



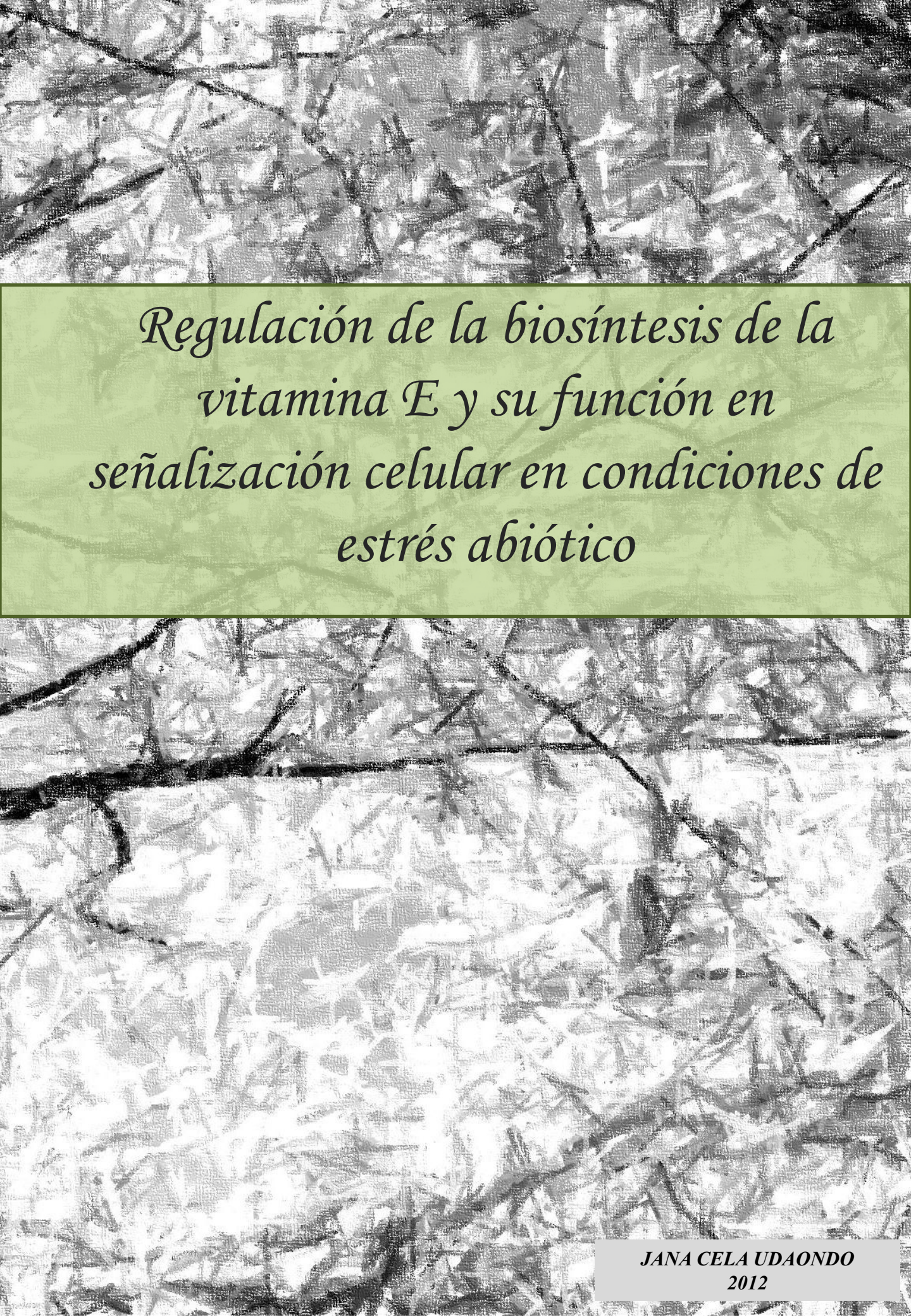
Regulación de la biosíntesis de la vitamina E y su función en señalización celular en condiciones de estrés abiótico

Jana Cela Udaondo

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



*Regulación de la biosíntesis de la
vitamina E y su función en
señalización celular en condiciones de
estrés abiótico*

*JANA CELA UDAONDO
2012*

REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE LA VITAMINA E Y SU FUNCIÓN EN SEÑALIZACIÓN CELULAR EN CONDICIONES DE ESTRÉS ABIÓTICO

Memoria presentada por Jana Cela Udaondo para optar al título de Doctora dentro del programa de doctorado “Biología Vegetal”, bienio 2008/2010, de la Universitat de Barcelona.

Este trabajo se ha realizado en el Departamento de Biología Vegetal de la de la Universitat de Barcelona bajo la dirección del Dr. Sergi Munné Bosch.

Doctoranda

Director de Tesis

Jana Cela Udaondo

Dr. Sergi Munné Bosch

BARCELONA, ABRIL 2012

Adopta el paso de la naturaleza:

su secreto es la paciencia.

Ralph W. Emerson

El valor y la utilidad de un experimento

dependen de lo apropiado que sea el material

para el objeto con que se emplea.

Gregor Mendel

ÍNDICE

ÍNDICE

Agradecimientos	I
Abreviaciones	III
1. Introducción	1
1.1. Vitamina E en plantas	1
<i>Clases, características químicas y estructura</i>	1
<i>Distribución en vegetales</i>	2
<i>Funciones</i>	4
1.2. Regulación de la biosíntesis de la vitamina E	11
<i>Ruta de biosíntesis</i>	11
<i>Regulación por estreses ambientales y hormonas</i>	14
<i>Efectos de la edad de la hoja</i>	21
1.3. Vitamina E en señalización retrograda	25
<i>Genes implicados en la biosíntesis, percepción y señalización del etileno</i>	26
1.4. Elección del modelo experimental	32
2. Objetivos	39
3. Informe del director	43
4. Resultados	47
Capítulo 1: Ethylene signaling may be involved in the regulation of tocopherol biosynthesis in <i>Arabidopsis thaliana</i>	49
Capítulo 2: Enhanced oxidative stress in the ethylene insensitive (<i>ein3-1</i>) mutant of <i>Arabidopsis thaliana</i> exposed to salt stress	65

Capítulo 3: Diurnal changes in photosystem II photochemistry, photoprotective compounds and stress-related phytohormones in the CAM plant, <i>Aptenia cordifolia</i>	81
Capítulo 4: Acclimation to high salinity in the invasive CAM plant <i>Aptenia cordifolia</i>	95
Capítulo 5: Accumulation of γ - rather than α -tocopherol alters ethylene signaling gene expression in the <i>vte4</i> mutant of <i>Arabidopsis thaliana</i>	115
5. Discusión	145
5.1. Regulación de la biosíntesis de vitamina E en plantas	145
<i>Regulación por etileno</i>	146
<i>Regulación por ácido abscísico</i>	151
<i>Regulación de la expresión génica</i>	153
5.2. Funciones de la vitamina E	156
<i>Fotoprotección</i>	156
<i>Señalización celular</i>	160
6. Conclusiones	167
7. Anexo	173
8. Bibliografía	197

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

Posiblemente sean los agradecimientos la parte de una tesis que se escribe con más cariño, intentando recordar toda la gente que ha contribuido a hacer que ahora pueda estar frente al ordenador escribiéndolos. Hace ya casi 7 años que empecé mi aventura investigadora de mano del Dr. Munné con lo que parecía una simple colaboración y que acabó siendo un proyecto de doctorado. Sin duda alguna, ha sido gracias a él que ahora puedo estar “a punto” de acabar esta primera etapa. Gràcies “Jefe” per les llargues reunions sempre tan profitoses, per l’asequibilitat, l’optimisme i sobretot, per la confiança que sempre has tingut en mi. Espero haver estat a l’alçada de les expectatives i que puguem continuar treballant junts.

Gracias también a los compis de departa. Quiero hacer una especial mención a Iker y Maren, que me enseñasteis pacientemente en las primeras etapas. A Marta y Laia, con quienes he compartido tantos muestreros (y horas buenas). A Beth, que ahora se encuentra en la lejanía, con nuevas oportunidades. A Jordi, Guillem, Tana, Cris, Amparo, Salima, Hasna (my beautiful friend), Rut, Georgina, Sam, Isis, Mireia, Salva, Luisinho, Igor, Toni, Marta Pintó por todas esas conversaciones distraídas de mediodía, a veces científicas, pero no siempre. A las nuevas generaciones, Xavier, Melanie y Marteta, y sus montones de preguntas.

A todo el personal del departa, a los profes, a Carmen Cañueto (que haríamos sin ti, Carmen!!), a las “secres” (a Marga, a mi queridísima Esther, a nuestra añorada Mercè). Gracias al personal de Camps experimentals, Ricardo y Josep. Josep, moltes gràcies per ensenyar-me tantes coses, amb tu he après molt, sobretot de plantes, i especialment d’*Arabidopsis*, però també gràcies per les xerrades amenes i pels trajectes en tren. Gracias al personal del Parc Científic, a Isidre Casals, siempre dispuesto a encontrar una solución,

a María, a Eva y sobre todo a Esther, por su inestimable ayuda en la lucha contra las burbujas.

Thanks to Jon Falk, for sharing a wonderful work and for your generosity. To Caren Chang, for welcoming me in your lab and giving me the opportunity to make a wonderful work. And Luis Mur, with whom still I have so many things to do. También quería dedicar unas líneas a Silvana, Francisco y especialmente a Mónica Pava Ripoll, con quien pasé muy buenos momentos durante mi estancia en Estados Unidos. Ese tiempo fue mucho más llevadero gracias a tu amistad y a pesar de la distancia, te deseo lo mejor.

A mis padres por animarme siempre y apoyarme en los tiempos difíciles. A mi hermano, por recordarme lo “buena bióloga que soy” (y no, no sé como se llaman los bichos, a mi me gustan las plantas, y no, tampoco sé como se llaman :p). A Omar, por acompañarme en este viaje, por su paciencia y su comprensión, por compartir tantos buenos momentos (y los que aún nos quedan por compartir!). A mis niñas, Eva y Alba, y mi Ester, siempre dispuestas a todo, siempre a mi lado.

Finalmente, quería dar las gracias también al antiguo Ministerio de Educación y Ciencia por financiar esta tesis. Al Comissionat per a Universitats i Recerca del Departament d’Innovació, Universitats i Empresa de la Generalitat de Catalunya por concederme la beca BE para “Estades de recerca fora de Catalunya” en las convocatorias 2008 y 2010, para las estancias en la Universidad de Maryland y la Universidad de Gales, respectivamente, y al Premio Icrea Academia de la Generalitat de Catalunya al Dr. S. Munné Bosch.

ABREVIACIONES

Abreviaciones

ABA: ácido abscísico

ACC: ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico

ACO: ACC oxidasa

ACS: ACC sintasa

AdoMet: S-adenosilmetionina

CAM: metabolismo ácido de las crasuláceas

$^3\text{Chl}^*$: clorofila triplete excitada

CTR1: intermediario en la vía de señalización del etileno

DMPBQ: 2,3-dimetil-5-fitilbenzoquinol

DPS: estado de depoxidación del ciclo de las xantofilas

EIL: intermediario en la vía de señalización del etileno

EIN2: intermediario en la vía de señalización del etileno

EIN3: intermediario en la vía de señalización del etileno

EIN4: receptor de etileno

ERF1: intermediario en la vía de señalización del etileno

ERS1: receptor de etileno

ERS2: receptor de etileno

ETO1: proteína adaptadora específica de sustrato para la ACS

ETR1: receptor de etileno

ETR2: receptor de etileno

ϕ_{PSII} : eficiencia relativa del fotosistema II

F_v/F_m : eficiencia máxima del fotosistema II

γ -TMT: γ -tocoferol metiltransferasa

GAP-DH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GGDP: geranilgeranil difosfato

H₂O₂: peróxido de hidrogeno

HGA: ácido homogentísico

HGGT: homogentisato geranilgeranil transferasa

HPD: *p*-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

HPT: homogentisato preniltransferasa

IAA: ácido indol-3-acético

JA: ácido jasmónico

MDA: malondialdehído

MeJA: ácido metil jasmónico

MEP: metileritritol 4-fosfato

MPBQ: 2-metil-6-fetilbenzoquinol

MGGBQ: 2-metil-6-geranilgeranil benzoquinol

NO: óxido nítrico

PC-8: plastocromanol-8

PDP: fitil difosfato

PF: peso fresco

PS: peso seco

PSII: fotosistema II

PT: peso turgente

q-PCR: PCR cuantitativa

ROS: especies reactivas del oxígeno

RWC: contenido hídrico relativo

SA: ácido salicílico

SAG: gen asociado a la senescencia

TAT: tirosina aminotransferasa

TC: tocoferol ciclasa

TTP: proteína de transporte de tocoferol

UPLC-MS/MS: cromatografía líquida de ultra-alta resolución asociada a espectrometría de masas en tándem

VTE1: tocoferol ciclasa

VTE2: homogentisato preniltransferasa

VTE3: MPBQ metiltransferasa

VTE4: γ -tocoferol metiltransferasa

1. INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1. Vitamina E en plantas

Clases, características químicas y estructura

El término vitamina E se introdujo por primera vez en el año 1922 por Evans y Bishop para describir un factor en la dieta importante para la reproducción animal aunque tuvieron que pasar más de 40 años para que fuera asociado con propiedades antioxidantes (Epstein et al. 1966). A partir de ese momento, se estudió ampliamente el papel de esta vitamina en humanos y animales y, posteriormente, en plantas.

Vitamina E es el nombre utilizado para describir un grupo de moléculas anfipáticas esenciales para la dieta humana, los tococromanoles, que incluyen 8 componentes naturales con actividad antioxidante. Los tococromanoles se dividen en dos grandes grupos de homólogos, los tocoferoles y los tocotrienoles. Todos ellos tienen una estructura básica común, formada por un anillo cromanol y una cadena poliprenol, que en el caso de los tocoferoles está totalmente saturada y deriva del fitil difosfato (PDP) y en el caso de los tocotrienoles está tres veces insaturada (con un doble enlace en los carbonos 3', 7' y 11'), derivada del geranylgeranyl difosfato (GGDP). Cada uno de estos dos grupos está formado por 4 homólogos (α , β , γ y δ) que difieren en el número y posición de los grupos metilo del anillo aromático. La forma α tiene tres sustituyentes metilo en el anillo aromático, las formas β y γ tienen dos pero en posiciones diferentes y la forma δ sólo uno (Fig 1.1.1). La estructura básica de los tococromanoles, una cola hidrocarbonada unida a una cabeza polar, hace que sean moléculas anfipáticas que se distribuyen insertando la cola hidrocarbonada en las membranas lipídicas del cloroplasto y el anillo aromático polar se mantiene en la superficie de éstas. Las diferencias de estructura entre los diferentes homólogos, como los patrones de metilación del anillo aromático o el grado de saturación de las cadenas laterales, confieren propiedades químicas y físicas ligeramente

diferentes. Por un lado, pueden aportar diferentes grados de capacidad antioxidante, siendo los α -tococromanoles los que presentan mayor capacidad antioxidante *in vitro* y el α -tocoferol, en concreto, la mayor actividad biológica en animales basándose en la absorción fetal en ratas (Weiser et al. 1986) además de ser el único homólogo capaz de ser transportado por la “proteína de transporte de tocoferol” o TTP en humanos (revisado por Kamal-Eldin y Appelqvist 1996). Por otro lado, ayudan a mantener la estructura y estabilidad de las membranas (revisado por Falk y Munné-Bosch 2010).

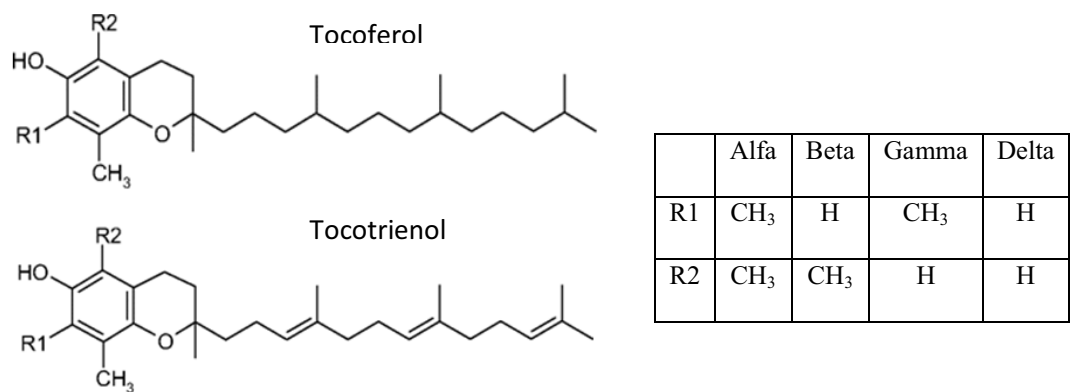


Figura 1.1.1. Estructura básica de los tocoferoles y tocotrienoles.

Distribución en vegetales

Los tococromanoles son sintetizados únicamente por organismos fotosintéticos, pero la distribución de los diferentes homólogos varía según la especie y el tejido en cuestión (revisado por DellaPenna 2005). Los tocoferoles se han encontrado en todos los organismos fotosintéticos analizados con la única excepción de *Anacystis nidulans*, una cianobacteria (Omata y Murata 1984). Además, los niveles de α -tocoferol son un carácter evolutivo que tiende a aumentar en grupos evolutivamente más modernos (Esteban et al. 2009). El α -tocoferol es la forma más abundante en la naturaleza (revisado por Sheppars

et al. 1993) y con mayor actividad biológica en animales basándose en la absorción fetal (Weiser et al. 1986). En plantas, el α -tocoferol es la forma predominante en tejidos fotosintéticos, seguido de su precursor inmediato, el γ -tocoferol. En otros tejidos, las cantidades y la presencia de los diferentes homólogos varían enormemente, predominando en algunos casos los tocoferoles y en otros los tocotrienoles. Los tocoferoles están presentes en gran variedad de tejidos. Los podemos encontrar en hojas, semillas, frutos, raíces, cotiledones, hipocótilos, flores y en los diferentes órganos florales y la cantidad y composición puede variar enormemente entre unos y otros (Arrom y Munné-Bosch 2010; Asensi-Fabado y Munné-Bosch 2010; Hojati et al. 2011). Al contrario que los tocoferoles, la distribución de los tocotrienoles en el reino vegetal es mucho menos universal. Los tocotrienoles no acostumbran a estar presentes en tejidos fotosintéticos, aunque el α -tocotrienol se ha descrito en acículas de algunos miembros del género *Picea* (Franzen et al. 1991). En cambio, son abundantes en semillas y en frutas, especialmente en mocotiledóneas (Horvath et al. 2006), y también en el látex de *Hevea brasiliensis* (Whittle et al. 1966). Las concentraciones de los tococromanoles son muy variables, desde valores inferiores a 1 $\mu\text{g/g}$ PS en algunas especies o tejidos, hasta los 26 mg vitamina E total/100g de peso comestible que se pueden encontrar en el mangostán (*Garcinia mangostana*) (equivalentes a 1,3 mg/g PS) (Fig 1.1.2) (ver Anexo) o 1 mg/g de aceite de vitamina E que se encuentra en el aceite de palma, una de las fuentes naturales más ricas de tococromanoles (Monde et al. 2009).



Figura 1.1.2.
Fotografía del mangostán (*Garcinia mangostana*) en un mercado.

Funciones

A principios de los años 90 se pensaba que la función del α -tocoferol era únicamente su actividad antioxidante asociada al mantenimiento de la integridad de las membranas (Fryer 1992). A pesar de esto, hay evidencias recientes de que los tocoferoles y los tocotrienoles tienen numerosas funciones en plantas.

El α -tocoferol es un potente antioxidante debido a la capacidad de su anillo heterocíclico cromanol de donar el hidrógeno fenólico a los radicales lipídicos (revisado por Kamal-Eldin y Appelqvist 1996) desactivándolos químicamente, ya que son los responsables de la propagación de la peroxidación lipídica, manteniendo así la estabilidad de las membranas (revisado por Liebler 1993). A la vez, puede desactivar química y físicamente el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), siendo capaz una única molécula de α -tocoferol de eliminar por *quenching* 120 moléculas de $^1\text{O}_2$ antes de ser degradada (Fahrenholtz et al. 1974). La eliminación química del $^1\text{O}_2$ implica la degradación del α -tocoferol, que pasa a quinonas o epóxidos, mientras que la eliminación de los radicales lipídicos peroxil implica la formación de radicales α -tocoferoxil, que son reciclados nuevamente a α -tocoferol por la acción del ciclo del ascorbato-glutatión (revisado por Munné-Bosch y Alegre 2002). También puede desactivar las clorofilas triplete excitadas ($^3\text{Chl}^*$) en las membranas tilacoidales, por un mecanismo similar al del β -caroteno, aunque es éste último el que detoxifica la mayor parte de $^3\text{Chl}^*$ (Krieger-Liszkay y Trebst 2006). Los tococromanos también actúan como agentes estabilizadores de membranas, interactuando con fosfolípidos asimétricos y formando complejos con componentes específicos de membrana, de esta forma ayudan a mantener el grado de fluidez (revisado por Wang y Quinn 2000).

El α -tocoferol también juega un importante papel en la tolerancia al estrés. En plantas resistentes a la sequía se produce un aumento neto de los niveles de éste, mientras

que en plantas sensibles, se produce un aumento inicial seguido de pérdida neta (revisado por Munné-Bosch 2002). Pero el tocoferol no actúa sólo. Conjuntamente con otros antioxidantes, como el glutatión y el ácido ascórbico (Kanwischer et al. 2005) o los carotenoides (Li et al. 2012) reduce los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) en los cloroplastos, contribuyendo así a mantener un estado redox adecuado y a mantener la estructura y función de las membranas tilacoidales. Numerosos tipos de estrés conducen a un aumento de los niveles de ROS, como la sequía, la salinidad, el exceso de luz o las bajas temperaturas, entre otros (revisado por Foyer y Noctor 2009), alterando el equilibrio redox de los cloroplastos además de la posibilidad de causar daños en macromoléculas tales como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos, que pueden conducir a la muerte celular en último lugar. Para evitar esto, el conjunto de antioxidantes se coordina para detoxificar las ROS. El ciclo del ascorbato-glutatión es esencial para la eliminación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el reciclaje de los radicales α -tocoferoxil a α -tocoferol, produciéndose monodehidroascorbato, el cual es a su vez reciclado a ácido ascórbico por la acción de la dehidroascorbato reductasa y el glutatión (revisado por Foyer y Noctor 2011). Por otro lado, los carotenoides y los tocoferoles tienen una acción sinérgica frente a la presencia de ROS. Los carotenoides se dividen en dos tipos: los carotenos, siendo el β -caroteno el más abundante y las xantofilas que incluyen luteína, zeaxantina, anteraxantina, violaxantina y neoxantina. Los carotenos suelen ser más abundantes en los centros de reacción del fotosistema I y II, mientras que las xantofilas se encuentran predominantemente en las antenas (revisado por Anderson 1986; Thornber et al. 1991). Ambos grupos se caracterizan por tener una estructura principal lineal de 40 átomos de carbono derivada del isopreno con dobles enlaces conjugados y en los extremos tienen anillos con (xantofilas) o sin (carotenos) oxígeno. El hecho de que la cadena contenga dobles enlaces conjugados les permite absorber luz entre 400 y 500 nm

así como la energía de excitación de las $^3\text{Chl}^*$ evitando la formación de $^1\text{O}_2$. En condiciones de exceso de luz, las xantofilas juegan un papel clave en la disipación térmica, mediante el ciclo de las xantofilas, en el cual la violaxantina, por la acción enzimática de la violaxantina de-epoxidasa pasa a anteraxantina y posteriormente a zeaxantina en un intento de disipar el exceso de luz y prevenir daños fotooxidativos (Demmig-Adams y Adams 1996). En plantas de *Salvia lyrata* expuestas a una combinación de alta radiación y estrés hídrico, se vio que cuando la disipación térmica de energía a través del ciclo de las xantofilas no podía ofrecer más protección según avanzaba la combinación de estreses, los niveles de β -caroteno disminuyeron y el α -tocoferol se degradaba a α -tocoferol quinona, posiblemente por un aumento en la producción de ROS en las membranas tilacoidales (Munné-Bosch y Cela 2006). Además, mutantes deficientes en carotenoides han permitido estudiar la interacción entre éstos y el tocoferol. La acción coordinada del α -tocoferol y los carotenoides ayuda a proteger el fotosistema II (PSII) del daño fotooxidativo (Trebst 2003; Havaux et al. 2005) mientras que un aumento de los niveles de α -tocoferol en mutantes *npq1lor1* de *Chlamydomonas reinhardtii* que carecen de zeaxantina y luteína puede mejorar la tolerancia al estrés oxidativo a pesar de que el α -tocoferol no es capaz de reemplazarlas totalmente (Li et al. 2012).

Las semillas de la mayoría de plantas contienen niveles de tocoferoles más altos en comparación con otros tejidos, sugiriendo que estos compuestos pueden jugar un papel importante en la germinación y el desarrollo inicial de la plántula. De acuerdo con esta premisa, los mutantes *vte2* de *Arabidopsis thaliana*, que carecen de tocoferoles, tienen una importante reducción de la longevidad de la semilla y defectos del desarrollo en las primeras etapas de crecimiento, en comparación con las plantas *wild type* (Sattler et al. 2004). Este fenotipo se debe a que el mutante *vte2* es incapaz de metabolizar

correctamente los lípidos almacenados y sufre un fuerte aumento de los productos de peroxidación lipídica, como el malondialdehído (MDA) y los peróxidos lipídicos, entre otros. Además, al analizar un perfil de expresión génica durante la germinación, 160 genes estaban regulados a la alza, en cambio, el mutante *vte1*, que acumula 2,3-dimetil-5-fitilbenzoquinol (DMPBQ), no muestra deficiencias en la germinación y únicamente 12 genes estaban regulados a la alza en las mismas condiciones (Sattler et al. 2006). Por otro lado, el doble mutante *vte2vte1* que carece de tocoferoles, plastocromanol-8 (PC-8) y DMPBQ presenta un fenotipo mucho más severo que el de los mutantes individuales, mientras que la presencia de PC-8 en el mutante *vte2* atenúa ese fenotipo, sugiriendo que el PC-8 puede actuar como antioxidante *in vivo* (Mène-Saffrané et al. 2010).

También se ha sugerido la implicación de los tocoferoles en la regulación del metabolismo de los carbohidratos. El mutante *sxd1* (*sucrose export defective1*) de maíz (Russin et al. 1996) tiene alterado el gen de la tocoferol ciclasa (Porfirova et al. 2002) y acumula sacarosa y almidón en las hojas por alteraciones de la estructura de los plasmodesmos que conducen al bloqueo de la exportación de fotoasimilados desde las células del mesófilo hacia el floema (Russin et al. 1996). Éste mismo fenotipo se ha descrito en hojas de plantas de patata transgénicas con la expresión de *VTE1* alterada (Hofius et al. 2004) y en el mutante *vte1* de *A. thaliana* aunque en este caso, sólo en condiciones de bajas temperaturas (Sattler et al. 2003; Maeda et al. 2006). Aunque la implicación del tocoferol en la exportación de fotoasimilados parece clara, el mecanismo molecular mediante el cual lo hace no está del todo claro, aunque parece haber una relación entre éste fenotipo en condiciones de baja temperatura y el metabolismo lipídico (Song et al. 2010).

Hasta ahora, hemos visto que los tocoferoles están relacionados con diversos aspectos, como la respuesta frente al estrés, la germinación o la prevención de la

propagación de la peroxidación lipídica, pero también se ha especulado sobre el papel del tocoferol en la señalización celular. El mutante *vte1* de *A. thaliana* mostró una reducción del crecimiento y un aumento de los niveles de antocianinas, precedidos por un aumento de ácido jasmónico, sugiriendo un papel directo del tocoferol en la regulación hormonal de la planta (Munné-Bosch et al. 2007). Por otro lado, los mutantes *vte2-1* y *vte2-2* de *A. thaliana*, que carecen de tocoferoles y de los intermediarios MPBQ y DMPBQ mostraron problemas durante la germinación, causados por una gran acumulación de hidroperóxidos, fitoprostanos y MDA (Sattler et al. 2006). El perfil de expresión génica mostró además una sobre-regulación de diversos genes asociados con el estrés oxidativo como consecuencia de la acumulación de productos de la peroxidación lipídica. La importancia de la regulación de los niveles de los productos de oxidación lipídica no enzimática (como fitoprostanos o MDA) por los niveles de tocoferol recae en el hecho que estos compuestos son capaces de inducir la expresión de genes asociados al estrés oxidativo cuando son aplicados de forma exógena (revisado por Thoma et al. 2004), por lo que, de forma indirecta, los niveles de tocoferol actúan como señal celular. Otra evidencia de la relación entre productos de oxidación lipídica (especialmente MDA), tocoferol y regulación de la expresión génica se obtuvo mutando tres genes que codifican para desaturasas de ácidos grasos (*fad3*, *fad7* y *fad8*) en el *background* del mutante *vte2-1*, reduciendo así los niveles de MDA durante la germinación y consiguiendo eliminar los defectos del desarrollo que se observaban durante la germinación de ese mutante (Mène-Saffrané et al. 2007). Al exponer el mismo mutante a bajas temperaturas, la composición lipídica del retículo endoplasmático se modificaba, disminuyendo los niveles de ácido linolénico y aumentando los de ácido linoleico, pero cuando ese *background* se modificaba alterando una desaturasa de ácidos grasos del retículo endoplasmático se eliminaba el fenotipo inducido por la falta de tocoferol (Maeda et al. 2008). Aunque el

mecanismo no está del todo claro, hay evidencias de que el tocoferol es un factor clave en el metabolismo de lípidos, regulando los niveles de los productos de oxidación y de la composición del retículo endoplasmático. En cultivos de células en suspensión de tabaco, el tratamiento con α -tocoferol disminuía la actividad de las MAPK, sugiriendo un papel en la regulación de la vía de transducción de señales relacionada con el estrés (Hyun et al. 2011). Finalmente cabe comentar que los tocoferoles pueden afectar el metabolismo de los carbohidratos y afectar la transición fuente-sumidero así como alterar la expresión génica, como pasa en los mutantes *sdx1* de maíz, el *vte1* de *A. thaliana* o las plantas transgénicas de patata deficientes en la tocoferol ciclasa (Hofius et al. 2004). Estos descubrimientos en plantas deficientes en tocoferoles indican un papel del tocoferol en señalización, abriendo un nuevo abanico de preguntas que responder. ¿Cómo los tocoferoles afectan la expresión génica? ¿Qué mecanismos están detrás de esa regulación? A pesar que el ácido jasmónico juega un papel clave, ¿podría haber otras fitohormonas detrás de esta regulación?

Pero en las hojas no solamente hay α -tocoferol, sino que también se puede encontrar en concentraciones detectables el γ -tocoferol. Generalmente se considera que la acumulación de γ -tocoferol está asociada a su papel como precursor inmediato del α -tocoferol, pero algunos estudios sugieren papeles específicos para este homólogo. En *Xanthium strumarium* se sugirió que el γ -tocoferol podría estar relacionado con la inducción floral en dicha especie (Battle et al. 1977). Las hojas jóvenes de ayocote (*Phaseolus coccineus*) presentaban niveles muy elevados de γ -tocoferol que disminuyeron con el desarrollo de la hoja (Szymanska y Kruk 2008). Los autores sugirieron que esta disminución se debía a que el γ -tocoferol sustituía a otros antioxidantes lipofílicos ausentes en las hojas jóvenes más que a una disminución por el aumento de la síntesis de α -tocoferol, además de un papel protector en condiciones de

estrés hídrico y alta radiación sugerido por la acumulación preferente de γ -tocoferol quinona, un producto de degradación de éste. El mutante *vte4* de *A. thaliana*, que carece de α -tocoferol, mostraba un comportamiento similar a las plantas *wild type* bajo condiciones de estrés oxidativo impuesto por alta luz, altas temperaturas o tratamiento de frío (Bergmüller et al. 2003) sugiriendo que el γ -tocoferol puede ser tan eficiente como el α -tocoferol en respuestas al estrés. En mutantes de tabaco con la γ -TMT silenciada y bajo condiciones de estrés salino, el γ -tocoferol era incapaz de sustituir al α -tocoferol, aunque sí mejoraba la tolerancia de las plantas a la desecación (Abbasi et al. 2007). En sistemas animales se sabe que el óxido nítrico (NO) puede reaccionar con el γ -tocoferol pero no con el α -tocoferol, pudiendo estar implicado en la regulación de los niveles de NO (Cooney et al. 1993) mientras que en plantas de cebada con diferentes niveles de γ -tocoferol en semillas se observó una correlación inversa entre los niveles de γ -tocoferol y la elongación de la raíz (Desel y Krupinska 2005). Si tenemos en cuenta que el NO estimula la germinación y la elongación de la raíz, se puede especular que el γ -tocoferol puede modificar el desarrollo de la plántula controlando el contenido de NO en las semillas germinando. Todos estos estudios contribuyen a la idea de que el γ -tocoferol tiene funciones específicas y no sólo actúa como precursor en la ruta de síntesis del α -tocoferol, pero el mecanismo a través del cual lo hace, sus implicaciones a nivel de señalización celular o en otros modelos vegetales, no está claro. Por ejemplo, se ha estudiado en *A. thaliana*, como modelo de metabolismo C3, o en maíz, una C4, pero nada se sabe en plantas con metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM).

En otros tejidos, especialmente en semillas los tocoferoles están muchas veces acompañados por tocotrienoles. Los tocotrienoles se han relacionado con funciones importantes en la salud humana, reduciendo los niveles de colesterol en sangre (Song y DeBose-Boyd 2006) o en el tratamiento de diversos tipos de cáncer (Sun et al. 2009; Xu

et al. 2009), pero poco se sabe de su papel en plantas. El hecho que tengan una estructura muy similar a la de los tocoferoles ha hecho sugerir que podrían tener funciones antioxidantes similares (Munné-Bosch et al. 2011). Plantas transgénicas de tabaco que acumulan tocotrienoles son capaces de proteger los lípidos de membrana de las hojas de la peroxidación lipídica, de forma equivalente a cómo podría estar pasando en los tejidos que los acumulan de forma natural (Matringe et al. 2008).

1.2. Regulación de la biosíntesis de la vitamina E

Ruta de biosíntesis

Todos los tococromanoles provienen de la misma vía de síntesis (Soll y Schult 1979). El anillo aromático (ácido homogentísico, HGA) proviene de la vía del ácido siquímico (Norris et al. 1998), mientras que la cola hidrofóbica (PDP para los tocoferoles y GGDP para los tocotrienoles) deriva de la vía del metileritritol 4-fosfato (MEP) (Rohmer 2003). A nivel celular, la biosíntesis de los tococromanoles tiene lugar en los plastos (Sun et al. 2009) y hasta el momento no se ha comprobado que ningún homólogo pueda ser transportado a otras partes de la planta.

La primera reacción de la ruta de biosíntesis de los tococromanoles es la condensación del HGA con la cola hidrofóbica (PDP o GGDP) mediante la enzima homogentisato preniltransferasa (HPT) para dar 2-metil-6-fetilbenzoquinol (MPBQ) en el caso de los tocoferoles y 2-metil-6-geranilgeranil benzoquinol (MGGBQ) en el caso de los tocotrienoles. Aunque la ruta de biosíntesis es compartida por tocoferoles y tocotrienoles en la mayoría de especies, recientemente se descubrió una nueva enzima específica para tocotrienoles en monocotiledóneas, la homogentisato geranilgeranil transferasa o HGGT (Cahoon et al. 2003) que condensa el HGA con el GGDP. En especies que no tienen la enzima HGGT, dependiendo del sustrato que se una a la HPT y

de la especificidad de ésta, se determinará cuál de los dos grupos de compuestos será sintetizado en cada tejido. En *A. thaliana*, la enzima HPT es más activa con PDP, aunque también es capaz de utilizar el GGDP como sustrato (Sadre et al. 2006).

A continuación, tienen lugar 2 metilaciones y una ciclación, obteniendo el grupo cromanol (Porfirova et al. 2002). LA MPBQ metiltransferasa añade un grupo metilo al MPBQ obteniendo el 2,3-dimetil-5-fetilbenzoquinol (DMPBQ), seguida de la ciclación del anillo para dar el γ -tocoferol mediante la tocoferol ciclasa (TC). En el último paso, se añade un grupo metilo al anillo cromanol obteniendo el α -tocoferol, mediante la enzima γ -tocoferol metiltransferasa (γ -TMT) (Fig 1.2.1). En caso que la MPBQ metiltransferasa no añadiera el primer grupo metil, de la tocoferol ciclasa se obtendría el δ -tocoferol y a continuación el β -tocoferol (Shintani y DellaPenna 1998).

En la planta modelo *A. thaliana* las diferentes enzimas implicadas en la biosíntesis de los tocoferoles han sido identificadas y localizadas en el genoma nuclear. La primera enzima de la vía, la HPT, es codificada por el locus *VTE2* (AT2G18950) (Collakova y DellaPenna 2001); la MPBQ metiltransferasa por el locus *VTE3* (AT3G63410) (Cheng et al. 2003); la TC, por el locus *VTE1* (AT4G32770) (Porfirova et al. 2002) y la γ -TMT, por el locus *VTE4* (AT1G64970) (Koch et al. 2003).

A nivel celular, la biosíntesis tiene lugar en plastos, como los amiloplastos de semillas, los cloroplastos de tejidos fotosintéticos o los cromoplastos de frutas (revisado por Munné-Bosch y Alegre 2002). En concreto, en *A. thaliana*, las últimas enzimas de la vía como la TC y la γ -TMT se localizan en los plastoglóbulos y en las membranas cloroplásticas, respectivamente (Vidi et al. 2006; Zbierzak 2010).

La regulación de la síntesis de los tocoferoles es compleja. Aumentos de γ -tocoferol inhiben la síntesis del α -tocoferol (Arango y Heise 1998) pero otros factores,

como diferentes tipos de estrés, el estado de desarrollo o el balance hormonal pueden afectar los niveles de este antioxidante.

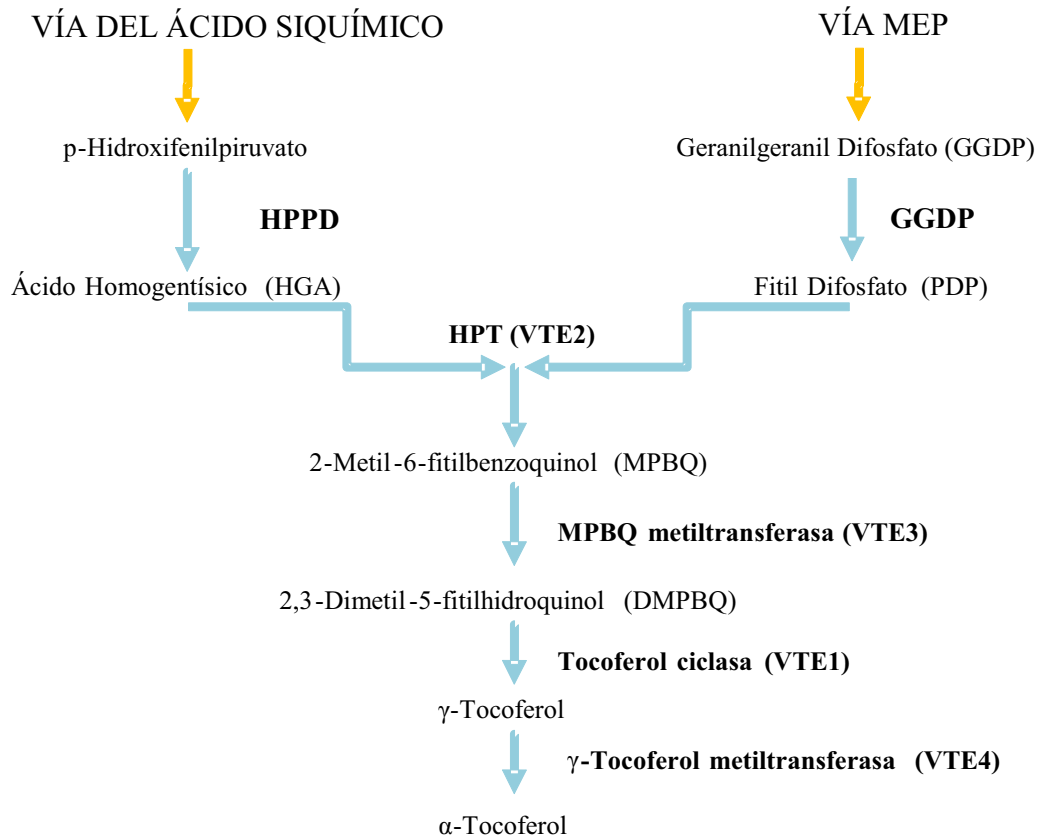


Figura 1.2.1. Resumen de la ruta de síntesis de α -tocoferol, con las principales enzimas implicadas y los genes que las codifican.

Regulación por estreses ambientales y hormonas

Las plantas son organismos sésiles y por lo tanto, pueden estar sometidas a diversas situaciones de estrés ambiental, como bajas temperaturas, salinidad, sequía, inundaciones, calor, estrés oxidativo o toxicidad por metales pesados. De hecho, el estrés abiótico es la principal causa de pérdidas en las cosechas a nivel mundial, provocando pérdidas en la mayoría de cultivos de más del 50%. El concepto de estrés implica una fuerza o condición desfavorable externa a la planta que inhibe el funcionamiento normal. La inmovilidad es la causa de que las plantas hayan adquirido y perfeccionado, a lo largo de millones de años de evolución, mecanismos de autodefensa que les permiten vivir en ambientes muy diversos, por lo que una condición que puede ser desfavorable para una especie, puede no serlo para otra. Los diferentes estreses inducen cambios en la expresión génica a la vez que participan en la generación de hormonas como el ácido abscísico (ABA), el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) o el etileno (revisado por Mahajan y Tuteja 2005).

De todos los recursos necesarios para las plantas, el agua es el más importante y limitante, siendo el componente mayoritario de éstas, ya que puede llegar a representar hasta el 90% del peso fresco. El déficit hídrico se da en plantas cuando la transpiración por las hojas es superior a la absorción de agua por las raíces. El estrés hídrico es un síndrome complejo, que altera de forma sustancial el metabolismo de la planta, disminuye el crecimiento y la fotosíntesis y afecta profundamente los ecosistemas y cultivos (revisado por Skirycz y Inzé 2010). Bajo condiciones de déficit hídrico, la disponibilidad de CO₂ disminuye debido al cierre estomático. Esto lleva a la acumulación de NADPH y ATP, porque el ciclo de Calvin no puede consumirlos llevando a la saturación del transporte fotosintético de electrones. Tanto el PSI como el PSII pueden llegar a transferir el exceso de energía al oxígeno (O₂). El PSII cedería el exceso de energía acumulado en

las $^3\text{Chl}^*$ directamente al O_2 originando $^1\text{O}_2$, mientras que el PSI lo haría a través de la reacción de Mehler y se generaría anión superóxido (O_2^-). A fin de hacer frente al aumento de la formación de ROS, los cloroplastos han desarrollado un conjunto de antioxidantes que son capaces de limitar sus efectos negativos en las células (revisado por Apel y Hirt 2004).

La salinidad de los suelos, especialmente debida a la presencia de NaCl, es otro de los principales factores de estrés abiótico que afecta la agricultura a nivel mundial. La salinización del suelo está reduciendo la superficie irrigada del mundo entre el 1 y el 2% al año, con mayor intensidad en las regiones áridas y semiáridas, y podría poner en peligro hasta el 10% de la cosecha mundial de cereales, según la FAO. Cuando las plantas crecen en suelos salinos, pueden padecer tres tipos de estreses diferentes, estrés hídrico impuesto por el bajo potencial osmótico externo, toxicidad provocada por los iones que se acumulan dentro de la planta y limitaciones nutricionales causadas por una disminución de la asimilación de nitratos, fosfatos, potasio, calcio y magnesio (Xu y Shi 2007). Pero la salinidad no sólo causa déficit hídrico fisiológico y toxicidad iónica, sino que también provoca reducciones en la fotosíntesis y producción de ROS, que pueden causar estrés oxidativo, y si el estrés persiste, un daño oxidativo que puede afectar diversas biomoléculas como los lípidos de membrana, las proteínas y los ácidos nucleicos (revisado por Zhu 2002).

La aclimatación de las plantas a los cambios en el ambiente requiere un nuevo estado de homeostasis celular conseguido por un delicado balance entre diferentes vías que residen en diferentes compartimentos celulares. Esta coordinación se puede ver alterada bajo condiciones de estrés hídrico o salino, especialmente cuando la planta se expone a una rápida disminución del potencial hídrico, o si están implicados otros parámetros ambientales. Si diferentes vías se desacoplan, los electrones se transfieren al

oxígeno molecular y forman las ROS. Pero éstas juegan un doble papel en las respuestas de las plantas al estrés abiótico funcionando, por un lado, como productos tóxicos para el metabolismo del estrés, pero también como importantes moléculas de transducción de señales (revisado por Garg y Manchanda 2009). En condiciones normales, pero especialmente en condiciones de estrés, las ROS son detoxificadas por un conjunto de antioxidantes enzimáticos, como la superóxido dismutasa, la ascorbato peroxidasa y la catalasa, entre otros, y antioxidantes no enzimáticos como el ácido ascórbico, el glutatión, los carotenoides y los tocoferoles (revisado por Miller et al. 2010). Los antioxidantes de bajo peso molecular como el glutatión, el ascorbato y los tocoferoles, pueden afectar la expresión génica asociada al estrés abiótico, alterando las respuestas de aclimatación. Como se ha descrito en el apartado 1.1, el α -tocoferol es un antioxidante lipídico que puede desactivar las ROS y proteger los lípidos de la oxidación (revisado por Wang y Quinn 2000). Diversos factores de estrés ambiental se asocian con un aumento de las ROS derivadas de la fotosíntesis y de los niveles de tocoferoles y otros antioxidantes relacionados con la tolerancia al estrés. Mientras que las plantas tolerantes al estrés normalmente aumentan los niveles de α -tocoferol, las más sensibles muestran una pérdida neta de tocoferol bajo condiciones de estrés, que conduce a daño oxidativo y muerte celular (revisado por Munné-Bosch 2005). El aumento de los niveles de tocoferol en condiciones de estrés se ha relacionado con aumentos en los niveles de expresión del gen *HPT* en *A. thaliana* en condiciones de alta luz, aunque los niveles de *TC* se mantuvieron estables (Collakova y DellaPenna 2003). En arroz, los niveles de expresión de la *TC* (*OsVTE1*) aumentaban en condiciones de salinidad, presencia de H_2O_2 , déficit hídrico, frío o la aplicación de fitohormonas como el ABA o el SA, pero no se vieron influidos por el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) o el agua destilada (ShouQiang et al. 2011). Las fitohormonas también juegan un papel protector como señal en respuesta al

estrés hídrico y salino, regulando el cierre estomático, la conductancia estomática o afectando procesos del desarrollo como la senescencia o la abscisión (revisado por Gaspar et al. 2003). En cambio, en plantas con metabolismo CAM, la producción de ROS está limitada debido a la concentración de CO₂ derivado del proceso de descarboxilación, evitando la sobre-excitación de la maquinaria fotosintética en condiciones de estrés hídrico (revisado por Griffiths 1989). Hasta la fecha, nada se sabe del papel del tocoferol ni de la regulación de su síntesis en condiciones de estrés en plantas con metabolismo CAM.

La síntesis del α -tocoferol está regulada durante la respuesta al estrés y parece ser que algunas hormonas como el ABA, el SA o el JA juegan un papel importante en esta regulación (Sandorf y Holländer-Czytco 2002; Munné-Bosch et al. 2009). Las hormonas actúan como mensajeros químicos en el control de procesos moleculares, bioquímicos y biológicos relacionados con el crecimiento y el desarrollo. Las plantas necesitan reajustar los procesos bioquímicos y biológicos internos para responder a los cambios ambientales, como la luz, el agua y la disponibilidad de nutrientes, sirviendo como elementos integradores del programa de desarrollo en respuesta a las señales ambientales.

El ABA es un de los reguladores clásicos del metabolismo, implicado en la adaptación de las plantas a diferentes tipos de estrés, como el déficit hídrico, la salinidad o las bajas temperaturas (revisado por Xiong et al. 2002). El principal mecanismo de acción del ABA es el cierre estomático en condiciones de estrés, ayudando a prevenir la pérdida de agua, pero además, regula la síntesis de diversas proteínas implicadas en la tolerancia al estrés, modulando los niveles de expresión de los genes de interés. Para ello, estos genes tienen elementos en *cis* en la zona promotora con secuencias conservadas e inducibles por ABA, como DRE, MYCRS/MYBRS, ABRE o NACRS y a las que se unen factores de transcripción específicos, como DREB, MYC/MYB, AREB/ABF, NAM,

ATAF1 y 2 o CUC respectivamente, implicando una compleja vía de señalización (revisado por Agarwal y Jha 2010). ¿Pero es el ABA quien regula la biosíntesis de tocoferol en condiciones de estrés? En plantas de *Cistus creticus* expuestas a déficit hídrico, se vió que la ruta de biosíntesis del ABA y del α -tocoferol se estimulaban simultáneamente en estas condiciones (Munné-Bosch et al. 2009). De forma equivalente, células en suspensión de *Eucalyptus gunnii* aumentaban los niveles de expresión del gen que codifica para la TC después de aplicarles ABA (El Kayal et al. 2006). Pero posiblemente la mejor prueba de que el ABA y el tocoferol están relacionados en condiciones de estrés, se obtuvo en arroz. Aunque las condiciones de estrés no afectaron los niveles de expresión de la TC, la HGGT ni la MPBQ, la HPT y la γ -TMT redujeron ligeramente los niveles de expresión, pero la *p*-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD), que regula el flujo de la vía y transforma el *p*-hidroxifenilpiruvato en HGA, aumentó los niveles de expresión en condiciones de déficit hídrico y frío respecto al control. Este aumento de los niveles de expresión de la *HPPD* llevó a los autores a examinar los elementos promotores de éste gen, encontrando un elemento ABRE de respuesta al ABA no sólo en éste sino también en la γ -TMT y la *MPBQ*, mientras en la *HPT* encontraron un motivo IIb, también relacionado con la respuesta al ABA (Chaudhary y Khurana 2009). A pesar de ésto, todavía quedan muchas incógnitas en la relación entre el ABA y el tocoferol, tanto en otros modelos como en el mecanismo concreto de acción.

De entre todas las fitohormonas relacionadas con el estrés, el etileno juega un papel muy importante en la adaptación de las plantas a los estreses ambientales (revisado por Morgan y Drew 1997; Bleecker y Kende 2000). La sencillez de su estructura le permite ser un gas a temperatura y presión ambiental difundiendo libremente hacia el exterior o a través de las membranas, comunicando de forma rápida las células diana, ya estén en el mismo tejido o sean plantas cercanas, a través de la comunicación planta-

planta (Pierik et al. 2004). Pero poco se sabe de la relación entre el etileno y el tocoferol. Al tratar flores cortadas de clavel (*Dianthus caryophyllus*) con etileno, los niveles de ROS aumentaron, mientras los niveles de α -tocoferol y glutatión disminuyeron (Bartoli et al. 1996). Al exponer plantas de encina (*Quercus ilex*) a altas temperaturas o a déficit hídrico los niveles de α -tocoferol aumentaron, al igual que se ha descrito en otras muchas especies. Sin embargo, cuando estas plantas se exponían a concentraciones de etileno elevadas, como las que se pueden encontrar en zonas contaminadas, se observaron síntomas de estrés oxidativo, además de un descenso en los niveles de α -tocoferol (Munné-Bosch et al. 2004). A nivel de regulación de la expresión génica, no se sabe mucho más. Los niveles de la enzima HPPD están regulados por etileno, además de JA, herbicidas y H₂O₂ en cebada (Falk et al. 2002). Los niveles de expresión de la misma enzima eran rápidamente inducidos por etileno durante la maduración de mango, y éste aumento fue seguido de un aumento en los niveles del antioxidante (Singh et al. 2011). De forma más indirecta, se analizaron en sésamo los niveles de expresión de la geranylgeranyl reductasa, enzima localizada en los plastos y que cataliza la reducción del GGDP a PDP, una molécula necesaria para la síntesis tanto de tocoferoles como de clorofilas. Se vió que los niveles de expresión disminuían por la acción del etileno, la oscuridad y el ABA, aunque en este estudio no se analizaron los niveles de tocoferol, no sabiendo si esta regulación génica tenía efectos sobre ellos (Park et al. 2010).

El JA es una molécula implicada en señalización derivada del ácido linolénico y que forma parte del grupo de las oxilipinas. Juega un papel clave en señalización activando genes implicados en las respuestas de defensa contra estreses abióticos como la sequía, la radiación ultravioleta y el ozono, así como frente al estrés biótico, tanto frente a infestaciones por insectos como a patógenos microbianos (revisado por Avanci et al. 2010). Se ha sugerido que los niveles de JA están regulados por α -tocoferol (Munné-

Bosch et al. 2007). El hecho que el tocoferol controle los niveles de ROS en el cloroplasto, el grado de peroxidación lipídica y en consecuencia los niveles de hidroperóxidos en los cloroplastos, hace que también pudiera regular los niveles de JA en hojas de forma indirecta, y pudiendo afectar a su vez de forma indirecta los niveles de expresión en el núcleo a través de esta fitohormona. El mutante *vte2* exhibe numerosos defectos de desarrollo durante la germinación, mientras que las plantas *wild type* y el mutante *vte1*, el cual acumula DMPBQ (precursor de la síntesis de tocoferoles), tuvieron un desarrollo normal. Este fenotipo aberrante fue debido a aumentos de los niveles de hidroperóxidos lipídicos y ácidos grasos hidroxilados en comparación con las plantas *wild type*, mostrando un papel esencial de los tocoferoles limitando la oxidación lipídica no enzimática desde la formación de la semilla hasta el desarrollo de las plántulas (Sattler et al. 2004; 2006). En concreto, los hidroperóxidos lipídicos, provenientes de la peroxidación lipídica se pueden convertir en diversos productos, uno de ellos el JA a través de la acción enzimática de diversas enzimas (revisado por Schaller 2001). El JA también es capaz de regular los niveles de tocoferol. Se vió que los niveles de expresión de la enzima HPPD se regulan por JA y etileno, además de H₂O₂ o herbicidas en cebada (Falk et al. 2002). La enzima tirosina aminotransferasa (TAT) inducible por coronatina, que cataliza la transaminación de la tirosina a *p*-hidroxifenilpiruvato y es una de las primeras enzimas de la vía de síntesis de los tocoferoles, también podía ser inducida por ácido metiljasmónico (MeJA) además de por diversos estreses (Sandorf y Holländer-Czytko 2002).

Otra hormona con un papel importante frente al estrés es el ácido salicílico (SA). Aunque juega un papel de vital importancia frente al estrés biótico, también es importante en la respuesta al estrés abiótico, como el hídrico o el salino, potenciando la respuesta al estrés en plántulas de *Arabidopsis* en condiciones de estrés salino y osmótico (Borsani et

al. 2001). También se ha visto que plantas de judías (*Phaseolus vulgaris*) y tomate (*Lycopersicon esculentum*) germinadas a partir de semillas imbibidas con SA mostraban una mayor tolerancia a diferentes tipos de estrés (Senaratna et al. 2000). Mutantes de *A. thaliana* deficientes en SA tenían niveles más elevados de α - y γ -tocoferol en semillas que las plantas control (Abreu y Munné-Bosch 2009). En *Ctenanthe setosa*, plantas expuestas a largos períodos de sequía a las que se les aplicaba un tratamiento exógeno de SA aumentaban los niveles de α -tocoferol, además de otros antioxidantes como el ascorbato y el glutatión, así como las actividades de enzimas antioxidantes, como la catalasa, la superóxido dismutasa y otras, y disminuía la peroxidación lipídica respecto las plantas control (Kadioglu et al. 2011). También se observó una fuerte correlación entre SA y α -tocoferol en plantas de *Phillyrea angustifolia* en condiciones de déficit hídrico, sugiriendo una posible relación entre ambos compuestos (Munné-Bosch y Peñuelas 2003). Los mutantes *NahG*, deficientes en SA, mostraron niveles más bajos de α -tocoferol en comparación con las plantas *wild type*, tanto en condiciones de déficit hídrico como en condiciones control (Munné-Bosch et al. 2007). En plantas de encina (*Quercus ilex*) sometidas a altas temperaturas, los niveles de α -tocoferol aumentaban, en cambio, si además se trataban con MeSA, los niveles no sólo no aumentaban, sino que incluso disminuían a partir de temperaturas superiores a los 40°C (Llusià et al. 2005).

Efectos de la edad de la hoja

Los niveles de tocoferol en las hojas también están regulados por el estado de desarrollo de la misma. Durante el desarrollo foliar, los niveles de α -tocoferol de las hojas viejas son más altos que el de las hojas jóvenes en numerosas especies. Finalmente, este aumento se para y los niveles empiezan a disminuir en hojas muy senescentes. A

principios de los años noventa, se observó que los niveles de α -tocoferol aumentaban en relación a la edad de la hoja en *X. strumarium*, mientras que los niveles de γ -tocoferol eran más altos en las hojas jóvenes en relación a las hojas viejas (Molina-Torres y Martínez 1991). En soja (*Glycine max*), judía (*Phaseolus vulgaris*) (Tramontano et al. 1992) y en diversos cultivos forrajeros (Tramontano et al. 1993) también se observó un aumento de los niveles de α -tocoferol asociados a la edad de la hoja, de forma similar a lo que se encontró durante una prospección en 28 especies del género *Picea* (Franzen et al. 1991). En ésta, proponían que los niveles de α -tocoferol podrían ser utilizados como un indicador de la resistencia al estrés, e indirectamente, del estado de salud del árbol. Los niveles de α - y γ -tocoferol se analizaron en hojas de diferentes edades de haya (*Fagus sylvatica*), además del contenido de pigmentos, y sometidas a diferentes intensidades de luz para estudiar el papel de estos componentes durante el desarrollo y a la vez, para usarlos en el diagnóstico del estado de salud de esa especie (García-Plazaola y Becerril 2011). Ambos homólogos aumentaron durante el desarrollo de la hoja, aunque finalmente no resultaron un buen marcador del estado de salud, decantándose los autores por los niveles de clorofilas. En otros modelos de estudio, como las plantas mediterráneas, este patrón de aumento asociado al estado de desarrollo y posterior disminución en etapas tardías de la senescencia también se repite, como en *Pistacia lentiscus* (Munné-Bosch y Peñuelas 2003). El inicial aumento de los niveles de α -tocoferol se explica como un mecanismo fotoprotector para evitar la degradación de la proteína D1 por la acción del oxígeno singlete (Trebst et al. 2002) así como para evitar la propagación de la peroxidación lipídica. En cambio, en este estudio, en etapas finales de la senescencia, aumentó el estrés oxidativo y el daño fotoinhibidor del aparato fotosintético, por lo que se especuló que la disminución del α -tocoferol podía disparar la degradación de la proteína D1, permitiendo el desensamblaje del PSII juntamente con una propagación de la

peroxidación lipídica, que facilitaría a su vez el desensamblaje de las membranas fotosintéticas durante las últimas etapas de removilización de nutrientes en las hojas senescentes (Munné-Bosch y Peñuelas 2003). El aumento de los niveles de α -tocoferol asociado a la edad foliar ha planteado una cuestión de gran interés desde el punto de vista de alimentación humana. La gran controversia actual sobre el uso de plantas modificadas genéticamente y las grandes restricciones que tienen para el uso comercial llevó a mejorar los niveles de esta vitamina, esencial en la dieta humana, manipulando el tiempo de recolección (hojas de diferentes edades) y las condiciones de crecimiento de diferentes especies de interés comercial, como la lechuga, las espinacas, el maíz, el pepino o el pimiento sin alterarlas a nivel génico (Lizarazo et al. 2010).

¿Qué importancia tiene el γ -tocoferol durante el desarrollo foliar? El papel del γ -tocoferol no está del todo claro. Dependiendo de la especie, los niveles aumentan o disminuyen con la edad. En *X. strumarium* y *P. coccineus* los niveles eran más altos en hojas jóvenes (Molina-Torres y Martínez 1991; Szymanska y Kruk 2008, respectivamente), mientras en hayas (*F. sylvatica*) aumentaron con la edad (García-Plazaola y Becerril 2011). Aunque la disminución de los niveles de γ -tocoferol se podría asociar a una activación de la vía de síntesis para el aumento de α -tocoferol, Szymanska y Kruk (2008) proponen funciones específicas para el γ -tocoferol en hojas jóvenes (ver apartado 1.1).

A nivel genético el aumento de tocoferol en hojas senescentes se relaciona con el mantenimiento de las membranas fotosintéticas durante la removilización de nutrientes en los gerontoplastos y se ha relacionado a nivel molecular con aumentos de la expresión de HPPD en cebada (revisado por Chrost et al. 1999) y durante la maduración de frutos de tomate (Singh et al. 2011). La inactivación de *HPT* en plantas de tabaco, las cuales tenían reducciones en los niveles de tocoferoles, mostraron una aceleración de la senescencia en

las hojas viejas (Abbasi et al. 2009). Además, las fitohormonas, especialmente el ABA y el etileno juegan un papel esencial en la regulación de la senescencia, siendo el ABA un importante inductor en condiciones de déficit hídrico. Los niveles de ABA aumentan durante la senescencia al mismo tiempo que los genes que codifican para las enzimas claves de su biosíntesis. Además, las aplicaciones exógenas de ABA inducen la expresión de diversos genes asociados a la senescencia (SAGs) (revisado por Lim et al. 2007). El etileno también es importante en la regulación de la senescencia, pero no en todas las especies. Las hojas del mutante *etr1-1* de *A. thaliana*, en las que el receptor es incapaz de unirse al etileno, viven más tiempo que las de la planta control porque la senescencia empieza más tarde, a pesar que progresa a la misma velocidad que en las plantas *wild type*. Otros mutantes relacionados con el etileno muestran disparidad en el papel que este desempeña durante la senescencia, mientras *ein2* se comporta de forma similar a *etr1-1*, *ctr1* y un mutante sobreproductor de etileno en tomate no muestran este retraso (revisado por Gan 2010).

¿Qué relación hay entre el tocoferol, las fitohormonas y la edad foliar? ¿El γ -tocoferol tiene un papel específico, o sólo actúa como precursor del α -tocoferol? Aunque el aumento de los niveles de tocoferol durante el desarrollo de la hoja no senescente está bien descrito en la bibliografía, no se ha estudiado el papel que juega el estrés abiótico (como el déficit hídrico o la salinidad) en la regulación de la biosíntesis de tocoferol o la implicación de fitohormonas, especialmente en cuanto a regulación de la expresión génica se refiere. Todavía hay muchas preguntas que resolver en la relación tocoferol-desarrollo foliar-fitohormonas.

1.3. Vitamina E en señalización retrograda

Los cloroplastos son orgánulos celulares derivados de un proceso de endosimbiosis (Martin et al. 2002). Se estima que en los cloroplastos se pueden encontrar entre 2000 y 3500 proteínas (Van Wijk y Baginsky 2011), de las cuales sólo 100-120 están codificadas por el genoma plastidial (revisado por Sugiura 1992), el resto se encuentran codificadas en el núcleo y deben ser importadas al cloroplasto. Este hecho requiere un elevado grado de coordinación entre ambos orgánulos a través del intercambio de información. Este intercambio de información se conoce como señalización anterógrada, cuando es del núcleo al orgánulo y señalización retrograda cuando va del cloroplasto al núcleo transmitiendo información del estado funcional y de desarrollo de los orgánulos (revisado por Pfannschmidt 2003). El núcleo, que posee las secuencias codificantes de numerosas proteínas necesarias para la fotosíntesis y otras actividades del cloroplasto, debe regular sus niveles de expresión y de síntesis y el cloroplasto, a su vez, debe “comunicar” al núcleo su estado y las necesidades de las diferentes proteínas, a través de cambios del estado redox de los componentes de la maquinaria fotosintética, que actuarían como señal coordinadora. El aparato fotosintético de los cloroplastos está codificado por genes que se encuentran en ambos orgánulos, por lo que su expresión debe estar altamente regulada, siendo la luz uno de los más importantes. Las reacciones de la fotosíntesis son un sistema de percepción muy eficaz de los cambios ambientales, ya que el estado redox de los componentes del transporte fotosintético de electrones, los aceptores finales de electrones o las ROS pueden actuar de forma más o menos directa como moléculas señal (revisado por Pfannschmidt 2003). Si tenemos en cuenta que las ROS que se generan bajo condiciones de estrés oxidativo pueden contribuir a la señalización celular (Ryter y Tyrrell 1998; Gamaley y Klyubin 1999; Desikan et al. 2000) y el α -tocoferol es un potente antioxidante que regula los

niveles de ROS en el cloroplasto, se puede hipotetizar que en consecuencia también puede tener un papel en señalización. A pesar de esto, poco se sabe de la implicación del tocoferol en la compleja red de comunicación cloroplasto-núcleo, ya sea de forma directa o indirecta, y en el caso de hacerlo, ¿qué mecanismo utiliza? Hasta el momento no se ha descrito ningún mecanismo por el cual el tocoferol pueda abandonar el cloroplasto, por lo que una regulación directa parece poco probable. ¿Qué genes estaría regulando de los aproximadamente 25.000 que contiene el genoma de *A. thaliana*? Para responder a esta pregunta, se hipotetizó que en condiciones de estrés abiótico (hídrico o salino) que provocan un aumento de los niveles de tocoferol, y en el caso de que la premisa que el tocoferol interviene en señalización fuera cierta, provocaría cambios en los patrones de expresión. Además, se eligió el etileno como posible diana de la señalización a través del tocoferol porque interviene en la respuesta al estrés. A pesar que el ABA también juega un papel esencial en los mecanismos de defensa contra el estrés, recientemente se han descrito elementos de respuesta al ABA en genes claves de la biosíntesis de tocoferol en arroz (Chaudhary y Khurana 2009). Por lo que el estudio del papel del tocoferol es señalización celular en relación al etileno era la más novedosa.

Genes implicados en la biosíntesis, percepción y señalización del etileno

Las hormonas actúan como mensajeros químicos en el control de procesos moleculares, bioquímicos y biológicos relacionados con el crecimiento y el desarrollo. Las plantas, al ser organismos sésiles, necesitan reajustar los procesos bioquímicos y biológicos internos para responder a los cambios ambientales, como la luz, el agua y la disponibilidad de nutrientes, sirviendo como elementos integradores del programa de desarrollo en respuesta a las señales ambientales. Entre los 5 grupos de hormonas clásicas, el etileno se distingue por su estructura simple hidrocarbonada (C₂H₄) y su

naturaleza gaseosa a temperatura y presión ambientales, que le confieren unas características especiales. Por un lado, la capacidad de difundir libremente por los espacios intercelulares y coordinar una respuesta rápida y uniforme en los tejidos, y por otro, la posibilidad de modificar su concentración interna simplemente regulando su velocidad de síntesis, sin necesidad de un metabolismo adicional para reducir la concentración de hormona libre, ya que ésta puede difundir libremente hacia el exterior. Ya hace más de un siglo que el etileno se reconoció por primera vez como un regulador del crecimiento vegetal, viéndose que este gas provocaba en plántulas etioladas de guisante la conocida como *triple respuesta*, que se caracteriza por la reducción de la elongación, el engrosamiento del hipocótilo y el cambio en la orientación del desarrollo (Neljubov 1901). Desde entonces, se han estudiado extensamente sus funciones; el etileno regula numerosos procesos en plantas, incluyendo germinación, crecimiento, maduración de frutos climatéricos, respuestas a estrés, tanto biótico como abiótico y senescencia, así como la biosíntesis y los mecanismos que controlan sus respuestas, como la percepción y los mecanismos de transducción de señales (revisado por Lin et al. 2009).

La biosíntesis de etileno fue propuesta por primera vez a finales de los años 70 (Fig 1.3.1) (Adams y Yang 1979). Empieza con la conversión de la metionina en S-adenosilmetionina (AdoMet) mediante la AdoMet sintetasa. El AdoMet se convierte en ACC mediante la ACC sintasa (ACS), siendo este el paso limitante en la biosíntesis de etileno. A continuación, la ACC oxidasa (ACO) convierte el ACC en etileno, liberando CO₂ y ácido cianhídrico, que posteriormente se detoxifica. Tanto la ACS como la ACO están codificadas por una familia multigénica en todas las especies, y sus patrones de expresión son complejos debido a la regulación génica diferencial. A pesar de que la vía de síntesis del etileno ha sido extensamente estudiada, los mecanismos moleculares de regulación aún no están totalmente claros (revisado por Lin et al. 2009). En algunos

casos, la síntesis de etileno se correlaciona con un aumento de los niveles de transcripción de *ACS*, pero estudios recientes sugieren mecanismos postranscripcionales para controlar rápidamente su síntesis. Como mecanismo de regulación postranscripcional se ha sugerido la regulación de la vida media de la ACS, que varía entre 20 minutos y 2 horas, identificándose mutantes que tienen alterada su biosíntesis, como el sobreproductor de etileno *eto*, que tiene una elevada síntesis y una respuesta constitutiva en plántulas etioladas (revisado por Wang y Quinn 2000). En estudios de la tasa de renovación de proteínas se ha visto que en plántulas de *eto1* la ACS5 tiene una vida mucho más larga que en plántulas *wild type*. La proteína ETO1 en condiciones normales actúa como un adaptador específico de sustrato para la ACS5, y posiblemente para otras isoformas, como marca para la degradación mediante el proteosoma 26S, el cual suele estar relacionado con la degradación de proteínas de rápida tasa de renovación (revisado por Chae y Kieber 2005).

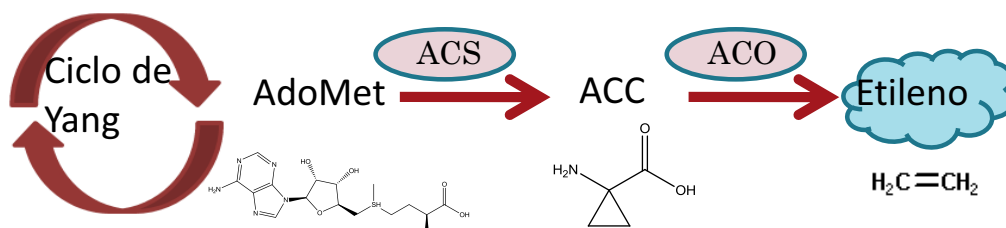


Figura 1.3.1. Ruta de biosíntesis del etileno.

La percepción del etileno se lleva a cabo por una pequeña familia de receptores, que en *A. thaliana* consta de 5 miembros, clasificados en dos subfamilias, la de tipo I con ETR1 y ERS1, con tres dominios hidrofóbicos transmembrana en el extremo amino-terminal y un dominio histidina quinasa con similitud a una histidina quinasa de dos componentes bacterianos bien conservado. El tipo II está formado por ETR2, EIN4 y ERS2, que tienen cuatro dominios hidrofóbicos trans-membrana y un dominio histidina quinasa menos conservado (Fig 1.3.2) (Chang et al. 1993; Hua et al. 1998; O'Malley et al.

2005). Todos los receptores muestran el mayor grado de homología en el dominio amino-terminal, de acuerdo con la habilidad de unirse al etileno con una afinidad similar, siendo capaces las dos subfamilias de ser sensibles al etileno y encontrándose todos anclados a la membrana del retículo endoplasmático formando homodímeros, ya que la solubilidad del etileno en ambientes acuosos y lipídicos permite que los receptores sean fácil y rápidamente accesibles al etileno, sin necesidad de un mecanismo de transporte activo (Chen et al. 2002). Los receptores son reguladores negativos de la vía de respuesta, es decir, en ausencia de la hormona, los receptores reprimen activamente los componentes que se encuentran más abajo en la vía de señalización e inhiben la respuesta. En presencia de la hormona y de iones de cobre, ésta se une a los 5 receptores, haciendo que estos se inactiven y liberando la vía de su represión (Fig 1.3.3) (Hua y Meyerowitz 1998).

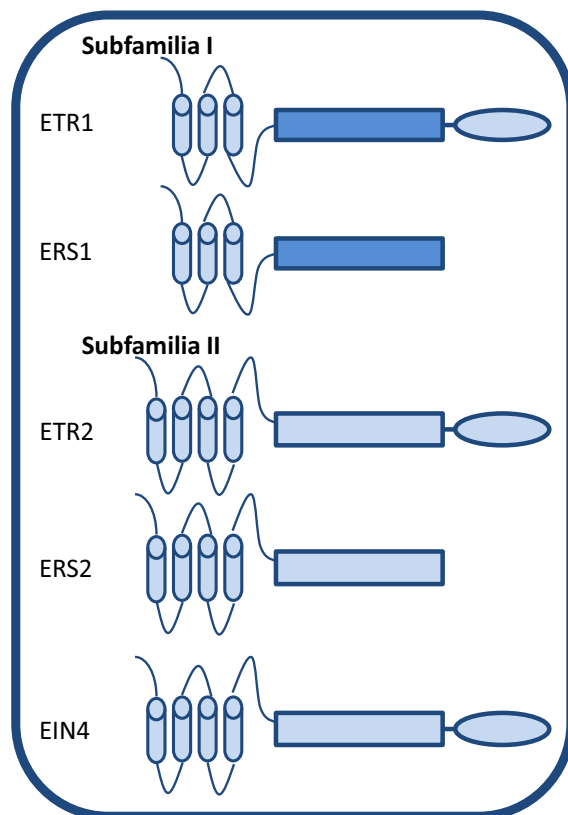


Figura 1.3.2. Esquema de la estructura de los 5 receptores de etileno, clasificados en dos subfamilias, la de tipo I con ETR1 y ERS1, con tres dominios hidrofóbicos transmembrana y un dominio histidina quinasa con similitud a una histidina quinasa de dos componentes bacterianos bien conservado. El tipo II está formado por ETR2, EIN4 y ERS2, que tienen cuatro dominios hidrofóbicos transmembrana y un dominio histidina quinasa menos conservado.

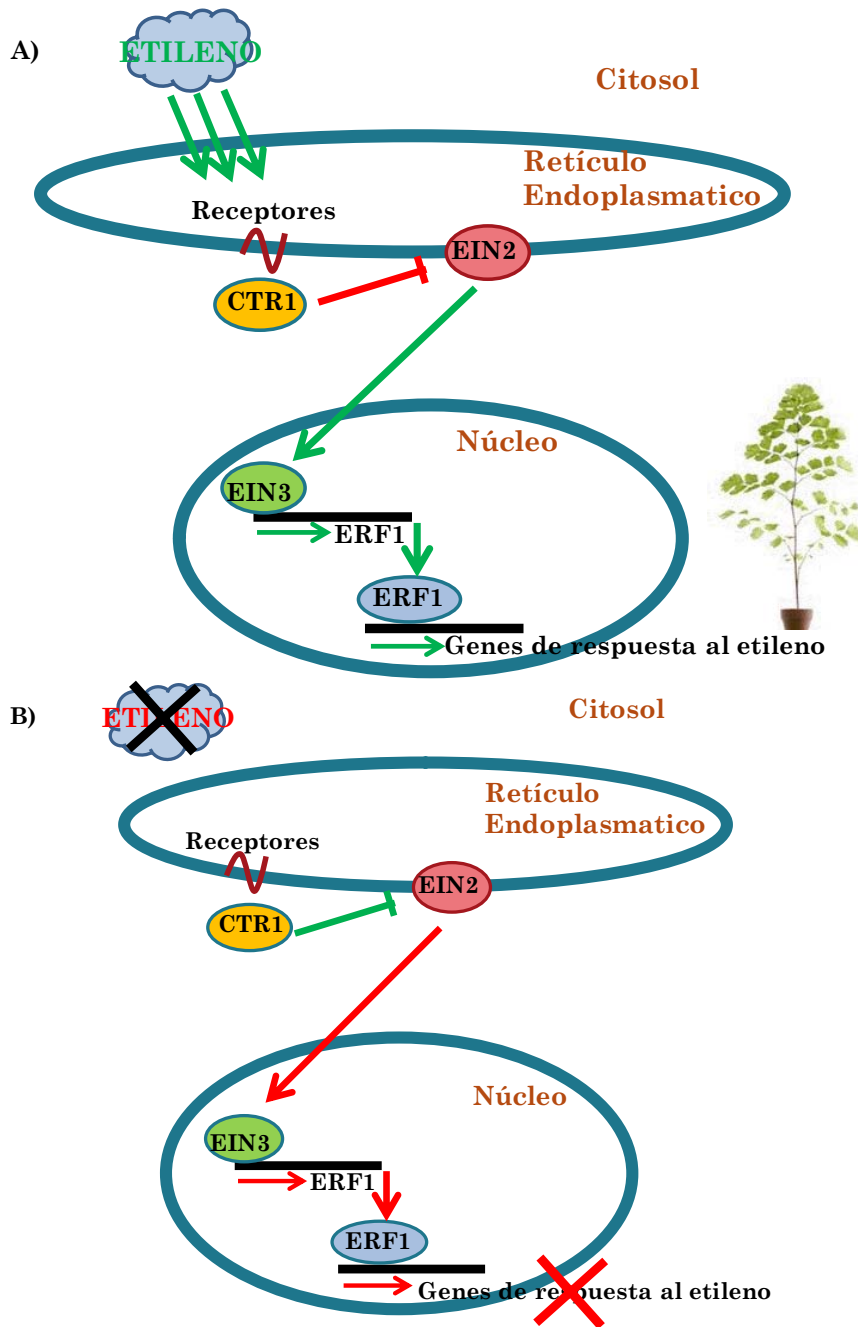


Figura 1.3.3. Representación esquemática de la acción del etileno, en presencia (A) y ausencia (B) de la hormona, como modelo de regulación negativa. En el primer caso, en presencia de etileno, los receptores inactivan CTR1, pero esto activa el resto de la vía y se expresan los genes de respuesta al etileno. En el segundo caso, la falta de etileno hace que los receptores estén activados y activan CTR1 y a la vez, el resto de la vía queda inactivada y los genes de respuesta no se expresan.

El primer componente en la vía de señalización es CTR1, que codifica para una quinasa de serina/treonina tipo Raf con similitud a MAPKKK, por lo que se ha sugerido una señalización en cascada tipo MAP-quinasa. CTR1 actúa a continuación de los receptores, interactuando físicamente con ellos y formando un complejo localizado en el retículo endoplasmático que reprime activamente la respuesta del etileno (Kieber et al. 1993). A continuación del complejo receptor/CTR1 hay un regulador positivo de la vía, EIN2, que es necesario para todas las respuestas al etileno estudiadas y es el paso crítico en la transducción de señales. EIN2 tiene un dominio amino-terminal con doce pasos trans-membrana y parecido a un transportador de iones metálicos, y un dominio carboxi-terminal implicado en las interacciones proteína-proteína (Alonso et al. 1999). Actuando a continuación de EIN2 encontramos EIN3, proteína localizada en el núcleo y que pertenece a una pequeña familia que en *Arabidopsis* también incluye las proteínas EIL, y que actúa como un regulador transcripcional en la respuesta al etileno (Chao et al. 1997). La vía de señalización del etileno también utiliza el proteosoma SCF/26S para regular los niveles de, al menos, uno de sus componentes, EIN3, habiendo proteínas que se unen y marcan el EIN3 producido de forma constitutiva para ser degradado en ausencia de la hormona. A continuación de EIN3 y EIL encontramos ERF1, el cual es responsable de la regulación de diversos genes de respuesta al etileno, siendo necesario para las respuestas de defensa relacionadas con el JA, interactuando de forma sinérgica el etileno y el JA para conseguir niveles máximos de expresión de *ERF1* (Lorenzo et al. 2003), representando este factor de transcripción un elemento crítico en la interacción de ambas hormonas. A nivel de planta entera, los cambios coordinados en los niveles de expresión de los diferentes grupos de genes de respuesta conducen a disparar los diferentes mecanismos fisiológicos de respuesta relacionados con esta hormona. Por eso resultaría interesante estudiar el papel del tocoferol en la regulación de la expresión de genes

relacionados con el etileno, para comprobar el posible papel que juega este antioxidante en la señalización celular y no únicamente como mecanismo fotoprotector.

1.4. Elección del modelo experimental.

Aptenia cordifolia (Fig 1.4.1) es una planta suculenta con metabolismo CAM y perteneciente a la familia Aizoaceae. Es originaria de Sudáfrica y muy resistente a la sequía. En nuestro territorio está catalogada como especie con potencial invasor (BOE, 2011) debido a que por su rápido crecimiento y a la formación de una alfombra densa sobre el terreno es utilizada habitualmente en jardinería para cubrir muros o rocallas. Esta característica la hace especialmente agresiva con las especies autóctonas ya que debido al hecho que forma densas alfombras no permite el crecimiento de otras especies vegetales, con el efecto que esto tiene en la biodiversidad de la zona afectada, incluso en la fauna. Los tallos pueden alcanzar los 60 centímetros de largo y las hojas, de color verde brillante, suculentas y en forma de corazón, los 3 centímetros.



Figura 1.4.1. Fotografía de una *Aptenia cordifolia* usada durante los experimentos.

Si unimos el rápido crecimiento, la abundancia de hojas, y su resistencia a la sequía, la convierten en un buen modelo para estudiar los mecanismos de respuesta frente al estrés. Al tratarse de una especie invasora en todo el mundo, los mecanismos de respuesta y adaptación al estrés serán de gran valor para la comunidad científica y pueden ayudar a controlar la distribución de las poblaciones no autóctonas. El hecho de que sea una planta con metabolismo CAM y de crecimiento rápido, permite estudiar el papel de los tocoferoles en respuesta al estrés y la regulación de su biosíntesis en un grupo de plantas del que hasta el momento no se sabía nada y que a la vez podrían ser la clave de la resistencia y la fotoprotección. La limitación de esta especie como modelo es la falta de conocimiento a nivel molecular. El hecho que el genoma no esté secuenciado limita el análisis de niveles de expresión y a la vez, la ausencia de mutantes o transgénicos comerciales dificulta el profundizar en aspectos muy concretos.

Arabidopsis thaliana es una pequeña herbácea con un ciclo de vida muy corto (3 meses, aproximadamente). Actualmente se usa como planta modelo en numerosas ramas de la fisiología vegetal por las ventajas que presenta. El ciclo de vida corto permite obtener nuevas generaciones y completar un experimento en menos de tres meses, además de ser una planta que se puede obtener con bastante facilidad a partir de semillas (Fig 1.4.2), en muchas ocasiones compradas o intercambiadas con otros grupos de investigadores. El hecho de que sea una herbácea de tamaño reducido facilita el cultivo y permite optimizar el espacio (Fig 1.4.3).

The top 10 ways to kill arabidopsisby accident (honest gov)



Occasionally, people write into NASC (arabidopsis.info) complaining that they have problems with seed germination. Whilst we always take this very seriously and perform germination tests in-house, we do tend to find that many problems are due to 'operator-error'.

Here are our personal favourite top 10 reasons why you may be killing the seeds you love. We hope that this article can save the lives of innocent seeds everywhere. (Position 11 is dedicated to those users who receive empty tubes and complain about missing seed ...when they order DNA stocks !)

Graphics - Nicola Leftley, concept and text - Sean May, NASC Jan 2006.

10. Gasping ! - If your mutant needs supplements (e.g. vitamins, amino acids) - have you forgotten to add them ?

9. Too hot ! - Arabidopsis is not a tropical plant (< 30°C).

8. Has it germinated already and been eaten ? Use intercept or other pest control to kill those worms and grubs.

7. Mould alert ! - don't store your seeds in a damp dark place - keep out of the fridge !

6. Drowning ? Arabidopsis is not sub aquatic - it likes to breathe and doesn't get on very well with algae !

5. HOW long have you had the seed out of storage ?!

4. You didn't wait for the seed to mature on the plant did you ? If it's green, it's not ready.

..for those that sterilise for tissue culture:

3. Bleach sensibly - if you forget to time it properly, you can forget germination.

2. Use alcohol in moderation.

..and our favourite...

1. Don't bury your seed ! - they're only little plants and will never find the surface if you dig a hole and throw them in !!!

Figura 1.4.2. Consejos para cultivar semillas de *A. thaliana* proporcionados con la compra de semillas en el NASC (The Nottingham Arabidopsis Stock Centre).

La comunidad científica la adoptó como planta modelo, especialmente en la rama de la genética, porque tiene un genoma pequeño (5 cromosomas y unas 125 Mb en total) permitiendo tenerlo secuenciado desde el año 2000. También se dispone de mutantes y transgénicos comerciales gracias a que se puede transformar de forma eficiente con *Agrobacterium tumefaciens*, siendo esta característica de gran utilidad a la hora de estudiar el papel de un compuesto en diferentes momentos del desarrollo, bajo diferentes condiciones ambientales.



Figura 1.4.3. Fotografía de una cámara de ambiente controlado donde se llevan a cabo experimentos con *A. thaliana* en los Campos Experimentales de la Facultad de Biología, Universidad de Barcelona.

2. OBJETIVOS

2. Objetivos

Objetivo principal

Estudiar la regulación de la biosíntesis de α - y γ -tocoferol en condiciones de estrés abiótico (déficit hídrico y estrés salino), así como su posible implicación en señalización celular

Objetivos específicos

- Estudiar los efectos del déficit hídrico y la salinidad sobre el tocoferol en relación a otros mecanismos de fotoprotección y los niveles hormonales en la planta CAM, *A. cordifolia*

- Estudiar la regulación de la biosíntesis de tocoferol en condiciones de déficit hídrico, estrés salino o en relación a la edad de la hoja

- Examinar los efectos de alterar la señalización, percepción y producción de etileno sobre los niveles de tocoferol bajo condiciones de estrés hídrico en la planta modelo *A. thaliana*

- Estudiar la posible implicación de los tocoferoles en señalización celular sobre los niveles de expresión de los genes implicados en la biosíntesis, percepción y señalización del etileno en condiciones de estrés hídrico y salino, y en relación a la edad de la hoja

- Investigar el mecanismo mediante el cual el tocoferol, localizado en el cloroplasto, podría intervenir como señal de comunicación cloroplasto-núcleo

3. INFORME DEL DIRECTOR



Barcelona, 3 de abril de 2012

El Dr. Sergi Munné Bosch, como director de la Tesis Doctoral titulada “**Regulación de la biosíntesis de la vitamina E y su función en señalización celular en condiciones de estrés abiótico**” presentada por la doctoranda Jana Cela Udaondo,

INFORMA sobre el factor de impacto y la participación de la doctoranda en cada uno de los artículos incluidos en la memoria de esta Tesis Doctoral

Capítulo 1. Artículo “**Ethylene signaling may be involved in the regulation of tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis thaliana***”, publicado en la revista *FEBS Letters*, índice de impacto (2010) de 3.601. En este primer trabajo se describe la importancia de la señalización de etileno, y muy particularmente de EIN3, en la biosíntesis de tocoferol en plantas de *A. thaliana* sometidas a déficit hídrico. Este es el primer estudio en que se demuestra la importancia de la señalización de etileno en la biosíntesis de tocoferol. Se describe por primera vez que esta importante hormona relacionada con procesos de estrés influye sobre los niveles de tocoferol en plantas, tanto en plantas sometidas a estrés como en el envejecimiento de las hojas. La doctoranda ha realizado todo el muestreo, el análisis de las muestras, el tratamiento estadístico y la elaboración de los resultados, y además ha participado en el diseño experimental y discusión de los resultados, constandingo por tanto como primera autora del trabajo. La doctoranda ha demostrado una gran capacidad de trabajo, así como un excelente manejo de las principales medidas de marcadores de estrés y del HPLC para el análisis de tocoferoles. Demuestra asimismo una gran capacidad de análisis e interpretación de los resultados.

Capítulo 2. Artículo “**Enhanced oxidative stress in the ethylene-insensitive (*ein3-1*) mutant of *Arabidopsis thaliana* exposed to salt stress**”, publicado en la revista *Journal*

of *Plant Physiology*, índice de impacto (2010) de 2.677. En este trabajo se describe la importancia de la señalización de etileno, y muy particularmente de EIN3, en la resistencia de plantas de *A. thaliana* al estrés salino moderado, incluyendo medidas de hormonas y de tocoferol, entre otros marcadores de estrés oxidativo, además de los análisis de expresión génica. Se demuestra que el mutante *ein3-1* presenta mayor acumulación de ácido jasmónico y mayor estrés oxidativo en respuesta a la salinidad que las plantas salvajes, y que por tanto la señalización de etileno es esencial en la respuesta de las plantas al estrés salino. La doctoranda ha realizado la parte dedicada al tocoferol y otros marcadores de estrés oxidativo, así como la parte de expresión génica en este trabajo, el tratamiento estadístico y la elaboración de esta parte de los resultados, y además ha participado en la discusión de los resultados, compartiendo el primer lugar como autora del trabajo. La doctoranda ha demostrado una gran capacidad de trabajo en equipo, así como un excelente manejo de las principales medidas de marcadores de estrés y del HPLC para el análisis de tocoferoles, así como de los análisis de los niveles de expresión génica por PCR. Estos últimos se llevaron a cabo por parte de la doctoranda durante una estancia de 6 meses en la Universidad de Maryland en el laboratorio de la Dra. Caren Chang.

Capítulo 3. Artículo “Diurnal changes in photosystem II photochemistry, photoprotective compounds and stress-related phytohormones in the CAM plant, Aptenia cordifolia”, publicado en la revista Plant Science, índice de impacto (2010) de 2.481. En este trabajo la doctoranda realiza un salto cualitativo importante en cuanto a la aproximación experimental realizando estudios de regulación de la biosíntesis y función de los tocoferoles en la planta CAM invasora A. cordifolia. Se demuestra que el γ -tocopherol aumenta de forma paralela al ácido abscísico en respuesta al estrés hídrico en esta especie, mientras que los niveles de α -tocopherol permanecen constantes. La doctoranda ha realizado todo el muestreo, el análisis de las muestras, el tratamiento estadístico y la elaboración de los resultados, y además ha participado en el diseño experimental y discusión de los resultados, constanding por tanto como primera autora del trabajo. La doctoranda ha demostrado una gran capacidad de trabajo, así como un excelente manejo de las principales medidas de marcadores de estrés y del HPLC para el análisis de tocoferoles y del UPLC-MS/MS para el análisis de hormonas. Demuestra asimismo una gran capacidad de análisis e interpretación de los resultados.

Capítulo 4. Artículo “**Acclimation to high salinity in the invasive CAM plant *Aptenia cordifolia***”, enviado a la revista *Plant Ecology and Diversity*, índice de impacto (2010) de 2.053. En este trabajo la doctoranda profundiza en el estudio de aspectos ecofisiológicos en esta planta invasora, pero en este caso en respuesta a la salinidad, realizando un estudio muy completo a corto y largo plazo. Se demuestra aquí la gran resistencia de esta especie a elevadas concentraciones de NaCl y se describe la importancia de dos de los mecanismos implicados, por una parte la importancia de las citoquininas en el crecimiento de las hojas y por otra parte el papel de los carotenoides y los tocoferoles en la fotoprotección de esta especie cuando está expuesta a salinidad. La doctoranda ha realizado todo el muestreo, el análisis de las muestras, el tratamiento estadístico y la elaboración de los resultados, y ha realizado ya prácticamente todo el diseño experimental y la discusión de los resultados, constanding por tanto como primera autora del trabajo. Además de seguir demostrando una gran capacidad de trabajo, un excelente manejo del HPLC y UPLC-MS/MS, y una gran capacidad de análisis e interpretación de los resultados, la doctoranda demuestra ya un elevado grado de independencia y madurez científica.

Capítulo 5. Artículo “**Accumulation of γ - rather than α -tocopherol alters ethylene signaling gene expression in the *vte4* mutant of *Arabidopsis thaliana***”, publicado en la revista *Plant and Cell Physiology*, índice de impacto (2010) de 4.257. En este trabajo la doctoranda realiza un salto cualitativo muy importante en esta tesis doctoral, centrándose en este caso en como el tocoferol, un antioxidante presente en cloroplastos, puede alterar la expresión de genes implicados en la biosíntesis, percepción y señalización de etileno, los cuales se encuentran en el núcleo, investigando por tanto un caso de señalización celular retrógrada, en este caso del cloroplasto al núcleo. Se demuestra en este estudio por primera vez que los niveles alterados de γ -tocopherol en los cloroplastos desencadenan grandes cambios a nivel de expresión génica en el núcleo en cuanto a genes relacionados con el etileno, una de las hormonas más importantes en la respuesta de las plantas al estrés. La doctoranda ha demostrado una gran capacidad de trabajo en equipo, así como un excelente manejo de las principales medidas de marcadores de estrés y del HPLC para el análisis de tocoferoles y del UPLC-MS/MS para el análisis de ácido jasmónico, así como una gran experiencia en los análisis de los niveles de expresión génica por PCR.

Estos últimos se llevaron a cabo por parte de la doctoranda durante una estancia de 6 meses en la Universidad de Maryland en el laboratorio de la Dra. Caren Chang. La doctoranda demuestra una gran madurez científica, destacando sobretodo por su excelente labor en el laboratorio y trabajo en equipo.

Y, para que así conste a los efectos oportunos,

Dr. Sergi Munné-Bosch

4. RESULTADOS

Capítulo 1: La señalización de etileno puede estar implicada en la regulación de la biosíntesis de tocoferol en *Arabidopsis thaliana*

Ethylene signaling may be involved in the regulation of tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*

Jana Cela^a, Jon Falk^b, Sergi Munné-Bosch^a

^a Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^b Institute of Botany, Christian-Albrechts-University of Kiel, Kiel, Germany

Resumen

Se investigó la biosíntesis de tocoferol en los mutantes de *Arabidopsis thaliana* *ein3-1*, *etr1-1* y *eto1-1*, los cuales muestran defectos en la señalización, percepción o una sobreproducción de etileno, respectivamente. Una mutación en el gen *EIN3* retrasó el aumento de α -tocoferol relacionado con el estrés hídrico y causó una reducción de los niveles de este antioxidante de cerca del 30% comparado con las plantas *wild type*. A diferencia de las plantas *wild type* y del mutante *ein3-1*, los mutantes *etr1-1* y *eto1-1* mostraron un fuerte aumento (de más de 5 veces) de los niveles de α -tocoferol durante el desarrollo foliar. Se puede concluir que la percepción y señalización de etileno puede estar implicada en la regulación de la biosíntesis de tocoferol durante el estrés hídrico y el envejecimiento foliar.



Ethylene signaling may be involved in the regulation of tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*

Jana Cela^a, Jon Falk^b, Sergi Munné-Bosch^{a,*}

^a *Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain*

^b *Institute of Botany, Christian-Albrechts-University of Kiel, Olshausenstrasse 40, 24098 Kiel, Germany*

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 February 2009

Revised 19 February 2009

Accepted 20 February 2009

Available online 1 March 2009

Edited by Ulf-Ingo Flügge

Keywords:

Ethylene

Leaf aging

Tocopherol

Vitamin E

Water-stress

ABSTRACT

Tocopherol biosynthesis was investigated in *ein3-1*, *etr1-1* and *eto1-1* mutants of *Arabidopsis thaliana*, which show a defect in ethylene signaling, perception and over-produce ethylene, respectively. A mutation in the *EIN3* gene delayed the water-stress related increase in α -tocopherol and caused a reduction in the levels of this antioxidant by ca. 30% compared to the wild type. In contrast to the wild type and *ein3-1* mutants, both *etr1-1* and *eto1-1* mutants showed a sharp (up to 5-fold) increase in α -tocopherol levels during leaf aging. It is concluded that ethylene perception and signaling may be involved in the regulation of tocopherol biosynthesis during water stress and leaf aging.

© 2009 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Under water deficit, active oxygen species are produced as a consequence of stomatal closure and over-reduction of the photosynthetic electron transport chain leading to the production of superoxide anion, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals, which in turn may cause lipid peroxidation and photo-inhibitory damage to the photosynthetic apparatus. Protection against oxidative damage in chloroplasts is provided by a number of both enzymatic and non-enzymatic antioxidants [1]. From the non-enzymatic compounds, the lipid-soluble antioxidant α -tocopherol has been proven to be especially important to maintain the integrity of thylakoids and chloroplast membranes [2]. Conditions favouring oxidative damage have been shown to induce an enhanced accumulation of endogenous α -tocopherol in order to cope with oxidative stress [3]. Moreover, tocopherol levels could be shown to increase with leaf age and during leaf senescence [4–7].

In the past decade all genes necessary for the biosynthesis of tocopherols in plants have been identified, characterized, and used for biotechnological approaches generating plants with altered tocopherol composition or levels [8,9]. However, not much is known about the regulatory mechanisms controlling the biosynthesis of tocopherols during development and under stress condi-

tions in plants. So far, exogenous treatment with jasmonate and ethylene in barley and the use of jasmonic acid-deficient *Arabidopsis* plants showed that these phytohormones may induce the accumulation of transcripts of at least one gene coding for an enzyme involved in the biosynthesis of tocopherols [10,11]. Furthermore, it could be shown that endogenous levels of salicylic acid, an important phytohormone involved in oxidative stress signaling, strongly correlates with tocopherol levels in water-stressed *Phyllirea angustifolia* plants and senescing *Salvia lanigera* leaves [12,13], but that in other species, such as *Cistus creticus*, abscisic acid correlates much better than salicylic acid or jasmonic acid with α -tocopherol in water-stressed plants [14]. Ethylene has long been known as a major signal molecule in the adaptation of plants to environmental stresses [15–17]. When holm oak (*Quercus ilex*) is exposed to heat stress or drought stress a significant increase in α -tocopherol can be observed. However, when such plants are additionally fumigated with ethylene in concentrations found in polluted areas, symptoms of enhanced oxidative stress accompanied with a significant decrease in α -tocopherol levels in the leaves were observed [18].

To get further insight into the mechanisms underlining the regulation of α -tocopherol levels in plants we used in the present study the ethylene-response mutants *ein3-1* (At3g20770) [19] and *etr1-1* (At1g66340) [20] as well as the ethylene over-producer *eto1-1* (At3g51770) [21] from *Arabidopsis thaliana*. The accumulation of α -tocopherol in response to water stress and leaf aging was compared to the transcript level of selected tocopherol pathway-related genes.

* Corresponding author. Fax: +34 934112842.

E-mail address: smunne@ub.edu (S. Munné-Bosch).

2. Materials and methods

2.1. Plant material, growth conditions and treatments

Seedlings of the *A. thaliana* Columbia ecotype (Col-0) and the *ein3-1* mutant, which shows reduced responsiveness to ethylene (At3g20770, N8052 [19]) were used in the present study. Plants were grown in pots containing a mixture of peat/perlite/vermiculite (1:1:1, v/v/v) in a constant environment chamber (8-h photoperiod, 90–110 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, air temperature 21–23 °C) and were watered with Hoagland's solution every 3 days during 8 weeks until the experiment started. Then, plants were either exposed to water deficit (water-stressed plants) by withholding water, or were watered with Hoagland's solution every 3 days (irrigated plants) during 10 days. To confirm the role of ethylene in the regulation of tocopherol biosynthesis, the ethylene-response mutant *etr1-1* (At1g66340, N237 [20]) as well as the ethylene over-producer mutant *eto1-1* (At3g51770, N3072 [21]) were compared to the wild type in terms of tocopherol accumulation. Upper (young, not fully expanded) and lower (older, fully expanded but not senescing) leaves of the rosette were collected and used for the experiments.

Leaf water status and PSII efficiency (as stress indicators), as well as α -tocopherol contents, together with expression of major tocopherol biosynthetic genes were measured in leaves collected at the middle of the photoperiod. For measurements of α -tocopherol and relative transcript levels leaves were collected, frozen in liquid nitrogen, and stored at –80 °C until analysis. Experiments were fully replicated twice giving very similar results.

2.2. Stress indicators

Leaves were weighed, re-hydrated for 24 h at 4 °C in darkness and subsequently oven-dried for 24 h at 80 °C. The relative leaf water content (RWC) was determined as $100 \times (\text{FW} - \text{DW}) / (\text{TW} - \text{DW})$, where FW is the fresh weight, TW is the turgid weight after re-hydrating the leaves at 4 °C in darkness, and DW is the dry weight after oven-drying the leaves at 80 °C to constant weight. The relative and maximum efficiencies of photosystem II photochemistry (ϕ_{PSII} and F_v/F_m , respectively) were determined by using a pulse-modulated fluorimeter mini-PAM (Walz, Effeltrich, Germany) in the light and after 1 h of dark adaptation, respectively, as described [22].

2.3. Analyses of α -tocopherol

To measure α -tocopherol, leaf samples (100 mg) were extracted two times with ice-cold methanol using sonication and determined by HPLC as described [23]. In short, tocopherols were separated on a Partisil 10 ODS-3 column (250 \times 4.6 mm, Scharlau, Barcelona, Spain) at a flow rate of 1 mL min^{-1} . The solvents consisted of (A) methanol/water (95:5, v/v) and (B) methanol. The gradient used was: 0–10 min 100% A, 10–20 min decreasing to 0% A, 20–25 min 0% A, 25–28 min increasing to 100% A, and 28–33 min 100% A. α -Tocopherol was quantified by its absorbance at 295 nm (Diode array detector 1000S, Applied Biosystems) and identified by its characteristic spectrum and by co-elution with an authentic standard provided by Sigma (Steinheim, Germany).

2.4. Gene expression analyses

RNA was isolated from leaf material by a modified hot borate method [24]. Leaf samples (100 mg) were ground to a fine powder in liquid nitrogen with a modified Retsch mill (Haan, Germany), the powder transferred into a 2 ml reaction cap containing

750 μl of pre-heated borate extraction buffer (0.2 M sodium borate, 1% (w/v) SDS, 30 mM EGTA) and 750 μl phenol, and then mixed and incubated for 30 min at 30 °C. The samples were centrifuged for 20 min at 25000 $\times g$, the upper phase mixed with 1 ml phenol/chloroform and centrifuged again. This procedure was repeated twice, before the RNA was precipitated with LiCl at a final concentration of 3 M on ice for 4 h and centrifuged for 15 min at 4 °C. The pellet was washed with 70% (v/v) ethanol, air-dried, resuspended in 20 μl water, and the RNA concentrations determined at 260 nm.

For semi-quantitative RT-PCR, equal amounts of RNA (1 μg) from each sample were used for reverse transcription and 1/80 of the cDNA for the following PCR reaction. The amounts of cDNAs of all samples were calibrated using the Quantum RNA™ 18S Internal Standard (Ambion). The ratio of 18S to 18S competitor primer pair was 1:9 or 2:8. For the PCR amplification gene specific primers listed in [Supplementary Table 1](#) were used. Conditions were established such that the PCR reactions would remain in the linear range for all primer pairs used as follows: 94 °C (1 min), 30–38 cycles of 94 °C (45 s), 60 °C (45 s), 72 °C (1–2 min). PCR products were electrophoretically separated on a 1% (w/v) agarose gel containing ethidium bromide and the intensity of the PCR products measured with an AlphaMager gel documentation system using AlphaEaseFC Software (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA). First the relative transcript level of each transcript was calculated as the ratio of the band intensities of gene specific to 18S product. To compare changes in transcript levels over time the relative transcript level observed for each gene in experiment 1 of irrigated wild type leaves (control) was set as 1. Each time point is based on at least three quantifications ($n \geq 3$).

2.5. Statistical analyses

Statistical variations between measurements of different treatments at different times were analyzed with an analysis of variance ANOVA or the Student's *t*-test using SPSS software (Chicago, IL, USA). Differences were considered significant at a probability level of $P < 0.05$.

3. Results

Wild type and *ein3-1* mutant plants were morphologically indistinguishable after 8 weeks of growth and showed similar symptoms of wilting after 10 days of water deficit. The relative water content (RWC) showed a similar trend in both plant groups in response to water deficit. The RWC kept nearly constant during the first 7 days of water deficit treatment but then decreased sharply from ca. 80% at day 7 to values below 40% at day 10 in both plant groups ([Fig. 1](#)). The relative efficiency of PSII photochemistry (ϕ_{PSII}) followed a similar trend in response to water deficit in both plant groups, showing a strong depletion in this parameter to values around 0.3 at day 10. In contrast, the maximum efficiency of PSII photochemistry (F_v/F_m ratio), which is an indicator of damage to the photosynthetic apparatus, decreased more in wild type than in *ein3-1* mutants. In other words, while PSII efficiency partly recovered by exposure of plants to darkness in the mutants, damage to photosynthetic electron transport appeared to be irreversible in wild type plants ([Fig. 2](#)).

α -Tocopherol levels were similar in leaves of wild type and *ein3-1* mutants under control conditions, but they increased progressively, and particularly after 7 days of water deficit, in wild type plants ([Fig. 3](#)). By contrast, increases in this antioxidant were not observed until day 10 of water deficit in the *ein3-1* mutant. The defect in ethylene signaling also caused a reduction in the extent of α -tocopherol accumulation in leaves, with levels of this antioxi-

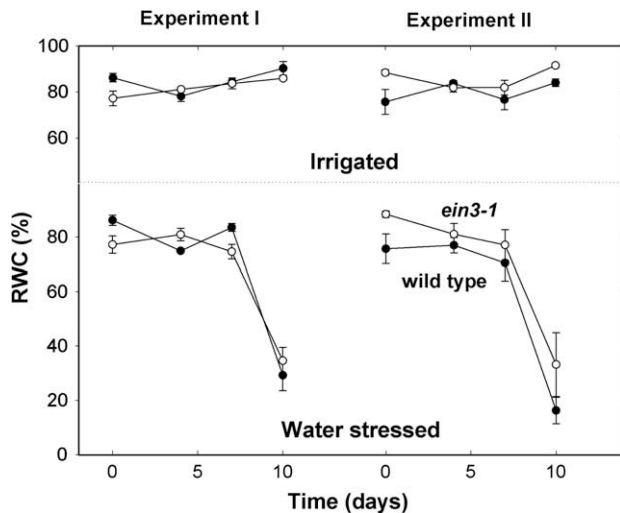


Fig. 1. Changes in relative water contents (RWC) in leaves of irrigated and water-stressed wild type and *ein3-1* mutants of *Arabidopsis thaliana*. Results of two independent experiments are shown. Data represent the mean \pm SE of five individuals. No significant differences were observed between plant groups in any of the days of measurements (Student's *t*-test, $P \leq 0.05$).

dant being *ca.* 30% lower in the mutant compared to the wild type after 10 days of stress. It is noteworthy that the increase in α -tocopherol levels in the wild type was observed before the RWC decreased sharply. In order to better understand the regulatory mechanisms underlying the water-stress-induced accumulation of α -tocopherol, the transcript levels of tocopherol biosynthesis genes were analyzed by semi-quantitative RT-PCR. The relative transcript levels of the genes encoding for the 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (*HPD*), tocopherol cyclase (*VTE1*), homogentisate prenyltransferase (*VTE2*) and γ -tocopherol methyltransferase (*VTE4*) were not significantly different between both plant groups. Moreover, water deficit did not induce an increase in transcript levels of these genes (Supplementary Fig. 1). Therefore, the increase in α -tocopherol observed under water stress conditions was not accompanied by an increase of transcript levels of central genes encoding for enzymes of the tocopherol biosynthetic pathway.

In order to confirm the influence of ethylene on the accumulation of α -tocopherol in leaves, young and older leaves of two other mutants were analyzed. A second ethylene-response mutant, *etr1-1*, showed 2-fold higher α -tocopherol levels in young leaves compared to wild type and *ein3-1* mutants (Table 1). In contrast to the *ein3-1* mutant, tocopherol levels were about 10-fold higher in the older leaves of the *etr1-1* mutant compared to those of the wild type. On the other hand, when young and old leaves of the ethylene over-producer *eto1* were analyzed a dramatic higher tocopherol level was also observed in older leaves (Table 1), while transcript levels were not increased (Supplementary Table 2).

Table 1

Relative leaf water content (RWC), relative and maximum PSII efficiency (ϕ_{PSII} and F_v/F_m , respectively), and α -tocopherol levels in young and old leaves of wild type and *eto1-1*, *etr1-1*, and *ein3-1* mutants of *Arabidopsis thaliana*. Data represent the mean \pm SE of five randomly chosen plants. Significant differences between young and old leaves are indicated by an asterisk (Student's *t*-test, $P \leq 0.05$).

	Wild type		<i>ein3-1</i>		<i>etr1-1</i>		<i>eto1-1</i>	
	Young	Old	Young	Old	Young	Old	Young	Old
RWC (%)	78.10 \pm 2.24	83.71 \pm 1.20	81.11 \pm 0.90	81.86 \pm 1.92	80.18 \pm 5.61	77.63 \pm 1.75	81.34 \pm 3.61	84.39 \pm 2.47
ϕ_{PSII}	0.71 \pm 0.03	0.70 \pm 0.03	0.75 \pm 0.01	0.75 \pm 0.01	0.73 \pm 0.02	0.75 \pm 0.01	0.73 \pm 0.03	0.72 \pm 0.01
F_v/F_m	0.82 \pm 0.01	0.83 \pm 0.02	0.80 \pm 0.02	0.85 \pm 0.02	0.77 \pm 0.02	0.81 \pm 0.01	0.78 \pm 0.01	0.77 \pm 0.02
α -Tocopherol ($\mu\text{mol [g DW]}^{-1}$)	0.81 \pm 0.16	1.05 \pm 0.02	0.80 \pm 0.10	1.16 \pm 0.20	2.19 \pm 0.66	10.97 \pm 0.64*	1.01 \pm 0.12	6.60 \pm 0.36*

4. Discussion

Tocopherol contents are known to change during leaf development and appear to be strongly influenced by different stress conditions. Drought stress is known to increase α -tocopherol levels in several species, including *A. thaliana* [25,26], and it has been recently shown that enhanced production of α -tocopherol may improve drought tolerance in tobacco [27]. On the other hand, ethylene, the simplest unsaturated hydrocarbon, regulates many diverse metabolic and developmental processes in plants, ranging from seed germination to organ senescence, and it is considered to play a major role as a signal molecule at low concentrations in the tolerance of several species to environmental stresses (for review, see [15,28,29]). In previous studies, it was shown that exogenous treatment with ethylene can induce transcription of the *hpd* gene, which encodes for 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, a key enzyme in tocopherol biosynthesis [10]. Also, it was shown that sustained accumulation of ethylene, at concentrations similar to those found in polluted areas, can give rise to enhanced oxidative stress and lowered tocopherol levels in holm oak plants exposed to heat stress or a combination of heat and drought stress [18]. We were therefore interested in unraveling the possible involvement of ethylene in the regulation of tocopherol biosynthesis in plants, and with this purpose we compared the water-stress response of the *ein3-1* mutant, which shows a defect in ethylene signaling, to that of wild type plants. Tocopherol levels increased progressively during water stress in wild type plants, but this water-stress-induced increase was delayed and reduced in *ein3-1* mutants, thus suggesting that ethylene signaling may be involved in tocopherol biosynthesis. EIN3 is a transcription factor involved in ethylene signaling and loss-of-function mutations in *ein3* gene cause partial ethylene insensitivity. This insensitivity can be rescued by expression of *EIL1* or *EIL2* indicating that, along with EIN3, at least these two EIN3-like (EIL) proteins can mediate an ethylene-response [19]. It is therefore likely that EIL proteins may account for the partial increase in α -tocopherol levels observed in the *ein3-1* mutants. Further insight into the signaling components involved in the regulation of tocopherol biosynthesis was obtained by comparing the water-stress response of *ein2-1* and *eil1-1* mutants to that of *ein3-1* mutants (Table 2). EIN2, which has similarity to the Nramp family of metal ion transporters [30], acts downstream of ETR1 and upstream of EIN3 and EIL proteins [31]. When exposed to water deficit for 7 days, *ein3-1* and *ein2-1* mutants showed 33% and 43% reductions, respectively, in α -tocopherol accumulation in leaves compared to wild type, while tocopherol levels in *eil1-1* mutants were reduced by 15% compared to wild type. This suggests that the regulation of tocopherol biosynthesis is specifically regulated by EIN2, EIN3 and EIL1 proteins. It appears that EIN2 proteins have a major role in the control of tocopherol biosynthesis, since *ein2-1* mutants could only increase tocopherol levels by 33% under water deficit (relative to irrigated plants), while wild type plants increased the levels of this antioxidant 2.5 fold under the same conditions (water-stressed plants relative to irrigated ones, Table 2). Loss-of-function mutations in *EIN3*

Table 2

Relative leaf water content (RWC), relative and maximum PSII efficiencies (ϕ_{PSII} and F_v/F_m , respectively), and α -tocopherol levels in leaves of wild type, and *ein3-1*, *ein2-1* and *eil1-1* mutants of *Arabidopsis thaliana* either grown under irrigated conditions (irrigated plants) or exposed to water deficit for 7 days (water-stressed plants). Data represent the mean \pm SE of five randomly chosen plants. Significant differences between irrigated and water-stressed plants are indicated by an asterisk.

	Wild type		<i>ein3-1</i>		<i>ein2-1</i>		<i>eil1-1</i>	
	Irrigated	Water-stressed	Irrigated	Water-stressed	Irrigated	Water-stressed	Irrigated	Water-stressed
RWC (%)	89.47 \pm 0.75	85.54 \pm 1.48*	90.40 \pm 2.44	84.07 \pm 1.36*	90.46 \pm 0.22	85.08 \pm 2.02*	89.88 \pm 0.73	84.48 \pm 1.66*
ϕ_{PSII}	0.78 \pm 0.04	0.74 \pm 0.02	0.78 \pm 0.02	0.76 \pm 0.02	0.77 \pm 0.03	0.75 \pm 0.02	0.81 \pm 0.03	0.82 \pm 0.01 ^a
F_v/F_m	0.84 \pm 0.04	0.78 \pm 0.01	0.85 \pm 0.02	0.82 \pm 0.01 ^a	0.84 \pm 0.02	0.81 \pm 0.01 ^a	0.84 \pm 0.03	0.85 \pm 0.01 ^a
α -Tocopherol ($\mu\text{mol [g DW]}^{-1}$)	0.82 \pm 0.09	2.12 \pm 0.08*	0.81 \pm 0.05	1.44 \pm 0.14 ^a	0.90 \pm 0.10	1.20 \pm 0.02 ^a	0.78 \pm 0.06	1.81 \pm 0.10 ^a

^a Indicates significant differences between mutants and the wild type for each of these treatments (Student's *t*-test, $P \leq 0.05$).

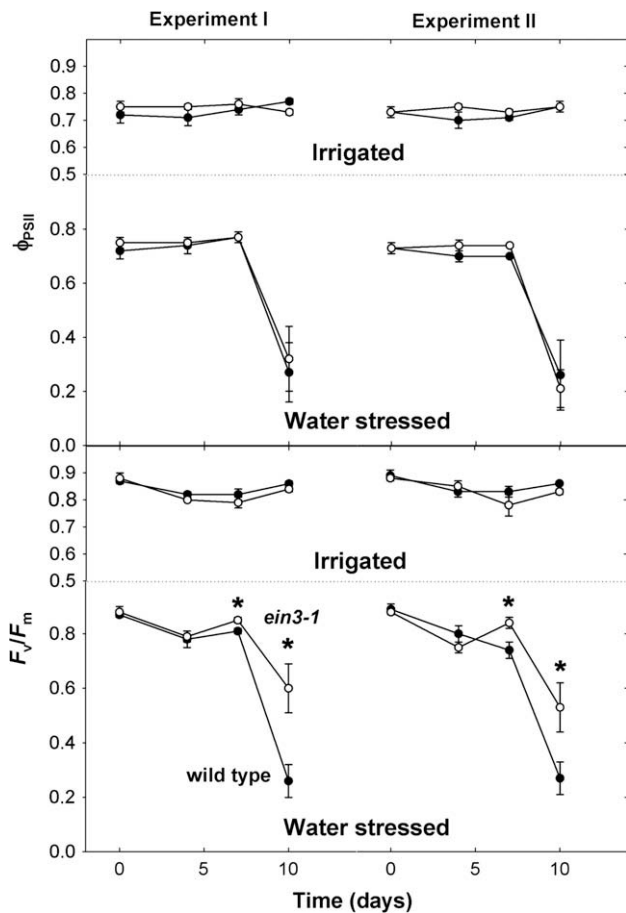


Fig. 2. Changes in relative and maximum efficiency of PSII photochemistry (ϕ_{PSII} and F_v/F_m , respectively) in leaves of irrigated and water-stressed wild type and *ein3-1* mutants of *Arabidopsis thaliana*. Results of two independent experiments are shown. Data represent the mean \pm SE of five individuals. Significant differences between plant groups are indicated by an asterisk (Student's *t*-test, $P \leq 0.05$).

and *EIL1* genes also reduced tocopherol biosynthesis, although to a lower extent, thus suggesting that EIN3 and EIL can compensate each other to some extent. It is also noteworthy that, while ethylene-response mutants altered tocopherol accumulation under water stress, clearly other factors additionally regulate tocopherol accumulation since these mutants still show accumulation of this compound under water stress.

The involvement of ethylene in the regulation of tocopherol accumulation in *Arabidopsis* plants was confirmed by using *etr1-1* and *eto1-1* mutants. Ethylene is perceived by a family of five membrane-bound receptors (ETR1, ETR2, ERS1, ERS2, EIN4) that have similarity to two-component regulators from bacteria [32]. Interestingly, mutation of the *etr1* gene led to drastic changes in α -tocopherol levels during leaf development, the oldest leaves

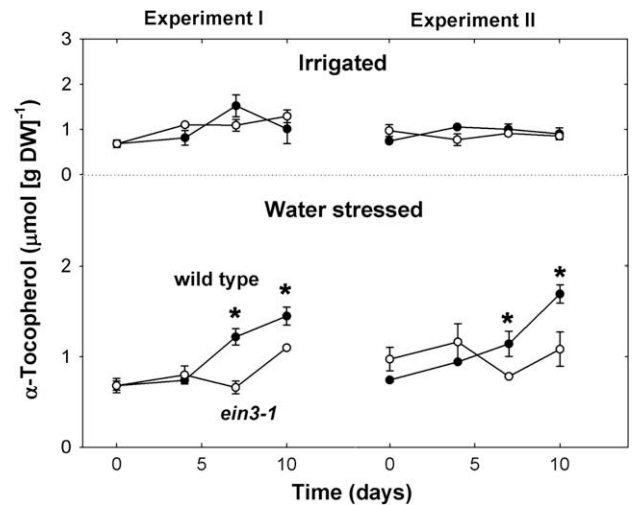


Fig. 3. Changes in α -tocopherol levels in leaves of irrigated and water-stressed wild type and *ein3-1* mutants of *Arabidopsis thaliana*. Results of two independent experiments are shown. Data represent the mean \pm SE of four individuals. Significant differences between plant groups are indicated by an asterisk (Student's *t*-test, $P \leq 0.05$).

showing up to 5-fold higher tocopherol levels than young leaves in the *etr1-1* mutant. By contrast, tocopherol levels were lower in wild type plants, and increased only slightly during leaf development. Although mutations in any single gene encoding an ethylene receptor have little or no effect upon seedling growth, consistent with functional overlap within the receptor family, it appears that ETR1 may play a central, specific role in the regulation of tocopherol biosynthesis. Since ethylene receptors are negative regulators of ethylene signaling [33], the tocopherol increase observed in *etr1-1* mutants confirms the involvement of ethylene signaling in the regulation of tocopherol biosynthesis. Furthermore, tocopherol biosynthesis was also enhanced in the ethylene over-producer *eto1-1* mutant, thus indicating that ethylene promotes tocopherol biosynthesis in *A. thaliana*. An experiment conducted to unravel the effects of the interaction between water deficit and leaf aging on tocopherol biosynthesis showed that old leaves accumulate α -tocopherol to a similar extent during the first 4 days of water deficit, despite relative leaf water contents decreased to ca. 60% in *eto1-1* mutants (Supplementary Fig. 2). Even, tocopherol levels decreased significantly in old leaves of water-stressed *etr1-1* mutants, while transcript levels kept similar (Supplementary Fig. 3), thus suggesting degradation of tocopherol under stress. Indeed, *etr1-1* and *eto1-1* mutants showed symptoms of photo-oxidative damage in old leaves after one week of stress, which were accompanied by visible death of photosynthetic tissues in the ethylene over-producer *eto1-1* mutant (data not shown).

Tocopherol biosynthesis was most likely not regulated at the transcriptional level in the present study, while it has been previ-

ously shown that some tocopherol biosynthetic genes, and particularly *VTE2*, which encodes for homogentisate prenyltransferase and plays a rate limiting step in tocopherol biosynthesis, increase in response to water deficit in field-grown *C. creticus* plants [14] and in response to a combination of high light and nutrient stress in *A. thaliana* [34]. In the present study, however, stress-induced increases in tocopherol were moderate (up to 2-fold), much lower than in the those previous studies, which might explain why we failed to detect by semi-quantitative RT-PCR any significant increase in transcript levels of tocopherol biosynthetic genes in wild type plants. Up to 5-fold increases in α -tocopherol levels were however observed in the leaf aging experiment, while transcript levels were not increased, thus confirming that the ethylene-mediated effects on tocopherol biosynthesis appear not to be regulated at the transcriptional level. Since most components of ethylene signaling, including transcription factors, influence tocopherol accumulation and this is not reflected at the transcript level of the tocopherol biosynthetic genes examined, further research is needed to unravel ethylene-regulated genes involved either directly or indirectly in the regulation of tocopherol biosynthesis.

Acknowledgments

We are very grateful to Joseph Ecker and the the Arabidopsis Biological Resource Center for kindly providing Arabidopsis seeds, and the Serveis de Camps Experimentals and Serveis Científic-Tècnics (University of Barcelona) for technical assistance. This research was supported by the BFU2006-01127 grant from the Spanish Government. Support for the research of S.M. was also received through the prize ICREA Academia for excellence in research, funded by the Generalitat de Catalunya.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.febslet.2009.02.036.

References

- Asada, K. (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol.* 141, 391–396.
- Havaux, M., Eymery, F., Porfirova, S., Rey, P. and Dörmann, P. (2005) Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 17, 3451–3469.
- Munné-Bosch, S. and Alegre, L. (2002) The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21, 31–57.
- Chrost, B., Falk, J., Kernebeck, B., Mölleken, H. and Krupinska, K. (1999) Tocopherol biosynthesis in senescing chloroplasts – a mechanism to protect envelope membranes against oxidative stress and a prerequisite for lipid remobilization? in: *The Chloroplast: From Molecular Biology to Biotechnology* (Argyroudi-Akoyunoglou, J.H. and Senger, H., Eds.), pp. 171–176, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Dertinger, U., Schaz, U. and Schulze, E.D. (2003) Age-dependence of the antioxidative system in tobacco with enhanced glutathione reductase activity or senescence-induced production of cytokinins. *Physiol. Plant* 119, 19–29.
- Falk, J., Andersen, G., Kernebeck, B. and Krupinska, K. (2003) Constitutive overexpression of barley 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in tobacco results in elevation of the vitamin E content in seeds but not in leaves. *FEBS Lett.* 540, 35–40.
- Munné-Bosch, S. and Peñuelas, J. (2003) Photo- and antioxidative protection during summer leaf senescence in *Pistacea lentiscus* L. grown under Mediterranean field conditions. *Ann. Bot.* 92, 385–392.
- DellaPenna, D. (2005) Progress in the dissection and manipulation of vitamin E synthesis. *Trends Plant Sci.* 10, 574–579.
- Dörmann, P. (2007) Functional diversity of tocopherols in plants. *Planta* 225, 269–276.
- Falk, J., Krauss, N., Dahnhardt, D. and Krupinska, K. (2002) The senescence associated gene of barley encoding 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is expressed during oxidative stress. *J. Plant Physiol.* 159, 1245–1253.
- Sandorf, I. and Hollander-Czytko, H. (2002) Jasmonate is involved in the induction of tyrosine aminotransferase and tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 216, 173–179.
- Munné-Bosch, S. and Peñuelas, J. (2003) Photo- and antioxidative protection, and a role for salicylic acid during drought and recovery in field-grown *Phillyrea angustifolia* plants. *Planta* 217, 758–766.
- Abreu, M.E. and Munné-Bosch, S. (2007) Photo- and antioxidant protection and salicylic acid accumulation during post-anthesis leaf senescence in *Salvia lanigera* grown under Mediterranean climate. *Physiol. Plant* 131, 590–598.
- Munné-Bosch, S., Falara, V., Pateraki, I., López-Carbonell, M., Cela, J. and Kanellis, A.K. (2009) Physiological and molecular responses of the isoprenoid biosynthetic pathway in a drought-resistant Mediterranean shrub, *Cistus creticus* exposed to water deficit. *J. Plant Physiol.* 166, 136–145.
- Morgan, P.W. and Drew, M.C. (1997) Ethylene and plant responses to stress. *Physiol. Plant* 100, 620–630.
- Chang, C. and Shockey, J.A. (1999) The ethylene-response pathway: signal perception to gene regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 352–358.
- Chen, Y.-F., Etheridge, N.D. and Schaller, G.E. (2005) Ethylene signal transduction. *Ann. Bot.* 95, 901–915.
- Munné-Bosch, S., Peñuelas, J., Asensio, D. and Llusià, J. (2004) Airborne ethylene may alter antioxidant protection and reduce tolerance of holm oak to heat and drought stress. *Plant Physiol.* 136, 2937–2947.
- Chao, Q., Rothenberg, M., Solano, R., Roman, G., Terzaghi, W. and Ecker, J.R. (1997) Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell* 89, 1133–1144.
- Chang, C., Kwok, S.F., Bleecker, A.B. and Meyerowitz, E.M. (1993) Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science* 262, 539–544.
- Wang, K.L.-C., Yoshida, H., Lurin, C. and Ecker, J.R. (2004) Regulation of ethylene gas biosynthesis by the *Arabidopsis* ETO1 protein. *Nature* 428, 945–950.
- Genty, B., Briantais, J.M. and Baker, N.R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990, 87–92.
- Munné-Bosch, S. and Alegre, L. (2003) Drought-induced changes in the redox state of α -tocopherol, ascorbate, and the diterpene carnosic acid in chloroplasts of *Labiatae* plants differing in carnosic acid contents. *Plant Physiol.* 131, 1816–1825.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second ed, Cold Spring Harbor Press, New York.
- Munné-Bosch, S., Schwarz, K. and Alegre, L. (1999) Enhanced formation of α -tocopherol and highly oxidized abietane diterpenes in water-stressed rosemary plants. *Plant Physiol.* 121, 1047–1052.
- Munné-Bosch, S., Peñuelas, J. and Llusià, J. (2007) A deficiency in salicylic acid alters isoprenoid accumulation in water-stressed NahG transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Sci.* 172, 756–762.
- Liu, X.L., Hua, X.J., Guo, J., Qi, D.M., Wang, L.J., Liu, Z.P., Jin, Z.P., Chen, S.Y. and Liu, G.S. (2008) Enhanced tolerance to drought stress in transgenic tobacco plants overexpressing VTE1 for increased tocopherol production from *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnol. Lett.* 30, 1275–1280.
- Abeles, F.B., Morgan, P.W. and Saltveit, M.E. (1992) *Ethylene in Plant Biology*, Academic Press, San Diego.
- Bleecker, A.B. and Kende, H. (2000) Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 1–18.
- Alonso, J., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S. and Ecker, J. (1999) EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science* 284, 2148–2152.
- Kendrick, M.D. and Chang, C. (2008) Ethylene signaling: new levels of complexity and regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 479–485.
- Bleecker, A.B. (1999) Ethylene perception and signaling: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci.* 4, 269–274.
- Hua, J. and Meyerowitz, E.M. (1998) Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 94, 261–271.
- Collakova, E. and DellaPenna, D. (2003) The role of homogentisate phytyltransferase and other tocopherol pathway enzymes in the regulation of tocopherol synthesis during abiotic stress. *Plant Physiol.* 133, 930–940.

SUPPLEMENTARY DATA

Suppl. Table 1. Gene specific primers used to estimate transcript levels of tocopherol biosynthetic genes.

<i>hpd</i> _forward	(ATCTCAAGAAACGGGTCGG)
<i>hpd</i> _reverse	(TTGGCTTCAAGAGTCTTTTCGTA)
<i>vte1</i> _forward	(GGGTACACCTCTGCGTGCTC)
<i>vte1</i> _reverse	(CCATGTCCCAAACCACGGTC)
<i>vte2</i> _forward	(AGTAAAGTTGTCGCAAAACCG)
<i>vte2</i> _reverse	(CCAAGATGCCAGTGAAAAGTAAAGG)
<i>vte4</i> _forward	(GGATGTTGGGTGTGGGATTGGAGG)
<i>vte4</i> _reverse	(CTTGGCCTTGTCAGGCATATGC)

SUPPLEMENTARY DATA

		Mean \pm SE	
hpd		Young	Old
	wild type	1,0 \pm 0,1	1,6 \pm 0,2
	ein3-1	1,4 \pm 0,2	1,5 \pm 0,5
	etr1-1	1,1 \pm 0,4	0,9 \pm 0,3
	eto1-1	1,2 \pm 0,1	1,4 \pm 0,2

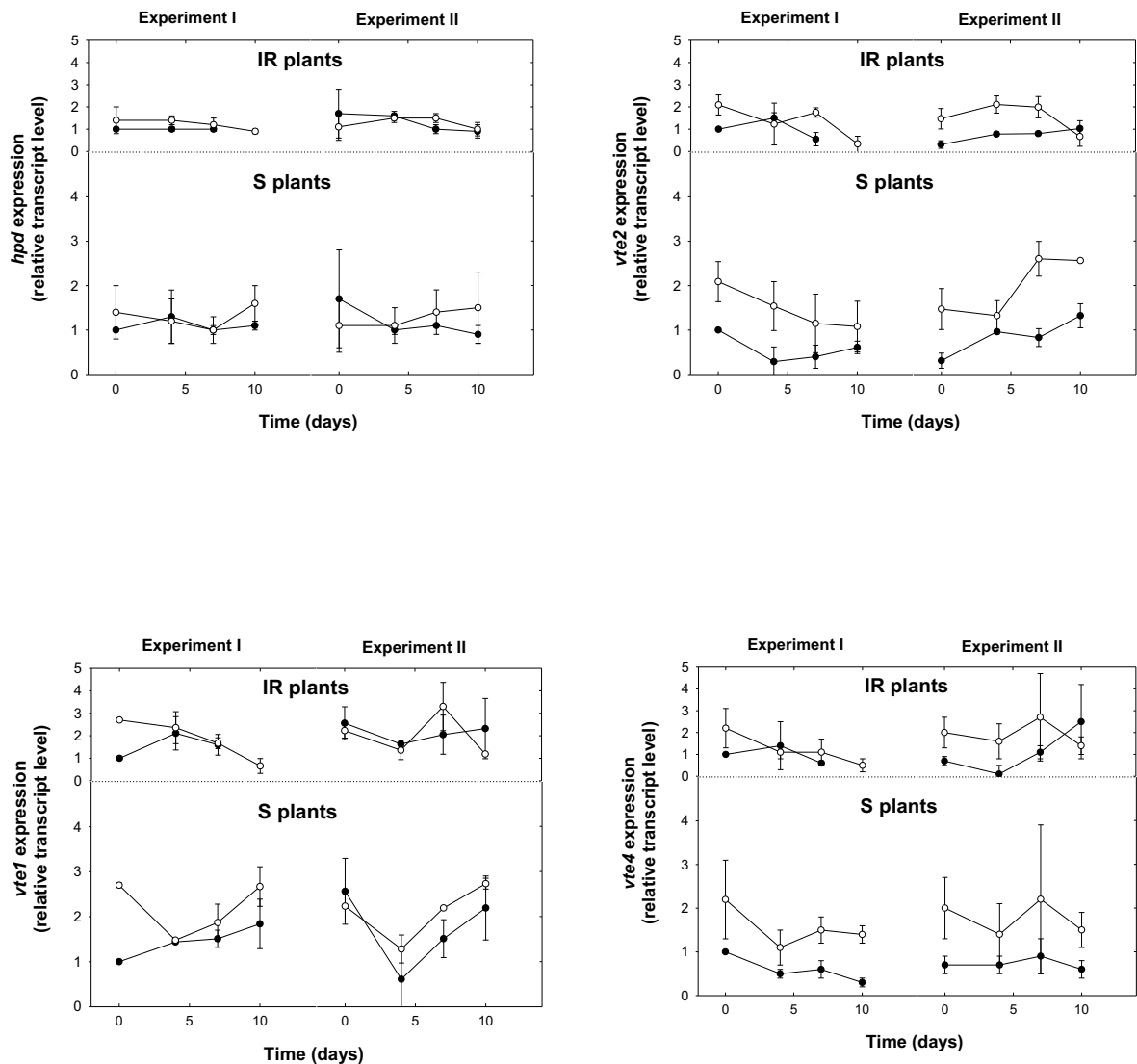
		Mean \pm SE	
vte1		Young	Old
	wild type	2,1 \pm 0,7	1,6 \pm 0,1
	ein3-1	2,4 \pm 0,7	1,4 \pm 0,4
	etr1-1	2,0 \pm 1,1	1,4 \pm 0,3
	eto1-1	1,4 \pm 0,3	1,4 \pm 0,3

		Mean \pm SE	
vte2		Young	Old
	wild type	1,5 \pm 0,2	0,8 \pm 0,2
	ein3-1	1,2 \pm 0,9	2,1 \pm 0,4
	etr1-1	1,2 \pm 0,6	0,8 \pm 0,6
	eto1-1	0,4 \pm 0,4	0,4 \pm 0,5

		Mean \pm SE	
vte4		Young	Old
	wild type	1,4 \pm 1,1	1,0 \pm 0,4
	ein3-1	1,1 \pm 0,3	1,6 \pm 0,8
	etr1-1	1,4 \pm 0,4	1,0 \pm 0,3
	eto1-1	0,6 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1

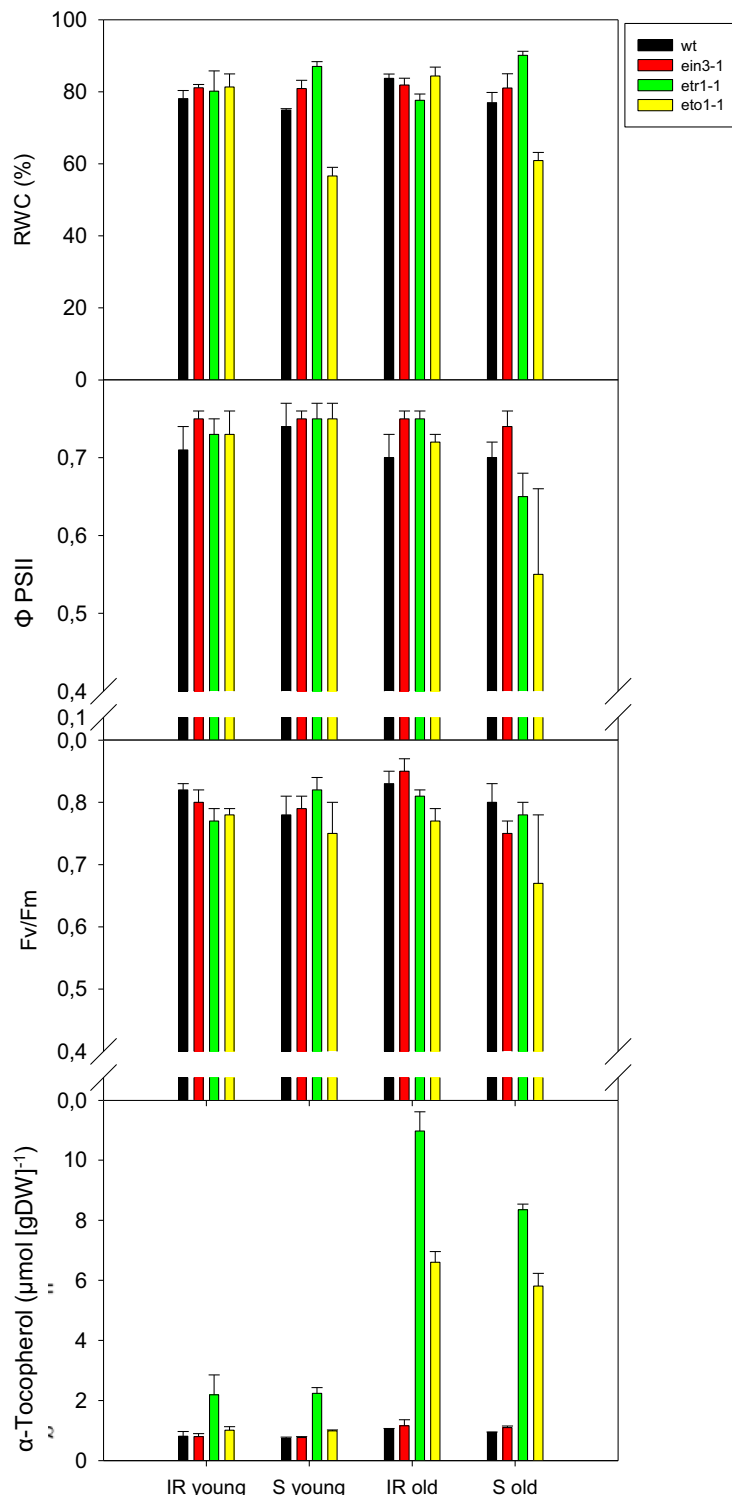
Suppl. Table 2. Transcript levels of major tocopherol biosynthetic genes (hpd, vte1, vte2 and vte4) in young and old leaves of wild type and *ein3-1*, *etr1-1* and *eto1-1* mutants of *Arabidopsis thaliana*. No significant differences were observed in any of the tested transcript levels between young and old leaves (Student's t-test, $P \leq 0.05$). All data is given as relative transcript levels compared to wild type young leaves.

SUPPLEMENTARY DATA



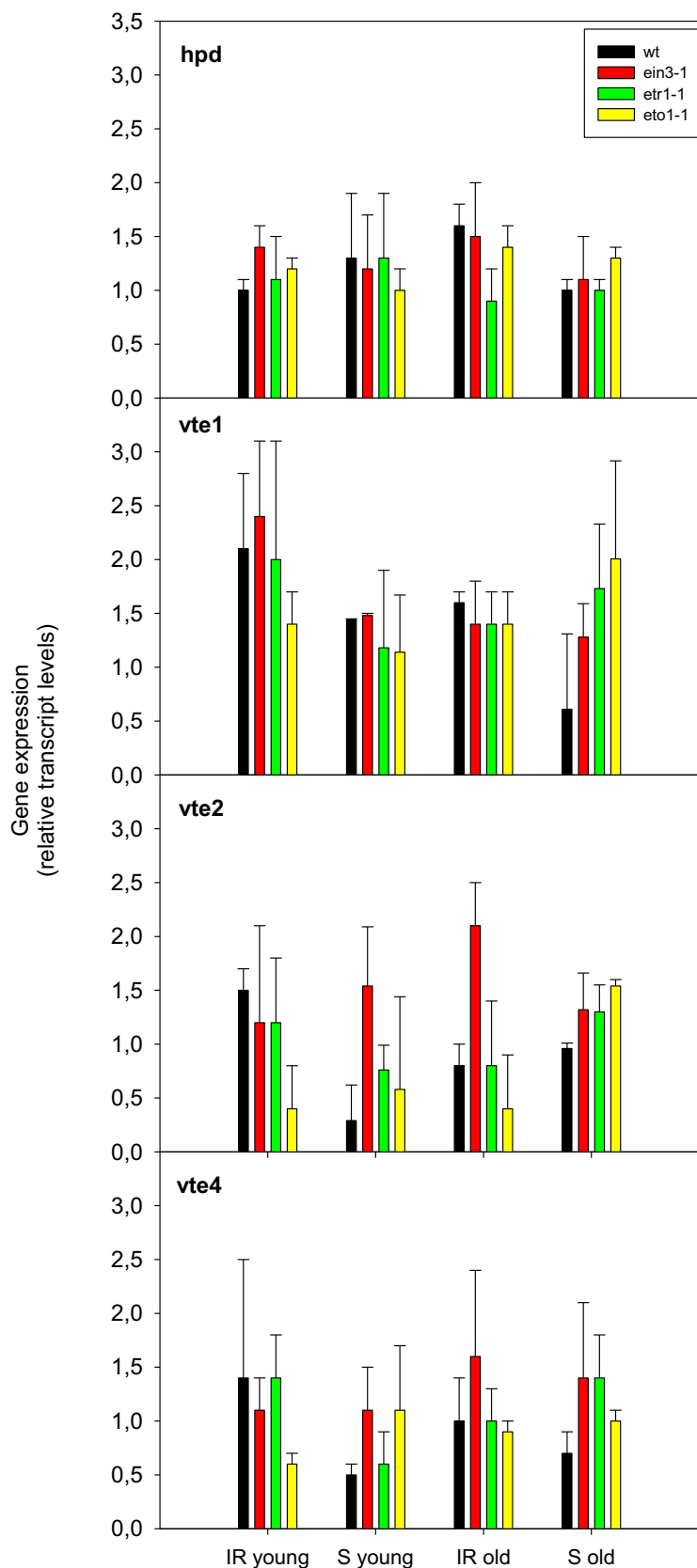
Suppl. Fig. 1. Transcript levels of major tocopherol biosynthetic genes (*hpd*, *vte1*, *vte2* and *vte4*) in irrigated and water-stressed wild type (black symbols) and *ein3-1* mutants (white symbols) of *Arabidopsis thaliana*. Results of two independent experiments are shown. No significant differences were observed in any of the tested transcript levels between wild type and *ein3-1* mutants (ANOVA, $P \leq 0.05$). No data is available for transcript levels of IR plants at day 10 due to technical problems. All data is given as relative transcript levels compared to wild type young leaves.

SUPPLEMENTARY DATA



Suppl. Fig. 2. Relative leaf water content (RWC), relative and maximum PSII efficiencies (ϕ PSII and F_v/F_m , respectively), and α -tocopherol levels in young and old leaves of wild type and *ein3-1*, *etr1-1* and *eto1-1* mutants of *Arabidopsis thaliana* either irrigated (IR) or exposed to water deficit for 4 days (water-stressed [S] plants) Data represent the mean \pm SE of five randomly chosen plants.

SUPPLEMENTARY DATA



Suppl. Fig. 3. Transcript levels of major tocopherol biosynthetic genes (*hpd*, *vte1*, *vte2* and *vte4*) in young and old leaves of wild type and *ein3-1*, *etr1* and *eto1* mutants of *Arabidopsis thaliana* either irrigated (IR) or exposed to water deficit for 4 days (water-stressed [S] plants). Data represent the mean \pm SE of five randomly chosen plants.

**Capítulo 2: Aumento del estrés oxidativo en el mutante insensible al etileno (*ein3-1*)
de *Arabidopsis thaliana* expuesto a estrés salino**

Enhanced oxidative stress in the ethylene-insensitive (*ein3-1*) mutant of *Arabidopsis thaliana* exposed to salt stress

María Amparo Asensi-Fabado^a, Jana Cela^a, Maren Müller^a, Laia Arrom^a, Caren Chang^b,
Sergi Munné-Bosch^a

^aDepartament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^bDepartment of Cell Biology and Molecular Genetics, University of Maryland, College Park, MD, USA

Resumen

Para entender mejor el papel de la señalización del etileno en la tolerancia de las plantas al estrés, se midieron los cambios en los niveles de expresión génica inducidos por estrés salino de los genes de biosíntesis, percepción y señalización del etileno en plantas de *Arabidopsis thaliana* expuestas a 15 días de salinidad. De entre los genes analizados, *EIN3* fue el que mostró el mayor aumento de los niveles de expresión bajo condiciones de estrés salino, sugiriendo un papel clave de este componente de la señalización de etileno en la respuesta al estrés salino. Además, se analizó la respuesta al estrés después de 15 días (añadiendo 100 mM de NaCl a la solución nutritiva) en el mutante *ein3-1* comparado con el *wild type* (Col-0) en términos de crecimiento, marcadores de estrés oxidativo (peroxidación lipídica, pigmentos foliares y antioxidantes de bajo peso molecular) y los niveles de las fitohormonas relacionadas con el crecimiento y el estrés (incluyendo las citocininas, auxinas, giberelinas, ácido abscísico, ácido jasmónico y ácido salicílico). El mutante *ein3-1* creció de forma similar a las plantas *wild type* tanto en condiciones control como en condiciones de estrés salino, lo cual se asoció a una evolución diferencial a lo largo del tiempo en los niveles de las citocininas zeatina y ribosido de zeatina, y de la auxina ácido indol-3-acético entre el mutante *ein3-1* y el *wild type*. A pesar de que no se observaron signos de deterioro fisiológico bajo condiciones de estrés salino (en términos de biomasa de la roseta, contenido hídrico foliar y de pigmentos, y la eficiencia del PSII) el mutante *ein3-1* mostró un aumento en la peroxidación lipídica bajo condiciones de estrés salino, como se indica por el aumento de 2,4 veces en el contenido de malondialdehído y de ácido jasmónico en comparación con el *wild type*. Podemos concluir que, en dosis moderadas de salinidad, la insensibilidad parcial al etileno puede ser compensada por los cambios en los niveles endógenos de otras fitohormonas y las señales derivadas de la peroxidación lipídica en el mutante *ein3-1* expuesto a estrés

salino, pero al mismo tiempo, este mutante muestra un mayor estrés oxidativo bajo condiciones de salinidad que el *wild type*.



Enhanced oxidative stress in the ethylene-insensitive (*ein3-1*) mutant of *Arabidopsis thaliana* exposed to salt stress

María Amparo Asensi-Fabado^{a,1}, Jana Cela^{a,1}, Maren Müller^a, Laia Arrom^a, Caren Chang^b, Sergi Munné-Bosch^{a,*}

^a *Departament de Biologia Vegetal, Universitat de Barcelona, Facultat de Biologia, Avinguda Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain*

^b *Department of Cell Biology and Molecular Genetics, University of Maryland, Bioscience Research Bldg 413, College Park, MD 20742, United States*

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 July 2011

Received in revised form 3 November 2011

Accepted 3 November 2011

Keywords:

Antioxidants

EIN3

Lipid peroxidation

Phytohormones

Salt stress

ABSTRACT

To better understand the role of ethylene signaling in plant stress tolerance, salt-induced changes in gene expression levels of ethylene biosynthesis, perception and signaling genes were measured in *Arabidopsis thaliana* plants exposed to 15 days of salinity. Among the genes analyzed, *EIN3* showed the highest expression level increase under salt stress, suggesting a key role for this ethylene-signaling component in response to salt stress. Therefore, we analyzed the salt stress response over 15 days (by adding 100 mM NaCl to the nutrient solution) in the *ein3-1* mutant compared to the wild-type (Col-0) in terms of growth, oxidative stress markers (lipid peroxidation, foliar pigments and low-molecular-weight antioxidants) and levels of growth- and stress-related phytohormones (including cytokinins, auxins, gibberellins, abscisic acid, jasmonic acid and salicylic acid). The *ein3-1* mutant grew similarly to wild-type plants both under control and salt stress conditions, which was associated with a differential time course evolution in the levels of the cytokinins zeatin and zeatin riboside, and the auxin indole-3-acetic acid between the *ein3-1* mutant and the wild-type. Despite showing no signs of physiological deterioration under salt stress (in terms of rosette biomass, leaf water and pigment contents, and PSII efficiency) the *ein3-1* mutant showed enhanced lipid peroxidation under salt stress, as indicated by 2.4-fold increase in both malondialdehyde and jasmonic acid contents compared to the wild-type. We conclude that, at moderate doses of salinity, partial insensitivity to ethylene might be compensated by changes in endogenous levels of other phytohormones and lipid peroxidation-derived signals in the *ein3-1* mutant exposed to salt stress, but at the same time, this mutant shows higher oxidative stress under salinity than the wild-type.

© 2011 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Acclimation of plants to changes in their environment requires a new state of cellular homeostasis achieved by a delicate balance between multiple pathways that reside in different cellular compartments. This coordination may, however, be disrupted during salt stress, especially when the cell or the entire plant is exposed to a rapid decrease in water potential, or when additional environmental parameters are involved (Miller et al., 2010). Damage caused by high salinity is often associated with three different mechanisms (Abdelly et al., 2008). First, ion toxicity is caused by excessive accumulation of Na⁺ and Cl⁻ in the cytoplasm, leading

to an ionic imbalance. This can be counteracted by an increased transport intensity of the ions to the vacuole. Second, even if massive ion compartmentalization occurred in the vacuole, the cytosol water potential must be lowered to balance a low external water potential, allowing water intake in plant cell and preventing macromolecule damage. Third, a high cellular NaCl concentration causes increased formation of reactive oxygen species (ROS), which is considered to be the primary event under a variety of stress conditions. It has been generally accepted that enhanced production of ROS during stress can disturb cellular redox homeostasis, by enhancing oxidative processes such as membrane lipid peroxidation, protein oxidation, enzyme inhibition, and DNA and RNA damage (Bartels and Sunkar, 2005; Miller et al., 2010).

Ethylene, the simplest unsaturated hydrocarbon, regulates many diverse metabolic and developmental processes in plants, ranging from seed germination to senescence, and is considered to play a major role as a signal molecule in the tolerance of several species to environmental constraints, including salt stress (for review, see Bleeker and Kende, 2000; Xu et al., 2008). The use of different experimental approaches, such as (i) exogenous

Abbreviations: ABA, abscisic acid; DHA, dehydroascorbate; IAA, indole-3-acetic acid; JA, jasmonic acid; MDA, malondialdehyde; RWC, relative leaf water content; SA, salicylic acid; Z, zeatin; ZR, zeatin riboside.

* Corresponding author. Tel.: +34 934021465; fax: +34 934112842.

E-mail address: smunne@ub.edu (S. Munné-Bosch).

¹ These authors contributed equally to this work.

application of ethylene precursors or ethylene-enriched atmospheres (Munné-Bosch et al., 2004; Wang et al., 2009), (ii) determination of endogenous concentrations of ethylene prior to and during a salt stress period (Kukreja et al., 2005; Zapata et al., 2007), and (iii) the use of transgenic plants and mutants (He et al., 2005; Cao et al., 2006, 2007), have provided evidence that ethylene is involved in the regulation of plant tolerance to salt stress. However, the role of ethylene signal transduction in response to abiotic stress, and particularly salt stress, remains to be completely understood.

Based on the mutant analysis the triple response of etiolated seedlings treated with ethylene, an ethylene signal transduction pathway has been proposed in *Arabidopsis thaliana* that involves five ethylene receptors, including ETR1, ERS1, ETR2, EIN4 and ERS2, as well as other important signaling components, such as CTR1, EIN2, and EIN3 (Bleecker and Kende, 2000; Guo and Ecker, 2004; Chen et al., 2005; Kendrick and Chang, 2008). The *EIN3* gene is an important component of ethylene signaling that encodes a transcription factor that is required, together with EIL1, for full activation of ethylene responses (Chao et al., 1997; Solano et al., 1998; An et al., 2010). The *ein3-1* loss-of-function mutant of *A. thaliana* displays partial insensitivity to ethylene, and *EIN3* has been shown to participate in plant responses to salt stress (Cao et al., 2007). Cao et al. (2007) showed that an alteration in receptor function or the loss of *EIN2* function may lead to salt-sensitive responses. However, a mutation in *EIN3* did not lead to the same phenotype, despite the *ein3-1* mutant showing increased electrolyte leakage compared to the wild-type under salt stress (Cao et al., 2007). Unfortunately, it is still unknown whether such changes in electrolyte leakage are associated with increased oxidative stress, nor what mechanisms are involved in conferring salt stress tolerance in the *ein3-1* mutant.

To better understand the role of ethylene signaling in the tolerance to salt stress, our aim was to evaluate the effects of the loss of *EIN3* function on salt stress tolerance in *A. thaliana*. In particular, we examined the possible compensatory roles of other phytohormones and oxidative stress-derived signals in the *ein3-1* mutant.

Materials and methods

Plant material and treatments

Seedlings of the *Arabidopsis thaliana* Columbia ecotype (Col-0) wild-type plants and the *ein3-1* mutant, which shows reduced responsiveness to ethylene (AT3G20770, N8052, Chao et al., 1997) were used in the present study. Plants were grown in separate pots containing a mixture of peat/perlite/vermiculite (1:1:1 by volume) in a constant-environment chamber (8-h photoperiod, 90–110 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, air temperature 21–23 °C) and were irrigated with Hoagland solution. Wild-type and *ein3-1* plants were placed on different trays and mixed following a randomized distribution. After 45 days from seed germination, plants were assigned to control (irrigation with Hoagland solution) or salt stress (irrigation with Hoagland solution with an addition of 100 mM NaCl) treatments. Irrigation was applied every 3 days; one day after irrigation, the remaining solution was removed from each tray to prevent salt precipitation. Control plants were irrigated following the same system as salt-stressed plants. Plants remained in the vegetative (pre-reproductive) state during the whole experiment. With these plants, two different experiments (samplings) were performed including:

(i) *Experiment 1*. To evaluate expression levels of ethylene biosynthesis, perception and signaling genes in wild-type plants under salt stress, a sampling was performed at day 15 after the start of treatments (control and salt stress).

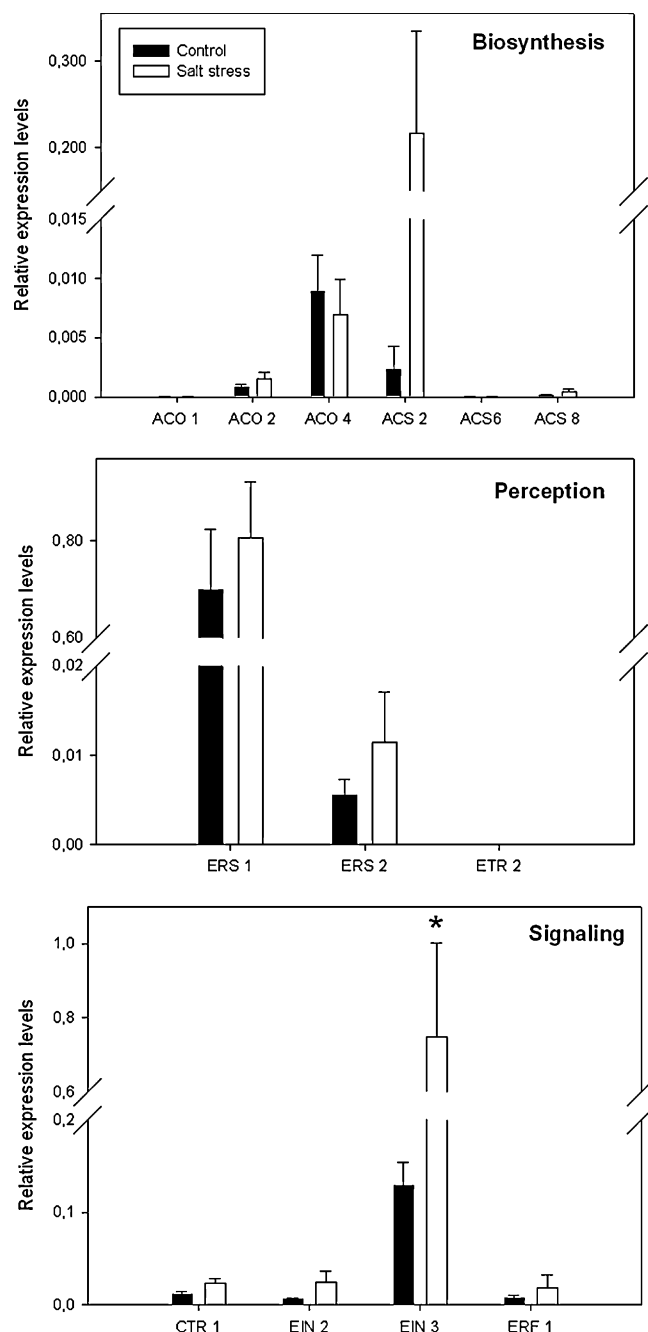


Fig. 1. Changes in the relative gene expression of ethylene biosynthesis, perception and signaling genes in wild-type plants exposed to 15 days of salt stress. Data represent the mean \pm S.E. of 4 individuals. An asterisk indicates significant differences in gene expression between control and salt stress (Student's *t*-test, $P \leq 0.05$). Values are given relative to the reference gene *GAPDH* (AT1G13440.1), which encodes for glyceraldehyde 3P dehydrogenase.

(ii) *Experiment 2*. To evaluate the salt stress response of *ein3-1* mutants in terms of growth and phytohormones, samplings were performed at day 0 (immediately before the first treatment irrigation), and 6, 11 and 15 days after the start of treatments. Moreover, we evaluated the salt stress response of *ein3-1* mutants in terms of oxidative stress and *ERF1* gene expression with a sampling performed at day 15 after the start of treatments (control and salt stress).

In all cases, measurements were made in the middle of the photoperiod, except for F_v/F_m , which was measured at pre-dawn

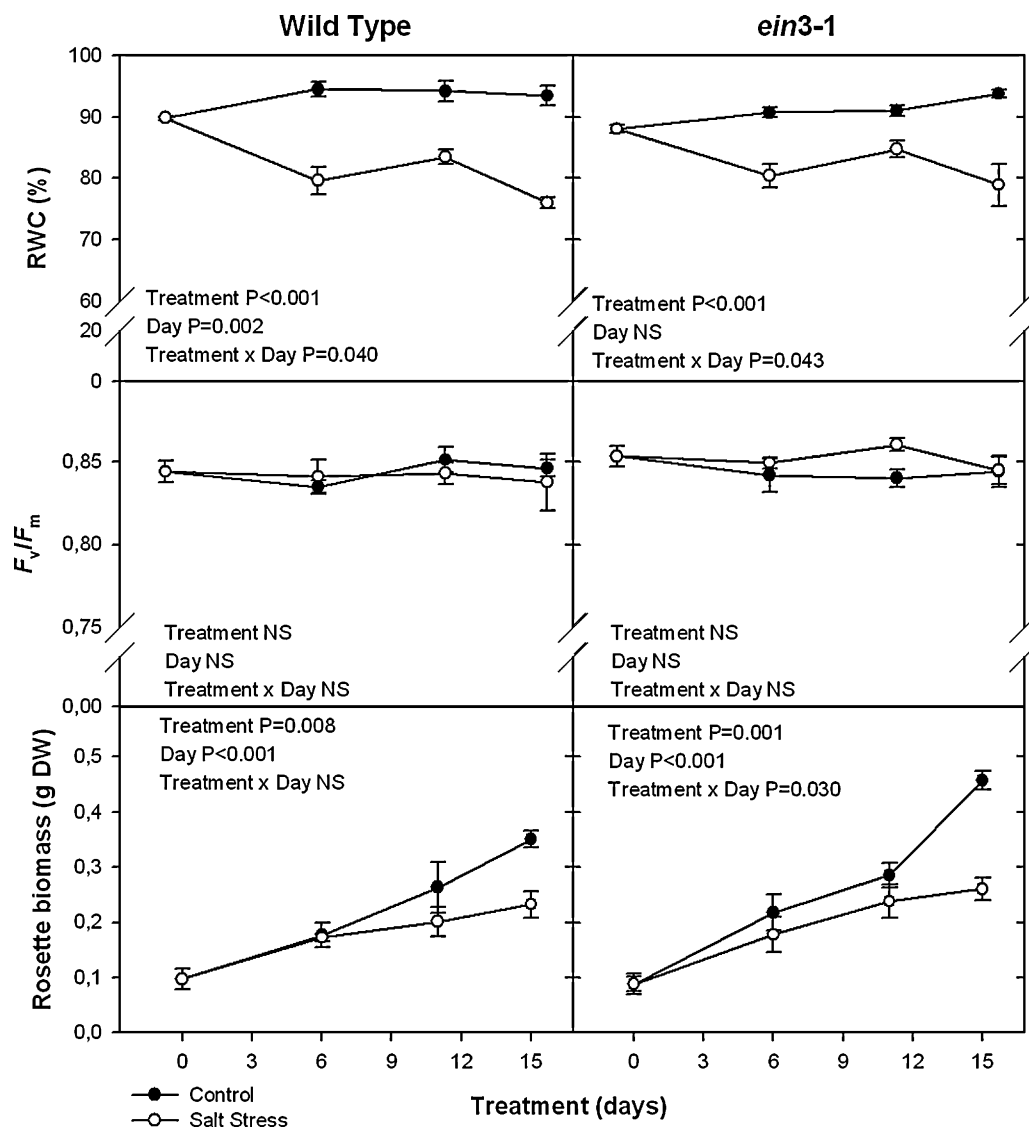


Fig. 2. Changes in the relative leaf water content (RWC), the maximum efficiency of PSII photochemistry (F_v/F_m ratio) and rosette biomass in wild-type and *ein3-1* mutant leaves of *A. thaliana* after exposure to 15 days of salt stress treatment. Data represent the mean \pm S.E. of 4–6 individuals. Results of statistics are shown inside panels (two-way ANOVA, $P \leq 0.05$).

(one hour before turning on lights). Samples used for biochemical and gene expression analyses were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analyzed. For all analyses, each sample corresponded to a mixture of leaves of the whole rosette from a unique plant. Four to six plants, each from a different tray, were measured per genotype and treatment.

Growth, leaf water content and chlorophyll fluorescence

The whole rosette was weighed to determine the plant biomass. Then, leaves were collected, immediately weighted (fresh weight), re-hydrated for 24 h at 4°C in darkness (turgid weight) and subsequently oven-dried for 72 h at 60°C (dry weight). The RWC was determined as $100 \times (\text{fresh wt} - \text{dry wt}) / (\text{turgid wt} - \text{dry wt})$. Measurements of the maximum efficiency of photosystem II photochemistry (F_v/F_m) were performed by using a pulse-modulated fluorimeter mini-PAM (Walz, Effeltrich, Germany). The F_v/F_m ratio was calculated as $(F_m - F_0) / F_m$, where F_m and F_0 are the maximum and basal fluorescence yields, respectively, of dark-adapted leaves.

Gene expression analyses

For the analysis of gene expression levels, the frozen material was ground in liquid nitrogen and the RNA was isolated using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, USA), following the kit instructions. The genomic DNA was eliminated using the DNase, RNase-Free DNase Set (Qiagen, USA) and the pure RNA was converted to cDNA using GeneAmp RNA PCR (Applied Biosystems, USA).

All genes were analyzed by qRT-PCR. The cDNA was amplified using LightCycler 480 SYBR Green 1 Master (Roche, Indianapolis, IN, USA). For the majority of primers (Suppl. Table 1), the PCR conditions were: 45 cycles of 95°C ($10'$); 63°C ($20'$); 72°C ($20'$). The quantification was carried out by the C_T method, and the reference gene used was *GAPDH* (AT1G13440.1).

Hormonal profiling

The extraction and analyses of gibberellins, cytokinins, auxins, abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA) were carried out as described previously (Abreu and Munné-Bosch, 2009), except that UPLC–MS/MS was used instead of HPLC–MS/MS,

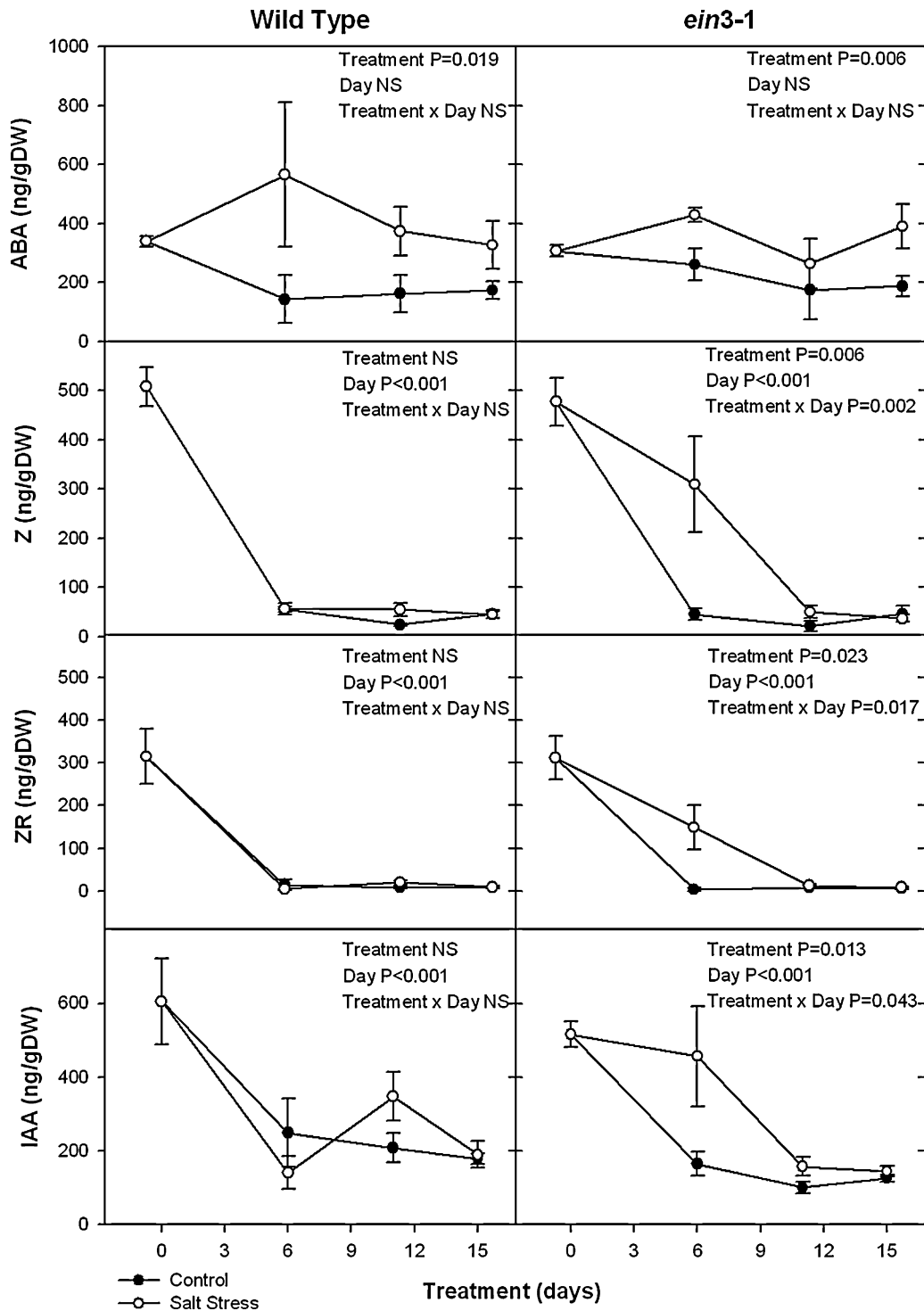


Fig. 3. Changes in the endogenous concentrations of phytohormones, abscisic acid (ABA), the cytokinins, zeatin (Z) and zeatin riboside (ZR) and indole-3-acetic acid (IAA) in wild-type and *ein3-1* mutant leaves of *A. thaliana* after exposure to 15 days of salt stress treatment. Data represent the mean \pm S.E. of 4–6 individuals. Results of statistics are shown inside panels (two-way ANOVA, $P \leq 0.05$).

thus allowing us to considerably shorten the run time for each sample. Deuterium-labeled hormone analogs, purchased from OlChemIm, Olomouc, Czech Republic, were added to each sample immediately after grinding and were used as internal standards.

Foliar pigments, antioxidants and lipid peroxidation

Levels of pigments (chlorophyll *a* and *b*, total carotenoids and total anthocyanins) were measured following extraction with

methanol and subsequent acidification for anthocyanin determination as described previously (Munné-Bosch et al., 2007). Levels of α -tocopherol were measured by HPLC following extraction with methanol as previously described (Amaral et al., 2005). Ascorbic acid (AA) and dehydroascorbate (DHA) contents were determined by the ascorbate oxidase assay as described by Turcsányi et al. (2000). The level of malondialdehyde (MDA) as an indicator of lipid peroxidation was estimated by the thiobarbituric acid-reactive substances assay as described by Hodges et al. (1999).

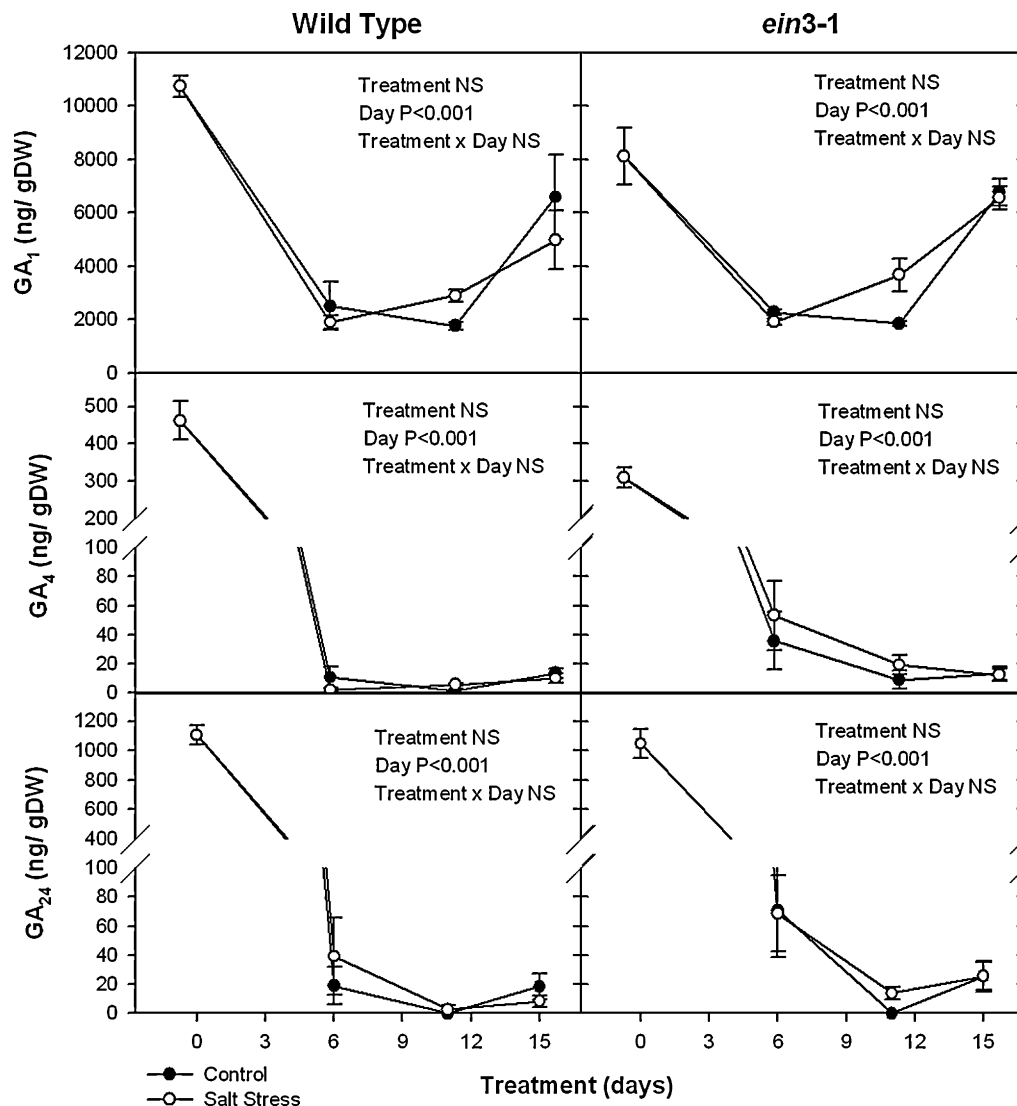


Fig. 4. Changes in the endogenous concentrations of gibberellins in wild-type and *ein3-1* mutant leaves of *A. thaliana* after exposure to 15 days of salt stress treatment. Data represent the mean \pm S.E. of 4–6 individuals. Results of statistics are shown inside panels (two-way ANOVA, $P \leq 0.05$).

Statistical analyses

Statistical differences between measurements on different days and treatments were analyzed using analysis of variance ANOVA or Student's *t*-test. Differences were considered significant at a probability level of $P \leq 0.05$. These analyses were conducted using the SPSS software (Chicago, IL, USA).

Results and discussion

EIN3 gene expression is induced under salt stress

Salt-induced changes in gene expression levels of ethylene biosynthesis, perception and signaling genes were measured in *A. thaliana* plants exposed to 15 days of salinity (Fig. 1). Among the genes analyzed, *EIN3* showed the highest expression level increase, suggesting a key role for this ethylene signaling component in plant responses to salt stress. Although several studies have provided evidence that ethylene is involved in the regulation of plant tolerance to salt stress (see reviews by Bartels and Sunkar, 2005; Miller et al., 2010), the role of ethylene signaling in plant stress responses is not completely understood. The *EIN3* transcription factor

regulates many different plant responses (Solano et al., 1998; Alonso et al., 2003; Zhong et al., 2009), and most recently has been found to regulate the uptake of iron (Lingam et al., 2011) and to mediate the synergy of (JA) and ethylene signaling (Zhu et al., 2011).

The *ein3-1* mutant can withstand moderate doses of salt stress

Exposure of plants to 15 days of salt stress led to decreases in the relative leaf water content (RWC) from 90% to 76% in the wild-type and from 88% to 78% in the *ein3-1* mutant. RWC values did not differ significantly between these genotypes either under the control or salt stress conditions; in both genotypes, RWC decreased progressively as stress progressed, but particularly during the first 6 days of treatment (Fig. 2). Reductions in the RWC did not lead to significant changes in the F_v/F_m ratio, which stayed above 0.83 in both genotypes throughout the experiment. Nevertheless, the early decreases in RWC observed upon 100 mM NaCl treatment occurred concomitantly with an inhibition of plant growth, which is generally one of the first responses of plants to salt stress (Bartels and Sunkar, 2005). Ethylene has long been recognized as a growth inhibitor, but increasing evidence suggests that ethylene can also promote growth (Pierik et al., 2006; Hattori et al., 2009). In our study, plant

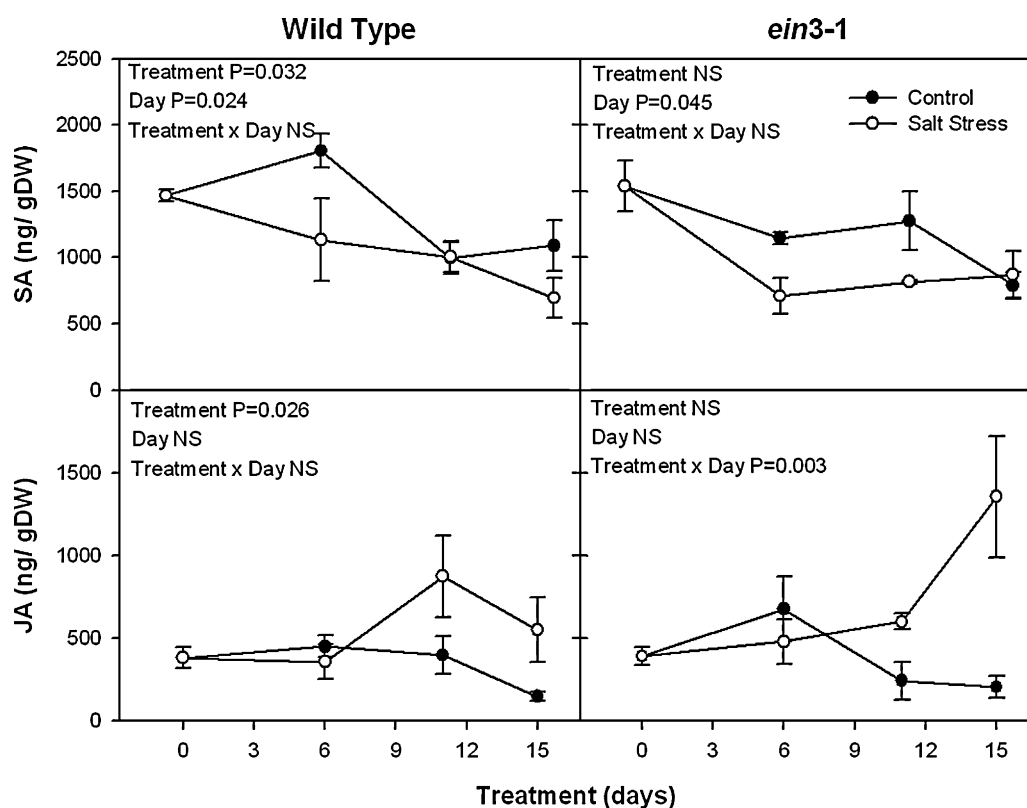


Fig. 5. Changes in the endogenous concentrations of salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA) in wild-type and *ein3-1* mutant leaves of *A. thaliana* after exposure to 15 days of salt stress treatment. Data represent the mean \pm S.E. of 4–6 individuals. Results of statistics are shown inside panels (two-way ANOVA, $P \leq 0.05$).

growth dynamics were similar in both the wild-type and *ein3-1*, the latter attaining slightly higher plant biomass production after 15 days of treatment, both under irrigated and salt stress conditions (Fig. 2). Accordingly, it was shown that biomass accumulation (expressed as relative growth rate) of ethylene insensitive genotypes does not differ from wild-type under near-optimal growth conditions (Tholen et al., 2004). In another study, it was shown that the *ein3-1* mutant exhibits reduced salt stress tolerance under 200 mM NaCl treatment, a response that seems to result from an alteration of nuclear-localized growth-repressing DELLA proteins (Achard et al., 2006). Therefore, it appears that *ein3-1* mutants can withstand moderate doses of NaCl but fail to respond under more severe stress.

Salt-induced changes in the hormonal balance of leaves in *ein3-1* mutants

ABA levels increased in response to salt stress in both wild-type plants and *ein3-1* mutant plants, reaching maximum levels in both plant groups after 6 days of salt treatment (Fig. 3), coincident with the major decrease in the RWC (Fig. 2). Endogenous levels of growth-related phytohormones such as the cytokinins zeatin (Z) and zeatin riboside (ZR), and the auxin indole-3-acetic acid (IAA) revealed significant differences between *ein3-1* mutant plants and wild-type plants under stress (Fig. 3). Z, ZR and IAA showed a sharp decrease at the beginning of the experiment both in the wild-type and the *ein3-1* mutant under control conditions. Salt stress did not alter this pattern in wild-type plants. However, a delayed decrease in these growth-related hormones was observed in salt-treated *ein3-1* mutant plants (Fig. 3). In contrast, gibberellin levels were similar both under control and salt stress conditions between the wild-type and the *ein3-1* mutant (Fig. 4). Furthermore, endogenous levels of JA also revealed differences between the wild-type and

ein3-1 mutant plants, the latter showing higher increases under salt stress than the former. SA levels did not clearly differ between the *ein3-1* mutant and wild-type (Fig. 5). These results show that a link exists between ethylene signaling through EIN3 and other phytohormones, namely cytokinins and auxins, to modulate plant growth under salt stress conditions. In agreement with this new connection, it has been shown that ethylene controls the indole-3-pyruvic acid route of IAA biosynthesis in a tissue-specific manner through *TAA1* (TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS1) and *TAR2* (TAA-RELATED2) gene expression (Stepanova et al., 2008). Enhanced levels of cytokinins and auxins at early phases of salt stress may result in a greater capacity for growth, since such phytohormones are known to be involved in the regulation of cell division and expansion (Beemster and Baskin, 2000; Braybrook and Kuhlmeier, 2010).

Enhanced oxidative stress in the *ein3-1* mutant

To confirm that enhanced JA levels were caused by increased oxidative stress and an overall increase in lipid peroxidation-related processes in salt-stressed plants, MDA levels, together with the contents of photosynthetic pigments, total anthocyanins, tocopherol and ascorbate, were measured after 15 days of treatment (Fig. 6). The *ein3-1* mutant showed 2.4-fold higher MDA levels under salt stress, while the wild-type showed no significant variations. Increases in MDA levels in salt-stressed *ein3-1* correlated with enhanced JA production (Fig. 5), but was not accompanied by any changes in growth, PSII efficiency or contents of foliar pigments. Only reduced ascorbate levels decreased in the salt-stressed *ein3-1* mutant, and this was associated with a 3-fold increase in the oxidation state of ascorbate (Fig. 6), thus indicating increased oxidative stress. Both JA and MDA, which are products of lipid peroxidation (the former with the need of enzymatic activity (Andreou

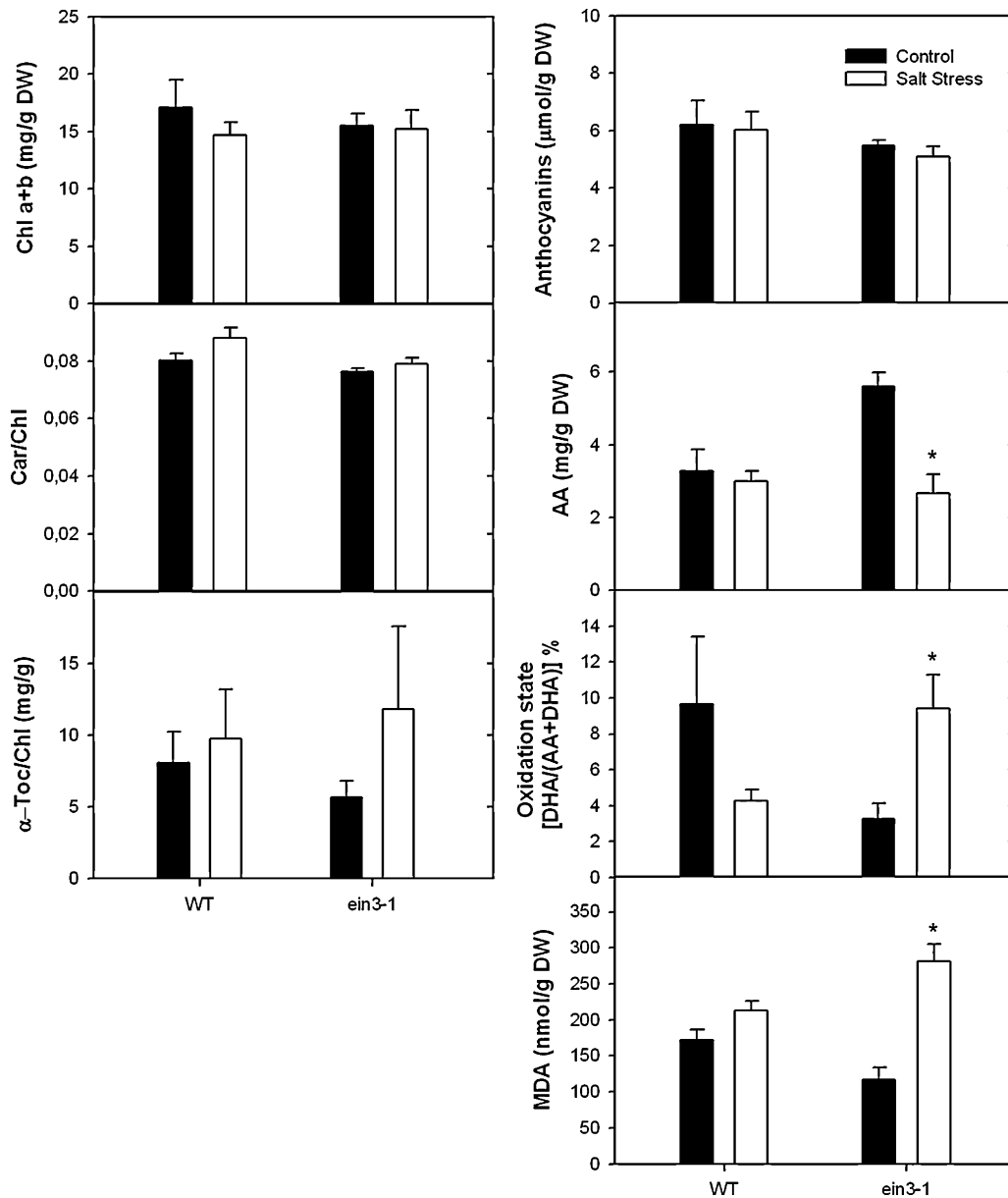


Fig. 6. Chlorophyll (Chl) *a*+*b* levels, carotenoids and tocopherol per unit of Chl, total anthocyanin levels, ascorbate (AA) levels, oxidation state of ascorbate given as $100 \times \text{DHA}/(\text{AA}+\text{DHA})$, and malondialdehyde (MDA) levels (an indicator of lipid peroxidation) in wild-type and *ein3-1* mutant leaves of *A. thaliana* after exposure to 15 days of salt stress treatment. Data represent the mean \pm S.E. of 4–6 individuals. An asterisk indicates statistical significant differences between control and salt-stressed plants (Student's *t*-test, $P \leq 0.05$).

et al., 2009)), can be considered stress-derived signals, since they are known to modulate gene expression under a variety of stress conditions (Weber et al., 2004; Wasternack and Kombrink, 2010). It should be noted, however, that uncontrolled production of MDA can also result in further oxidative processes within the cell, leading to cell destruction (Esterbauer, 1993). Thus, the concentration of these lipid peroxidation-derived compounds should be finely regulated.

Furthermore, it has been shown that both EIN3 and JA converge in the activation of *ERF1*, a central regulator of ethylene response genes (Shinshi, 2008; Zhu et al., 2011). Therefore, we hypothesized that enhanced production of lipid peroxidation-derived signals, particularly JA, in the *ein3-1* mutant could at least partly compensate for the lack of EIN3 by activating *ERF1* expression under salt stress. However, although *ERF1* expression

tended to increase in the *ein3-1* mutant exposed to salt stress compared to the wild-type, differences were not statistically significant due to the high variability observed in stressed *ein3-1* plants (Fig. 7).

Finally, it is interesting to note that the *ein3-1* mutant has increased electrolyte leakage when exposed to a similar NaCl dose and severe necrosis when exposed to 200 mM NaCl (Cao et al., 2007). Therefore, enhanced production of lipid peroxidation-derived signals may be effective as a compensatory mechanism at early phases of stress and low doses only, such as those used in our study, but not when stress is more severe, suggesting an essential role of EIN3 in plant response to salt stress. In agreement with this idea, previous studies have also shown that exposure of the *ein3-1* mutant to severe water deficit causes severe oxidative damage (Cela et al., 2009).

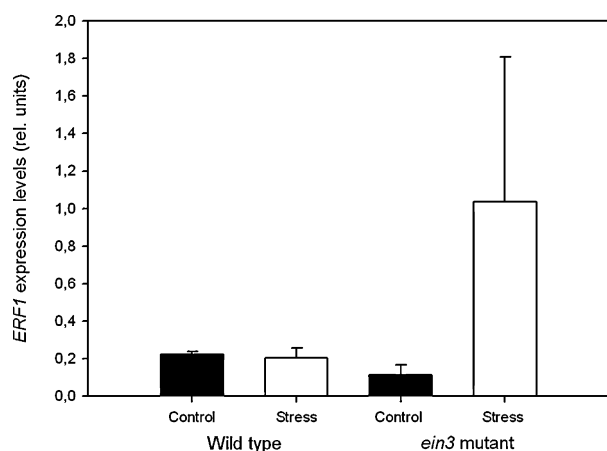


Fig. 7. Relative expression levels of the *ERF1* gene in wild-type and *ein3-1* mutant leaves of *A. thaliana* after exposure to 15 days of salt stress treatment. No statistically significant differences were found between genotypes nor between control and salt-stressed plants (ANOVA, $P > 0.05$). Values are given relative to the reference gene *GAPDH*, which encodes for glyceraldehyde 3P dehydrogenase.

Conclusion

In conclusion, we have shown that the *EIN3* gene plays a role in plant responses to salinity and we have identified two different mechanisms that might help the *ein3-1* mutant to withstand moderate doses of salinity, which include (i) changes in the hormonal balance of leaves (mainly cytokinins and auxins) to sustain growth at early phases of stress, and (ii) increased oxidative stress that leads to the production of lipid peroxidation-derived signals, namely MDA and JA. These signals might play a positive role at low concentrations to withstand moderate salt stress, but may be detrimental if they accumulate in high quantities, particularly in the case of MDA.

Acknowledgements

We are grateful to Serveis de Camps Experimentals and Serveis Científico-Tècnics (University of Barcelona) for technical assistance. Support for the research was received through grants BFU2009-07294 and BFU2009-06045 from the Ministry of Science and Innovation of the Spanish Government and the ICREA Academia prize to S.M.-B. funded by the Generalitat de Catalunya. C.C. was supported by a grant from the National Science Foundation (MCB0923796) and by the Maryland Agricultural Experiment Station.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jplph.2011.11.007.

References

- Abdely C, Öztürk M, Ashraf M, Grignon C. Biosaline agriculture and high salinity tolerance. Basel: Birkhäuser Verlag; 2008.
- Abreu ME, Munné-Bosch S. Salicylic acid deficiency in *NahG* transgenic lines and *sid2* mutants increases seed yield in the annual plant *Arabidopsis thaliana*. J Exp Bot 2009;60:1261–71.
- Achard P, Cheng H, De Grauwe L, Decat J, Schoutteten H, Moritz T, et al. Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. Science 2006;311:91–4.
- Alonso JM, Stepanova AN, Solano R, Wisman E, Ferrari S, Ausubel FM, et al. Five components of the ethylene-response pathway identified in a screen for weak ethylene-insensitive mutants in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100:2992–7.
- Amaral JS, Casal S, Torres D, Seabra RM, Oliveira BPP. Simultaneous determination of tocopherols and tocotrienols in hazelnuts by a normal phase liquid chromatographic method. Anal Sci 2005;21:1545–8.
- An F, Zhao Q, Ji Y, Li W, Jiang Z, Yu X, et al. Ethylene-induced stabilization of ETHYLENE INSENSITIVE3 and EIN3-LIKE1 is mediated by proteasomal degradation of EIN3 binding F-box 1 and 2 that requires EIN2 in *Arabidopsis*. Plant Cell 2010;22:2384–401.
- Andreou A, Brodhun F, Feussner I. Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. Prog Lipid Res 2009;48:148–70.
- Bartels D, Sunkar R. Drought and salt tolerance in plants. Crit Rev Plant Sci 2005;24:23–58.
- Beemster GTS, Baskin TI. *STUNDED PLANT 1* mediates effects of cytokinin, but not of auxin, on cell division and expansion in the root of *Arabidopsis*. Plant Physiol 2000;124:1718–27.
- Bleecker AB, Kende H. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. Annu Rev Cell Dev Biol 2000;16:1–18.
- Braybrook SA, Kuhlemeier C. How a plant builds leaves. Plant Cell 2010;22:1006–18.
- Cao WH, Liu J, He XJ, Mu RL, Zhou HL, Chen SY, et al. Modulation of ethylene responses affects plant salt-stress responses. Plant Physiol 2007;143:707–19.
- Cao WH, Liu J, Zhou QY, Cao YR, Zheng SF, Du BX, et al. Expression of tobacco ethylene receptor NTHK1 alters plant responses to salt stress. Plant Cell Environ 2006;29:1210–9.
- Cela J, Falk J, Munné-Bosch S. Ethylene signaling may be involved in the regulation of tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett 2009;583:992–6.
- Chao QM, Rothenberg M, Solano R, Roman G, Terzaghi W, Ecker JR. Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ethylene-insensitive3 and related proteins. Cell 1997;89:1133–44.
- Chen YF, Etheridge N, Schaller E. Ethylene signal transduction. Ann Bot 2005;95:901–15.
- Esterbauer H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. Am J Clin Nutr 1993;57:779–86.
- Guo HW, Ecker JR. The ethylene signaling pathway: new insights. Curr Opin Plant Biol 2004;7:40–9.
- Hattori Y, Nagai K, Furukawa S, Song X-J, Kawano R, Sakakibara H, et al. The ethylene response factors SNORKEL1 and SNORKEL2 allow rice to adapt to deep water. Nature 2009;460:1026–30.
- He XJ, Mu RL, Cao WH, Zhang ZG, Zhang JS, Chen SY. AtNAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. Plant J 2005;44:903–16.
- Hodges DM, Delong JM, Forney CF, Prange RK. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. Planta 1999;207:604–11.
- Kendrick MD, Chang C. Ethylene signaling: new levels of complexity and regulation. Curr Opin Plant Biol 2008;11:479–85.
- Kukreja S, Nandwal AS, Kumar N, Sharma SK, Sharma SK, Unvi V, et al. Plant water status, H₂O₂ scavenging enzymes, ethylene evolution and membrane integrity of *Cicer arietinum* roots as affected by salinity. Biol Plant 2005;49:305–8.
- Lingam S, Mohrbacher J, Brumbarova T, Potuschak T, Fink-Straube C, Blondet E, et al. Interaction between the bHLH transcription factor FIT and ETHYLENE INSENSITIVE3/ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 reveals molecular linkage between the regulation of iron acquisition and ethylene signaling in *Arabidopsis*. Plant Cell 2011;23:1815–29.
- Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. Plant Cell Environ 2010;33:453–67.
- Munné-Bosch S, Peñuelas J, Asensio D, Llusia J. Airborne ethylene may alter antioxidant protection and reduce tolerance of holm oak to heat and drought stress. Plant Physiol 2004;136:2937–47.
- Munné-Bosch S, Weiler EW, Alegre L, Müller M, Dürsting P, Falk J. α -Tocopherol may influence cellular signaling by modulating jasmonic acid levels in plants. Planta 2007;225:681–91.
- Pierik R, Tholen D, Poorter H, Visser EJW, Voisenek LACJ. The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. Trends Plant Sci 2006;11:177–83.
- Shinshi H. Ethylene-regulated transcription and crosstalk with jasmonic acid. Plant Sci 2008;175:18–23.
- Solano R, Stepanova A, Chao QM, Ecker JR. Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. Genes Dev 1998;12:3703–14.
- Stepanova AN, Robertson-Hoyt J, Yun J, Benavente LM, Xie DY, Dolezal K, et al. TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. Cell 2008;133:177–91.
- Tholen DJH, Voisenek LACJ, Poorter H. Ethylene insensitivity does not increase leaf area or relative growth rate in *Arabidopsis*, *Nicotiana tabacum*, and *Petunia* \times *hybrida*. Plant Physiol 2004;134:1803–12.
- Turcsányi E, Lyons T, Plochl M, Barnes J. Does ascorbate in the mesophyll cell walls form the first line of defence against ozone? Testing the concept using broad bean (*Vicia faba* L.). J Exp Bot 2000;51:901–10.
- Wang H, Liang X, Wan Q, Wang X, Bi Y. Ethylene and nitric oxide are involved in maintaining ion homeostasis in *Arabidopsis callus* under salt stress. Planta 2009;230:293–307.
- Wasternack C, Kombrink E. Jasmonates: structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. ACS Chem Biol 2010;5:63–77.

- Weber H, Chételat A, Reymond P, Farmer EE. Selective and powerful stress gene expression in *Arabidopsis* in response to malondialdehyde. *Plant J* 2004;37:877–88.
- Xu Z, Chen M, Li L, Ma Y. Functions of the ERF transcription factor family in plants. *Botany* 2008;86:969–77.
- Zapata PJ, Botella MA, Pretel MT, Serrano M. Responses of ethylene biosynthesis to saline stress in seedlings of eight plant species. *Plant Growth Regul* 2007;53:97–106.
- Zhong S, Zhao M, Shi T, Shi H, An F, Zhao Q, et al. EIN3/EIL1 cooperate with PIF1 to prevent photo-oxidation and to promote greening of *Arabidopsis* seedlings. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:21431–6.
- Zhu Z, An F, Feng Y, Li P, Xue L, A M, et al. Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:12539–44.

SUPPLEMENTARY DATA

Suppl. Table 1. Primers used for molecular analyses

Reference gene	
<i>GAPDH</i>	For:CAAGCAGGAATCTGAAGGCAAATGA Rev:CAACCACACACAAACTCTCGCCG
Ethylene biosynthesis	
<i>ACS2</i> (AT1G01480)	For:AGGCAATTGCACATTTTCATGG Rev:CTGTCCGCCACCTCAAGTCT
<i>ACS6</i> (AT4G11280)	For:CGCTGAAAATCAGCTTTGTGG Rev:CATAACAATCCGGTCAGGATCAA
<i>ACS8</i> (AT4G37770)	For:CCCAGACGGCATTATCCAAA Rev:TGAAGGAAGGAAGGCCATGA
<i>ACS11</i> (AT4G08040)	For:TGGCTTGAAGAGCATCCAGAA Rev:CCATCTTGTTTCGTATCGAATTTTCAC
<i>ACS11</i> (AT4G08040)	For:TGGCTTGAAGAGCATCCAGAA Rev:CCATCTTGTTTCGTATCGAATTTTCAC
<i>ACO1</i> (At2g19590)	For:TCAGATGCAGATTGGGAAAGC Rev:TCTCACACATGAGCTTGGAGAGTC
<i>ACO2</i> (At1g62380)	For:TGCAGGAGGCATCATCTTGTT Rev:AACGATGCAACCGACATCCT
<i>ACO4</i> (At1g05010)	For:CCGATGTCCCTGATCTCGAC Rev:AGTCGGTCTTTTCGACCCGTA
Ethylene perception	
<i>ERS1</i> (AT2G40940)	For:AACCATTCCGGTGGAGGACT Rev:TGCAAGATGTAGCGCCATTG
<i>ERS2</i> (AT1G04310)	For:ATCCGAGTCTCAACGCTTGC Rev:TCCAGAATATCCACCGCCTCT
<i>ETR2</i> (AT3G23150)	For:TTGGAATTTACAGGTCGATGA Rev:CTGTTTCCTTCGTCTTCGCAGT
Ethylene signaling	
<i>CTR1</i> (AT5G03730)	For:TCCAGCCTTCAAGGAACTTCAC Rev:CCATCAATGCACTCCTTCCAC
<i>EIN2</i> (AT5G03280)	For:TGCGCATGCACTTAACCTTTT Rev:TGACTCAGCAAGACGCCAGA
<i>EIN3</i> (AT3G20770)	For:AGGCAGAGACCTTTTTCTTCATCA Rev:CAGGCTCAGCTTGTGGAACA
ERF1 (AT3G23240.1)	For:TCCCTTCAACGAGAACGACTC Rev:ACGGATTTGATCGGAAGGTC
<i>CTR1</i> (AT5G03730)	For:TCCAGCCTTCAAGGAACTTCAC Rev:CCATCAATGCACTCCTTCCAC

**Capítulo 3: Cambios diarios en la fotoquímica del fotosistema II, componentes
fotoprotectores y hormonas relacionadas con el estrés en la planta CAM, *Aptenia
cordifolia***

Diurnal changes in photosystem II photochemistry, photoprotective compounds and stress-related phytohormones in the CAM plant, *Aptenia cordifolia*

Jana Cela, Laia Arrom, Sergi Munné-Bosch

Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Resumen

La aclimatación de las reacciones fotosintéticas a los cambios diarios de la radiación solar necesita ajustes en la fotoquímica del fotosistema II y puede estar afectada por estreses ambientales, como la sequía. En este estudio, examinamos los efectos de un déficit hídrico severo a corto plazo en la fotoquímica del fotosistema II, los componentes fotoprotectores (tocoferoles y carotenoides, incluyendo el ciclo de las xantofilas) y las fitohormonas relacionadas con el estrés (ácido abscísico y ácido salicílico) en la planta CAM, *Aptenia cordifolia* L. f. Schwantes. La violaxantina rápidamente se convertía en zeaxantina bajo condiciones de alta radiación, el estado de deepoxidación del ciclo de las xantofilas alcanzaba niveles máximos de 0,95 al mediodía en plantas regadas. Bajo condiciones de mayor demanda de fotoprotección causada por el déficit hídrico, las plantas mostraron un aumento significativo de los niveles de ácido abscísico y γ -tocoferol, seguidos por un descenso en los niveles de β -caroteno y de la relación F_v/F_m en los últimos estadios del estrés. La disminución de esta relación por debajo de 0,7 se correlacionó con un aumento sostenido en el estado de deepoxidación del ciclo de las xantofilas, el cual se mantuvo por encima de 0,90 durante la noche después de 15 días de déficit hídrico. A diferencia del ácido abscísico, los niveles de ácido salicílico se mantuvieron constantes bajo condiciones de déficit hídrico, mostrando una fuerte disminución durante el día tanto en condiciones regadas como bajo déficit hídrico. Podemos concluir que la planta CAM, *A. cordifolia* muestra diversas estrategias de aclimatación al déficit hídrico a corto plazo, incluyendo la acumulación de ácido abscísico y γ -tocoferol, así como un aumento sostenido del estado de deepoxidación del ciclo de las xantofilas, el cual está estrechamente relacionado con la fotoquímica del fotosistema II. La acumulación diferencial de los homólogos de tocoferol bajo

condiciones de déficit hídrico y las variaciones diarias de los niveles de ácido salicílico en esta planta CAM también serán discutidas.



Diurnal changes in photosystem II photochemistry, photoprotective compounds and stress-related phytohormones in the CAM plant, *Aptenia cordifolia*

Jana Cela, Laia Arrom, Sergi Munné-Bosch *

Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 645, E-08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 April 2009

Received in revised form 29 June 2009

Accepted 1 July 2009

Available online 7 July 2009

Keywords:

Abscisic acid

Baby sun rose (*Aptenia cordifolia*)

Salicylic acid

Tocopherols

Xanthophylls

Water deficit

ABSTRACT

Acclimation of photosynthetic light reactions to daily changes in solar radiation requires adjustments in photosystem II photochemistry and may be affected by environmental stresses, such as drought. In this study, we examined the effects of a short-term, severe water deficit on diurnal variations in photosystem II photochemistry, photoprotective compounds (tocopherols and carotenoids, including the xanthophyll cycle) and stress-related phytohormones (abscisic acid and salicylic acid) in the CAM plant, *Aptenia cordifolia* L. f. Schwantes. Violaxanthin was rapidly converted to zeaxanthin under high light, the de-epoxidation state of the xanthophyll cycle reaching maximum levels of 0.95 at midday in irrigated plants. Under a higher photoprotective demand caused by water deficit, plants showed significant increases in abscisic acid and γ -tocopherol levels, which were followed by decreases in β -carotene and the F_v/F_m ratio at later stages of stress. Decreases in this ratio below 0.70 correlated with sustained increases in the de-epoxidation state of the xanthophyll cycle, which kept above 0.90 at night after 15 days of water deficit. In contrast to abscisic acid, salicylic acid levels kept constant under water deficit and showed a sharp decrease during the day both under irrigated and water stress conditions. We conclude that the CAM plant, *A. cordifolia* showed several strategies of acclimation to short-term water deficit, including abscisic acid and γ -tocopherol accumulation, as well as sustained increases in the de-epoxidation state of the xanthophyll cycle, which was tightly coupled to daily variations in photosystem II photochemistry. The differential accumulation of tocopherol homologues under water deficit and the diurnal fluctuations of salicylic acid levels in this CAM plant will also be discussed.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Crassulacean acid metabolism (CAM) is considered to be an adaptive mechanism allowing many terrestrial and epiphytic succulents to survive in periodically droughted habitats. In CAM plants, carbon dioxide uptake occurs during the night, when stomata open; carbon dioxide is combined with phosphoenolpyruvate to yield oxaloacetate, which is reduced to malate. Malate is transported into the vacuole and malic acid accumulates during the night. Nocturnal acid accumulation and nocturnal stomatal aperture are the main diagnostic features of CAM. During the day malate is decarboxylated in the cytoplasm, providing Rubisco with increased partial pressures of carbon dioxide during C_3 photosynthesis. The net outcome of the functioning of CAM is that

carbon dioxide is fixed with significant water saving relative to C_3 photosynthesis, since the process occurs at times of lower evaporative demand and a larger air-leaf carbon dioxide concentration gradient [1–3].

In C_3 plants, water deficit may lead to an imbalance between the production and consumption of reducing equivalents and ATP in photosynthesis by inducing stomatal closure and consequently decreasing carbon dioxide assimilation during the day. This may enhance excess excitation energy in thylakoids of stressed plants, which must activate adequate photoprotection mechanisms, as those described for high light-acclimated plants, to dissipate excess energy and afford protection to photosystem II (PSII) [4]. Osmond suggested that high daytime partial pressures of carbon dioxide inside the leaves and re-fixation of respiratory CO_2 might contribute to the protection of the photosynthetic machinery against high irradiance with closed stomata in CAM plants [5]. Since then, some evidence has been gathered, most of it in facultative CAM plants, in favor of this hypothesis (reviewed by [3]). However, it has been shown that photoprotection through the xanthophyll cycle may not necessarily be more effective in CAM than in C_3 species, as shown in a comparison of *Clusia multiflora* (obligate C_3) and *Clusia minor* (facultative CAM). Zeaxanthin

Abbreviations: ABA, abscisic acid; CAM, crassulacean acid metabolism; Chl, chlorophyll; DPS, de-epoxidation state of the xanthophyll cycle; DW, dry weight; ϕ_{PSII} , relative efficiency of PSII photochemistry; F_v/F_m , maximum efficiency of PSII photochemistry; IR, irrigated; PPF, photosynthetically active photon flux density; PSII, photosystem II; SA, salicylic acid; WS, water-stressed.

* Corresponding author. Tel.: +34 934021463; fax: +34 934112842.

E-mail address: smunne@ub.edu (S. Munné-Bosch).

content and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence were equally large in both species subjected to high irradiance, precluding a specific role of CAM in energy dissipation. Nevertheless, leaves of *C. multiflora* became necrotic and died when plants were maintained for a long period under high irradiance, whereas leaves of *C. minor*, by switching to CAM, did not [6].

Baby sun rose (*Aptenia cordifolia* L. f. Schwantes, family Aizoaceae) is a perennial herb, spreading over ground and neighboring vegetation, with small, heart-shaped, dark green succulent leaves interspersed with small, axillary, many-petaled, bright pink to purple flowers. Baby sun rose, which is native to the coastal deserts of southern Africa, was first identified as a C_3 plant that induces CAM under salt stress [7], but later it was found to be an obligate CAM plant, both under water deficit and well-watered conditions [1,8]. In perennial obligate CAM plants, where up to 99% of CO_2 assimilation occurs during the night [9], our knowledge on the response of photoprotective mechanisms under water deficit is still very limited, although several studies have shown the importance of carotenoids, and particularly of xanthophyll cycle-dependent energy dissipation, in acclimation to high light stress [reviewed by 10].

Abscisic acid (ABA) is known to modulate key aspects of plant responses to water deficit such as transpiration efficiency, hydraulic conductivity and leaf expansion [11]. Furthermore, it has been shown that exogenous ABA can induce CAM metabolism in a number of species (reviewed by [12]) and it has been recently suggested that ABA might have a role in photoprotection in CAM plants, since exogenous ABA can induce chloroplast clumping in the leaf cells of two species of *Kalanchoë* under light [13]. Although it is well known that ABA levels increase in plant responses to drought stress, including some CAM plants (reviewed by [3]), to our knowledge no studies have evaluated diurnal variations in endogenous ABA contents in CAM plants exposed to water deficit. Although salicylic acid (SA) has also been shown to participate in plant responses to abiotic stress, including drought [14,15], no studies have been performed thus far to evaluate the role of this compound in CAM plants.

In a recent study, the influence of a short-term drought on diurnal gas exchange, malic and citric acid contents, water relations and chlorophyll fluorescence were evaluated in *A. cordifolia* [8]. In the present study, we aimed at better understanding how CAM plants respond to water deficit, and more particularly to what extent daily variations in PSII photochemistry, photoprotective compounds (tocopherols and carotenoids, including the xanthophyll cycle) and stress-related phytohormones (ABA

and SA) may be influenced by short-term drought in the CAM plant, *A. cordifolia*.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and growth conditions

Thirty plants of baby sun rose (*A. cordifolia*) were purchased in Verdflor, S.L. (Barcelona, Spain) on 28 June 2007. Plants, which were ~20 cm tall and were grown in pots of 100 mL capacity containing a mixture of soil:peat:perlite (1:1:1, by vol.), were immediately transferred outdoors at the experimental fields of the Faculty of Biology of the University of Barcelona, where they acclimated to full sunlight for 11 days until the experiment started, on 9 July 2007. Then, two water regimes were imposed on plants: irrigated (IR) plants were kept watered twice a week with Hoagland's solution, while water-stressed (WS) plants were not watered at all for up to 15 days. During the experiment (9–24 July 2007), plants were exposed to the following climatic conditions (maximum daily photosynthetically active photon flux density [PPFD] of $\sim 2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, photoperiod of $\sim 15/9$ h [day/night], and daily air temperature and relative humidity ranging 19–29 °C and 36–87%, respectively, Table 1). Environmental conditions were monitored by means of a weather station situated 100 m from plants and consisted of a PPFD pyranometer sensor CM11 (KIPP and ZONEN, Delft, The Netherlands) and a HMP35AC thermohygrometer (Vaisala, Helsinki, Finland).

Leaf hydration, chlorophyll fluorescence, photosynthetic pigments (chlorophylls and carotenoids, including the xanthophyll cycle), tocopherols, ABA and SA were measured in fully expanded young leaves on clear sunny days at pre-dawn (1 h before sunrise) at 0, 4, 10 and 15 days of experiment, and every 2–3 h at day 15 in both IR and WS plants. For measurement of photosynthetic pigments, tocopherols and phytohormones, leaves were collected, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until analysis.

2.2. Leaf hydration and chlorophyll fluorescence

Leaf hydration was determined as $(FW - DW)/DW$, where FW is the fresh weight and DW is the dry weight after oven-drying the leaves at 80 °C to constant weight. Chlorophyll fluorescence measurements were performed by using a mini-PAM (Walz, Effeltrich, Germany) as previously described [16]. The relative and maximum efficiencies of PSII photochemistry (ϕ_{PSII} and F_v/F_m , respectively) were calculated from chlorophyll fluorescence data obtained from leaves exposed to light during the day or

Table 1

Climatological conditions (maximum daily photosynthetically active photon flux density [PPFD], maximum and minimum daily air temperature, and maximum and minimum daily relative humidity), during the measurement days of the experiment; and PPFD, air temperature and relative humidity on sampling times (solar time) of 24 July.

Day of experiment	Days of water deficit	PPFD _{max} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	T_{max} (°C)	T_{min} (°C)	RH _{max} (%)	RH _{min} (%)
9 July	0	2086	28.6	21.1	87	36
13 July	4	1950	27.0	19.0	83	54
19 July	10	1872	28.3	21.9	84	52
24 July	15	1988	26.9	21.0	85	59
24 July	Time of day	PPFD ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	T (°C)		RH (%)	
	2:00	0	22.3		83	
	4:00	0	22.2		82	
	6:00	268	23.8		75	
	9:00	1540	24.8		63	
	12:00	1988	26.0		61	
	15:00	1316	25.4		67	
	18:00	124	23.4		74	
	20:00	0	22.5		79	
	23:00	0	22.9		73	

dark-adapted during the night, respectively, according to the equations developed by Van Kooten and Snel [17].

2.3. Photosynthetic pigments and tocopherols

The extraction and HPLC analyses of photosynthetic pigments and tocopherols were carried out as described [18]. In short, for extraction of photosynthetic pigments and tocopherols, lyophilized leaf samples were ground in liquid nitrogen and repeatedly extracted with ice-cold methanol using sonication until the extract was colorless. Pigments were separated on a nonendcapped Zorbax ODS-5 μm column (250 mm \times 4.6 mm, 20% C, Teknokroma, St. Cugat del Vallés, Spain) at 30 °C at a flow rate of 1 mL min⁻¹. The solvents consisted of (A) acetonitrile:methanol (85:15, v/v) and (B) methanol:ethyl acetate (68:32, v/v). The gradient used was: 0–14 min, 100% A; 14–16 min, decreasing to 0% A; 16–28 min, 0% A; 28–30 min, increasing to 100% A; and 30–38 min, 100% A. Detection was carried out at 445 nm (Diode array detector, HP1100 Series HPLC System; Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Tocopherols (α - and γ -tocopherol, and their respective oxidation products, α - and γ -tocopherol quinone) were separated on a Partisil 10 ODS-3 column (250 mm \times 4.6 mm, Scharlau, Barcelona, Spain) at a flow rate of 1 mL min⁻¹. The solvents consisted of (A) methanol:water (95:5, v/v) and (B) methanol. The gradient used was: 0–10 min, 100% A; 10–15 min, decreasing to 0% A; 15–20 min, 0% A; 20–23 min, increasing to 100% A; and 23–28 min, 100% A. Detection was carried out at 295 and 256 nm for α - and γ -tocopherol, and their respective quinones, respectively (Diode array detector, HP1100 Series HPLC System; Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

2.4. Phytohormone analyses

The extraction and analyses of ABA and SA were carried out essentially as described [19], except that UPLC–MS/MS was used instead of HPLC–MS/MS, thus allowing us to considerably shorten the run time for each sample. Lyophilized leaf samples were ground in liquid nitrogen and repeatedly extracted with ice-cold methanol using sonication until the extract was colorless. Then the extracts were combined, filtered through a 0.45 μm PTFE filter (Waters, Milford, MA, USA), and injected into the UPLC–MS/MS system.

The UPLC system consisted of Acquity Waters (Millford, MA, USA) binary pump equipped with an autosampler and an UV detector. For the analysis of the extracts, a Supelco Discovery C18 (Bellefonte, PA, USA) column (150 mm \times 2.1 mm, 5 μm) was used with a binary solvent system comprising acetonitrile (A) and deionized water (B), both containing 0.05% (v/v) glacial acetic acid. Separations were performed using a gradient of increasing acetonitrile content, at a constant flow rate of 0.4 mL min⁻¹. The gradient was increased linearly from 1.4% to 45.4% A over 20 min and held for 1 min. The acetonitrile content was then increased linearly to 100% A over 2 min. After 0.5 min, the initial conditions were restored and allowed to equilibrate for 2 min before next injection.

MS/MS analyses were performed on an API 3000 triple quadrupole mass spectrometer (PE Sciex, Concord, Ont., Canada). All the analyses were performed using the Turbo Ion spray source in negative ion mode in a single run. MRM acquisition was done monitoring the following transitions: ABA, 263/153; SA, 137/93. Quantification by MS/MS using the MRM method was performed as described [19]. The MRM mode was required because many compounds could present the same nominal molecular mass, but the combination of the parent mass and unique fragment ions was used selectively to monitor each of the compounds analyzed. Results were corrected taking into account the specific recovery rates for each compound (recovery rates were above 80% in all cases).

2.5. Statistical analyses

Statistical differences between treatments and measurements on different days or on different times of the day were analyzed following the analysis of variance ANOVA or Student's *t*-test using SPSS. Regression analyses were performed by using Sigma Plot. Differences were considered significant at a probability level of $P \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Water deficit causes photoinhibition in the CAM plant, *A. cordifolia*

The effects of short-term water deficit on PSII photochemistry were investigated in plants grown in small pots and exposed to maximum daily PPFD of $\sim 2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, photoperiod of $\sim 15/9$ h [day/night], and daily air temperatures ranging 19–29 °C (Table 1). IR plants showed leaf hydration contents around 11 g water/g DW throughout the study, while WS plants showed significant reductions in leaf hydration at day 10, attaining minimum leaf hydration contents of ca. 7 g water/g DW after 15 days of water deficit (Fig. 1). Despite this reduction in leaf water contents, chlorophyll (Chl) *a* + *b* levels kept constant throughout the study in WS plants. In contrast, PSII photochemistry was affected by water deficit, the F_v/F_m ratio decreasing from around 0.80 in IR plants to values below 0.70 after 15 days in WS plants (Fig. 1). The ϕ_{PSII} inversely correlated with solar irradiance, was decreasing during the morning and attaining values around 0.10 with maximum diurnal PPFD at midday both in IR and WS plants (Fig. 2). Although ϕ_{PSII} values did not differ significantly between IR and WS plants at midday, ϕ_{PSII} values recovered more rapidly and to a higher extent during the afternoon and evening in IR plants compared to WS plants (Fig. 2). Diurnal variations in ϕ_{PSII} were associated with the de-epoxidation state of the xanthophyll cycle (DPS), which negatively correlated with ϕ_{PSII} ($r^2 = 0.528$, $P \leq 0.05$). WS plants retained higher DPS values during the night, showing smaller daily fluctuations compared to IR plants. In contrast, diurnal variations in zeaxanthin levels did not differ significantly between IR and WS plants (Fig. 2).

3.2. Enhanced formation of γ -tocopherol and β -carotene degradation in WS plants

Among the four tocopherol homologues, only γ - and α -tocopherol were present in *A. cordifolia* leaves. In IR plants, γ -tocopherol represented around 17% of the total tocopherol accumulated in leaves, and both α - and γ -tocopherol kept constant throughout the study. In contrast, γ -tocopherol increased significantly from 54 to 74 $\mu\text{g/g}$ DW after 4 days of water deficit, reaching maximum levels after 10 days of stress, which were 64% higher in WS plants compared to IR plants (Fig. 3). After 10 days of water deficit, γ -tocopherol represented around 24% of the total tocopherol accumulated in leaves. γ -Tocopherol levels did not increase further after 10 days of water deficit (Fig. 3), while leaf hydration attained minimum levels after 15 days of stress (Fig. 1). α -Tocopherol levels did not differ significantly between IR and WS plants throughout the study (Fig. 3). γ - and α -tocopherol quinones were not detected throughout the study in *A. cordifolia* leaves neither in IR plants nor in WS plants. In contrast to tocopherols, β -carotene levels decreased up to 36% in WS plants. Contents of β -carotene changed in parallel with leaf hydration, attaining minimum levels after 15 days of water deficit (Fig. 3). Neither Chl *a* + *b*, Chl *a/b* ratio, β -carotene, nor α - and γ -tocopherol showed significant variations during the day either in IR or WS plants (Table 2).

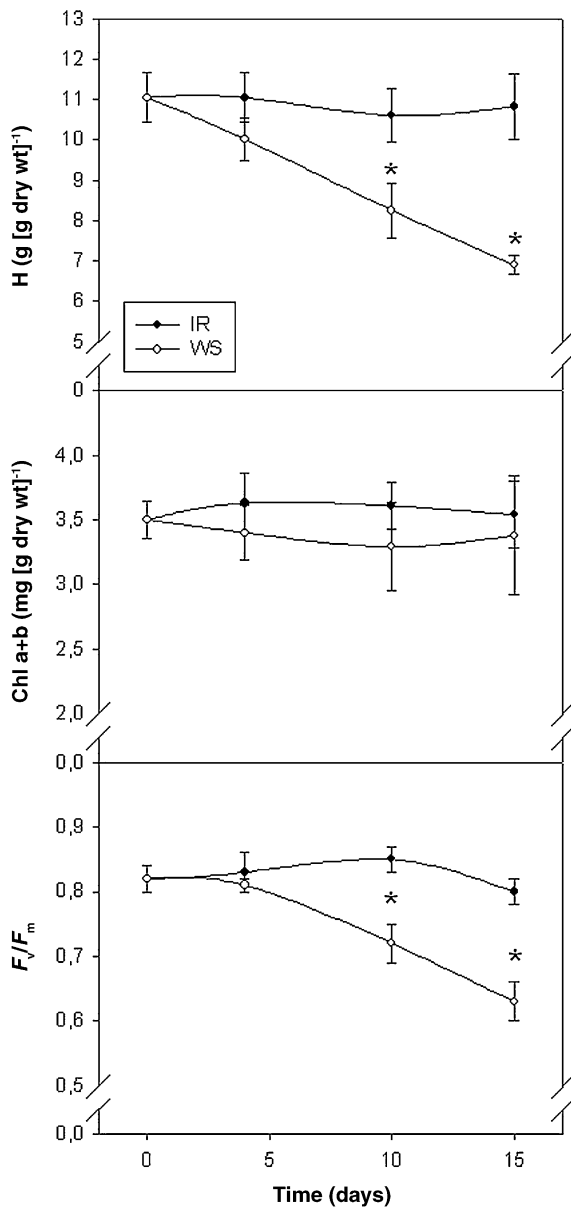


Fig. 1. Leaf hydration (H), chlorophyll (Chl) *a* + *b* contents and maximum efficiency of PSII (F_v/F_m ratio) of irrigated (IR, black symbols) and water-stressed (WS, white symbols) *A. cordifolia* plants. Data correspond to the mean \pm SEM of 5 measurements made at pre-dawn (1 h before sunrise). An asterisk indicates significant differences between IR and WS plants (Student's *t*-test, $P \leq 0.05$).

3.3. Diurnal and WS-related changes in ABA and SA accumulation in leaves

Endogenous ABA concentrations kept constant around 650 ng/g DW throughout the study in IR plants, while they increased to ca. 1100 ng/g DW after 4 days of water deficit in WS plants (Fig. 4). ABA levels did not increase further under stress and kept at similar high levels after 10 and 15 days of water deficit, with values 75% and 64% higher in WS plants compared to IR plants, respectively. SA levels were not significantly different throughout the study between IR and WS plants (Fig. 4). While no clear patterns of diurnal variations in ABA levels were observed either in IR or WS plants, endogenous concentrations of SA were severely affected by the time of day in both plant groups (Fig. 5). Endogenous SA concentrations were at their highest during the night and at early morning, while they attained their lowest values during the afternoon in IR plants, or midday and afternoon in WS plants.

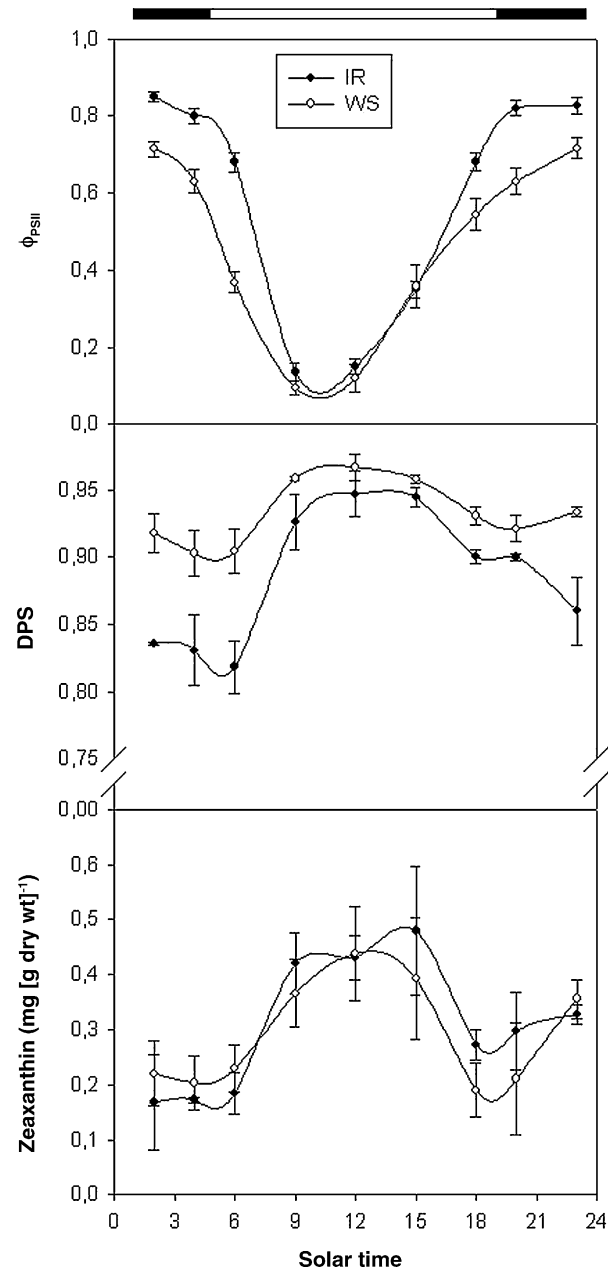


Fig. 2. Daily changes in the efficiency of PSII photochemistry (ϕ_{PSII}), de-epoxidation state of the xanthophyll cycle (DPS) and zeaxanthin accumulation in leaves of irrigated (IR, black symbols) and water-stressed (WS, white symbols) *A. cordifolia* plants. Data represent the mean \pm SEM of 3 and 5 measurements for xanthophylls and ϕ_{PSII} , respectively, made every 2–3 h during 24 July 2007, which corresponds to 15 days of water deficit for WS plants. DPS was calculated as $(Z + 0.5A)/(V + A + Z)$, where Z is zeaxanthin, A is antheraxanthin and V is violaxanthin.

Diurnal variations in SA concentrations were identical in IR and WS plants, except that minimum levels during the day were attained earlier in WS plants compared to IR plants (Fig. 5).

4. Discussion

Acclimation of photosynthetic light reactions to high light requires structural and functional dynamics, which occur in the timescale from seconds to several days. At high light, the dissipation of excess excitation energy as heat is rapidly set up. It requires, at least, the ΔpH -dependent activation of violaxanthin de-epoxidase and involvement of the PsbS protein. Also, it is crucial

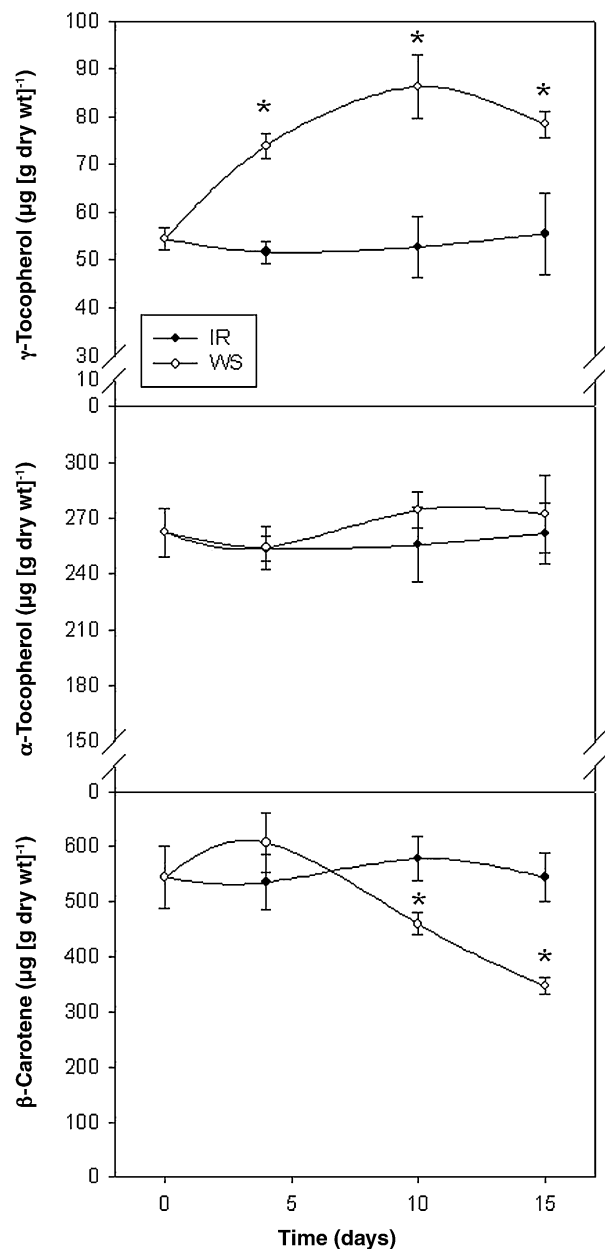


Fig. 3. Levels of the antioxidants, α - and γ -tocopherol, and β -carotene in leaves of irrigated (IR, black symbols) and water-stressed (WS, white symbols) *A. cordifolia* plants. Data correspond to the mean \pm SEM of 3 measurements made on samples collected at pre-dawn (1 h before sunrise). An asterisk indicates significant differences between IR and WS plants (Student's *t*-test, $P \leq 0.05$).

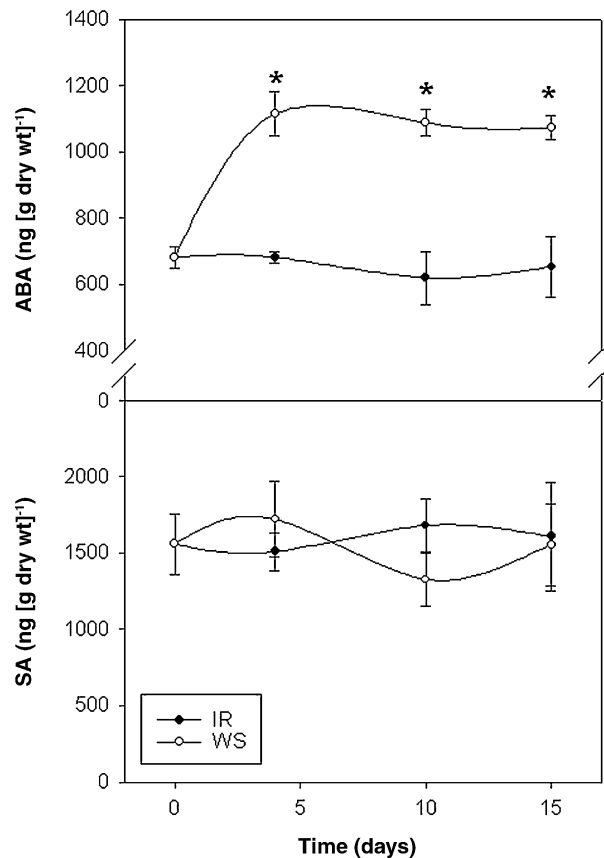


Fig. 4. Endogenous concentrations of abscisic acid (ABA) and salicylic acid (SA) in leaves of irrigated (IR, black symbols) and water-stressed (WS, white symbols) *A. cordifolia* plants. Data correspond to the mean \pm SEM of 3 measurements made on samples collected at pre-dawn (1 h before sunrise). An asterisk indicates significant differences between IR and WS plants (Student's *t*-test, $P \leq 0.05$).

for protection against the high light stress the function of the PSII repair cycle, which involves recycling of the D1 protein. Furthermore, the water–water cycle, cyclic electron transfer around PSI and formation of singlet oxygen and its consequent detoxification by antioxidants, mainly carotenoids and tocopherols, are important protection means induced under high light [20–23].

Water deficit severely affected PSII photochemistry and photoprotection in *A. cordifolia* plants exposed to short-term water deficit. As water deficit on plants was imposed in small pots, water stress was severe, as indicated by time course evolution in leaf hydration, which decreased by 38% after 15 days of withholding water. Despite ABA levels increased sharply after 4 days of water deficit, which could help maintaining water contents during this period [11], this phytohormone did not increase

Table 2

Daily changes in chlorophyll (Chl) *a* + *b* levels, the Chl *a*/*b* ratio, and contents of β -carotene, α - and γ -tocopherol in *A. cordifolia* plants either irrigated (IR plants) or exposed to water deficit for 15 days (WS plants). Data correspond to the mean \pm SEM of 3 measurements made on samples collected at pre-dawn (1 h before sunrise), midday (at maximum diurnal PPFD) and evening (1 h after sunset). No significant differences between times of day were observed in any of the parameters analyzed (Student's *t*-test, $P \leq 0.05$). Chl *a* + *b* levels are given as mg/g DW, while β -carotene and tocopherol levels are given as μ g/g DW.

	IR plants			WS plants		
	Pre-dawn	Midday	Evening	Pre-dawn	Midday	Evening
Chl <i>a</i> + <i>b</i>	3.54 \pm 0.26	3.29 \pm 0.42	3.83 \pm 0.73	3.38 \pm 0.46	3.85 \pm 0.18	3.50 \pm 0.89
Chl <i>a</i> / <i>b</i>	2.09 \pm 0.09	2.00 \pm 0.01	2.01 \pm 0.04	1.99 \pm 0.08	1.83 \pm 0.11	2.04 \pm 0.12
β -Carotene	544 \pm 44	458 \pm 65	535 \pm 89	347 \pm 15	358 \pm 32	370 \pm 0.89
α -Tocopherol	262 \pm 16	270 \pm 7	254 \pm 46	272 \pm 20	276 \pm 9	290 \pm 34
γ -Tocopherol	55 \pm 8	54 \pm 3	52 \pm 2	78 \pm 3	81 \pm 5	72 \pm 11

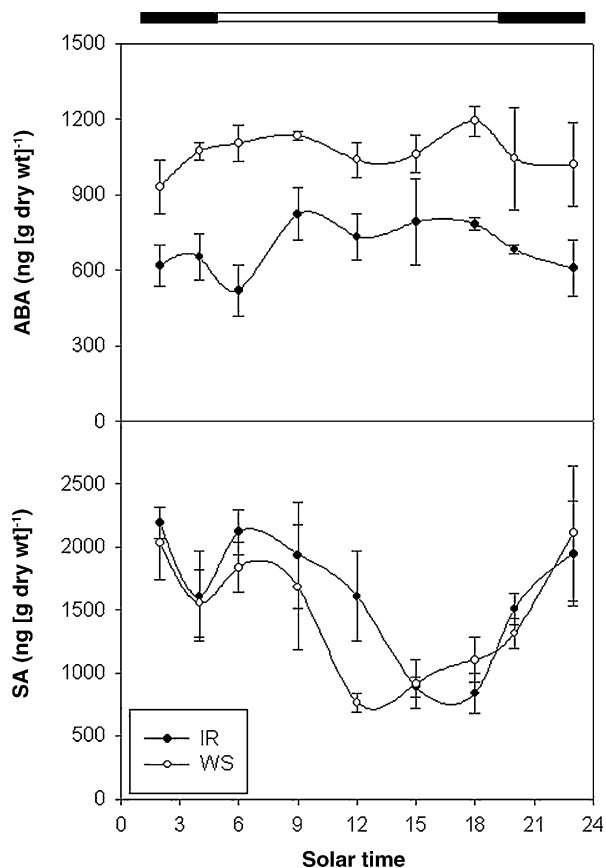


Fig. 5. Daily changes in the endogenous levels of abscisic acid (ABA) and salicylic acid (SA) in leaves of irrigated (IR, black symbols) and water-stressed (WS, white symbols) *A. cordifolia* plants. Data represent the mean \pm SEM of 3 measurements made every 2–3 h during 24 July 2007, which corresponds to 15 days of water deficit for WS plants.

further, which might be associated with the leaf water loss observed later. Therefore, the present study allowed us to study the response of plants to severe water deficit and how this species affords protection to the photosynthetic apparatus when water loss cannot be avoided. This, together with the fact that studies were performed under high light conditions, allowed us to study what is the response of this species when there is a strong photoprotective demand associated with a severe water loss.

Together with α -tocopherol, the xanthophylls, and especially zeaxanthin have been ascribed a protective function in thylakoids. The high light- and drought-adapted plants display large pools of α -tocopherol and xanthophylls and maximal conversion to zeaxanthin [18,24–27]. Almost all violaxanthin was de-epoxidized to zeaxanthin at midday in IR plants (DPS of ca. 0.94), thus indicating a high demand for dissipation of excess excitation energy in leaves. When the photoprotective demand was additionally increased by short-term water deficit, a nocturnal increase in the DPS was observed, which was associated with smaller F_v/F_m ratios. These results suggest that water stress led to increased susceptibility to photoinhibition, which might be attributed to a photoprotective process rather than to a photo-damage process. Such a photoprotection was associated with an enhanced formation of zeaxanthin via de-epoxidation of violaxanthin at midday, but not with increased accumulation of zeaxanthin at night. Indeed, it has been suggested that under lasting stress conditions and in some plant species, the flexible dissipation of excess energy is replaced by a highly effective, but less flexible continuous engagement of zeaxanthin in dissipation that does not require a Δ pH. Under these conditions, the

xanthophyll cycle itself is arrested in its photoprotective form—as the photochemical system is maintained in its dissipative state (reviewed by [28]). It appears that this Δ pH-independent, less flexible, but potent form of dissipation is particularly pronounced in long-lived, slow-growing evergreen species with a limited capacity for photosynthesis, propensity to down regulate photosynthesis under stress and ability to survive prolonged periods of severe environmental conditions that preclude growth (reviewed by [28]). Results obtained in the present study suggest therefore that *A. cordifolia* is one of the species that have developed this capacity for sustained dissipation of excess energy, and warrants further research aimed at unraveling other factors that contribute to this mechanism.

β -Carotene is very efficient in the scavenging of triplet chlorophyll in antenna complexes, and cooperates with α -tocopherol in the scavenging of singlet oxygen produced in the reaction center of PSII [29–32]. It has been proposed that the location of two β -carotene molecules on the D2 polypeptide means there is more oxidative damage to the D1 protein and that this underlies the fact that this latter protein is continuously re-synthesized, at a far greater rate than any other protein involved in photosynthesis [33]. Thus, the water stress induced degradation of β -carotene observed in the present study might be associated with enhanced photogenerated singlet oxygen in chloroplasts. However, α -tocopherol, tocopherol quinones and Chl levels kept constant in WS plants, which suggest that chloroplasts were not suffering photo-oxidative damage. It appears therefore that the photoprotection conferred by carotenoids was efficient in avoiding irreversible damage to the photosynthetic apparatus.

In contrast, γ -tocopherol levels increased during early stages of water deficit in *A. cordifolia* plants. What is the function of this tocopherol form in this obligate CAM plant? Indeed, this is to our knowledge the first report on tocopherol levels in CAM plants. Both α - and γ -tocopherol may protect chloroplasts from reactive oxygen species, but it has been suggested that γ -tocopherol specifically protects plants from osmotic stress [34]. Although further research is needed, it may therefore be speculated that *A. cordifolia* plants increased γ -tocopherol levels during early stages of water deficit, and in parallel with ABA increases, this helped prevent leaf desiccation.

Also, we evaluated the diurnal variations in ABA and SA levels in *A. cordifolia* plants exposed to water deficit. ABA levels did not show significant variations during the day, in agreement with two previous studies in the CAM plants, *Ananas comosus* [35] and *Mesembryanthemum nodiflorum* [36]. In contrast, endogenous concentrations of SA decreased during the day in *A. cordifolia* plants. To our knowledge, this is the first study on SA levels in CAM plants and on diurnal variations in SA levels in plants, although other studies have evaluated how endogenous concentrations of this compound are affected by water deficit in C_3 plants, giving contrasting results depending on the species and magnitude of stress imposed [14,37,38]. In the present study, SA levels decreased significantly at midday and kept at low levels during the afternoon in WS plants, and also decreased during the afternoon in IR plants, thus indicating that endogenous SA concentrations are regulated on a diurnal basis in this CAM plant. Further research is however needed to unravel the processes (degradation, conjugation) and enzyme(s) involved in this diurnal-dependent regulation of SA levels in CAM species, and examine which factors (light, temperature and/or others) modulate diurnal fluctuations in SA levels.

It is concluded that *A. cordifolia* plants showed several strategies of acclimation to short-term water deficit, including ABA and γ -tocopherol accumulation, and both transient and sustained increases in the DPS, which were tightly coupled to daily variations in PSII photochemistry. The specific function of γ -tocopherol as

well as the mechanisms involved in the diurnal regulation of SA levels in this CAM plant warrants further investigations.

Acknowledgments

We are very grateful to the Serveis Científico-Tècnics and Serveis dels Camps Experimentals (Universitat de Barcelona) for technical assistance. We also thank Marc Roig for his help in sampling. This work was supported by the Ministry of Education and Science of the Spanish Government (project no. BFU2006-01127). Support for the research of S.M. was also received through the prize ICREA Academia, funded by the Generalitat de Catalunya.

References

- [1] M. Kluge, I.P. Ting, *Crassulacean Acid Metabolism*, Springer Verlag, Berlin, 1978.
- [2] K. Winter, J.A.C. Smith, *Crassulacean Acid Metabolism: Biochemistry, Ecophysiology and Evolution*, Springer Verlag, Berlin, 1996.
- [3] A. Herrera, Crassulacean acid metabolism and fitness under water deficit stress: if not for carbon gain, what is facultative CAM good for? *Ann. Bot.* 103 (2009) 645–653.
- [4] N. Smirnov, The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation, *New Phytol.* 125 (1993) 27–58.
- [5] C.B. Osmond, Carbon cycling and stability of the photosynthetic apparatus in CAM, in: I.P. Ting, M. Gibb (Eds.), *Crassulacean Acid Metabolism*, Springer Verlag, Berlin, 1982, pp. 112–127.
- [6] U. Lüttge, *Clusia: A Woody Neotropical Genus of Remarkable Plasticity and Diversity*, Springer Verlag, Heidelberg, 2007.
- [7] S. Treichel, Crassulaceansäurestoffwechsel bei einem saltoleranten Vertreter der Aizoacea: *Aptenia cordifolia*, *Plant Sci. Lett.* 4 (1975) 141–144.
- [8] W.B. Herppich, K. Peckmann, Responses of gas exchange, photosynthesis, nocturnal acid accumulation and water relations of *Aptenia cordifolia* to short-term drought and rewatering, *J. Plant Physiol.* 150 (1997) 141–144.
- [9] P.S. Nobel, *Environmental Biology of Agaves and Cacti*, Cambridge University Press, Cambridge, 1988.
- [10] U. Lüttge, Light-stress and crassulacean acid metabolism, *Phyton* 40 (2000) 65–82.
- [11] A.J. Thompson, J. Andrews, B.J. Mulholland, J.M.T. McKee, H.W. Hilton, J.S. Horridge, G.D. Farquhar, R.C. Smeaton, I.R.A. Smillie, C.R. Black, I.B. Taylor, Overproduction of abscisic acid in tomato increases transpiration efficiency and root hydraulic conductivity and influences leaf expansion, *Plant Physiol.* 143 (2007) 1905–1917.
- [12] T. Taybi, J.C. Cushman, A.M. Borland, Environmental, hormonal and circadian regulation of crassulacean acid metabolism expression, *Funct. Plant Biol.* 29 (2002) 669–678.
- [13] A. Kondo, J. Kaikawa, T. Funaguma, O. Ueno, Clumping and dispersal of chloroplasts in succulent plants, *Planta* 219 (2004) 500–506.
- [14] S. Munné-Bosch, J. Peñuelas, Photo- and antioxidative protection, and a role for salicylic acid during drought and recovery in field-grown *Phillyrea angustifolia* plants, *Planta* 217 (2003) 758–766.
- [15] T. Senaratna, D. Touchell, T. Bunn, K. Dixon, Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants, *Plant Growth Regul.* 30 (2000) 157–161.
- [16] S. Munné-Bosch, S. Nogués, L. Alegre, Diurnal variations of photosynthesis and dew absorption by leaves in two evergreen shrubs growing in Mediterranean field conditions, *New Phytol.* 144 (1999) 109–119.
- [17] O. van Kooten, J.F.H. Snel, The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology, *Photosynth. Res.* 25 (1990) 147–150.
- [18] S. Munné-Bosch, L. Alegre, Drought-induced changes in the redox state of α -tocopherol, ascorbate and the diterpene carnosic acid in chloroplasts of Labiatae species differing in carnosic acid contents, *Plant Physiol.* 131 (2003) 1816–1825.
- [19] M.E. Abreu, S. Munné-Bosch, Salicylic acid deficiency in NahG transgenic lines and sid2 mutants increases seed yield in the annual plant *Arabidopsis thaliana*, *J. Exp. Bot.* 60 (2009) 1261–1271.
- [20] K.K. Niyogi, Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50 (1999) 333–359.
- [21] K. Asada, The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50 (1999) 601–639.
- [22] E. Kanervo, M. Suorsa, E.M. Aro, Functional flexibility and acclimation of the thylakoid membrane, *Photochem. Photobiol. Sci.* 4 (2005) 1072–1080.
- [23] J. Peñuelas, S. Munné-Bosch, Isoprenoids: an evolutionary role for photoprotection, *Trends Plant Sci.* 10 (2005) 166–169.
- [24] K. Hormaetxe, R. Esteban, J.M. Becerril, J.I. García-Plazaola, Dynamics of the α -tocopherol pool as affected by external (environmental) and internal (leaf age) factors in *Buxus sempervirens* leaves, *Physiol. Plant* 125 (2005) 333–344.
- [25] J.I. García-Plazaola, J.M. Becerril, A. Hernández, U. Niinemets, H. Kollist, Acclimation of antioxidant pools to the light environment in a natural forest canopy, *New Phytol.* 163 (2004) 87–97.
- [26] U. Hansen, B. Fiedler, B. Rank, Variation of pigment composition and antioxidative systems along the canopy gradient in a mixed beech/oak forest: a comparative study on deciduous tree species differing in shade tolerance, *Trees* 16 (2002) 354–364.
- [27] S. Munné-Bosch, L. Alegre, Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants, *Planta* 210 (2000) 925–931.
- [28] B. Demmig-Adams, W.W. Adams III, Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation, *New Phytol.* 172 (2006) 11–21.
- [29] A. Trebst, B. Depka, H. Holländer-Czytko, A specific role for tocopherol and of chemical singlet oxygen quenchers in the maintenance of photosystem II structure and function in *Chlamydomonas reinhardtii*, *FEBS Lett.* 516 (2002) 156–160.
- [30] S. Munné-Bosch, L. Alegre, The function of tocopherols and tocotrienols in plants, *Crit. Rev. Plant Sci.* 21 (2002) 31–57.
- [31] S. Munné-Bosch, The role of α -tocopherol in plant stress tolerance, *J. Plant Physiol.* 162 (2005) 743–748.
- [32] M. Havaux, F. Eymery, S. Porfirova, P. Rey, P. Dörmann, Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell* 17 (2005) 3451–3469.
- [33] A. Telfer, Too much light? How β -carotene protects de photosystem II reaction centre, *Photochem. Photobiol. Sci.* 12 (2005) 950–956.
- [34] A. Abbasi, M. Hajirezaei, D. Hofius, U. Sonnewald, L.M. Voll, Specific roles of α - and γ -tocopherol in abiotic stress response of transgenic tobacco, *Plant Physiol.* 143 (2007) 1720–1738.
- [35] C.C. Nievola, J.E. Kraus, L. Freschi, B.M. Souza, H. Mercier, Temperature determines the occurrence of CAM and C_3 photosynthesis in pineapple plantlets grown *in vitro*, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 41 (2005) 832–837.
- [36] M.I. Elamry, A.K. Hegazy, Age-specific changes of acidity, phosphoenolpyruvate carboxylase, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, abscisic acid and leaf water potential in *Mesembryanthemum nodiflorum*, *Biol. Plant.* 40 (1998) 219–228.
- [37] M.E. Abreu, S. Munné-Bosch, Salicylic acid may be involved in the regulation of drought-induced leaf senescence in perennials: a case study in field-grown *Salvia officinalis* L. plants, *Environ. Exp. Bot.* 64 (2008) 105–112.
- [38] S. Munné-Bosch, V. Falara, I. Pateraki, M. López-Carbonell, J. Cela, A.K. Kanellis, Physiological and molecular responses of the isoprenoid biosynthetic pathway in a drought-resistant Mediterranean shrub, *Cistus creticus* exposed to water deficit, *J. Plant Physiol.* 166 (2009) 136–145.

Capítulo 4: Aclimatación a la alta salinidad en la planta invasora y CAM *Aptenia*

cordifolia

Acclimation to high salinity in the invasive CAM plant *Aptenia cordifolia*

Jana Cela, Sergi Munné-Bosch

Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona,
Barcelona, Spain

Enviado a *Plant Ecology and Diversity*

Resumen

Antecedentes: Las plantas invasoras, como la *Aptenia cordifolia*, crecen rápidamente en diferentes hábitats colonizando grandes superficies del suelo. Sin embargo, los mecanismos de aclimatación al estrés salino no se han estudiado en esta planta CAM obligada.

Objetivos: Se evaluó la capacidad de esta especie de soportar el estrés salino en términos de crecimiento, fotoprotección y cambios en los niveles de fitohormonas.

Resultados: Esta especie no fue sólo muy resistente a la salinidad extrema (hasta 650 mM de NaCl) a corto plazo (14 días) sino que también lo fue a altas dosis de salinidad (150 mM NaCl) a largo plazo (durante 42 días); se observó una mejora en el estado hídrico foliar y en la producción de biomasa fresca. Esto ocurrió simultáneamente con un aumento en los niveles de zeatina, mientras que las concentraciones de otras fitohormonas no se vieron afectadas. Además, las plantas fueron capaces de mantener la eficiencia máxima del PSII (un indicador de daño en el PSII) por encima de 0,80 durante los 42 días a 150 mM de NaCl, y por encima de 0,50 durante los 14 días con altas dosis de salinidad (incluyendo los 650 mM NaCl).

Conclusiones: Se puede concluir que *A. cordifolia* no sólo ha desarrollado mecanismos de adaptación a altas dosis de salinidad sino que es capaz de tomar ventaja en estas condiciones, aumentando el contenido hídrico foliar y la producción de biomasa fresca, aumentando su competencia ecológica en ambientes salinos.

Acclimation to high salinity in the invasive CAM plant *Aptenia cordifolia*

Jana Cela and Sergi Munné-Bosch*

Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal, 643, E-08028 Barcelona, Spain

Background: Invasive species such as *Aptenia cordifolia* grow rapidly in different habitats colonizing large areas of soil surface. However, mechanisms of acclimation to salt stress have not been explored thus far in this obligate CAM plant.

Aims: We evaluated the capacity of this species to withstand salt stress in terms of growth, photoprotection and changes in phytohormones.

Results: This species was not only very resistant to extreme salinity (up to 650 mM NaCl) in the short-term (14 days) but also to high salt concentrations (150 mM NaCl) in the long-term (42 days); improvements in leaf water status and fresh biomass production were also observed. This occurred concurrently with an increase in zeatin levels, while concentrations of other phytohormones were unaffected. Furthermore, plants were able to maintain the F_v/F_m ratio - an indicator of damage to PSII - above 0.80 for 42 days at 150 mM NaCl, or above 0.50 for 14 days at extreme salinity (up to 650 mM NaCl).

Conclusions: We conclude that *A. cordifolia* has not only evolved mechanisms to adapt to high salinity but is able to take advantage of such conditions, by increasing leaf water content and fresh biomass production, highlighting its ecological competence in saline environments.

Keywords: CAM plant, invasive species, photoprotection, phytohormones, salt stress

Abbreviations: ABA, abscisic acid; ACC, 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid; GA, gibberellin; IAA, indole-3-acetic acid; 2iP, isopentenyladenine; IPA, isopentenyladenosine; JA, jasmonic acid; SA, salicylic acid; Z, zeatin; ZR, zeatin riboside.

Introduction

Invasive plant species are non-indigenous, or non-native, species of plants that adversely affect the habitats and bioregions they invade, from an ecological, environmental and even economic perspective. The nature of the disruption is a dominant colonization of a particular habitat or wild land area, often made possible by a lack of natural controls (i.e. predators or herbivores). Common traits of invasive species include combined asexual and sexual reproduction, fast growth and rapid reproduction, high dispersal ability, an association with humans (e.g. horticultural interest) and phenotypic plasticity, which facilitates a tolerance to a wide range of environmental conditions (Pimentel 2011). Since more than 6% of the world's land suffers from salinity problems – a threat that is increasing in the context of global change, particularly in arid and semi-arid regions of the globe (Pereira et al. 2009) – invasive species with a high capacity to adapt to salt stress are becoming increasingly problematic.

Unless plants overcome the problem of salinity by solute accumulation, stomatal closure or through other means, it reduces plant growth by altering plant water and ion homeostasis leading to osmotic stress and ion toxicity (Munns 2002). Stomatal closure can, however, cause a reduction in photosynthesis, which can lead to excess excitation energy in the chloroplasts. This is due to a decoupling between ATP and NADPH formation by photophosphorylation and photosynthetic electron transport, and their consumption during the Calvin cycle due a reduction in the availability of CO₂ for carboxylation. If this is not safely dissipated, it may result in damage to PSII due to an over-reduction of reaction centres and an inhibition of the PSII repair process (Takahashi and Badger 2011). In CAM plants, CO₂ assimilation occurs during the night when stomata are open. Therefore the decarboxylation process that occurs during the day will determine the amount of CO₂ available for Rubisco.

*Corresponding author: E-mail: smunne@ub.edu

Consequently, if the decoupling between ATP and NADPH formation and utilization occurs in CAM plants, it is not directly associated with stomatal closure as it is in C_3 plants. Despite this, CAM plants still require efficient mechanisms of photoprotection; they can survive under fluctuating light environments and some of them are also very resistant to high light stress. Consequently, they develop both internal and external photoprotection mechanisms, such as xanthophyll cycle-dependent energy dissipation and reflective epicuticular waxes, respectively (Barker et al. 1997). The former serves as one of the most important mechanisms of photoprotection both quantitatively and because of its flexibility and speed of activation in fluctuating light environments (Demmig-Adams and Adams 2002). However, when this mechanism functions at its highest rates, when plants should be capable of withstanding even higher doses of excess excitation energy, which usually occurs when stresses are combined (e.g. salt stress with intense light), reactive oxygen species (ROS), such as singlet oxygen in PSII or superoxide anion in PSI can be produced, resulting in the uncontrolled oxidation of proteins, nucleic acids and lipids. This can potentially lead to the destruction of the photosynthetic apparatus (Asada 2006). To prevent ROS from damaging cellular components, plants have evolved various antioxidant enzymes and antioxidant molecules, including the so-called ascorbate-glutathione cycle (Foyer and Noctor 2005), which is very effective at removing the hydrogen peroxide produced from the dismutation of the superoxide anion in PSI, and the concerted action of the tocopherols and β -carotene quenching singlet oxygen in PSII (Trebst 2003).

Aptenia cordifolia (L. f.) Schwantes, also known as *Mesembryanthemum cordifolium* (baby sun rose or heartleaf iceplant), is a species of succulent plant from the Aizoaceae family that undergoes CAM metabolism (Herppich et al. 1997, Trípodí and Podestá 2003). Native to southern Africa, this species has become very invasive in the rest of the world. This is in part because it has become a popular ornamental plant and partly because of its unique ecophysiology. It is a mat-forming perennial herb, which grows rapidly in flat clumps on the ground from a woody base. It is extremely aggressive and out-competes native species. It propagates very easily from clippings and once established can easily recover from freezing episodes and, being a drought-tolerant species, requires very little water (Cela et al. 2009). Although it is invasive and crowds out native dune plants, therefore easily growing in saline environments, its response to salt stress has not been explored and to the best of our knowledge, thus far nothing is known about the mechanisms this plant species has evolved to withstand salt stress.

The aim of this study was to establish how *A. cordifolia* plants respond to long-term and short-term salt stress, with an emphasis on evaluating the effects of salinity on growth, activation of photoprotection mechanisms and changes in phytohormone levels.

Materials and methods

Plant material, treatments and sampling

Two salt stress experiments were performed on *A. cordifolia* plants, which were purchased from a nursery (Verdflor, S.L., Barcelona, Spain) and grown under controlled conditions in pots of 100 mL capacity. The mixture contained soil, peat and perlite (1:1:1, v/v/v) as described previously (Cela et al. 2009). For Experiment 1, plants were subjected to two treatments: (i) control plants were kept watered with tap water every two days, and (ii) salt-stressed plants were supplemented with 150 mM NaCl. The response of plants to salt stress was evaluated once every 6–8 days for a total of 42 days. For Experiment 2, tap water was supplemented with eight different salt concentrations (0, 50, 150, 250, 350, 450, 550 and 650 mM NaCl). The plant response to different salt concentrations was evaluated only once after 14 days of treatments. In both experiments plants were grown outdoors in the Experimental Fields of the Faculty of Biology of the University of Barcelona during the summer and all measurements were performed on young leaves (situated in the uppermost part of the branches) at midday. Plants were therefore exposed to a combination of salt stress and intense solar radiation. Climatic conditions were monitored with a portable Quantum sensor (Li-Cor, Lincoln, NE, USA) and a thermohygrometer (Vaisala, Helsinki, Finland). During Experiment 1, measurements starting on 27 July 2010 were performed at an incident PPFD between 1,500 and 1,950 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. However this was not the case on days 8 and 35, which corresponded to variable cloudy days (Fig. 1). During sampling, air temperature and relative humidity ranged from 28–35°C and 34–55%, respectively, typical of a Mediterranean summer. During Experiment 2, measurements after 2 weeks of salt treatments were performed on 6 June 2011 at midday, with an incident PPFD of 1,500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, air temperature of 23°C and a relative humidity of 51%.

Water contents and chlorophyll fluorescence

Relative water content was determined as $\text{RWC} = (\text{FW} - \text{DW}) / (\text{TW} - \text{DW}) \times 100$, where FW is the fresh weight, TW is the turgid weight after 24 h of re-hydration at 4°C in darkness, and DW is the dry weight after oven-drying the leaves at 80°C to constant weight. Leaf hydration was determined as $H = (\text{FW} - \text{DW}) / \text{DW}$. The relative and maximum efficiencies of PSII photochemistry (Φ_{PSII} and F_v/F_m , respectively) were determined by using a pulse-modulated

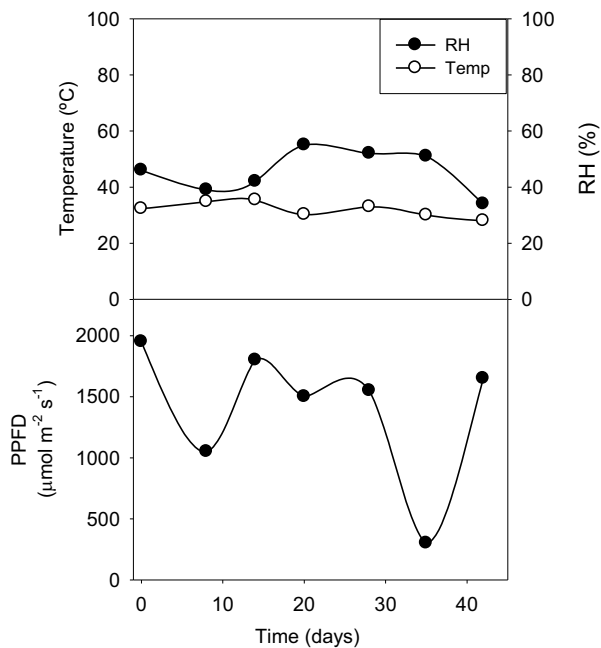


Figure 1. Climatological conditions (air temperature, relative humidity and photosynthetically active photon flux density [PPFD]) during the measurement days of Experiment 1.

fluorometer mini-PAM (Walz, Effeltrich, Germany) in attached leaves at midday and after 1 h of dark adaptation, respectively, as described by Genty et al. (1989).

Photosynthetic pigments and tocopherols

The HPLC analysis of photosynthetic pigments (including chlorophylls and carotenoids) and tocopherols were carried out as described by Cela et al. (2009) and Amaral et al. (2005), respectively.

Phytohormones

The extraction and UPLC-MS/MS analyses of phytohormones, including auxins, cytokinins, gibberellins (GAs), abscisic acid (ABA), 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid (ACC, the ethylene precursor), jasmonic acid (JA) and salicylic acid (SA), were performed as described by Müller and Munné-Bosch (2011).

Statistical analysis

Statistical differences between treatments and measurements on different days of Experiment 1 and the differences between different concentrations of Experiment 2 were analyzed with analysis of variance (ANOVA) using SPSS software. Differences were considered significant at a probability level of $P \leq 0.05$.

Results

Salt stress improves growth and water contents

Salt stress in the long-term (150 mM NaCl for 42 days, Experiment 1) and even higher salt doses for 14 days (Experiment 2) did not decrease leaf growth in the CAM plant, *A. cordifolia*. On the contrary, leaf growth (expressed as fresh biomass production) were significantly higher at concentrations of 150 mM NaCl compared to controls. This was observed during the period between the second and fifth week of treatment, while during the later stages of this long-term experiment, no differences were detected (Fig. 2). Although we observed that very high doses of salt stress over a period of 14 days caused a reduction in leaf growth, the differences were not significant (ANOVA, $P \leq 0.05$). The same trend was observed for leaf growth expressed as dry biomass, but again differences were not significant (Fig. 2). An analysis of the leaf water status, estimated as RWC and H, revealed an increase in water content from 20 days onwards at 150 mM NaCl, and an improvement in the leaf water hydration at concentrations of up to 350 mM NaCl (Fig. 2).

Plants can avoid chlorophyll loss and damage to PSII under salt stress

Significant reductions in chlorophyll levels were not observed at concentrations of 150 mM NaCl in the long-term or at concentrations of up to 350 mM NaCl over 14 days (Fig. 3). However, at salt doses of 450 mM or higher a reduction in chlorophyll levels was observed. This was most evident in the oldest leaves, which showed clear symptoms of damage and even necrosis. In addition, salt doses of or exceeding 250 mM NaCl inhibited flowering (Fig. 4). Young leaves were, however, very resistant to 150 mM NaCl over 42 days, which was also indicated by constant $\text{Chl } a/b$, F_v/F_m and Φ_{PSII} (Fig. 3). These parameters, most particularly $\text{Chl } a/b$ and F_v/F_m ratios, were significantly reduced at salt concentrations of or above 250 mM NaCl (ANOVA, $P \leq 0.05$, Fig 3). Note that in the long-term experiments, Φ_{PSII} was largely dependent on the incident PPFD i.e. decreasing Φ_{PSII} (Fig. 3) was observed at midday when PPFD decreased (Fig. 1).

Levels of lutein and the xanthophyll cycle (VZA) pool per unit of chlorophyll were unaltered at 150 mM NaCl for 42 days, but increased with higher doses of salinity (Fig. 5). However, differences were not observed when values were expressed on a dry weight basis (Suppl. Fig. 1). The de-epoxidation of the xanthophyll cycle (DPS) was unaltered at 150 mM NaCl for 42 days, but at 50 mM NaCl decreased significantly relative to the other salt doses after 14 days of treatment. It is worth noting that DPS values were high (between 0.6 and 0.8) throughout Experiment 1 and very high (above 0.8) during Experiment 2 (Fig. 5). β -Carotene, α -tocopherol and γ -tocopherol levels per unit of chlorophyll were unaltered at 150 mM NaCl for 42 days and at higher

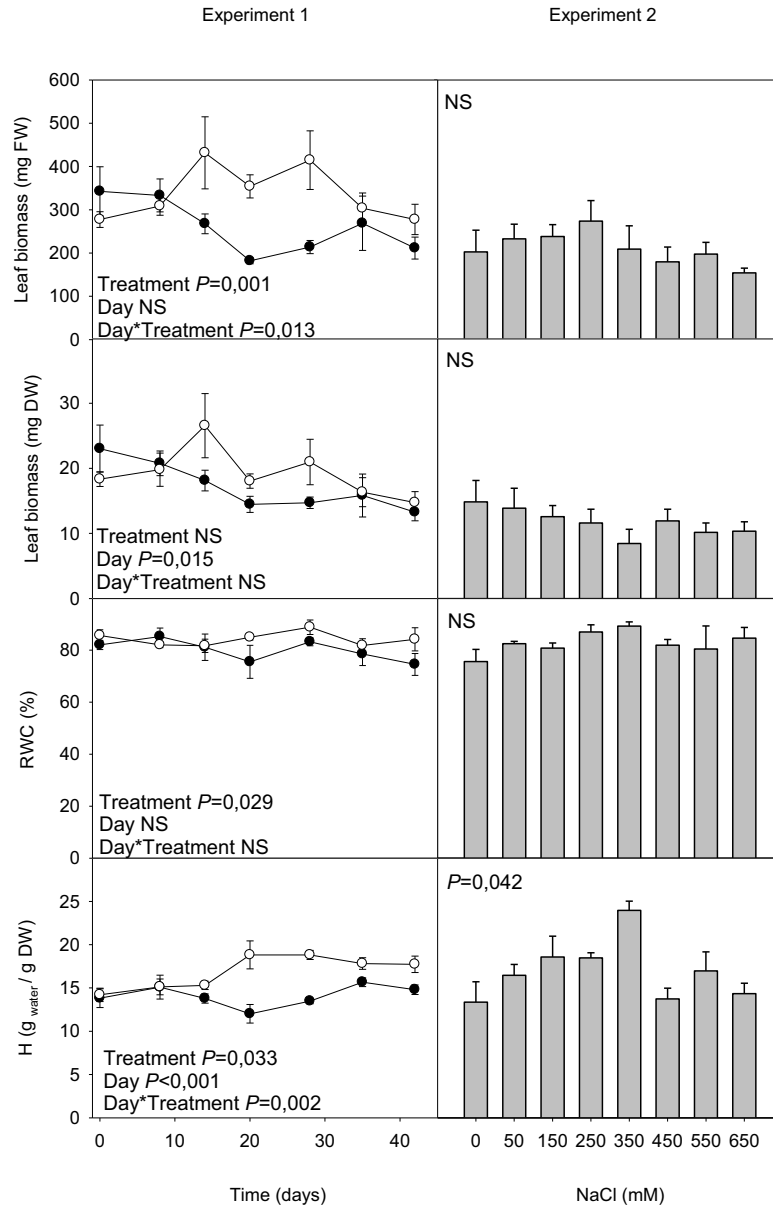


Figure 2. Leaf biomass (mg FW and mg DW), relative leaf water content (RWC) and leaf hydration (H) of *A. cordifolia* plants exposed to 150 mM NaCl for 42 days (Experiment 1) or to different NaCl concentrations for 14 days (Experiment 2). Data shown are the mean \pm SE of $n=6$ (Experiment 1) and $n=4$ (Experiment 2). Results of statistical analyses are shown in the inlets (ANOVA, $P\leq 0.05$). NS, not significant.

doses for 14 days, although tocopherol levels tended to increase at concentrations of 350 mM NaCl or above (Fig. 6). It is worth highlighting that in Experiment 2, levels of γ -tocopherol progressively increased (when results were expressed on a dry weight basis) as the salt dose increased (Suppl. Fig. 1).

Cytokinin levels increase under salinity

While levels of the stress-related phytohormones, ABA, ACC, SA and JA were not altered at 150 mM for 42 days (Fig. 7), levels of the active cytokinin – zeatin – increased by

50% after 14 days of exposure to 150 mM NaCl. However, concentrations of gibberellins, the auxin – indole-3-acetic acid – and the other cytokinins, including zeatin riboside (ZR), isopentenyladenosine (IPA) and isopentenyladenine (2iP), did not increase with levels of zeatin (Suppl. Fig. 2 and Fig. 8). Furthermore, the exposure of plants to increasing concentrations of salt resulted in a progressive increase in the levels of all cytokinins with the highest levels of zeatin, ZR and IPA observed at concentrations between 150 and 350 mM NaCl, and the highest concentrations of 2-iP observed at the highest salt concentrations (550 and 650 mM NaCl).

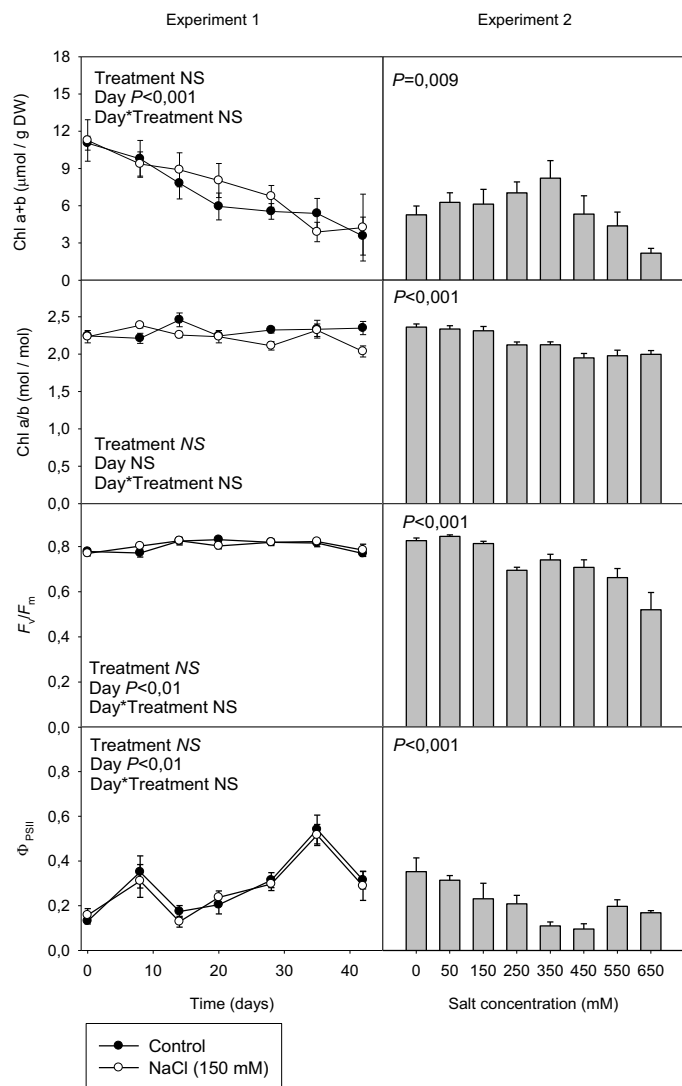


Figure 3. Chlorophyll (Chl) a+b contents, Chl a/b ratio, and maximum and relative efficiency of PSII photochemistry (F_v/F_m and Φ_{PSII} , respectively) in leaves of *A. cordifolia* plants exposed to 150 mM NaCl for 42 days (Experiment 1) or to different NaCl concentrations for 14 days (Experiment 2). Data are the mean \pm SE of n=6 (Experiment 1) and n=4 (Experiment 2). Results of statistics are shown in the inlets (ANOVA, $P \leq 0.05$). NS, not significant.

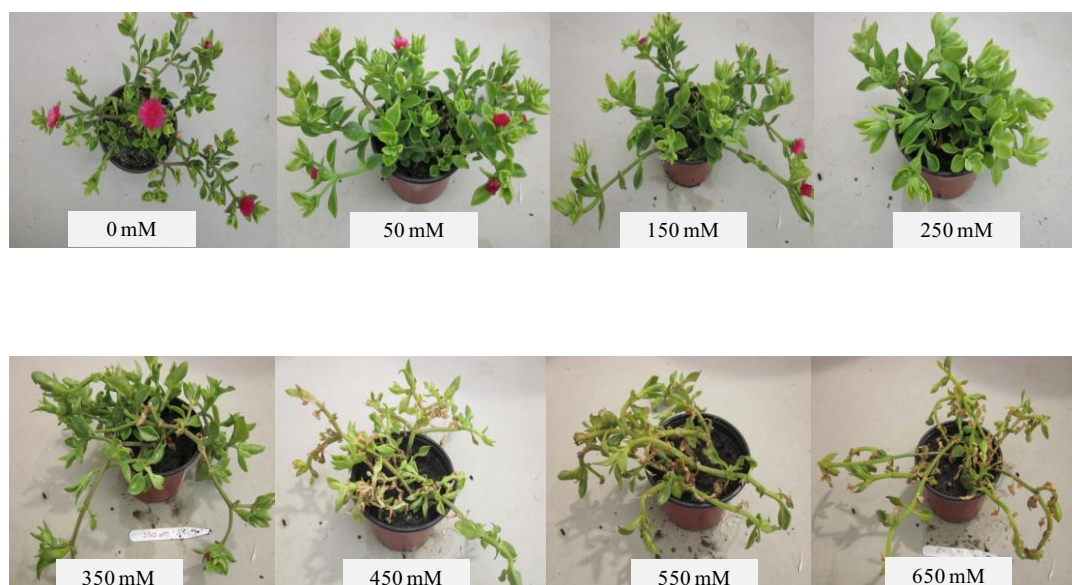


Figure 4. Phenotype of *A. cordifolia* plants exposed to different salt concentrations (Experiment 2).

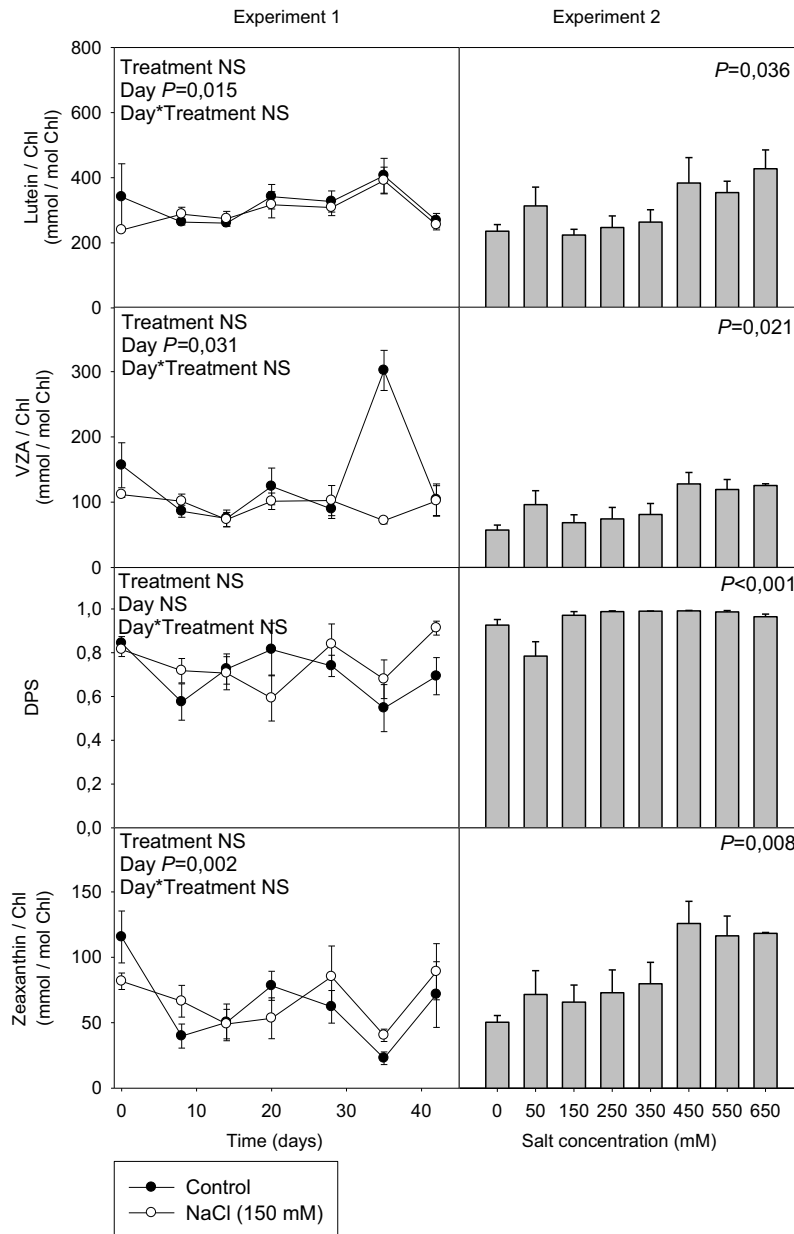


Figure 5. Levels of lutein and the xanthophyll cycle pool (VZA) per unit of chlorophyll (Chl), the de-epoxidation state of the xanthophyll cycle (DPS) and zeaxanthin levels per unit of Chl in leaves of *A. cordifolia* plants exposed to 150 mM NaCl for 42 days (Experiment 1) or to different NaCl concentrations for 14 days (Experiment 2). Data are the mean \pm SE of $n=6$ (Experiment 1) and $n=4$ (Experiment 2). Results of statistics are shown in the inlets (ANOVA, $P\leq 0.05$). NS, not significant.

However, due to a high variability between samples these differences were not significant (Fig. 8). A progressive, but not significant, increase in the ethylene precursor, ACC, with the salt concentration was also observed. In contrast, ABA levels decreased significantly between 70% and 80% at 450 and 550 mM NaCl relative to other salt doses tested (Fig. 7). This decrease was not, however, maintained at the highest salt dose tested (650 mM NaCl).

Discussion

This study assessed the capacity of the invasive plant *A. cordifolia* to withstand salt stress in the long-term (42 days) and to withstand high doses of salinity (up to 650 mM NaCl) in the short-term (14 days). This was measured in terms of growth, photosynthetic pigments and photoprotection, and changes in both growth-related and stress-related phytohormones. The results of this study show that this invasive plant species is very resistant to both moderate and

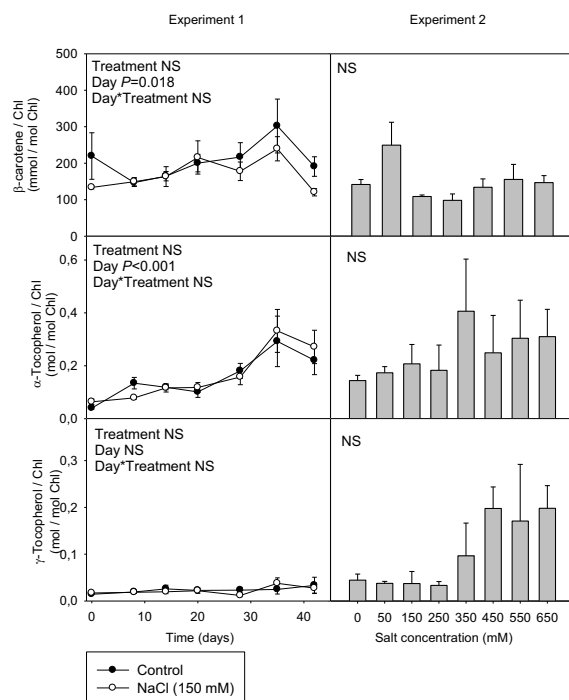


Figure 6. Levels of the antioxidants, β -carotene and α - and γ -tocopherols per unit of chlorophyll (Chl) in leaves of *A. cordifolia* plants exposed to 150 mM NaCl for 42 days (Experiment 1) or to different NaCl concentrations for 14 days (Experiment 2). Data are the mean \pm SE of $n=6$ (Experiment 1) and $n=4$ (Experiment 2). Results of statistics are shown in the inlets (ANOVA, $P \leq 0.05$). NS, not significant.

high doses of salinity, but also that a sustained salt concentration of 150 mM NaCl has a positive effect on (i.e. increases) leaf water content and fresh biomass production. However, this effect was only observed in a time frame between the second and fifth week of treatment, which indicates that this invasive plant species takes advantage of salt stress during the first weeks of salt acclimation. This is very important in enabling these plants to survive in soils with a high salt concentration, giving them an ecological advantage over native species that cannot tolerate salinity. Where other plants (except halophytes) would respond negatively to salt stress, this species takes advantage of this environmental constraint to improve water content and leaf growth, which may be particularly important for increasing its competence over other species (Pimentel 2011). Indeed, this species behaves similarly to halophytes in that moderate salt stress (150 mM NaCl) improves leaf water status and growth, while mild salt stress (50 mM NaCl) decreases DPS values and therefore the photoprotective demand of leaves. This further supports the notion that *A. cordifolia* is particularly well adapted to salt concentrations of up to 150 mM. An additional observation was that flowering was inhibited at salt concentrations of or exceeding 250 mM, which was accompanied by reductions in chlorophyll and

carotenoid levels, the latter indicating photooxidative stress. Therefore, although this species adapts particularly well to low and moderate doses of salinity, it suffers at doses of or exceeding 250 mM NaCl. Therefore, we propose that *A. cordifolia* can be considered a “marginal” halophyte, similar to barley and the date palm (*Phoenix dactylifera*), which can tolerate approximately 5 g/L (Glenn et al. 1999), corresponding to approximately 87 mM NaCl. This is not surprising considering that *Aizoaceae*, the family to which *A. cordifolia* belongs, contains several halophytes such as its close relative *Mesembryanthemum crystallinum* (Epimashko et al. 2006; Cosentino et al. 2010).

We observed that the increase in leaf growth (expressed on a fresh weight basis) at moderate salt doses (150 mM NaCl) was associated with a concomitant increase in zeatin levels, while levels of other cytokinins and phytohormones (auxins, gibberellins, abscisic acid, salicylic acid and jasmonic acid) were unaffected in this way. Since cytokinins activate cell division in plants (Riou-Khamlichi et al. 1999), it is likely that the salt-induced growth stimulation observed in this study was modulated by cytokinins, specifically zeatin, which is the cytokinin that is considered active in most bioassays (Mok and Mok 2001).

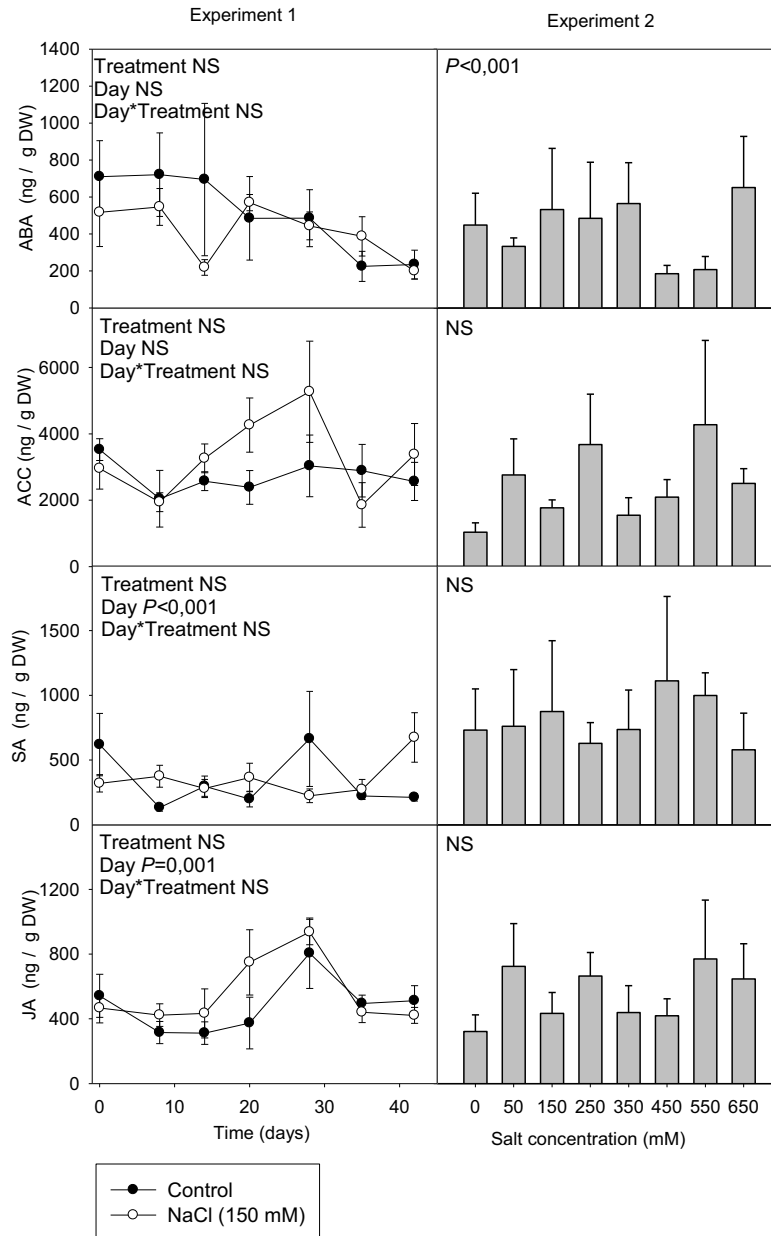


Figure 7. Changes in the endogenous concentrations of abscisic acid (ABA), 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid (ACC, the ethylene precursor), salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA) in leaves of *A. cordifolia* plants exposed to 150 mM NaCl for 42 days (Experiment 1), or to different NaCl concentrations for 14 days (Experiment 2). Data are the mean \pm SE of $n=6$ (Experiment 1) and $n=4$ (Experiment 2). Results of statistics are shown in the inlets (ANOVA, $P \leq 0.05$). NS, not significant.

It should also be considered, however, that the improvement in leaf hydration could be responsible for the improvement in cell growth, since cell turgor is required for cell expansion and growth (Cosgrove 1987). Therefore, it appears that the improvement in leaf growth at moderate doses of salinity in *A. cordifolia* was due both to: (i) an increase in zeatin levels, promoting cell division, and (ii) an improvement in leaf turgor, favouring cell expansion, with both processes acting simultaneously after 2 weeks of salt stress. It should be

noted, however, that leaf biomass expressed as fresh matter increased more than when it was expressed as dry matter. This indicates that in terms of determining leaf growth at moderate doses of salinity, the effect exerted by leaf turgor is more important quantitatively than that exerted by zeatin. It has been shown that some members of the *Aizoaceae* family use sequestered salts to maximize turgor pressure in growing cells, thereby increasing growth rates (Von Willert et al. 1992). If this also occurs in *A. cordifolia*, combined with

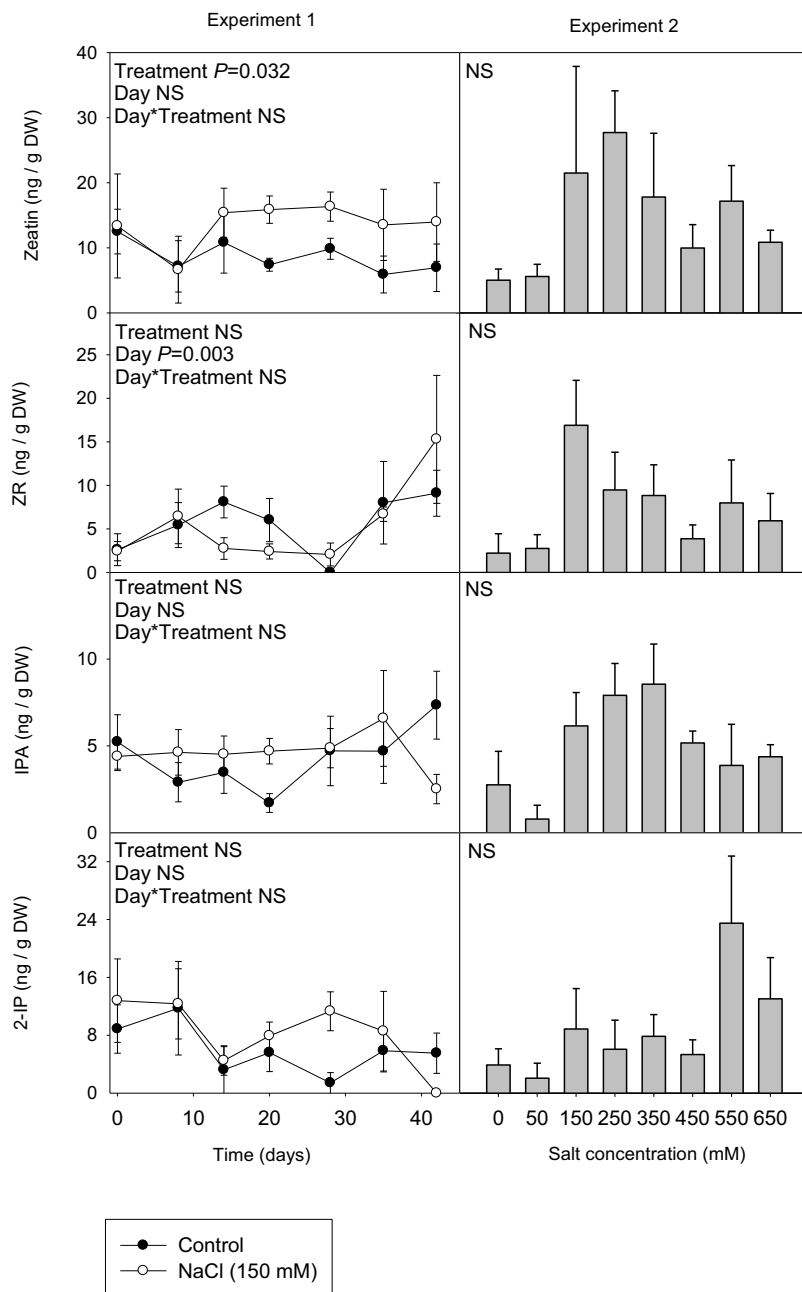


Figure 8. Changes in the endogenous concentrations of the cytokinins, zeatin, zeatin riboside (ZR), isopentenyladenosine (IPA) and isopentenyladenine (2iP) in leaves of *A. cordifolia* plants exposed to 150 mM NaCl for 42 days (Experiment 1) or to different NaCl concentrations for 14 days (Experiment 2). Data are the mean \pm SE of n=6 (Experiment 1) and n=4 (Experiment 2). Results of statistics are shown in the inlets (ANOVA, $P \leq 0.05$). NS, not significant.

zeatin, it might help to improve leaf growth and limit salt toxicity at moderated doses of salinity.

Furthermore, plants were able to maintain the F_v/F_m ratio, an indicator of damage to PSII, above 0.80 for 42 days at 150 mM NaCl, and above 0.50 for 14 days at higher salt doses (including 650 mM NaCl). Although F_v/F_m ratios below 0.75 are indicative of photoinhibition to PSII, it is interesting to note the high photoprotection capacity of young leaves in this species at high salinity doses. While old

leaves died at high salt doses, young leaves suffered photooxidative stress (as indicated by reductions in the F_v/F_m ratio), but could withstand stress and remained alive for 14 days. It appears that this photoprotection was achieved by an enhanced de-epoxidation of the xanthophyll cycle. Chlorophyll levels remained unaltered for 42 days at 150 mM NaCl and for 14 days up to a concentration of 550 mM NaCl. It is also worth highlighting that with salt stress, α -tocopherol levels remained constant or increased slightly,

thus indicating that this plant species maintains its capacity to inhibit the propagation of lipid peroxidation in thylakoids and avoid photooxidative processes, which is considered to be one of the most important functions of α -tocopherol in chloroplasts (Falk and Munné-Bosch 2010). Furthermore, the concerted action of carotenoids and α -tocopherol might help protect PSII from photooxidative damage (Trebst 2003, Havaux et al. 2005). Li et al. (2012) suggested that an increase in α -tocopherol levels could improve the photooxidative stress tolerance in *Chlamydomonas reinhardtii* lacking xanthophylls, although it was also noted that α -tocopherol was unable to fully replace xanthophylls. In *A. cordifolia*, β -carotene, tocopherol and xanthophyll (lutein, zeaxanthin) levels remained constant for 42 days at 150 mM NaCl, thus indicating that the concerted action of tocopherols, xanthophylls and β -carotene could prevent damage to PSII, as indicated by constant F_v/F_m ratios. However, these mechanisms were not enough to fully protect PSII at higher salt concentrations.

We concluded that *A. cordifolia* is capable of withstanding high doses of salt stress and that moderate doses of salinity may even improve leaf growth through a specific modulation of cytokinin levels. It appears therefore that this species has not only evolved mechanisms to adapt to high salinity but also to improve growth under moderate salinity, which may increase its ecological competence over that of other species thus favouring rapid colonization of soils.

Acknowledgments

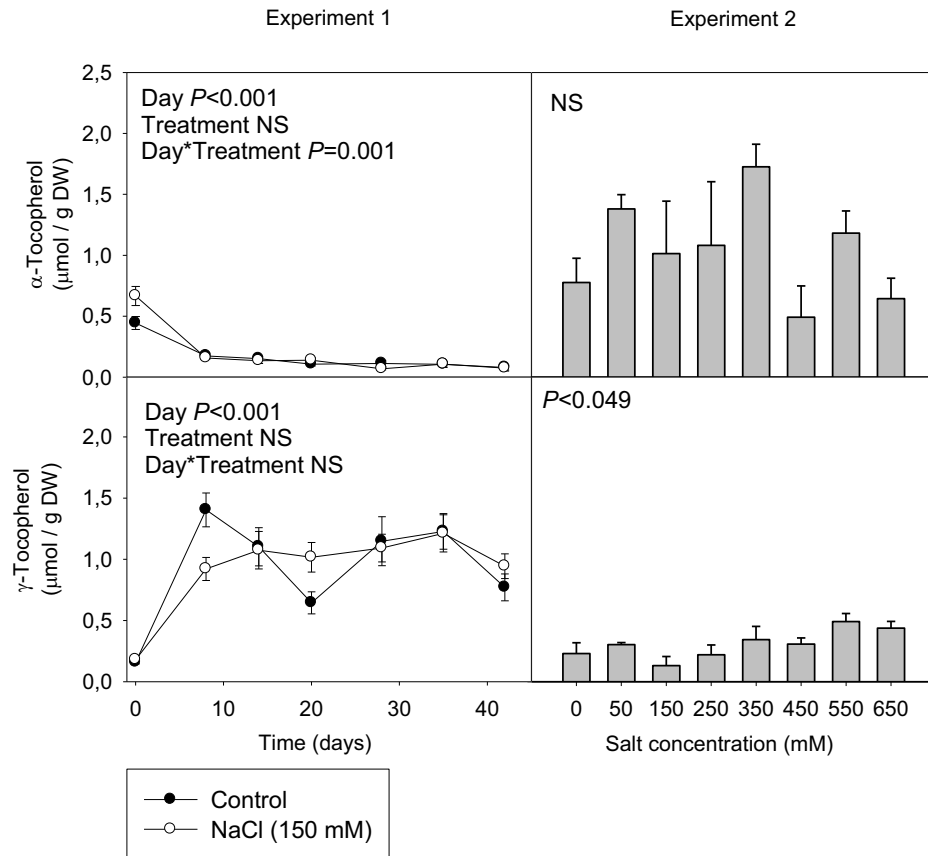
Support for the research was received through grants BFU2009-07294, BFU2009-06045, and CSD2008-00040 from the Ministry of Science and Innovation of the Spanish Government, and the ICREA Academia prize to S.M.-B, funded by the Generalitat de Catalunya.

References

- Amaral JS, Casal S, Torres D, Seabra RM, Oliveria BPP. 2005. Simultaneous determination of tocopherols and tocotrienols in hazelnuts by a normal phase liquid chromatographic method. *Analytical Science* 21:1545-1548.
- Asada K. 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* 141:391-396.
- Barker DH, Seaton GGR, Robinson SA. 1997. Internal and external photoprotection in developing leaves of the CAM plant *Cotyledon orbiculata*. *Plant Cell and Environment* 20:617-624.
- Cela J, Arrom L, Munné-Bosch S. 2009. Diurnal changes in photosystem II photochemistry, photoprotective compounds and stress-related phytohormones in the CAM plant, *Aptenia cordifolia*. *Plant Science* 177:404-410.
- Cela J, Chang C, Munné-Bosch S. 2011. Accumulation of γ -tocopherol rather than α -tocopherol alters ethylene signaling gene expression in the *vte4* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 52:1389-1400.
- Cosentino C, Fischer-Schielbs E, Bertl A, Thiel G, Homann U. 2010. Na^+/H^+ antiporters are differentially regulated in response to NaCl stress in leaves and roots of *Mesembryanthemum crystallinum*. *New Phytologist* 186:669-680.
- Cosgrove DJ. 1987. Wall relaxation and the driving forces of cell expansive growth. *Plant Physiology* 84: 561-564.
- Demmig-Adams B, Adams WW. 2002. Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. *Science* 298:2149-2153.
- Epimashko S, Fischer-Schliebs E, Christian A, Thiele G, Lüttge U. 2006. Na^+/H^+ -transporter, H^+ -pumps and an aquaporin in light and heavy tonoplast membranes from organic acid and NaCl accumulating vacuoles of the annual facultative CAM plant and halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Planta* 224:944-951.
- Falk J, Munné-Bosch S. 2010. Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. *J Exp Bot* 61:1549-1566.
- Foyer CH, Noctor G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17:1866-1875.
- Genty B, Briantais JM, Baker NR. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990:87-92.
- Glenn EP, Brown JJ, Blumwald E. 1999. Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18:227-255.
- Havaux M, Eymery F, Porfirova S, Rey P, Dörmann P. 2005. Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 17:3451-3469.
- Herppich WB, Peckmann K. 1997. Responses of gas exchange, photosynthesis, nocturnal acid accumulation and water relations of *Aptenia cordifolia* to short-term drought and rewatering. *Journal of Plant Physiology* 150:467-474.
- Li Z, Keasling JD, Niyogi KK. 2012. Overlapping photoprotective function of vitamin E and carotenoids in *Chlamydomonas*. *Plant Physiology* 158:313-323.

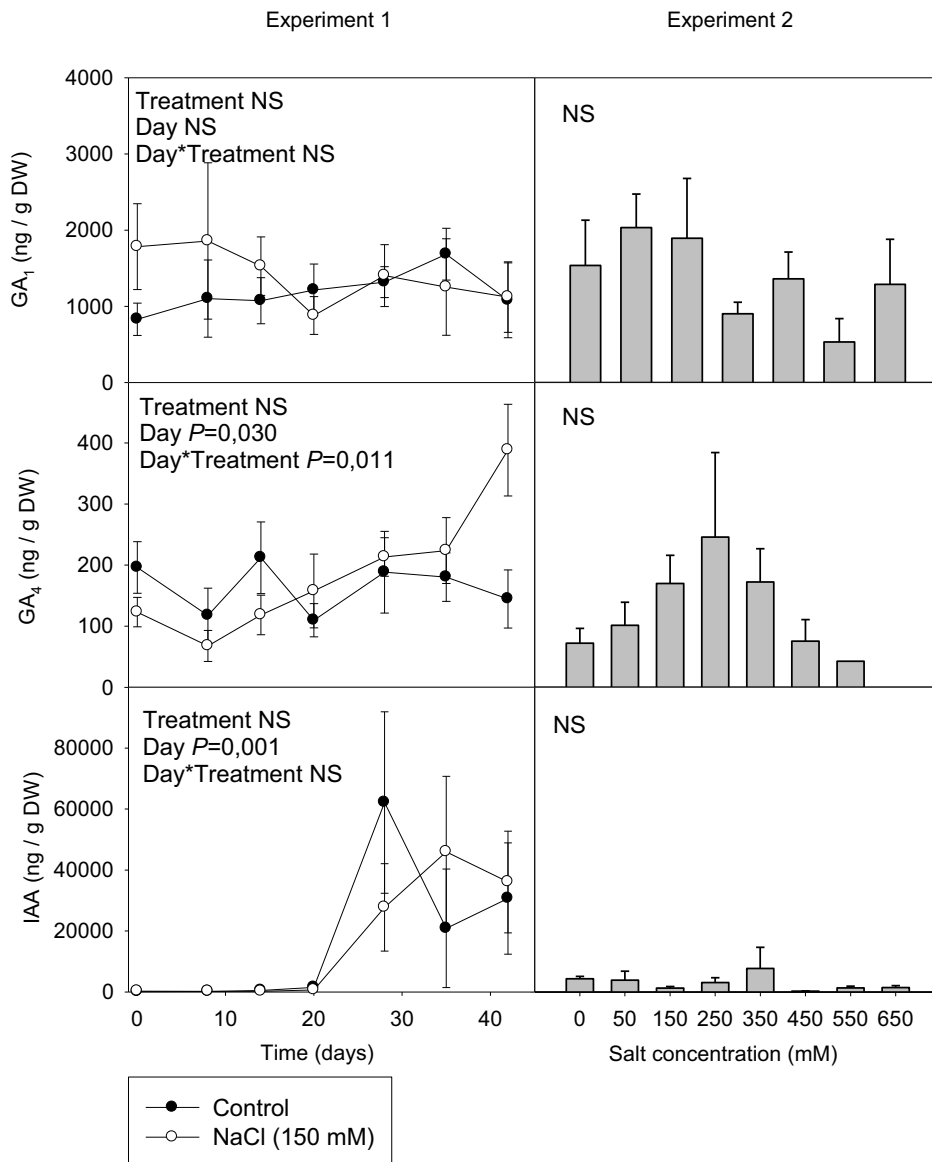
- Mok DWS, Mok MC. 2001. Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52:89-118.
- Müller M, Munné-Bosch S. 2011. Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Plant Methods* 7:37.
- Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell and Environment* 25:239-250.
- Pereira LS, Cordery I, Iacovides I. 2009. *Coping with water scarcity*. Springer, Berlin, Germany.
- Pimentel D. 2011. *Biological invasions*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacquard A, Murray JAH. 1999. Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* 283:1541-1544.
- Takahashi S, Badger MR. 2011. Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends in Plant Science* 16:53-60.
- Trebst A (2003) Function of β -carotene and tocopherol in photosystem II. *Zeitschrift für Naturforschung* 58c:609-620.
- Trípodí KEJ, Podestá FE. 2003. Purification and characterization of an NAD-dependent malate dehydrogenase from leaves of the crassulacean acid metabolism plant *Aptenia cordifolia*. *Plant Physiology and Biochemistry* 41:97-105.
- VonWillert DJ, Eller BM, Weger MJA, Brinckmann E, Ihlenfeldt HD. 1992. *Life strategies of succulents in deserts: with special reference to the Namib Desert*. Cambridge University Press, Cambridge, England.

SUPPLEMENTARY DATA



Suppl. Figure 1. Levels of α -tocopherol and γ -tocopherol in leaves of *A. cordifolia* plants exposed to 150 mM NaCl for 42 days (Experiment 1) or to different NaCl concentrations for 14 days (Experiment 2). Data are the mean \pm SE of $n=6$ (Experiment 1) and $n=4$ (Experiment 2). Results of statistics are shown in the inlets (ANOVA, $P \leq 0.05$). NS, not significant.

SUPPLEMENTARY DATA



Suppl. Figure 2. Changes in the endogenous concentrations of the gibberellin 1 (GA₁), gibberellin 4 (GA₄) and the indole-3-acetic acid (IAA) in leaves of *A. cordifolia* plants exposed to 150 mM NaCl for 42 days (Experiment 1) or to different NaCl concentrations for 14 days (Experiment 2). Data are the mean \pm SE of $n=6$ (Experiment 1) and $n=4$ (Experiment 2). Results of statistics are shown in the inlets (ANOVA, $P \leq 0.05$). NS, not significant.

Capítulo 5: La acumulación de γ - en vez de α -tocoferol altera la expresión de genes de señalización de etileno en el mutante *vte4* de *Arabidopsis thaliana*

Accumulation of γ -rather than α -tocopherol alters ethylene signaling gene expression in the *vte4* mutant of *Arabidopsis thaliana*

Jana Cela^a, Caren Chang^b, Sergi Munné-Bosch^a

^aDepartament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^bDepartment of Cell Biology and Molecular Genetics, University of Maryland, College Park, MD, USA

Resumen

Los tocoferoles son antioxidantes que se encuentran en los cloroplastos de las hojas, y es tema de debate si pueden o no afectar la señalización y la expresión génica en células vegetales. Para conocer a fondo los posibles efectos de la composición cloroplástica de tocoferoles en la expresión génica en el núcleo, se investigó los niveles de expresión de los genes de la biosíntesis, percepción y señalización del etileno en los mutantes *vte1* y *vte4* de *Arabidopsis thaliana*, los cuales tienen alterada la biosíntesis de tocoferol (vitamina E). Los cambios en la expresión génica se midieron en plantas expuestas a estrés hídrico o salino, además de en hojas jóvenes y maduras en los mutantes *vte1* y *vte4*, los cuales carecen de tocoferol ciclasa y γ -tocoferol metiltransferasa, respectivamente. Mientras los niveles de transcripción de los genes de señalización del etileno en el mutante *vte1* y en el *wild type* eran similares en todas las condiciones analizadas, los mayores cambios en la expresión génica tuvieron lugar en el mutante *vte4*, especialmente en las hojas maduras (en comparación con las hojas jóvenes) y bajo condiciones de estrés salino. La acumulación de γ - en vez de α -tocoferol en este mutante llevó a un aumento de los niveles de transcripción de genes de señalización del etileno (particularmente *CTR1*, *EIN2*, *EIN3* y *ERF1*) en las hojas maduras de las plantas control. Sin embargo, con el tratamiento de salinidad, los niveles de transcripción de la mayoría de genes permaneció constante o descendió en el mutante *vte4*, mientras estos aumentaban drásticamente en las plantas *wild type* y en el mutante *vte1*. Además, bajo condiciones de estrés salino, la edad foliar indujo una acumulación de ácido jasmónico en el mutante *vte1* y en el *wild type*, pero no en el mutante *vte4*. Se puede concluir que el ácido jasmónico y la vía de señalización de etileno están reguladas a la baja en las hojas maduras de las plantas con estrés salino en el mutante *vte4*.

Accumulation of γ - Rather than α -Tocopherol Alters Ethylene Signaling Gene Expression in the *vte4* Mutant of *Arabidopsis thaliana*

Jana Cela¹, Caren Chang² and Sergi Munné-Bosch^{1,*}

¹Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

²Department of Cell Biology and Molecular Genetics, University of Maryland, College Park, MD 20742-5815, USA

*Corresponding author: E-mail, smunne@ub.edu; Fax, +34-934112842

(Received May 30, 2011; Accepted June 22, 2011)

Tocopherols are antioxidants found in chloroplasts of leaves, and it is a matter of current debate whether or not they can affect signaling and gene expression in plant cells. For insight into the possible effects of altered tocopherol composition in chloroplasts on gene expression in the nucleus, the expression of ethylene biosynthesis, perception and signaling genes was investigated in *vte1* and *vte4* *Arabidopsis thaliana* mutants, which are impaired in tocopherol (vitamin E) biosynthesis. Changes in gene expression were measured in plants exposed to either salt or water stress, and in young and mature leaves of *vte1* and *vte4* mutants, which lack tocopherol cyclase and γ -tocopherol methyltransferase, respectively. While transcript levels of ethylene signaling genes in the *vte1* mutant and the wild type were similar in all tested conditions, major changes in gene expression occurred in the *vte4* mutant, particularly in mature leaves (compared with young leaves) and under salt stress. Accumulation of γ - instead of α -tocopherol in this mutant led to elevated transcript levels of ethylene signaling pathway genes (particularly *CTR1*, *EIN2*, *EIN3* and *ERF1*) in mature leaves of control plants. However, with salt treatment, transcript levels of most of these genes remained constant or dropped in the *vte4* mutant, while they were dramatically induced in the wild type and the *vte1* mutant. Furthermore, under salt stress, leaf age-induced jasmonic acid accumulated in both the *vte1* mutant and the wild type, but not in the *vte4* mutant. It is concluded that jasmonic acid and ethylene signaling pathways are down-regulated in mature leaves of salt-stressed *vte4* plants.

Keywords: Ethylene signaling • Salt stress • Tocochromanols • Vitamin E • Water stress.

Abbreviations: ACC, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid; ACO, ACC oxidase; ACS, ACC synthase; ANOVA, analysis of variance; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; ROS, reactive oxygen species; RWC, relative water content; UPLC-MS/MS, ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry

Introduction

Tocopherols, which are part of the vitamin E group of compounds, are lipid-soluble molecules essential for human nutrition, but they are only synthesized by photosynthetic organisms, including all plants, algae and most cyanobacteria (Horvath et al. 2006, Mène-Saffrané and DellaPenna 2010). Tocopherols play an important role as antioxidants, but there is some controversy concerning whether or not they have additional functions in both animals and plants (Azzi 2007, Maeda and DellaPenna 2007, Traber and Atkinson 2007, Falk and Munné-Bosch 2010). Recent studies on vitamin E-deficient (*vte*) *Arabidopsis thaliana* mutants have revealed that one of the most important functions tocopherols play is acting as antioxidants in chloroplasts, thus protecting plants from photo-inhibition and photo-oxidative stress (Havaux et al. 2005). Tocopherols, in cooperation with other antioxidants, can scavenge lipid peroxyl radicals, preventing the propagation of lipid peroxidation, and are excellent quenchers and scavengers of singlet oxygen, controlling its levels. Furthermore, studies on *vte* mutants have revealed an important role for tocopherols in low-temperature adaptation (Maeda et al. 2006, Maeda et al. 2008) and seedling germination and growth (Sattler et al. 2004, Sattler et al. 2006), in both cases influencing gene expression levels though modulation of extraplastidic polyunsaturated fatty acid metabolism. Under water deficit and salt stress, however, it is still unknown to what extent a tocopherol deficiency in these mutants can alter the plant stress response at the gene expression level.

Previous studies have shown a positive correlation between tocopherol accumulation and water stress in several plant species (Munné-Bosch et al. 1999, Munné-Bosch and Alegre 2003), including *A. thaliana* (Cela et al. 2009). However, nothing is known about how a tocopherol deficiency in *A. thaliana* affects water stress tolerance. It is noteworthy that increased tocopherol levels in transgenic tobacco plants overexpressing *VTE1* from *A. thaliana* show enhanced tolerance to water stress (Liu et al. 2008). *VTE1* encodes a tocopherol cyclase that is

Plant Cell Physiol. 52(8): 1389–1400 (2011) doi:10.1093/pcp/pcr085, available online at www.pcp.oxfordjournals.org

© The Author 2011. Published by Oxford University Press on behalf of Japanese Society of Plant Physiologists.

All rights reserved. For permissions, please email: journals.permissions@oup.com

essential for the synthesis of all tocopherol forms (Porfirova et al. 2002, Sattler et al. 2003), thus this study indicates that tocopherols, which mainly accumulate in the form of α -tocopherol in leaves (Szymanska and Kruk 2008a, Szymanska and Kruk 2008b), confer resistance to water stress. Protection is thought to be exerted through their antioxidant role in chloroplasts, since reactive oxygen species (ROS) production is known to be exacerbated under drought stress (Smirnoff 1993, Smirnoff 2005), but the exact mechanisms remain unknown. Less information is available on the role of tocopherols in salt stress tolerance, another of the most important stresses limiting crop yields. Salt stress limits growth by different mechanisms, including ion toxicity, causing osmotic unbalance and leading to oxidative stress by increasing ROS production (Miller et al. 2010). However, very little is known about the role of tocopherols in protecting plants from salt stress. Interestingly, it has been shown that decreased total tocopherol contents in *HPT:RNAi* transgenic tobacco plants, which lack all tocopherol forms, increases the sensitivity to salt stress, while tolerance to osmotic stress and methyl viologen of γ -tocopherol methyltransferase transgenics, which accumulate γ - instead of α -tocopherol, is strongly increased (Abbasi et al. 2007).

Ethylene gas regulates many diverse metabolic and developmental processes in plants, ranging from seed germination to organ senescence, and is considered to play a major role as a signal molecule at low concentrations in the tolerance to environmental stresses, including water and salt stress (Bleecker and Kende 2000, Argueso et al. 2007). Ethylene production is induced by various stresses, as well as by other hormones and developmental cues (Argueso et al. 2007). The rate-limiting step in the two-step biosynthetic pathway is the production of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) by the enzyme ACC synthase (ACS). Conversion of ACC into ethylene gas is then catalyzed by ACC oxidase (ACO). The ACS and ACO enzymes are encoded by multigene families. *A. thaliana* has nine ACS genes (*ACS1*, *ACS2*, *ACS4*, *ACS5*, *ACS6*, *ACS7*, *ACS8*, *ACS9* and *ACS11*), which display unique and overlapping expression patterns (Tsuchisaka and Theologis 2004, Argueso et al. 2007). ACS gene expression is differentially regulated by various ethylene-inducing factors. For instance, *ACS6* expression is stimulated by ozone, wounding, auxins and ethylene (Vahala et al. 1998, Tian et al. 2002). All but three of the ACS genes are expressed in young rosette leaves; *ACS1* is expressed in the vascular tissue, *ACS9* appears to be inactive and *ACS11* expression is restricted to the trichomes (Tsuchisaka and Theologis 2004).

The ethylene signal transduction pathway, as proposed in *A. thaliana*, involves five ethylene receptors *ETR1*, *ERS1*, *ETR2*, *EIN4* and *ERS2*, as well as the negative regulator *CTR1*, the downstream positive regulator *EIN2*, and the transcription factor *EIN3* (among others), which up-regulates yet another transcription factor, *ERF1* (Chen et al. 2005, Kendrick and Chang 2008; see also **Supplementary Fig. S1**). Recent studies have shown that alterations in ethylene signaling affect plant responses to both salt and water stress (Cao et al. 2006, Cao et al. 2008, Cela et al. 2009). For example,

ethylene-insensitive mutants are hypersensitive to salt, suggesting that ethylene signaling reduces sensitivity to salt stress (Cao et al. 2008).

In a previous study, it was shown that a defect in ethylene signaling in the *ein3-1* mutant can alter tocopherol biosynthesis in *A. thaliana* (Cela et al. 2009). Since ethylene is a major player in the response of plant to water and salt stress, we aimed here to evaluate not only whether or not a deficiency in specific tocopherol forms in *vte1* and *vte4* mutants of *A. thaliana* alters plant response to salt and water stress, but also to what extent a particular differential response in these mutants is associated with a specific response at the expression level of ethylene biosynthesis, perception and/or signaling genes.

Results

Plant response to water and salt stress in *vte1* and *vte4* mutants

Salt stress (addition of 100 mM NaCl to the nutrient solution) and water stress (by withholding water) for 11 d caused dramatic effects on growth in wild-type *A. thaliana* plants (**Supplementary Fig. S2**). Rosette biomass of wild-type plants was reduced by 34 and 57% in response to salt and water stress, respectively. *vte1* and *vte4* mutants showed a response very similar to that of the wild type, in control and salt- or water-stressed conditions. It is noteworthy that water stress led to a more dramatic phenotype than salt stress; both *vte1* and *vte4* mutants and the wild type showed a similar response characterized by accelerated senescence in mature leaves, an aspect more evident than that observed under salt stress (**Supplementary Fig. S2**). Measurements of the relative water content (RWC) and the maximum efficiency of PSII photochemistry (the F_v/F_m ratio), an indicator of photoinhibition to the photosynthetic apparatus, showed that the water stress imposed on plants was much more severe than the salt stress, with RWC decreasing from values >85% in control plants to values of around 20% in water stress and 70% in salt stress (**Fig. 1**). The F_v/F_m ratio decreased from values around 0.85 in control plants to 0.30 in water-stressed plants, while salt stress did not significantly alter this parameter. Furthermore, in the wild type, the levels of α -tocopherol stayed constant throughout the study in control and salt-stressed plants, while they increased from 190 to 700 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW in water-stressed plants. The levels of γ -tocopherol were much lower than those of α -tocopherol in wild-type plants, but they increased from 4 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW in control to 13 and 54 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW in salt- and water-stressed plants, respectively. As expected, the *vte4* mutant showed γ -tocopherol but not α -tocopherol accumulation in leaves, with γ -tocopherol levels around 150 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW under control conditions, similar to α -tocopherol levels in the wild type. However, in contrast to wild-type plants, the *vte4* mutant did not increase tocopherol levels under either salt or water stress. As expected, the *vte1* mutant did not accumulate either α - or γ -tocopherol in leaves (**Fig. 1**). Despite significant

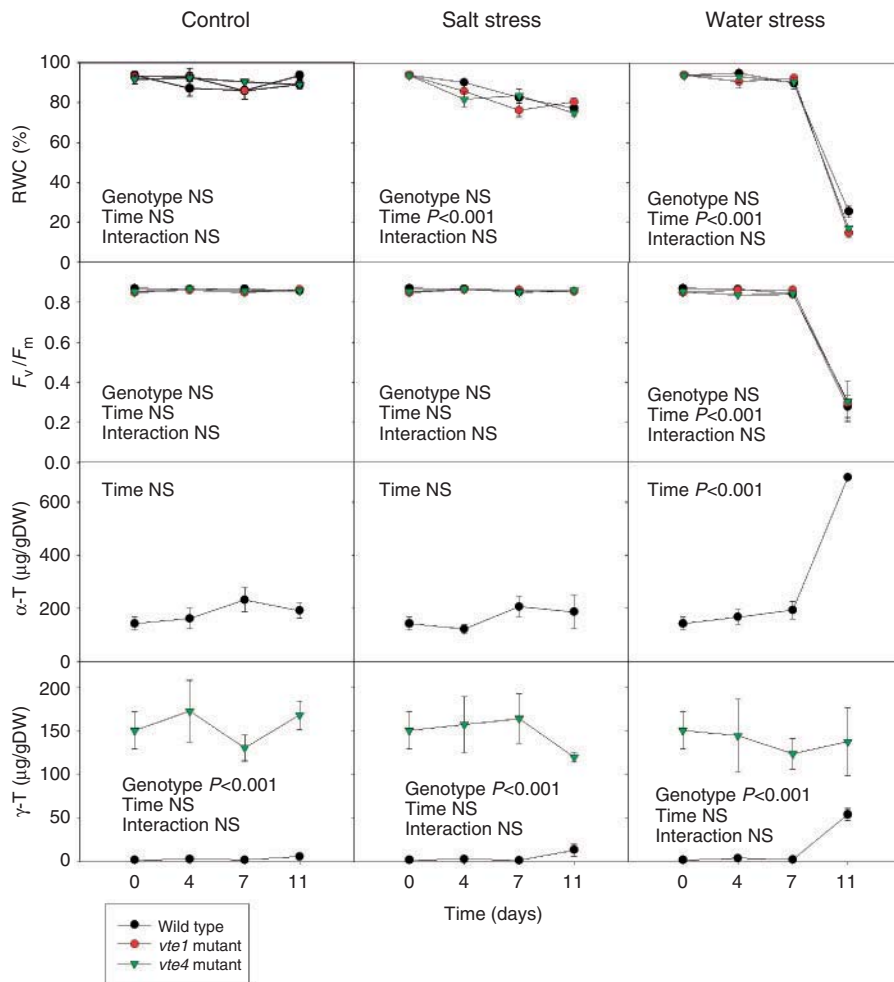


Fig. 1 Time-course evolution of relative water content (RWC), maximum efficiency of PSII photochemistry (F_v/F_m ratio) and levels of α - and γ -tocopherol (α -T and γ -T, respectively) in young leaves of the wild type and *vte1* and *vte4* mutants of *A. thaliana* exposed to control, salt stress or water stress conditions for 11 d. Data are the mean \pm SE of $n = 4$ experiments. Significant differences between genotypes, time of measurements and their interaction (genotype \times time) are given in the panels (ANOVA, $P \leq 0.05$). NS, not significant.

stress-induced tocopherol increases in wild-type plants, the expression levels of three of the most important genes involved in tocopherol biosynthesis (encoding homogentisate phytyltransferase, *VTE2*; tocopherol cyclase, *VTE1*; and γ -tocopherol methyltransferase, *VTE4*) were not significantly altered (**Supplementary Fig. S3**).

Expression of ethylene biosynthesis, perception and signaling genes in response to water and salt stress in *vte1* and *vte4* mutants

Expression levels were analyzed for the nine genes of the ACS family (*ACS1*, *ACS2*, *ACS4*, *ACS5*, *ACS6*, *ACS7*, *ACS8*, *ACS9* and *ACS11*), and *ACS2*, *ACS6*, *ACS8* and *ACS11* were shown to have high expression levels in leaves by quantitative PCR (data not shown). Later, it was confirmed that the *ACS2* gene showed the highest expression levels by quantitative PCR (**Supplementary Fig. S4**). Transcripts of both *ACS2* and *ACS6* increased significantly in response to water deprivation in both mutants and

the wild type, while *ACS8* also increased in response to water stress but differences were not significant. In contrast, transcript levels of *ACS6* increased in the *vte4* mutant exposed to salt stress, while levels remained unaltered in the wild type and the *vte1* mutant (**Supplementary Fig. S4**). Transcript levels of *ACS11* stayed at values < 0.00012 throughout the study (data not shown). Increases in *ACS2* and *ACS6* transcripts in water-stressed plants were accompanied by significant increases in *ACO4* and *ACO1* expression levels (**Fig. 2**). Furthermore, *ACO4* expression levels increased more in the *vte4* mutant than in the *vte1* mutant or the wild type exposed to water stress, a result that was also observed, although to a lesser extent, in plants exposed to salt stress. Expression levels of ethylene perception genes also revealed a differential response in tocopherol mutants (**Fig. 3**). The *vte4* mutant showed lower transcript levels of *ERS1* than the *vte1* mutant in all tested conditions, although differences were significant under salt stress only. Analysis of the ethylene signaling genes *EIN2*,

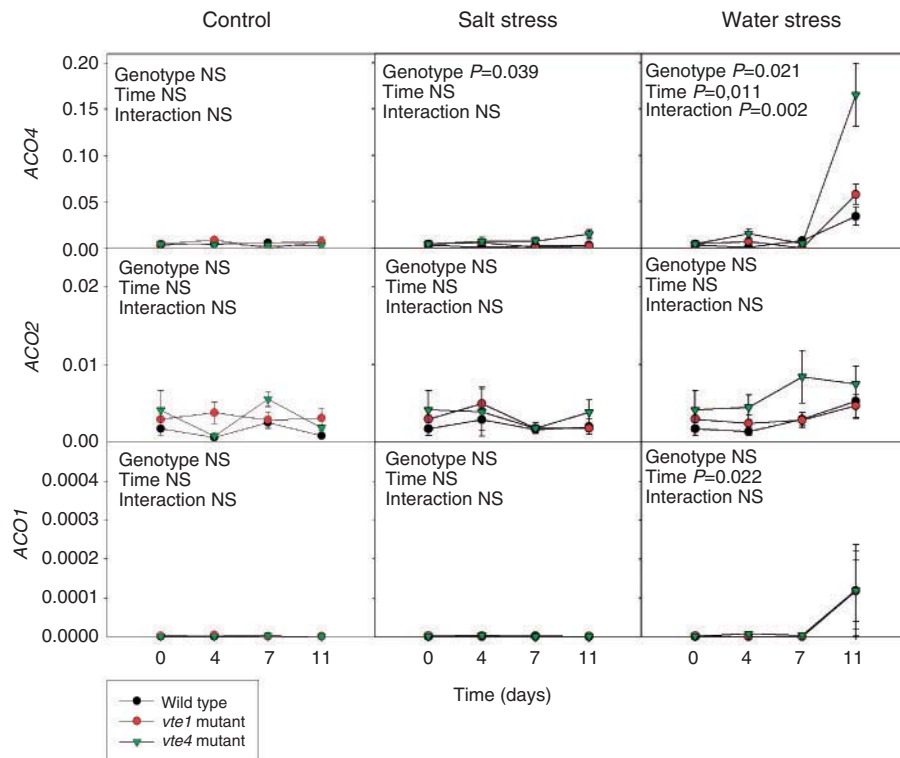


Fig. 2 Time-course evolution of relative expression of the ethylene biosynthesis genes, *ACO4*, *ACO2* and *ACO1* in young leaves of the wild type and *vte1* and *vte4* mutants of *A. thaliana* plants exposed to control, salt stress or water stress conditions for 11 d. Data are the mean \pm SE of $n = 4$ experiments. Significant differences between genotypes, time of measurements and their interaction (genotype \times time) are given in the panels (ANOVA, $P \leq 0.05$). NS, not significant. *GAPDH* was used as the reference gene to calculate the relative expression of the ethylene biosynthesis genes.

EIN3, *CTR1* and *ERF1* did not reveal any effect of tocopherol deficiency or stress treatments, except for an increase in *ERF1* transcript levels under 11 d of water stress in all genotypes (**Supplementary Fig. S5**).

Influence of leaf age on expression of ethylene biosynthesis, perception and signaling genes and their interaction with salt and water stress

The influence of leaf age on gene expression was evaluated in control conditions and in plants exposed to 7 d of salt or water stress, before stress treatments caused severe cell death in mature leaves. Values of RWC and the F_v/F_m ratio in young and mature leaves did not reveal differences in the degree of stress suffered by both leaf types in all treatments and mutants (**Fig. 4**). α -Tocopherol increased significantly from 190 to 400 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW in mature leaves compared with young leaves under water stress, but leaf age did not cause any effect under control or salt stress conditions, although levels increased slightly under salt stress. γ -Tocopherol levels changed in parallel to those of α -tocopherol, with a significant increase in wild-type plants under salt stress. Mature leaves of the *vte4* mutant also showed significant increases in γ -tocopherol levels in response to water stress (**Fig. 4**). Again, transcript levels of tocopherol

biosynthetic genes did not always correlate with tocopherol levels in leaves. Transcript levels of *VTE2* increased in parallel with tocopherol levels in mature leaves of wild-type plants exposed to water stress, but transcript levels of *VTE1*, *VTE2* and *VTE4* increased sharply in mature leaves of wild-type plants in response to salt stress with no concomitant increases in tocopherol (**Supplementary Fig. S6**; and **Fig. 4**).

While leaf age did not induce changes in *ACS6* and *ACS8* transcript levels (**Supplementary Fig. S7**), the *ACO1* and *ACO2* transcript levels were drastically affected by leaf age, with particularly interesting interactions with salt and water stress (**Fig. 5**). In control plants, leaf age reduced *ACO2* transcript levels, particularly in the wild type and the *vte1* mutant, an aspect that was also observed in *ACO4* and *ACO1* expression, though to a lower extent. These effects were not so evident in the *vte4* mutant, to the extreme that *ACO1* transcript levels increased in mature leaves of this mutant under control conditions. A similar response was observed under water stress, especially exacerbated in *ACO1* transcript levels of the *vte4* mutant, which increased particularly in mature leaves of water-stressed plants. In contrast, this response was not observed under salt stress (**Fig. 5**). Furthermore, transcript levels of ethylene perception genes, namely *ERS1*, *ERS2* and *ETR2*, increased in mature leaves of control plants of the *vte4*

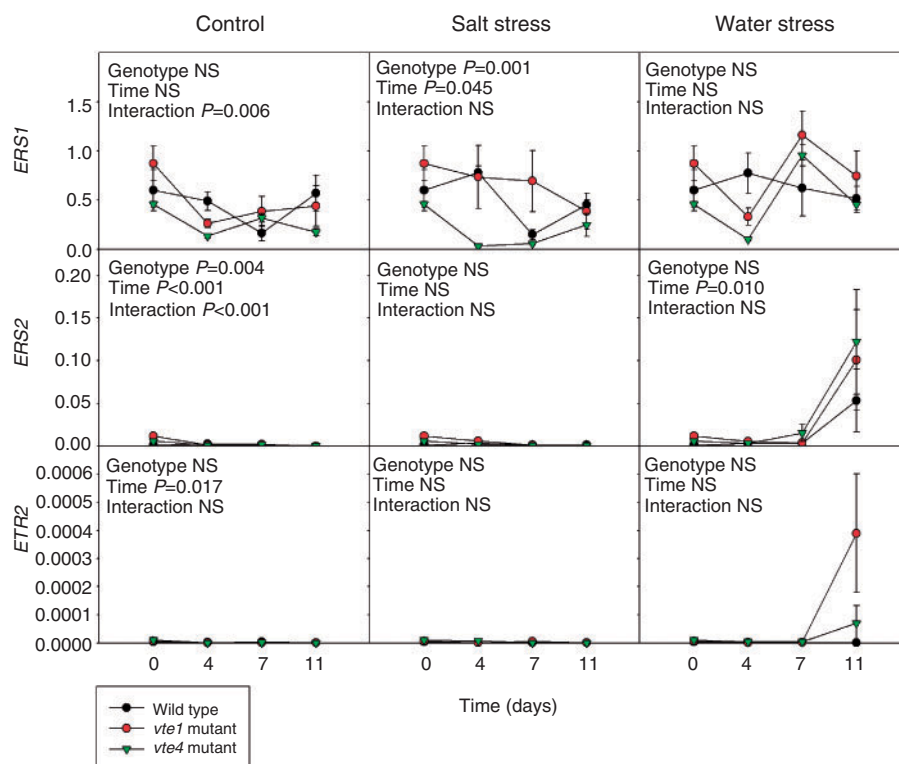


Fig. 3 Time-course evolution of relative expression of the ethylene perception genes, *ERS1*, *ERS2* and *ETR2* in young leaves of the wild type and *vte1* and *vte4* mutants of *A. thaliana* plants exposed to control, salt stress or water stress conditions for 11 d. Data are the mean \pm SE of $n = 4$ experiments. Significant differences between genotypes, time of measurements and their interaction (genotype \times time) are given in the panels (ANOVA, $P \leq 0.05$). NS, not significant. *GAPDH* was used as the reference gene to calculate the relative expression of the ethylene perception genes.

mutant only, a response that was also observed only for this mutant for the *ERS1* gene under water stress (Fig. 6). Major changes in gene expression of ethylene signaling genes also occurred in mature leaves of the *vte4* mutant under both control and water-stressed conditions (Fig. 7). Elevated levels of all the ethylene signaling transcripts, particularly the downstream components *CTR1*, *EIN2*, *EIN3* and *ERF1*, were observed in mature leaves of the control and water-stressed *vte4*. However, with salt treatment these transcript levels remained constant or dropped in the *vte4* mutant, while they were dramatically induced in the wild type (particularly *CTR1*, *EIN2* and *ERF1*). Furthermore, the *vte1* mutant and wild-type plants behaved similarly in all tested conditions, particularly for *CTR1*, *EIN3* and *ERF1* expression (Fig. 7).

Changes in jasmonic acid levels

To unravel whether or not those changes in gene expression could be associated with a modulation of oxylipin levels, a time course of the evolution of endogenous jasmonic acid levels was evaluated under control, salt and water stress conditions (Supplementary Fig. S8), and in young and mature leaves at 7 d of stress (Fig. 8). Jasmonic acid levels did not significantly differ between *vte1* or *vte4* mutants and the wild type in young

leaves during the 11 d of treatment (Supplementary Fig. S8). However, jasmonic acid levels increased in mature leaves of the *vte1* mutant under control conditions, but not in those of the *vte4* mutant or the wild type. Under salt stress, leaf age-induced jasmonic acid accumulated in both the *vte1* mutant and the wild type, but not in the *vte4* mutants (Fig. 8). No differences between mutants and the wild type were observed in jasmonic acid levels under water stress (Supplementary Fig. S8).

Discussion

A number of environmental stress factors have been associated with an increase in photosynthesis-derived ROS, and the levels of tocopherols and other antioxidants have been related to stress tolerance. Whereas stress-tolerant plants normally display increased tocopherol levels, the most sensitive ones show net tocopherol loss under stress, which is thought to lead to oxidative damage and cell destruction (reviewed in Munné-Bosch and Alegre 2002). However, the function of tocopherols might be more complex, especially considering their role in cellular signaling. Tocopherols are part of an intricate signaling network controlled by ROS, antioxidants and hormones,

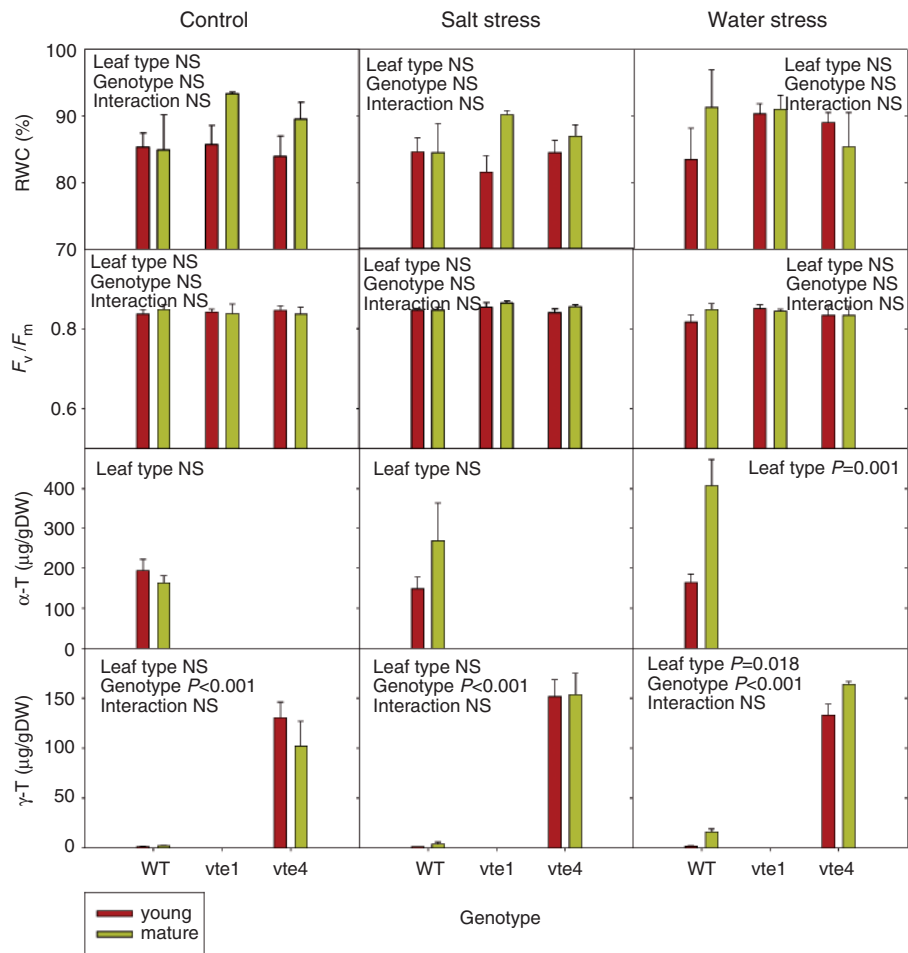


Fig. 4 Relative water content (RWC), maximum efficiency of PSII photochemistry (F_v/F_m ratio) and levels of α - and γ -tocopherol (α -T and γ -T, respectively) in young and mature leaves of the wild type, and *vte1* and *vte4* mutants of *A. thaliana* exposed to control, salt stress or water stress conditions for 7 d. Data are the mean \pm SE of $n = 4$ experiments. Significant differences between genotypes, leaf type and their interaction (genotype \times leaf type) are given in the panels (ANOVA, $P \leq 0.05$). NS, not significant.

and are therefore good candidates to influence signaling in plant cells. Tocopherols, ascorbate and glutathione are interdependent in the control of ROS levels (Foyer and Noctor 2005, Kanwischer et al. 2005, Munné-Bosch 2005, Asada 2006), and ROS are crucial modulators of gene expression in chloroplasts (Apel and Hirt 2004) and the nucleus (Vandenabeele et al. 2003). Furthermore, ROS and hormones interact in the regulation of signal transduction and gene expression in plants (Pastori and Foyer 2002). By controlling ROS levels and the extent of lipid peroxidation in chloroplasts, tocopherols may indirectly regulate the amounts of extraplastidic lipid peroxidation products and affect gene expression in the nucleus. Hofius et al. (2004) showed that tocopherols may affect source-sink transitions and may alter gene expression in plants, thus providing the first steps towards understanding the role of tocopherols in signaling in plant cells. Later, it was found that tocopherols play an essential role in low-temperature adaptation (Maeda et al. 2006, Maeda et al. 2008, Song et al. 2010) and seedling germination and growth (Sattler et al. 2004,

Sattler et al. 2006), in both cases influencing gene expression levels through modulation of extraplastidic polyunsaturated fatty acid metabolism. Under water deficit and salt stress, however, it was still unknown to what extent a tocopherol deficiency can alter the plant stress response at the gene expression level.

The results clearly indicate that major changes in transcript levels of ethylene biosynthesis, perception and signaling genes occur in the *vte4* mutant, which lacks α -tocopherol, but accumulates γ -tocopherol in leaves. Transcript levels of *ACS6* increased in the *vte4* mutant exposed to 11 d of salt stress, while levels were unaltered in the wild type and the *vte1* mutant. *ACO4* expression levels also increased more in the *vte4* mutant than in the *vte1* mutant or the wild type exposed to severe water stress, a result that was also observed, although to a lesser extent, in plants exposed to salt stress, probably partly because the salt stress was not as severe as the water stress. Another important factor controlling the extent of tocopherol effects on the expression of ethylene biosynthesis,

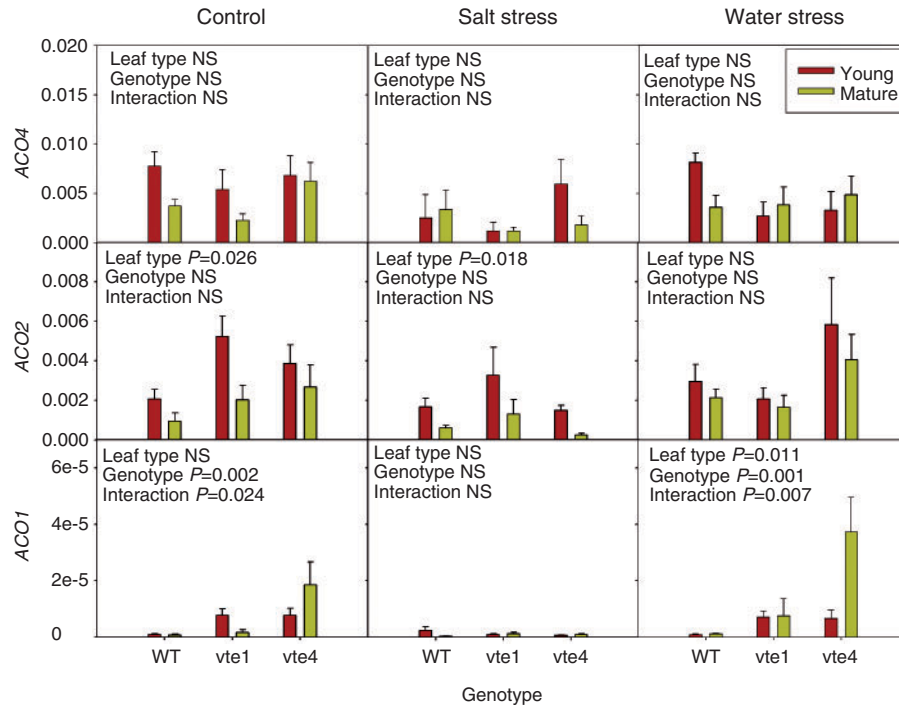


Fig. 5 Relative expression of the ethylene biosynthesis genes, *ACO4*, *ACO2* and *ACO1* in young and mature leaves of the wild type and *vte1* and *vte4* mutants of *A. thaliana* plants exposed to control, salt stress or water stress conditions for 7 d. Data are the mean \pm SE of $n = 4$ experiments. Significant differences between genotypes, leaf type and their interaction (genotype \times leaf type) are given in the panels (ANOVA, $P \leq 0.05$). NS, not significant. *GAPDH* was used as the reference gene to calculate relative expression of the ethylene biosynthesis genes.

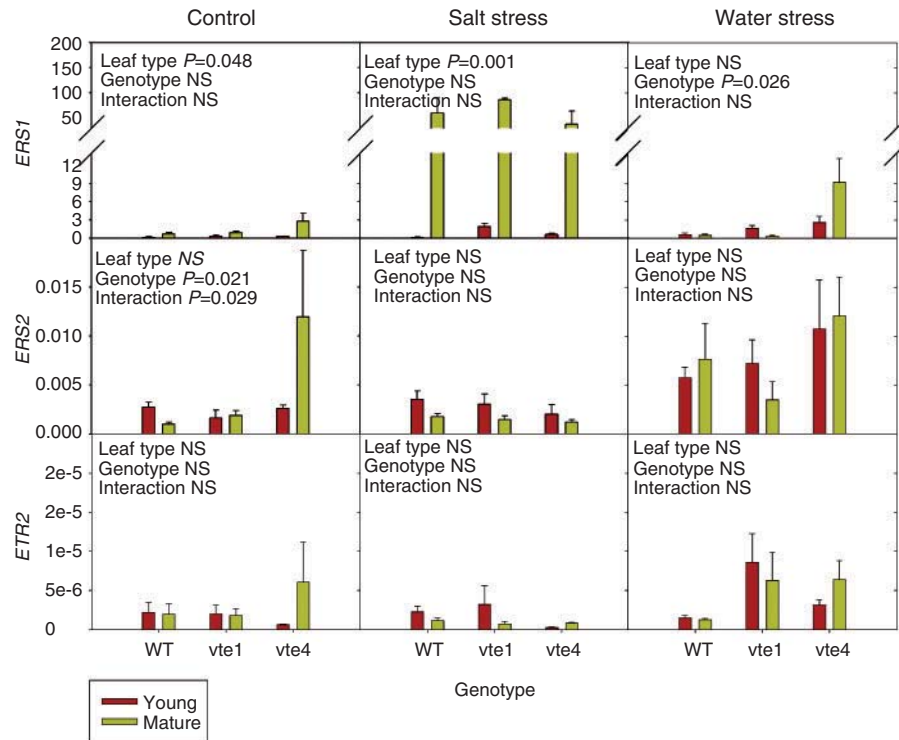


Fig. 6 Relative expression of the ethylene perception genes, *ERS1*, *ERS2* and *ETR2* in young and mature leaves of the wild type and *vte1* and *vte4* mutants of *A. thaliana* plants exposed to control, salt stress or water stress conditions for 7 d. Data are the mean \pm SE of $n = 4$ experiments. Significant differences between genotypes, leaf type and their interaction (genotype \times leaf type) are given in the panels (ANOVA, $P \leq 0.05$). NS, not significant. *GAPDH* was used as the reference gene to calculate relative expression of the ethylene perception genes.

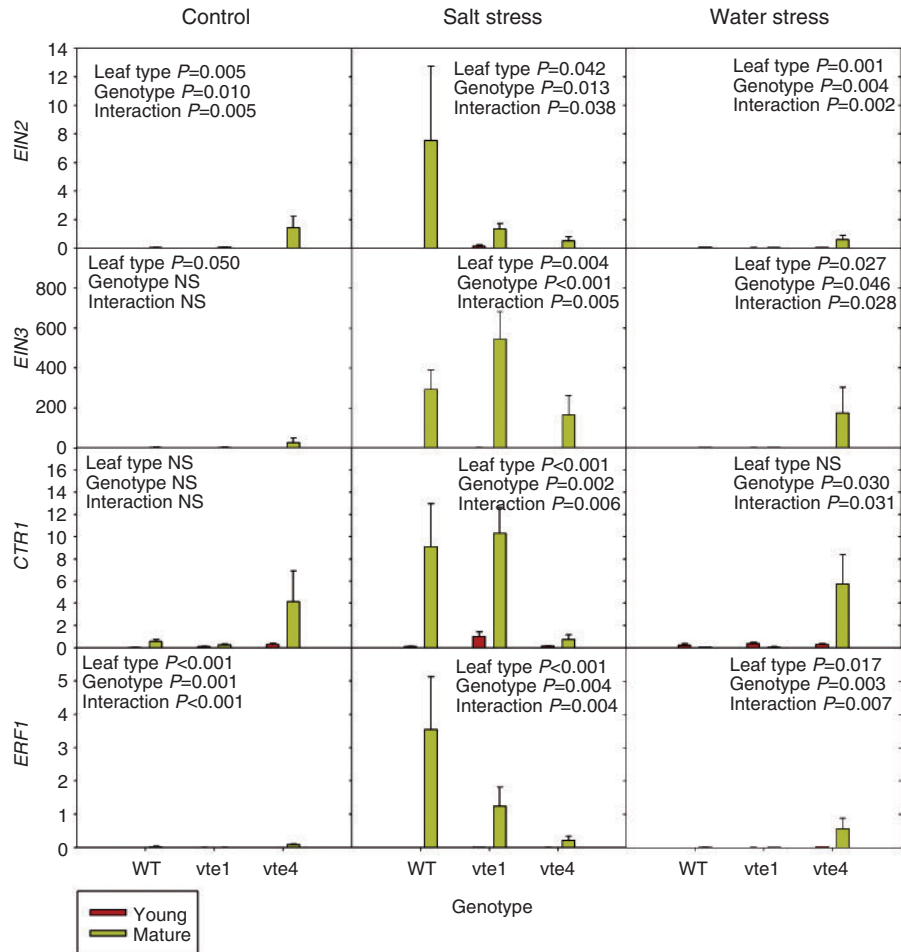


Fig. 7 Relative expression of the ethylene signaling genes, *EIN2*, *EIN3*, *CTR1* and *ERF1* in young and mature leaves of the wild type and *vte1* and *vte4* mutants of *A. thaliana* plants exposed to control, salt stress or water stress conditions for 7 d. Data are the mean \pm SE of $n = 4$ experiments. Significant differences between genotypes, leaf type and their interaction (genotype \times leaf type) are given in the panels (ANOVA, $P \leq 0.05$). NS, not significant. *GAPDH* was used as the reference gene to calculate relative expression of the ethylene signaling genes.

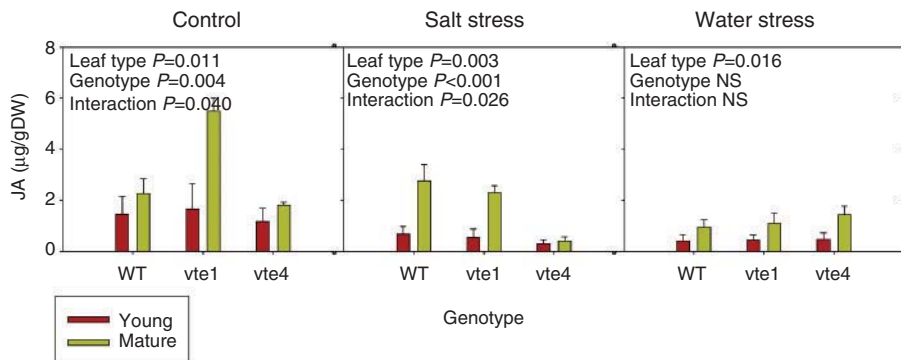


Fig. 8 Jasmonic acid (JA) levels in young and mature leaves of the wild type and *vte1* and *vte4* mutants of *A. thaliana* plants exposed to control, salt stress or water stress conditions for 7 d. Data are the mean \pm SE of $n = 4$ experiments. Significant differences between genotypes, leaf type and their interaction (genotype \times leaf type) are given in the panels (ANOVA, $P \leq 0.05$). NS, not significant.

perception and signaling genes is leaf age. In control plants, reduced ACO2 transcript levels were observed in mature leaves of the wild type and the *vte1* mutant, while ACO1 transcript levels increased in those of the *vte4* mutant. Furthermore, transcript levels of *ERS1*, *ERS2* and *ETR2* increased in mature leaves of the *vte4* mutant only, and elevated levels of *CTR1*, *EIN2*, *EIN3* and *ERF1* were observed in mature leaves of the control and water-stressed *vte4* mutant. However, with salt treatment, these transcript levels remained constant or dramatically dropped in the *vte4* mutant. In addition, leaf age-induced jasmonic acid accumulated in both the *vte1* mutant and the wild type, but not in the *vte4* mutant under salt stress. It has been shown that the transcription factor ERF1 acts downstream of the interaction between the ethylene and jasmonic acid pathways and is a key element in the integration of both signals for the regulation of defense response genes (Lorenzo et al. 2003), thereby suggesting that jasmonic acid and ethylene signaling transcript levels are down-regulated in mature leaves of the salt-stressed *vte4* mutant.

Interestingly, this differential response at the gene expression level in the *vte4* mutant results in a similar resistance to salt and water stress, as indicated by the F_v/F_m ratio and plant biomass, which were similar in the *vte4* mutant and the wild type. Similar stress sensitivity in the *vte4* mutant and the wild type was also observed when plants were subjected to light, heat and cold stress (Bergmüller et al. 2003). Indeed, neither the *vte1* nor the *vte4* mutants were more sensitive than the wild type to any of the stress conditions applied in the present study, thus suggesting that γ -tocopherol is at least as efficient as its α homolog in the protection of plants against salt and water stress. It appears, however, that the mechanisms to achieve this similar response differ between the mutants, as indicated by changes in transcript levels of ethylene biosynthesis genes under both salt and water stress. Obviously, this does not exclude many other mechanisms that may operate in these mutants, and their response to salt and water stress may not necessarily be the same as their response to other types or magnitudes of stresses. Indeed, transgenic tobacco accumulating γ - instead of α -tocopherol was more sensitive to high doses of salt stress (≥ 200 mM NaCl) than the wild-type strain, which accumulates α -tocopherol (Abbasi et al. 2007). Taken together, this suggests that plants constitutively accumulating γ - instead of α -tocopherol show an altered response to salt stress, since sustained accumulation of γ -tocopherol represses jasmonic acid and ethylene signaling response pathways, which leads to reduced expression of transcription factor ERF1. One may speculate that this will predispose plants to suffer the negative effects of salt stress when the duration and/or magnitude of stress is increased (Abbasi et al. 2007), effects that were not observed in our study due to exposure of plants to low doses of salinity. It is interesting to note that such effects were specific to the plant response to salinity and were not observed under water deficit.

Furthermore, the apparent lack of differential response in the *vte1* mutant might be associated with the antioxidant potential of the tocopherol precursor, 2,3-dimethyl-5-phytylhydroquinol, which accumulates in this mutant (Lieber and Burr 2000). Although the *vte1* mutant lacks both tocopherols and plastochromanol, which account for 5–10% of total tocopherols in *A. thaliana* grown under low light conditions (Zbierzak et al. 2010), this mutant accumulates plastochinone, an important lipid-soluble antioxidant which in addition to tocopherols protects chloroplasts from photooxidative stress (Szymanska and Kruk 2010). It is therefore very likely that the accumulation of plastochinone and 2,3-dimethyl-5-phytylhydroquinol can substitute for the lack of tocopherols in the *vte1* mutant and therefore no apparent phenotype in plant response to water deficit and salt stress in the low light conditions used in the present study was observed.

It is concluded that jasmonic acid and ethylene signaling pathways are down-regulated in mature leaves of the salt-stressed *vte4* mutant, thus indicating that an altered tocopherol composition in chloroplasts of this mutant alters the physiological response of mature leaves to salt stress. It is still to be determined, however, how enhanced γ -tocopherol levels lead to reduced jasmonic acid and ethylene signaling gene expression levels in mature leaves, and why this occurs under salt stress conditions only.

Materials and Methods

Plant material, growth conditions and treatments

Seeds of *A. thaliana* Columbia ecotype (Col 0) and *vte1* and *vte4* mutants, which were provided by Kathleen Brückner (University of Kiel, Germany), were used in this study. *vte1* and *vte4* mutants have T-DNA insertions in the *VTE1* and *VTE4* genes, which encode tocopherol cyclase and γ -tocopherol methyltransferase, respectively, so that the *vte1* mutant lacks both α - and γ -tocopherol, and the *vte4* mutant lacks α -tocopherol but accumulates γ -tocopherol (Porfirova et al. 2002, Bergmüller et al. 2003). Plants were grown in pots containing a mixture of peat:perlite:vermiculite (1:1:1, v/v/v) in a constant environment chamber (8 h photoperiod, 90–110 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, air temperature 21–23°C) and were watered with Hoagland's solution every 3 d during 8 weeks until the experiment started. Then, plants were exposed for 11 d to either (i) water deficit (water-stressed plants) by withholding water; (ii) salt stress by watering with Hoagland's solution but with an additional 100 mM of NaCl; or (iii) watering with Hoagland's solution (controls).

For analysis of tocopherols, jasmonic acid and the genes involved in the biosynthesis, perception and signaling of ethylene, young leaves were collected in the middle of the photoperiod at 0, 4, 7 and 11 d of treatment, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analyses. Young and mature leaves were additionally collected at day 7 of

the experiment (before severe necrosis occurred in mature leaves of water-stressed plants) to examine the influence of leaf age.

Biomass, leaf water content and the F_v/F_m ratio

Biomass was determined after 11 d of treatment by measuring the rosette weight after drying the leaves in an oven at 80°C for 24 h. RWC was determined as $100 (FW - DW)/(TW - DW)$, where FW is the fresh weight, TW is the turgid weight after re-hydrating the leaves at 4°C in darkness for 24 h, and DW is the dry weight after oven-drying the leaves at 80°C to constant weight. The F_v/F_m was determined by using a pulse-modulated fluorimeter mini-PAM (Walz) after 1 h of dark adaptation, as described (Genty et al. 1989).

Analyses of tocopherols

For the extraction of α - and γ -tocopherol, leaf samples were ground in liquid nitrogen and extracted with ice-cold methanol using a Branson 2510 ultrasonic cleaner (Branson) for 45 min. The samples were then centrifuged for 15 min at 4°C and transferred to vials for analysis. The HPLC analysis was carried out as described (Amaral et al. 2005). In brief, the HPLC equipment consisted of an integrated system with a Waters 600 controller pump, a Waters 714 plus auto-sampler and an FP-1520 fluorescence detector (Jasco). Tocopherols were separated on an Inertsil 100A (5 μ m, 30 \times 250 mm, GL Sciences Inc.) normal-phase column operating at room temperature. The mobile phase used was a mixture of *n*-hexane and 1,4-dioxane (95.5:4.5, v/v) at a flow rate of 0.7 ml min⁻¹, and the injection volume was 10 μ l. Detection was carried out for excitation at 295 nm and emission at 330 nm. Quantification was based on the fluorescence signal response compared with authentic standards of each compound (Sigma-Aldrich).

Gene expression analyses

RNA was isolated from leaf material using the RNEasy Plant Mini Kit (Qiagen) following the kit instructions, but incubated with DNase [RNase-Free DNase Set (Qiagen)] to eliminate the genomic DNA. The RNA was used for cDNA synthesis using GeneAmp RNA PCR (Applied Biosystems).

The most important genes related to ethylene biosynthesis, perception and signaling were analyzed by real-time PCR for each sample. At the same time, genes of tocopherol biosynthesis were analyzed only in wild-type plants. cDNAs were amplified using LightCycler 480 SYBR Green 1 Master (Roche), and the specific primers for each gene (**Supplementary Table S1**) were purchased from Eurofins MWG Operon. For the great majority of primers, the conditions were: 45 cycles of 95°C (10 s); 63°C (20 s); 72°C (20 s). For quantification, the ΔC_T method was used with the equation: $\text{ratio (reference gene, target gene)} = 2^{CT(\text{reference gene}) - CT(\text{target gene})}$, where CT is the cycle number at which enough amplified product accumulates to yield a detectable fluorescent signal, the reference gene was

GAPDH (which encodes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) and the target gene was the gene of interest.

Jasmonic acid analyses

Levels of jasmonic acid were analyzed by UPLC-MS/MS (ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry) with a modification of the method described by Abreu and Munné-Bosch (2009). In brief, leaf samples were ground in liquid nitrogen and, after addition of deuterated jasmonic acid as an internal standard, extracted with methanol using sonication. The supernatant was dried completely under a nitrogen stream and the extract reconstituted in methanol. The extracts were then filtered through a 0.22 μ m PTFE filter (Waters), and injected into the UPLC-MS/MS system. The UPLC system consisted of an Acquity Waters binary pump equipped with an autosampler and a UV detector. For analysis of the extracts, a HALO C18 column (2.1 \times 75 mm, 2.7 μ m) was used with a binary solvent system comprising acetonitrile (A) and deionized water (B), both containing 0.005% (v/v) glacial acetic acid. Separations were performed using a gradient of increasing acetonitrile content, at a constant flow rate of 0.4 ml min⁻¹. The gradient used was: 0 min, 1% A; 0–4.5 min, increasing to 45% A; 4.5–5 min, increasing to 99% A; 5–6 min, 99% A; 6–6.2 min, decreasing to 1% A; 6.2–7 min, 1% A. MS/MS analyses were performed on an API 3000 triple quadrupole mass spectrometer (PE Sciex). All the analyses were performed using the Turbo Ion spray source in negative ion mode. MRM acquisition was carried out by monitoring the following transition: JA, 209/59; and for the deuterated internal standard: JA* (d5), 214/62. Quantification by MS/MS using the MRM method was performed as described (Abreu and Munné-Bosch 2009). Results were corrected taking into account the specific recovery rates using the internal deuterated standard.

Statistical analyses

Statistical differences between measurements of the different treatments and ages were analyzed with analysis of variance (ANOVA) using SPSS software. Differences were considered significant at a probability level of $P < 0.05$.

Supplementary data

Supplementary data are available at PCP online.

Funding

This research was supported by the Generalitat de Catalunya [ICREA Academia prize awarded to S.M.-B.]; the National Institutes of Health [(1R01GM071855) to C.C.]; the Comissionat per a Universitats i Recerca del Departament d'Innovació, Universitats i Empresa of the Generalitat de Catalunya [fellowship awarded J.C.].

Acknowledgments

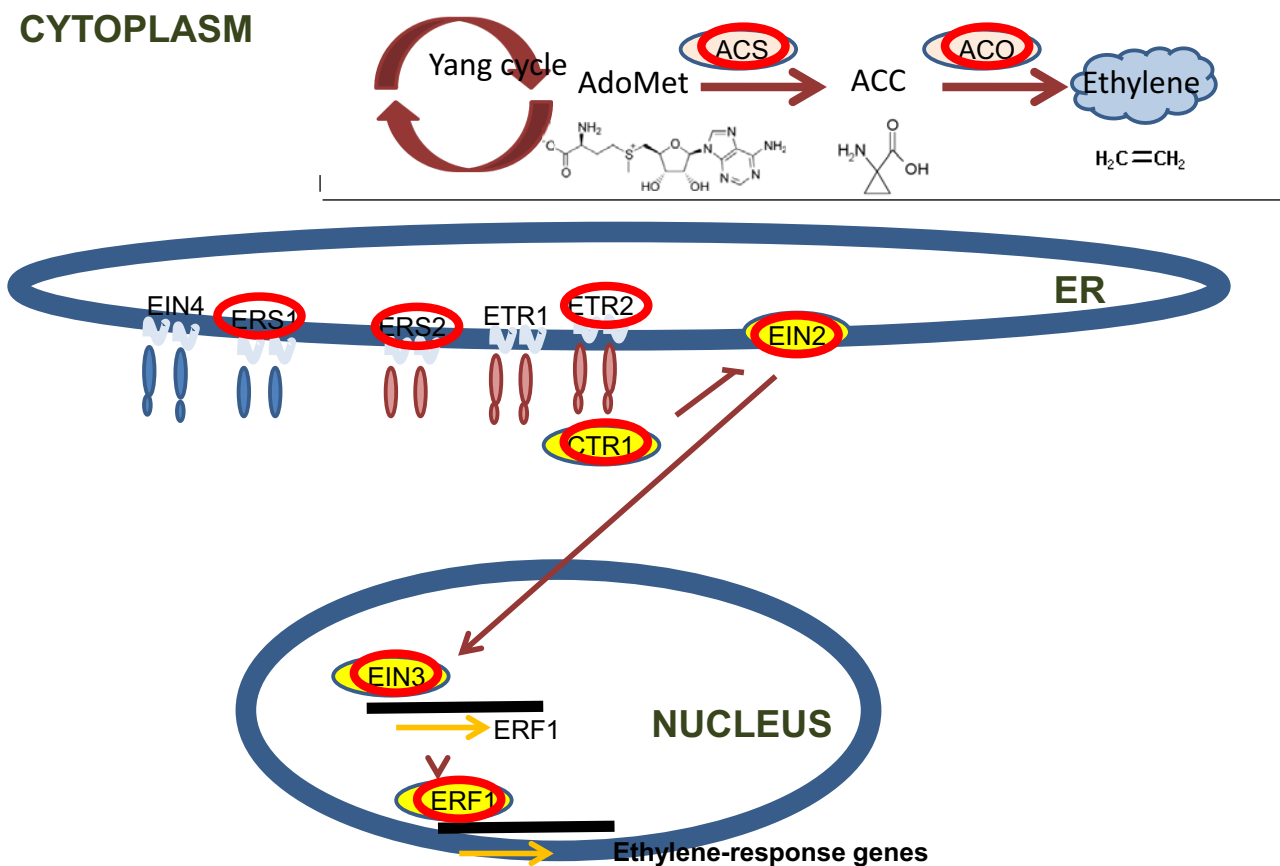
We are very grateful to the Serveis Científico-tècnics (University of Barcelona) for technical assistance and Kathleen Brückner (University of Kiel, Germany) for providing seeds of *vte1* and *vte4* mutants.

References

- Abbasi, A., Hajirezaei, M., Hofius, D., Sonnewald, U. and Voll, L.M. (2007) Specific roles of α - and γ -tocopherol in abiotic stress responses of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Plant Physiol.* 143: 1720–1738.
- Abreu, M.E. and Munné-Bosch, S. (2009) Salicylic acid deficiency in *NahG* transgenic lines and *sid2* mutants increases seed yield in the annual plant *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 60: 1261–1271.
- Amaral, J.S., Casal, S., Torres, D., Seabra, R.M. and Oliveira, B.P.P. (2005) Simultaneous determination of tocopherols and tocotrienols in hazelnuts by a normal phase liquid chromatographic method. *Anal. Sci.* 21: 1545–1548.
- Apel, K. and Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 373–399.
- Argueso, C.T., Hansen, M. and Kieber, J.J. (2007) Regulation of ethylene biosynthesis. *J. Plant Growth Regul.* 26: 92–105.
- Asada, K. (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol.* 141: 391–396.
- Azzi, A. (2007) Molecular mechanism of α -tocopherol action. *Free Radic. Biol. Med.* 43: 16–21.
- Bergmüller, E., Porfirova, S. and Dörmann, P. (2003) Characterization of an *Arabidopsis* mutant deficient in gamma-tocopherol methyltransferase. *Plant Mol. Biol.* 52: 1181–1190.
- Bleecker, A.B. and Kende, H. (2000) Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 1–18.
- Cao, W.H., Liu, J., He, X.J., Mu, R.L., Zhou, H.L., Chen, S.Y. et al. (2006) Modulation of ethylene responses affects plant salt-stress responses. *Plant Physiol.* 143: 707–719.
- Cao, W., Chen, S.Y. and Zhang, J.S. (2008) Ethylene signaling regulates salt stress response. *Plant Signal. Behav.* 3: 761–763.
- Cela, J., Falk, J. and Munné-Bosch, S. (2009) Ethylene signaling may be involved in the regulation of tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 583: 992–996.
- Chen, Y.F., Etheridge, N. and Schaller, E. (2005) Ethylene signal transduction. *Ann. Bot.* 95: 901–915.
- Falk, J. and Munné-Bosch, S. (2010) Tocochromanols functions in plants: antioxidation and beyond. *J. Exp. Bot.* 61: 1549–1566.
- Foyer, C.H. and Noctor, G. (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17: 1866–1875.
- Genty, B., Briantais, J. and Baker, N.R. (1989) The relationship between quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990: 87–92.
- Havaux, M., Eymery, F., Porfirova, S., Rey, P. and Dörmann, P. (2005) Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 17: 3451–3469.
- Hofius, D., Hajirezaei, M., Geiger, M., Tschiersch, H., Melzer, M and Sonnewald, U. (2004) RNAi-mediated tocopherol deficiency impairs photoassimilate export in transgenic potato plants. *Plant Physiol.* 135: 1256–1268.
- Horvath, G., Wessjohann, L., Bigirimana, J., Monica, H., Jansen, M., Guisez, Y. et al. (2006) Differential distribution of tocopherols and tocotrienols in photosynthetic and non-photosynthetic tissues. *Phytochemistry* 67: 1185–1195.
- Kanwischer, M., Porfirova, S., Bergmüller, E. and Dörmann, P. (2005) Alterations in tocopherol cyclase activity in transgenic and mutant plants of *Arabidopsis* affect tocopherol content, tocopherol composition, and oxidative stress. *Plant Physiol.* 137: 713–723.
- Kendrick, M.D. and Chang, C. (2008) Ethylene signaling: new levels of complexity and regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11: 479–485.
- Liebler, D.C. and Burr, J.A. (2000) Antioxidant reactions of α -tocopherolhydroquinone. *Lipids* 35: 1045–1047.
- Liu, X., Hua, X., Guo, J., Qi, D., Wang, L., Liu, Z. et al. (2008) Enhanced tolerance to drought stress in transgenic tobacco plants overexpressing *VTE1* for increased tocopherol production from *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnol. Lett.* 30: 1275–1280.
- Lorenzo, O., Piqueras, O., Sánchez-Serrano, J.J. and Solano, R. (2003) *ETHYLENE RESPONSE FACTOR1* integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* 15: 165–178.
- Maeda, H. and DellaPenna, D. (2007) Tocopherol functions in photosynthetic organisms. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 260–265.
- Maeda, H., Sage, T.L., Isaac, G., Welti, R. and DellaPenna, D. (2008) Tocopherols modulate extraplastidic polyunsaturated fatty acid metabolism in *Arabidopsis* at low temperature. *Plant Cell* 20: 452–470.
- Maeda, H., Song, W., Sage, T.L. and DellaPenna, D. (2006) Tocopherols play a crucial role in low-temperature adaptation and phloem loading in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 2710–2732.
- Mène-Saffrané, L. and DellaPenna, D. (2010) Biosynthesis, regulation and functions of tocochromanols in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48: 301–309.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S. and Mittler, R. (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ.* 33: 453–467.
- Munné-Bosch, S. (2005) The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *J. Plant Physiol.* 162: 743–748.
- Munné-Bosch, S. and Alegre, L. (2002) The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21: 31–57.
- Munné-Bosch, S. and Alegre, L. (2003) Drought-induced changes in the redox state of α -tocopherol, ascorbate, and the diterpene carnosic acid in chloroplasts of Labiatae species differing in carnosic acid contents. *Plant Physiol.* 131: 1816–1825.
- Munné-Bosch, S., Schwarz, K. and Alegre, L. (1999) Enhanced formation of α -tocopherol and highly oxidized abietane diterpenes in water-stressed rosemary plants. *Plant Physiol.* 121: 1047–1052.
- Pastori, G. and Foyer, C.H. (2002) Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress: the central role of 'redox' and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiol.* 129: 460–468.
- Porfirova, S., Bergmüller, E., Tropf, S., Lemke, R. and Dörmann, P. (2002) Isolation of an *Arabidopsis* mutant lacking vitamin E and identification of a cyclase essential for all tocopherol biosynthesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99: 12495–12500.
- Sattler, S.E., Cahoon, E.B., Coughlan, S.J. and DellaPenna, D. (2003) Characterization of tocopherol cyclases from higher plants and cyanobacteria. Evolutionary implications for tocopherol synthesis and function. *Plant Physiol.* 132: 2184–2195.
- Sattler, S.E., Gilliland, L.U., Magallanes-Lundback, M., Pollard, M. and DellaPenna, D. (2004) Vitamin E is essential for seed longevity and

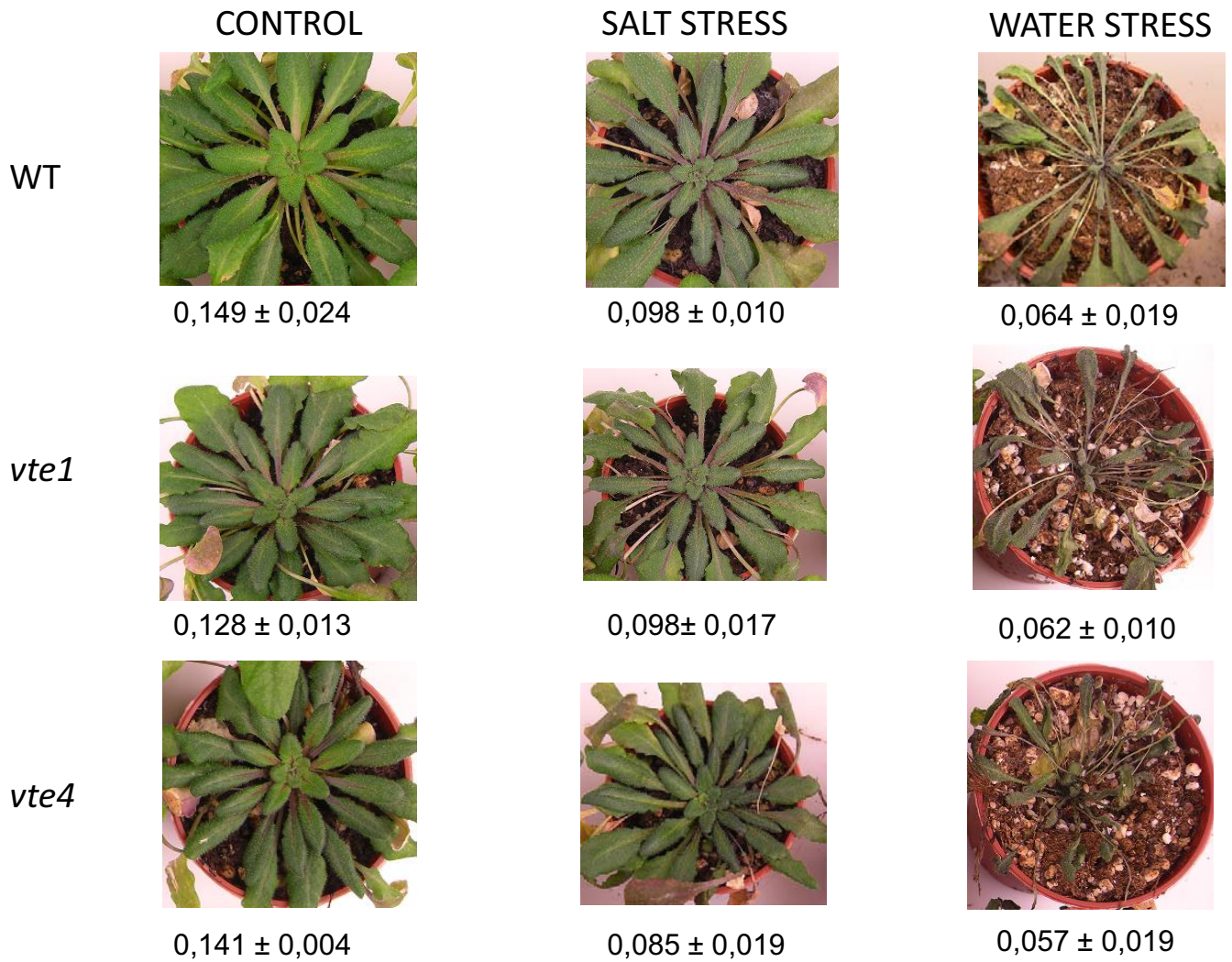
- for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell* 16: 1419–1432.
- Sattler, S.E., Mène-Saffrané, L., Farmer, E.E., Krischke, M., Müller, M.J. and DellaPenna, D. (2006) Non-enzymatic lipid peroxidation reprograms gene expression and activates defense markers in *Arabidopsis* tocopherol-deficient mutants. *Plant Cell* 18: 3706–3720.
- Smirnov, N. (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.* 125: 27–58.
- Smirnov, N. (2005) Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants. Blackwell Publishing, Oxford.
- Song, W., Maeda, H. and DellaPenna, D. (2010) Mutations of the ER to plastid lipid transporters TGD1, 2, 3 and 4 and the ER oleate desaturase FAD2 suppress the low temperature-induced phenotype of *Arabidopsis* tocopherol-deficient mutant *vte2*. *Plant J.* 62: 4–18.
- Szymanska, R. and Kruk, J. (2008a) Tocopherol content and isomers' composition in selected plant species. *Plant Physiol. Biochem.* 46: 29–33.
- Szymanska, R. and Kruk, J. (2008b) Gamma-tocopherol dominates in young leaves of runner bean (*Phaseolus coccineus*) under a variety of growing conditions: the possible functions of gamma-tocopherol. *Phytochemistry* 69: 2142–2148.
- Szymanska, R. and Kruk, J. (2010) Plastoquinol is the main prenyllipid synthesized during acclimation to high light conditions in *Arabidopsis* and is converted to plastoquinone by tocopherol cyclase. *Plant Cell Physiol.* 51: 537–545.
- Tian, Q., Uhlir, N.J. and Reed, J.W. (2002) *Arabidopsis* SHY2/IAA3 inhibits auxin-regulated gene expression. *Plant Cell* 14: 301–319.
- Traber, M.G. and Atkinson, J. (2007) Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic. Biol. Med.* 43: 4–15.
- Tsuchisaka, A. and Theologis, A. (2004) Unique and overlapping expression patterns among the *Arabidopsis* 1-amino-cyclopropane-1-carboxylase synthase gene family members. *Plant Physiol.* 136: 2982–3000.
- Vahala, J., Schlagnhauser, C.D. and Pell, E.J. (1998) Induction of an ACC synthase cDNA by ozone in light-grown *Arabidopsis thaliana* leaves. *Physiol. Plant.* 103: 45–50.
- Vandenabeele, S., Van Der Kelen, K., Dat, J., Gadjev, I., Boonefaes, T., Morsa, S. et al. (2003) A comprehensive analysis of hydrogen peroxide-induced gene expression in tobacco. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100: 16113–16118.
- Zbierzak, A.M., Kanwischer, M., Wille, C., Vidi, P., Giavalisco, P., Lohmann, A. et al. (2010) Intersection of the tocopherol and plastoquinol metabolic pathways at the plastoglobule. *Biochem. J.* 425: 389–399.

SUPPLEMENTARY DATA



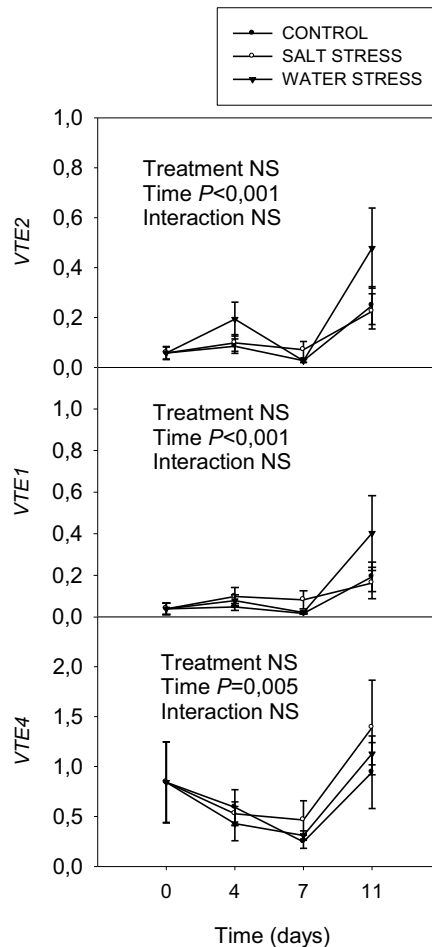
Suppl. Fig. 1 Overview of genes involved in ethylene biosynthesis, perception and signaling in *A. thaliana*. Genes coding for proteins marked in red were analyzed in the present study. AdoMet, S-Adenosyl-L-Methionine. ACC, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid.

SUPPLEMENTARY DATA



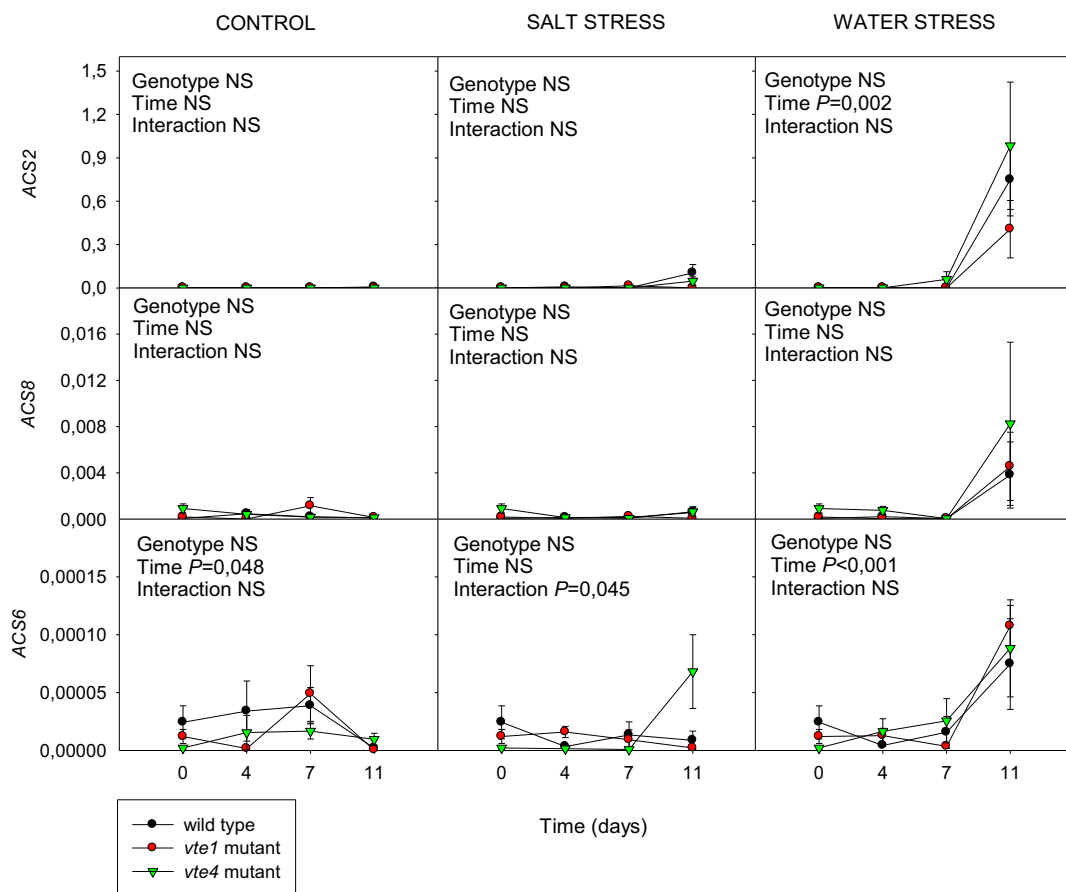
Suppl. Fig. 2 Phenotype and rosette biomass (in g of dry mass) of wild type (WT) plants, and *vte1* and *vte4* mutants of *A. thaliana* exposed to 11 days of salt or water stress treatments compared to controls. Data are the mean ± SE of at least 4 individuals. No significant differences between genotypes were observed in any treatment (ANOVA, $P \leq 0.05$)

SUPPLEMENTARY DATA



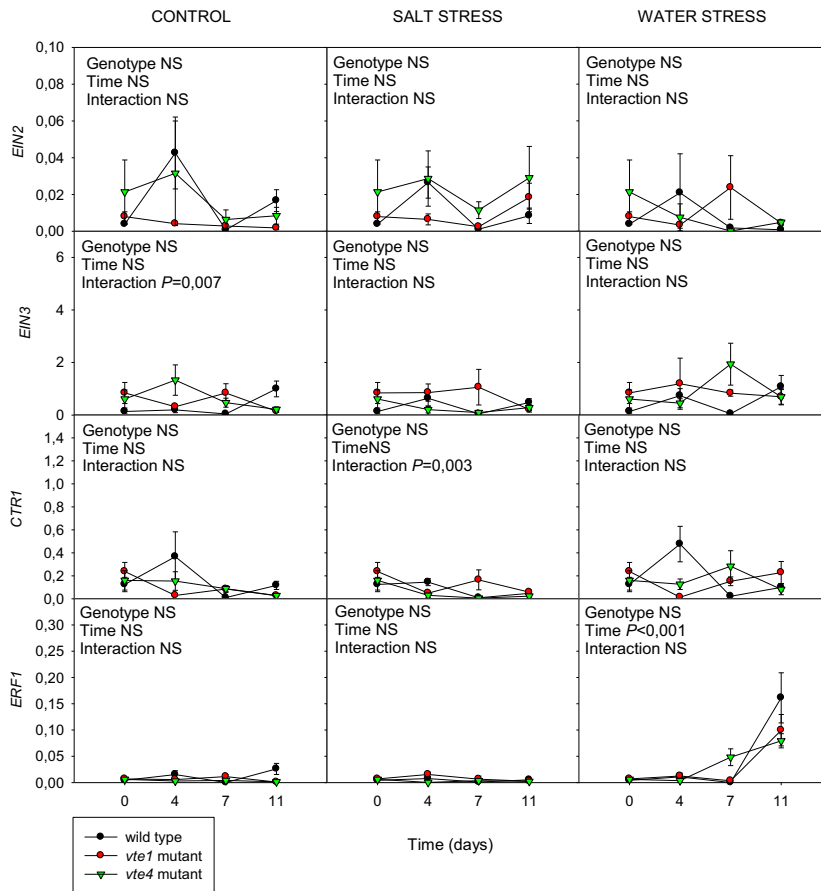
Suppl. Fig. 3 Time-course evolution in relative expression of the tocopherol biosynthesis genes, *VTE2*, *VTE1* and *VTE4* in young leaves of wild type *A. thaliana* plants exposed to control, salt stress or water stress conditions for 11 days. Data are the mean \pm SE of $n=4$. Significant differences between treatments, time of measurements and its interaction (Treatment x Time) are given in the panels (ANOVA, $P \leq 0.05$). NS, not significant. Data are given in relative units using *GAP-DH* as the reference gene.

SUPPLEMENTARY DATA



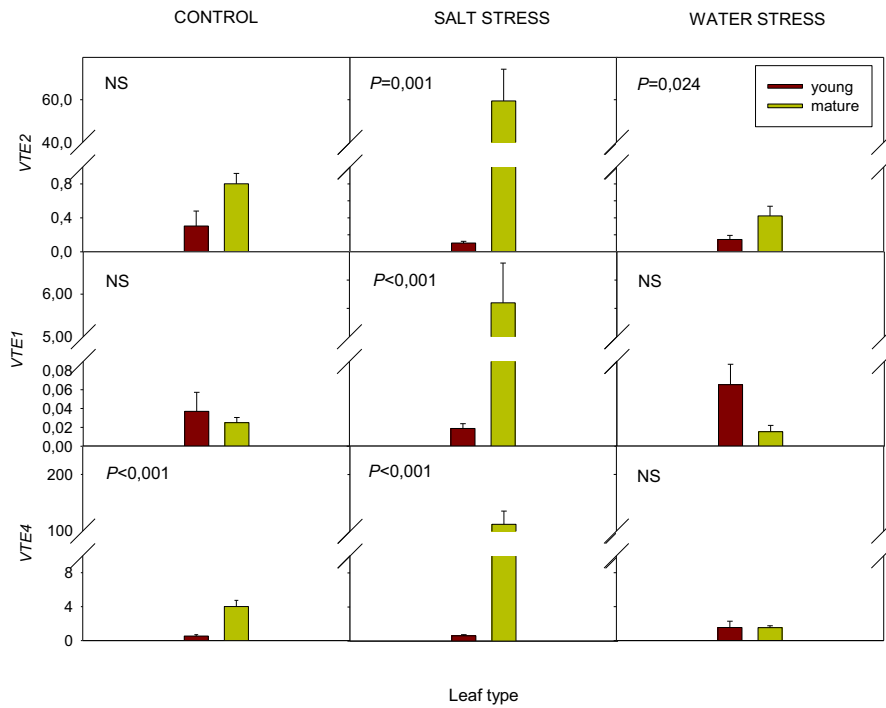
Suppl. Fig. 4 Time-course evolution in relative expression of the ethylene biosynthesis genes, ACS2, ACS8 and ACS6 in young leaves of wild type *A. thaliana* plants exposed to control, salt stress or water stress conditions for 11 days. Data are the mean \pm SE of $n=4$. Significant differences between genotypes, time of measurements and its interaction (Genotype x Time) are given in the panels (ANOVA, $P \leq 0.05$). NS, not significant. Data are given in relative units using *GAP-DH* as the reference gene.

SUPPLEMENTARY DATA



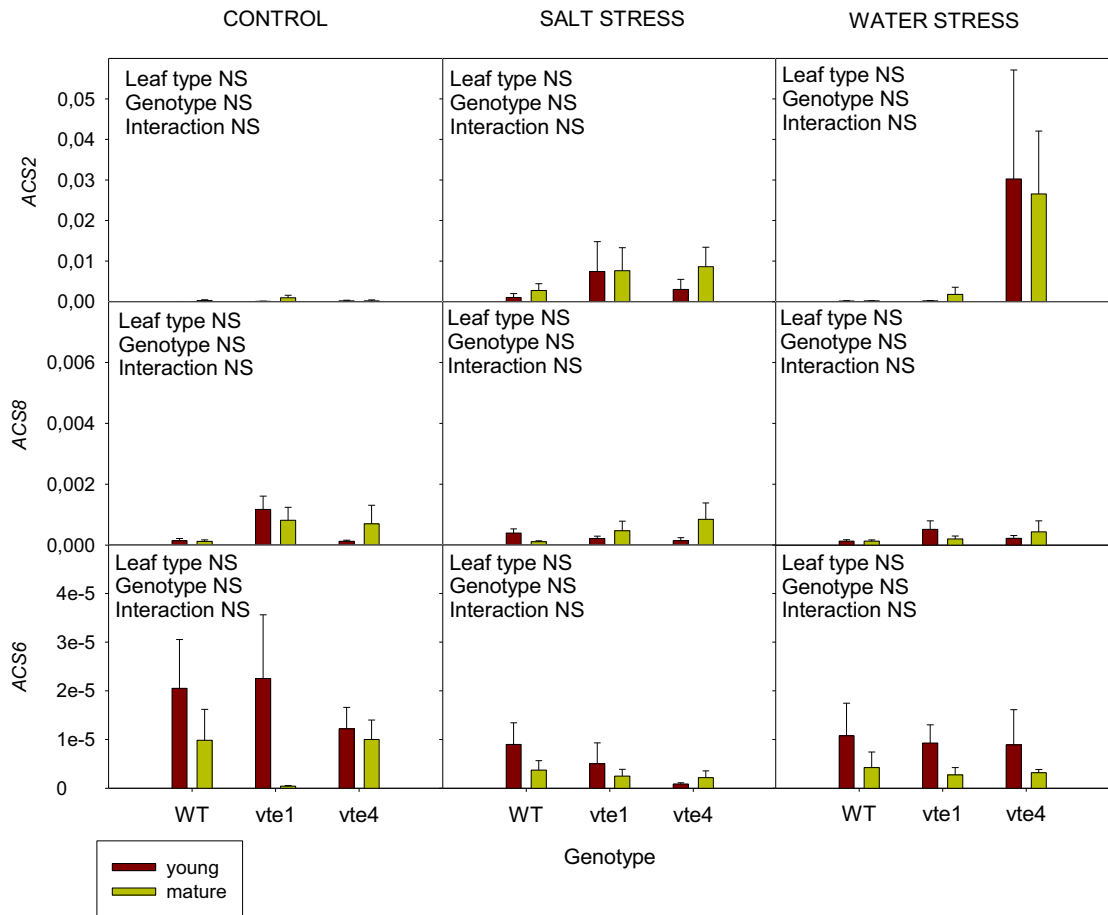
Suppl. Fig. 5 Time-course evolution in relative expression of the ethylene signalling genes, *EIN2*, *EIN3*, *CTR1* and *ERF1* in young leaves of wild type *A. thaliana* plants exposed to control, salt stress or water stress conditions for 11 days. Data are the mean \pm SE of $n=4$. Significant differences between genotypes, time of measurements and its interaction (Genotype x Time) are given in the panels (ANOVA, $P \leq 0.05$). NS, not significant. Data are given in relative units using *GAP-DH* as the reference gene.

SUPPLEMENTARY DATA



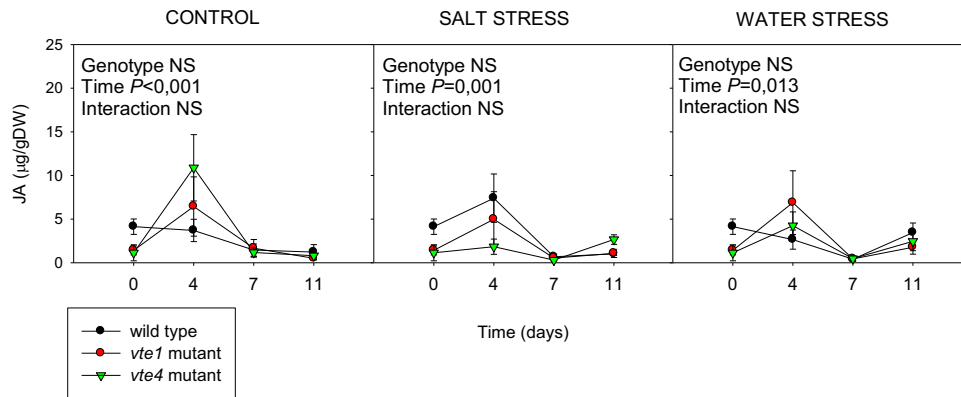
Suppl. Fig. 6 Relative expression of the tocopherol biosynthesis genes, *VTE2*, *VTE1* and *VTE4* in young and mature leaves of wild type *A. thaliana* plants exposed to control, salt stress or water stress conditions for 7 days. Data are the mean \pm SE of $n=4$. Significant differences between leaf type are given in the panels (ANOVA, $P \leq 0.05$). NS, not significant. Data are given in relative units using *GAP-DH* as the reference gene.

SUPPLEMENTARY DATA



Suppl. Fig. 7 Relative expression of the ethylene biosynthesis genes, *ACS2*, *ACS8* and *ACS6* in young and mature leaves of wild type *A. thaliana* plants exposed to control, salt stress or water stress conditions for 7 days. Data are the mean \pm SE of $n=4$. Significant differences between genotypes, time of measurements and its interaction (Leaf type x Genotype) are given in the panels (ANOVA, $P \leq 0.05$). NS, not significant. Data are given in relative units using *GAP-DH* as the reference gene.

SUPPLEMENTARY DATA



Suppl. Fig. 8 Time-course evolution of endogenous jasmonic acid (JA) levels in young leaves of wild type *A. thaliana* plants, and *vte1* and *vte4* mutants exposed to control, salt stress or water stress conditions for 11 days. Data are the mean \pm SE of $n=4$. Significant differences between genotypes, time of measurements and its interaction (Genotype x Time) are given in the panels (ANOVA, $P \leq 0.05$). NS, not significant.

SUPPLEMENTARY DATA

Suppl. Table 1. Primers used for analyses of gene expression

Reference gene

GAP-DH For:CAAGCAGGAATCTGAAGGCAAAATGA
Rev:CAACCACACACAAACTCTCGCCG

Ethylene biosynthesis

ACS2 (AT1G01480) For:AGGCAATTGCACATTTTCATGG
Rev:CTGTCCGCCACCTCAAGTCT

ACS6 (AT4G11280) For:CGCTGAAAATCAGCTTTGTGG
Rev CATAACAATCCGGTCAGGATCAA

ACS8 (AT4G37770) For:CCCAGACGGCATTATCCAAA
Rev:TGAAGGAAGGAAGGCCATGA

ACS11 (AT4G08040) For:TGGCTTGAAGAGCATCCAGAA
Rev:CCATCTTGTTTCGTATCGAATTCAC

ACO1 (At2g19590) For:TCAGATGCAGATTGGGAAAGC
Rev:TCTCACACATGAGCTTGGAGAGTC

ACO2 (At1g62380) For:TGCAGGAGGCATCATCTTGTT
Rev:AACGATGCAACCGACATCCT

ACO4 (At1g05010) For:CCGATGTCCCTGATCTCGAC
Rev:AGTCGGTCTTTTCGACCCGTA

Ethylene perception

ERS1 (AT2G40940)

For:AACCATTCCGGTGGAGGACT
Rev:TGCAAGATGTAGCGCCATTG

ERS2 (AT1G04310)

For:ATCCGAGTCTCAACGCTTGC
Rev:TCCAGAATATCCACCGCCTCT

ETR2 (AT3G23150)

For:TTGGAATTTACAGGTCGATGA
Rev:CTGTTTCCTTCGTCTTCGCAGT

Ethylene signaling

CTR1 (AT5G03730)

For:TCCAGCCTTCAAGGAACTTCAC
Rev:CCATCAATGCACTCCTTCCAC

EIN2 (AT5G03280)

For:TGCGCATGCACTTAACCTTTT
Rev:TGACTCAGCAAGACGCCAGA

EIN3 (AT3G20770)

For:AGGCAGAGACCTTTTTCTTCATCA
Rev:CAGGCTCAGCTTGTGGAACA

ERF1 (AT3G23240.1)

For:TCCCTTCAACGAGAACGACTC
Rev:ACGGATTTGATCGGAAGGTC

Tocopherol biosynthesis

VTE1 (AT4G32770)

For:ACAAGGAGGTTCCACCAGAGG
Rev:CAACATCACCCCAACCGTAAA

VTE2 (AT2G18950)

For:TTGGCACAGTGCTTAGCATTTTAT
Rev:TCTCCTGATGCCAATGGAAGA

VTE4 (AT1G64970)

For:TTGGCATTACTCTCAGCCCTGT
Rev:TCACCACTCTCCATCGACCA

5. DISCUSIÓN

5. Discusión

5.1. Regulación de la biosíntesis de vitamina E en plantas

La vitamina E es un conjunto de moléculas anfipáticas que juegan un importante papel en el correcto funcionamiento de los cloroplastos, detoxificando el oxígeno singlete, previniendo la propagación de la peroxidación lipídica y en consecuencia, ayudando a mantener la estabilidad y funcionalidad de las membranas fotosintéticas (revisado por Munné-Bosch y Alegre 2002). Además, el contenido de tocoferol está fuertemente influenciado por diferentes condiciones de estrés y por el estado de desarrollo de la hoja. En plantas *wild type* de *A. thaliana* sometidas a déficit hídrico los niveles de α -tocoferol aumentaron (capítulo 1) de forma similar a como ya se había descrito anteriormente (Munné-Bosch et al. 1999; 2007). En cambio, cuando fueron sometidas a un estrés salino moderado los niveles se mantuvieron estables (capítulo 2 y 5), muy probablemente debido a una menor intensidad del estrés. La edad de la hoja no provocó cambios en los niveles de tocoferol en condiciones control, a diferencia de lo que pasa en otras especies (Franzen et al. 1991; Tramontano et al. 1992). Pero el déficit hídrico sí tuvo un efecto diferente según la edad de la hoja (capítulo 5). Mientras las hojas jóvenes mantuvieron estables los niveles de tocoferol bajo condiciones de falta de agua, las hojas viejas sufrieron un aumento de dos veces en los niveles de α -tocoferol. ¿Pero qué sucedió con el γ -tocoferol, el precursor inmediato del α ? En condiciones de déficit hídrico los niveles aumentaron casi 5 veces después de 11 días de estrés, en cambio, la salinidad moderada tampoco hizo aumentar los niveles como pasaba con el α -tocoferol. De nuevo, fueron las hojas viejas sometidas a déficit hídrico las que aumentaron sus niveles en comparación con las hojas jóvenes, que se mantuvieron en niveles similares a en condiciones control (capítulo 5). El mutante *vte4*, el cual sólo tiene γ -tocoferol, mostró un comportamiento similar al observado en las plantas *wild type*, manteniendo niveles

estables en condiciones control y de salinidad, pero aumentando los niveles en las hojas viejas sometidas a déficit hídrico. En *A. cordifolia*, a diferencia de *A. thaliana*, tanto en condiciones de déficit hídrico como de estrés salino, los niveles de α -tocoferol se mantuvieron estables y solamente el γ -tocoferol aumentó ligeramente en condiciones de alta salinidad si era expresado por peso seco. Veremos a continuación si estos cambios están regulados a nivel hormonal en *A. thaliana* y *A. cordifolia*, las dos especies objeto de estudio.

Regulación por etileno

De entre todas las hormonas vegetales, el etileno destaca por su estructura característica: dos únicos átomos de carbono unidos por un doble enlace. Esta estructura tan sencilla le permite estar en forma gaseosa a presión y temperatura ambiente, pudiendo difundir libremente a través de los espacios celulares, a tejidos vecinos o incluso, hasta plantas próximas (Pierik et al. 2004). Está implicado en la regulación de diversos procesos, como la maduración de frutos climatéricos, germinación, crecimiento y destaca por su importancia en la respuesta de las plantas a diferentes tipos de estrés, tanto abióticos como bióticos (revisado por Lin et al. 2009).

Hasta el momento poco se sabía de la relación entre el tocoferol y el etileno. Flores cortadas de clavel y tratadas con etileno y plantas de encina expuestas a concentraciones elevadas de etileno mostraban una disminución de α -tocoferol (Bartoli 1996; Munné-Bosch et al. 2004). En cambio, en mango se ha observado que la HPPD es rápidamente inducida por etileno (Singh et al. 2011) y en cebada además de estar regulada por etileno lo está por JA, herbicidas y H₂O₂ (Falk et al. 2002), sugiriendo una relación positiva entre el etileno y el tocoferol. Para corroborar esta hipótesis se utilizaron

diversos mutantes de etileno de *A. thaliana*, además de usar el déficit hídrico, el estrés salino y la edad de la hoja como herramientas para aumentar los niveles de α -tocoferol. *A. thaliana* presenta una gran ventaja sobre la mayoría de especies y es que se dispone de numerosos mutantes fácilmente asequibles para los investigadores, ya sea por intercambio con otros laboratorios u obteniéndolos a través del NASC (European Arabidopsis Stock Centre) o del TAIR (The Arabidopsis Information Resource). Los mutantes usados en estos estudios se pueden dividir en tres grupos: (i) los mutantes con algún gen afectado en la señalización del etileno (*ein2-1*, *ein3-1* y *eil1-1*) (capítulos 1 y 2), (ii) con afectación de algún receptor (*etr1-1*) (capítulo 1) o (iii) sobreproductores por aumento de la vida media de la ACS (*eto1-1*) (capítulo 1).

Mutantes del grupo (i) juntamente con plantas *wild type* se sometieron a condiciones de déficit hídrico, provocando un aumento de los niveles de α -tocoferol en todos los genotipos, aunque en los mutantes el aumento fue menor en comparación con las plantas *wild type*. EIN3 es un factor de transcripción implicado en la señalización del etileno y mutaciones de pérdida de función causan una insensibilidad parcial, que puede ser restaurada por la expresión de *EIL1* y *EIL2*, indicando que estas dos proteínas similares a EIN3 (EIN3-like, EIL) pueden intervenir en la respuesta al etileno (Chao et al. 1997). Los estudios del capítulo 1 demuestran claramente una correlación positiva entre etileno y tocoferol. Pero a pesar que los 3 mutantes usados mostraron niveles más bajos de tocoferol, la respuesta fue diferente entre ellos, siendo el mutante *ein2-1* el que mostró una mayor reducción de los niveles de este antioxidante (43% en comparación con las plantas *wild type*). Esto sugiere que alteraciones más arriba en la vía de señalización tienen efectos más pronunciados en los niveles de tocoferol, mientras que las proteínas EIN3 y EIL1 pueden ser complementarias. Con estos resultados y teniendo en cuenta que se han descrito elementos de respuesta al ABA en varios genes implicados en la

biosíntesis de tocoferol (Chaudhary y Khurana 2009) se puede sugerir el modelo de señalización esquematizado en el Figura 5.1.1 para la respuesta al déficit hídrico. El ABA, a través de un mecanismo que no está del todo claro (pero que podría ser a través de una regulación a nivel transcripcional) y diversos elementos implicados en la vía de señalización del etileno (EIN3, EIN2 y EIL1) inducirían un aumento de tocoferol, y este aumento ayudaría pues a combatir el estrés oxidativo causado por el déficit hídrico.

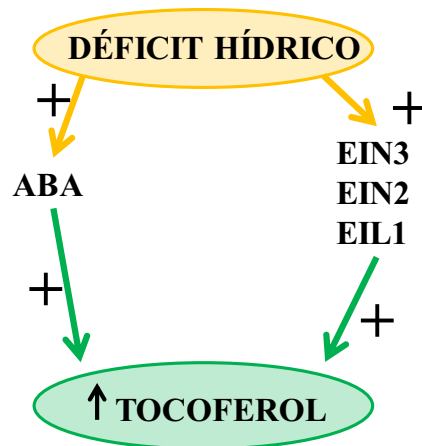


Figura 5.1.1. Modelo de señalización en condiciones de estrés hídrico en plantas *wild type* de *A. thaliana*.

El estrés salino es uno de los principales factores de estrés abiótico que afectan a la agricultura a nivel mundial, y además de provocar déficit hídrico fisiológico o toxicidad por iones, disminuye la fotosíntesis y promueve la formación de ROS, que a su vez deben ser detoxificadas para volver a un estado redox óptimo. Cuando los mutantes *ein3-1* se sometieron a condiciones de estrés salino moderado no se observaron cambios significativos de los niveles de α -tocoferol pero sí un aumento de las señales derivadas del estrés oxidativo, como el MDA o el JA. La insensibilidad que presenta este mutante al etileno fue compensada en estas condiciones por el aumento de señales derivadas del estrés oxidativo, pero también por cambios en los niveles endógenos de fitohormonas,

además del papel que puedan jugar otros elementos reguladores como las proteínas EIL, que ya hemos visto que pueden substituir parcialmente a EIN3. EIN3 actúa sobre numerosos genes de respuesta al etileno, entre ellos ERF1, un factor de transcripción que une de forma sinérgica la respuesta al etileno con la del JA (Lorenzo et al. 2003), y los niveles de expresión del cuál parecían aumentar en condiciones de estrés en el mutante *ein3-1*. Con estos resultados, se puede sugerir un modelo de respuesta como el esquematizado en la Figura 5.1.2 en el cual, el mutante *ein3-1* induciría mecanismos de resistencia a la salinidad a través de la modulación de los niveles de MDA o del estado redox del ascorbato, además de una vía que iría a través del JA y del gen *ERF1* pero ambas independientes de tocoferol. Posiblemente si se aumentara la intensidad del estrés o la duración de éste, las alteraciones de los niveles de α -tocoferol y los niveles de expresión del gen *ERF1* fueran más marcadas, obteniendo resultados similares a los observados en condiciones de déficit hídrico, pero hacen falta más estudios para entender el mecanismo y si el tocoferol está o no implicado en la respuesta al estrés salino.

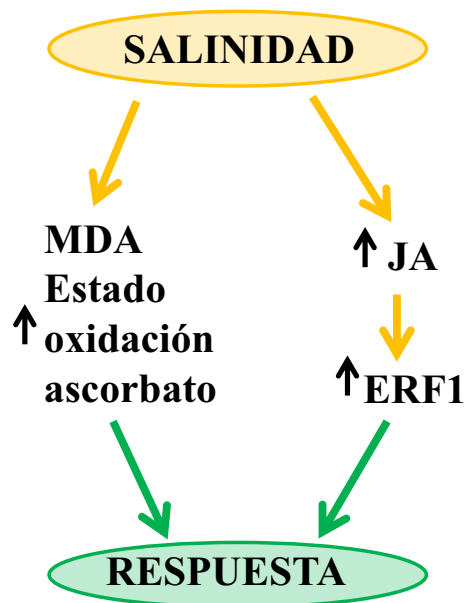


Figura 5.1.2. Modelo de señalización en condiciones de estrés salino en el mutante *ein3-1* de *A. thaliana*.

Para corroborar que el etileno estaba relacionado con el tocoferol, se usaron los mutantes de los grupos (ii) y (iii), *etr1-1* y *eto1-1*. El mutante *etr1-1* tiene modificado uno de los 5 receptores para el etileno y muestra una insensibilidad parcial a dicha hormona. El mutante *eto1-1* es un sobreproductor de etileno que alargando la vida media de la ACS5 (revisado por Chae y Kieber 2005), enzima clave de la biosíntesis de dicha hormona, y posiblemente de otras isoformas, lleva a un aumento en la producción de etileno de diez veces respecto las plantas *wild type* (Wang et al. 2004). La importancia de este mutante recae en el hecho de que al ser un sobreproductor, nos da información del efecto que tendría directamente el etileno. El aumento en la síntesis de etileno (mutante *eto1-1*) llevó a un aumento de los niveles de α -tocoferol de 6,5 veces en hojas jóvenes respecto a las hojas viejas, mientras que en las plantas *wild type* no fue significativo. La síntesis constitutiva y elevada de etileno bloquea la acción de CTR1, lo cual, a su vez, activa toda la vía de respuesta y la expresión de los genes de respuesta, actuando sobre la síntesis de tocoferol y promoviéndola en hojas viejas y bajo condiciones de estrés hídrico. Por otro lado, en el mutante *etr1-1*, el receptor es incapaz de unirse al etileno quedando apagado y en consecuencia CTR1 también está bloqueado, activando la vía de respuesta y aumentando los niveles de tocoferol 5 veces en hojas jóvenes respecto hojas viejas.

En *A. cordifolia* solo se pudieron analizar los niveles de ACC, el precursor inmediato del etileno. La falta de mutantes disponibles para profundizar en el estudio y la imposibilidad de medir los niveles de etileno por cromatografía de gases limitaron el estudio de la regulación de la biosíntesis de tocoferol por etileno. Independientemente de las limitaciones del modelo, ni los niveles de ACC ni los de tocoferol aumentaron con el estrés (salvo un ligero aumento de γ -tocoferol en condiciones de alta salinidad únicamente al ser expresado por peso seco).

Regulación por ácido abscísico

El ABA es un regulador del metabolismo implicado en la respuesta de las plantas a diferentes tipos de estrés, como la salinidad o el déficit hídrico (revisado por Xiong et al. 2002). Regulando el cierre estomático y la síntesis de proteínas implicadas en el estrés, el ABA ayuda a superar los períodos de déficit hídrico. Estudios previos sugieren que el ABA puede tener un papel en la regulación de los niveles de tocoferol en condiciones de estrés. En plantas de *C. creticus* expuestas a déficit hídrico, la ruta de biosíntesis del ABA y los niveles de α -tocoferol aumentaban de forma paralela (Munné-Bosch et al. 2009). Además, en cultivos celulares de *E. gunnii* los niveles de expresión de *TC* aumentaban tras la aplicación de ABA (El Kayal et al. 2006). También se han descrito en arroz diversos elementos de respuesta al ABA en algunos genes implicados en la biosíntesis de tocoferol, como en *HPPD*, *MPBQ* y γ -*TMT* (Chaudhary y Khurana 2009).

En *A. cordifolia*, el papel del ABA en la regulación del tocoferol depende del tipo y la intensidad del estrés que se aplica. El déficit hídrico provocó un aumento rápido de los niveles de ABA después de tan solo 4 días de estrés, que luego se mantuvieron a lo largo del tiempo y que correlacionaban bien con los niveles de γ -tocoferol ($r^2=0.60$) (Fig 5.1.2). En cambio, los niveles de α -tocoferol se mantuvieron estables, y ninguno de los dos homólogos de tocoferol ni el ABA mostraron variaciones diarias. Se han descrito diversos elementos de respuesta al ABA en los genes implicados en la síntesis de tocoferoles en arroz (Chaudhary y Khurana 2009), que en el caso de encontrarse también en *A. cordifolia* podrían explicar que el ABA haga aumentar los niveles de γ -tocoferol, precursor de su homólogo α -, ya sea para tener una cantidad apreciable disponible para una rápida activación de la vía de síntesis del α -tocoferol o porque el γ -tocoferol tiene funciones específicas, más allá de un simple precursor. Diversos trabajos apoyan esta última hipótesis. En hojas de *P. coccineus* los niveles de γ -tocoferol disminuían con la

edad de la hoja, por lo que los autores sugirieron que podía deberse más a una sustitución de otros antioxidantes lipófilicos por parte del γ -tocoferol que por un aumento de la síntesis de α -tocoferol (Szymanska y Kruk 2008), además de tener un papel protector en condiciones de estrés hídrico y alta radiación, sugerido por la acumulación de γ -tocoferol quinona, su producto de oxidación. En mutantes de tabaco con el gen que codifica para la γ -TMT silenciado y bajo condiciones de estrés salino, el γ -tocoferol mejoraba la tolerancia de las plantas a la desecación (Abbasi et al. 2007). En *A. cordifolia*, el γ -tocoferol podría estar pues ayudando a combatir los efectos de la pérdida de agua, juntamente con el ABA, especialmente en las primeras etapas del déficit hídrico, pero el mecanismo es totalmente desconocido.

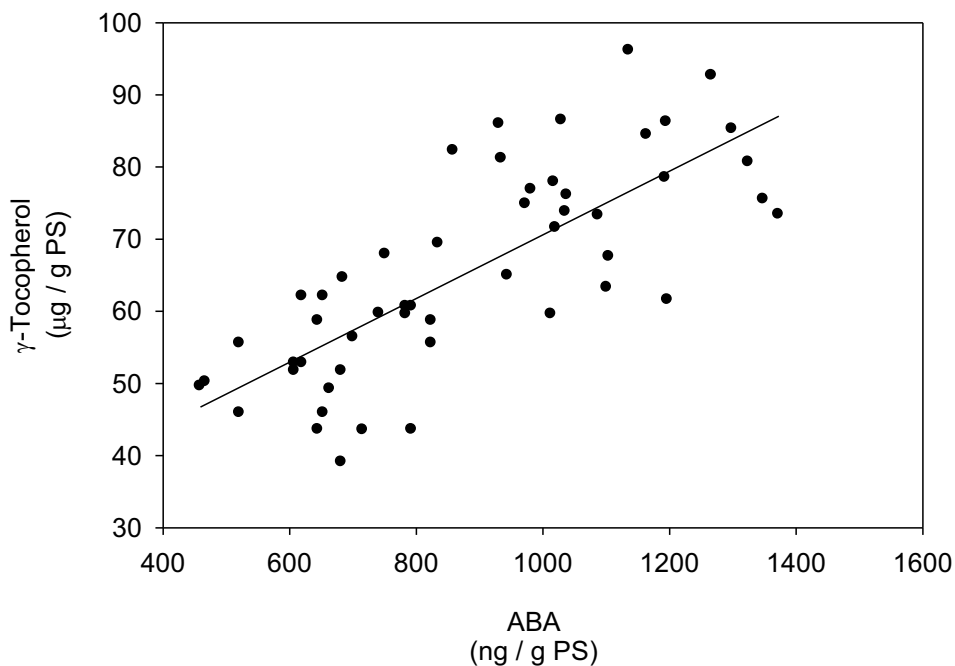


Figura 5.1.3. Correlación entre los niveles de ABA y γ -tocoferol de en plantas de *A. cordifolia* en el experimento de déficit hídrico (capítulo 3). PS, peso seco.

Regulación de la expresión génica

Las enzimas más importantes de la biosíntesis de los tocoferoles (en esencia los homólogos α - y γ -, presentes en hojas) son la HPT, codificada en *A. thaliana* por el gen *VTE2*, la tocoferol ciclasa (VTE1) y la γ -tocoferol metiltransferasa (VTE4), además de la HPPD, o *p*-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa, que regula la síntesis de HGA, clave en la síntesis de tocoferoles. Aunque los niveles de tocoferol varían dependiendo de diversos factores, como la respuesta a estreses o durante el desarrollo foliar y la senescencia, poco se sabe de los mecanismos asociados a estas variaciones. En plantas de *C. creticus*, los niveles de expresión del gen *VTE2*, aumentaban en respuesta al estrés hídrico y en consecuencia, los niveles de tocoferol también lo hacían (Munné-Bosch et al. 2009). De forma parecida, plantas de *A. thaliana* aumentaban los niveles de expresión del gen que codifica para la misma enzima en respuesta a un combinación de estreses (alta luz y déficit de nutrientes) (Collakova y DellaPenna 2003). A su vez, los niveles de expresión de la *HPPD* rápidamente se inducían por etileno durante la maduración de mango, seguido de un aumento en los niveles del antioxidante (Singh et al. 2011). En nuestros estudios (capítulos 1 y 5), los resultados apoyan la hipótesis de que los niveles de tocoferol no fueron regulados a nivel de expresión génica, sino que sugieren una posible regulación postranscripcional. En los dos capítulos en los que se analizaron los niveles de transcripción de los genes que codifican para las principales enzimas de la vía de síntesis del tocoferol, ninguno de los aumentos de tocoferol fue acompañado de variaciones de los niveles de expresión, y a su vez, cuando los niveles de expresión cambiaban no iban acompañados de cambios en las concentraciones del antioxidante, con la única excepción de los niveles de expresión del gen *VTE2* en las hojas viejas del tratamiento de déficit hídrico del capítulo 5 en el que ambos, gen y producto, aumentaron de forma similar (Tabla 5.1.1 y 5.1.2).

Genotipo	Tratamiento	Niveles de α -tocoferol	Gen	Niveles de expresión
<i>Wild type</i> (capítulo 1)	Déficit hídrico	x 2	<i>HPD</i>	
			<i>VTE1</i>	
			<i>VTE2</i>	
			<i>VTE4</i>	
	Hoja joven Déficit hídrico		<i>HPD</i>	
			<i>VTE1</i>	
			<i>VTE2</i>	
			<i>VTE4</i>	
	Hoja vieja Déficit hídrico		<i>HPD</i>	
			<i>VTE1</i>	
			<i>VTE2</i>	
			<i>VTE4</i>	

Tabla 5.1.1. Resumen de los niveles de α -tocoferol y de expresión de los genes implicados en su biosíntesis en los diferentes tratamientos aplicados en las plantas *wild type* del capítulo 1. Los aumentos significativos respecto el control se marcan en verde y el gris indica que no hubo cambios significativos.

Posiblemente los cambios más sorprendentes fueron los aumentos de los niveles de expresión de los genes *VTE1*, *VTE2* y *VTE4* en las hojas viejas respecto las hojas jóvenes en condiciones de estrés salino y que eran de 280, 580 y 180 veces respectivamente, mientras que los niveles de ambos homólogos de tocoferol permanecían constantes. Se podría pensar que esta descoordinación entre gen y producto, especialmente cuando aumenta la expresión génica pero no los niveles de tocoferol, se debe a una pérdida neta de tocoferol. En plantas de *S. lyrata* expuestas a una combinación de alta luz y estrés hídrico, los niveles de tocoferol alcanzaban niveles máximos y se mantenían constantes al aumentar la intensidad del estrés (Munné-Bosch y Cela 2006). Esta constancia se debía a una síntesis intensa de tocoferol acompañada por una fuerte degradación a la forma de quinona, acompañada de fuertes reducciones en el RWC y en la eficiencia máxima del PSII (F_v/F_m). Pero esta hipótesis es poco probable, al menos en parte (sería necesario el análisis de los niveles de quinonas para tener certeza de ello),

porque los niveles de tocoferol aumentaron de forma progresiva en todos los experimentos, sin llegar a niveles constantes. Harían falta más estudios para profundizar en la regulación de la biosíntesis de tocoferol, ya que es posible que las variaciones de los niveles de expresión no necesariamente vayan paralelas a los niveles de enzimas o la velocidad de reacción de éstas.

Genotipo	Tratamiento	Niveles de α -tocoferol	Gen	Niveles de expresión
<i>Wild type</i> (capítulo 5)	Déficit hídrico	x 4	VTE1	
			VTE2	
			VTE4	
	Salinidad		VTE1	
			VTE2	
			VTE4	
	Hoja vieja Control		VTE1	
			VTE2	
			VTE4	x 8
	Hoja vieja Déficit hídrico	x 2	VTE1	
			VTE2	x 3
			VTE4	
	Hoja vieja Salinidad		VTE1	x 280
			VTE2	x 580
			VTE4	x 180

Tabla 5.1.2. Resumen de los niveles de α -tocoferol y de expresión de los genes implicados en su biosíntesis en los diferentes tratamientos aplicados en las plantas *wild type* del capítulo 5. Los aumentos significativos respecto el control o respecto hoja joven para los análisis de diferentes edades de hoja se marcan en verde. El gris indica que no hubo cambios significativos.

5.2. Funciones de la vitamina E

Fotoprotección

Las plantas han desarrollado mecanismos para disipar el exceso de energía en condiciones de alta radiación, de déficit hídrico o en presencia de sal en el medio, evitando así un estrés oxidativo que podría conducir a la muerte. El déficit hídrico y la salinidad son dos de los principales problemas que limitan los cultivos a nivel mundial pero si además, a estos dos factores de estrés se les añade la alta radiación aparecerá un exceso de luz en los cloroplastos. En estas condiciones, es necesario disipar este exceso de energía para prevenir el daño fotooxidativo. Para ello las plantas han desarrollado diversos mecanismos como la disipación en forma de calor, mediante un mecanismo dependiente de la activación de la violaxantina deepoxidasa, el ciclo agua-agua, o la formación de $^1\text{O}_2$ y su consiguiente detoxificación por antioxidantes, principalmente carotenoides y tocoferol (Asada 1999; Demmig-Adams y Adams 1996; Kanervo et al. 2005; Miller et al. 2010; Niyogi 1999).

Las ROS han de ser detoxificadas para evitar que alteren el equilibrio redox de los cloroplastos y causen daños en macromoléculas tales como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos, que pueden conducir a la muerte celular en último lugar. Los carotenoides y los tocoferoles tienen una acción sinérgica frente a la presencia de ROS y actuando conjuntamente son capaces de detoxificarlas y mantener la maquinaria fotosintética en condiciones óptimas. ¿Pero qué hace a estos dos grupos de antioxidantes tan eficientes? El α -tocoferol es un potente antioxidante debido a la capacidad del anillo heterocíclico cromanol de donar el hidrógeno fenólico a los radicales lipídicos desactivándolos químicamente. A la vez, puede desactivar química y físicamente el $^1\text{O}_2$ y desactivar las $^3\text{Chl}^*$ en las membranas tilacoidales, por un mecanismo similar al del β -caroteno

(Krieger-Liszkay y Trebst 2006). En cambio, los carotenoides tienen una estructura principal lineal de 40 átomos de carbono con dobles enlaces conjugados y en los extremos tienen anillos que pueden contener o no oxígeno. Es precisamente la presencia de los dobles enlaces conjugados lo que les permite absorber luz así como la energía de excitación de las $^3\text{Chl}^*$ evitando la formación de $^1\text{O}_2$. Por otro lado, en condiciones de exceso de luz el ciclo de las xantofilas es clave para la disipación térmica (Demmig-Adams y Adams 1996).

Gracias al uso de mutantes deficientes de carotenoides se ha podido estudiar la interacción entre éstos y el tocoferol. Su acción coordinada ayuda a proteger el PSII del daño fotooxidativo (Trebst 2003; Havaux et al. 2005) mientras que un aumento de los niveles de α -tocoferol en el mutante *npq1lor1* de *Chlamydomonas reinhardtii* que carece de zeaxantina y luteína puede mejorar la tolerancia al estrés oxidativo (Li et al. 2012). Este estudio demuestra, no obstante, que a pesar de la acción coordinada, el α -tocoferol no es capaz de remplazarlos totalmente.

El déficit hídrico o el estrés salino, combinados con alta luz, producen una respuesta fotoprotectora en *A. cordifolia*. En condiciones de falta de agua y exceso de radiación hubo una máxima conversión del ciclo de las xantofilas hacia zeaxantina, manteniendo un alto estado de depoxidación del ciclo de las xantofilas (DPS), incluso durante la noche, en las plantas con déficit hídrico asociado a bajas relaciones F_v/F_m . En algunas especies se ha sugerido que la disipación del exceso de energía de excitación es remplazada por una acumulación sostenida de la zeaxantina. De esta manera, el ciclo de las xantofilas se detendría en su forma fotoprotectora (Demmig-Adams y Adams 2006). También se observó degradación de β -caroteno, aunque los niveles de α -tocoferol, α -tocoferol quinona y clorofilas se mantuvieron constantes. En cambio, los niveles de γ -tocoferol sufrieron un fuerte aumento paralelo con los niveles de ABA. Esta respuesta

diferente entre los dos homólogos de tocoferol hace que su correcta detección y cuantificación sean de suma importancia, lo que nos llevó a probar diferentes métodos de cuantificación, descritos más ampliamente en el Anexo.

Cuando se sometió a la misma especie a estrés salino moderado a largo plazo, también se activaron mecanismos de defensa similares a los que se habían observado previamente en condiciones de déficit hídrico: degradación de β -caroteno y niveles constantes de α -tocoferol y xantofilas (luteína y zeaxantina), lo cual sugiere que la acción concertada de todos ellos es capaz de prevenir el daño en el PSII y mantener una relación elevada F_v/F_m . En cambio, a altas dosis de salinidad, de 250 mM o más, el descenso de los niveles de β -caroteno y xantofilas hace que los tocoferoles solos no sean capaces de evitar el daño en el PSII, causando un descenso en la relación F_v/F_m , igual como pasaba en condiciones de déficit hídrico.

En resumen, los mecanismos que usa *A. cordifolia* para responder al estrés oxidativo se basan principalmente en carotenoides, ya sean xantofilas o β -caroteno, y tocoferoles. La acción de ambos antioxidantes parece contribuir a que se mantenga el PSII funcionando correctamente, pero es la disminución de carotenoides la responsable de la disminución de la F_v/F_m , indicando un daño fotooxidativo. Aunque los tocoferoles pueden jugar un papel importante como antioxidantes, ante una fuerte demanda de fotoprotección no son capaces de proteger el PSII solos, especialmente cuando los carotenoides ya han empezado a degradarse, por lo que a pesar de tener una acción coordinada sus funciones no son totalmente redundantes. Ambos mecanismos (carotenoides y tocoferoles) parecen ser necesarios para el correcto funcionamiento de la maquinaria fotosintética en condiciones de alta demanda de fotoprotección, causada por un exceso de luz unido a un déficit hídrico o un estrés salino.

Además, cabe destacar que estos estudios (capítulos 3 y 4) apoyan un papel para el γ -tocoferol más allá de un mero precursor. Por ejemplo, el aumento que se observó en las primeras etapas de déficit hídrico era paralelo al aumento de ABA en *A. cordifolia*. En un estudio previo se vio que el γ -tocoferol era más potente que su homólogo α en conferir tolerancia a la desecación *in vivo* (Abbasi et al. 2007). Si esto lo unimos al hecho que aumentó de forma paralela al ABA, se puede sugerir que ambos compuestos podrían coordinar una respuesta que ayudará a combatir la desecación foliar, además de poder ayudar al α -tocoferol a proteger el PSII frente al estrés fotooxidativo. No obstante, el mecanismo de protección del γ -tocoferol es totalmente desconocido.

Aunque las plantas de *A. cordifolia* muestran diversas estrategias de aclimatación al déficit hídrico a corto plazo y a altas dosis de salinidad estos mecanismos no fueron suficientes para garantizar la supervivencia de esos individuos. En cambio, dosis moderadas de estrés salino (150 mM) ejercían un efecto positivo en el estado hídrico foliar. En España, la *A. cordifolia* está catalogada como una especie potencialmente invasora, por lo que este comportamiento frente a estreses moderados le puede proporcionar un alto potencial invasor en suelos salinos, como los cercanos a la línea de costa. Esta mejora del crecimiento fue proporcionada a través de por lo menos dos mecanismos: (i) regulación del balance hormonal, por un aumento de los niveles de zeatina y (ii) mejora de la turgencia foliar, siendo este último posiblemente el más importante. Si además añadimos la fuerte capacidad fotoprotectora que presenta y que se puede reproducir fácilmente, hace que esta especie tenga un alto potencial invasor y sea capaz de desplazar la flora autóctona. Por este motivo, el conocer los mecanismos de adaptación y crecimiento pueden ayudar a desarrollar estrategias que controlen su dispersión descontrolada, sobretodo en zonas donde la flora autóctona sea de especial interés conservacionista.

Señalización celular

Los cloroplastos son orgánulos celulares semiautónomos derivados de un proceso de endosimbiosis (Martin et al. 2002). A pesar que en ellos hay entre 2000 y 3500 proteínas diferentes (Van Wijk y Baginsky 2011), solo entre un 3 y un 5% están codificadas por el genoma plastidial (revisado por Sugiura 1992). El resto se encuentran codificadas en el núcleo, requiriendo un alto nivel de coordinación entre ambos orgánulos. El núcleo, que posee las secuencias codificantes de numerosas proteínas necesarias para la fotosíntesis y otras actividades del cloroplasto, debe regular sus niveles de expresión y de síntesis y el cloroplasto, a su vez, debe “comunicar” al núcleo su estado y las necesidades de las diferentes proteínas, a través de cambios del estado redox de los componentes de la maquinaria fotosintética, que actuarían como señal coordinadora (revisado por Pfannschmidt 2010). ¿Puede el tocoferol participar en esta “comunicación”? Si es así, ¿qué genes estaría regulando de los aproximadamente 25.000 que contiene el genoma de *A. thaliana*? Partiendo de la premisa que el tocoferol aumenta sus niveles en respuesta al estrés y el etileno es una de las hormonas que intervienen en la respuesta al estrés, ¿si el tocoferol interviniera en señalización celular, podría hacerlo, por ejemplo, a través del etileno?

Mediante el uso de mutantes deficientes en tocoferol (*vte1* y *vte4*) y con diversas aproximaciones que llevan a aumentos de este compuesto (déficit hídrico, estrés salino o edad de la hoja) se analizó el efecto del tocoferol en genes de expresión nuclear relacionados con la biosíntesis, percepción y señalización del etileno. Los resultados mostraron que los mayores cambios en los niveles de transcripción de los genes analizados ocurrieron en el mutante *vte4*, el cual carece de α -tocoferol, pero en condiciones normales de crecimiento, es capaz de sustituirlo aumentando los niveles de γ -

tocoferol, mientras que el mutante *vte1* se comportó como las plantas *wild type* en todas las condiciones probadas.

El déficit hídrico y el estrés salino prolongados causaron un aumento en los niveles de expresión del gen *ACO4* en el mutante *vte4*, a su vez, los niveles de expresión del gen *ERS1* disminuyeron en condiciones de salinidad prolongadas. Pero los mayores cambios se produjeron en las hojas viejas de dicho mutante, aumentando los niveles de la *ACO1*, *ERS1*, *ERS2*, *ETR2* y en los genes relacionados con la señalización del etileno en condiciones control y/o de déficit hídrico mientras que la salinidad produjo una disminución de *EIN2*, *CTR1* y *ERF1*. A pesar de los cambios observados en este mutante a nivel de expresión génica, presentó una resistencia similar que las plantas *wild type* y el mutante *vte1* al estrés hídrico y salino. Este comportamiento ya había sido observado cuando estos mismos mutantes se sometían a otros tipos de estreses (Bergmüller et al. 2003). Sin embargo, aunque la respuesta sea similar, los mecanismos implicados son diferentes, como se puede observar por las diferencias en los niveles de expresión y que podrían ser a su vez diferentes en otros tipos de estrés o cuando la magnitud o amplitud del estrés varíe. En este mutante, la acumulación sostenida de γ -tocoferol reprime la vía de señalización de respuesta del ácido jasmónico y del etileno, lo cual lleva a reducciones de la expresión del gen que codifica para el factor de transcripción ERF1 en hojas viejas sometidas a estrés salino, sugiriendo para este mutante y en estas condiciones un modelo como el de la Figura 5.2.1.

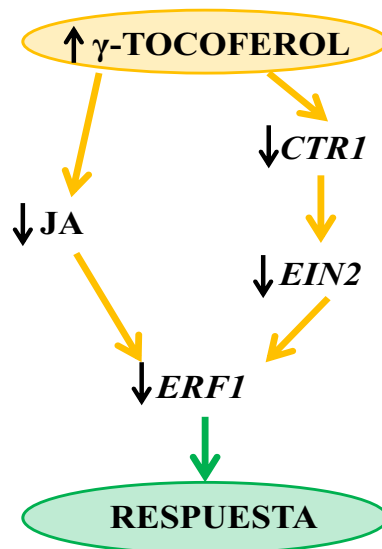


Figura 5.2.1. Modelo de señalización en hojas viejas en condiciones de estrés salino en el mutante *vte4* de *A. thaliana*.

Diversos estudios sugieren un papel del tocoferol en señalización celular y el posible mecanismo mediante el cual lo hace (Hofius et al. 2004; Sattler et al. 2006; Mène-Saffrané et al. 2007; Munné-Bosch et al. 2007; Maeda et al. 2008; Hyun et al. 2011). Esta idea se basa en la premisa que las ROS, la síntesis de las cuales se estimula en condiciones de estrés, pueden contribuir a la señalización (Ryter y Tyrrell 1998; Gamaley y Klyubin 1999; Desikan et al. 2000) y a su vez, los tocoferoles son potentes antioxidantes que regulan los niveles de ROS en el cloroplasto. Pero esta función en señalización celular plantea además una serie de cuestiones inherentes a la propia naturaleza del tocoferol y es el mecanismo mediante el cual el tocoferol consigue regular los niveles de expresión de algunos genes del etileno. Solamente bajo ciertas condiciones, el JA parece ser el elemento clave que serviría de señal desde el cloroplasto al núcleo. El JA se sintetiza a partir de hidroperóxidos de los cloroplastos y actúa como señal en el núcleo (revisado por Wasternack 2007). El JA y la vía de señalización del etileno están reguladas a la baja en el mutante *vte4*, pero solo en hojas maduras sometidas a estrés

salino, indicando que una composición alterada de tocoferol altera la respuesta fisiológica. En estas condiciones, el tocoferol, concretamente el γ -tocoferol, regula los niveles de JA, importante hormona de la respuesta al estrés. Hasta el momento, no se ha descrito ningún mecanismo mediante el cual el tocoferol pueda abandonar el cloroplasto, por lo que una actuación directa sobre los niveles de expresión de genes nucleares parece poco plausible. A pesar de esto, diversos estudios muestran que aunque la presencia del tocoferol se limita al cloroplasto, su acción llega hasta el núcleo a través de regular el metabolismo de los ácidos grasos (Mène-Saffrané et al. 2007), de los productos de la peroxidación lipídica no enzimáticos (Thoma et al. 2004; Sattler et al. 2006; Maeda et al. 2008) o a través de los productos de la peroxidación lipídica enzimática, en concreto, del JA y que además tiene acción hormonal (Munné-Bosch et al. 2007). Por otro lado, el tratamiento con α -tocoferol disminuía la actividad de las MAPK en cultivos de células en suspensión de tabaco, sugiriendo un papel en la regulación de la vía de transducción de señales relacionada con el estrés (Hyun et al. 2011). Finalmente, también se ha visto que los tocoferoles pueden afectar el transporte de los carbohidratos en diferentes especies, por lo que aunque hemos demostrado que el tocoferol interviene en señalización, hay diversas hipótesis que estudiar a la hora de plantearse un mecanismo. Aunque el JA solo ha sido capaz de explicar un limitado número de situaciones, otras oxilipinas o derivados lipídicos podrían actuar como señal entre el tocoferol y el núcleo. Incluso, si el transporte de fotoasimilados también se ve alterado en algunas situaciones, podrían ser el elemento clave que conectaría nuestro antioxidante con los elementos nucleares.

Por último, hay que comentar el hecho que aunque los tocoferoles alteren los patrones de expresión de los genes analizados, esto no necesariamente se ha de traducir en aumentos de los niveles de proteínas o del producto de éstas, ya que pueden estar interviniendo otros mecanismos de regulación, por ejemplo post-transcripcionales, que

podrían compensar las variaciones de los niveles de expresión, e igualando la respuesta. Al fin y al cabo, a pesar de los cambios, los mutantes se comportaron a nivel fenotípico como las plantas *wild type*, abriendo un abanico de posibilidades y nuevas preguntas que responder. La primera de ellas, ¿los niveles de etileno se ven alterados? Si los niveles de etileno no cambian, pero los niveles de expresión de los genes implicados en su biosíntesis sí lo hacen, ¿que mecanismos lo están regulando? ¿Los niveles de esas proteínas cambian, son más activas, más estables? Al contrario, si los niveles de etileno sí aumentaran ¿cómo consiguen los mutantes tener el mismo fenotipo que las plantas *wild type*? Por tanto, hacen falta más estudios para esclarecer el efecto del tocoferol en la regulación de la síntesis del etileno, así como sobre su percepción y su vía de señalización.

6. CONCLUSIONES

6. Conclusiones

- ✓ El etileno promueve la síntesis de tocoferol en *A. thaliana*:
 - Alteraciones en el gen *EIN3* provocan un retraso y una reducción en el aumento de α -tocoferol asociado al estrés hídrico
 - La biosíntesis de tocoferol está regulada específicamente por las proteínas EIN2, EIN3 y EIL1
 - ETR1 juega un papel central y específico en la regulación de la biosíntesis de tocoferol
 - Niveles elevados de etileno promueven aumentos de tocoferol en hojas viejas
- ✓ El mutante *ein3-1* es capaz de resistir dosis moderadas de salinidad, cambiando el balance hormonal foliar y aumentando el estrés oxidativo
- ✓ La biosíntesis de tocoferol no está regulada a nivel transcripcional bajo condiciones de estrés hídrico y salino, ni en relación con la edad de la hoja en *A. thaliana*
- ✓ El ABA parece jugar un papel importante en la regulación de la biosíntesis de tocoferol en *A. cordifolia* en condiciones de estrés
- ✓ En condiciones de alta demanda de fotoprotección (alta luz y déficit hídrico), *A. cordifolia* es capaz de mantener una disipación sostenida del exceso de energía, manteniendo el ciclo de las xantofilas en su forma fotoprotectora (zeaxantina)
- ✓ En *A. cordifolia* los tocoferoles ayudan a la protección del PSII en condiciones de déficit hídrico y estrés salino cuando la demanda de fotoprotección es elevada, juntamente con la acción del β -caroteno y el ciclo de las xantofilas, pero cuando los carotenoides se empiezan a degradar por el aumento de la producción de $^1\text{O}_2$ no son capaces de remplazarlos totalmente

- ✓ Los niveles hormonales en *A. cordifolia* se alteran de forma específica dependiendo del tipo de estrés y la intensidad de éste:
 - Los niveles de ABA aumentan con el déficit hídrico, pero sus niveles no varían a lo largo del día ni en respuesta al estrés salino moderado
 - Los niveles de SA están regulados de forma diurna en condiciones de déficit hídrico
 - El estrés salino moderado hace aumentar los niveles de zeatina, pero no de otras fitohormonas como otras citocininas, GA, auxinas ni de las hormonas del estrés (ABA, SA, JA)
- ✓ *A. cordifolia* se puede considerar una especie halófito marginal, debido a que dosis moderadas de estrés salino ejercen un efecto positivo en el estado hídrico foliar
- ✓ En los mutantes *vte4* de *A. thaliana*, el γ -tocoferol sustituye al α -tocoferol en condiciones control, pero no puede aumentar los niveles en respuesta al estrés
- ✓ El γ -tocoferol parece tener funciones específicas además de precursor del α -tocoferol:
 - Juntamente con el ABA, podría intervenir en la regulación de los mecanismos que combaten la desecación foliar en las primeras etapas de déficit hídrico en *A. cordifolia*
 - Influencia de forma específica los niveles de expresión de genes implicados en la biosíntesis, percepción y señalización del etileno en *A. thaliana*
- ✓ El tocoferol interviene en señalización celular regulando los niveles de expresión de genes implicados en la biosíntesis, percepción y señalización del etileno:
 - El γ -tocoferol influencia de forma específica los niveles de expresión de la *ACO4* en mutantes *vte4* tanto en condiciones de estrés hídrico y salino, así

como los niveles de la *ACS6* después de 11 días de estrés salino y disminuye la expresión del gen que codifica para el receptor *ERS1* en condiciones de estrés salino

- El γ -tocoferol aumenta los niveles de expresión de todos los genes implicados en la señalización de etileno estudiados (*EIN3*, *EIN2*, *CTR1* y *ERF1*) en condiciones control y de déficit hídrico en hojas maduras. En condiciones de estrés salino, mientras los niveles en las plantas *wild type* aumentan drásticamente, en el mutante *vte4* se mantienen estables o disminuyen
- ✓ El tocoferol interviene en la comunicación cloroplasto-núcleo a través de regular los niveles de expresión de genes relacionados con el etileno, formando parte de la intrincada red de señalización retrógrada

7. ANEXO

ANEXO

Puesta a punto de la metodología para el análisis de tocoferoles en diferentes tipos de muestras

Además de los experimentos realizados, durante la tesis se optimizó la metodología de la cuantificación de los tocoferoles. Hay diversas técnicas para analizar los niveles de vitamina E, como por HPLC con diferentes tipos de detectores, por GC-MS (cromatografía de gases-espectrometría de masas) o LC-MS (cromatografía líquida-espectrometría de masas). De entre las diversas metodologías, en el grupo inicialmente se usaba el HPLC con fase reversa, pero debido al hecho que no permite separar el γ - del β -tocoferol, se buscó una metodología alternativa que permitiera el análisis de los 8 compuestos que forman lo que comúnmente se conoce como vitamin E. En este anexo se describirán las características de los métodos, ventajas e inconvenientes y las pruebas que se realizaron en cada caso.

Para la cuantificación de los niveles de α - y γ -tocoferol de los diferentes capítulos se utilizaron dos técnicas diferentes de HPLC. La cromatografía líquida de alta resolución (de las siglas HPLC) es una de las técnicas analíticas más usadas en bioquímica y química analítica y se utiliza en un amplio abanico de actividades, como el análisis de alimentos, drogas, etc., separando los componentes de una mezcla dependiendo de las interacciones químicas de estos con la columna cromatográfica. El HPLC utiliza una fase móvil líquida para separar los componentes de la muestra problema. Las muestras se disuelven en la fase móvil y se hacen circular a través de la columna (Fig A.1). Según las características de la fase móvil, de la columna y de la muestra, esta última se separa en los diferentes componentes que la forman, pudiendo ser detectados y cuantificados. Basándose en el tipo de separación, hay diferentes tipos de HPLC, como el de fase normal, fase reversa,

exclusión molecular o de intercambio iónico. De entre todos estos, en este anexo nos centraremos en el de fase normal y fase reversa, que fueron los utilizados para analizar los niveles de tocoferol en los diferentes capítulos.

La fase reversa es la más ampliamente utilizada. La columna está rellena de un compuesto no polar, normalmente C8 (n-octil) o C18 (n-octadecilo), y la fase móvil es relativamente polar, como el agua, el metanol o el acetonitrilo, por lo que los solutos de alta polaridad son los que eluyen primero. En la fase normal, la columna es polar, normalmente de sílice, y retiene los analitos polares. La fase móvil es no polar como el hexano, cloroformo o etil éter, por lo que los solutos poco polares son los que eluyen primero. El hecho de aumentar la polaridad de la fase móvil tiene el efecto de reducir el tiempo de elución.

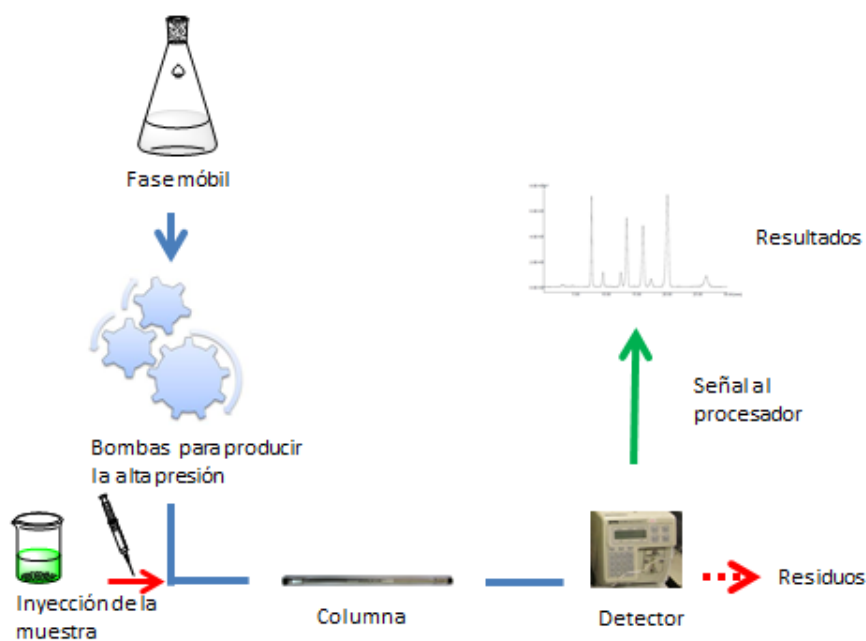


Figura A.1. Esquema de una cromatografía por HPLC.

También hay diversos sistemas de detección, que pueden basarse en las propiedades del soluto, como la fluorescencia o la absorbancia ultravioleta, o según las propiedades de los compuestos, como serían el índice de refracción o la conductividad. Para nuestros estudios se usaron detectores de absorbancia de luz ultravioleta y de fluorescencia (Fig A.2). Los detectores de absorbancia ultravioleta son los más utilizados en HPLC y se basan en la espectrofotometría de absorción. La habilidad de un compuesto para absorber la luz ultravioleta o la visible depende de la estructura química que tenga la molécula. Hay diferentes tipos de detectores ultravioletas, dependiendo de su complejidad, siendo los más sencillos los que detectan a una única longitud de onda. Los detectores más potentes, y que fueron usados en estos análisis, son los que utilizan fotodiodos para registrar el espectro completo de cada compuesto que pasa por el detector. La radiación procedente de la fuente, en este caso una lámpara de deuterio, atraviesa la muestra y se focaliza en numerosos elementos fotosensibles (fotodiodos), generando una señal eléctrica que se procesa obteniendo los resultados de absorbancia. La ventaja de este sistema es que se puede generar una gran cantidad de datos experimentales, ya que se obtienen los espectros de absorción de cada compuesto que forma parte de la muestra.

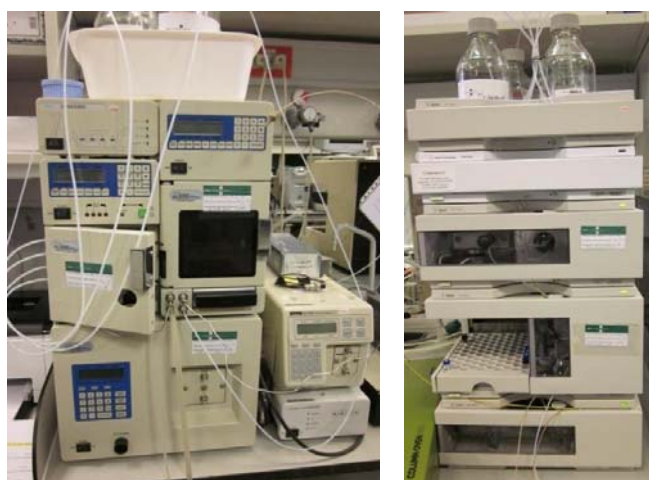


Figura A.2. HPLCs utilizados para los diferentes análisis de tocoferoles. El de la izquierda, equipo de la casa comercial Jasco utilizado para el análisis por fluorescencia. A la derecha el equipo Agilent 1100 utilizado para la detección por ultravioleta.

Además de la detección ultravioleta, también se usó un detector de fluorescencia (Fig A.2). La limitación de éste recae en que no todos los compuestos tienen propiedades fluorescentes (absorber radiación a una determinada longitud de onda y emitir radiación fluorescente a una longitud de onda más larga), aunque a su vez, resulta una ventaja por la especificidad asociada que presenta. La lámpara que se usa suele ser de xenón o deuterio y los detectores suelen ser como los de absorbancia.

Independientemente del sistema de detección, los resultados se presentan en forma de cromatograma. Cada uno proporciona dos tipos de información, por un lado, cada compuesto tiene un tiempo de retención característico para las condiciones de análisis, y en segundo lugar, tanto el área como la altura del pico obtenido son proporcionales a la concentración de ese compuesto.

Finalmente, cabe comentar la columna cromatográfica. Es el elemento cromatográfico más importante y lo que determinará el rendimiento y la resolución de todo el HPLC. La elección de la columna es clave y se determina por numerosos factores, como el tipo de cromatografía a usar (fase normal, fase reversa u otras) y el tipo de muestra que se quiere analizar (polaridad, carga, grupos funcionales) (Fig A.3).



Figura A.3. Columnas utilizadas para los diferentes análisis de tocoferoles. A) Columna Partisil 10 ODS-3 (250 mm x 4.6 mm). B) Columna Inertsil 5 SI (250 mm x 3 mm).

Métodos utilizados

Para los análisis de α - y γ -tocoferol se usaron dos técnicas de HPLC diferentes. En los capítulos 1 y 3 (Método 1), se usó cromatografía de fase reversa y detección ultravioleta, y en los capítulos 2, 4 y 5 (Método 2) se usó cromatografía de fase normal y detección por fluorescencia. La tabla A.1 muestra las características de ambos métodos.

	Método 1	Método 2
Fase móvil	A: metanol: agua (95:5, v/v) B: metanol	Hexano: dioxano (95,5:4,5 v/v)
Columna	Partisil 10 ODS-3 (250 mm x 4,6 mm)	Inertsil 5 SI (250 mm x 3 mm)
Detección	α - y γ -toc, 295 nm α - y γ -toc quinona, 256 nm Ultravioleta	Excitación: 295 nm Emisión: 330 nm Fluorescencia
Equipo	<i>Diode array detector</i> 1000S, Applied Biosystems <i>Diode array detector</i> , HP100 Series HPLC System; Agilent Technologies	Detector de fluorescencia FP-1520 (Jasco)
Permite separar	α - toc; γ -toc; α -toc quinona; γ -toc quinona	α -, β -, γ -, δ -tocoferol α -, β -, γ -, δ -tocotrienol
Gradiente	0-10 min, 100% A 10-15 min, disminución a 0% A 15-20 min, 0% A 20-23 min, aumento a 100% A 23-28 min, 100% A	Isocrático (sin gradiente)

Tabla A.1. Características de los dos métodos de análisis de tocoferoles usados.

Cada uno de los métodos usados presenta una serie de ventajas e inconvenientes (Tabla A.2). A pesar que el método 1 permite la obtención de los espectros de absorción y el análisis de las quinonas, el γ - y el β -tocoferol coeluyen en el mismo tiempo de retención y no es posible separarlos, mientras que el método 2 permite solucionar este problema gracias a la fase móvil y la columna cromatográfica (el problema de estos dos homólogos es que tienen la misma masa molecular y la misma carga, solamente cambia la posición de uno de los grupos metilo del anillo cromanol).

Ventajas		Inconvenientes	
Método 1	Método 2	Método 1	Método 2
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Obtención de espectros de absorción ✓ Análisis de quinonas 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Alta especificidad ✓ Cromatogramas más cortos para α- y γ-toc ✓ Alta sensibilidad ✓ Separa γ- y β-homólogos 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Poca sensibilidad ✓ No separa γ- y β-homólogos 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Precio del hexano y características químicas (muy volátil y compresible) ✓ No permite detectar quinonas ✓ No se obtienen espectros de absorción

Tabla A.2. Ventajas e inconvenientes de los dos métodos de análisis de tocoferoles.

Por otro lado, el método 2 presenta el inconveniente que no permite obtener los espectros de absorción y solo se puede comprobar la identidad del compuesto por coelución con estándares auténticos. Hay que tener presente a su vez, que la misma fluorescencia es una característica reducida a un número escaso de compuestos, por lo que nuestros componentes a analizar tienen que cumplir una serie de requisitos, deben tener fluorescencia, pero además deben excitarse y emitir a longitudes de onda concretas, por lo que el número de moléculas que cumplen todos los requisitos es limitado (por ejemplo, las quinonas no tienen fluorescencia y por eso no pueden ser analizadas por este método). Otro inconveniente del método 2 es el uso del hexano, además de los cuidados durante la manipulación por su toxicidad, hay que tener en cuenta el precio y el hecho que es muy volátil y compresible, pudiéndose generar burbujas de aire dentro del sistema cromatográfico.

Pruebas de optimización del Método 1

El método 1 ha sido ampliamente usado por el grupo y probado en *A. thaliana* (Munné-Bosch et al. 2007), pero no en *A. cordifolia*. En esta especie, se probó la extracción con dos tipos de disolventes, metanol y hexano. Dada la naturaleza tan apolar del hexano y el elevado contenido de agua de las hojas de *A. cordifolia* se optó por liofilizar el material, y se realizaron 5 extracciones por muestra (Fig. A.4). Se cuantificaron los niveles de α - y γ -tocoferol por coelución con patrones auténticos (Sigma) y por comparación del espectro de absorción (Fig. A.5.). El disolvente no afectó la eficiencia de extracción, por lo que finalmente se optó por usar el metanol por cuestiones prácticas ya que es menos tóxico, se evapora menos y es más económico. También se optó por hacer dos extracciones, extrayendo más del 95% de ambas formas de tocoferol.

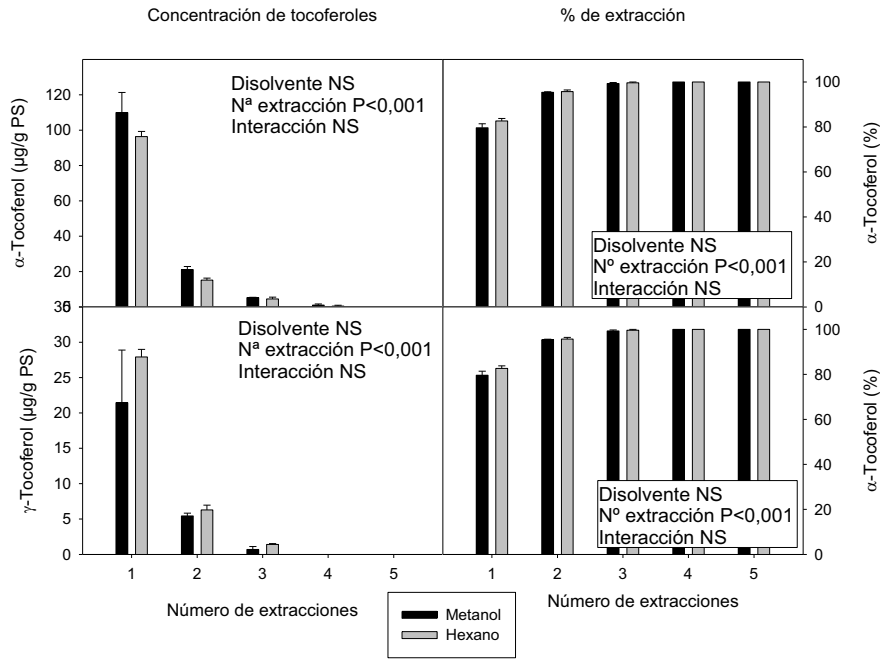


Figura A.4. Niveles de α - y γ -tocoferol según el número de extracciones en *A. cordifolia*. Los datos son la media \pm SE de n=4 réplicas. Las diferencias significativas entre el tipo de disolvente, el número de extracciones y su interacción se muestran en los paneles. PS, peso seco de la hoja.

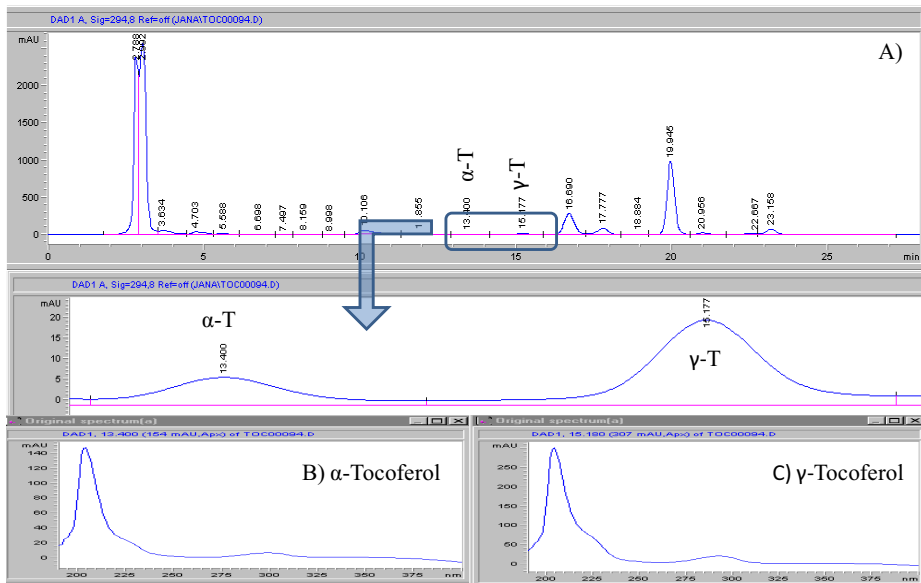


Figura A.5. Cromatograma de una muestra de *A. cordifolia* con el Método 1 y usando metanol para la extracción. A) Cromatograma completo donde se muestran los detalles de los picos de α - y γ -tocoferol. B) y C) espectros de absorción del α - y γ -tocoferol, respectivamente.

Pruebas de optimización del Método 2

El método 2 fue descrito por Amaral (2005) y presenta la ventaja que permite separar los 8 tococromanos (Fig. A.6.). La importancia de este método recae en el hecho que permite separar la forma γ de la β , las cuales solo difieren en la posición de un grupo metilo del anillo cromanol y que no pueden ser separadas con HPLC de fase reversa. Por otro lado, aunque en hojas las formas mayoritarias son la α y la γ , en otros tejidos la composición es diferente y resulta de gran interés poder detectar los 8 compuestos. La vitamina E es importante para la nutrición humana y es importante analizar, además de los niveles de α -tocoferol (el homólogo con mayor actividad en humanos), el de los otros, ya que recientemente se están descubriendo nuevas funciones para éstos. Para poner el método a punto, además de los análisis con hojas de *A. cordifolia* y *A. thaliana* se analizó la composición de vitamina E en frutas de interés comercial de 32 especies diferentes y que se describen a continuación, en el capítulo titulado “**Tocopherol and Tocotrienol (Vitamin E) Composition of Some Edible Fruits**” que forma parte del libro titulado “Vitamin E: Nutrition, Side Effects and Supplements”.

En resumen, los niveles y las proporciones de tocoferoles y tocotrienoles fueron muy variables dependiendo de la especie analizada y no eran constantes dentro de una misma familia. Los tocoferoles se encontraron en todas las frutas analizadas, mientras que los tocotrienoles tuvieron una presencia menos universal, aunque muy importante. En general los tocoferoles fueron más abundantes que los tocotrienoles, pero en algunas especies los tocotrienoles fueron la forma mayoritaria. También hay que destacar que de entre los 4 tocoferoles fueron el α , seguido del γ , los más abundantes.

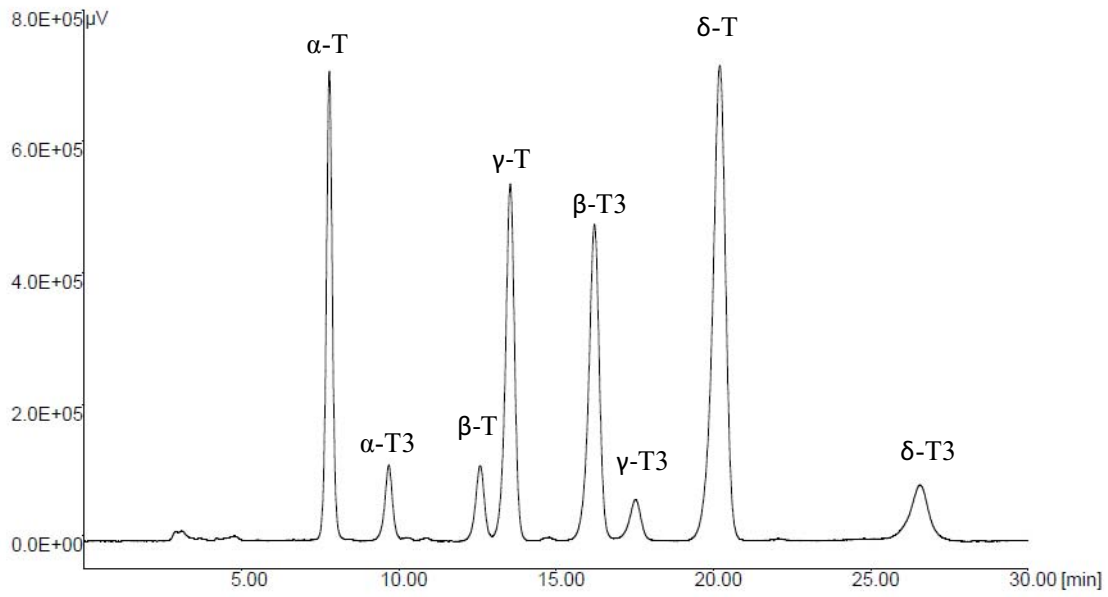


Figura A.6. Cromatograma de un patrón mixto con los 4 tocoferoles y los 4 tocotrienoles usando el Método 2. T, tocoferol; T3, tocotrienol.

Chapter 10

TOCOPHEROL AND TOCOTRIENOL (VITAMIN E) COMPOSITION OF SOME EDIBLE FRUITS

*Jana Cela, Maren Müller and Sergi Munné-Bosch**

Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona,
Avinguda Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

ABSTRACT

Tocopherols and tocotrienols, which include the Vitamin E group of compounds, are exclusively synthesized by photosynthetic organisms. Since humans cannot produce vitamin E, we obtain it mainly from plant sources, including plant oils, seeds, fruits and vegetables. However, despite their importance for the human body, we still do not know in many cases the amounts of vitamin E in fruits and vegetables, and therefore what is their daily intake needed to cover vitamin E needs in our body. Aside from tocopherols, tocotrienols can also play a role in human health. Tocotrienols are not synthesized by all plants and little information is presently available on the contents of these compounds in fruits and vegetables. The present study was aimed at examining the amounts of vitamin E in fruits of different origin and unraveling the relative contribution of tocopherols and tocotrienols to their vitamin E contents. A rapid and sensitive HPLC method was therefore used for the quantification of all naturally occurring vitamin E homologues (including α -, β -, γ - and δ -tocopherols, but also α -, β -, γ - and δ -tocotrienols) from edible fruits of different origin. We evaluated the levels of vitamin E in 32 species of fruits, giving contrasting results in terms of tocopherol and tocotrienol accumulation. Tocopherols were present in all fruits examined at concentrations ranging between 0.01 and 3.83 mg/100 g edible fruit. Tocotrienols were not present in all fruits, but in some of them (baby pineapple, purple mangosteen, sharon fruit, yellow passionfruit and sweet granadilla) represented the major vitamin E form. Furthermore, purple mangosteen was a remarkable source of tocotrienols, with an accumulation of δ -tocotrienol of 24,18 mg/100 g edible fruit. Tocotrienols from fruits can therefore significantly contribute to our daily dietary intake of vitamin E.

* Corresponding author: Sergi Munné-Bosch; e-mail: smunne@ub.edu; fax. +34-934112842 ; tel. +34-934021463

1) INTRODUCTION

Currently, many dietary organizations recommend an increase of the consumption of fruits and vegetables that contain natural antioxidant vitamins (Bazzano et al. 2002; United States Department of Agriculture, U.S. Department of Health and Human Service 2004). Tocopherols and tocotrienols, collectively known as tocochromanols, are lipid-soluble molecules that belong to the group of vitamin E compounds, and they play an essential role in human nutrition and health. Both tocopherols and tocotrienols, which differ in the saturation of their prenyl chain, consist of four homologues (α , β , γ and δ), depending on the amount and position of methyl groups in their chromanol head (Fig. 1). The term ‘vitamin E’ was first introduced by Evans and Bishop (1922) to describe a dietary factor, later found to be α -tocopherol (Fernholz, 1938), with a significant role in animal reproduction. Several years passed before vitamin E was known to be a potent antioxidant (Epstein et al., 1966). Thereafter, the role of this vitamin was extensively studied in humans, animals and plants, and it is considered today an essential component of our diet that plays an important role as an antioxidant in our body. Furthermore, α -tocopherol, the vitamin E form that can be specifically transported in our body by a specific α -tocopherol-binding protein, has also been suggested to play non-antioxidant roles, an aspect that is still controversial today (Azzi, 2007; Brigelius-Flohé and Davies, 2007; Traber and Atkinson, 2007).

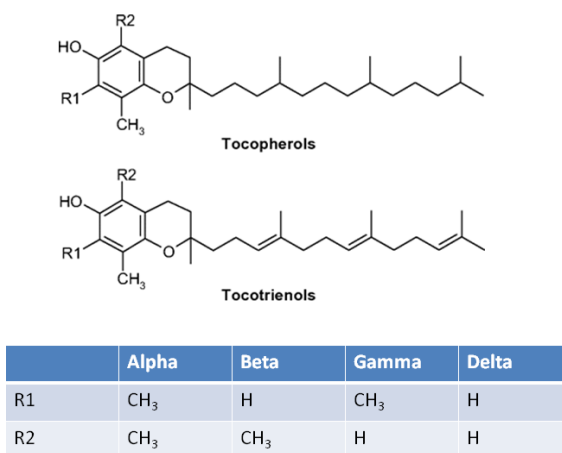


Figure 1. Chemical structure of tocopherols and tocotrienols (vitamin E).

According to FAO and OMS, the Recommended Dietary Allowances (RDA) of vitamin E in humans is between 10–50 mg of vitamin E in a 2000 kcal/day diet. Since we cannot produce vitamin E, we obtain it mainly from plant sources, including plant oils, seeds, fruits and vegetables. However, we do not know in many cases the amounts of vitamin E in fruits and vegetables, and therefore what is their daily intake needed to cover vitamin E needs in our body. Although rare, vitamin E deficiency may cause neurological problems due to poor nerve conduction and lead to neuromuscular dysfunctions, including spinocerebellar ataxia and myopathies. Deficiency can also cause anemia due to oxidative damage to red blood cells (Brigelius-Flohé and Traber, 1999). Although obviously beneficial in some cases,

supplementation with vitamin E is however not always recommended. A case control study done in the Netherlands found that high maternal vitamin E is associated with an increased risk of congenital heart defects in the offspring, especially when the supplements are taken in the preconception period (Smedts et al., 2009). An adequate dietary intake of fruits and vegetables, which provide moderate doses of vitamin E, is therefore recommended to fulfill daily dietary intakes of vitamin E in humans, with the additional advantage of providing other health-promoting substances.

Compared with tocopherols, tocotrienols are poorly studied. Less than 1% of papers on vitamin E relate to tocotrienols (Sen et al., 2006). Current research direction is starting to give more prominence to the tocotrienols, the lesser known but more potent antioxidants in the vitamin E family. While α -tocopherol and α -tocotrienol have equal antioxidant activity *in vitro* when analyzed in *n*-hexane, α -tocotrienol exhibits even significantly greater peroxy radical scavenging potency when incorporated into phosphatidylcholine liposomes (Suzuki et al., 1993). Furthermore, some studies have suggested that tocotrienols have specialized roles in protecting neurons from damage and in cholesterol reduction by inhibiting the activity of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase. Dietary intake of tocotrienols is also thought to protect against stroke-associated brain damage *in vivo* (Sen et al., 2006; Das et al., 2008).

However, while tocopherols are ubiquitously present in all plants and in almost all plant parts, tocotrienols are only present in a range of unrelated plant groups and are almost exclusively found in seeds and fruits (Falk and Munné-Bosch, 2010). In addition, various factors such as genotype, ripening time, cultivation techniques and climatic conditions that occur during the pre-harvest period together with postharvest handling practices can affect the content of phytochemicals in plant foods, and they may have a significant role in determining vitamin E contents (Beltrán et al., 2010). Furthermore, unfortunately the present knowledge of the tocotrienol contents of plant foods is still very limited. While great efforts have been done to unravel the contents of tocopherols in foods, few reports include the levels of tocotrienols. In the present study, we aim at unraveling the contents of both tocopherols and tocotrienols in several edible fruits of different origin to evaluate the relative contribution of tocotrienols to our daily vitamin E intake.

2) MATERIALS AND METHODS

Reagents

Standards: α -tocopherol, β -tocopherol, γ -tocopherol, δ -tocopherol, α -tocotrienol, β -tocotrienol, γ -tocotrienol, and δ -tocotrienol and the solvents (methanol, *n*-hexane and *p*-dioxane) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

Sampling

Fruits were purchased from a central market of Barcelona (La Boqueria). Fruits were mature and ready for consumption when samples were taken. At least 700 mg of fruit pulp

(edible part) was taken and immediately frozen in liquid nitrogen. Then, samples were freeze-dried and stored at -80°C until analyses. Samples were kept frozen by a maximum of 4 weeks before analyses.

Estimation of Water Contents

Water content of samples was estimated as $\text{WC (\%)} = 100 \times (\text{FM} - \text{DM}) / \text{FM}$, in which FM and DM are the fresh and dry matter of the pulp, respectively, which were measured by immediately weighting the samples in an analytical balance prior and after freeze-drying. Freeze-drying was performed until material was completely dry and samples attained constant weight.

Determination of Vitamin E

All tocopherol and tocotrienol homologues were extracted in methanol and their levels measured by HPLC as follows. Freeze-dried samples (60 mg) were ground in liquid nitrogen and repeatedly extracted (three times) with ice-cold methanol using a Branson 2510 ultrasonic cleaner (Branson, Danbury, CT, USA) for 45 minutes. Then, extracts were vortexed and centrifuged for 15 min at 4°C and transferred to vials for HPLC analysis, which was essentially carried out as described (Amaral et al., 2005). The HPLC equipment consisted of an integrated system with a Waters 600 controller pump (Waters, Milford, MA, USA), a Waters 714 plus auto-sampler (Waters, Milford, MA, USA) and a FP-1520 fluorescence detector (Jasco, Japan). Tocopherols and tocotrienols were separated on an Inertsil 100A (5 μm , 30x250mm, GL Sciences Inc., Japan) normal-phase column operating at room temperature. The mobile phase used was a mixture of n-hexane and p-dioxane (95.5; 4.5, v/v) at a flow rate of $0,7 \text{ mL min}^{-1}$, and the injection volume was 10 μL . Detection was carried out at an excitation of 295nm and emission at 330nm. Quantification was based on the fluorescence signal using a calibration curve prepared with authentic standards.

3) RESULTS AND DISCUSSION

All tocopherol and tocotrienol forms were measured in 33 fruit samples, which are summarized in Table 1 (see also Fig. 2). Analyses were performed in the edible part of these fruits, so results represent actual levels of vitamin E taken from these fruits. Samples represent a high diversity of fruits, coming from different countries but all commercialized in a local market in Barcelona (Spain) and were collected in a mature stage, thus ready for consumption. Samples include fruits from 32 species, including two different varieties of *Passiflora edulis* (samples 20 and 21), and 22 families, the Rosaceae and Solanaceae being the most represented families with 4 species each (samples 23-26 and 29-32, respectively).

Tocopherol and Tocotrienol (Vitamin E) Composition of Some Edible Fruits

Table 1. Fruit samples in which vitamin E contents, including all tocopherols and tocotrienols homologues were measured in this study. Species and family, together with the water content of the sample are also given. Data of water contents represent the mean \pm standard error of 3 pieces for each fruit sample.

Sample	Fruit	Species	Family	Water content (%)
1	Kiwifruit	<i>Actinidia deliciosa</i>	Actinidiaceae	82,25 \pm 0,05
2	Mango	<i>Mangifera indica</i>	Anacardiaceae	78,79 \pm 0,24
3	Baby pineapple	<i>Ananas sativus</i> var. Queen Victoria	Bromeliaceae	82,91 \pm 0,07
4	Dragon fruit	<i>Hylocereus undatus</i>	Cactaceae	87,59 \pm 0,59
5	Prickly pear	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Cactaceae	84,72 \pm 0,58
6	Yellow pitahaya	<i>Selenicereus megalanthus</i>	Cactaceae	83,61 \pm 0,82
7	Papaya	<i>Carica papaya</i>	Caricaceae	85,84 \pm 0,30
8	Purple mangosteen	<i>Garcinia mangostana</i>	Clusiaceae	80,55 \pm 0,21
9	Cantaloupe melon	<i>Cucumis melo</i> var. <i>lymphothelialis</i>	Cucurbitaceae	88,74 \pm 0,16
10	Horned melon	<i>Cucumis metuliferus</i>	Cucurbitaceae	86,82 \pm 1,47
11	Sharon fruit	<i>Diospyros kaki</i>	Ebenaceae	81,50 \pm 0,72
12	Blueberry	<i>Vaccinium corymbosum</i>	Ericaceae	85,56 \pm 0,35
13	Tamarind	<i>Tamarindus indica</i>	Fabaceae	17,56 \pm 2,25
14	Redcurrant	<i>Ribes rubrum</i>	Grossulariaceae	79,49 \pm 0,58
15	Avocado	<i>Persea americana</i>	Lauraceae	83,41 \pm 0,59
16	Pomegranate	<i>Punica granatum</i>	Lythraceae	80,78 \pm 0,83
17	Fig	<i>Ficus carica</i>	Moraceae	80,98 \pm 1,08
18	Apple guava	<i>Psidium guajava</i>	Myrtaceae	84,16 \pm 2,32
19	Star fruit	<i>Averrhoa carambola</i>	Oxalidaceae	90,93 \pm 0,28
20	Purple passionfruit	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>edulis</i>	Passifloraceae	78,12 \pm 2,57
21	Yellow passionfruit	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Passifloraceae	78,95 \pm 1,40
22	Sweet granadilla	<i>Passiflora ligularis</i>	Passifloraceae	83,84 \pm 2,71
23	Apple	<i>Malus domestica</i> var. <i>Granny Smith</i>	Rosaceae	85,63 \pm 0,53
24	Blackberry	<i>Rubus fruticosus</i>	Rosaceae	84,98 \pm 1,30
25	Raspberry	<i>Rubus idaeus</i>	Rosaceae	84,95 \pm 0,65
26	Pear	<i>Pyrus communis</i>	Rosaceae	84,35 \pm 0,51
27	Kumquat	<i>Fortunella margarita</i>	Rutaceae	80,61 \pm 0,83
28	Sapodilla	<i>Manilkara zapota</i>	Sapotaceae	73,23 \pm 0,60
29	Cape gooseberry	<i>Physalis peruviana</i>	Solanaceae	75,73 \pm 1,60
30	Naranjilla	<i>Solanum quitoense</i>	Solanaceae	87,32 \pm 0,41
31	Tomato	<i>Solanum lycopersicum</i>	Solanaceae	93,44 \pm 0,18
32	Tamarillo	<i>Solanum betaceum</i>	Solanaceae	86,68 \pm 0,26
33	White grape	<i>Vitis vinifera</i>	Vitaceae	82,15 \pm 0,14

Tocopherol and Tocotrienol (Vitamin E) Composition of Some Edible Fruits

Tocopherols represented the major part of vitamin E levels in most fruits (Table 2), with concentrations ranging between 0,02 mg/100 g edible fruit in baby pineapple and 3,83 mg/100 g edible fruit in blackberry (Fig. 3). Kiwifruit, raspberry and blueberry had also remarkable amounts of tocopherols, with values ranging between 2,31 and 2,71 mg/100g edible weight. Among different tocopherol homologues, α -tocopherol was the most abundant form and it was present in all fruits analyzed. γ -tocopherol was the second most abundant form, with maximum levels of 1,6 mg/100g edible weight in raspberry. Although α -tocopherol was the major form in most species, in some fruits such as cantaloupe melon, raspberry and cape gooseberry, γ -tocopherol was the major tocopherol homologue, with concentrations of 0,26, 1,57 and 1,63 mg/100g edible weight, respectively. β - and δ -tocopherols were also found in some fruits, but at much lower concentrations (with maximum concentrations of 0,012 mg/100g edible weight in cape gooseberry and 0,69 mg/100g edible weight in blackberry, respectively).

Little is known about tocotrienols in fruits, but these compounds were found in almost all fruits analyzed, except in kiwifruit, dragon fruit, fig, apple, blackberry and raspberry, the last three belonging to the Rosaceae family. Therefore, levels of tocotrienols can significantly contribute to the dietary daily intake of vitamin E (Table 2). Furthermore, in some fruits such as purple mangosteen, but also in baby pineapple, sharon fruit, yellow passionfruit and sweet granadilla, tocotrienols represented the major vitamin E form. In general, γ -tocotrienol was the most abundant homologue in fruits, except in purple mangosteen and kumquat in which δ -tocotrienol was the most abundant form, and in yellow passionfruit and sweet granadilla in which α -tocotrienol was the most abundant form. The fruits containing both tocopherols and tocotrienols can have outstanding health benefits, since beyond the essential role of α -tocopherol, which is transported by the human body by a specific protein, tocotrienols can also exert beneficial health properties, such as reducing plasma cholesterol levels (Song et al., 2006), protecting against stroke-associated brain damage (Sen et al., 2006; Das et al., 2008) and a possible role in cancer prevention (Sun et al., 2009; Xu et al., 2009).

Table 2. Percentage of tocopherols and tocotrienols in fruit samples analyzed. The percentage of tocopherols and tocotrienols relative to total vitamin E as well as the percentage of different tocopherol and tocotrienol homologues are given.

Sample	Fruit	Vitamin E		Tocopherols				Tocotrienols		
		% Tocopherols	% Tocotrienols	α -T	β -T	γ -T	δ -T	α -T3	γ -T3	δ -T3
1	Kiwifruit	100	-	96,8	-	3,2	-	-	-	-
2	Mango	96,1	3,9	100	-	-	-	-	100	-
3	Baby pineapple	21,6	78,4	100	-	-	-	-	100	-
4	Dragon fruit	100	-	86,3	-	13,7	-	-	-	-
5	Prickly pear	96,2	3,8	97,2	0,2	2,6	-	-	100	-
6	Yellow pitahaya	77,2	22,8	96,0	-	4,0	-	-	100	-
7	Papaya	89,3	10,7	61,0	-	39,0	-	-	100	-
8	Purple mangosteen	1,7	98,3	81,6	0,7	14,8	2,9	0,4	5,0	94,6
9	Cantaloupe melon	93,7	6,3	26,6	-	71,6	1,8	-	100	-
10	Horned melon	92,4	7,6	89,9	0,2	8,4	1,5	-	100	-
11	Sharon fruit	35,3	64,7	100	-	-	-	-	100	-
12	Blueberry	99,5	0,5	84,2	-	15,8	-	-	100	-
13	Tamarind	89,3	10,7	89,7	-	10,3	-	-	100	-
14	Redcurrant	90,9	9,1	95,2	0,9	1,4	2,5	-	100	-
15	Avocado	76,2	23,8	99,0	-	1,0	-	-	100	-
16	Pomegranate	91,1	8,9	78,8	-	21,2	-	-	100	-
17	Fig	100	-	92,2	-	7,8	-	-	-	-
18	Apple guava	95,0	5,0	92,2	-	4,9	2,9	-	100	-
19	Star fruit	80,9	19,1	58,2	1,9	30,0	9,9	-	100	-
20	Purple passionfruit	70,4	29,6	93,2	-	6,8	-	17,0	83,0	-
21	Yellow passionfruit	9,0	91,0	90,3	-	9,7	-	87,9	12,1	-
22	Sweet granadilla	1,7	98,3	100	-	-	-	73,2	18,1	8,7
23	Apple	100	-	100	-	-	-	-	-	-

Table 2 (Continued).

24	Blackberry	100	-	56,8	0,1	25,2	17,9	-	-	-
25	Raspberry	100	-	26,4	-	67,9	5,7	-	-	-
26	Pear	87,6	12,4	99,6	0,4	-	-	-	100	-
27	Kumquat	87,7	15,3	100	-	-	-	-	40,5	59,5
28	Sapodilla	88,0	12,0	96,3	-	3,7	-	-	100	-
29	Cape gooseberry	93,8	6,2	41,4	1,0	52,3	5,3	-	100	-
30	Naranjilla	65,2	34,8	67,5	-	32,5	-	-	100	-
31	Tomato	75,0	25,0	93,1	0,1	6,9	-	-	100	-
32	Tamarillo	95,5	4,5	87,7	0,1	12,2	-	-	100	-
33	White grape	61,3	38,7	64,5	-	35,5	-	-	100	-

A remarkable result was the levels of vitamin E in purple mangosteen (sample 8). This fruit not only presented the highest levels of vitamin E among the fruits analyzed, but was additionally the richest in tocotrienols, especially δ -tocotrienol which was present at a concentration of 24,18 mg/100 g edible fruit. In this fruit, the levels of tocopherols were similar to other species, with α -tocopherol being the major form but also with some amounts of β , γ and δ homologues. In a previous study, the levels of α -tocopherol in mangosteen were reported to be 0,18 mg/100 g edible fruit (Charoensiri et al., 2009), half the amounts reported in the present study (0,35 mg/100 g edible fruit). However, neither other tocopherol homologues nor tocotrienols were analyzed. Thus, to our knowledge, this is the first time such high levels of tocotrienols are reported in mangosteen. As a natural source of δ -tocotrienol, it can contribute to prevent some diseases, and it has been shown to reduce plasma cholesterol levels together with γ -tocotrienol (Song et al., 2006). Furthermore, δ -tocotrienol has been investigated for a possible role in the treatment of pancreatic cancer (Hussein and Mo, 2009) and clinical trials are currently underway to evaluate the effects of pure δ -tocotrienol in individuals with pancreatic cancer (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00985777>). In these studies, palm oil, which is one of the richest natural sources of tocopherols and tocotrienols, is used to extract δ -tocotrienol. Palm oil contains vitamin E amounts around 100 mg/ 100g oil, with a concentration of δ -tocotrienol ranging between 4,3 and 10,0 mg/ 100g oil (Monde et al., 2009), which is well below the amounts of δ -tocotrienol levels found in purple mangosteen.

In conclusion, fruits contain significant amounts of vitamin E and can therefore contribute to the daily intake of vitamin E. However, the amounts of tocopherols and tocotrienols are highly variable depending on the fruit so that the amount and form of vitamin E ingested can vary enormously depending on the fruits in our diet. Considering a daily RDA between 10–50 mg of vitamin E, in some cases, such as in avocado, taking two pieces of fruit could suffice to cover daily RDA, while in other cases fruits will only partly contribute to our daily RDA. In this case, green vegetables will be an alternative source of tocopherols, while oils can additionally provide tocotrienols at high amounts.

ACKNOWLEDGMENTS

Support for the research was received through the ICREA Academia prize funded by the Generalitat de Catalunya. We are very grateful to Xavier Miret for his help in extraction and analyses of vitamin E.

REFERENCES

Amaral JS, Casal S, Torres D, Seabra RM, Oliveira BPP (2005) Simultaneous determination of tocopherols and tocotrienols in hazelnuts by a normal phase liquid chromatographic method. *Anal. Sci.* 21:1545–1548.

- Azzi A (2007) Molecular mechanisms of α -tocopherol action. *Free Rad. Biol. Med.* 43: 16-21.
- Bazzano LA, He J, Ogden LG, Loria CM, Vuppuruti S, Myers L, Whelton PK (2002) Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: The first national health and nutrition examination survey epidemiologic follow up study. *Am. J. Clin. Nutr.* 76: 93-99.
- Beltrán G, Jiménez A, del Río C, Sánchez S, Martínez L, Uceda M, Aguilera MP (2010) Variability of vitamin E in virgin olive oil by agronomical and genetic factors. *J. Food Comp. Anal.* doi:10.1016/j.jfca.2010.03.003.
- Brigelius-Flohé R, Davies KJA (2007) Is vitamin E an antioxidant, a regulator of signal transduction and gene expression, or a 'junk' food? Comments on the two accompanying papers: "Molecular mechanism of α -tocopherol action" by A. Azzi and "Vitamin E, antioxidant and nothing more" by M. Traber and J. Atkinson. *Free Rad. Biol. Med.* 43: 2-3.
- Brigelius-Flohé R, Traber MG (1999) Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J.* 13: 1145-1155.
- Charoensiri R, Kongkachuichai R, Suknicom S, Sungpuag P (2009) Beta-carotene, and alpha-tocopherol contents of selected Thai fruits. *Food Chem.* 113: 202-207.
- Chun J, Lee J, Ye L, Exler J, Eitenmiller RR (2006) Tocopherols and tocotrienol contents of raw and processed fruits and vegetables in the United States diet. *J. Food Comp. Anal.* 19: 196-204.
- Das S, Lekli I, Das M, Szabo G, Varadi J, Juhasz B, Bak I, Nesaretam K, Tosaki A, Powell SR, Das DK (2008) Cardiprotection with palm oil tocotrienols: comparison of different isomers. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294: H970-H978.
- Epstein SS, Forsyth J, Saporoschetz IB, Mantel N (1966) An exploratory investigation on the inhibition of selected photosensitizers by agents of varying antioxidant activity. *Rad. Res.* 28: 322-335.
- Evans HM, Bishop KS (1922) Fetal resorption. *Science* 55: 650.
- Falk J, Munné-Bosch S (2010) Tocochromanol function in plants: antioxidation and beyond. *J. Exp. Bot.* 61: 1549-1566.
- Fernholz E (1938) On the constitution of α -tocopherol. *J. Am. Chem. Soc.* 60: 700-705.
- Hussein D, Mo H (2009) d-Delta-tocotrienol-mediated suppression of the proliferation of human PANC-1, MIA PaCa-2, and BxPC-3 pancreatic carcinoma cells. *Pancreas* 38: e124-36.
- Monde AA, Michel F, Carbonneau MA, Tiahou G, Vernet MH, Eymard-Duvernay S, Badiou S, Adon B, Konan E, Sess D, Critol JP (2009) Comparative study of fatty acid composition, vitamin E and carotenoid contents of palm oils from four varieties of oil palm from Cote d'Ivoire. *J. Sci. Food Agri.* 89: 2535-2540.
- Sen CK, Khanna S, Roy S (2006) Tocotrienols: vitamin E beyond tocopherols. *Life Sci.* 78: 2088-2098.
- Smedts HPM, de Vries JH, Rakhshandehroo M, Wildhagen MF, Verkleij-Hagoort AC, Steegers EA, Steegers-theunissen RPM (2009) High maternal vitamin E intake by diet or supplements is associated with congenital heart defects in the offspring. *BJOG* 116: 416-423.

-
- Song BL, DeBose-Boyd RA (2006) Insig-dependent ubiquitination and degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase stimulated by delta- and gamma-tocotrienols. *J. Biol. Chem.* 281: 25054-25061.
- Suzuki Y, Tsuchiya M, Wassall SR, Choo YM, Govil G, Kagan VE, Packer L (1993) Structural and dynamic membrane properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. Implication to the molecular mechanism of the antioxidant potency. *Biochemistry* 32: 10692-10699.
- Traber MG, Atkinson J (2007) Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Rad. Biol. Med.* 43: 4-15.
- Xu X, Liu J, Liu H, Qi G, Sun X, Sun W, Chen B (2009) Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by γ -tocotrienol in human colon carcinoma HT-29 cells. *Nutrition* 25: 555-566.
- Sun W, Xu W, Liu H, Liu J, Wang Q, Zhou J, Dong F, Chen B (2009) γ -Tocotrienol induces mitochondria-mediated apoptosis in human gastric adenocarcinoma SGC-7901 cells. *J. Nutr. Biochem.* 20: 276-284.

8. BIBLIOGRAFÍA

7. Bibliografía

- Abbasi A, Hajirezaei M, Hofius D, Sonnewald U, Voll LM (2007) Specific roles of α - and γ -tocopherol in abiotic stress responses of transgenic tobacco. *Plant Physiol* **143**: 1720-1738
- Abbasi A, Saur A, Hennig P, Tschiersch H, Hajirezaei M, Hofius D, Sonnewald V, Voll LM (2009) Tocopherol deficiency in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants leads to accelerated senescence. *Plant Cell Environ* **32**: 144-157
- Abreu ME, Munné-Bosch S (2009) Salicylic acid deficiency in *NahG* transgenic lines and *sid2* mutants increases seed yield in the annual plant *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **60**: 1261-1271
- Adams DO, Yang SF (1979) Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 170-174
- Adie B, Chico JM, Rubio-Somoza A, Solano R (2007) Modulation of plant defenses by ethylene. *J Plant Growth Regul* **26**: 160-177
- Agarwal PK, Jha B (2010) Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signaling. *Biol Plant* **54**: 201-212
- Alonso JM, Hirayama T, Roman G, Nourizadeh S, Ecker JR (1999) EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science* **284**: 2148-2152
- Anderson JM (1986) Photoregulation of the composition, function and structure of thylakoid membranes. *Annu Rev Plant Physiol* **37**: 93-136
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 373-399

- Arango Y, Heise KP (1998) Tocopherol synthesis from homogentisate in *Capsicum annuum* L. (yellow pepper) chromoplast membranes: evidence for tocopherol cyclase. *Biochem J* **336**: 531-533
- Arrom L, Munné-Bosch S (2010) Tocopherol composition in flower organs of *Lilium* and its variations during natural and artificial senescence. *Plant Sci* **179**: 289-295
- Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 601-639
- Asada K, Takahashi M (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. En Photoinhibition. Elsevier/North Holland Biomedical Press (Holanda)
- Asensi-Fabado MA, Munné-Bosch S (2010) Vitamins in plants: occurrence, biosynthesis and antioxidant function. *Trends Plant Sci* **15**: 1360-1385
- Atkinson J, Epanand RF, Epanand RM (2008) Tocopherols and tocotrienols in membranes: a critical review. *Free Radic Biol Med* **44**: 739-764
- Avanci NC, Luche DD, Goldman GH, Goldman MHS (2010) Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. *Genet Mol Res* **9**: 484-505
- Bartoli CG, Simontacchi M, Montaldi E, Puntarulo S (1996) Oxidative stress, antioxidant capacity and ethylene production during ageing of cut carnation (*Dianthus caryophyllus*) petals. *J Exp Bot* **47**: 595-601
- Battle RW, Laidman DL, Gaunt JK (1977) The relationship between floral induction and γ -tocopherol concentrations in leaves of *Xanthium strumarium* L. *Biochem Soc Trans* **5**: 322-324
- Bergmüller E, Porfirova S, Dörmann P (2003) Characterization of an *Arabidopsis* mutant deficient in γ -tocopherol methyltransferase. *Plant Mol Biol* **52**: 1181-1190

- Bleecker AB, Kende H (2000) Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 1-18
- BOE (2011) Boletín Oficial del Estado. **298**: 132711
- Borsani O, Valpuesta V, Botella MA (2001) Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol* **126**: 1024-1030
- Cahoon EB, Hall SE, Ripp KG, Ganzke TS, Hitz WD, Coughlan SJ (2003) Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. *Nat Biotechnol* **21**: 1082-1087
- Chae HS, Kieber JJ (2005) *Eto brute?* Role of ACS turnover in regulating ethylene biosynthesis. *Trends Plant Sci* **10**: 291-296
- Chang C, Kwok SF, Bleecker AB, Meyerowitz EM (1993) *Arabidopsis* ethylene response gene *ETR1*: similarity of product to two-component regulators. *Science* **262**: 539-544
- Chao Q, Rothenberg M, Solano R, Roman G, Terzaghi W, Ecker JR (1997) Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein EHTYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell* **89**: 1133-1144
- Chaudhary N, Khurana P (2009) Vitamin E biosynthesis genes in rice: molecular characterization, expression profiling and comparative phylogenetic analysis. *Plant Sci* **177**: 479-491
- Chen YF, Randlett MD, Findell JL, Schaller GE (2002) Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmatic reticulum of *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **277**: 19861-19866
- Cheng ZG, Sattler S, Maeda H, Sakuragi Y, Bryant DA, DellaPenna D (2003) Highly divergent methyltransferases catalyze a conserved reaction in tocopherol and

plastoquinone synthesis in cyanobacteria and photosynthetic eukaryotes. *Plant Cell* **15**: 2343-2456

➤ Chrost B, Falk J, Kernebeck B, Molleken H, Krupinska K (1999) Tocopherol biosynthesis in senescing chloroplasts - A mechanism to protect envelope membranes against oxidative stress and a prerequisite for lipid remobilization? En Chloroplast: from molecular biology to biotechnology. Springer (Holanda)

➤ Collakova E, DellaPenna D (2001) Isolation and functional analysis of homogentisate phytyltransferase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **127**: 1113-1124

➤ Collakova E, DellaPenna D (2003) The role of homogentisate phytyltransferase and other tocopherol pathway enzymes in the regulation of tocopherol synthesis during abiotic stress. *Plant Physiol* **133**: 930-940

➤ Cooney RV, Franke AA, Harwood PJ, Hatch-Pigott V, Custer LJ, Mordan LJ (1993) Gamma-tocopherol detoxification of nitrogen dioxide: superiority of alpha-tocopherol. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 1771-1775

➤ DellaPenna D (2005) A decade of progress in understanding vitamin E synthesis in plants. *J Plant Physiol* **162**: 729-737

➤ Demmig-Adams B, Adams WW (1996) Xanthophyll cycle and light stress in nature: uniform response to excess direct sunlight among higher plant species. *Planta* **198**: 460-470

➤ Demmig-Adams B, Adams WW (2006) Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation. *New Phytol* **172**: 11-21

➤ Desel C, Krupinska K (2005) The impact of tocochromanols on early seedling development and NO release. *J Plant Physiol* **162**: 771-776

- Desikan R, Neill SJ, Hancock JT (2000) Hydrogen peroxide-induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Free Radic Biol Med* **28**: 773-778
- El Kayal W, Keller G, Debayles C, Kumar R, Weier D, Teulieres C, Marque C (2006) Regulation of tocopherol biosynthesis through transcriptional control of tocopherol cyclase during cold hardening in *Eucalyptus gunnii*. *Physiol Plant* **126**: 212-223
- Epstein SS, Forsyth J, Saporoschetz IB, Mantel N (1966) An exploratory investigation on the inhibition of selected photosensitizers by agents of varying antioxidant activity. *Radiat Res* **28**: 322-325
- Esteban R, Olano JM, Castresana J, Fernández-Marín B, Hernández A, Becerril JM, García-Plazaola JI (2009) Distribution and evolutionary trends of photoprotective isoprenoids (xanthophylls and tocopherols) within the plant kingdom. *Physiol Plant* **135**: 379-389
- Evans HM, Bishop KS (1922) On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science* **56**: 650-651
- Fahrenholz SR, Doleiden FH, Trozzolo AM, Lamola AA (1974) Quenching of singlet oxygen by α -tocopherol. *Photochem Photobiol* **20**: 505-509
- Falk J, Krauß N, Dähnhardt D, Krupinska K (2002) The senescence associated gene of barley encoding 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is expressed during oxidative stress. *J Plant Physiol* **159**: 1245-1253
- Falk J, Munné-Bosch S (2010) Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. *J Exp Bot* **61**: 1549-1566
- Foyer CH, Noctor G (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid Redox Signal* **11**: 861-905

- Foyer CH, Noctor G (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol* **155**: 2-18
- Franzen J, Bausch J, Glatzle D, Wagner E (1991) Distribution of vitamin E in spruce seedling and mature tree organs, and within the genus. *Phytochemistry* **30**: 147-151
- Fryer MJ (1992) The antioxidant effects of thylakoid vitamin E (α -tocopherol). *Plant Cell Environ* **15**: 381-392
- Gamaley IA, Klyubin IV (1999) Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions. *Int Rev Cytol* **188**: 203-255
- Gan S (2010) The hormonal regulation of senescence. En *Plant Hormones*. Springer (Holanda)
- García-Plazaola JI, Becerril JM (2011) Seasonal changes in photosynthetic pigments and antioxidants in beech (*Fagus sylvatica*) in a Mediterranean climate: implications for tree decline diagnosis. *Aust J Plant Physiol* **28**: 225-232
- Garg N, Manchanda G (2009) ROS generation in plants: boon or bane? *Plant Biosyst* **1**: 81-96
- Gaspar TH, Kevers C, Faivare-Rampanti O, Crèvecoeur M, Penel CL, Greppin H, Doomes J (2003) Changing concepts in plant hormone action. *In Vitro Cell Dev Biol* **39**: 85-106
- Griffiths H (1989) Carbon-dioxide concentrating mechanisms and the evolution of CAM in vascular epiphytes. En *Vascular plants as epiphytes: evolution and ecophysiology*. Springer (Alemania)
- Havaux M, Eymery F, Porfirova S, Rey P, Dörman P (2005) Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **17**: 3451-3469

- Hofius D, Hajirezaei MR, Geiger M, Tschiersch H, Melzer M, Sonnewald U (2004) RNAi-mediated tocopherol deficiency impairs photoassimilate export in transgenic potato plants. *Plant Physiol* **135**: 1256-1268
- Hojati M, Modarres-Sanavy SAM, Karimi M, Ghanati F (2011) Responses of growth and antioxidant systems in *Carthamus tinctorius* L. under water deficit stress. *Acta Physiol Plant* **33**: 105-112
- Horvath G, Wessjohann L, Bigirimana J, Monica H, Jansen M, Guisez Y, Caubergs R, Horemans N (2006) Differential distribution of tocopherols and tocotrienols in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues. *Phytochemistry* **67**: 1185-1195
- Hua J, Meyerowitz EM (1998) Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **94**: 261-271
- Hua J, Sakai S, Nourizadeh S, Chen QC, Bleecker AB, Ecker JR, Meyerowitz EM (1998) *EIN4* and *ERS2* are members of the putative ethylene receptor gene family in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 1321-1332
- Hyun TK, Kumar K, Rao KP, Sinha AK, Roitsch T (2011) Role of α -tocopherol in cellular signaling: α -tocopherol inhibits stress-induced mitogen-activated protein kinase activation. *Plant Biotechnol Rep* **5**: 19-25
- Kadioglu A, Saruhan N, Sağlam A, Terzi R, Acet T (2011) Exogenous salicylic acid alleviates effects of long term drought stress and delays leaf rolling by inducing antioxidant system. *Plant Growth Regul* **64**: 27-37
- Kamal-Eldin A, Appelqvist L (1996) The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* **31**: 671-701
- Kanervo E, Suorsa M, Aro EM (2005) Functional flexibility and acclimation of the thylakoid membrane. *Photochem Photobiol Sci* **4**: 1072-1080

- Kanwischer M, Porfirova S, Bermüller E, Dörman P (2005) Alterations in tocopherol cyclase activity in transgenic and mutant plants of *Arabidopsis* affect tocopherol content, tocopherol composition, and oxidative stress. *Plant Physiol* **137**: 13-723
- Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldmann KA, Ecker JR (1993) *CTR1*, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell* **72**: 427-441
- Koch M, Lemke R, Heise KP, Mock HP (2003) Characterization of gamma-tocopherol methyltransferases from *Capsicum annuum* L and *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem* **270**: 84-92
- Krieger-Liszkay A, Trebst A (2006) Tocopherol is the scavenger of singlet oxygen produced by the triplet states of chlorophyll in the PSII reaction centre. *J Exp Bot* **57**: 1677-1684
- Li Z, Keasling JD, Niyogi KK (2012) Overlapping photoprotective function of vitamin E and carotenoids in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol* **158**: 313-323
- Liebler DC (1993) The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. *Crit Rev Toxicol* **23**: 147-169
- Lim PO, Kim HJ, Nam Hg (2007) Leaf senescence. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 115-36
- Lin Z, Zhong S, Grierson D (2009) Recent advances in ethylene research. *J Exp Bot* **60**: 3311-3336
- Liu X, Hua X, Guo J, Qi D, Wang L, Liu Z, Jin Z, Chen S, Liu G (2008) Enhanced tolerance to drought stress in transgenic tobacco plants overexpressing *VTE1* for increased tocopherol production from *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnol Lett* **30**: 1275-1280

- Lizarazo K, Fernández-Marín B, Becerril JM, García-Plazaola JI (2010) Ageing and irradiance enhance vitamin E content in green edible tissues from crop plants. *J Sci Food Agric* **90**: 1994-1999
- Llusà J, Peñuelas J, Munné-Bosch S (2005) Sustained accumulation of methyl salicylate alters antioxidant protection and reduces tolerance of holm oak to heat stress. *Physiol Plant* **124**: 353-361
- Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ, Solano R (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathway in plant defense. *Plant Cell* **15**: 165-178
- Maeda H, Sage TL, Isaac I, Welti R, DellaPenna D (2008) Tocopherols modulate extraplastidic polyunsaturated fatty acid metabolism in *Arabidopsis* at low temperature. *Plant Cell* **20**: 452-470
- Maeda H, Song W, Sage TL, DellaPenna D (2006) Tocopherols play a crucial role in low-temperature adaptation and phloem loading in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 2710-2732
- Mahajan S, Tuteja N (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch Biochem Biophys* **444**: 139-158
- Martin W, Rujan T, Richly E, Hansen A, Cornelsen S, Lins T, Leister D, Stoebe B, Hasegawa M, Penny D (2002) Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 12246-12251
- Matringe M, Ksas B, Rey P, Havaux M (2008) Tocotrienols, the unsaturated forms of vitamin E, can function as antioxidants and lipid protectors in tobacco leaves. *Plant Physiol* **147**: 764-778

- Mène-Saffrané L, Davoine C, Stolz S, Majcherczyk P, Farmer EE (2007) Genetic removal of tri-unsaturated fatty acids suppresses developmental and molecular phenotypes of an *Arabidopsis* tocopherol-deficient mutant. *J Biol Chem* **282**: 35749-35756
- Mène-Saffrané L, Jones AD, DellaPenna D (2010) Plastochromanol-8 and tocopherols are essential lipid-soluble antioxidants during seed desiccation and quiescence in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 17815-17820
- Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ* **33**: 453-467
- Molina-Torres J, Martínez ML (1991) Tocopherols and leaf age in *Xanthium strumarium* L. *New Phytol* **118**: 95-99
- Monde AA, Michel F, Carbonneau MA, Tiahou G, Vernet MH, Eymard-Duvernay S, Badiou S, Adon B, Konan E, Sess D, Critol JP (2009) Comparative study of fatty acid composition, vitamin E and carotenoid contents of palm oils from four varieties of oil palm from Cote d'Ivoire. *J Sci Food Agri* **89**: 2535-2540
- Morgan PW, Drew MC (1997) Ethylene and plant responses to stress. *Physiol Plant* **100**: 620-630
- Munné-Bosch S (2005) The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *J Plant Physiol* **162**: 743-748
- Munné-Bosch S (2007) α -Tocopherol: a multifaceted molecule in plants. En (Litwack, ed) Vitamin E. Elsevier (USA)
- Munné-Bosch S, Alegre L (2002) The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Crit Rev Plant Sci* **21**: 31-57

- Munné-Bosch S, Cela J (2006) Effects of water deficit on photosystem II photochemistry and photoprotection during acclimation of lyreleaf sage (*Salvia lyrata* L.) plants to high light. *J Photochem Photobiol B* **85**: 191-197
- Munné-Bosch S, Falara V, Pateraki I, López-Carbonell M, Cela J, Kanellis AK (2009) Physiological and molecular responses of the isoprenoid biosynthetic pathway in a drought-resistant Mediterranean shrub, *Cistus creticus* exposed to water deficit. *J Plant Physiol* **166**: 136-145
- Munné-Bosch S, Nogués L, Alegre L (1999) Diurnal variations of photosynthesis and dew absorption by leaves in two evergreen shrubs growing in Mediterranean field conditions. *New Phytol* **114**: 109-119
- Munné-Bosch S, Oñate M, Olivera PG, Garcia QS (2011) Changes in phytohormones and oxidative stress markers in buried seeds of *Vellozia alata*. *Flora* **206**: 704-711
- Munné-Bosch S, Peñuelas J (2003) Photo- and antioxidative protection during summer leaf senescence in *Pistacia lentiscus* L. grown under mediterranean field conditions. *Ann Bot* **92**: 385-391
- Munné-Bosch S, Peñuelas J, Asensio D, Llusà J (2004) Airborne ethylene may alter antioxidant protection and reduce tolerance of holm oak to heat and drought stress. *Plant Physiol* **136**: 2937-2947
- Munné-Bosch S, Peñuelas J, Llusà J (2007) A deficiency in salicylic acid alters isoprenoid accumulation in water-stressed *NahG* transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Sci* **172**: 756-762
- Munné-Bosch, Weiler EW, Alegre L, Müller M, Dütchting P, Falk J (2007) α -Tocopherol may influence cellular signaling by modulating jasmonic acid levels in plants. *Planta* **225**: 681-691

- Neljubov D (1901) Über die horizontale nutation der stengel von *Pisum sativum* und einiger anderer. *Pflanzen Beih Bot Zentralb* **10**: 128-139
- Niki E, Tsuchiya J, Tanimura R, Kamiya Y (1982) Regeneration of vitamin E from α -chromanoxyl radical by glutathione and vitamin C. *Chem Lett* **6**: 789-792
- Niyogi KK (1999) Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 333-359
- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 249-279
- Norris SR, Shen X, DellaPenna D (1998) Complementation of the *Arabidopsis pds1* mutation with the gene encoding *p*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Plant Physiol* **117**: 1317-1323
- O'Malley RC, Rodríguez FI, Esch JJ, Binder BM, O'Donnell P, Klee HJ, Bleeker AB (2005) Ethylene-binding activity, gene expression levels, and receptor system output for ethylene receptor family members from *Arabidopsis* and tomato. *Plant J* **41**: 651-659
- Omata T, Murata N (1984) Cytochromes and prenylquinones in preparations of cytoplasmic and thylakoid membranes from the cyanobacterium (blue-green alga) *Anacystis nidulans*. *Biochim Biophys Acta* **766**: 395-402
- Packer JE, Slater TF, Willison RL (1979) Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* **278**: 737-738
- Park MR, Cho EA, Rehman S, Yun SJ (2010) Expression of a sesame geranylgeranyl reductase cDNA is induced by light but repressed by abscisic acid and ethylene. *Pak J Bot* **42**: 1815-1825
- Pfannschmidt T (2003) Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends Plant Sci* **8**: 1360-1385

- Pierik R, Whitelam GC, Voeselek LACJ, de Kroon H, Visser EJW (2004) Canopy studies on ethylene-insensitive tobacco identify ethylene as a novel element in blue light and plant-plant signalling. *Plant J* **38**: 310-319
- Porfirova S, Bergmüller E, Tropf S, Lemke R, Dörmann P (2002) Isolation of an *Arabidopsis* mutant lacking vitamin E and identification of a cyclase essential for all tocopherol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 12495-12500
- Rohmer M (2003) Mevalonate-independent methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. *Pure Appl Chem* **75**: 375-387
- Russin WA, Evert RF, Vanderveer PJ, Sharkey TD, Briggs SP (1996) Modification of a specific class of plasmodesmata and loss of sucrose export ability in the sucrose export defective1 maize mutant. *Plant Cell* **8**: 645-658
- Rytter SW, Tyrrell RM (1998) Singlet molecular oxygen ($^1\text{O}_2$): A possible effector of eukaryotic gene expression. *Free Radic Biol Med* **24**: 1520-1534
- Sadre R, Gruber J, Frentzen M (2006) Characterization of homogentisate prenyltransferase involved in plastoquinone-9 and tocopherol biosynthesis. *FEBS Lett* **580**: 5357-5362
- Sakamoto M, Munemura I, Tomita R, Kobayashi K (2008) Involvement of hydrogen peroxide in leaf abscission signaling, revealed by analysis with an in vitro abscission system in *Capsicum* plants. *Plant J* **56**: 13-27
- Sandorf I, Holländer-Czytko H (2002) Jasmonate is involved in the induction of tyrosine aminotransferase and tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **216**: 173-179
- Sattler SE, Cahoon EB, Coughlan SJ, DellaPenna D (2003) Characterization of tocopherol cyclases from higher plants and cyanobacteria. Evolutionary implications for tocopherol synthesis and function. *Plant Physiol* **132**: 2184-2195

- Sattler SE, Gilliland LU, Magallanes-Lundback M, Pollard M, DellaPenna D (2004) Vitamin E is essential for seed longevity, and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell* **16**: 1419-1432
- Sattler SE, Mène-Saffrané L, Farmer EE, Krischke M, Mueller MJ, DellaPenna D (2006) Nonenzymatic lipid peroxidation reprograms gene expression and activates defense markers in *Arabidopsis* tocopherol-deficient mutants. *Plant Cell* **18**: 3706-3720
- Schaller F (2001) Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signaling molecules. *J Exp Bot* **52**: 11-23
- Senaratna T, Touchell D, Bunn E, Dixon K (2000) Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regul* **30**: 157-161
- Sheppard AJ, Pennington JAT, Weihrauch JL (1993) Analysis and distribution of vitamin E in vegetable oils and foods. En Vitamin E in Health and Disease. Marcel Dekker, Inc (USA)
- Shintani D, DellaPenna D (1998) Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. *Science* **282**: 2098-2100
- ShouQiang O, SiJie H, Peng L, WanKe Z, JinSong Z, ShouYi C (2011) The role of tocopherol cyclase in salt stress tolerance of rice (*Oryza sativa*). *Sci China Life Sci* **54**: 181-188
- Singh RK, Ali SA, Nath P, Sanel VA (2011) Activation of ethylene-responsive *p*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase leads to increased tocopherol levels during ripening in mango. *J Exp Bot* **62**: 1-11
- Skirycz A, Inzé D (2010) More from less: plant growth under limited water. *Curr Opin Biotechnol* **21**: 197-203

- Soll J, Schultz G (1979) Comparison of geranylgeranyl and phytyl substituted methylquinols in the tocopherol synthesis of spinach chloroplasts. *Biochem Biophys Res Commun* **91**: 715-720
- Soll J, Schultz G, Joyard J, Douce R, Block MA (1985) Localization and synthesis of prenylquinones in isolated outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. *Arch Biochem Biophys* **238**: 290-29
- Song BL, DeBose-Boyd RA (2006) Insig-dependent ubiquitination and degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase stimulated by δ - and γ -tocotrienols. *J Biol Chem* **281**: 25054-25061
- Song W, Maeda H, DellaPenna D (2010) Mutations of the ER to plastid lipid transporters *TGD1*, 2, 3 and 4 and the ER oleate desaturase *FAD2* suppress the low temperature-induced phenotype of *Arabidopsis* tocopherol deficient mutant *vte2*. *Plant J* **62**: 1004-1018
- Sugiura M (1992) The chloroplast genome. *Plant Mol Biol* **19**: 149-168
- Sun Q, Zybaylov B, Majeran W, Friso G, Olinares PDB (2009) PPDB, the plant proteomics database at Cornell. *Nucleic Acids Res* **37**: 969-974
- Sun W, Xu W, Liu H, Liu J, Wang Q, Zhou J, Dong F, Chen B (2009) γ -Tocotrienol induces mitochondria-mediated apoptosis in human gastric adenocarcinoma SGC-7901 cells. *J Nutr Biochem* **20**: 276-284
- Szymanska R, Kruk J (2008) γ -Tocopherol dominates in young leaves of runner bean (*Phaseolus coccineus*) under a variety of growing conditions: the possible functions of γ -tocopherol. *Phytochemistry* **69**: 2142-2148
- Thoma I, Krischke M, Loeffler C, Mueller MJ (2004) The isoprostanoic pathway in plants. *Chem Phys Lipids* **128**: 135-148

- Thornber JP, Morishige DT, Anandan S, Peter GF (1991) Chlorophyll-carotenoid proteins of higher plant thylakoids. En (Scheer, ed) Chlorophylls. CRC Press (USA)
- Tramontano WA, Ganci D, Pennino M, Dierenfeld ES (1992) Age dependent α -tocopherol concentrations in leaves of soybean and pinto beans. *Phytochemistry* **31**: 3349-3351
- Tramontano WA, Ganci D, Pennino M, Dierenfeld ES (1993) Distribution of α -tocopherol in early foliage samples in several forage crops. *Phytochemistry* **34**: 389-390
- Trebst A, Depka B, Höllander-Czytko H (2002) A specific role for tocopherol and of chemical singlet oxygen quenchers in the maintenance of photosystem II structure and function in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett* **516**: 156-160
- Trebst A (2003) Function of β -carotene and tocopherol in photosystem II. *Z Naturforsch* **58**: 609-620
- Van Wijk KJ, Baginsky S (2011) Plastid proteomics in higher plants: current state and future goals. *Plant Physiol* **155**: 1578-1588
- Vidi PA, Kanwischer M, Baginsky S, Austin JR, Csucs G, Dormann P, Kessler F, Brehelin C (2006) Tocopherol cyclase (VTE1) localization and vitamin E accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles. *J Biol Chem* **281**: 11225-11234
- Wang KLC, Yoshida H, Lurin C, Ecker JR (2004) Regulation of ethylene gas biosynthesis by the *Arabidopsis* ETO1 protein. *Nature* **428**: 945-950
- Wang X, Quinn PJ (2000) The location and function of vitamin E in membranes. *Mol Membr Biol* **17**: 143-156
- Wasternack C (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot* **100**: 681-697
- Weiser H, Vecchi M, Schlachter M (1986) Stereoisomers of α -tocopheryl acetate. IV. USP units and α -tocopherol equivalents of all-rac-, 2-ambo- and RRR- α -tocopherol

evaluated by simultaneous determination of resorption-gestation, myopathy and liver storage capacity in rats. *Int J Vitam Nutr Res* **56**: 45-56

➤ Whittle KJ, Dunphy PJ, Pennock JF (1966) The isolation and properties of δ -tocotrienol from *Hevea latex*. *Biochem J* **100**: 138-145

➤ Wu L, Zhang Z, Zhang H, Wang XC, Huang R (2008) Transcriptional modulation of ethylene response factor protein JERF3 in the oxidative stress response enhances tolerance of tobacco seedlings to salt, drought, and freezing. *Plant Physiol* **148**: 1953-1963

➤ Xie Z, Jiang D, Cao W, Dai T, Jing Q (2003) Relationships of endogenous plant hormones to accumulation of grain protein and starch in winter wheat under different post-anthesis soil water statuses. *Plant Growth Regul* **41**: 117-127

➤ Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* **14**: 165-183

➤ Xu WF, Shi WM (2007) Mechanisms of salt tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* constitutively overexpressing the tomato 14-3-3 protein *TFT7*. *Plant Soil* **301**: 17-28

➤ Xu X, Liu J, Liu H, Qi G, Sun X, Sun W, Chen B (2009) Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by γ -tocotrienol in human colon carcinoma HT-29 cells. *Nutrition* **25**: 555-566

➤ Yu M, Shen L, Fan B, Zhao D, Zheng Y, Sheng J (2009) The effect of MeJa on ethylene biosynthesis and induced disease resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. *Postharv Biol Technol* **54**: 153-158

➤ Zbierzak AM, Kanwischer M, Wille C, Vidi PA, Giavalisco P, Lohmann A, Briesen I, Porfirova S, Br  h  lin C, Kessler F, Dörmann P (2010) Intersection of the

tocopherol and plastoquinol metabolic pathways at the plastoglobule. *Biochem J* **425**:
389-399

➤ Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev
Plant Biol* **53**: 247-273

