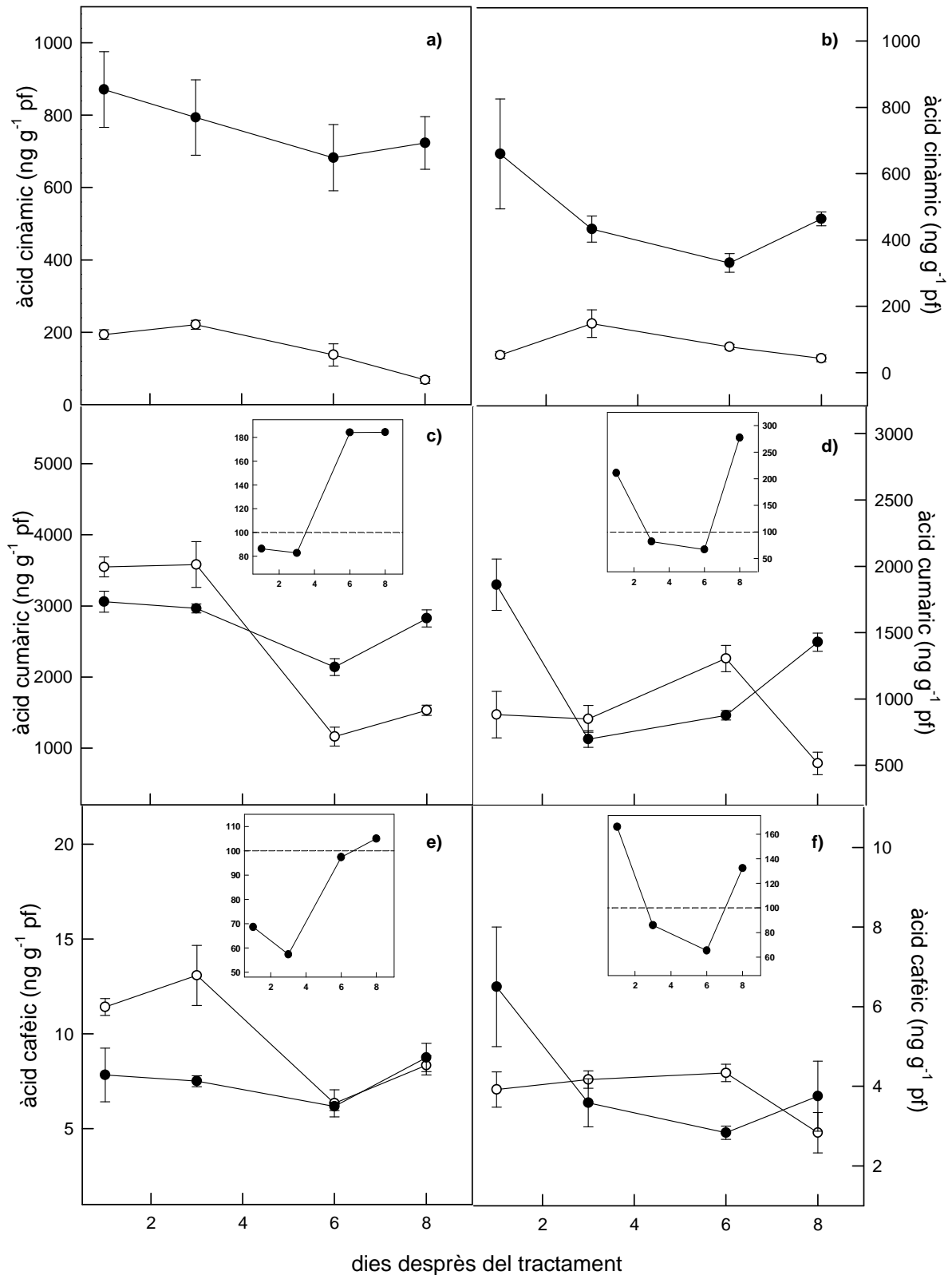


Figura 6.4 Concentració d'àcid cinàmic, àcid cumàric i àcid cafèic en arrels de (a,c,e) mandarí Cleopatra i (b,d,f) citrango Carrizo sotmeses a estrès per inundació. En cada gràfic, (○) representa a les plantes control i (●) a les estressades. Les gràfiques inserides mostren la variació percentual dels metabòlits en les plantes estressades

En el cas dels àcids cumàric i cafèic, les tendències observades foren diferents a les de l'àcid cinàmic, i diferents també entre ambdós genotips. La concentració d'àcid cumàric en les arrels de plantes de Cleopatra (Figura 6.4c) en condicions control va ser lleugerament superior (1.2 vegades) a la d'inundació en els tres primers dies d'experiment, mentre que en els dos últims punts, dies 6 i 8 després de l'inici del tractament, els nivells d'àcid cumàric de les plantes inundades foren 1.8 vegades superiors als de les plantes control (veure gràfica inserida de la Figura 6.4c), encara que no superaren els valors dels controls en les dues primeres dates, que foren de 3547.2 i 3581.7 ng g⁻¹ pf, respectivament. En el cas de citrango Carrizo (Figura 6.4d), els nivells d'àcid cumàric de les plantes inundades al final del tractament d'inundació fou 2.7 vegades superior a la de les control, assolint una concentració de 1427.6 ng g⁻¹ pf. Finalment, els perfils d'àcid cafèic mostraren variacions similars al llarg de l'experiment; en les plantes de Cleopatra (Figura 6.4e), la concentració en el primer i tercer dia d'estrès va ser inferior per a les plantes inundades (1.5 i 1.7 vegades), però, en els dos últims dies els nivells de l'àcid cafèic foren pràcticament iguals entre plantes d'ambdós tractaments. En les arrels de les plantes de Carrizo (Figura 6.4f) les diferències encara foren menys significatives que en Cleopatra, mantenint-se els nivells d'àcid cafèic molt similars entre plantes control i tractades al llarg del tot el període experimental.

6.1.1.3 Perfilats metabolòmics

Per tal de completar tot l'estudi fisiològic de les plantes de cítrics seleccionades, Cleopatra i Carrizo, es va realitzar també una anàlisi metabolòmica de les arrels de les plantes control i estressades (Annex 6). Les mostres vegetals s'analitzaren tal i com es descriu a l'apartat 3.6 de material i mètodes. Per tal de extraure els senyals o metabòlits significativament alterats en resposta a l'estrès per inundació es realitzaren anàlisis estadístiques de les dades mitjançant l'algoritme maSigPro (Conesa *et al.*, 2006) (Figures 6.5 i 6.6), que van desvetllar 112 senyals cromatogràfics significativament alterats en mandarí Cleopatra d'un total de 2880 detectats, mentre que en el cas de Carrizo foren 211 els que passaren l'anàlisi d'un total de 2765.

Com es pot observar a la Figura 6.5b, els senyals significativament alterats de la Figura 6.5a foren agrupats en cinc clústers amb diferents perfils, dels quals només quatre foren considerats com a clústers amb significat biològic. Es considera que un clúster de comportament té significat biològic quan les tendències de les plantes control són més estables que les de les plantes estressades. Atenent a aquest criteri, el clúster 5, amb 33 senyals, quedà descartat, ja que els nivells d'aquests senyals en les arrels estressades es van mantenir constants al llarg de tot l'experiment. Per tant, l'anàlisi realitzat a les arrels de Cleopatra deixà 79 senyals significativament alterats, de les 2880 inicials. Els clústers 1 i 4, amb 25 i 22 senyals, respectivament, mostraren perfils en els quals els possibles metabòlits es veren reprimits a causa de l'estrès, ja que els valors mitjans de les arrels de les plantes estressades estan en nivells inferiors als valors de les plantes control, perfil més acusat en el cas del primer clúster. En els clúster 2 i 3, que contenen 17 i 15 senyals, respectivament, els perfils van ser contraris als anteriors, i els senyals augmentaren amb l'aparició de l'estrès, des del primer dia en el clúster 2 i al final del tractament en el tercer.

En el cas de Carrizo, Figura 6.6, dels 2765 senyals detectats pel sistema informàtic, 211 es trobaven alterats significativament, i s'agruparen també en 5 clústers, dels quals només es consideraren clústers amb significat biològic els clústers 1 i 3, de forma que aquest genotip es va quedar amb 91 senyals significativament alterats. El clúster 1, amb 65 senyals, presentà una tendència molt clara on els nivells dels possibles metabòlits es veren incrementats per la presència de l'estrès, mentre que en el clúster 3, amb 26 senyals, es veren reduïts, disminuint els seus valors respecte dels corresponents controls.

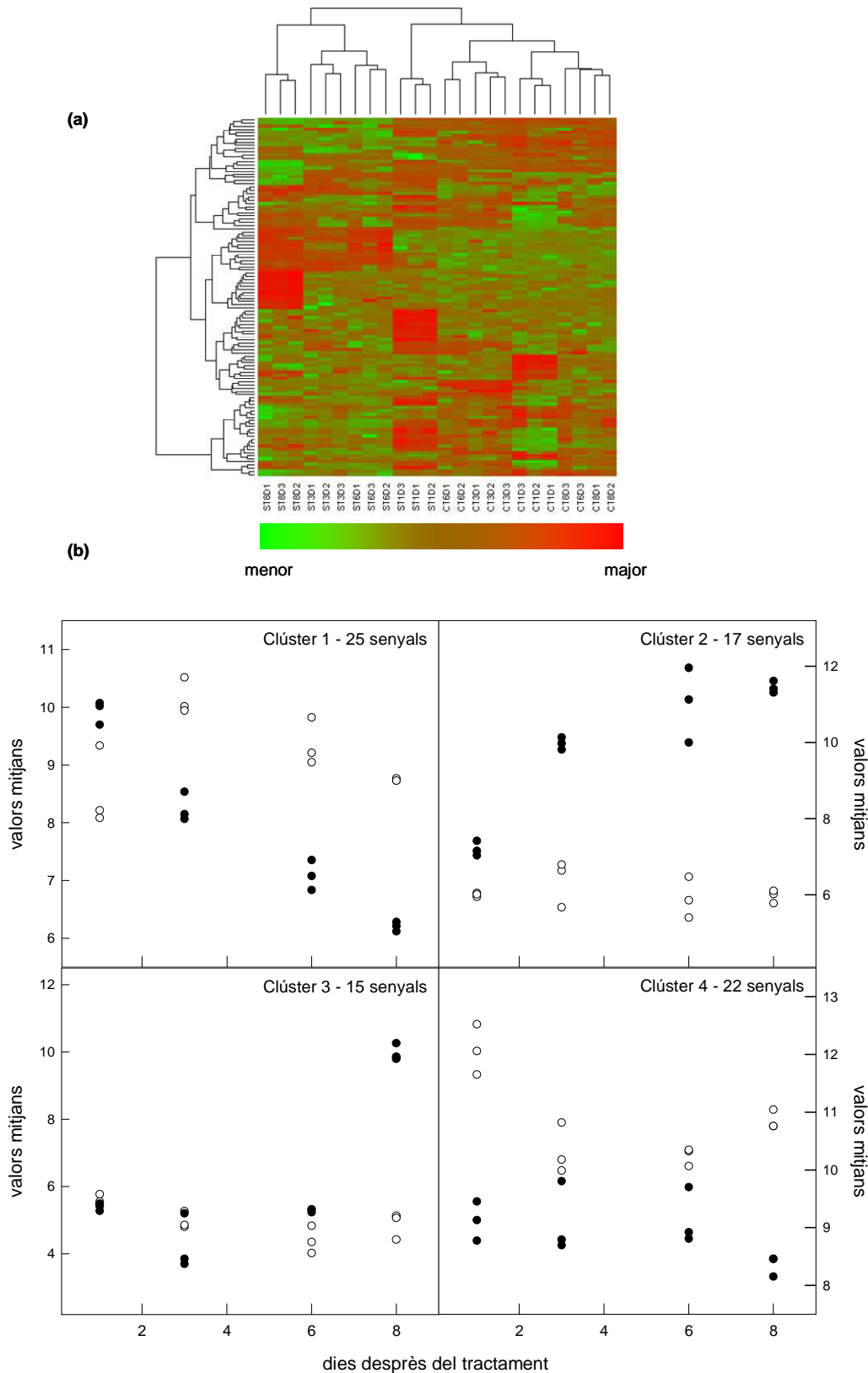


Figura 6.5 (a) HCA dels senyals significativament alterats en arrels de plantes de mandari Cleopatra sotmeses a estrès per inundació, i (b) perfils dels clústers obtinguts. En cada gràfic, (○) representa a les plantes control i (●) a les estressades

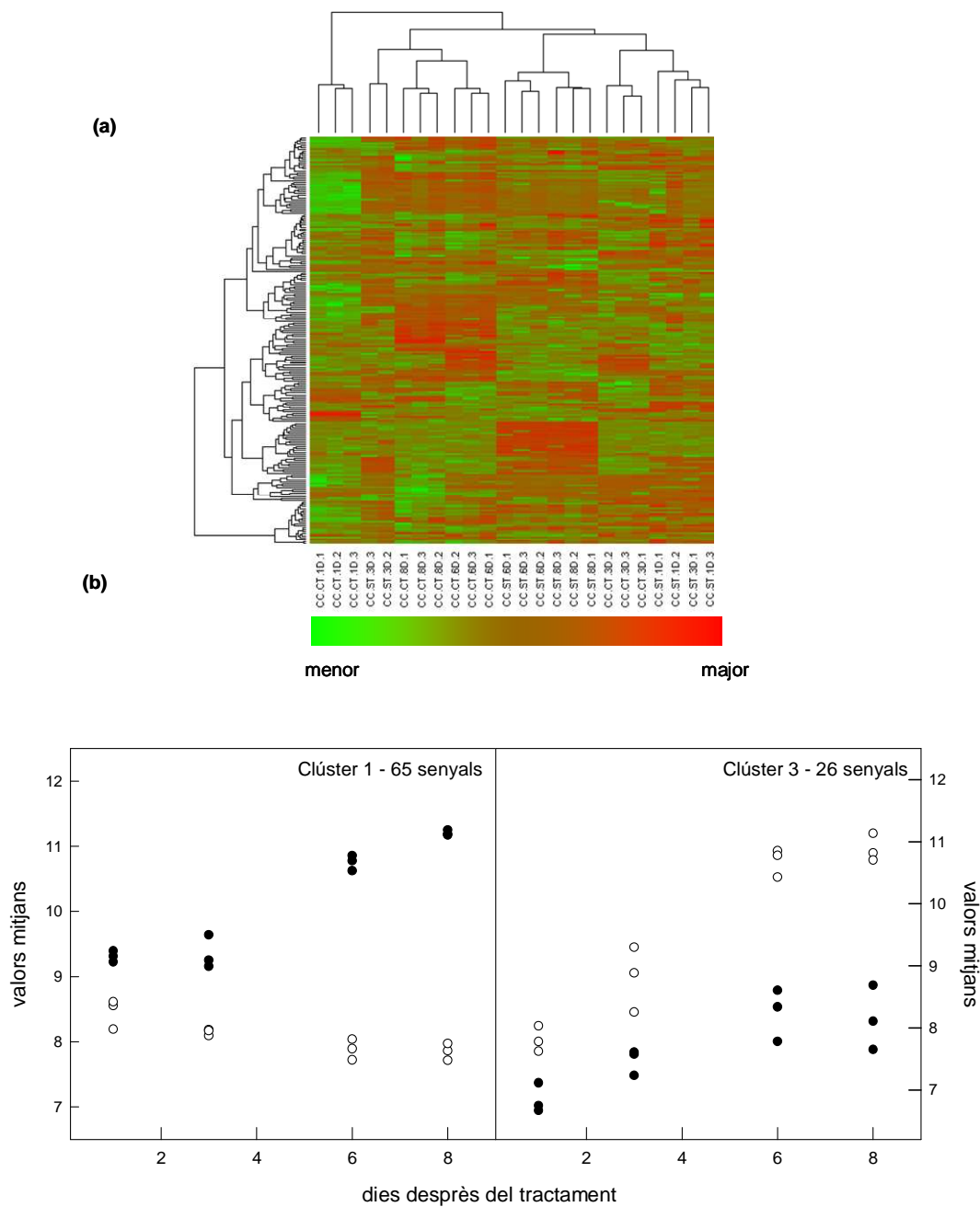


Figura 6.6 (a) HCA dels senyals significativament alterats en arrels de plantes de citrango Carrizo sotmeses a estrès per inundació, i (b) perfils dels clústers amb significat biològic obtinguts. En cada gràfic, (○) representa a les plantes control i (●) a les estressades

Al comparar els senyals significativament alterats a causa de l'estrès per inundació del substrat d'ambdues espècies estudiades, 112 per al genotip mandarí Cleopatra i 211 per a citrange Carrizo, només es trobaren 14 senyals en comú (Figura 6.7), amb un grau de solapament del 12.5 i 6.6 %, respectivament.

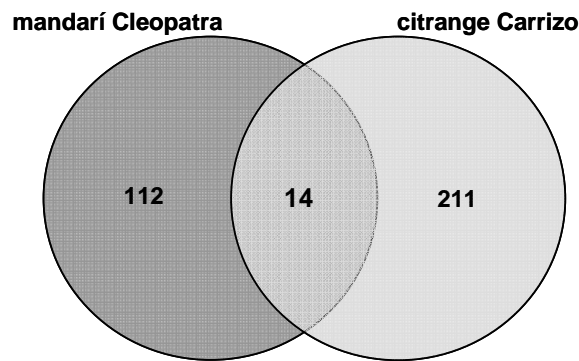


Figura 6.7 Diagrames de Venn que representen el solapament dels senyals cromatogràfics significativament alterats entre plantes de mandarí Cleopatra i citrange Carrizo sotmeses a estrès per inundació

6.1.2 Experiments de sequera

6.1.2.1 Concentració de prolina

En un segon grup d'experiments, plàntules de mandarí Cleopatra i citrange Carrizo, foren sotmeses a estrès per sequera durant un període total de 14 dies. Es realitzaren mesures de contingut de prolina en els arrels de les plantes control i les estressades, mostrant-se els resultats en la Figura 6.8.

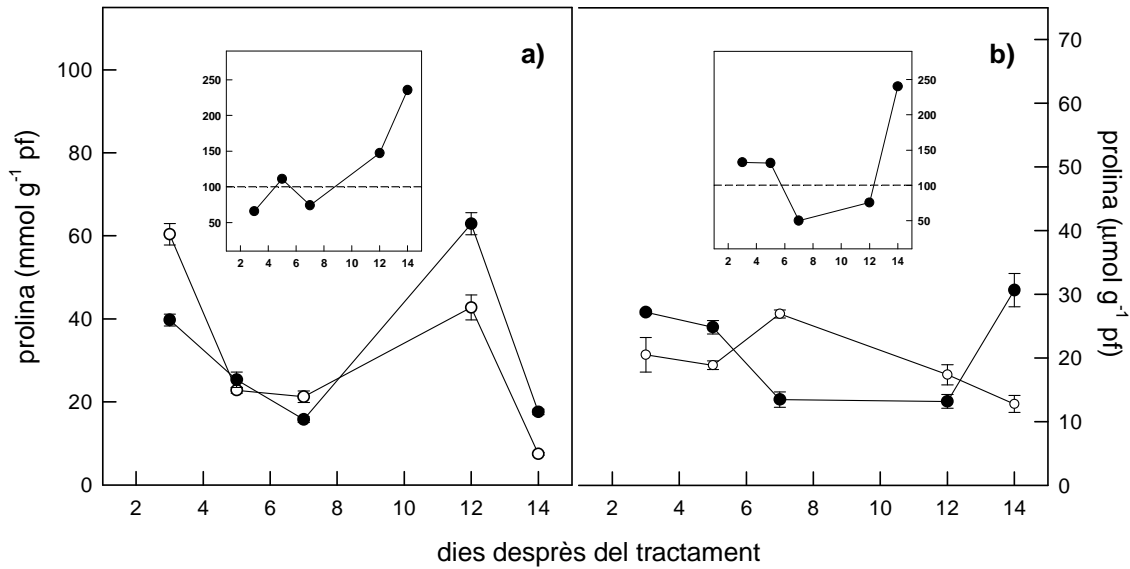


Figura 6.8 Concentració de prolina en arrels de (a) mandarí Cleopatra i (b) citrange Carrizo sotmeses a estrès hídric. En cada gràfic, (○) representa les plantes control i (●) les estressades. Les gràfiques inserides mostren la variació percentual del metabòlit en les plantes estressades

Tal i com es pot observar a la figura anterior, la concentració de prolina va mostrar molts canvis en les plantes sotmeses a estrès hídric al compararla amb les plantes control, tant en el genotip Cleopatra (Figura 6.8a) com en Carrizo (Figura 6.8b), amb una tendència general que es pot apreciar en les corresponents gràfiques inserides, on es veu clarament un augment relatiu de la concentració de prolina amb l'aparició de la sequera. S'observà un increment en la concentració de prolina en les arrels de les plantes estressades de mandarí Cleopatra al cap de 12 i 14 dies de sequera, amb valors de 62.9 i 17.6 $\mu\text{mol g}^{-1}$ pf, respectivament, mentre que les arrels de les plantes control presentaven valors de 42.7 i 7.5 $\mu\text{mol g}^{-1}$ pf en les mateixes dates. En les plantes de Carrizo sotmeses a estrès per sequera, aquest increment en la concentració radicular de prolina es va produir als 14 dies després del inici del tractament, assolint valors de 30.6 $\mu\text{mol g}^{-1}$ pf, 2.4 vegades superiors als corresponents controls.

6.1.2.2 Concentració de fitohormones

Es va dur a terme la determinació d'hormones vegetals i d'alguns precursors de lignines, igual que en els experiments d'inundació, als extractes d'arrels de Cleopatra i Carrizo sotmeses a estrès per sequera, tal i com es descriu a l'apartat 3.5 dels materials i mètodes. Els resultats d'aquestes determinacions es mostren a les Figures 6.9, 6.10 i 6.11, tant de les plantes controls com de les inundades, expressats en ng g^{-1} pf.

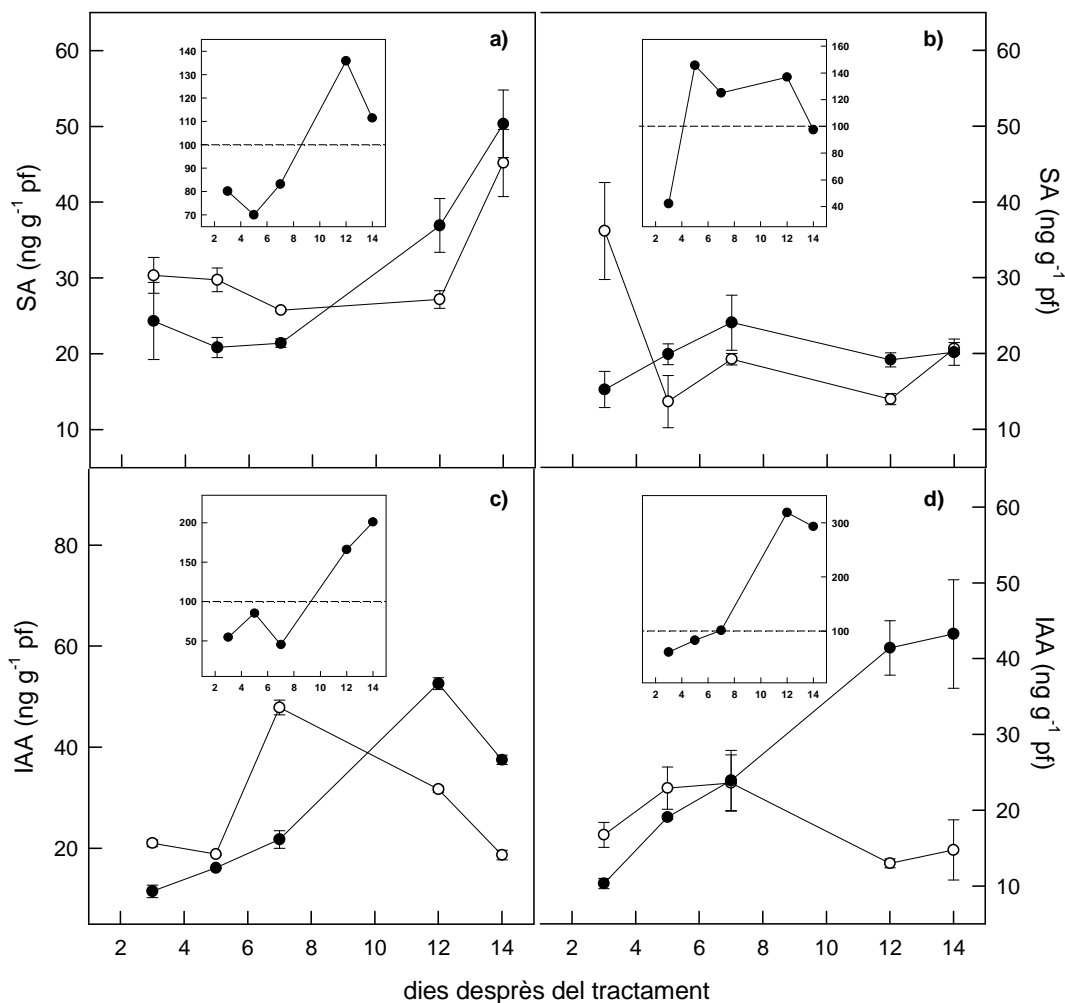


Figura 6.9 Concentració de SA i IAA en arrels de (a,c) mandarí Cleopatra i (b,d) citrange Carrizo sotmeses a estrès hídric. En cada gràfic, (○) representa a les plantes control i (●) a les estressades. Les gràfiques inserides mostren la variació percentual dels metabòlits en les plantes estressades

Al llarg de la major part de l'experiment, tant les arrels de les plantes tractades com de les control dels dos genotips estudiats, mostraren nivells similars de SA. En les arrels de Cleopatra (Figura 6.9a), els nivells d'aquesta hormona es mantingueren constants durant els primers 7 dies d'experiment tant en les plantes tractades com en les control, encara que en aquest període de temps els nivells de SA foren lleugerament superiors en les plantes control que en les estressades. En els dos últims punts de l'experiment la situació va canviar, i ambdós grups veren incrementada la concentració endògena de SA, assolint valors en les plantes sotmeses a estrès hídric de 36.9 i 50.3 ng g⁻¹ pf en els dies 12 i 14, respectivament, mentre que les concentracions control foren de 27.2 i 45.2 ng g⁻¹ pf en les mateixos punts. En el cas de Carrizo (Figura 6.9b), la concentració de SA va ser superior en les arrels de les plantes tractades que en les control, excepte el primer i últim dia, on foren major (36.2 i 15.2 ng g⁻¹ pf) i igual (20.6 i 20.2 ng g⁻¹ pf), respectivament. Per altra banda, la sequera continuada va induir un augment significatiu d'IAA al cap de 12 dies de tractament, tant en les plantes de Cleopatra (Figura 6.9c) com en les de Carrizo (Figura 6.9d), assolint valors de 52.6 i 37.5 ng g⁻¹ pf en els dies 12 i 14 d'inundació, respectivament, front als 31.6 i 18.6 ng g⁻¹ pf en condicions control en Cleopatra; i 41.4 i 43.2 ng g⁻¹ pf en les arrels inundades de Carrizo en els dies 12 i 14, respectivament, front als 13.0 i 14.7 ng g⁻¹ pf en els mateixos punts per a les plantes control.

Els nivells endògens de JA en les arrels de les plantes de mandarí Cleopatra sotmeses a estrès per sequera (Figura 6.10a), mostraren alguns canvis respecte als nivells de les plantes control durant els 14 dies d'experiment, encara que no es va observar cap tendència clara, la concentració de JA en les plantes tractades es va veure incrementada de 28.7 a 46.2 ng g⁻¹ pf des del primer fins l'últim dia d'experiment. Les plantes estressades de Carrizo (Figura 6.10b) presentaren un increment important en la concentració radicular de JA després de 3 i 5 dies de sequera, assolint concentracions de 77.1 i 117.2 ng g⁻¹ pf, respectivament. Després, els valors es reduïren igualant-se amb els control. En el cas de l'ABA, la concentració radicular es va veure incrementada en resposta a l'estrès hídric en ambdós genotips. En el cas de les plantes estressades de Cleopatra (Figura 6.10c), la concentració en aquesta hormona

es va veure incrementada assolint valors de $90.8 \text{ ng g}^{-1} \text{ pf}$ després de 14 dies d'experiment, 4.8 vegades superiors a les plantes control, mentre que en les plantes de Carrizo sotmeses a estrès hídric (Figura 6.10d) la concentració va ser lleugerament superior, amb valors d'ABA de $148.8 \text{ ng g}^{-1} \text{ pf}$ en aquest últim dia, 7.3 vegades superior a la corresponent control.

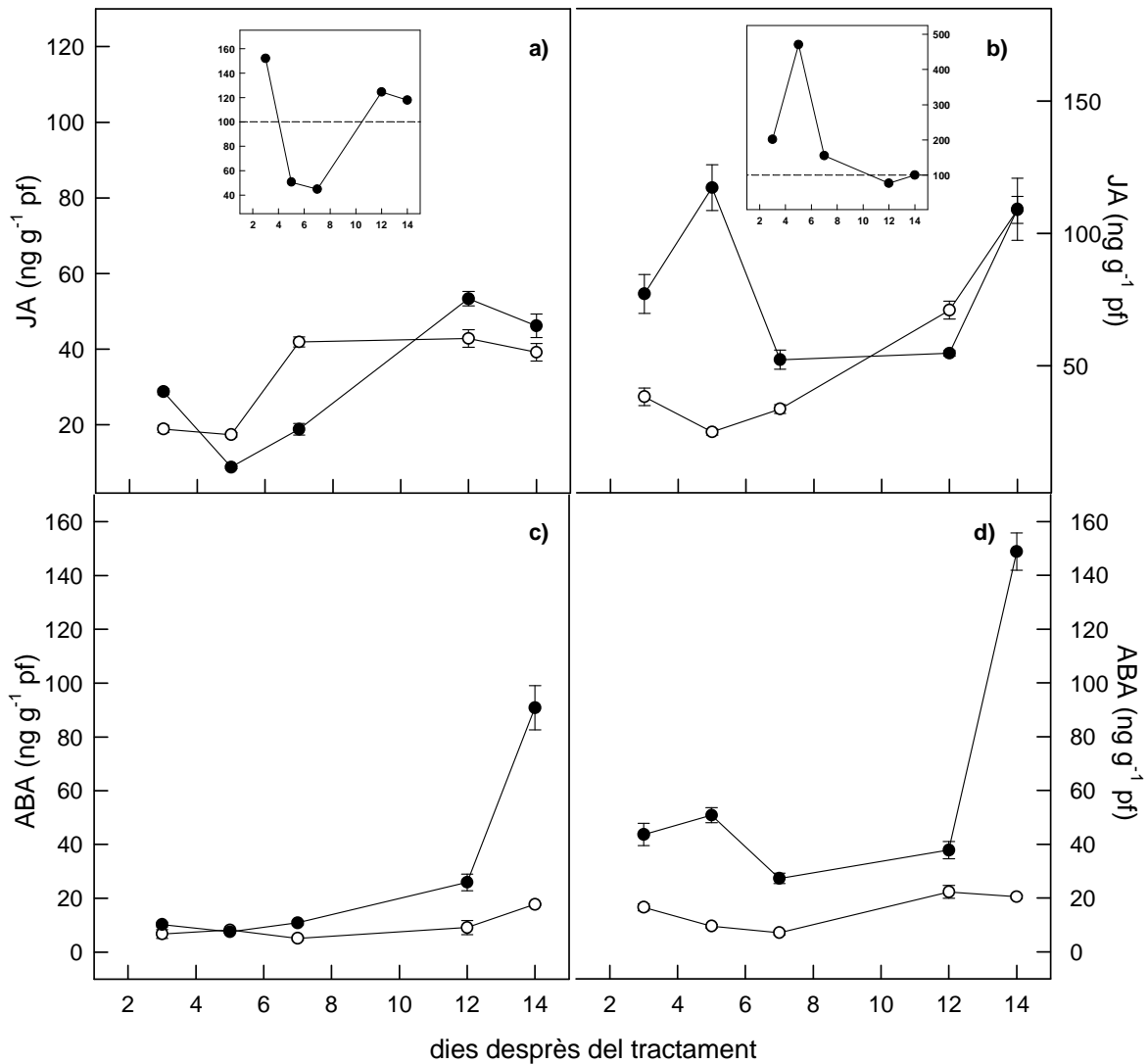


Figura 6.10 Concentració de JA i ABA en arrels de (a,c) mandarí Cleopatra i (b,d) citrango Carrizo sotmeses a estrès per sequera. En cada gràfic, (○) representa a les plantes control i (●) a les estressades. Les gràfiques inserides mostren la variació percentual del metabòlit en les plantes estressades

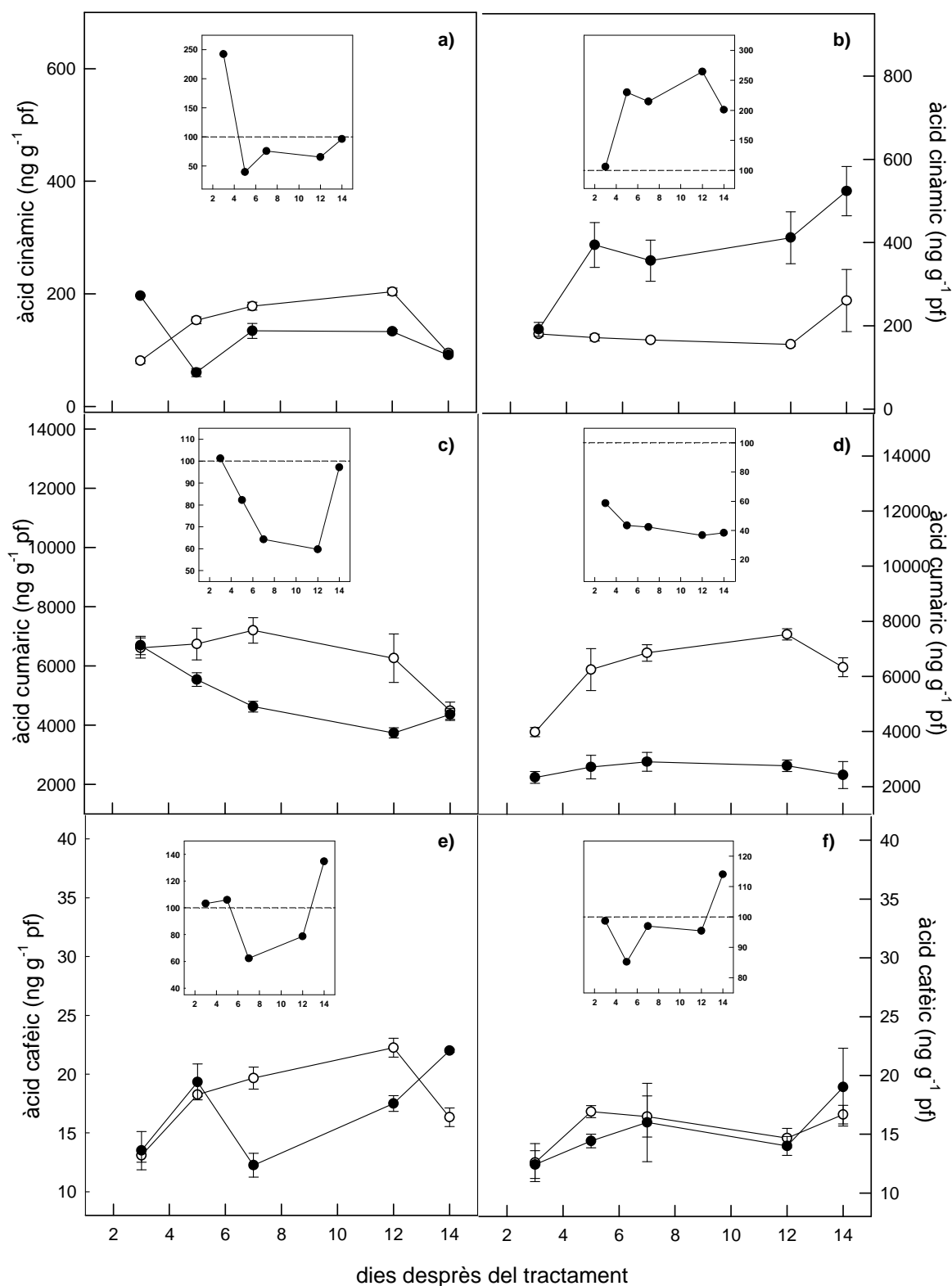


Figura 6.11 Concentració d'àcid cinàmic, àcid cumàric i àcid cafèic en arrels de (a,c,e) mandarín Cleopatra i (b,d,f) citrange Carrizo sotmeses a estrès per sequera. En cada gràfic, (○) representa a les plantes control i (●) a les estressades. Les gràfiques inserides mostren la variació percentual dels metabòlits en les plantes estressades

La concentració d'àcid cinàmic radicular en les plantes de mandarí Cleopatra (Figura 6.11a) sotmeses a estrès per sequera no va mostrar cap tendència clara, encara que en el primer dia de tractament aquest metabòlit mostrà nivells que assoliren els $196.7 \text{ ng g}^{-1} \text{ pf}$ en les plantes estressades i $81.2 \text{ ng g}^{-1} \text{ pf}$ en les control. En els punts següents, els dies 5, 7 i 12, la concentració d'àcid cinàmic en les plantes estressades va ser 2.5, 1.3 i 1.5 vegades inferior que en les control, respectivament. En l'últim dia d'experiment, la concentració del metabòlit es va igualar entre les mostres control i les inundades, amb valors de 95.0 i $91.3 \text{ ng g}^{-1} \text{ pf}$, respectivament. En el cas de citrange Carrizo (Figura 6.11b), la concentració d'àcid cinàmic es va veure incrementada a causa de l'estrès a partir del cinquè dia d'experiment, amb valors de 394.4 , 356.6 , 411.6 i $523.7 \text{ ng g}^{-1} \text{ pf}$ en els dies 5, 7, 12 i 14, respectivament, dues vegades superiors que en els corresponents control. L'àcid cumàric es va comportar de manera similar en els dos genotips, veient reduïda la seua concentració a causa de l'estrès. En les arrels de les plantes de Cleopatra sotmeses a estrès per sequera (Figura 6.11c), els nivells d'aquest compost foren inferiors als nivells control en tots els punts excepte en el primer i últim dia, en els quals els nivells es solapaven. En els dies 5, 7 i 12, la concentració d'àcid cumàric en les arrels de les plantes estressades fou de 5539.8 , 4626.9 i 3737.4 , valors 1.2, 1.5 i 1.6 vegades inferiors que en les corresponents controls. En el cas de citrange Carrizo (Figura 6.11d), el patró de regulació de l'àcid cumàric fou més constant al llarg de tot l'experiment, ja que en tots els dies d'estudi la concentració d'aquest metabòlit es va veure reprimida en resposta a l'estrès per sequera, amb valors que oscil·laven entre 2336.6 i $2903.4 \text{ ng g}^{-1} \text{ pf}$, mentre que la concentració d'àcid cumàric en les arrels de les plantes control va assolir els $7524.6 \text{ ng g}^{-1} \text{ pf}$. Per últim, es va realitzar la determinació d'àcid cafèic en les arrels de Cleopatra (Figura 6.11e) i Carrizo (Figura 6.11f) sotmeses a estrès per sequera, i no s'observaren moltes diferències entre genotips ni tractaments. La concentració de l'àcid va augmentar lleugerament cap al final del període experimental en les arrels estressades de Cleopatra, assolint valors de $22.0 \text{ ng g}^{-1} \text{ pf}$, 1.4 vegades superiors al control. En la resta de punts no hi van haver canvis importants. En el cas de Carrizo, encara s'hi notaren menys canvis que en Cleopatra, i novament, la concentració d'àcid cafèic es va veure incrementada al final de l'experiment en les arrels de les plantes estressades,

amb valors lleugerament superiors als control que assoliren tan sols els 19.0 i 16.7 ng g⁻¹ pf, respectivament.

6.1.2.3 Perfilats metabolòmics

Finalment, es van dur a terme els perfilats metabolòmics de les mostres control i tractades d'ambdós genotips de cítrics, Cleopatra i Carrizo, pertanyents a l'experiment de sequera realitzat (Annex 7). Igual que en els casos anteriors, s'extragueren els senyals cromatogràfics provinents del instrument d'anàlisi després de centroiditzar les dades, i es realitzaren anàlisis estadístiques utilitzant l'algoritme maSigPro (Conesa *et al.*, 2006). L'anàlisi estadística de les dades extretes per l'*xcms* va trobar 255 senyals significativament alterats a causa de l'estrès hídric, dels 3466 detectats pel software en Cleopatra. En Carrizo foren 264 els senyals amb valors diferencials d'un total de 2802, valors lleugerament superiors als de Cleopatra (Figures 6.12 i 6.13).

A més dels senyals extrets pel software maSigPro, és necessari també observar les tendències de les plantes en els clústers, per saber quins van a tindre un significat biològic i quins no. En el cas de Cleopatra, els senyals significativament alterats s'agruparen en tres clústers, dels quals només dos es poden considerar com significatius (Figura 6.12b). El clúster 3, amb 116 senyals quedà descartat quedant-nos amb els clústers 1 i 2, que contenien 47 i 92 senyals, respectivament. El primer clúster mostrà un comportament en el qual els nivells dels possibles metabòlits es veuen reprimits a causa de l'estrès, mentre que en el segon es veuen induïts. En total, foren doncs 139 els senyals amb significat biològic, dels 3466 detectats inicialment.

Per al cas de citrange Carrizo, 3 foren els clústers obtinguts, però, al igual que en el cas anterior, només dos d'ells es consideraren amb significat biològic (Figura 6.13b). El clúster 3, amb 44 senyals, quedà descartat de l'estudi, quedant, per tant, un total de 220 senyals. Aquestos senyals, pertanyents als clústers 1 i 2, no mostraren tendències tan clares com en el cas de Cleopatra, encara que es poden agrupar com a senyals reprimits i induïts. El primer clúster, amb 125 senyals, mostrà un perfil en el qual els valors de les plantes

estressades disminuïen amb la presència de l'estrès; i en el clúster 2, amb un total de 95 senyals, els possibles metabòlits augmentaven la seua concentració com a resposta a l'estrès.

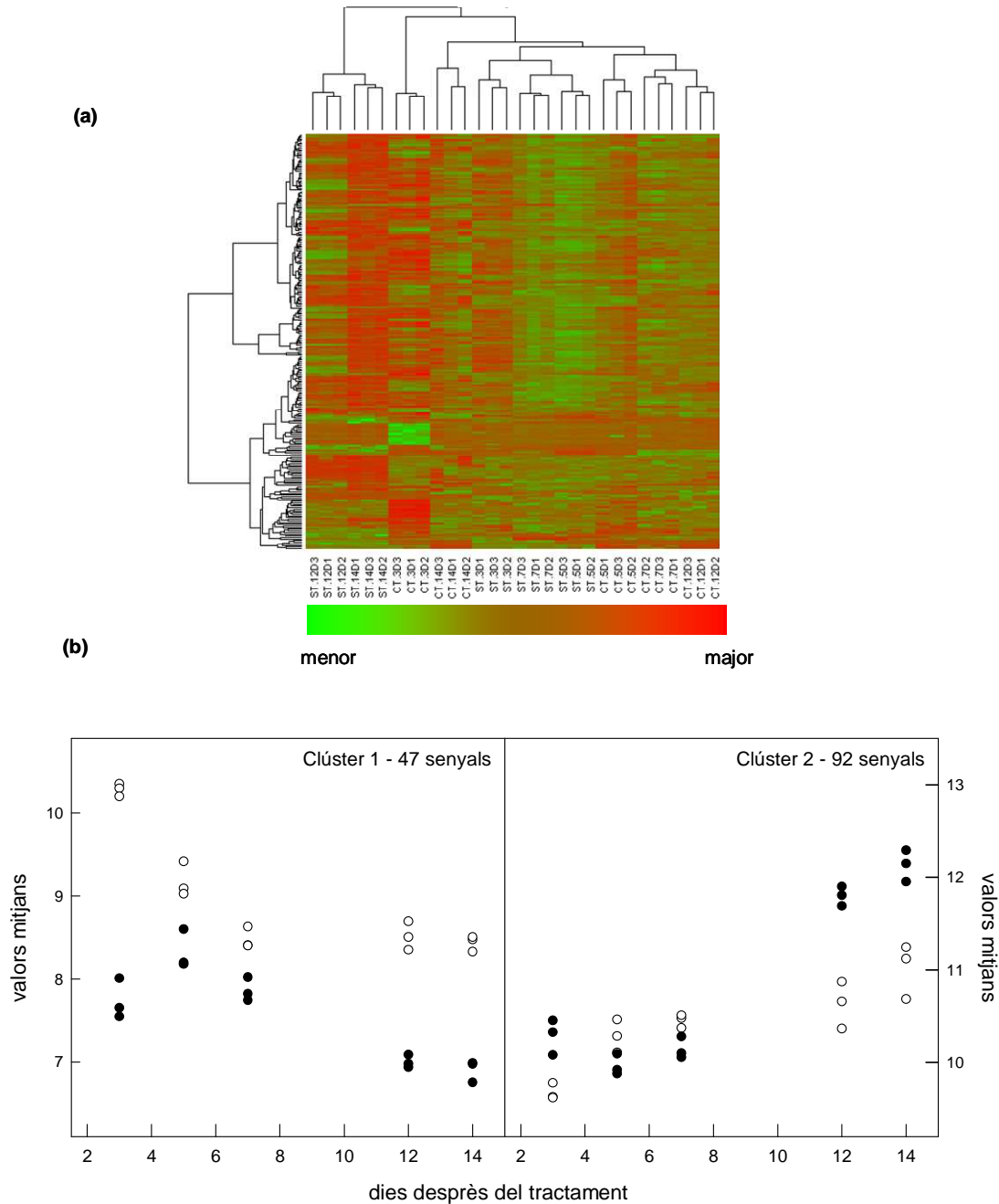


Figura 6.12 (a) HCA dels senyals significativament alterats en arrels de plantes de mandarí Cleopatra sotmeses a estrès per sequera, i (b) perfils dels clústers obtinguts. En cada gràfic, (○) representa a les plantes control i (●) a les estressades

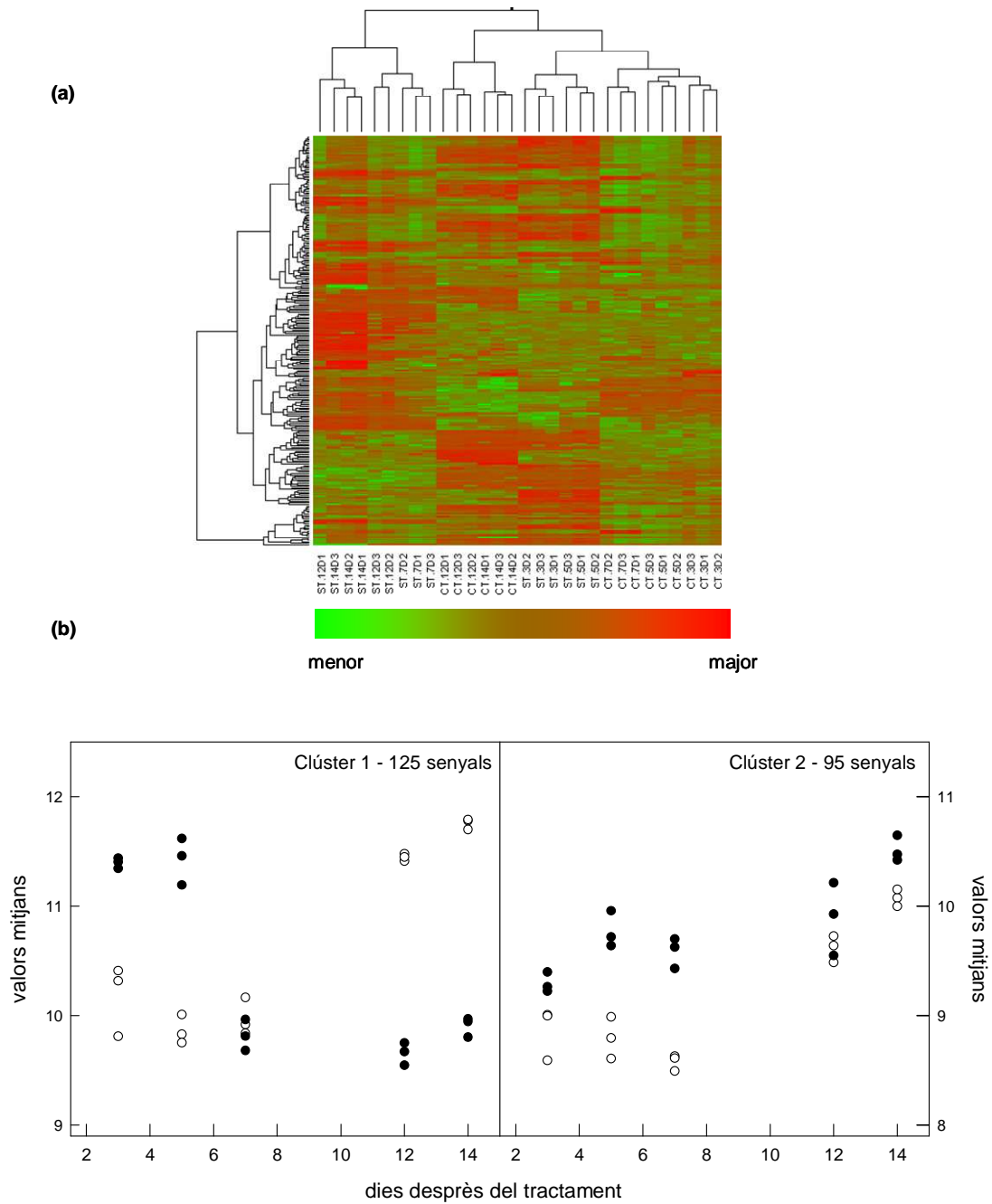


Figura 6.13 (a) HCA dels senyals significativament alterats en arrels de plantes de citrango Carrizo sotmeses a estrès per sequera, i (b) perfils dels clústers obtinguts. En cada gràfic, (○) representa a les plantes control i (●) a les estressades

Al comparar els senyals significativament alterats a causa de l'estrès per sequera comuns entre ambdós genotips, es trobaren 22 senyals compartits entre Cleopatra i Carrizo (Figura 6.14).

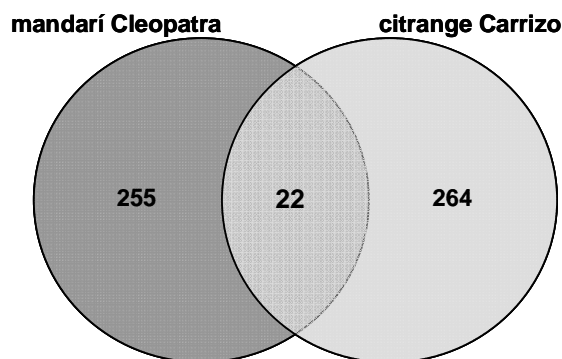


Figura 6.14 Diagrames de Venn que representen el solapament dels senyals cromatogràfics significativament alterats entre plantes de mandarí Cleopatra i citrange Carrizo sotmeses a estrès per sequera

Quan es compararen els perfils metabòlics de les plantes no estressades de Cleopatra i Carrizo es va trobar un alt grau de solapament (40%), amb un total de 950 senyals comuns, dels quals 458 estaven diferencialment acumulats entre ambdues espècies (Figura 6.15).

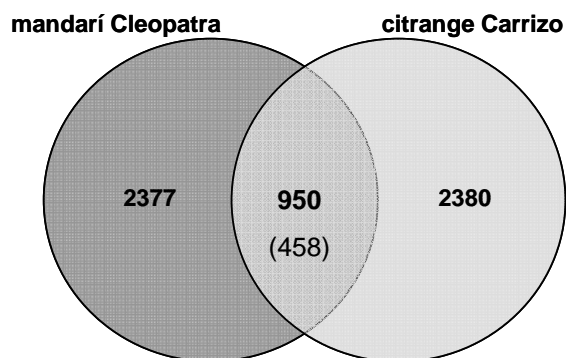


Figura 6.15 Diagrames de Venn que representen el solapament dels senyals cromatogràfics entre plantes de Cleopatra i Carrizo en condicions control

6.2 Discussió

En el present capítol de tesi s'ha avaluat el comportament de dos genotips de cítrics front a dues situacions ambientals adverses: la sequera i l'estrès induït per la inundació del substrat. Els genotips seleccionats foren: mandarí Cleopatra i citrange Carrizo, àmpliament emprats com a portaempelts en la citricultura de diversos països. Per tal de dur a terme aquesta tasca, es va realitzar una caracterització fisiològica i bioquímica de les respostes d'aquests genotips quan estaven sotmesos a condicions ambientals adverses, amb especial atenció a les variacions en els continguts endògens d'hormones vegetals, així com l'acumulació de prolina com a compost osmoregulador, i distints metabòlits secundaris: àcids cafèic, cumàric i cinàmic. A més a més, s'analitzaren les variacions existents en els perfilats metabolòmics de forma no dirigida per tal d'aprofundir en la regulació del metabolisme secundari en cítrics i la seua implicació en els mecanismes de tolerància front a l'estrès abiòtic.

La sequera és una de les principals causes de reducció dels cultius en la majoria de les regions agronòmiques del món (Bajaj *et al.*, 1999). Els cítrics són arbres perennes amb períodes de productivitat llarga, que per tant, estan esposats a canvis tant en el sòl com en l'atmosfera, que limiten la seua productivitat. Per altra banda, l'estrès per inundació del substrat, provocat per fortes pluges estacionals, pot afectar negativament a la fisiologia de planta i, per tant, a la productivitat dels cultius. Aquest fenomen indueix disminucions progressives en la concentració d'oxigen del sòl i el potencial redox de la planta (Ruiz-Sanchez *et al.*, 1996; Garcia-Sanchez *et al.*, 2007). Com en altres tipus de cultius, els cítrics responen a l'estrès per inundació reduint el potencial hídric, la conductància estomàtica, l'intercanvi gasós i el creixement de la planta (Vu i Yelenosky, 1991; Arbona *et al.*, 2008; Arbona *et al.*, 2008).

Els dos genotips seleccionats per a aquest estudi són, de forma anàloga a l'anterior capítol, tolerants i/o sensibles alternativament a les condicions d'estrès triades. En investigacions anteriors, s'ha descrit que el mandarí Cleopatra és més tolerant a l'estrès hídric que citrange Carrizo, i que aquest comportament podria estar relacionat amb determinades característiques

fenotípiques tals com la menor biomassa de la canòpia i la reduïda extensió i activitat del sistema radicular (Romero *et al.*, 2006). Aquestes mateixes característiques també atorguen a aquest genotip una major tolerància a l'estrès salí disminuint l'absorció d'ions clorur (Moya *et al.*, 1999). En el cas de citrange Carrizo, ocorre el contrari: una major biomassa foliar unida a una activitat radicular superior fan que sigui menys tolerant al dèficit hídric. Les característiques que són avantatjoses front a l'estrès hídric semblen no ser-ho en el cas d'embassament del substrat, ja que front a aquesta situació, citrange Carrizo va provar ser més tolerant que mandarí Cleopatra (Arbona i Gómez-Cadenas, 2008). En aquest sentit, la importància del sistema radicular és clau, determinant la tolerància de cadascun dels genotips descrits, per la qual cosa, aquest capítol s'ha centrat en l'estudi d'aquest òrgan.

El dèficit hídric causa una àmplia gama de canvis bioquímics i fisiològics, que comença amb la disminució del potencial osmòtic a nivell cel·lular (Bajaj *et al.*, 1999). Moltes plantes responen a l'estrès per dèficit hídric mitjançant una acumulació de compostos orgànics no tòxics de baix pes molecular, coneguts com a soluts compatibles, com és l'aminoàcid prolina (Correa-Molinari *et al.*, 2004), que produeixen una disminució del potencial hídric. En el cas de la inundació del substrat, també hi ha estudis que recolzen que per tal de fer front a l'estrès, les plantes acumulen prolina reduint així l'acidificació cel·lular i la concentració d'ions radicals d'oxigen (Khedr *et al.*, 2003). Tant les plantes de citrange Carrizo com les de mandarí Cleopatra veren incrementada la concentració radicular de prolina en resposta a l'estrès. Sota condicions d'inundació, les plantes de citrange Carrizo acumulen més prolina que les de Cleopatra, mentre que en condicions de sequera els perfils foren molt similars entre ambdós genotips. Els nivells d'aquest metabòlit augmenten en el genotip tolerant, Carrizo, quan es sotmeten les plantes a inundació, però són més primerenques en el cas de Cleopatra. En el cas d'estrès hídric, ambdues espècies acumulen quantitats similars de l'osmòlit compatible, però va ser Carrizo, més sensible a aquest estrès, el més primerenc. Es podria, per tant, relacionar la tolerància amb la síntesi més tardana de prolina, més que amb els nivells assolits. En aquest sentit, les dades presentades en aquest capítol són contradictòries amb els resultats publicats per (Arbona *et al.*, 2004; Arbona *et*

al., 2008), on una relació $[\text{prolina}_{\text{estrès}}]/[\text{prolina}_{\text{control}}]$ major en condicions d'estrès vindria associada a la sensibilitat mentre que relacions inferiors es relacionarien amb la tolerància; concordant també amb l'estudi realitzat en el capítol anterior en plantes model, on es veia com, *Thellungiella*, l'espècie més tolerant, mantenia la relació més baixa. Les diferències observades podrien estar relacionades amb el teixit estudiat, ja que, mentre que en estudis anteriors s'havia pres material procedent de la part aèria, en aquest capítol s'han considerat només les arrels. Les dades presentades, doncs, indiquen una relació directa entre la capacitat de sintetitzar i acumular prolina a l'arrel i la tolerància relativa a l'estrès, la qual cosa previndria, almenys parcialment, la necessitat d'una major acumulació en els òrgans foliars, on probablement s'estigués registrant un estrès secundari provocat pel mal funcionament del sistema radicular.

Dins del context d'aquest treball, i (Dat *et al.*, 2004) pel que respecta a la regulació hormonal dependent del SA, l'estrès per inundació va induir efectes contraris en *Cleopatra* i *Carrizo*, mentre que quan foren sotmesos a sequera continuada ambdós genotips presentaren perfils similars, encara que l'acumulació de SA en *Carrizo* fou més primerenca que en *Cleopatra*. El comportament d'aquesta fitohormona es va relacionar amb la inducció de dany en els teixits vegetals, per la qual cosa, les concentracions en les arrels inundades de *Cleopatra* foren superiors als controls durant tot el període d'estudi. Per altra banda, el perfil d'acumulació de l'auxina IAA va ser similar en tots dos genotips en les dues condicions adverses assajades. No obstant, aquesta inducció d'IAA, que fou progressiva respecte del temps d'exposició a l'estrès, fou més intensa en els genotips relativament més sensibles: *Cleopatra* en estrès per inundació i *Carrizo* en sequera, associada possiblement amb una activació del creixement meristemàtic a l'arrel amb l'objectiu de facilitar l'accés a àrees del substrat que presenten millors condicions per a la supervivència. (Arbona i Gómez-Cadenas, 2008) descrigueren el mateix comportament en tres patrons de cítrics sotmesos a embassament del substrat. Com a hormones amb una clara implicació en la regulació de les respostes fisiològiques a l'estrès, s'analitzaren les variacions endògenes en la concentració d'ABA i JA induïdes per estrès abiòtic. Tal i com descrigueren també (Arbona i Gómez-

Cadenas, 2008), les concentracions d'ambdues hormones disminuïren en resposta a l'embassament del substrat de forma similar en tots dos genotips considerats, l'estrès per sequera imposat va induir la situació contrària, incrementant la concentració radicular d'aquestes hormones vegetals. En trets generals, les dades són compatibles amb una interacció entre JA i ABA en la regulació de les respostes fisiològiques a l'estrès. Seguint aquesta hipòtesi, l'increment transitori en la concentració de JA observat en arrels de cítrics sotmeses a estrès hídric sempre precedeix a l'inici de l'increment de la concentració d'ABA suggerint una funció del JA com a 'interruptor' alternant entre l'estat control i d'estrès, tal i com s'ha proposat abans (Arbona i Gómez-Cadenas, 2008). En aquest sentit, les dades presentades es correlacionen de forma clara amb la relativa tolerància dels genotips estudiats a l'estrès hídric: les plantes de citrange Carrizo, el genotip més sensible, presentaren l'increment transitori en la concentració de JA de forma més primerenca i intensa que les de Cleopatra quan es sotmetien a condicions adverses i, de la mateixa manera, l'increment subseqüent en la concentració d'ABA fou més acusat en les arrels de Carrizo. Dins d'aquest raonament, l'absència o reducció en els nivells endògens de JA, acompanyarien la reducció dels nivells d'ABA, com ocorre en situacions d'estrès per embassament del substrat. S'ha discutit la possibilitat de que el descens acusat en la concentració radicular d'ambdues hormones estigués relacionada amb la manca d'oxigen induïda per l'embassament del substrat; no obstant, altres metabòlits com l'IAA, que requereix també oxigen per a la seua biosíntesi, s'hauria de veure afectat, i no és el cas. Açò estaria relacionat, per tant, amb una resposta regulada per les condicions d'estrès. Es tracta d'un dels pocs casos on la reducció dels nivells hormonals basals constituiria per si mateix una senyal en contraposició a l'increment que s'ha observat en la part aèria (Arbona i Gómez-Cadenas, 2008). En aquest sentit, resultats d'expressió gènica encara no publicats suggereixen que si bé el descens dels nivells endògens de JA vindrien associats a una repressió de l'activitat LOX compatible amb la manca d'O₂, la reducció de la concentració d'ABA podria estar associada amb una inducció de l'activitat ABA 8'-hidroxilasa (CYP707A1), primer pas en el catabolisme de l'ABA lliure. Al contrari que en el cas anterior d'estrès per sequera, en cap de

les dues hormones es va poder relacionar de forma clara el patró de variació amb la relativa tolerància i/o sensibilitat dels distints genotips.

En els estudis descrits en el present capítol, s'analitzaren també les variacions de concentració en distints precursors de lignines com l'àcid cinàmic, l'àcid cumàric i l'àcid cafèic. Un dels primers derivats de l'activitat fenilalanina amoni liasa és l'àcid cinàmic, del qual deriven la resta de precursors. Aquesta activitat enzimàtica i el flux d'àcid cinàmic són altament sensibles a les variacions ambientals i a l'estrès, encara que en condicions basals les dades indiquen que el flux metabòlic del cinàmic a cumàric, en arrels de plantes de cítrics, regulat per l'enzim trans-cinamat 4-monooxigenasa és favorable a la formació d'àcid cumàric. En resposta a la inundació del substrat, la concentració d'àcid cinàmic va augmentar al voltant de 4 vegades per sobre dels valors control en les arrels d'ambdós genotips estudiats. Per altra banda, quan les plantes de Carrizo i Cleopatra es sotmeteren a estrès hídric, en les primeres s'observà un increment en aquest metabòlit mentre que en les de Cleopatra s'observà un descens que abastà bona part del període experimental. De forma anàloga, els nivells d'àcid cumàric incrementaren en ambdós genotips cap a la fi del període experimental en condicions d'estrès per inundació, mentre que en condicions de sequera es va produir una reducció dràstica, independentment de la relativa sensibilitat o tolerància. En el cas de l'àcid cafèic, independentment de la situació d'estrès, les variacions en els nivells endògens d'ambdós genotips foren similars: la concentració d'aquest metabòlit en les plantes estressades de Cleopatra va presentar descensos transitoris respecte dels valors control, mentre que en les plantes de Carrizo s'observaren variacions aïllades que no presentaren cap patró clar. Les dades presentades apunten a una diferent regulació del metabolisme d'àcids fenòlics en condicions d'estrès possiblement dirigida a modificar l'estat antioxidant així com la composició de paret cel·lular. En aquest sentit, aquests precursors de lignines s'han identificat com a lligands de diferents molècules tals com sucres, poliamines, etc...que podrien actuar com a modificadors de la seua activitat biològica (Ralph, 2010). En un treball de revisió recent publicat per (Hernández i Van Breusegem, 2010), es mostrà com l'expressió de gens relacionats amb el lligament d'àcid cinàmic es veia induïda per l'estrès abiòtic, especialment per sequera. En la biosíntesi de lignines, l'acció de 4CLs (4-cumarat Co-A ligasa) catalitza en un primer pas

l'esterificació d'àcid cumàric amb Co-A. El producte d'aquesta reacció es redueix subseqüentment fins el corresponents monolignols precursors de lignines. No obstant, aquests enzims poden emprar com a substrat no sols àcid cumàric sinó també cinàmic, cafèic o ferúlic (Lucheta *et al.*, 2007). En aquest sentit, el perfil d'àcids fenòlics que mostraren les arrels de mandarí Cleopatra subjectes a estrès per sequera és compatible amb una reducció del requeriment de precursors per a la biosíntesi de lignines, mentre que en les arrels de Carrizo, el requeriment es redueix únicament a unitats de monolignols derivades de l'àcid cinàmic. En el cas d'estrès per inundació, els requeriments són similars en ambdós genotips i, a més a més, els resultats presentats apunten a l'increment en àcid cumàric com a una resposta tardana associada amb una major pressió de l'estrès. Pel contrari, l'àcid cafèic podria no ser un element clau en la resposta de cítrics a estrès per inundació del substrat o sequera.

Per tal d'aprofundir més en el coneixement de les variacions en el metabolisme secundari de cítrics en condicions d'estrès abiòtic, es dugueren a terme anàlisis metabolòmics no dirigits emprant la plataforma optimitzada durant el desenvolupament d'aquesta tesi doctoral. Els resultats mostraren un total de 112 senyals alterades en Cleopatra en resposta a estrès per inundació front a les 211 en Carrizo que suggereixen una resposta més intensa en aquest genotip. D'aquestes, sols 32 senyals es veieren incrementades en Cleopatra respecte de valors control envers les 65 en Carrizo. En la direcció contrària, sols 26 senyals es reduïren en Carrizo i un total de 47 en Cleopatra. De tots els senyals alterats, sols 14 foren comuns a ambdós genotips, indicant una clara especificitat pel que respecta a la resposta del metabolisme secundari front a estrès per inundació del substrat. Dels metabòlits comuns incrementats en ambdós patrons, s'ha pogut identificar un metabòlit amb un patró de fragmentació compatible amb la presència d'una unitat d'àcid ferúlic ($[M-195.06]^+$). En ambdós patrons, aquesta constituiria una resposta positiva primerenca. En Carrizo, on el nombre de metabòlits induïts fou superior, dels ions detectats s'ha identificat un que podria correspondre amb el triterpenoide limonina ($[M+H]^+$ 471.18, $C_{26}H_{31}O_8^+$, segons (Manners *et al.*, 2003), amb un fragment del metabòlit narirutina ($[M-Hexosa]^+$ 419.13, $C_{21}H_{23}O_9^+$), i amb un

fragment d'un altre triterpenoide glicòsid de l'àcid nomilínic ($[M\text{-Hexosa-H}_2\text{O-CO-CH}_4\text{O}]^+$ 455.21, $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{O}_7^+$). Aquests senyals no foren alterats en Cleopatra, el qual podria indicar una resposta efectiva del metabolisme de flavonoides i triterpenoides en Carrizo en resposta a la inundació del substrat. En resposta a estrès hídric, el nombre de metabòlits significativament alterats respecte del control en ambdós genotips fou relativament similar (255 i 264 en Cleopatra i Carrizo, respectivament) amb un baix grau de solapament, sols 22 senyals comunes. De tots els senyals alterats, 92 i 95 es veieren incrementades i 47 i 125 reduïdes en Cleopatra i Carrizo, respectivament. Dels senyals incrementats (clúster 2 en ambdós casos) s'identificaren 13 possibles metabòlits en Carrizo i s'anotaren tres ions pseudomoleculares ($[M+H]^+$) mentre que per la seua part, en Cleopatra s'identificaren 19 candidats, anotant-s'hi dos ions pseudomoleculares. En aquest últim genotip, un dels ions recol·lectats es va associar putativament amb un fragment de la limonina glicosil ester ($[M\text{-Hexosa}]^+$, 471.20) que elueix a un temps de retenció de 26.4 min. Per altra banda, dins del grup de senyals reduïts respecte del control, es pogueren identificar 10 possibles metabòlits en Cleopatra i 21 en Carrizo. D'aquests últims s'anotaren tres ions pseudomoleculares dels quals dos correspongueren a la mateixa molècula. En general, l'anàlisi dels resultats procedents dels perfilats metabolòmics indica que mentre que la inundació del substrat va provocar una inducció massiva de metabòlits secundaris en arrels de Carrizo, el genotip tolerant, aquesta va ser més moderada en Cleopatra amb un major nombre de metabòlits reprimits pel tractament. En el cas de l'estrès hídric, però, el nombre de senyals induïdes per l'estrès fou gairebé idèntic en ambdós genotips considerats mentre que el nombre de senyals reprimides pel tractament fou el doble en les plantes de Carrizo que en les de Cleopatra, suggerint que la resposta metabòlica en aquest genotip s'encarà a mantenir el metabolisme basal mantenint un grau d'inducció moderat de nous metabòlits. També és possible que es degui a una caiguda generalitzada del metabolisme. En aquest sentit, l'objectiu d'aquesta part de la tesi no fou identificar nous metabòlits induïts per l'estrès sinó validar la plataforma metabolòmica per a l'avaluació de la resposta del metabolisme secundari front a l'estrès, per tant la identificació dels metabòlits s'ha fet en base al valor de massa exacta i a la bibliografia existent, sense anar més enllà.

A mode de resum, i integrant tots els resultats provinents de les determinacions hormonals i de metabòlits secundaris, per a les dades i argumentacions presentades en aquest capítol, la resposta metabòlica de les plantes dels dos genotips Carrizo i Cleopatra front a l'estrès induït per l'embassament del substrat té aparentment un caràcter que es podria definir 'actiu': destinat a pal·liar o combatre els efectes de l'estrès sobre la fisiologia. Front a l'estrès hídric, Cleopatra adopta una estratègia 'passiva' destinada a evadir la situació adversa mantenint el metabolisme a un nivell més baix, mentre que Carrizo manté la mateixa estratègia 'activa'. Aquest comportament del mandarí Cleopatra és comú també a altres tipus d'estrès, com la salinitat, on l'únic avantatge d'aquest genotip és la menor acumulació d'ions clorur i la reducció dràstica i preventiva dels paràmetres fotosintètics i d'intercanvi gasós (López-Climent *et al.*, 2008). Aquesta estratègia sembla ser útil sols front a l'estrès hídric, ja que quan les plantes de Cleopatra es sotmeteren a inundació del substrat s'observà una reducció dràstica i ràpida dels paràmetres d'intercanvi gasós (Arbona *et al.*, 2009) relacionada possiblement amb la disminució de la capacitat per a absorbir aigua del substrat. En aquest sentit, tal i com indiquen les dades presentades en aquesta memòria, la incapacitat de l'arrel per a activar distints sistemes metabòlics, tals com la síntesi i acumulació de prolina, al mateix nivell que Carrizo, podria estar relacionada amb la seua marcada sensibilitat a aquest estrès.

7. Conclusions

7. CONCLUSIONS

- I. S'ha demostrat que l'algoritme `matchedFilter` es el més adequat per al tipus de dades generat pel sistema LC/ESI-QqTOF-MS emprat en el desenvolupament d'aquesta tesi. L'aplicació d'aquest algoritme resulta en un major nombre de pics i, per tant, un millor substrat per a l'algoritme de correcció del temps de retenció així com per a l'anotació i agrupació d'ions duta a terme pel software CAMERA.
- II. La plataforma metabolòmica desenvolupada en aquest treball ha quedat validada tant per a distingir extractes procedents de distintes fonts de material vegetal emprant l'anàlisi de components principals (PCA) com per esbrinar quins senyals són els responsables de les diferències entre grups de mostres emprant l'anàlisi de variància implementat en el software DChip.
- III. La plataforma metabolòmica pot ser aplicada també a estudis dinàmics on existeixen dues variables a considerar: tractament i temps de tractament, emprant l'anàlisi de variància del software DChip si no es disposa de controls en cada punt temporal, o el software `maSigPro` en el cas contrari.
- IV. Depenent de la pressió de l'estrès, la capacitat d'acumular prolina de forma massiva en les arrels previndria d'una acumulació posterior més intensa en la part aèria en aquelles espècies tolerants. En les espècies sensibles, la menor capacitat de l'arrel per activar sistemes metabòlics, tals com la síntesi i acumulació de prolina, provocaria una activació més intensa del sistema de defensa front a l'estrès en la part aèria.
- V. Se suggereix una inter-relació entre el JA i el ABA a nivell de senyalització. El JA actuaria com a disparador que canviaria l'estat vegetal de 'control' a 'estrès' i que dispararia l'acumulació més progressiva d'ABA. Els genotips sensibles sotmesos a una situació

d'estrès presenten un increment transitori de JA més acusat que els genotips tolerants que, inclús, poden no presentar-lo. De forma anàloga, l'acumulació progressiva d'ABA seria també menys intensa. Un cas a banda el constitueix l'estrès per embassament del substrat, on s'observa una reducció dràstica dels nivells d'ambdós hormones. No obstant, aquesta observació és compatible amb la hipòtesi que suggereix una relació directa entre JA i ABA.

- VI.** Existeix una elevada especificitat pel que fa als canvis del metabolisme secundari induïts per l'estrès en totes quatre espècies vegetals. Aquesta especificitat no ve només determinada per l'espècie, sino també pel tipus d'estrès. Aquelles espècies on hi ha un major nombre de senyals alterats per l'estrès presenten també una activitat metabòlica basal més moderada que no preveu l'efecte de la pressió exercida per l'estrès. Dins d'aquestes respostes, es poden diferenciar aquelles dirigides a combatre l'estrès classificades com a 'conservatives', destinades a mantenir el metabolisme basal i 'actives', on es produeix predominantment una inducció del metabolisme secundari. El tipus de resposta és inherent a l'estrès imposat i a la relativa tolerància i/o sensibilitat de l'espècie considerada.

- VII.** Les respostes fisiològiques front a l'estrès en *Arabidopsis* estan induïdes post-estrès mitjançant l'acció de l'ABA i el JA. Pel que fa a *Thellungiella*, la seua configuració metabòlica basal millor preparada per a tolerar les condicions ambientals adverses evita en part la necessitat d'aquesta activació hormonal.

- VIII.** En arrels de plantes de cítrics sotmeses a situacions ambientals adverses, el SA sembla estar associat directament amb la inducció de dany i inversament amb la tolerància, atenent a la direccionalitat de la variació així com a la temporalitat.

- IX.** Es proposa a l'IAA com una peça clau en la senyalització de les respostes de les arrels de cítrics a l'estrès. Aquesta resposta es relaciona amb la necessitat d'activació del creixement meristemàtic radicular amb l'objectiu de colonitzar noves àrees del substrat amb millors condicions per a la supervivència.

- X.** El canvis en el metabolisme d'àcids fenòlics d'arrels de plantes s'associen no sols als diferents genotips sinó també a la situació d'estrès. Es suggereix que els canvis observats van dirigits a modificar l'estat antioxidant així com la composició de la paret cel·lular. A més a més, es descarta la implicació de l'àcid cafèic com a element clau de la resposta dels cítrics a l'estrès abiòtic.

8. Bibliografia

8. BIBLIOGRAFIA

- Acharya, B.R. i Assmann, S.M. (2009) Hormone interactions in stomatal function. *Plant Molecular Biology*. 69: 451-462
- Ackerly, D.D., Knight, C.A., Weiss, S.B., Barton, K. i Starmer, K.P. (2002) Leaf size, specific leaf area and microhabitat distribution of chaparral woody plants: Contrasting patterns in species level and community level analyses. *Oecologia*. 130: 449-457
- Adams-Phillips, L., Barry, C. i Giovannoni, J. (2004) Signal transduction systems regulating fruit ripening. *Trends in Plant Science*. 9: 331-338
- Adie, B.A.T., Pérez-Pérez, J., Pérez-Pérez, M.M., Godoy, M., Sánchez-Serrano, J., Schmelz, E.A. i Solano, R. (2007) ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in Arabidopsis. *Plant Cell*. 19: 1665-1681
- Agustí, M. (2003) "Citricultura". Mundi-Prensa Libros Madrid
- Ahmed, H.B., Mimouni, H., Manaa, A. i Zid, E. (2010) Salicylic acid enhances salinity tolerance in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Acta Botanica Gallica*. 157: 361-368
- Ahn, S. i Jin, C. (2004) Protective role of exogenous spermidine against paraquat toxicity in radish chloroplasts. *Journal of Plant Biology*. 47: 338-347
- Alcázar, R., Cuevas, J.C., Planas, J., Zarza, X., Bortolotti, C., Carrasco, P., Salinas, J., Tiburcio, A.F. i Altabella, T. (2010) Integration of polyamines in the cold acclimation response. *Plant Science*. in press
- Alemán, F., Nieves-Cordones, M., Martínez, V. i Rubio, F. (2009) Differential regulation of the HAK5 genes encoding the high-affinity K⁺ transporters of *Thellungiella halophila* and *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany*. 65: 263-269

- Al-Yassin, A. (2004) Influence of salinity on *Citrus*: a review paper. *Journal of Central European Agriculture*. 5: 263-272
- Alabadí, D., Gil, J., Blázquez, M.A. i García-Martínez, J. (2004) Gibberellins repress photomorphogenesis in darkness. *Plant Physiology*. 134: 1050-1057
- Alonso-Ramírez, A., Rodríguez, D., Reyes, D., Jiménez, J.A., Nicolás, G., López-Climent, M., Gómez-Cadenas, A. i Nicolás, C. (2009) Evidence for a Role of Gibberellins in Salicylic Acid-Modulated Early Plant Responses to Abiotic Stress in Arabidopsis Seeds. *Plant Physiology*. 150:1335-1344
- Alvarez, S., Marsh, E.L., Schroeder, S.G. i Schachtman, D.P. (2008) Metabolomic and proteomic changes in the xylem sap of maize under drought. *Plant, Cell and Environment*. 31: 325-340
- Amtmann, A. (2009) Learning from evolution: Thellungiella generates new knowledge on essential and critical components of abiotic stress tolerance in plants. *Molecular Plant*. 2: 3-12
- An, L.Z., Liu, G.X., Zhang, M.X., Chen, T., Liu, Y.H., Feng, H.Y., Xu, S.J., Qiang, W.Y. i Wang, X.L. (2004) Effect of enhanced UV-B radiation on polyamine content and membrane permeability in cucumber leaves. *Russian Journal of Plant Physiology*. 51: 658-662
- Arbona, V., Flors, V., Jacas, J., García-Agustín, P. i Gómez-Cadenas, A. (2003) Enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses of Carrizo citrange, a salt-sensitive citrus rootstock, to different levels of salinity. *Plant and Cell Physiology*. 44: 388-394
- Arbona, V. i Gómez-Cadenas, A. (2008) Hormonal modulation of citrus responses to flooding. *Journal of Plant Growth Regulation*. 27: 241-250

- Arbona, V., Hossain, Z., López-Climent, M.F., Pérez-Clemente, R.M. i Gómez-Cadenas, A. (2008) Antioxidant enzymatic activity is linked to waterlogging stress tolerance in citrus. *Physiologia Plantarum*. 132: 452-466
- Arbona, V., Iglesias, D.J., Talón, M. i Gómez-Cadenas, A. (2009) Plant phenotype demarcation using nontargeted LC-MS and GC-MS metabolite profiling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 7338-7347
- Arbona, V., Jacas, J. i Gómez-Cadenas, A. (2004) Response of the antioxidant machinery of two citrus rootstocks (Cleopatra mandarin and Carrizo citrange) to salt stress. *Proceeding International Society of Citriculture*. 2: 644-648
- Arbona, V., López-Climent, M.F., Mahouachi, J., Pérez-Clemente, R.M., Abrams, S.R. i Gómez-Cadenas, A. (2006) Use of persistent analogs of abscisic acid as palliatives against salt-stress induced damage in citrus plants. *Journal of Plant Growth Regulation*. 25: 1-9
- Arbona, V., López-Climent, M.F., Pérez-Clemente, R.M. i Gómez-Cadenas, A. (2009) Maintenance of a high photosynthetic performance is linked to flooding tolerance in citrus. *Environmental and experimental botany*. 66: 135-142
- Argueso, C.T., Ferreira, F.J. i Kieber, J.J. (2009) Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant, Cell and Environment*. 32: 1147-1160
- Ávalos, A. i Pérez-Urria, E. (2009). Serie Fisiología Vegetal. *Reduca*. 2: 119-145
- Azcón-Bieto, J. i Talón, M. (2008) (2ª). "Fundamentos de Fisiología vegetal". McGraw-Hill Interamericana Madrid

- Bailey-Serres J. i Voesenek, L.A.C.J. (2008) Flooding stress: Acclimations and genetic diversity. *Annual Review of Plant Biology*. 59: 313-339
- Bajaj, S., Targolli, J., Liu, L., Ho, T.D. i Wu, R. (1999) Transgenic approaches to increase dehydration-stress tolerance in plants. *Molecular Breeding*. 5: 493-503
- Bajguz, A. i Hayat, S. (2009) Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*. 47: 1-8
- Bañuls, J. i Primo-Millo, E. (1995) Effects of salinity on some *Citrus* Scion-rootstock combinations. *Annals of Botany*. 76: 97-102
- Bañuls, J. i Primo-Millo, E. (1992) Effects of Chloride and sodium on gas exchange parameters and water relations of *Citrus* plants. *Physiologia Plantarum*. 86: 115-123
- Bates, L.S., Waldren, R.P. i Teare, I.D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*. 39: 205-207
- Bedair, M. i Sumner, L.W. (2008) Current and emerging mass-spectrometry technologies for metabolomics. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 27: 238-250
- Blée, E. (2002) Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in Plant Science*. 7: 315-321
- Blom, C.W.P.M. i Voesenek, L.A.C.J. (1996) Flooding: The survival strategies of plants. *Trends in Ecology and Evolution*. 11: 290-295
- Böttcher, C., Von Roepenack-Lahaye, E., Willscher, E., Scheel, D. i Clemens, S. (2007) Evaluation of matrix effects in metabolite profiling based on capillary liquid chromatography electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 79: 1507-1513

- Böttcher, C., Centeno, D., Freitag, J., Höfgen, R., Köhl, K., Kopka, J., Kroymann, J., Matros, A., Mock, H.P., Neumann, S., Pfalz, M., Von Roepenack-Lahaye, E., Schauer, N., Trenkamp, S., Zubriggen, M. i Fernie, A.R. (2008a) Teaching (and learning from) metabolomics: The 2006 PlantMetaNet ETNA Metabolomics Research School. *Physiologia Plantarum*. 132: 136-149
- Böttcher, C., Von Roepenack-Lahaye, E., Schmidt, J., Schmotz, C., Neumann, S., Scheel, D. i Clemens, S. (2008b) Metabolome analysis of biosynthetic mutants reveals a diversity of metabolic changes and allows identification of a large number of new compounds in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 147: 2107-2120
- Bouxin, G. (2005) Ginkgo, a multivariate analysis package. *Journal of Vegetation Science*. 16: 355-359
- Boyer, J.S. (1982) Plant productivity and environment (crop genetic improvement). *Science*. 218: 443-448
- Boyes, D.C., Zayed, A.M., Ascenzi, R., McCaskill, A.J., Hoffman, N.E., Davis, K.R. i Görlach, J. (2001) Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: A model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell*. 13: 1499-1510
- Breckle, S.W. (2002) Salinity, halophytes and salt-affected natural ecosystems. En: "Salinity: environment-plant-molecules". Kluwer Academic Publishers
- Bressan, R.A., Zhang, C., Zhang, H., Hasegawa, P.M., Bohnert, H.J. i Zhu, J. (2001) Learning from the *Arabidopsis* experience. The next gene search paradigm. *Plant Physiology*. 127: 1354-1360
- Browse J. (2009) Jasmonate passes muster: A receptor and targets for the defense hormone. *Annual Review of Plant Biology*. 60: 183-205
- Buer, C.S., Imin, N. i Djordjevic, M.A. (2010) Flavonoids: New roles for old molecules. *Journal of Integrative Plant Biology*. 52: 98-111

- Bundy, J.G., Davey, M.P. i Viant, M.R. (2009) Environmental metabolomics: A critical review and future perspectives. *Metabolomics*. 5: 3-21
- Camacho-Cristóbal, J.J., Maldonado, J.M. i González-Fontes, A. (2005) Boron deficiency increases putrescine levels in tobacco plants. *Journal of Plant Physiology*. 162: 921-928
- Cao, R., Zhang, Y., Mann, F.M., Huang, C., Mukkamala, C., Hudock, M.P., Mead, M.E., Prusic, S., Wang, K., Lin, F., Chang, T., Peters, R.J. i Oldfield, E. (2010) Diterpene cyclases and the nature of the isoprene fold. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*. 78: 2417-2432
- Castle, W.S., Tucker, D.P.H., Krezdorn, A.H. i Youtsey, C.O. (1993) "Rootstocks for Florida Citrus. Rootstock selection. The first step to success". University of Florida Florida, USA
- Catchpole, G.S., Beckmann, M., Enot, D.P., Mondhe, M., Zywicki, B., Taylor, J., Hardy, N., Smith, A., King, R.D., Kell, D.B., Fiehn, O. i Draper, J. (2005) Hierarchical metabolomics demonstrates substantial compositional similarity between genetically modified and conventional potato crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102: 14458-14462
- Choe, S. (2006) Brassinosteroid biosynthesis and inactivation. *Physiologia Plantarum*. 126: 539-548
- Cipollini, D., Enright, S., Traw, M.B. i Bergelson, J. (2004) Salicylic acid inhibits jasmonic acid-induced resistance of *Arabidopsis thaliana* to *Spodoptera exigua*. *Molecular Ecology*. 13: 1643-1653
- Claussen, W. (2005) Proline as a measure of stress in tomato plants. *Plant Science*. 168: 241-248
- Conesa, A., Nueda, M.J., Ferrer, A. i Talón, M. (2006) maSigPro: A method to identify significantly differential expression profiles in time-course microarray experiments. *Bioinformatics*. 22: 1096-1102

- Correa-Molinari, H.B., Jamil-Marur, C.J., Bespalhok-Filho, J.C., Kobayashi, A.K., Pileggi, M., Pereira-Leite-Júnior, R., Protasio-Pereira, L.F. i Esteves-Viera, L.G. (2004) Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncitrus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. *Plant Science*. 167: 1375-1381
- Dat, J.F., Capelli, N., Folzer, H., Bourgeade, P. i Badot, P. (2004) Sensing and signalling during plant flooding. *Plant Physiology and Biochemistry*. 42: 273-282
- Davies, F.S. i Albrigo, L.G. (1994) *Citrus*. Crop production science in horticulture nº 2. Ed: Atherton, J., Rees, A.
- De Vos, R.C., Moco, S., Lommen, A., Keurentjes, J.J., Bino, R.J. i Hall, R.D. (2007) Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature Protocols*. 2: 778-791
- Dettmer, K., Aronov, P.A. i Hammock, B.D. (2007) Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*. 26: 51-78
- Djoukeng, J.D., Arbona, V., Argamasilla, R. i Gómez-Cadenas, A. (2008) Flavonoid profiling in leaves of citrus genotypes under different environmental situations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 11087-11097
- Ducruix, C., Vailhen, D., Werner, E., Fievet, J.B., Bourguignon, J., Tabet, J., Ezan, E. i Junot, C. (2008) Metabolomic investigation of the response of the model plant *Arabidopsis thaliana* to cadmium exposure: Evaluation of data pretreatment methods for further statistical analyses. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 91: 67-77

- Durgbanshi, A., Arbona, V., Pozo, O., Miersch, O., Sancho, J.V. i Gómez-Cadenas, A. (2005) Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 8437-8442
- Durrant W.E. i Dong, X. (2004) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 42: 185-209
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D. i Basra, S.M.A. (2009) Plant drought stress: Effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*. 29: 185-212
- Feussner I. i Wasternack, C. (2002) The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology*. 53: 275-297
- Fiehn, O. (2002) Metabolomics- the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*. 48: 155-171
- Fiehn, O., Kopka, J., Dormann, P., Altmann, T., Trethewey, R.N. i Willmitzer, L. (2000) Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature Biotechnology*. 18: 1157-1161
- García-Sánchez, F., Syversten, J.P., Gimeno, V., Botia, P. i Pérez-Pérez, J.G. (2007) Responses to flooding and drought stress by two citrus rootstock seedlings with different water-use efficiency. *Physiologia Plantarum*. 130: 1-11
- Ghars, M.A., Parre, E., Debez, A., Bordenave, M., Richard, L., Leport, L., Bouchereau, A., Savouré, A. i Abdelly, C. (2008) Comparative salt tolerance analysis between *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*, with special emphasis on K⁺/Na⁺ selectivity and proline accumulation. *Journal of Plant Physiology*. 165: 588-599
- Giovannoni, J.J. (2004) Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell*. 16: S170-S180

- Glazebrook J. (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 43: 205-227
- Gómez-Cadenas, A., Iglesias, D.J., Arbona, V. Colmenero-Flores, J.M., Primo-Millo, E., Talón, M. (2003) Physiological and molecular responses of citrus to salinity. En: " Recent Research and Development in Plant Molecular Biology". Research Signpost, Kerala, India. 1: 281-298
- Gómez-Cadenas, A., Pozo, O.J., García-Augustín, P. i Sancho, J.V. (2002) Direct analysis of abscisic acid in crude plant extracts by liquid chromatography-electrospray/tandem mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*. 13: 228-234
- Gómez-Cadenas, A., Mahouachi, J., Tadeo, F.R., Primo-Millo, E. i Talon, M. (2000) Hormonal regulation of fruitlet abscission induced by carbohydrate shortage in citrus. *Planta*. 210: 636-643
- Gómez-Cadenas, A., Tadeo, F.R., Primo-Millo, E. i Talon, M. (1998) Involvement of abscisic acid and ethylene in the responses of citrus seedlings to salt shock. *Physiologia Plantarum*. 103: 475-484
- Gómez-Cadenas, A., Tadeo, F.R., Talon, M. i Primo-Millo, E. (1996) Leaf abscission induced by ethylene in water-stressed intact seedlings of Cleopatra mandarin requires previous abscisic acid accumulation in roots. *Plant Physiology*. 112: 401-408
- Gong, Q., Li, P., Ma, S., Indu Rupassara, S. i Bohnert, H.J. (2005) Salinity stress adaptation competence in the extremophile *Thellungiella halophila* in comparison with its relative *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. 44: 826-839
- Goodacre, R., York, E.V., Heald, J.K. i Scott, I.M. (2003) Chemometric discrimination of unfractionated plant extracts analyzed by electrospray mass spectrometry. *Phytochemistry*. 62: 859-863

- Granier, C. i Tardieu, F. (1999) Water deficit and spatial pattern of leaf development. Variability in responses can be simulated using a simple model of leaf development. *Plant Physiology*. 119: 609-619
- Grant, M. i Lamb, C. (2006) Systemic immunity. *Current Opinion in Plant Biology*. 9: 414-420
- Gravel, V., Antoun, H. i Tweddell, R.J. (2007) Effect of indole-acetic acid (IAA) on the development of symptoms caused by *Pythium ultimum* on tomato plants. *European Journal of Plant Pathology*. 119: 457-462
- Gullberg, J., Jonsson, P., Nordström, A., Sjöström, M. i Moritz, T. (2004) Design of experiments: An efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*. 331: 283-295
- Hannah, M.A., Wiese, D., Freund, S., Fiehn, O., Heyer, A.G. i Hinch, D.K. (2006) Natural genetic variation of freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 142: 98-112
- Hayat, S., Hasan, S.A., Fariduddin, Q. i Ahmad, A. (2008) Growth of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in response to salicylic acid under water stress. *Journal of Plant Interactions*. 3: 297-304
- Hernández, I. i Van Breusegem, F. (2010) Opinion on the possible role of flavonoids as energy escape valves: Novel tools for nature's Swiss army knife? *Plant Science*. 179: 297-301
- Hirose, N., Takei, K., Kuroha, T., Kamada-Nobusada, T., Hayashi, H. i Sakakibara, H. (2008) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany*. 59: 75-83

- Ho, T.H.D., Gómez-Cadenas, A., Zentella, R. i Casaretto, J. (2003) Crosstalk between gibberellin and abscisic acid in cereal aleurone. *Journal of Plant Growth Regulation*. 22: 185-194
- Howe, G.A. (2004) Jasmonates as signals in the wound response. *Journal of Plant Growth Regulation*. 23: 223-237
- Howe G.A. i Jander, G. (2008) Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology*. 59: 41-66
- Howe, G.A. i Schilmiller, A.L. (2002) Oxylin metabolism in response to stress. *Current Opinion in Plant Biology*. 5: 230-236
- Huang, D., Wu, W., Abrams, S.R. i Cutler, A.J. (2008) The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. *Journal of Experimental Botany*. 59: 2991-3007
- Humphreys, J.M. i Chapple, C. (2002) Rewriting the lignin roadmap. *Current Opinion in Plant Biology*. 5: 224-229
- Hyun, Y., Choi, S., Hwang, H., Yu, J., Nam, S., Ko, J., Park, J., Seo, Y.S., Kim, E.Y., Ryu, S.B., Kim, W.T., Lee, Y., Kang, H. i Lee, I. (2008) Cooperation and Functional Diversification of Two Closely Related Galactolipase Genes for Jasmonate Biosynthesis. *Developmental Cell*. 14: 183-192
- Iglesias, D. i Talón, M. (2008) Giberelinas. En: "Fundamentos de Fisiología Vegetal". Azcón-Bieto J y Talón M (Eds). Interamericana Mc Graw Hill, España, pp. 399-420
- Ikeda, T., Kanaya, S., Yonetani, T., Kobayashi, A. i Fukusaki, E. (2007) Prediction of Japanese green tea ranking by fourier transform near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 9908-9912

- Inan, G., Goto, F., Jin, J.B., Rosado, A., Koiwa, H., Shi, H., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Maggio, A. i Li, X. (2007) Isolation and characterization of shs1, a sugar-hypersensitive and ABA-insensitive mutant with multiple stress responses. *Plant Molecular Biology*. 65: 295-309
- Inan, G., Zhang, Q., Li, P., Wang, Z., Cao, Z., Zhang, H., Zhang, C., Quist, T.M., Goodwin, S.M., Zhu, J., Shi, H., Damsz, B., Charbaji, T., Gong, Q., Ma, S., Fredricksen, M., Galbraith, D.W., Jenks, M.A., Rhodes, D., Hasegawa, P.M., Bohnert, H.J., Joly, R.J., Bressan, R.A. i Zhu, J. (2004) Salt cress. A halophyte and cryophyte arabidopsis relative model system and its applicability to molecular genetic analyses of growth and development of extremophiles. *Plant Physiology*. 135: 1718-1737
- Ivanchenko, M.G., Muday, G.K. i Dubrovsky, J.G. (2008) Ethylene-auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. 55: 335-347
- Jackson, M.B., Saker, L.R., Crisp, C.M., Else, M.A. i Janowiak, F. (2003) Ionic and pH signalling from roots to shoots of flooded tomato plants in relation to stomatal closure. *Plant and Soil*. 253: 103-113
- Jameson, P.E. (2000) Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions - An overview. *Plant Growth Regulation*. 32: 369-380
- Jiang, M. i Zhang, J. (2001) Effect of Abscisid Acid on Active Oxygen Species, Antioxidative Defence System and Oxidative Damage in Leaves of Maize Seedlings. *Plant Cell Physiologist*. 42: 1265-1273
- Johansen, H.N., Glitsø, V. i Bach Knudsen, K.E. (1996) Influence of extraction solvent and temperature on the quantitative determination of oligosaccharides from plant materials by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44: 1470-1474
- Johnson, H.E., Broadhurst, D., Goodacre, R. i Smith, A.R. (2003) Metabolic fingerprinting of salt-stressed tomatoes. *Phytochemistry*. 62: 919-928

- Kant, S., Kant, P., Raveh, E. i Barak, S. (2006) Evidence that differential gene expression between the halophyte, *Thellungiella halophila*, and *Arabidopsis thaliana* is responsible for higher levels of the compatible osmolyte proline and tight control of Na⁺ uptake in *T. halophila*. *Plant, Cell and Environment*. 29: 1220-1234
- Kasukabe, Y., He, L., Nada, K., Misawa, S., Ihara, I. i Tachibana, S. (2004) Overexpression of Spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*. 45: 712-722
- Katajamaa, M. i Oresic, M. (2005) Processing methods for differential analysis of LC/MS profile data. *BMC Bioinformatics*. 6: 179
- Katsir, L., Chung, H.S., Koo, A.J. i Howe, G.A. (2008) Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing. *Current Opinion in Plant Biology*. 11: 428-435
- Kempa, S., Krasensky, J., Dal Santo, S., Kopka, J. i Jonak, C. (2008) A central role of abscisic acid in stress-regulated carbohydrate metabolism. *PLoS ONE*. 3: e3935
- Kemsley, E.K., Le Gall, G., Dainty, J.R., Watson, A.D., Harvey, L.J., Tapp, H.S. i Colquhoun, I.J. (2007) Multivariate techniques and their application in nutrition: A metabolomics case study. *British Journal of Nutrition*. 98: 1-14
- Keurentjes, J.J.B., Fu, J., De Vos, C.H.R., Lommen, A., Hall, R.D., Bino, R.J., Van Der Plas, L.H.W., Jansen, R.C., Vreugdenhil, D. i Koornneef, M. (2006) The genetics of plant metabolism. *Nature Genetics*. 38: 842-849
- Khan, W., Prithiviraj, B. i Smith, D.L. (2003) Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates. *Journal of Plant Physiology*. 160: 485-492

- Khedr, A.H.A., Abbas, M.A., Abdel Wahid, A.A., Quick, W.P. i Abogadallah, G.M. (2003) Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress. *Journal of Experimental Botany*. 54: 2553-2562
- Kim, J.K., Bamba, T., Harada, K., Fukusaki, E. i Kobayashi, A. (2007) Time-course metabolic profiling in *Arabidopsis thaliana* cell cultures after salt stress treatment. *Journal of Experimental Botany*. 58: 415-424
- Klessig, D.F. i Malamy, J. (1994) The salicylic acid signal in plants. *Plant Molecular Biology*. 26: 1439-1458
- Kobayashi, M., MacMillan, J., Phinney, B., Gaskin, P., Spray, C.R. i Hedden, P. (2000) Gibberellin Biosynthesis: metabolic evidence for three steps in the early 13-hydroxylation pathway of rice. *Phytochemistry*. 55: 317-321
- Koornneef, M., Bentsink, L. i Hilhorst, H. (2002) Seed dormancy and germination. *Current Opinion in Plant Biology*. 5: 33-36
- Kozlowski, T.T. (2000) Responses of woody plants to human-induced environmental stresses: Issues, problems, and strategies for alleviating stress. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 19: 91-170
- Kramer, P.J. i Boyer, J.S. (1995) "Water Relations of Plants and Soils". Academic Press San Diego, California, USA
- Krishnan, P., Kruger, N.J. i Ratcliffe, R.G. (2005) Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. *Journal of Experimental Botany*. 56: 255-265
- Kristl, J., Veber, M., Krajnicic, B., Oresnik, K. i Slekovec, M. (2005) Determination of jasmonic acid in *Lemna minor* (L.) by liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 383: 886-893

- Kuhl, C., Tautenhahn, R. i Neumann, S. (2010). CAMERA: Collection of annotation related methods for mass spectrometry data. R package version 1.4.0. <http://msbi.ipb-halle.de/msbi/CAMERA/>
- Kumria, R. i Rajam, M.V. (2002) Ornithine decarboxylase transgene in tobacco affects polyamines, in vitro-morphogenesis and response to salt stress. *Journal of Plant Physiology*. 159: 983-990
- Kunin, W.E., Vergeer, P., Kenta, T., Davey, M.P., Burke, T., Woodward, F.I., Quick, P., Mannarelli, M.E., Watson-Haigh, N.S. i Butlin, R. (2009) Variation at range margins across multiple spatial scales: environmental temperature, population genetics and metabolomic phenotype. *Proceedings Biological sciences/The Royal Society*. 276: 1495-1506
- Lambers, H., Pons, T.L. i Chapin, F.S. (2008) (2^a). "Plant Physiological Ecology". Springer Verlag New York, USA
- Lee, K.H., Piao, H.L., Kim, H., Choi, S.M., Jiang, F., Hartung, W., Hwang, I., Kwak, J.M., Lee, I. i Hwang, I. (2006) Activation of glucosidase via stress induced polymerization rapidly increases active of abscisic acid. *Cell*. 126: 1109-1120
- Leiss, K.A., Choi, Y.H., Abdel-Farid, I.B., Verpoorte, R. i Klinkhamer, P.G. (2009) NMR metabolomics of thrips (*Frankliniella occidentalis*) resistance in *Senecio* hybrids. *Journal of Chemical Ecology*. 35: 219-229
- Lefebvre, V., Kiani, S.P. i Durand-Tardif, M. (2009) A focus on natural variation for abiotic constraints response in the model species *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Molecular Sciences*. 10: 3547-3582
- Levchenko, V., Konrad, K.R., Dietrich, P., Roelfsema, M.R.G. i Hedrich, R. (2005) Cytosolic abscisic acid activates guard cell anion channels without preceding Ca²⁺ signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102: 4203-4208

- Li, B., Wei, A., Song, C., Li, N. i Zhang, J. (2008) Heterologous expression of the TsVP gene improves the drought resistance of maize. *Plant Biotechnology Journal*. 6: 146-159
- Li, C. i Hung Wong, W. (2001) Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. *Genome Biology*. 2: research0032.1-0032.11
- Lisec, J., Meyer, R.C., Steinfath, M., Redestig, H., Becher, M., Witucka-Wall, H., Fiehn, O., Törjék, O., Selbig, J., Altmann, T. i Willmitzer, L. (2008) Identification of metabolic and biomass QTL in *Arabidopsis thaliana* in a parallel analysis of RIL and IL populations. *Plant Journal*. 53: 960-972
- López-Climent, M.F., Arbona, V., Pérez-Clemente, R.M. i Gómez-Cadenas, A. (2008) Relationship between salt tolerance and photosynthetic machinery performance in citrus. *Environmental and Experimental Botany*. 62: 176-184
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J.J. i Solano, R. (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell*. 15: 165-178
- Lucheta, A.R., Silva-Pinhati, A.C.O., Basílio-Palmieri, A.C., Berger, I.J., Freitas-Astúa, J. i Cristofani, M. (2007) An in silico analysis of the key genes involved in flavonoid biosynthesis in *Citrus sinensis*. *Genetics and Molecular Biology*. 30: 819-831
- Mahouachi, J., Arbona, V. i Gómez-Cadenas, A. (2007) Hormonal changes in papaya seedlings subjected to progressive water stress and re-watering. *Plant Growth Regulation*. 53: 43-51
- Malonek, S., Rojas, M.C., Hedden, P., Gaskin, P., Hopkins, P. i Tudzynski, B. (2004) The NADPH cytochrome P450 Reductase Gene from *Gibberella fujikuroi* Is Essential for Gibberellin Biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 279: 25075-25084

- Mander, L.N. (2003) Twenty years of gibberellin research. *Natural Product Reports*. 20: 49-69
- Manners, G.D., Breksa III, A.P., Schoch, T.K. i Hidalgo, M.B. (2003) Analysis of bitter limonoids in citrus juices by atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 3709-3714
- Martínez, C., Pons, E., Prats, G. i León, J. (2004) Salicylic acid regulates flowering time and links defence responses and reproductive development. *Plant Journal*. 37: 209-217
- Mashego, M.R., Rumbold, K., De Mey, M., Vandamme, E., Soetaert, W. i Heijnen, J.J. (2007) Microbial metabolomics: Past, present and future methodologies. *Biotechnology Letters*. 29: 1-16
- Matsuura, H., Aoi, A., Satou, C., Nakaya, M., Masuta, C. i Nabeta, K. (2009) Simultaneous UPLC MS/MS analysis of endogenous jasmonic acid, salicylic acid, and their related compounds. *Plant Growth Regulation*. 57: 293-301
- McKeon, T.A., Fernandez-Maculet, J.C. i Yang, S. (1996) Biosynthesis and metabolism of ethylene. En: "Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology". Kluwer Academic Publishers Dordrecht, The Netherlands
- Meijón, M., Cañal, M.J., Fernández, H., Rodríguez, A., Fernández, B., Rodríguez, R. i Feito, I. (2010) Hormonal Profile in Vegetative and Floral Buds of Azalea: Levels of Polyamines, Gibberellins, and Cytokinins. *Journal of Plant Growth Regulation*: 1-9

- Meyermans, H., Morreel, K., Lapierre, C., Pollet, B., De Bruyn, A., Busson, R., Herdewijn, P., Devreese, B., Van Beeumen, J., Marita, J.M., Ralph, J., Chen, C., Burggraeve, B., Van Montagu, M., Messens, E. i Boerjan, W. (2000) Modifications in lignin and accumulation of phenolic glucosides in poplar xylem upon down-regulation of caffeoyl-coenzyme A O-methyltransferase, an enzyme involved in lignin biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*. 275: 36899-36909
- Mishra, G., Zhang, W., Deng, F., Zhao, J. i Wang, X. (2006) A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in Arabidopsis. *Science*. 312: 264-266
- Moco, S., Bino, R.J., Vorst, O., Verhoeven, H.A., De Groot, J., Van Beek, T.A., Vervoort, J. i Ric De Vos, C.H. (2006) A liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato. *Plant Physiology*. 141: 1205-1218
- Mok, D.W. i Mok, M.C. (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 89: 89-118
- Morris, K., Mackerness, S.A., Page, T., Fred John, C., Murphy, A.M., Carr, J.P. i Buchanan-Wollaston, V. (2000) Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *Plant Journal*. 23: 677-685
- Moya, J.L., Primo-Millo, E. i Talon, M. (1999) Morphological factors determining salt tolerance in citrus seedlings: the shoot to root ratio modulates passive root uptake of chloride ions and their accumulation in leaves. *Plant Cell and Environment*. 22: 1425-1433
- Munns, R. (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*. 25: 239-250
- Munns R. i Tester, M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*. 59: 651-681

- Normanly, J., Slovin, J.P. i Cohen, J.D. (2004) Auxin biosynthesis and metabolism. En: "Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action". Kluwer Acad. Pub. Dordrecht. The Netherlands
- Oksman-Caldentey, K.M. i Saito, K. (2005) Integrating genomics and metabolomics for engineering plant metabolic pathways. *Current Opinion in Biotechnology*. 16: 174-179
- Oliver, S.G., Winson, M.K., Kell, D.B. i Baganz, F. (1998) Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology*. 16: 373-378
- Peng, J. i Harberd, N.P. (2002) The role of GA-mediated signalling in the control of seed germination. *Current Opinion in Plant Biology*. 5: 376-381
- Perl-Treves, R. i Perl, A. (2002) Oxidative stress: an introduction. En: "Oxidative stress in plants". Taylor and Francis, London
- Pérez-Pérez, J.G., García, J., Robles, J.M. i Botía, P. (2010) Economic analysis of navel orange cv. 'Lane late' grown on two different drought-tolerant rootstocks under deficit irrigation in South-eastern Spain. *Agricultural Water Management*. 97: 157-164
- Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van Der Ent, S. i Van Wees, S.C.M. (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*. 5: 308-316
- Pillai, M.A. i Akiyama, T. (2004) Differential expression of an S-adenosyl-L-methionine decarboxylase gene involved in polyamine biosynthesis under low temperature stress in japonica and indica rice genotypes. *Molecular Genetics and Genomics*. 271: 141-149
- Pitman, M.G. i Läuchli, A. (2002) Global impact of salinity and agricultural ecosystems. En: "Salinity: environment-plant-molecules". Kluwer Academic Publishers Dordrecht. NL

- Popova, L.P., Pancheva, T. i Uzunova, A. (1997) Salicylic acid: properties, biosynthesis and physiological role. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*. 23: 85-93
- Ralph, J. (2010) Hydroxycinnamates in lignification. *Phytochemistry Reviews*. 9: 65-83
- Rao, M.V., Lee, H., Creelman, R.A., Mullet, J.E. i Davis, K.R. (2000) Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *Plant Cell*. 12: 1633-1646
- Raskin, I. (1992a) Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 43: 439-463
- Raskin, I. (1992b) Salicylate, a new plant hormone. *Plant Physiology*. 99: 799-803
- Raskin, I., Skubatz, H., Tang, W. i Meeuse, B.J.D. (1990) Salicylic acid levels in thermogenic and non-thermogenic plants. *Annals of Botany*. 66: 369-373
- Robinson, A.R., Ukrainetz, N.K., Kang, K.Y. i Mansfield, S.D. (2007) Metabolite profiling of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) field trials reveals strong environmental and weak genetic variation. *New Phytologist*. 174: 762-773
- Rochfort, S. (2005) Metabolomics reviewed: A new "omics" platform technology for systems biology and implications for natural products research. *Journal of Natural Products*. 68: 1813-1820
- Rodríguez-Gamir, J., Primo-Millo, E., Forner, J.B. i Forner-Giner, M.A. (2010) Citrus rootstock responses to water stress. *Scientia Horticulturae*. 126: 95-102
- Roessner, U., Luedemann, A., Brust, D., Fiehn, O., Linke, T., Willmitzer, L. i Fernie, A.R. (2001) Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. *The Plant Cell*. 13: 11-29

- Rogers, L.A. i Campbell, M.M. (2004) The genetic control of lignin deposition during plant growth and development. *New Phytologist*. 164: 17-30
- Rojo, E., Solano, R. i Sánchez-Serrano, J.J. (2003) Interactions between Signaling Compounds Involved in Plant Defense. *Journal of Plant Growth Regulation*. 22: 82-98
- Romero, P., Navarro, J.M., Pérez-Pérez, J., García-Sánchez, F., Gómez-Gómez, A., Porras, I., Martínez, V. i Botía, P. (2006) Deficit irrigation and rootstock: Their effects on water relations, vegetative development, yield, fruit quality and mineral nutrition of Clemenules mandarin. *Tree Physiology*. 26: 1537-1548
- Ruggiero, B., Koiwa, H., Manabe, Y., Quist, T.M., Inan, G., Saccardo, F., Joly, R.J., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. i Maggio, A. (2004) Uncoupling the effects of abscisic acid on plant growth and water relations. Analysis of *sto1/nced3*, an abscisic acid-deficient but salt stress-tolerant mutant in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 136: 3134-3147
- Ruiz-Sanchez, M., Domingo, R., Morales, D. i Torrecillas, A. (1996) Water relations of Fino lemon plants on two rootstocks under flooded conditions. *Plant Science*. 120: 119-125
- Saito, N., Munemasa, S., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., Mori, I.C. i Murata, Y. (2008) Roles of RCN1, regulatory a subunit of protein phosphatase 2a, in methyl jasmonate signaling and signal crosstalk between methyl jasmonate and abscisic acid. *Plant and Cell Physiology*. 49: 1396-1401
- Sanan-Mishra, N., Pham, X.H., Sopory, S.K. i Tuteja, N. (2005) Pea DNA helicase 45 overexpression in tobacco confers high salinity tolerance without affecting yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102: 509-514
- Santner, A., Calderon-Villalobos, L.I.A. i Estelle, M. (2009) Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology*. 5: 301-307

- Sauter, A., Abrams, S.R. i Hartung, W. (2002) Structural requirements of abscisic acid (ABA) and its impact on water flow during radial transport of ABA analogues through maize roots. *Journal of Plant Growth Regulation*. 21: 50-59
- Schaffer, B. (1998) Flooding Responses and Water-use Efficiency of Subtropical and Tropical Fruit Trees in an Environmentally-sensitive Wetland. *Annals of Botany*. 81: 475-481
- Schaller, F., Biesgen, C., Müssig, C., Altmann, T. i Weiler, E.W. (2000) 12-Oxophytodienoate reductase 3 (OPR 3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis. *Planta*. 210: 979-984
- Schnitzler, J.P., Louis, S., Behnke, K. i Loivamäki, M. (2010) Poplar volatiles biosynthesis, regulation and (eco)physiology of isoprene and stress induced isoprenoids. *Plant Biology*. 12: 302-316
- Seki, M., Umezawa, T., Urano, K. i Shinozaki, K. (2007) Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*. 10: 296-302
- Senaratna, T., Touchell, D., Bunn, E. i Dixon, K. (2000) Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regulation*. 30: 157-161
- Shulaev, V., Cortes, D., Miller, G. i Mittler, R. (2008) Metabolomics for plant stress response. *Physiologia Plantarum*. 132: 199-208
- Skirycz, A., de Bodt, S., Obata, T., de Clercq, I., Claeys, H., de Rycke, R., Andriankaja, M., van Aken, O., van Breusegem, F., Fernie, A.R. i Inzé, D. (2010) Developmental stage specificity and the role of mitochondrial metabolism in the response of Arabidopsis leaves to prolonged mild osmotic Stress. *Plant Physiology*. 152: 226-244

- Smith, C.A., Want, E.J., O'Maille, G., Abagyan, R. i Siuzdak, G. (2006) XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical Chemistry*. 78: 779-787
- Somerville, C. i Briscoe, J. (2001) Genetic engineering and water. *Science*. 292: 2217
- Son, H.S., Ki, M.K., Van Den Berg, F., Hwang, G.S., Park, W.M., Lee, C.H. i Hong, Y.S. (2008) ¹H nuclear magnetic resonance-based metabolomic characterization of wines by grape varieties and production areas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 8007-8016
- Srivastava, L.M. (2002) Auxins. En: Plant Growth and Development: hormones and environment". Academic Press, New York
- Stepien, P. i Johnson, G.N. (2009) Contrasting responses of photosynthesis to salt stress in the glycophyte arabidopsis and the halophyte thellungiella: Role of the plastid terminal oxidase as an alternative electron sink. *Plant Physiology*. 149: 1154-1165
- Storey, R. i Walker, R.R. (1999) Citrus and salinity. *Scientia Horticulture*. 78: 39-81
- Strader, L.C. i Bartel, B. (2008) A new path to auxin. *Nature Chemical Biology*. 4: 337-339
- Sumner, L.W., Mendes, P. i Dixon, R.A. (2003) Plant metabolomics: Large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry*. 62: 817-836
- Sun, Z., Qi, X., Li, P., Wu, C., Zhao, Y., Zhang, H. i Wang, Z. (2008) Overexpression of a *Thellungiella halophila* CBL9 homolog, ThCBL9, confers salt and osmotic tolerances in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Biology*. 51: 25-34

- Surplus, S.L., Jordan, B.R., Murphy, A.M., Carr, J.P., Thomas, B. i A.-H.-Mackerness, S. (1998) Ultraviolet-B-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: Role of salicylic acid and reactive oxygen species in the regulation of transcripts encoding photosynthetic and acidic pathogenesis-related proteins. *Plant, Cell and Environment*. 21: 685-694
- Symons, G.M. i Reid, J.B. (2003) Interactions between light and plant hormones during deetiolation. *Journal of Plant Growth Regulation*. 22: 3-14
- Tadeo, F.R., GomezCadenas, A., BenCheikh, W., Primo-Millo, E. i Talon, M. (1997) Gibberellin-ethylene interaction controls radial expansion in citrus roots. *Planta*. 202: 370-378
- Tanaka, R., Hirashima, M., Satoh, S. i Tanaka, A. (2003) The *Arabidopsis* accelerated cell death gene ACD1 is involved in oxygenation of pheophorbide a: inhibition of the pheophorbide a oxygenase activity does not lead to the "stay-green" phenotype in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*. 44: 1266-1274
- Tanji, K.K. i Keyes, C.G. (2002) Water quality aspects of irrigation and drainage: Past history and future challenges for civil engineers. *Journal of Irrigation and Drainage Engineering*. 128: 332-340
- Tari, I., Csiszár, J., Szalai, G., Horváth, F., Pécsváradi, A., Kiss, G., Szepesi, A., Szabó, M. i Erdei, L. (2002) Acclimation of tomato plants to salinity stress after a salicylic acid pre-treatment. *Acta Biologica Szegediensis*. 46: 55-56
- Tautenhahn R., Böttcher, C. i Neumann, S. (2007) Annotation of LC/ESI-MS mass signals. *Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*. 4414 LNBI: 371-380
- Tripoli, E., La Guardia, M., Giammanco, S., Di Majo, D. i Giammanco, M. (2007) *Citrus* flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*. 104: 466–479

- Tytti, S. i Seppo, K. (2002) Potassium nutrition and free polyamines of *Betula pendula* Roth and *Betula pubescens* Ehrh. *Plant and Soil*. 238: 141-149
- Urano, K., Kurihara, Y., Seki, M. i Shinozaki, K. (2010) 'Omics' analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*. 13: 132-138
- Valladares F. i Niinemets, Ü. (2008) Shade tolerance, a key plant feature of complex nature and consequences. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 39: 237-257
- Valladares, F., Zaragoza-Castells, J., Sánchez-Gómez, D., Matesanz, S., Alonso, B., Portsmouth, A., Delgado, A. i Atkin, O.K. (2008) Is shade beneficial for Mediterranean shrubs experiencing periods of extreme drought and late-winter frosts? *Annals of Botany*. 102: 923-933
- Van den Berg, R.A., Hoefsloot, H.C., Westerhuis, J.A., Smilde, A.K. i van der Werf, M.J. (2006) Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics*. 7: 142
- Van Der Werf, M.J., Jellema, R.H. i Hankemeier, T. (2005) Microbial metabolomics: Replacing trial-and-error by the unbiased selection and ranking of targets. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 32: 234-252
- Vardhini, B.V. i Rao, S.S.R. (2003) Amelioration of osmotic stress by brassinosteroids on seed germination and seedling growth of three varieties of sorghum. *Plant Growth Regulation*. 41: 25-31
- Verslues, P.E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J. i Zhu, J.K. (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal*. 45: 523-539

- Verslues, P.E. i Bray, E.A. (2006) Role of abscisic acid (ABA) and *Arabidopsis thaliana* ABA-insensitive loci in low water potential-induced ABA and proline accumulation. *Journal of Experimental Botany*. 57: 201-212
- Verslues, P.E. i Zhu, J. (2005) Before and beyond ABA: Upstream sensing and internal signals that determine ABA accumulation and response under abiotic stress. *Biochemical Society Transactions*. 33: 375-379
- Volkov, V. i Amtmann, A. (2006) *Thellungiella halophila*, a salt-tolerant relative of *Arabidopsis thaliana*, has specific root ion-channel features supporting K^+/Na^+ homeostasis under salinity stress. *Plant Journal*. 48: 342-353
- Volkov, V., Wang, B., Dominy, P.J., Fricke, W. i Amtmann, A. (2004) *Thellungiella halophila*, a salt-tolerant relative of *Arabidopsis thaliana*, possesses effective mechanisms to discriminate between potassium and sodium. *Plant, Cell and Environment*. 27: 1-14
- Von Roepenack-Lahaye, E., Degenkolb, T., Zerjeski, M., Franz, M., Roth, U., Wessjohann, L., Schmidt, J., Scheel, D. i Clemens, S. (2004) Profiling of *Arabidopsis* secondary metabolites by capillary liquid chromatography coupled to electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Plant Physiology*. 134: 548-559
- Vu, J.C.V. i Yelenosky, G. (1991) Photosynthetic responses of citrus trees to soil flooding. *Physiologia Plantarum*. 81: 7-14
- Wang, K.L., Li, H. i Ecker, J.R. (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell*. 14: S131-S151
- Wasternack, C. (2007) Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany*. 100: 681-697
- Weckwerth W. (2003) Metabolomics in Systems Biology. *Annual Review of Plant Biology*. 54: 669-689

- Wilkinson, S. i Davies, W.J. (2002) ABA-based chemical signalling: The coordination of responses to stress in plants. *Plant, Cell and Environment*. 25: 195-210
- Wishart, D.S. (2008) Metabolomics: applications to food science and nutrition research. *Trends in Food Science and Technology*. 19: 482-493
- Wishart, D.S. (2007) Human metabolome database: Completing the 'human parts list'. *Pharmacogenomics*. 8: 683-686
- Wong, C.E., Li, Y., Labbe, A., Guevara, D., Nuin, P., Whitty, B., Diaz, C., Golding, G.B., Gray, G.R., Weretilnyk, E.A., Griffith, M. i Moffatt, B.A. (2006) Transcriptional profiling implicates novel interactions between abiotic stress and hormonal responses in *Thellungiella*, a close relative of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 140: 1437-1450
- Xu, Y., Linda Chang, P.F., Liu, D., Narasimhan, M.L., Raghothama, K.G., Hasegawa, P.M. i Bressan, R.A. (1994) Plant Defense Genes Are Synergistically Induced by Ethylene and Methyl Jasmonate. *Plant Cell and Environment*. 6: 1077-1085
- Yalpani, N., Enyedi, A.J., Leon, J. i Raskin, I. (1994) Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Planta*. 193: 372-376
- Yamaguchi-Shinozaki, K. i Shinozaki, K. (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology*. 57: 781-803
- Yoshida, R., Hobo, T., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Takahashi, F., Aronso, J., Ecker, J.R. i Shinozaki, K. (2002) ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*. 43: 1473-1483

Bibliografia

- Zhang, X., Guo, S.L., Yin, H.B., Xiong, D.J., Zhang, H. i Zhao, Y.X. (2004) Molecular cloning and identification of a heat shock cognate protein 70 gene, Thhsc70, in *Thellungiella halophila*. *Acta Botanica Sinica*. 46: 1212-1219
- Zhao, H. i Yang, H. (2008) Exogenous polyamines alleviate the lipid peroxidation induced by cadmium chloride stress in *Malus hupehensis* Rehd. *Scientia Horticulturae*. 116: 442-447
- Zhu, J.K. (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology*. 6: 441-445
- Zhu, J.K. (2001) Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*. 6: 66-71