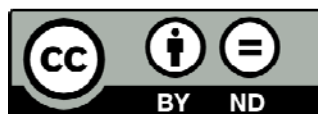




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Importancia de la vitamina E y los jasmonatos en la respuesta de las plantas ante la distinta disponibilidad de fósforo

Bárbara Simancas San Martín



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència *Reconeixement- SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.*

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia *Reconocimiento - SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.*

This doctoral thesis is licensed under the *Creative Commons Attribution-NoDerivatives 3.0. Spain License.*

Barcelona, Noviembre de 2017



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Importancia de la vitamina E y los jasmonatos en la respuesta de las plantas ante la distinta disponibilidad de fósforo

Memoria presentada por Bárbara Simancas San Martín para optar al título
de Doctora por la Universidad de Barcelona.

Programa de doctorado Ecología, Ciencias Ambientales y Fisiología Vegetal
de la Universidad de Barcelona.

Este trabajo se ha realizado en el Departamento de Biología Evolutiva,
Ecología y Ciencias Ambientales de la Facultad de Biología de la Universidad de
Barcelona bajo la dirección del Dr. Sergi Munné Bosch.

Doctoranda

Bárbara Simancas San Martín

Director de Tesis

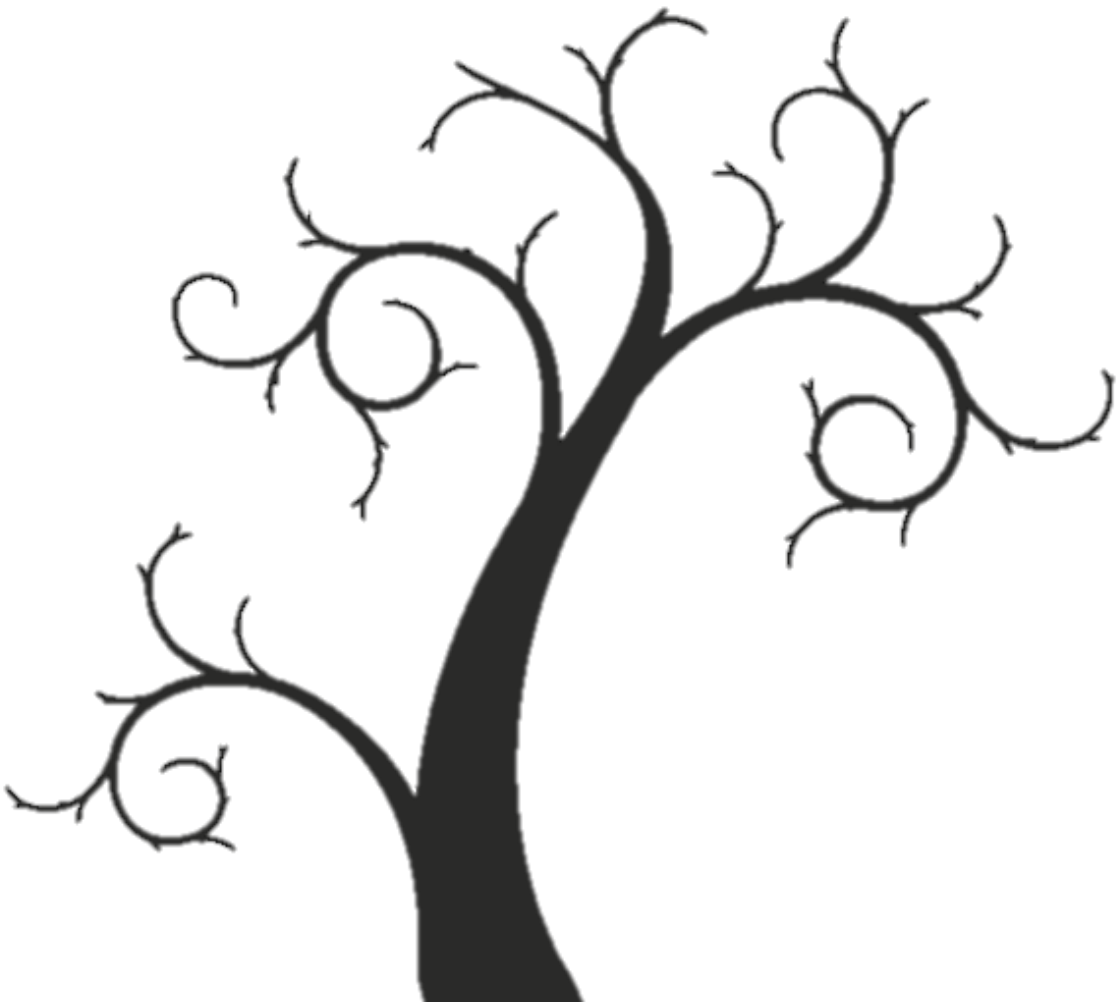
Dr. Sergi Munné Bosch

A mi familia,

lo mejor del mundo OS QUIERO



AGRADECIMIENTOS



Mil gracias a todos los que han hecho esto posible. Mi familia, mi gente, mis amigos, sin ellos nada de esto hubiese sido posible. GRACIAS, os quiero mucho a todos.

Me siento muy afortunada de haber disfrutado de esta gran oportunidad, donde he aprendido muchísimo a nivel formativo pero sobretodo a nivel personal. He conocido a mucha gente increíble en esta etapa de mi vida y sé que siempre nos tendremos ahí para lo que sea. Gracias en primer lugar a Eva Fleta y a Natalia Teribia, me han comprendido siempre muchísimo y sin duda su apoyo ha sido fundamental para terminar la Tesis. Gracias al resto del equipo Munné, TODOS son increíbles y me siento muy muy agradecida por haber formado parte del gran equipo Munné estos años. Son un grupo de gente estupenda de los que siempre aprendes y con los que siempre estaré en deuda. Pero quería agradecerse especialmente a las “borrachinas”, Alba, Erola, Paula y Vero, unas chicas estupendas y con mucho potencial. Nunca podría olvidar los divertidos muestreos de cerezas con Vero y Paula, las charlas interminables a la hora de comer y muy especialmente los muestreos junto a Alba y Erola. Mil gracias chicas! sois unas grandes trabajadoras y sobretodo unas grandes personas, gracias. Creo que después de todo el trabajazo realizado, todos echaremos un poco de menos los días de campo en Montserrat (al menos un porquito jeje). Y por supuestísimo a Sergi, mil gracias por esta oportunidad y por haber confiado en mí pese a ser del Real Madrid XD y no saber mucho de Fisiología Vegetal en un principio. Gracias, has sido un “jefe” estupendo y con el que se aprende muchísimo, gracias por todo y espero que sigamos en contacto siempre ☺. Y por supuesto, gracias al resto del grupo, Maren, Marta, Xavi y a Laura por el año en la chavola, todos fundamentales en esta aventura. Gracias a toda la Unidad de Fisiología Vegetal, gracias a Susan, Omar, Edu (siempre con una sonrisa), Xavier Serrat, Camilo... y gracias a todos los profesores (Lluisa, Carmen Bergareche, Susana Mangas y Sergi) con los que he podido participar en sus clases y de los que he aprendido muchísimo.

Gracias al grupo de Biología animal, son todos estupendos y siempre me han acogido genial pese a estudiar plantitas jeje. Muy especialmente a Marta, mi compi de piso y de aventuras, sé que muy pronto estaremos en Madrid juntitas de nuevo y a Oriol “protozoos”, ambos sois geniales y os quiero mucho, gracias por todo. Gracias también a Helena, compi del Máster de Biología Evolutiva y compañera indispensable en Barcelona, al igual que Lucía, gracias por todo chicas.

Gracias también a Laura Perlaza, mi compi y amiga de Potsdam, al igual que Mariajo y Rafael, gracias por hacerme disfrutar tanto de mi aventura alemana. Y gracias a Rob Salguero, compi de muestreos y jefe en Sheffield, del que he aprendido muchísimo, gracias por todo.

Pero también he de agradecerse mucho a mi gente de Madrid, a mis tunantes, a Adchri, Juanillo, Silvi y Eva, os quiero muchísimo y siempre estaremos juntitos. Gracias al resto de mis chicas del insti (ese barrio del Pilar!) y a mis compis de Facultad, mi gente de la Complu sois todos geniales, pero sobretodo gracias a las babys (Ainho, Olga, Zoe y Marta) y a Juanjo y Castillejo.

Gracias Tino, has sido indispensable y te quiero mucho, soy muy afortunada de haberte encontrado, GRACIAS por todo. Sin duda ambos recordaremos Barcelona siempre. Una parte de la tesis es tuya sin duda por tu paciencia ;)

Y por supuesto gracias a mi familia, mi madre, mi padre y a Olgui y Bei. Les debo todo a mi familia y me siento la persona más afortunada del mundo por tenerles, gracias se queda muy corto, así que mil gracias por todo y os quiero muchísimo. Sin los tupperes y el cariño y cuidado de mi mami, sin los abrazos y la bondad de mi papi y por supuestísimo sin mis hermanas Olgui y Bea, a las que adoro, nada hubiera sido posible. Hermanitas, sois unas personas geniales, no cambiéis nunca, os quiero muchísimo. Y gracias a Fufu por supuesto y al resto de mi familia cántabra y madrileña (tios, primos, abuela...), gracias a todos.



ÍNDICE

ÍNDICE 1

ABREVIATURAS..... 3

INTRODUCCIÓN..... 7

1. La vitamina E y otros antioxidantes 9

2. Los jasmonatos y otras hormonas vegetales..... 21

3. El fósforo..... 28

4. Modelos de estudio..... 35

5. Aproximaciones en estudios de fisiología vegetal 39

OBJETIVOS..... 45

INFORME DEL DIRECTOR DE TESIS 51

RESULTADOS.....	57
Capítulo 1. Interacción entre la vitamina E y el fósforo en el control de la longevidad en <i>Arabidopsis thaliana</i>	61
Capítulo 2. Reprogramación transcripcional de los mecanismos de defensa en mutantes deficientes en Vitamina E de <i>Arabidopsis thaliana</i> L. expuestos a distintas disponibilidades de fósforo	73
Capítulo 3. Diferencias entre machos y hembras en la fotoinhibición, el estrés foto-oxidativo y la fotoprotección en ortigas (<i>Urtica dioica</i> L.) expuestas a sequía y a deficiencia nutricional.....	107
Capítulo 4. La deficiencia de fósforo en la fase de transición incrementa el <i>sex ratio</i> y los niveles del ácido 12-oxo-fitodienoico en hembras de <i>Urtica dioica</i>	119

DISCUSIÓN.....	137
1. La vitamina E influye en el desarrollo de la planta según la disponibilidad de fósforo	139
2. Importancia de los jasmonatos y otras hormonas ante la distinta disponibilidad de fósforo	153
3. Interacción del fósforo y otros nutrientes	162
4. Dimorfismo sexual.....	166
5. Algunas aplicaciones y limitaciones de los estudios.....	169

CONCLUSIONES.....	173
-------------------	-----

REFERENCIAS.....	177
------------------	-----

ABREVIATURAS



ABA	Ácido abscísico
ACC	Ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico
ATP	Adenosín-trifosfato
Ca	Calcio
³Chl*	Clorofila triplete (clorofila excitada)
DPS	Estado de desoxidación del ciclo de las xantofilas
F_v/F_m	Máxima eficiencia del fotosistema II
H₂O₂	Peróxido de hidrogeno
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IAA	Ácido indol-3-acético
JA	Ácido jasmónico
K	Potasio
Mg	Magnesio
Mn	Manganeso
N	Nitrógeno
O₂^{•-}	Radical superóxido
¹O₂	Oxígeno singlete
OH[•]	Radical hidroxilo
OPDA	Ácido 12-oxo-fitodienoico
P	Fósforo
PC-8	Plastocromanol 8
P_i	Fosfato
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RWC	Contenido hídrico relativo
S	Azufre

SA	Ácido salicílico
SOD	Superóxido dismutasa
TF	Factor de transcripción
UHPLC-MS/MS	Cromatografía líquida de ultra alta resolución asociada a espectrometría de masas en tandem
VTE1	Tocoferol ciclasa
VTE4	γ -tocoferol metiltransferasa

INTRODUCCIÓN



1. La vitamina E y otros antioxidantes

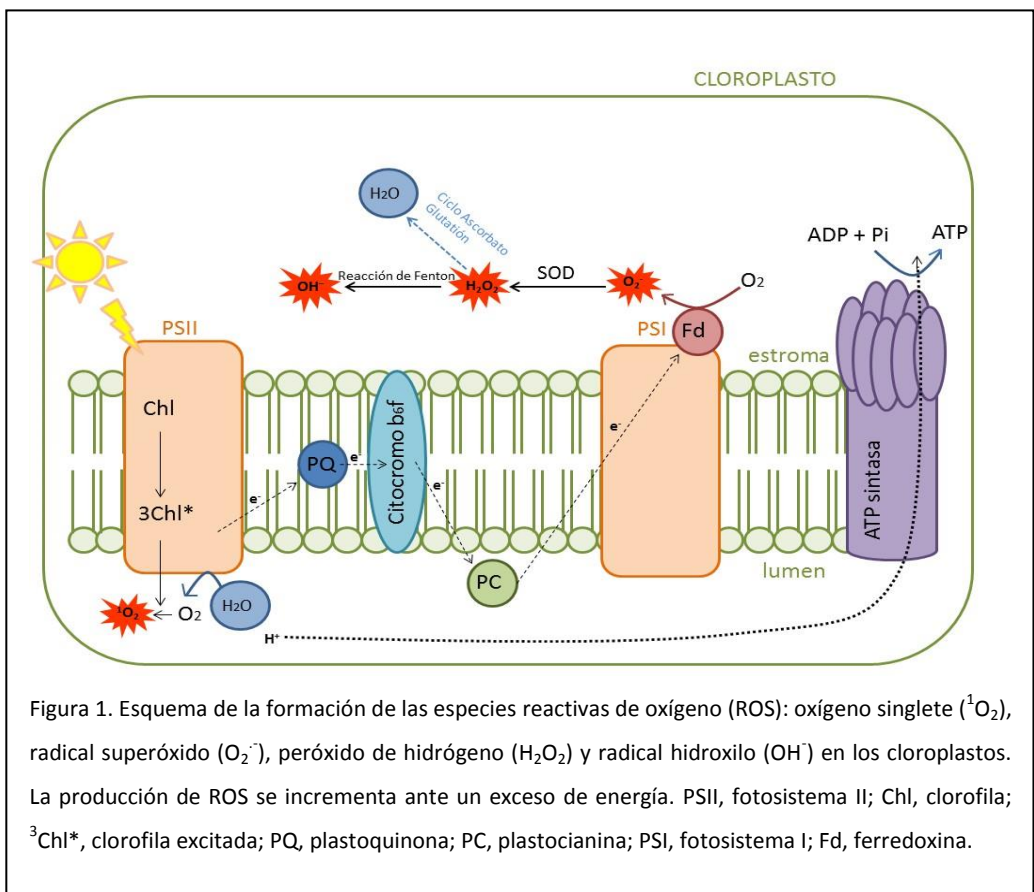
Respuesta de las plantas frente al estrés y papel de los antioxidantes

Un estrés implica una condición desfavorable para la planta, lo que limita su funcionamiento normal. Es importante considerar que una condición desfavorable puede serlo para una especie pero no para otra, aunque sí existen algunos estreses comunes para todas las plantas. Dentro de los diferentes estreses que puede sufrir una planta, el estrés abiótico (que incluye el déficit hídrico y la falta de nutrientes) es la principal causa de pérdidas en las cosechas a nivel mundial, provocando pérdidas de más del 50% en la mayoría de cultivos (Davies y Zhang, 1991).

Un estrés (tanto abiótico como biótico) suele producir el cierre estomático, reduciendo la incorporación de dióxido de carbono (CO_2) y la limitación de la fotosíntesis. Esto produce un exceso de energía a través de la excitación de las clorofilas, que se dirige al centro de reacción de los fotosistemas. Dicho exceso de energía puede ser disipada mediante la emisión de calor a través del ciclo de las xantofilas (*quenching* no fotoquímico) y la fluorescencia de las clorofilas. La energía que no es disipada en el fotosistema II (PSII) puede pasar de las clorofilas excitadas ($^3\text{Chl}^*$) al oxígeno (O_2), produciendo oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$). En el fotosistema I (PSI) pueden formarse radicales superóxido (O_2^-) debido a un exceso de reducción de la ferredoxina. Además, los radicales O_2^- , mediante la enzima superóxido dismutasa (SOD), se transforman en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y éste a su vez en el radical hidroxilo (OH^\cdot) (Asada, 2006) (Figura 1). Todas estas moléculas ($^1\text{O}_2$, O_2^- , H_2O_2 y OH^\cdot) son conocidas como especies reactivas de

oxígeno (ROS) y, aunque pueden tener efectos beneficiosos actuando como señalizadores celulares para regular las repuestas al estrés, también pueden ser muy nocivas para las plantas. Las ROS pueden reaccionar y oxidar un gran número de biomoléculas sobre las que causan daños o alteran sus funciones (Mittler, 2002; Apel y Hirt, 2004).

El principal proceso metabólico que contribuye (cualitativamente) a la generación de ROS es la fotosíntesis, debido en parte a la elevada concentración de oxígeno generada durante la fotólisis del agua (Figura 1).



Diferentes estreses, como la falta de nutrientes entre otros, conducen a un aumento de los niveles de ROS (Foyer y Noctor, 2009; Hernández y Munné-Bosch, 2015), lo que altera no solo el equilibrio químico entre las reacciones de

reducción-oxidación (redox) de los cloroplastos, sino también altera moléculas como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos. De ese modo, la mayoría de estreses conocidos producen estrés oxidativo, debido al desequilibrio entre la producción de ROS (oxidantes) y los niveles de antioxidantes (Apel y Hirt, 2004).

Un antioxidante es aquella molécula capaz de prevenir la oxidación de otras moléculas, estando presente a bajas concentraciones en comparación con los compuestos oxidantes. En condiciones normales, pero especialmente en condiciones de estrés, las ROS son detoxificadas por el conjunto de antioxidantes que produce la planta. Los antioxidantes pueden dividirse en antioxidantes enzimáticos, como la SOD, la ascorbato peroxidasa y la catalasa entre otros, y los no enzimáticos, como el ascorbato (o vitamina C) y el glutatión, ambos hidrofílicos, y por otro lado los carotenoides y los tocoferoles ambos lipofílicos (Gill *et al.*, 2010).

La vitamina C (ascorbato) es uno de los antioxidantes que participa activamente en la fotoprotección al controlar los niveles de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Packer *et al.*, 1979). Forma parte del ciclo del ascorbato-glutatión, el cual es esencial para la eliminación del H_2O_2 en los cloroplastos (Noctor y Foyer, 1998) y además participa en el reciclaje de la vitamina E. El ciclo del ascorbato-glutatión permite transformar los radicales α -tocoferoxil a α -tocoferol (Figura 3) (Niki *et al.*, 1982). En esta reacción se produce monodehidroascorbato (MDHA), el cual a su vez es reciclado a ácido ascórbico por la acción de la dehidroascorbato reductasa y el glutatión (GSH) (Foyer y Halliwell, 1976; Foyer y Noctor, 2005, 2011; Asada, 2006) (Figura 3). Además del ascorbato, los antioxidantes no enzimáticos lipofílicos, como los carotenoides y la vitamina E, también son fundamentales para combatir el exceso 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 (De las Rivas, 2000). Los carotenos suelen estar asociados a los centros de reacción del fotosistema I y II, mientras que las xantofilas se encuentran predominantemente en las antenas (Anderson, 1986; Thornber *et al.*, 1991). Ambos grupos derivan del isopreno y son capaces de absorber la energía de excitación de las $^3\text{Chl}^*$ evitando la formación del $^1\text{O}_2$. 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 se transforma a anteraxantina y posteriormente a zeaxantina en un intento de disipar el exceso de luz y prevenir daños foto-oxidativos (Demmig-Adams y Adams, 1996). Además, aunque no mediante la disipación de calor, la zeaxantina también es capaz de eliminar el $^1\text{O}_2$, función compartida con los tocoferoles (Havaux *et al.*, 2005). La luteína por su parte es capaz de desactivar $^3\text{Chl}^*$ (Jahns y Holzwarth, 2012) y por otro lado, la neoxantina es capaz de proteger el fotosistema II eliminando sobre todo el O_2^- , (Dall'Osto *et al.*, 2007). Además, los carotenoides trabajan de forma coordinada con otros antioxidantes, como ocurre con la vitamina E en la protección del fotosistema II (PSII) del daño foto-oxidativo (Trebst, 2003; Havaux *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2012).

La vitamina E

La vitamina E es el nombre común para referirnos a los tocoferoles y tocotrienoles, moléculas con gran capacidad antioxidante imprescindibles en la dieta de todos los animales, pero sintetizados únicamente por organismos fotosintéticos. Tienen una cadena poliprenil y un anillo cromanol que le otorga su gran capacidad antioxidante al ser capaz de donar sus hidrógenos del grupo hidroxilo a los radicales libres. Éstos, junto al plastocromanol-8 (PC-8) forman parte de los tococromanoles (DellaPenna, 2005).

Los tocoferoles, como los tocotrienoles, están formados por 4 homólogos (α , β , γ y δ) que difieren en el número y posición de los grupos metilo en el anillo. A diferencia de los tocotrienoles donde la cadena está 3 veces insaturada, los tocoferoles tienen la cadena completamente saturada (Figura 2) (Kamal-Eldin y Appelqvist, 1996). Los tococromanoles también actúan como agentes estabilizadores de membranas, debido a la similitud de su estructura química con los fosfolípidos que forman la membrana celular, lo que le permite intercalarse en la membrana para mantener su fluidez y estabilidad (Fryer, 1992; Wang y Quinn 2000; Falk y Munné-Bosch, 2010). El α -tocoferol es la forma predominante en tejidos fotosintéticos, seguido de su precursor inmediato, el γ -tocoferol (Horvath *et al.*, 2006; Munné-Bosch, 2007).

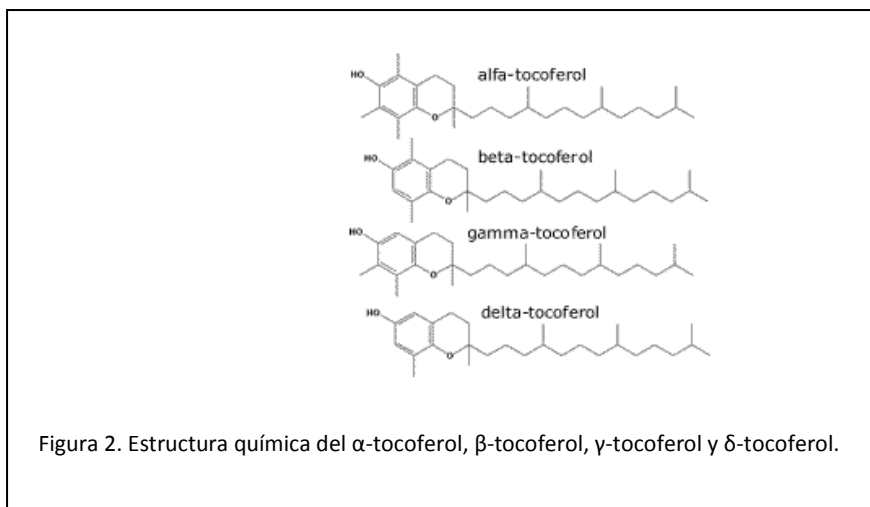


Figura 2. Estructura química del α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol y δ -tocoferol.

Junto a otros antioxidantes, como el glutatión y el ácido ascórbico (Kanwischer *et al.*, 2005) o los carotenoides (Li *et al.*, 2012), el α -tocoferol reduce los niveles de ROS en los cloroplastos, contribuyendo así a mantener un estado redox adecuado y a mantener la estructura y función de las membranas tilacoidales (Munné-Bosch y Alegre, 2002). Un ejemplo de su función antioxidante es la eliminación química del $^1\text{O}_2$, ésta implica la degradación del α -tocoferol a α -tocoferol quinona

(Fahrenhoizt *et al.*, 1974), mientras que la eliminación de los radicales OH^\cdot implica la formación de radicales α -tocoferoxil, que son reciclados nuevamente a α -tocoferol por la acción del ciclo del ascorbato-glutati3n (Munn3-Bosch y Alegre, 2002) (Figura 3).

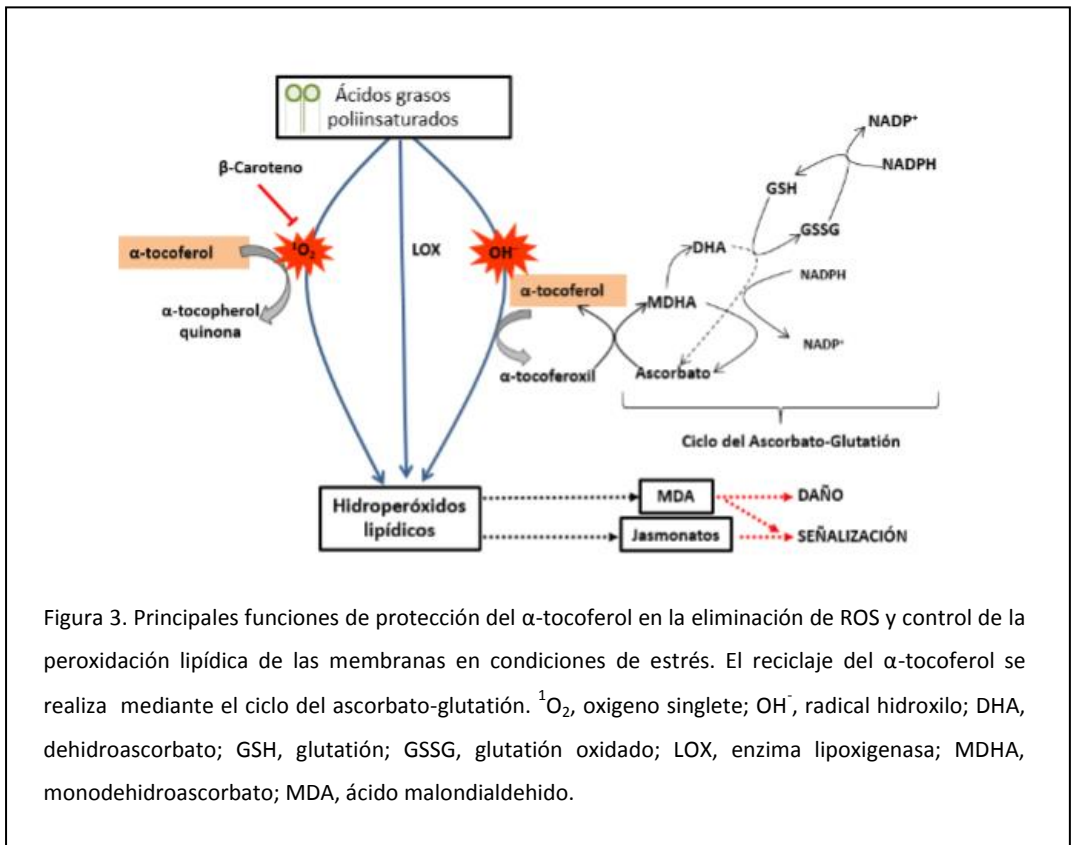


Figura 3. Principales funciones de protección del α -tocoferol en la eliminación de ROS y control de la peroxidación lipídica de las membranas en condiciones de estrés. El reciclaje del α -tocoferol se realiza mediante el ciclo del ascorbato-glutati3n. $^1\text{O}_2$, oxígeno singlete; OH^\cdot , radical hidroxilo; DHA, dehidroascorbato; GSH, glutati3n; GSSG, glutati3n oxidado; LOX, enzima lipoxigenasa; MDHA, monodehidroascorbato; MDA, ácido malondialdehido.

El aumento de ROS puede producir la peroxidación lipídica de las membranas, debido a la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas (PUFA) por acción del $^1\text{O}_2$ (Niyogi, 1999). Esta peroxidación lipídica produce hidroperóxidos lipídicos como producto primario y ácido malondialdehido (MDA) como producto secundario, participando además en la síntesis de algunas hormonas vegetales, como los jasmonatos (Wasternack, 2007). De manera que la

peroxidación lipídica produce tanto daños directos a las moléculas oxidadas, como posibles cambios en la señalización celular al alterar la síntesis de algunas hormonas vegetales (Figura 3). Además, se ha descrito que el MDA, como producto secundario de la peroxidación lipídica de PUFA, también podría participar en la señalización celular (Weber *et al.*, 2004).

De ese modo el α -tocoferol, por su papel antioxidante, reduciría la formación de hidroperóxidos lipídicos, limitando con ello la formación de MDA y daños en otras moléculas. Además, aunque la principal función de los tocoferoles es la antioxidante, también parece que desempeñan muchas otras funciones. En plantas deficientes de tocoferol se han descrito alteraciones en la germinación, floración (Battle *et al.*, 1977), crecimiento, senescencia foliar (Tramontano *et al.*, 1992; Abbasi *et al.*, 2009) y alteración en sus tocromanoles (Kanwischer *et al.*, 2005). Además, plantas mutantes con la ruta de biosíntesis de la vitamina E alterada muestran alteraciones en la estructura de los plasmodesmos que conducen al bloqueo de la exportación de fotoasimilados desde el mesófilo hacia el floema, de modo que la vitamina E también influye en el transporte de fotoasimilados (Russin *et al.*, 1996; Hofius *et al.*, 2004). Por ello, es necesario estudiar más en profundidad cuál sería el papel de los distintos tocoferoles y cómo se regulan en la planta.

Todos los tocoferoles y tocotrienoles provienen de la misma vía de síntesis (Soll *et al.*, 1979) que tiene lugar en los plastos (Sun *et al.*, 2009). El anillo aromático (ácido homogentísico, HGA) proviene de la vía del ácido siquímico y se forma en el citosol (Norris *et al.*, 1998; Herrmann y Weaver, 1999; Collakova y DellaPenna, 2001), mientras que la cola hidrofóbica deriva de la vía del metileritritol-4-fosfato (MEP) y se produce en el interior de los plastos (Lichtenthaler, 1999; Rohmer, 2003).

La primera reacción de la ruta de biosíntesis de los tococromanos es la condensación del HGA con la cola hidrofóbica mediante la enzima homogentisato fitiltransferasa o HPT (siendo el *VTE2* el gen codificante correspondiente) para dar lugar a 2-metil-6-fitilbenzoquinol (MPBQ). A continuación, tienen lugar 2 metilaciones y una ciclación del grupo cromanol (Porfirova *et al.*, 2002). LA MPBQ metiltransferasa (*VTE3* como gen codificante correspondiente) añade un grupo metilo al MPBQ obteniendo el 2,3-dimetil-6-fitilbenzoquinol (DMPBQ), seguida de la ciclación del anillo para dar el γ -tocoferol mediante la tocoferol ciclasa (*VTE1* como gen codificante de la enzima) (Porfirvova *et al.*, 2002; Sattler *et al.*, 2003; Vidi *et al.*, 2006). En el último paso, se añade un grupo metilo al anillo cromanol obteniendo el α -tocoferol, mediante la enzima γ -tocoferol metiltransferasa (siendo el *VTE4* su gen codificante). En caso que la MPBQ metiltransferasa no añadiera el primer grupo metilo, de la tocoferol ciclasa se obtendría el δ -tocoferol y a continuación el β -tocoferol (Shintani y DellaPenna, 1998; DellaPenna, 2005), ver Figura 4.

En la planta modelo *Arabidopsis thaliana* las diferentes enzimas implicadas en la biosíntesis de los tocoferoles han sido identificadas y localizadas en el genoma nuclear (Tabla 1). Ello ha permitido el estudio con mutantes en los que la ruta biosintética de la vitamina E se encuentra bloqueada a diferentes niveles.

Tabla 1. Las enzimas más importantes en la regulación de la biosíntesis de los tocoferoles para *A. thaliana*.

Enzima	Locus codificante	referencia
HPT Homogentisato fitiltransferasa	locus VTE2 (AT2G18950)	Collakova y DellaPenna., 2001 Sadre <i>et al.</i> , 2006
MPBQ metiltransferasa	locus VTE3 (AT3G63410)	Cheng <i>et al.</i> , 2003
Tocoferol ciclasa	locus VTE1 (AT4G32770)	Porfirova <i>et al.</i> , 2002
γ -tocoferol metiltransferasa	locus VTE4 (AT1G64970)	Koch <i>et al.</i> , 2003

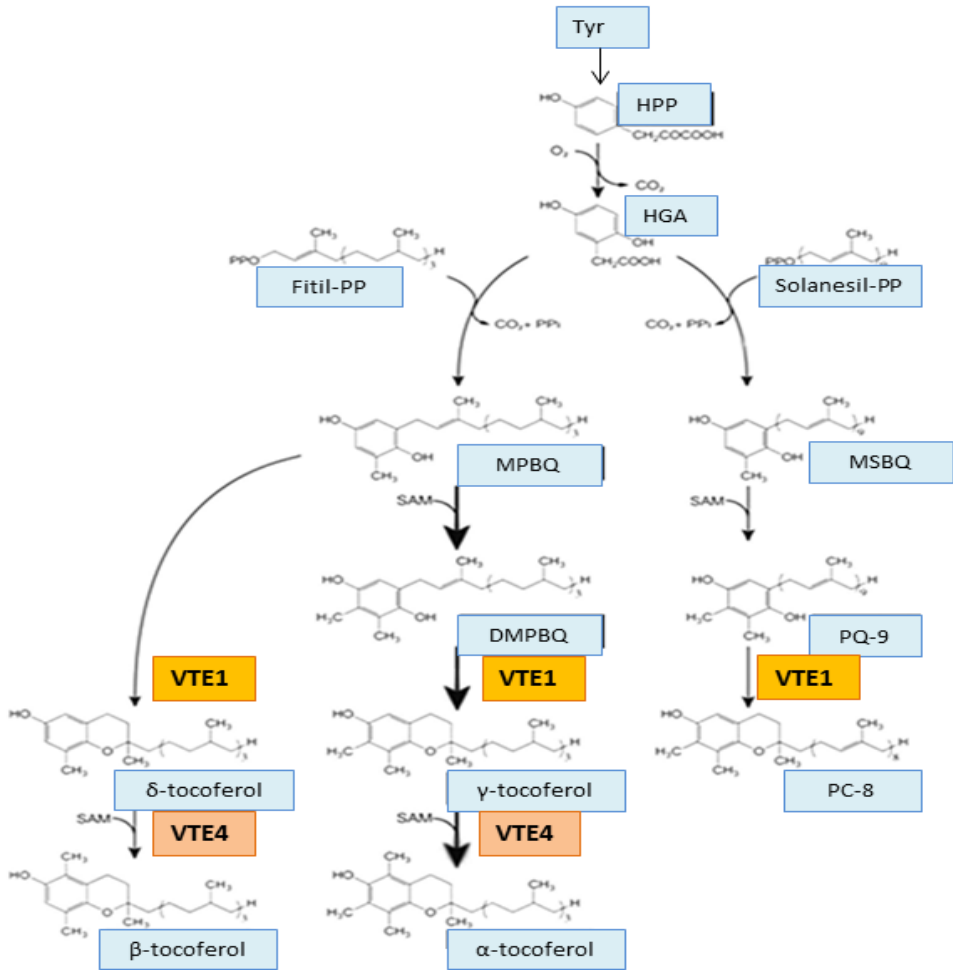


Figura 4. Representación esquemática de la ruta de biosíntesis de los tocoferoles en plantas. Aparecen en azul el nombre de los diferentes compuestos que participan en la síntesis de la vitamina E. A partir de la tirosina se produce el ácido homogentísico (HGA). El HGA mediante la enzima homogentisato fitiltransferasa o HPT se transforma en 2-metil-6-fitilbenzoquinol (MPBQ). La MPBQ metiltransferasa añade un grupo metilo al MPBQ obteniendo el 2,3-dimetil-5-fitilbenzoquinol (DMPBQ). Posteriormente se produce el γ -tocoferol mediante la enzima tocoferol ciclasa (VTE1), y por último se forma el α -tocoferol, mediante la enzima γ -tocoferol metiltransferasa (VTE4). Una planta con la ruta de síntesis bloqueada a nivel de la enzima VTE1 (mutante *vte1*) no presentará ningún tocoferol (ni β - o δ -tocoferol, ni las formas predominantes en hojas ni γ - o α -tocoferol, ni PC-8). Por otro lado, si la planta tiene la ruta de síntesis bloqueada a nivel de la enzima VTE4 (mutante *vte4*) no presenta α -tocoferol pero sí γ -tocoferol y PC-8 en sus hojas.

En la presente Tesis se han estudiado los mutantes *vte1* y *vte4*, estos mutantes presentan una inserción de T-DNA en los genes que codifican para las enzimas VTE1 Y VTE4 respectivamente. De manera que el mutante *vte1*, al tener bloqueada la síntesis de vitamina E al nivel de la enzima tocoferol ciclasa, no presenta ningún tocoferol (ni γ - ni α -tocoferol). Sin embargo, el mutante *vte4*, al tener bloqueada la ruta de síntesis de la vitamina E a nivel de la γ -tocoferol metiltransferasa no presenta α -tocoferol pero sí γ -tocoferol (Figura 4). Por ello en nuestros estudios hemos comparado los mutantes *vte1* y *vte4*, junto con el genotipo silvestre (Col-0), para observar la respuesta de plantas sin α - o γ -tocoferol y plantas con sólo γ -tocoferol o α -tocoferol frente al estrés.

Aunque el α -tocoferol es la forma predominante en hojas, el γ -tocoferol también se encuentra en concentraciones detectables y generalmente se asocia su acumulación a su papel como precursor inmediato del α -tocoferol. Pero estudios recientes sugieren que el papel del γ -tocoferol podría equipararse al del α -tocoferol, ya que mutantes *vte4* presentan un fenotipo similar al genotipo silvestre (Col-0, con α -tocoferol fundamentalmente en sus hojas) en condiciones de estrés oxidativo ante alta radiación, altas temperaturas o tratamiento de frío (Bergmüller *et al.*, 2003). Otros trabajos realizados también sugieren que el γ -tocoferol podría tener funciones independientes al α -tocoferol (Battle *et al.*, 1977; Bergmüller *et al.*, 2003; Szymanska y Kruk, 2008; Cela *et al.*, 2011). Además, 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) y en plantas de cebada podría estar implicado con la elongación de la raíz (Desel y Krupinska, 2005). Todos estos estudios contribuyen a la idea de que el γ -tocoferol tendría funciones específicas y no sólo actuaría como precursor en la ruta de síntesis del α -tocoferol.

El α -tocoferol no solo es abundante en las hojas, sino también en las semillas, ya que favorece la germinación y el desarrollo inicial de la plántula. Por ello, los

mutantes *vte2* de *A. thaliana*, que carecen de tocoferoles, tienen una reducción de la germinación en comparación con las plantas silvestres (Sattler *et al.*, 2004). Este fenotipo se debe a que los mutantes *vte2* de *A. thaliana* (en concreto los mutantes *vte2-1* y *vte2-2*, carentes de los intermediarios MPBQ y DMPBQ) son incapaces de metabolizar correctamente los lípidos almacenados. Por ello el mutante *vte2* sufre un fuerte aumento de los productos de la peroxidación lipídica, como el MDA y los peróxidos lipídicos entre otros (Sattler *et al.*, 2006).

Además, al analizar el perfil de expresión génica durante la germinación, 160 genes estaban sobre-expresados en el mutante *vte2* y en cambio, en el mutante *vte1* (que sí presenta DMPBQ) únicamente 12 genes sobre-expresados en las mismas condiciones y sin mostrar dificultades en su germinación (Sattler *et al.*, 2006). De manera que los tocoferoles e incluso algunos de sus precursores, como el DMPBQ o incluso el PC-8 (Mène-Saffrané *et al.*, 2010) parecen ejercer un papel importante en la germinación de las semillas.

Por otro lado, existen evidencias de que los tocoferoles participan en la señalización celular, pese a que los mecanismos no se conocen con exactitud. La señalización celular es la comunicación que existe mediante moléculas (señales) que se produce entre células u orgánulos para generar mediante la recepción de la señal una respuesta diferencial. Debido a que el aparato fotosintético de los cloroplastos está codificado por genes que se encuentran en el núcleo celular y en el propio cloroplasto (Sugiura, 1992), su expresión debe estar altamente coordinada y regulada mediante señalización celular. En el núcleo se encuentran las secuencias codificantes de numerosas proteínas que actúan dentro del cloroplasto, de forma que existe un amplio sistema de comunicación entre núcleo y cloroplasto (Koussevitzky *et al.*, 2007).

Se conoce como señalización anterógrada, cuando la regulación se lleva a cabo del núcleo al orgánulo celular (cloroplasto en este caso), y señalización retrógrada cuando la señalización se produce del cloroplasto al núcleo (Pfannschmidt, 2003).

Existen evidencias de que los antioxidantes de bajo peso molecular, como el glutatión, el ascorbato, los carotenoides y los tocoferoles, pueden afectar la expresión génica asociada al estrés abiótico (Foyer y Noctor, 2005). Además, la vitamina E al frenar la formación de MDA, también participa de forma indirecta en la señalización inducida por los productos de la peroxidación lipídica. Debido a que se ha demostrado que el MDA es capaz de inducir la expresión de genes asociados al estrés oxidativo cuando es aplicado de forma exógena sobre la planta (Chow, 1991). Además, los cambios del estado redox durante la fotosíntesis podrían actuar como señal para regular la expresión génica en el núcleo y los plastos (Pfannschmidt, 2003). De la misma manera que la cantidad de ROS que se generan bajo condiciones de estrés oxidativo (controlado muchas veces por los niveles de vitamina E), también puede contribuir a la señalización celular (Ryter y Tyrrell, 1998; Gamaley y Klyubin, 1999; Desikan *et al.*, 2000).

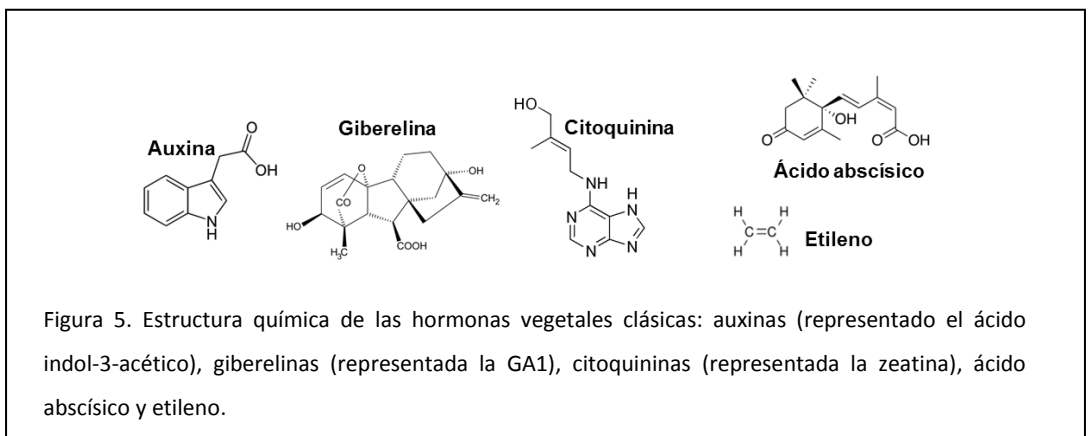
Es importante remarcar que el estudio de la regulación de la síntesis de los tocoferoles y su participación en señalización celular es compleja y requiere nuevas aproximaciones y estudios. Un avance muy novedoso son los estudios realizados con el mutante *vte1* de *A. thaliana*, que nos permite conocer cómo responde, incluso a nivel de señalización celular, una planta sin tocoferoles. Estudios previos mostraron que el mutante *vte1*, además de presentar una reducción del crecimiento y un aumento de los niveles de antocianinas, tenía mayores niveles de ácido jasmónico, sugiriendo un papel directo del tocoferol en la regulación hormonal de la planta y de esa manera también en la señalización celular (Munné-Bosch *et al.*, 2007). Debido a que se ha demostrado que algunas hormonas, además de ser fundamentales para muchos aspectos del desarrollo y

crecimiento de la planta, juegan un papel importante en la señalización celular (Sandorf y Holländer-Czytco, 2002; Munné-Bosch *et al.*, 2009).

2. Los jasmonatos y otras hormonas vegetales

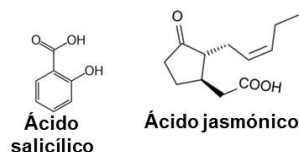
Las hormonas son moléculas orgánicas que aunque se encuentran en pequeñas cantidades, pueden influir enormemente en la fisiología de plantas y animales. Las hormonas vegetales se producen en cualquier parte de la planta y se transportan por toda ella, actuando como mensajeros químicos en el control de procesos relacionados con el crecimiento y el desarrollo. Las hormonas juegan un papel principal en la mayoría de procesos fisiológicos que ocurren en la planta y por supuesto en sus mecanismos de respuesta a un estrés. Por ello, el estudio y la determinación de sus concentraciones endógenas en plantas son fundamentales para conocer más sobre su papel en la respuesta de las plantas al estrés.

Las hormonas vegetales clásicamente se han dividido en auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico y etileno (Figura 5).



Pero en los últimos años han adquirido una especial relevancia otros reguladores hormonales (como el ácido salicílico (SA) o el ácido jasmónico (JA)) que también ejercen efectos importantes en el desarrollo y crecimiento de las plantas (Figura 6) (Gaspar *et al.*, 2003; Mahajan y Tuteja, 2005).

Figura 6. Estructura química del ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA), no incluidas dentro de la clasificación tradicional de hormonas vegetales.



Las auxinas (siendo el ácido indolacético o IAA la más abundante) promueven el crecimiento en longitud de la planta y la diferenciación celular. Además, en respuesta al déficit de fósforo, regulan la arquitectura de las raíces junto a otras hormonas (Franco-Zorilla *et al.*, 2004; Rouached *et al.*, 2010).

Las giberelinas (GA) son, al igual que las auxinas, estimuladoras del crecimiento y participan también en cambios en la arquitectura de las raíces ante la falta de fósforo (Jiang *et al.*, 2007).

Las citoquininas influyen en el control de la división y diferenciación celular, contrarrestando la dominancia apical, y retrasando el envejecimiento de las hojas. Se ha descrito que las citoquininas actúan como reguladores negativos en la respuesta a déficit de fósforo, reduciendo su contenido (Yang y Finnegan, 2010) e interactuando también en señalización celular (Franco-Zorilla *et al.*, 2005).

El ácido abscísico (ABA) está implicado en procesos de maduración de frutos, inhibición del crecimiento y cierre estomático. Frente al estrés, y muy especialmente frente al déficit hídrico, los niveles de ABA se incrementan tanto en hojas como en raíz, con el objetivo de reducir la transpiración y de inducir la

síntesis de proteínas para evitar la pérdida de agua (Tardieu y Davies, 1992). Ante la falta de fósforo mutantes deficientes en ABA presentaron una respuesta diferencial en señalización celular y acumulación de antocianinas (Trull *et al.*, 1997; Ciereszcoa y Kleczkowsk, 2002), de forma que el ABA también parece actuar en la respuesta a la falta de P_i .

Por otro lado, el etileno actúa frente a todo tipo de estreses en las plantas, como la maduración de los frutos, senescencia de hojas, flores y la abscisión del fruto. Además se ha descrito que el etileno también regula la arquitectura de la raíz en respuesta a la disponibilidad de P_i (Franco-Zorilla *et al.*, 2004 y Rouached *et al.*, 2010).

Además de las denominadas hormonas vegetales clásicas, como ya hemos comentado anteriormente, existen otras hormonas con un papel importante, el ácido salicílico (SA) y el ácido jasmónico (JA), ver Figura 6. El SA juega un papel de vital importancia frente al estrés biótico pero también 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; Abreu y Munné-Bosch, 2009).

El ácido jasmónico (JA) juega un papel clave en señalización celular 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 herbívoros como a parásitos (Creelman y Mullet, 1997; Avanci *et al.*, 2010).

Pero a parte del SA y el JA otras moléculas han sido recientemente descritas como hormonas vegetales entre las que destacan los brasinoesteroides, las estrigolactonas o la melatonina entre otras (Balzer y Hardeland, 1996; Rao *et al.*, 2002; Seto *et al.*, 2012).

Los jasmonatos

Los jasmonatos (JAs) son hormonas vegetales lipídicas derivadas de los ácidos grasos linoleico y linolénico principalmente (por ello forman parte de las oxilipinas). Actúan como moléculas señalizadoras de la respuesta de las plantas a numerosas situaciones de estrés y participan en diversos procesos del desarrollo. Regulan la respuesta a heridas (mecánicas o bióticas), a la exposición al ozono, a la sequía y al ataque de patógenos y plagas (Avanci *et al.*, 2010). Sin embargo, poco se sabe sobre su papel ante deficiencias nutricionales.

Los JAs conforman un grupo de numerosos compuestos precursores o derivados del ácido jasmónico (JA). Entre ellos cabe mencionar: el jasmonato de metilo (JA-Me), derivados hidroxilados 11-hidroxi-JA (11-OH-JA) y 12-hidroxi-JA (12-OH-JA), JA conjugados con aminoácidos (JA-AA) tales como valina, leucina, tirosina e isoleucina (JA-Ile), JA conjugados con amidas como dopa, dopamina y tiramina y JA conjugados con glucosa (JA-Glu) (Wasternack y Hause, 2002; Gidda *et al.*, 2003; Kramell *et al.*, 2005; Schaller *et al.*, 2005). Todos estos compuestos constituyen el grupo de octadecanoicos por ser derivados del ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA). Actualmente se desconoce si el OPDA presenta un papel por sí solo ante las respuestas a estreses, o actúa solo como precursor del JA. Aunque hay algunos estudios que describen en ocasiones al OPDA como participante independiente del JA en la regulación de la respuesta frente ataques bióticos (Stinzi *et al.*, 2001; Landgraf *et al.*, 2002; Danon *et al.*, 2005; Taki *et al.*, 2005). Además, se ha confirmado que su forma metilada (OPDA-Me) presenta actividad ante diversos procesos fisiológicos y respuestas de defensa contra herbívoros (Stelmach *et al.*, 2001; Stintzi *et al.*, 2002), siendo incluso más activo que el JA-Me en inducir enrollamiento de zarcillos (Stelmach *et al.*, 1998). Sin embargo poco sabemos actualmente sobre el OPDA-Me, detectado en hojas de cebada (Kramell *et al.*, 2000) y en raíces transformadas de tomate (Abdala *et al.*, 2003).

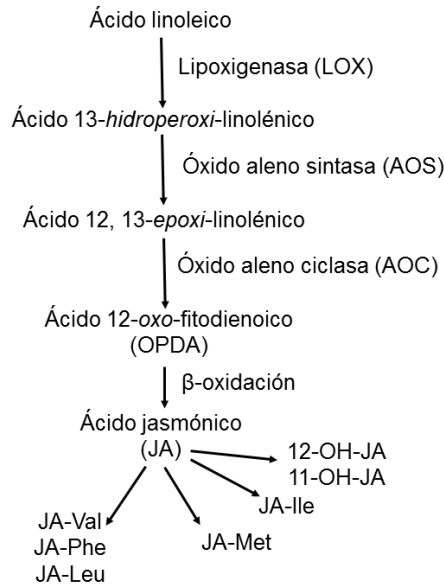


Figura 7. Biosíntesis del ácido jasmónico (JA) y algunos de sus derivados, incluyendo el jasmonato isoleucina (JA-Ile), jasmonato metionina (JA-Met), jasmonato valina (JA-Val), jasmonato fenilalanina (JA-Phe) o jasmonato leucina (JA-Leu).

El estudio de los JA-AAs es muy importante, ya que los aminoácidos no sólo forman parte de las proteínas, sino que muchos de ellos actúan como precursores de una gran cantidad de metabolitos con múltiples funciones en el desarrollo y respuesta al estrés de las plantas. Por ejemplo, la vitamina E deriva de la tirosina y muchos aminoácidos aromáticos son los precursores de muchas hormonas vegetales, es el caso de la metionina, precursor del etileno y las poliaminas por ejemplo (Radwanski y Last, 1995; Staswick y Tiryaki, 2004). El catabolismo de la isoleucina (Ile) permite la producción de energía celular (Mooney *et al.*, 2002) y su conjugado con los JAs (JA-Ile) esta descrita como la forma activa para *Arabidopsis* (Staswick y Tiryaki, 2004). Existen algunos trabajos sobre la función de los JA-AAs en *Arabidopsis* (Staswick y Tiryaki, 2004; Staswick y Tiryaki, 2004), y parece que

podrían proporcionar estabilidad y alterar parcialmente las funciones de la hormona, aunque son estudios preliminares y se desconoce su papel en otros modelos de plantas.

El contenido endógeno de JAs y octadecanoicos varía entre las diferentes especies de plantas, pero también dependiendo del tejido y tipo celular, del estadio de desarrollo de la planta, y en respuesta a los diferentes estímulos del medio ambiente (Creelman y Mullet, 1997). Diferentes señales podrían inducir la síntesis de JA a partir del ácido linolénico presente en las membranas celulares, especialmente en las las membranas cloroplásticas (Figura 7), y regular de este modo diversos procesos fisiológicos. Entre las señales que podrían inducir su síntesis se incluyen señales del desarrollo de la planta (debido a que el JA participa en muchos procesos de desarrollo) y señales externas o internas que indiquen estrés abiótico o biótico. Se ha sugerido también que los niveles de JA están regulados por α -tocoferol (Munné-Bosch *et al.*, 2007). El hecho que el α -tocoferol controle los niveles de ROS en el cloroplasto, el grado de peroxidación lipídica y por lo tanto los niveles de hidroperóxidos hace que también pudiera regular los niveles de JA en hojas de forma indirecta. Debido a que los hidroperóxidos lipídicos, provenientes de la peroxidación lipídica se pueden convertir en diversos productos, uno de ellos el JA a través de la acción de diversas enzimas (Schaller, 2001). Pero no solo los tocoferoles pueden regular la síntesis de JAs. El JA también es capaz de regular los niveles de tocoferol. La enzima tirosina aminotransferasa (TAT) participa en la transaminación de la tirosina a p-hidroxifenilpiruvato y es una de las primeras enzimas de la vía de síntesis de los tocoferoles que podría ser inducida por el JA-Me (Sandorf y Holländer-Czytko, 2002).

Numerosas respuestas de las plantas al estrés conducen al aumento en los niveles de JAs y de su precursor OPDA, seguido por cambios en la expresión de genes. Por ejemplo, los niveles de JAs regulan la expresión de muchos genes que

codifican para enzimas de su propia biosíntesis (Heitz *et al.*, 1997; Laudert y Weiler, 1998; Mussig *et al.*, 2000; Ishiguro *et al.*, 2001; Seo *et al.*, 2001), indicando de este modo un control positivo de su biosíntesis.

Los JAs se encuentran normalmente en bajas concentraciones (rango picomolar por gramo de peso fresco en tejido de hojas), pero pueden aumentar rápidamente bajo estímulos externos. Algunos órganos y tejidos presentan hasta 10 veces por encima del nivel encontrado en hojas, sugiriendo por tanto que los JAs presentan funciones diferentes en la regulación de determinados procesos de desarrollo y estructuras (Wasternack y Hause, 2002).

Las hormonas vegetales producen en muchas ocasiones ROS como segundos mensajeros en las cascadas de señalización, de forma que estas ROS también podrían producir cambios en las concentraciones hormonales (Bartoli *et al.*, 2013). Además, la producción de ROS en plantas se ve incrementada en casos de estrés, lo que altera el equilibrio redox y produce graves daños en muchas moléculas. Por ello, la planta cuenta a su vez con una amplia red de antioxidantes, como ya hemos comentado anteriormente, que controlan estos niveles y amortiguan el estado redox.

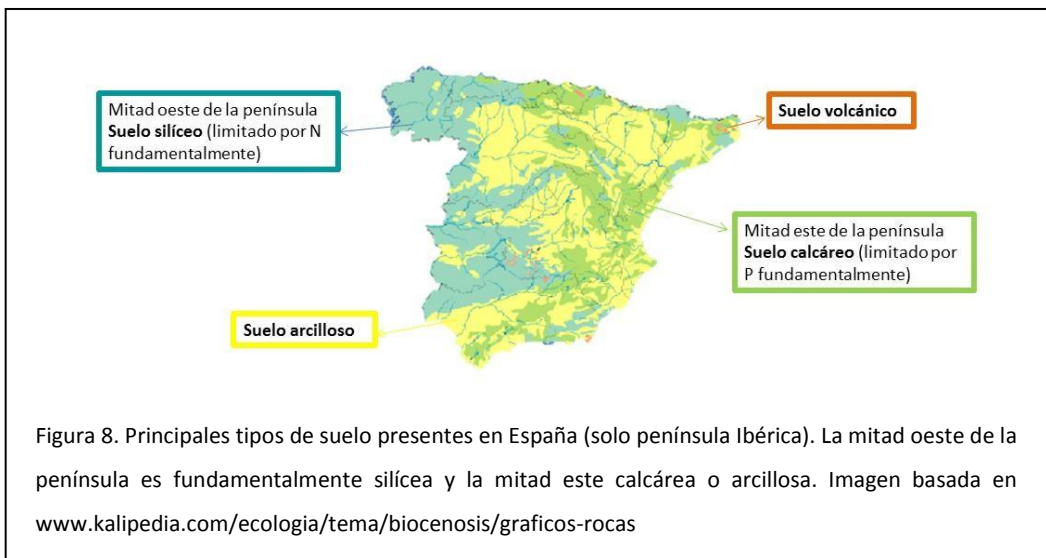
Entre los distintos antioxidantes que produce una planta destaca la vitamina E, como se detalla anteriormente, que además puede regular los niveles hormonales de los JAs tanto a través de su papel en la señalización celular como controlando los niveles de hidroperóxidos lipídicos (necesarios para la síntesis de JAs) por su acción antioxidante. De forma que existe una compleja red de relaciones e interacciones entre hormonas y antioxidantes vegetales que puede observarse de manera muy evidente en la relación entre JAs y la vitamina E en la respuesta al estrés (Schaller, 2001). Sin embargo poco se sabe cuál es su relación y papel en la respuesta a la diferente disponibilidad de fósforo, un elemento nutricional esencial para las plantas y cada vez más escaso en suelos naturales.

3. El fósforo

Las plantas necesitan una serie de elementos inorgánicos que, si no se encuentran en bastante cantidad en el suelo, limitan su crecimiento y desarrollo. El fósforo (P), nitrógeno (N) y potasio (K) junto al calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S) son los principales macronutrientes necesarios en plantas (Marschner, 2012). Sin embargo, estos nutrientes esenciales para las plantas suelen estar limitados en suelos naturales, reduciendo de esta manera el crecimiento y desarrollo. El fósforo inorgánico (P_i) es el macroelemento menos móvil en el suelo y su baja disponibilidad se debe fundamentalmente a su limitada solubilidad.

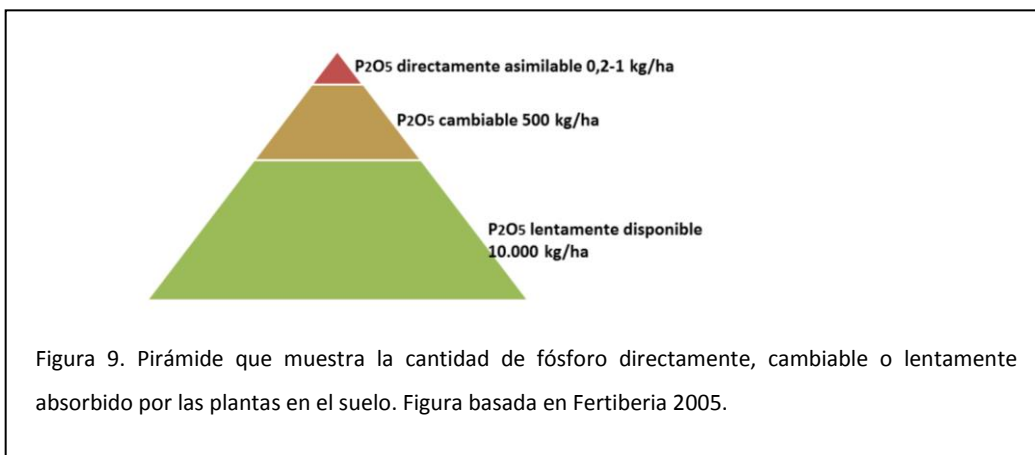
El fósforo es absorbido por las plantas como ión fosfato monovalente ($H_2PO_4^-$) o como ión fosfato divalente (HPO_4^{2-}) (Ullrich-Ebrius *et al.*, 1984; Furihata *et al.*, 1992; Schachtman *et al.*, 1998) dependiendo el pH del suelo. La forma monovalente predomina a pH ácidos (suelos silíceos, por ejemplo), mientras que la divalente se absorbe a pH básicos (calcáreos, entre otros). El P_i es fácilmente inmovilizado en el suelo formando complejos insolubles o precipitados junto con iones de aluminio o de hierro en suelos ácidos o con el Mg o el Ca en básicos (Manning, 2008).

El tipo de suelo (silíceo o calcáreo) también influye enormemente en la cantidad de P_i disponible para la planta. La Figura 8 muestra los principales tipos de suelo presentes en España (solo península Ibérica). La mitad oeste de la península es fundamentalmente silíceo y está limitada por nitrógeno principalmente. Sin embargo la mitad este (donde se encuentra Cataluña) es calcárea o arcillosa, cuyo limitante principal es el fósforo debido al alto pH.



Desde el punto de vista agronómico el fósforo puede estar presente en el suelo en tres formas asimilables (Figura 9):

1. Fósforo en la solución del suelo (directamente asimilable) 0.2-1 kg/ha.
2. Fijado en el complejo arcillo-húmico (cambiable o lábil) 500 kg/ha.
3. Componente de la materia orgánica, precipitado o adsorbido en los geles de hierro y aluminio, en suelos ácidos, y precipitado como fosfato cálcico o magnésico en suelos básicos (muy lentamente asimilable) 10.000 kg/ha.
4. Formando parte de la roca madre (no asimilable).



De ese modo, desde el punto de vista agronómico, el fósforo directamente asimilable representaría menos del 1% del fósforo disponible en el suelo, debido fundamentalmente a su baja solubilidad y a la facilidad de formar precipitados. Por ello el fósforo es uno de los limitantes más importantes para el crecimiento y desarrollo de las plantas en los suelos naturales (Manning, 2008; Marschner, 2012). Además, las características físicas y químicas del suelo determinan la capacidad y ritmo al que el suelo es capaz de reponer el fósforo que las plantas adquieren. En este proceso influyen fundamentalmente, la textura, el pH, la caliza activa y la materia orgánica. Por ejemplo, si el pH es muy básico se debe aportar mayor cantidad de fósforo como fertilizante, como también ocurre cuanto más arcillosa sea la estructura del suelo. En la agricultura, la fertilización pretende minimizar estas limitaciones para conseguir el máximo crecimiento de las plantas. Sin embargo, de nuevo por las características físico-químicas de los fosfatos, solo un 20% del P_i añadido por los fertilizantes suele ser absorbido por las plantas (Mishima *et al.*, 2003) lo que produce un uso excesivo de estos fertilizantes, y sus consiguientes problemas de contaminación ambiental y eutrofización (Schindler, 1977; Bennet *et al.*, 2001).

Debido a que la movilidad del fósforo en el suelo es muy limitada, las raíces pueden absorber el fósforo solamente de su entorno inmediato. Además, debido a que la cantidad de P_i en la solución del suelo es baja, la mayor parte de la absorción del P_i es activa ya que va en contra del gradiente de concentración, es decir, la concentración del fósforo es mayor en las raíces que en la solución del suelo (Raghothama, 1999; Cavagnaro *et al.*, 2001). Dicho proceso consume energía, así que las condiciones que limitan la actividad de las raíces, como las bajas temperaturas o el exceso o falta de agua, inhiben en muchos casos la absorción del fósforo. La incorporación del P_i al simplasto de las raíces se realiza mediante la acción de diferentes transportadores de P_i , entre los que destaca los cotransportadores PHT1 (Ulrich-Eberius *et al.*, 1981; Sakano, 1990).

Mucha de la absorción del P_i se realiza mediante la biosíntesis de adenosín-trifosfato (ATP), a partir de la adenosín-difosfato (ADP) y P_i , se transfiere el P_i a otros nucleótidos y moléculas fosforiladas, de forma que el transporte de P_i esta acoplado al de protones (H^+) mediante la acción de las ATPasas (Figura 1). Al formar parte del ADP y ATP, el fósforo es esencial en procesos de almacenamiento y transferencia de energía, pero también forma parte del NADP en el proceso fotosintético, esta implicado en el transporte de electrones en reacciones de oxidación-reducción y forma parte de los fosfolípidos de membranas (entre otras moléculas).

Además, el P_i y los nucleótidos fosfatados participan como substrato o producto en numerosas reacciones enzimáticas y la fosforilación también juega un papel muy importante en el control de la señalización y transducción de genes. También es capaz de regular la formación y translocación de los carbohidratos y almidón, y está involucrado en la fijación de N_2 . Por ello, la disponibilidad de P_i afecta a muchos aspectos del metabolismo de las plantas, incluyendo la fotosíntesis, la asimilación de carbono, la glicólisis y la respiración (Plaxton y Carswell, 1999; Poirier y Bucher, 2002).

El fósforo es capaz de estimular también el desarrollo de las raíces, flores y semillas, aumenta la firmeza de los tallos y sincroniza y adelanta la madurez de la cosecha, mejorando la resistencia de las plantas a enfermedades (Webster, 2015). De esta manera el fósforo es un elemento vital para el desarrollo de la planta, de forma que en periodos de crecimiento el porcentaje de cantidad total de fósforo asimilado es mayor al de N o K.

Pese a ser un elemento poco móvil en el suelo, el fósforo es un elemento altamente móvil en las plantas. Por ello cuando hay deficiencias, el fósforo puede ser translocado desde la parte madura de la planta a zonas jóvenes o zonas en crecimiento. Así, en una planta madura, el fósforo es transportado a zonas

reproductivas para la formación de semillas y frutos, observándose su deficiencia primero en hojas viejas.

Los estudios clásicos sobre la respuesta de las plantas a la falta de P_i se han basado principalmente en el estudio de raíces, y sobre cómo las plantas modifican la disponibilidad de fósforo en el sustrato mediante la secreción de distintos compuestos. Las plantas son capaces de modificar su estructura radicular y favorecen el desarrollo de micorrizas para optimizar el transporte del P_i al interior de las raíces (Ha y Tran, 2014). Uno de los síntomas más característicos ante la falta de P_i es la disminución de la relación tallo/raíz (Lynch, 1995), debido al incremento de las raíces laterales y micorrizas para favorecer la superficie de absorción de nutrientes (Williamson *et al.*, 2001; Niu *et al.*, 2013). Se incrementa el número y longitud de las raíces laterales (Bates y Lynch, 2001; Lopez-Bucio *et al.*, 2002) y algunas plantas producen también un conjunto de raíces llamadas “raíces proteoides” en respuesta a las limitaciones de P_i . Este tipo de raíces liberan ácidos orgánicos para acidificar el medio y producir iones de metales alrededor de las raíces favoreciendo así la movilización de fósforo y otros nutrientes (Marschner, 2012). Otras plantas secretan nucleasas extracelulares y fosfatasas para favorecer la disponibilidad del P_i en el suelo (Poirier y Bucher, 2002) o liberan protones y ácidos orgánicos para facilitar la liberación del P_i de los complejos con aluminio o hierro (Hinsinger *et al.*, 2003). Existe una gran cantidad de adaptaciones para mejorar la absorción del P_i , pero es muy variable entre especies, estatus nutricional de la planta y condiciones del suelo (Hinsinger, 2001).

Los síntomas de la deficiencia del fósforo incluyen retrasos en el crecimiento de la planta, coloración púrpura oscura de las hojas más viejas y una disminución de la longitud de las raíces primarias y de su florecimiento. En la mayoría de las plantas estos síntomas aparecen cuando la concentración del fósforo en las hojas es inferior al 0,2% de su peso seco. El requerimiento de fósforo para un

crecimiento óptimo de la planta está en el rango de 0,3 a 0,5% del peso seco durante la etapa vegetativa de crecimiento (Marschner, 2012). Sin embargo, la cantidad de fósforo necesaria en cada momento depende mucho de la especie y de las necesidades y condiciones para su desarrollo. En estudios de deficiencia nutricional de P_i es común usar una concentración de al menos 0,1 mM de P_i para *A. thaliana*, considerando concentraciones entre 0,5 mM y 2,5 mM como suficientes o altas al no ser una planta que tenga grandes requerimientos nutricionales (Williamson *et al.*, 2001). Sin embargo, otras plantas requieren grandes cantidades de nutrientes para su desarrollo (como es el caso de la ortiga), por lo que es conveniente considerar concentraciones bajas de P_i de 0,5 mM y concentraciones control de al menos 2mM. Debido a estas diferencias es importante estudiar distintos modelos de plantas para obtener e integrar información variada a cerca de cómo afecta la falta de fósforo a las plantas.

Aunque poco se conoce sobre cómo afecta la falta de P_i a la fisiología de los tejidos fotosintéticos, como las hojas o al estado fisiológico de la planta entera; se ha observado un descenso del crecimiento generalizado, una acumulación de antocianinas y una pérdida de clorofilas generalizada en tejidos viejos (Marschner, 2012). Pero a pesar de estos estudios muy poco se conoce sobre cómo la deficiencia de P_i afecta al nivel de antioxidantes, de hormonas o de expresión génica en plantas.

Por otro lado, junto con la falta de fósforo, es importante considerar también cómo afecta la falta de agua (déficit hídrico) a las plantas. Debido a que un déficit hídrico suele ir asociado con una deficiencia nutricional, ya que la menor disponibilidad de agua en el suelo reduce severamente la absorción de nutrientes por las raíces (Davies y Zhang, 1991). De ese modo, el déficit hídrico, junto al déficit nutricional que produce (incluyendo déficit de fósforo), afecta enormemente a la morfología, la fisiología y al metabolismo de la planta. Los modelos climáticos actuales predicen que debido al cambio climático va a seguir

incrementando la aridez y por tanto disminuyendo la disponibilidad de agua (Dai, 2012), especialmente en las zonas de clima mediterráneo (Bussotti *et al.*, 2014). De modo que sería conveniente unificar estudios que integren la falta de fósforo con el déficit hídrico (sequía), ya que ambos son muy comunes actualmente y están íntimamente relacionados, como trataremos de estudiar en el Capítulo 3, donde estudiaremos una sequía severa junto a déficit nutricional, para poder observar en mayor magnitud sus síntomas.

Por todo ello, con la presente tesis trataremos de estudiar cuál es la respuesta de las plantas ante la distinta disponibilidad de fósforo, tanto a nivel fisiológico (basado principalmente en la producción de antioxidantes y hormonas vegetales) y a nivel molecular (expresión génica). Con especial interés en la cantidad y tipo de vitamina E y niveles endógenos de JAs. Además, el estudio de la respuesta de las plantas a la falta de fósforo será realizado en dos modelos de plantas con estrategias de crecimiento y supervivencia muy distintas.

Los capítulos y publicaciones presentadas en la tesis son:

Capítulo 1: Interacción entre la vitamina E y el fósforo en el control de la longevidad en *Arabidopsis thaliana*.

Capítulo 2: Reprogramación transcripcional de los mecanismos de defensa en mutantes deficientes en vitamina E de *Arabidopsis thaliana* L. expuestos a distintas disponibilidades de fósforo.

Capítulo 3: Diferencias entre machos y hembras en la fotoinhibición, el estrés foto-oxidativo y la fotoprotección en ortigas (*Urtica dioica* L.) expuestas a sequía y a deficiencia nutricional.

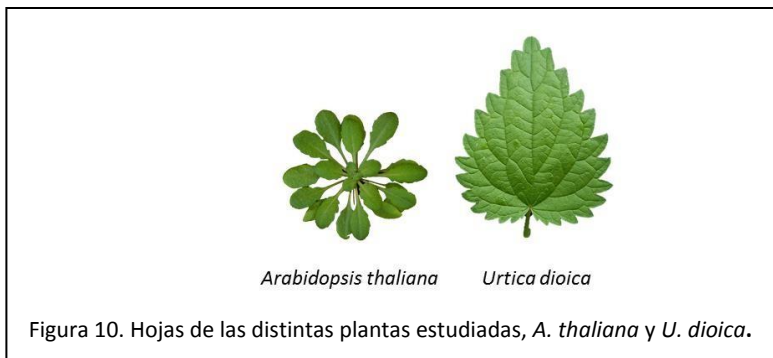
Capítulo 4: La deficiencia de fósforo en la fase de transición incrementa el sex ratio y los niveles del ácido 12-oxo-fitodienoico en hembras de *Urtica dioica*.

En el apartado de Resultados y al inicio de cada capítulo aparece un resumen de cada uno de ellos, dónde se justifica (al igual que en la introducción) el trabajo y se presentan los resultados obtenidos.

En todos los capítulos se justifica su estudio según los objetivos planteados en el apartado Objetivos

4. Modelos de estudio

Los modelos de estudio o plantas elegidas para realizar los estudios fueron *Arabidopsis thaliana* y *Urtica dioica* (Figura 10).



Arabidopsis thaliana

Arabidopsis thaliana L. es una pequeña herbácea anual con un ciclo de vida muy corto (3 meses aproximadamente). Son nativas de Europa, aunque algunas especies se han naturalizado en Asia y Norteamérica. Pese a que está emparentada con numerosas plantas comestibles como la col, el nabo o la planta de la mostaza, esta especie no tiene interés comercial. Sin embargo, se trata de

una planta modelo en estudios de biología vegetal, estudiada desde hace más de 40 años 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. El hecho de que sea una herbácea de tamaño reducido facilita el cultivo y permite optimizar el espacio. 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).

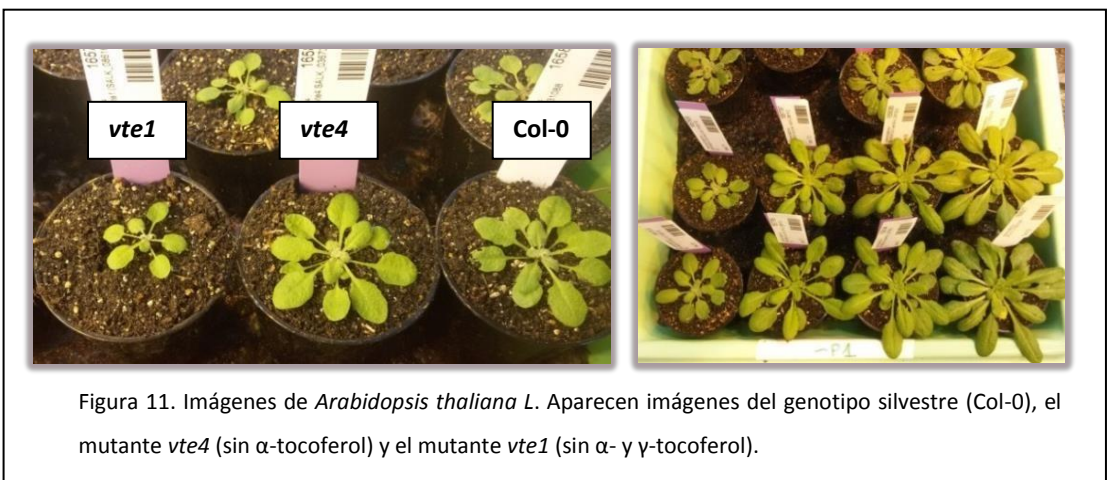


Figura 11. Imágenes de *Arabidopsis thaliana* L. Aparecen imágenes del genotipo silvestre (Col-0), el mutante *vte4* (sin α -tocoferol) y el mutante *vte1* (sin α - y γ -tocoferol).

En el año 2000 se obtuvo la secuencia de su genoma, siendo el primer genoma de planta secuenciado (Kaul *et al.*, 2000). También se dispone de mutantes y transgénicos comerciales gracias a que se puede transformar de forma eficiente con *Agrobacterium tumefaciens* (ver mutantes en la Figura 11).

A. thaliana fue elegida como modelo en nuestros estudios al permitirnos disponer de mutantes deficientes en vitamina E (mutantes *vte1* y *vte4*) y ser una planta de fácil manejo y cultivo lo que nos facilita disponer de un tamaño muestral grande. Además es una planta que crece con facilidad y nos permite trabajar con diferentes concentraciones de fósforo al tolerar concentraciones desde un 0,1 a un 2,5 mM de H_2PO_4 en la solución nutritiva.

Urtica dioica

Urtica dioica subsp. *dioica* (conocida como ortiga mayor) es una planta herbácea perenne y además, dioica, lo que nos permitirá trabajar con machos y hembras. La ortiga es una planta que puede alcanzar hasta 1,5 m de altura y presenta unos pelos urticantes llenos de un líquido irritante que al contacto con la piel producen una lesión y vierten su contenido (ácido fórmico e histamina entre otros compuestos) sobre ella, provocando ronchas, escozor y prurito. Florece del mes de julio en adelante. Las flores masculinas son verde amarillentas o violetas con estambres amarillos, reunidos en panículas pendulares y terminales. Normalmente son unisexuales, pequeñas y dispuestas en racimos colgantes de hasta 10 cm. Las flores femeninas se encuentran en largos amentos colgantes con flores más pequeñas de color verde o blanco (Figura 12).

U. dioica ha sido elegida como un modelo para estudiar el dimorfismo sexual secundario en plantas debido a que sus caracteres sexuales son distintivos y es relativamente sencillo diferenciar machos de hembras. Además, su crecimiento es rápido y sencillo, y pese a ser herbácea es perenne (puede vivir más de dos años). Sin olvidar también que es una planta que requiere altos valores de nutrientes para desarrollarse, de forma que esperamos observar fácilmente los signos de la deficiencia en fósforo.

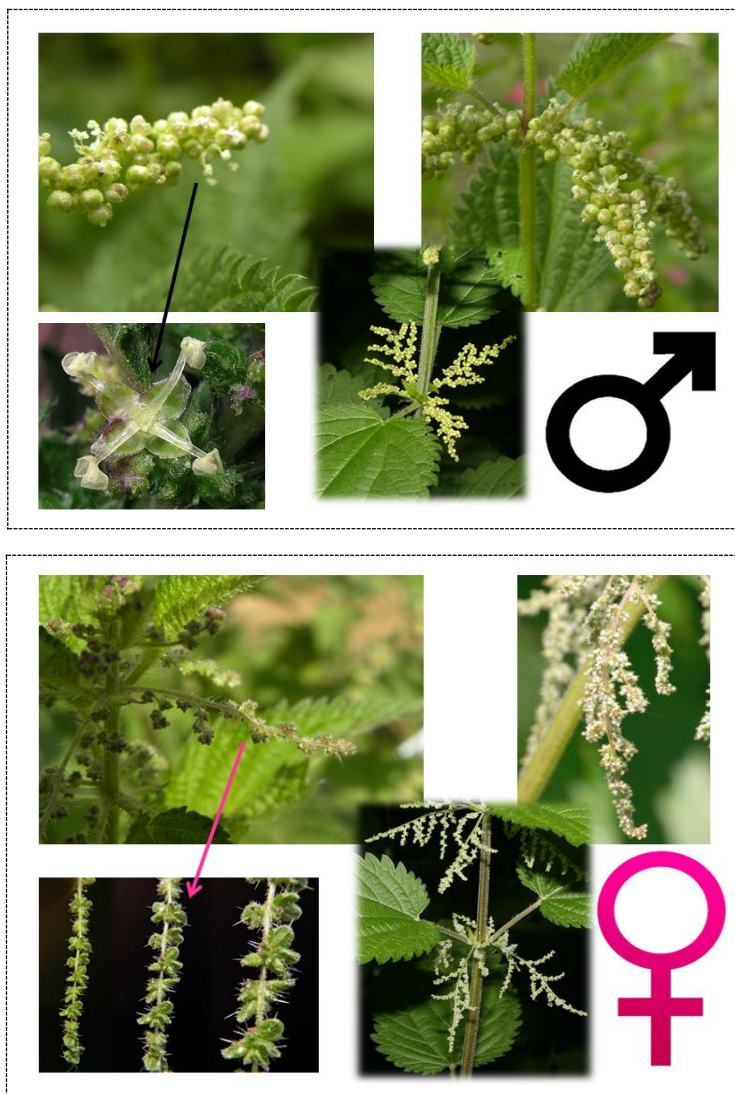


Figura 12. Las imágenes superiores son flores masculinas de *Urtica dioica* L. Las flores masculinas son más grandes y globosas, de color amarillo o violeta en muchos casos. Las imágenes inferiores muestran las flores y frutos de una planta hembra de *U. dioica*. Las flores femeninas son más pequeñas y muchas veces de color verde o blanco.

5. Aproximaciones en estudios de fisiología vegetal

Los estudios de fisiología vegetal pueden y deben abordarse desde diferentes aproximaciones. Por un lado no debemos olvidar la aproximación más molecular, que nos permite responder a preguntas concretas sobre los métodos de respuesta de las plantas y conocer qué moléculas concretas y qué genes participan en la respuesta de las plantas. Ello nos permite responder a la pregunta del *cómo lo hacen*, lo que nos permite un conocimiento y una aplicación muy concreta (fundamental, por ejemplo, en estudios de mejora genética o transgénicos). Pero por otro lado, para comprender *cómo responden las plantas y cómo funcionan* (objetivo de la fisiología vegetal) debemos aumentar nuestra visión y aumentar nuestra escala de trabajo.

En estudios fisiológicos, para responder a *cómo funciona* la planta, debemos conocer cuáles son sus niveles de hormonas, antioxidantes y resto de moléculas que participan activamente en su respuesta. Junto con esta visión *más bioquímica*, que nos permite conocer el papel que desempeñan las distintas moléculas que produce una planta, deberían abordarse los estudios a nivel molecular. Debido a que si no conocemos cómo se ve afectada la planta (por ejemplo a nivel de productos fotosintéticos) y cuáles son las moléculas que produce o no para responder a un estrés, no se pueden interpretar el resto de niveles de estudio.

La elección de un tipo de aproximación u otro debe basarse en el tipo de pregunta que tratamos de responder. No tiene sentido tratar de responder preguntas concretas con técnicas muy avanzadas sobre procesos de la naturaleza que no están claros. Por suerte, disponemos de estudios y trabajos de muchos naturalistas y curiosos de la naturaleza (los primeros biólogos) desde hace años. Lo que nos ha permitido saber bastante sobre *los procesos* que ocurren en la naturaleza.

Sin embargo, nuestra curiosidad es infinita y siempre trataremos de dar respuesta a todo lo que vemos. Probablemente ello ha provocado el gran aumento de estudios *moleculares* con técnicas muy avanzadas, que nos permiten ampliar nuestra visión de estudio a una nueva dimensión casi sin explorar. Es cierto que se avanza rápido, muchas veces cuando aprendes a manejar una técnica, esta ya se ha quedado atrasada, lo que puede resultar un poco frustrante. Pero esto no impide el avance de nuestra curiosidad, sino que lo revive aún más. El hecho de que se haya realizado un estudio muy novedoso e interesante nos hace aprender, pero también nos motiva, en esta sociedad competitiva en la que vivimos, a mejorar y a tratar de superarnos. Y por ello el gran avance científico de los últimos años en todas las áreas del conocimiento y por supuesto en la fisiología vegetal.

Debemos tener presente la visión molecular y bioquímica o fisiológica, y tratar de integrarlas en nuestros estudios, ya que cada una de ellas nos aporta información diferente y complementaria. La fisiología vegetal es un área de estudio muy compleja, donde cada punto de vista nos permite responder a preguntas concretas a diferentes niveles, pero que sólo unificando todo el conocimiento, podremos tener una idea real del funcionamiento de las plantas.

Aproximaciones experimentales en la Tesis

En la presente Tesis se trata de conocer cómo responden las plantas ante la distinta disponibilidad de fósforo desde diferentes puntos de vista y con especial interés en sus niveles de vitamina E y JAs. Para ello se han realizado diferentes técnicas y métodos de estudio en los diferentes capítulos, resumidos en la Tabla 2.

Capítulo 1: Interacción entre la vitamina E y el fósforo en el control de la longevidad en *Arabidopsis thaliana*.

Capítulo 2: Reprogramación transcripcional de los mecanismos de defensa en mutantes deficientes en vitamina E de *Arabidopsis thaliana* L. expuestos a distintas disponibilidades de fósforo.

Capítulo 3: Diferencias entre machos y hembras en la fotoinhibición, el estrés foto-oxidativo y la fotoprotección en ortigas (*Urtica dioica* L.) expuestas a sequía y a deficiencia nutricional.

Capítulo 4: La deficiencia de fósforo en la fase de transición incrementa el *sex ratio* y los niveles del ácido 12-*oxo*-fitodienoico en hembras de *Urtica dioica*.

Tabla 2. Técnicas de estudio empleadas en los distintos capítulos de la Tesis.

	Técnicas de estudio	Finalidad
C A P Í T U L O 1	<p>-Mutantes <i>vte1</i> y <i>vte4</i> de <i>A. thaliana</i>.</p> <p>-Longevidad (tiempo transcurrido desde su germinación hasta la muerte de su roseta).</p> <p>-Senescencia (tiempo transcurrido desde la floración hasta la muerte de la roseta).</p> <p>-Biomasa reproductiva y biomasa de la roseta.</p> <p>-Ratio F_v/F_m. Medida de la eficacia máxima del fotosistema II.</p> <p>-Método FOX (Bou <i>et al.</i>, 2008).</p> <p>-Coeficientes específicos de absorción (Lichtenthaler y Wellburn, 1983).</p> <p>-HPLC cromatografía líquida de alta eficacia acoplado a un detector de fluorescencia (Jasco).</p> <p>-UHPLC/ESI-MS/MS cromatografía líquida de alta eficacia acoplado a una espectrometría de masas en tándem.</p>	<p>-Ruta de síntesis de la vitamina E alterada.</p> <p>-Determinación de cuanto tiempo sobrevive la planta.</p> <p>-Determinación de tiempo que transcurre desde que comienza su periodo reproductivo hasta su muerte.</p> <p>-Estimación de su peso y crecimiento.</p> <p>-Indicador de fotoinhibición en el fotosistema II (PSII).</p> <p>-Cuantificación de los hidroperóxidos lipídicos (indican peroxidación lipídica y daño oxidativo).</p> <p>-Determinación de la cantidad de pigmentos clorofilas (a y b) y carotenoides.</p> <p>-Detección y cuantificación de tocoferoles (análisis de Vitamina E).</p> <p>-Cuantificación del perfil de jasmonatos (defensas químicas), incluyendo el OPDA (presursor de JAs), JA y JA-Ile.</p>
C A P Í T U L O 2	<p>-Mutantes <i>vte1</i> y <i>vte4</i> de <i>A. thaliana</i>.</p> <p>-<i>Priming</i> (aplicación reiterada de un estrés).</p> <p>-RWC (contenido hídrico relativo de la planta)</p> <p>-Medidas con el SPAD.</p> <p>-Ratio F_v/F_m. Medida de la eficacia máxima del fotosistema II.</p> <p>-Método TBARS (Hodges <i>et al.</i>, 1999).</p> <p>-HPLC cromatografía líquida de alta eficacia acoplado a un detector de fluorescencia (Jasco).</p> <p>-ICP-OES espectrometría de emisión en plasma acoplado inductivamente.</p> <p>-UHPLC/ESI-MS/MS cromatografía líquida de alta eficacia acoplado a una espectrometría de masas en tándem.</p> <p>-qRT-PCR reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real.</p> <p>-Análisis de la ontología genética (GO) y análisis de agrupamiento (Clustering analysis).</p>	<p>-Ruta de síntesis de la vitamina E alterada.</p> <p>-Estudio de memoria ante un estrés.</p> <p>-Indicativo del estado fisiológico e hídrico.</p> <p>-Cuantificación de las clorofilas.</p> <p>-Indicador de fotoinhibición en el fotosistema II (PSII).</p> <p>-Estimación de la peroxidación lipídica, niveles de malondialdehído (MDA) en hojas (medida del daño).</p> <p>-Detección y cuantificación de tocoferoles (análisis de Vitamina E).</p> <p>-Determinación de macro- y micronutrientes en hojas (P, S, K, Na, Mn...).</p> <p>-Cuantificación y determinación de las hormonas endógenas: OPDA, JA, JA-Ile, SA, t-Z, t- ZR, IPA, 2iP, IAA, GA1, GA3, GA4, GA7, ABA, ACC y melatonina.</p> <p>-Estudio de la expresión de 1880 genes que codifican a TFs en <i>A. thaliana</i>.</p> <p>-Análisis para diferenciar y agrupar los genes que presentan una expresión diferencial.</p>

	Técnicas de estudio	Finalidad
C A P Í T U L O 3	<p>-Plantas hembras y macho en <i>U. dioica</i>.</p> <p>-RWC (contenido hídrico relativo de la planta).</p> <p>-Ratio F_w/F_m. Medida de la eficacia máxima del fotosistema II.</p> <p>-Método FOX (Bou <i>et al.</i>, 2008).</p> <p>-HPLC cromatografía líquida de alta eficacia.</p>	<p>-Estudio de dimorfismo sexual secundario en su respuesta a un estrés.</p> <p>-Indicativo del estado fisiológico e hídrico.</p> <p>-Indicador de fotoinhibición en el fotosistema II (PSII).</p> <p>-Cuantificación de los hidroperóxidos lipídicos (indican peroxidación lipídica y daño oxidativo).</p> <p>-Determinación de la cantidad de clorofilas (a y b), carotenoides, ascorbato y su estado de oxidación, Lut, VZA, Z y DPS (componentes del ciclo de las xantofilas), son pigmentos y antioxidantes que indican el estado fisiológico de la planta.</p>
C A P Í T U L O 4	<p>-Plantas inmaduras y maduras (hembras y machos) en <i>U. dioica</i>.</p> <p>-RWC (contenido hídrico relativo de la planta).</p> <p>-LMA (masa de la hoja en relación a su área).</p> <p>-Ratio F_w/F_m. Medida de la eficacia máxima del fotosistema II.</p> <p>-UHPLC/ESI-MS/MS cromatografía líquida de alta eficacia acoplado a una espectrometría de masas en tándem.</p> <p>-EA-IRMS análisis elemental de la tasa de isótopos por espectrometría de masas.</p> <p>-ICP-OES espectrometría de emisión en plasma acoplado inductivamente.</p> <p>-Método FOX (Bou <i>et al.</i>, 2008).</p> <p>-Coeficientes específicos de absorción (Lichtenthaler y Wellburn, 1983).</p> <p>-HPLC cromatografía líquida de alta eficacia acoplado a un detector de fluorescencia (Jasco).</p>	<p>-Para diferenciar el comportamiento y sus mecanismos de respuesta entre los distintos sexos, incluyendo <i>sex ratio</i>.</p> <p>-Indicativo del estado fisiológico e hídrico.</p> <p>-Relación entre el peso seco de la hoja y su área.</p> <p>-Indicador de fotoinhibición en el fotosistema II (PSII).</p> <p>-Cuantificación y determinación de las hormonas endógenas: OPDA, JA, JA-Ile, JA-Val, JA-Met, JA-Phe, JA-Leu, SA, IAA, GA1, GA3, GA4, GA7, ABA, ACC.</p> <p>-Medidas del porcentaje de carbono y nitrógeno, junto con el estudio de sus respectivos isótopos C13 y N15.</p> <p>-Determinación de macro- y micronutrientes en hojas (P, S, K, Na, Mn...).</p> <p>-Cuantificación de los hidroperóxidos lipídicos (indican peroxidación lipídica y daño oxidativo).</p> <p>-Determinación de la cantidad de pigmentos clorofilas (a y b) y carotenoides.</p> <p>-Detección y cuantificación de tocoferoles (análisis de Vitamina E).</p>

OBJETIVOS



Objetivo general

El objetivo general de la Tesis doctoral es profundizar en el conocimiento de las respuestas de las plantas ante la distinta disponibilidad de fósforo, con especial hincapié en el papel de la vitamina E y los jasmonatos.

Hipótesis de partida

La escasez de fósforo afecta al estado fisiológico de la planta activando sus mecanismos de respuesta al estrés a través de la síntesis de antioxidantes como la vitamina E, y de la producción de hormonas vegetales como los jasmonatos. De ese modo, esperamos que estudiando los niveles de vitamina E y los niveles endógenos de los distintos jasmonatos, podamos entender cómo le afecta y cómo responde la planta a la distinta disponibilidad de fósforo.

Objetivos específicos

-Conocer si la vitamina E y la disponibilidad de fósforo influyen en la longevidad y desarrollo de las plantas.

-Averiguar si la vitamina E afecta a procesos de señalización celular ante distintas disponibilidades de fósforo.

-Conocer la importancia de los JAs ante la distinta disponibilidad de fósforo y tratar de estudiar si existe relación entre el contenido de vitamina E, cambios en la expresión génica y contenido de JAs.

-Estudiar la importancia de la vitamina E en una especie dioica para conocer si existe diferencia entre plantas macho y hembra.

-Evaluar si machos y hembras presentan una respuesta diferencial en relación a los contenidos de vitamina E y JAs ante distintas disponibilidades de fósforo.

INFORME DEL DIRECTOR DE TESIS





Barcelona, 29 de septiembre de 2017

El Dr. Sergi Munné Bosch, como director de la Tesis Doctoral titulada **“Importancia de la vitamina E y los jasmonatos en la respuesta de las plantas a la disponibilidad de fósforo”** presentada per la doctoranda Bárbara Simancas San Martín,

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 **“Interplay between vitamin E and phosphorus availability in the control of longevity in *Arabidopsis thaliana*”**, publicado en la revista *Annals of Botany*, índice de impacto (2016) de 4.041. En este trabajo se describe como la composición de vitamina E en los cloroplastos puede influenciar el crecimiento y la longevidad, todo ello según la disponibilidad de fósforo en el medio, en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Cabe destacar la aproximación experimental original en que se evalúa hasta qué punto varios marcadores clave del desarrollo de la planta (crecimiento, reproducción, longevidad) pueden verse drásticamente modificados en relación a la disponibilidad de fósforo, y como todo ello puede ser afectado a la vez por la concentración y composición de varias formas de tocoferol en los cloroplastos en los mutantes *vte1* y *vte4* de *Arabidopsis thaliana*. La doctoranda ha realizado todos los muestreos, los 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 en los muestreos y una excelente predisposición en la introducción al uso de la cromatografía líquida de alta

resolució (HPLC) para el anàlisis de vitamina E, y en la cromatografía líquida de alta resolució acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) para los anàlisis de hormonas. La doctoranda demuestra también una gran capacidad de anàlisis e interpretaci3n de los resultados y se introduce, asimismo, en la redacci3n de artícu los científicos.

Capítu lo 2. Artícu lo “**Defense-related transcriptional reprogramming in vitamin E-deficient arabidopsis mutants exposed to contrasting phosphate availability**”, publicado en la revista *Frontiers in Plant Science*, índice de impacto (2016) de 4.291. En este trabajo se estudian los efectos a nivel transcripcional de cambios en la composici3n en vitamina E en los cloroplastos en los mutantes *vte1* y *vte4* de *Arabidopsis thaliana*. Cabe destacar la aproximaci3n experimental original en que se realiza un anàlisis transcripcional masivo evaluándose la expresi3n de los genes que codifican para 1880 factores de transcripci3n en esta planta modelo expuesta a diferente disponibilidad de f3sforo. Cabe destacar también de este estudio la aproximaci3n experimental para una mejor comprensi3n de las respuestas de las plantas al *priming*. La doctoranda ha realizado todos los muestreos, los anàlisis de las muestras y ademàs ha participado en el diseño experimental y discusi3n de los resultados, constando por tanto como coprimera autora del trabajo. La doctoranda ha demostrado una gran capacidad de trabajo, así como un excelente manejo en los muestreos, en el HPLC para los anàlisis de vitamina E, y en el LC-MS/MS para los anàlisis de hormonas. Ademàs, la doctoranda muestra una excelente adaptaci3n al grupo de investigaci3n de la Dra. Balazadeh en el Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie en Potsdam, Alemania, donde la doctoranda realiza los muestreos y los anàlisis de las muestras por RT-qPCR. La doctoranda demuestra también una gran capacidad de anàlisis e interpretaci3n de los resultados y participa activamente en la redacci3n del artícu lo.

Capítulo 3. Artículo **“Sex-related differences in photoinhibition, photo-oxidative stress and photoprotection in stinging nettle (*Urtica dioica* L.) exposed to drought and nutrient deficiency”**, publicado en la revista *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, índice de impacto (2016) de 2.673. En este trabajo se describe como la composición de vitamina E en los cloroplastos puede estar relacionada con el nivel de fotoprotección y, por tanto, el grado de estrés foto-oxidativo en *Urtica dioica*, modelo que permite además estudiar los efectos del dimorfismo sexual en la fotoinhibición, fotoprotección y estrés foto-oxidativo en la respuesta de las plantas a la disponibilidad de fósforo. Cabe destacar la aproximación experimental original en que se utiliza una planta dioica para el estudio de la respuesta de las plantas a la disponibilidad de fósforo. La doctoranda ha realizado todos los muestreos, los 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 en los muestreos y un excelente manejo del HPLC para el análisis de antioxidantes. La doctoranda demuestra también una gran capacidad de análisis e interpretación de los resultados.

Capítulo 4. Artículo **“Phosphate starvation during the transition phase increases the sex ratio and 12-oxo-phytodienoic acid contents in females of *Urtica dioica*”**, publicado en la revista *Environmental and Experimental Botany*, índice de impacto (2016) de 4.369. En este trabajo se describe como la disponibilidad de fósforo en la fase de transición entre planta juvenil y madura puede influenciar la proporción de sexos, así como la capacidad de sintetizar jasmonatos de forma diferencial entre sexos en plantas dioicas. Cabe destacar la aproximación experimental original en

que se evalúa hasta qué punto la disponibilidad de fósforo puede afectar aspectos tan importantes de las poblaciones en plantas dioicas como son la proporción de sexos y la capacidad de sintetizar defensas químicas. Así mismo, se discute este último aspecto en relación a la capacidad de acumular vitamina E en cloroplastos. La doctoranda ha realizado todos los muestreos, los 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 del HPLC y del LC-MS/MS para los análisis de antioxidantes y hormonas, respectivamente. La doctoranda demuestra también una gran capacidad de análisis e interpretación de los resultados y, lo que es todavía más importante, una gran capacidad de liderazgo usando herramientas de análisis bioquímico que el grupo de investigación no utiliza habitualmente, como es el análisis de discriminación isotópica. La doctoranda demuestra pues un excelente grado de madurez científica.

Y, para que así conste a los efectos oportunos,

Dr. Sergi Munné Bosch



RESULTADOS



Capítulo 1: Interacción entre la vitamina E y el fósforo en el control de la longevidad en *Arabidopsis thaliana*.

Capítulo 2: Reprogramación transcripcional de los mecanismos de defensa en mutantes deficientes en vitamina E de *Arabidopsis thaliana* L. expuestos a distintas disponibilidades de fósforo.

Capítulo 3: Diferencias entre machos y hembras en la fotoinhibición, el estrés foto-oxidativo y la fotoprotección en ortigas (*Urtica dioica* L.) expuestas a sequía y a deficiencia nutricional.

Capítulo 4: La deficiencia de fósforo en la fase de transición incrementa el *sex ratio* y los niveles del ácido 12-*oxo*-fitodienoico en hembras de *Urtica dioica*.

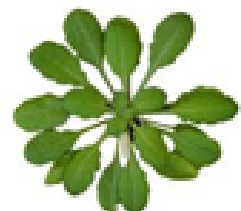
Capítulo 1. Interacción entre la vitamina E y el fósforo en el control de la longevidad en *Arabidopsis thaliana*

Chapter 1: Interplay between vitamin E and phosphorus availability in the control of longevity in *Arabidopsis thaliana*

Bárbara Simancas¹, Sergi Munné-Bosch¹

¹ Departamento de Biología Evolutiva, Ecología y Ciencias Ambientales, Unidad de Fisiología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, Barcelona, España.

Publicado en **Annals of Botany** (2015) 116(4), 511-518.
doi.org/10.1093/aob/mcv033



Resumen del Capítulo 1

El envejecimiento de las plantas y la deficiencia en P_i puede desencadenar la acumulación de ROS, dañando el aparato fotosintético, afectando a su longevidad y crecimiento. La vitamina E ayuda a controlar el estado redox celular mediante su reacción con el oxígeno singlete y evitando la propagación de la peroxidación lipídica en las membranas tilacoidales. Por ello, este estudio investiga cómo la disponibilidad de fósforo y la vitamina E interactúan en el control de la longevidad y desarrollo de *Arabidopsis thaliana* L. Para llevarlo a cabo, se comparó a distintas disponibilidades de fósforo, la respuesta del mutante *vte1* (con una inserción de T-DNA en la enzima tocoferol ciclasa (VTE1)), el mutante *vte4* (con la enzima γ -tocoferol metiltransferasa (VTE4) alterada) junto a la plantas de tipo silvestre o Col-0 (con α -tocoferol principalmente en hojas). Se determinó la longevidad (tiempo desde la germinación hasta la muerte de la roseta), las diferentes etapas de desarrollo, y medidas de eficiencia fotosintética, concentración de pigmentos, peroxidación lipídica, contenido de vitamina E y jasmonatos (JAs). El mutante *vte1* mostró senescencia acelerada bajo condiciones de control, exceso de fósforo y deficiencia leve de fósforo, lo que sugiere un retraso de la senescencia por el efecto protector de α -tocoferol. Sin embargo, bajo una deficiencia severa de fósforo, la falta de α -tocoferol, paradójicamente, aumentó de la longevidad en el mutante *vte1*, mientras que la senescencia se aceleró en plantas de tipo silvestre. Por otro lado, la falta de vitamina E redujo la fotoprotección en los mutantes y condujo a un aumento de los productos químicos de defensa (como se indica con los niveles de JAs) ante una deficiencia severa de P_i . Lo que indica un compromiso o *trade-off* entre la capacidad de fotoprotección y la activación de defensas químicas (acumulación de JAs).

PART OF A SPECIAL ISSUE ON REACTIVE OXYGEN AND NITROGEN SPECIES

Interplay between vitamin E and phosphorus availability in the control of longevity in *Arabidopsis thaliana*

Bárbara Simancas and Sergi Munné-Bosch*

Department of Plant Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal, 643, 08028 Barcelona, Spain

* For correspondence. E-mail smunne@ub.edu

Received: 5 December 2014 Returned for revision: 7 January 2015 Accepted: 6 February 2015 Published electronically: 25 March 2015

- **Background and Aims** Vitamin E helps to control the cellular redox state by reacting with singlet oxygen and preventing the propagation of lipid peroxidation in thylakoid membranes. Both plant ageing and phosphorus deficiency can trigger accumulation of reactive oxygen species, leading to damage to the photosynthetic apparatus. This study investigates how phosphorus availability and vitamin E interact in the control of plant longevity in the short-lived annual *Arabidopsis thaliana*.
- **Methods** The responses of tocopherol cyclase (VTE1)- and γ -tocopherol methyltransferase (VTE4)-null mutants to various levels of phosphorus availability was compared with that of wild-type plants. Longevity (time from germination to rosette death) and the time taken to pass through different developmental stages were determined, and measurements were taken of photosynthetic efficiency, pigment concentration, lipid peroxidation, vitamin E content and jasmonate content.
- **Key Results** The *vte1* mutant showed accelerated senescence under control conditions, excess phosphorus and mild phosphorus deficiency, suggesting a delaying, protective effect of α -tocopherol during plant senescence. However, under severe phosphorus deficiency the lack of α -tocopherol paradoxically increased longevity in the *vte1* mutant, while senescence was accelerated in wild-type plants. Reduced photoprotection in vitamin E-deficient mutants led to increased levels of defence chemicals (as indicated by jasmonate levels) under severe phosphorus starvation in the *vte4* mutant and under excess phosphorus and mild phosphorus starvation in the *vte1* mutant, indicating a trade-off between the capacity for photoprotection and the activation of chemical defences (jasmonate accumulation).
- **Conclusions** Vitamin E increases plant longevity under control conditions and mild phosphorus starvation, but accelerates senescence under severe phosphorus limitation. Complex interactions are revealed between phosphorus availability, vitamin E and the potential to synthesize jasmonates, suggesting a trade-off between photoprotection and the activation of chemical defences in the plants.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, jasmonates, longevity, P availability, photoprotection, plant defence trade-off, reactive oxygen species, ROS, senescence, vitamin E.

INTRODUCTION

Phosphorus (P) is ubiquitous in life chemistry as it is involved in just about every function (White and Hammond, 2008; Frank, 2013). The chemical form of P taken up by plants, orthophosphate (H_2PO_4^-), represents a very small fraction of available P in soils, and is generally immobile. However, as a macro-element, relatively significant quantities are required for biological function. Phosphorus deficiency produces many symptoms in plants: leaf tips look burnt and older leaves turn a dark green or reddish-purple colour. Poor availability of P in soils and consequent P deficiency are major constraints to crop production globally (Cordella *et al.*, 2009).

During senescence, remobilization of photoassimilates and nutrients to other plant parts occurs, especially to more demanding parts, such as growing young leaves, reproductive structures (flowers and/or fruit under development) and storage tissues. After the initiation of leaf senescence, there is a transition to the so-called reorganization phase, during which cell components selectively re-differentiate, leading to nutrient remobilization. Once this is accomplished, programmed cell

death occurs (Distelfeld *et al.*, 2014; Juvany *et al.*, 2014). During the reorganization phase, the extent of photo-oxidative stress in senescing leaves may be under tight control. Phosphatases, which are highly active during senescence, release phosphate from the nucleotide products of nuclease attack on RNA and DNA, and P can be redistributed from senescing tissues to other plant parts (Duff *et al.*, 1994; Frank, 2013). Under P starvation, however, plants can accumulate sugars and starch in their leaves due to limitations in carbohydrate loading and/or unloading (Wingler *et al.*, 1998; Hammond and White, 2008).

Lipid peroxidation can be suppressed by non-polar antioxidants such as vitamin E. The vitamin E group consists of eight compounds (four tocopherols and four tocotrienols, in each case termed *a*, *b*, *c* and *d*) that differ only in the saturation degree of the prenyl side chain and in the number of methyl groups in the chromanol ring. In photosynthetic tissues, the most important forms are *a*- and, to a lesser extent, γ -tocopherol. α -Tocopherol protects the photosynthetic membranes from the propagation of lipid peroxidation, helps to maintain membrane stability and, in a coordinated action with

other antioxidants, enables the correct functioning of the photosynthetic machinery under stress conditions (Munné-Bosch, 2005; Munné-Bosch *et al.*, 2013). γ -Tocopherol is the precursor of α -tocopherol and can accumulate in small quantities in young or senescing tissues only (Munné-Bosch and Alegre, 2002; Szymanska and Kruk, 2008). There is some controversy about whether or not tocopherols can have functions beyond their antioxidant role (Falk and Munné-Bosch, 2010). Some studies suggest that tocopherols can play a role in cell signalling, affecting processes outside chloroplasts (Cela *et al.*, 2011). Studies of mutants with an altered tocopherol biosynthetic pathway suggested that altered antioxidant capacities led to an increase in anthocyanin accumulation in senescing leaves that may be linked to alterations in jasmonic acid (JA) levels (Munné-Bosch *et al.*, 2007). Also, tocopherol-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* show alterations in photoassimilate transport at low temperatures as a result of alterations in callose deposition in the phloem (Maeda *et al.*, 2006) and endoplasmic reticulum fatty acid metabolism (Maeda *et al.*, 2008). Furthermore, it has recently been shown that vitamin E deficiency can accelerate senescence under optimal growth conditions, but paradoxically retard it under salt stress in tobacco plants (Abbasi *et al.*, 2007; Asensi-Fabado *et al.*, 2014).

Given the centrality of lipid peroxidation in plant defence against both biotic and abiotic stresses, we hypothesized that lack of vitamin E might influence interactions with P availability in the control of longevity and the capacity to synthesize jasmonates (JAs). Here, we examined the effects of alterations in vitamin E composition on the longevity, extent of photoprotection and JA profile to unravel possible trade-offs between vitamin E and defence signal production in plants.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and sampling

Seeds of *Arabidopsis 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. The *vte1* and *vte4* mutants have T-DNA insertions in the *VTE1* and *VTE4* genes, which encode tocopherol cyclase and *c*-tocopherol methyltransferase, respectively. The *vte1* mutant lacks both α -tocopherol and γ -tocopherol, and the *vte4* mutant lacks α -tocopherol but accumulates γ -tocopherol in the leaves (Porfirova *et al.*, 2002; Bergmüller *et al.*, 2003). Seeds were sown in 0.1-L pots containing a mixture of peat : perlite : vermiculite (1 : 1 : 1, v/v/v) and exposed to 4 °C for 1 week. Then, plants were transferred to a constant environment chamber (16-h photoperiod, 90–110 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, air temperature 21–23 °C). When plants had developed their first two leaves (stage 1.02, with two rosette leaves > 1 mm in length; Boyes *et al.*, 2001), they were exposed to four nutrient solution treatments. The control (C) treatment contained 5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 5 mM KNO_3 , 2 mM MgSO_4 , 1 mM KH_2PO_4 and 5 g/L iron chelate (EDTA FeNa). The treatment enriched in phosphorus (+P) contained the same but with 2 mM KH_2PO_4 , while the –P1 and –P2 treatments contained the same but with 0.5 and 0.1 mM KH_2PO_4 (50 % and 90 % less P, respectively), compared with controls. The –P1 and –P2 treatments were supplied with 0.5 and 0.1 mM KCl, respectively, to compensate for K deficiency. Plants were watered with freshly

prepared nutrient solution every 2–3 d. All nutrient solutions were adjusted to a pH of 6.5–7.0.

To estimate longevity (time from germination to rosette death) and the time elapsed between different developmental stages (time to germination, from sowing to germination; time to flowering, from germination to first flower at anthesis; and senescence period, time to rosette death minus time to flowering), we used 35 individuals per treatment and genotype. The rosette was considered dead when all leaves had completely senesced. For biomass estimation, chlorophyll fluorescence measurements and biochemical analyses on whole-rosette leaves, the entire rosettes of five individuals were used. These biochemical analyses were performed at the fruiting stage, when the first mature silique was visible. For pigment, vitamin E, lipid peroxidation and JA analyses, leaves were collected, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C until analysis.

Biomass estimation

Rosette and reproductive biomasses were estimated by weighing all leaves from the entire rosette and the whole reproductive part, respectively.

The F_v/F_m ratio

The maximum efficiency of photosystem II photochemistry [F_v/F_m ratio, an indicator of the photoinhibition of photosystem II (PSII)] was determined using a pulse-modulated fluorimeter (Mini-PAM; Walz, Effeltrich, Germany) after 1 h of dark adaptation, as described (Genty *et al.*, 1989).

Pigment analyses

Samples were extracted in methanol and assayed spectrophotometrically to estimate chlorophyll and carotenoid contents. Specific absorption coefficients reported by Lichtenthaler and Wellburn (1983) were used.

Lipid peroxidation assay

Lipid peroxidation was determined by estimating lipid hydroperoxide content following the FOX assay described by Bou *et al.* (2010). Leaves were ground with a mortar and pestle with liquid nitrogen, homogenized in 50 mmol L^{-1} potassium phosphate buffer (pH 6) and centrifuged at 20 000 g for 25 min at 4 °C. To 50 μL of supernatant an equal volume of 10 mM triphenylphosphine (TPP) in methanol was added and incubated for 30 min in darkness at room temperature. Then, the sample was incubated in 190 μL of freshly prepared FOX-2 reagent (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) with 10 μL of sample (and the respective negative controls, as well as standards ranging from 0 to 20 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ used for calibration) and the absorbance was measured at 560 nm.

Vitamin E analyses

The extraction and analyses of tocopherols were performed as described by Amaral *et al.*, (2005). Briefly, leaf

samples were ground in liquid nitrogen and extracted with methanol until the extract was colourless. After 45 min in a Branson 2510 ultrasonic cleaner (Branson, Danbury, CT, USA), the samples were centrifuged for 15 min at 4 °C and transferred to HPLC vials. The HPLC equipment consisted of a system with a Waters 600 controller pump, a Waters 714 Plus autosampler and an FP-1520 fluorescence detector (Jasco, Tokyo, Japan). For the separation of both tocopherols, an Inertsil 100A (5 mm, 30 × 250 mm; GL Sciences Inc.) normal-phase column operating at room temperature was used. The mobile phase was a mixture of *n*-hexane and 1,4-dioxane (95.5 : 4.5, v/v). The system worked a flow rate of 0.7 mL min⁻¹, injecting 10 mL per sample. Detection was carried out at 295 nm for excitation and at 330 nm for emission. Quantification was based on the fluorescence signal response compared with authentic standards of α - and γ -tocopherol (Sigma-Aldrich).

JA profiling

The extraction and analyses of 12-*oxo*-phytodienoic acid (OPDA), which is the JA precursor, JA and JA-isoleucine (JA-Ile) were performed by ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry in tandem (UHPLC-MS/MS) as described by Müller and Munné-Bosch (2011), with some modifications. Leaf samples (50 mg) were ground using liquid nitrogen and 30 μ L of internal standard solution (d5-OPDA, d5-JA and d5-JA-Ile, 1 ppm) and 1.5 mL of methanol were added, and the samples were incubated for 30 min in a Branson 2510 ultrasonic cleaner (Branson) and centrifuged for 15 min at 4 °C. Re-extraction was performed with methanol, repeating the same procedure. Both supernatants were mixed, filtered through a 0.22 μ m PTFE filter (Waters Milford, MA, USA) and injected into the UHPLC-MS/MS system. The UHPLC 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 (2.7 mm, 2 × 75 mm) was used with a binary solvent system comprising acetonitrile (A) and deionized water (B), both containing 0.005 % (v/v) glacial acetic acid. Separation was performed using a gradient of increasing acetonitrile content, at a constant flow rate of 0.4 mL min⁻¹. The following gradient was used: 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. The MS/MS analyses were performed on an API 3000 triple quadrupole mass spectrometer (PE Sciex, Framingham, MA, USA). Results were corrected taking into account the specific recovery rates using internal deuterated standards.

Statistical analyses

Differences between treatments were evaluated by one- or two-way analysis of variance (ANOVA) and were considered significant at a probability level of $P \leq 0.05$.

RESULTS

Longevity of *A. thaliana* *vte1* and *vte4* mutants under contrasting P availabilities

The *vte4* and *vte1* mutants were morphologically indistinguishable, despite the *vte1* mutant lacking both α -tocopherol

and γ -tocopherol, and *vte4* lacking α -tocopherol and accumulating γ -tocopherol instead. The *vte1* mutant grown under control conditions, excess P and mild P deficiency showed reduced longevity, due to both accelerated flowering and senescence (Fig. 1). However, longevity decreased by 25 % (and senescence was accelerated by 40 %) in wild-type plants under severe P deficiency ($-P_2$) compared with both *vte1* and *vte4* mutants. The *vte4* mutant, which accumulates γ - instead of α -tocopherol, showed a phenotype similar to the wild type under control conditions, excess P and mild P deficiency, thus indicating a similar role for both α - and γ -tocopherol in the control of longevity under these conditions. However, under severe P deficiency ($-P_2$), senescence was accelerated in the wild type, and both *vte* mutants did respond similarly, thus indicating that α -tocopherol, but not γ -tocopherol, promotes senescence under severe P limitation (Fig. 1). It is also worth mentioning that flowering occurred on average 25, 27 and 30 d after germination in the wild type, *vte4* and *vte1* mutants, respectively, under control conditions, indicating delayed flowering in the *vte* mutants relative to the wild type (Fig. 1). Furthermore, rosette and reproductive biomasses of wild-type plants and both *vte* mutants were reduced by 70–80 % in response to severe P deficiency (Fig. 2). Vegetative (rosette) and reproductive biomass was higher in the *vte1* mutant compared with the other two genotypes under mild P limitation and excess P ($-P_1$ and $+P$, respectively; Fig. 2).

Vitamin E increased PSII inactivation in the wild type under severe P limitation

α -Tocopherol accumulated in leaves of the wild type both under mild and severe P starvation, while γ -tocopherol accumulated in the *vte4* mutant under severe P limitation only (Fig. 3). As expected, the *vte1* mutant accumulated neither α - nor β -tocopherol in leaves (Fig. 3). Various photo-oxidative stress markers, including pigment (both chlorophyll and carotenoid) levels, the efficiency of PSII photochemistry and the extent of lipid peroxidation (measured as lipid hydroperoxide accumulation) revealed some differences in photoprotection strategies between the three genotypes (Fig. 4). Chlorophyll and lipid hydroperoxide contents of the *vte* mutants were similar to those of wild-type plants in all tested conditions, except for reduced chlorophyll and lipid hydroperoxide levels in the *vte4* mutant under severe P limitation (Fig. 4). The maximum efficiency of PSII photochemistry (F_v/F_m ratio), which is an indicator of inhibition of the photosynthetic apparatus, decreased more in wild-type plants (by 59 %) than in the *vte* mutants (20–25 %) under severe P deficiency. Increased longevity of the *vte1* and *vte4* mutants under severe P deficiency was therefore associated with improved PSII efficiency. In other words, accelerated senescence under severe P deficiency in the wild type was associated with photoinhibition of PSII. Interestingly, wild-type plants accumulated not only more α -tocopherol but also more carotenoids in senescing tissues under severe P limitation (Fig. 4). Therefore, increased PSII inactivation was paradoxically observed despite higher tocopherol and carotenoid accumulation in wild-type plants under severe P starvation.

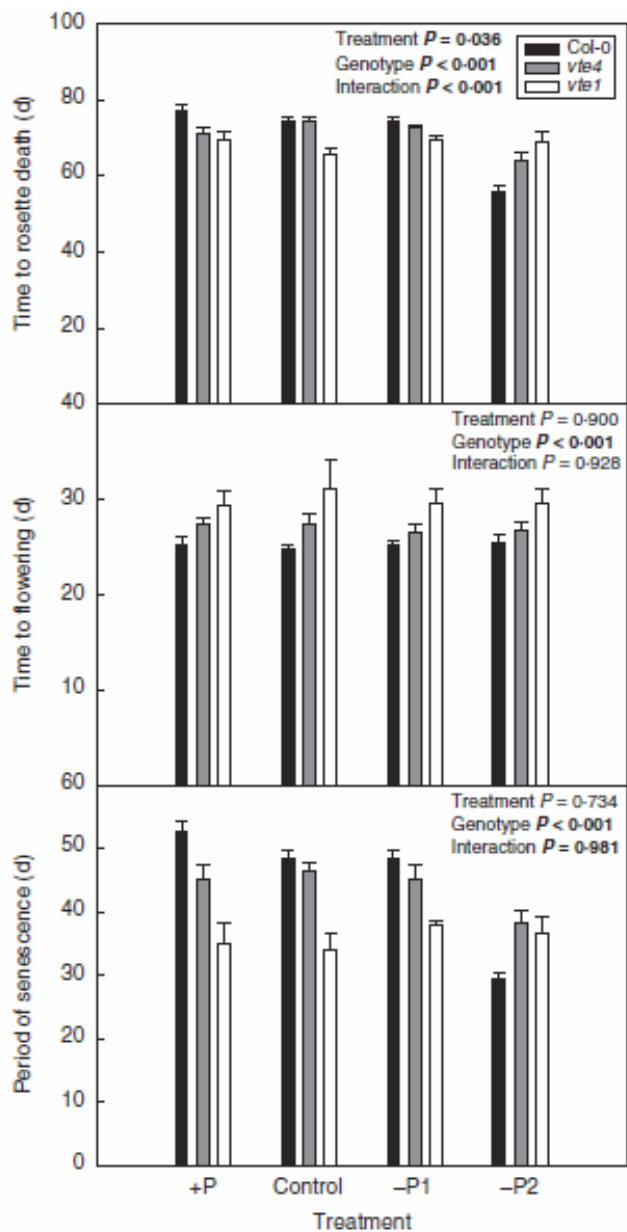


FIG. 1. Longevity (time from germination to rosette death), time to flowering (first flower) and senescence period (time to rosette death minus time to flowering) of wild type (Col-0) and *vte4* and *vte1* mutants (see key) of *A. thaliana* grown under various P availabilities (+P, C, -P1 and -P2 represent various P concentrations in the nutrient solution; see Materials and methods for details). Data represent the mean \pm s.e. of $n = 35$ individuals. Significant differences between treatments, genotypes and their interaction (treatment \times genotype) were analysed by two-way ANOVA ($P \leq 0.05$).

Trade-offs between vitamin E and JA accumulation in senescing leaves

We investigated JA levels in leaves to unravel the effects of P availability and tocopherol accumulation on the potential to synthesize defence chemicals. The levels of OPDA, JA and JA-Ile increased under severe P deficiency in all genotypes (Fig. 5). The extent of this accumulation differed, however, between genotypes depending on treatment. Under severe P limitation the

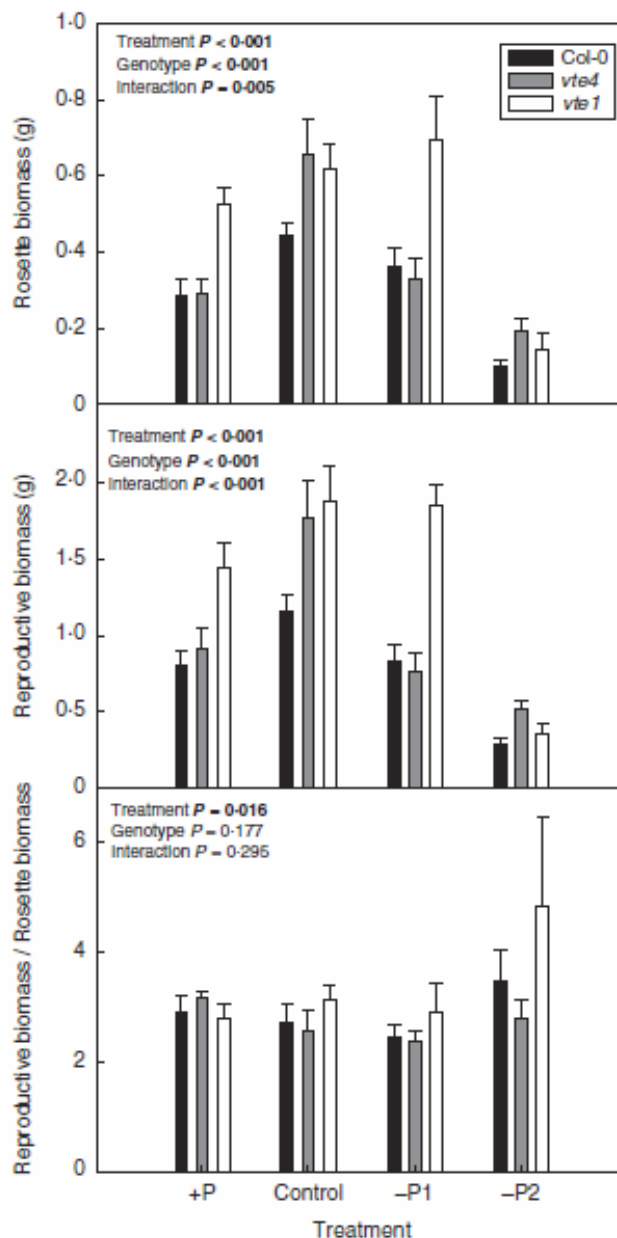


FIG. 2. Rosette biomass, reproductive biomass and ratio of reproductive to rosette biomass in wild type (Col-0) and *vte4* and *vte1* mutants (see key) of *A. thaliana* grown under various P availabilities (+P, C, -P1 and -P2 represent various P concentrations in the nutrient solution; see Materials and methods for details). Data represent the mean \pm s.e. of $n = 35$ individuals. Significant differences between treatments, genotypes and their interaction (treatment \times genotype) were analysed by two-way ANOVA ($P \leq 0.05$).

vte4 mutant showed a very sharp increase in OPDA levels, attaining 2-fold higher levels than the *vte1* mutant and the wild type. Note that lipid hydroperoxide levels were lower in the *vte4* mutant compared with *vte1* and the wild type under these conditions (Fig. 4), thus suggesting increased conversion of lipid hydroperoxides to OPDA in the *vte4* mutant under severe P deficiency. Interestingly, this increased OPDA production did not result in concomitant increases in JA or JA-Ile levels under severe P limitation (Fig. 5). Furthermore, JA levels were higher

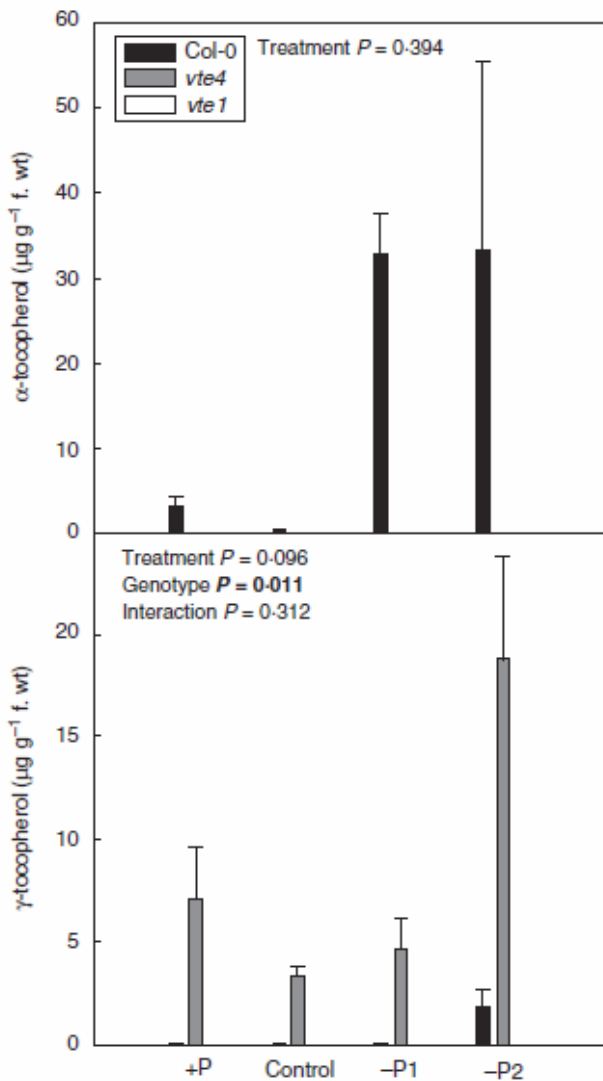


FIG. 3. Levels of α - and γ -tocopherol in wild type (Col-0) and *vte4* and *vte1* mutants (see key) of *A. thaliana* grown under various P availabilities (+P, C, -P1 and -P2 represent various P concentrations in the nutrient solution; see Materials and methods for details). Data represent the mean \pm s.e. of $n = 5$ individuals. Significant differences between treatments, genotypes and their interaction (treatment \times genotype) were analysed by two-way ANOVA ($P \leq 0.05$). Note that both tocopherols were absent in the *vte1* mutant, while the *vte4* mutant accumulated γ - instead of α -tocopherol.

in the *vte1* mutant compared with the other two genotypes under mild P limitation and excess P (-P1 and +P, respectively; Fig. 5). Higher JA levels were observed in parallel with increased vegetative and reproductive growth in the *vte1* mutant compared with the other two genotypes under these conditions (Fig. 2).

DISCUSSION

Longevity of *A. thaliana* *vte1* and *vte4* mutants under contrasting P availabilities

α -Tocopherol deficiency in the *vte1* mutant reduced longevity under control conditions, excess P and mild P deficiency, but it

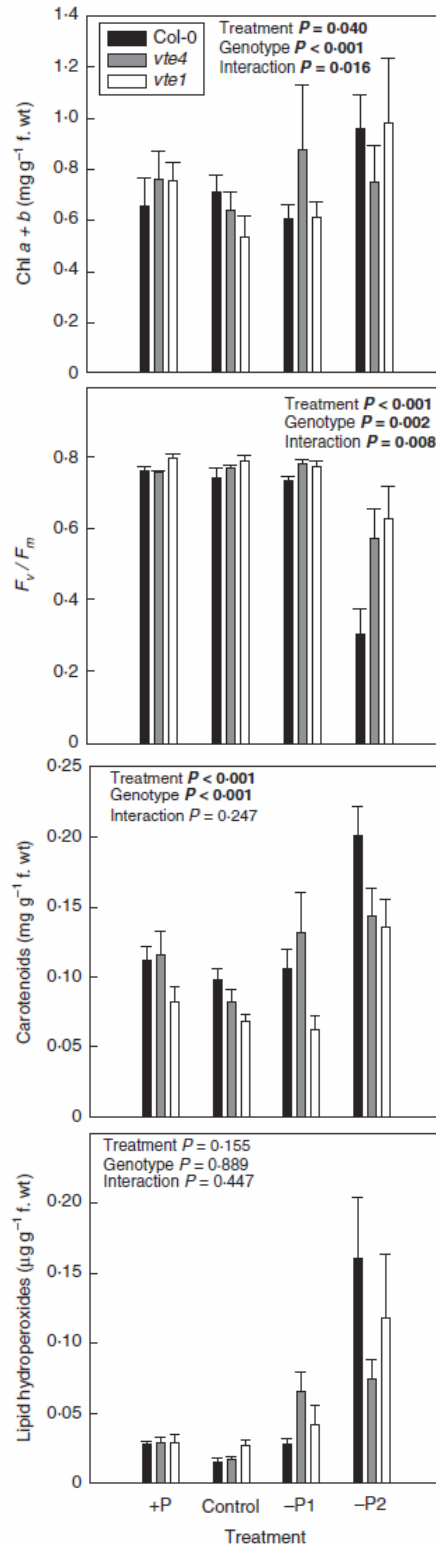


FIG. 4. Chlorophyll (Chl) a + b levels, maximum PSII efficiency of PSII photochemistry (F_v/F_m ratio), total carotenoid levels and extent of lipid peroxidation (estimated as hydroperoxide levels) in wild type (Col-0) and *vte4* and *vte1* mutants (see key) of *A. thaliana* grown under various P availabilities (+P, C, -P1 and -P2 represent various P concentrations in the nutrient solution; see Materials and methods for details). Data represent the mean \pm s.e. of $n = 5$ individuals. Significant differences between treatments, genotypes and their interaction (treatment \times genotype) were analysed by two-way variance ANOVA ($P \leq 0.05$).

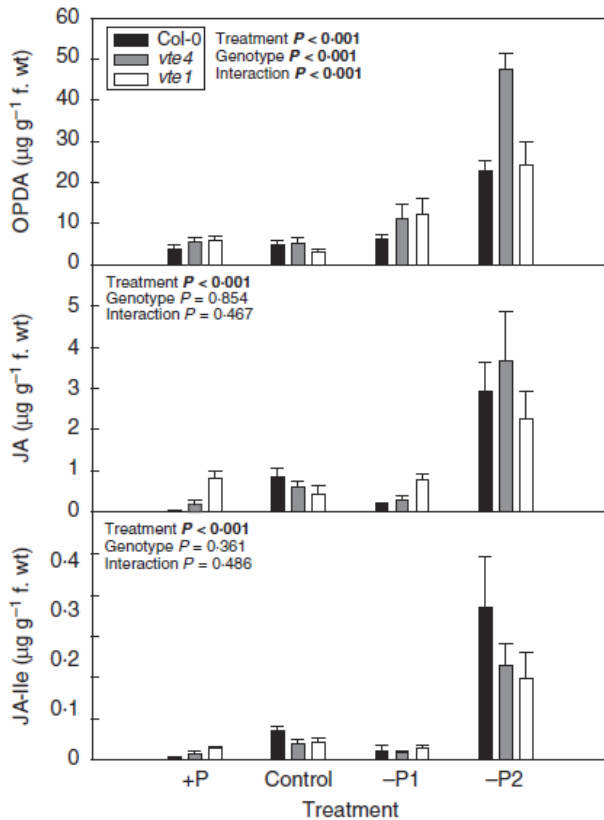


FIG. 5. Jasmonate profiling, including levels of OPDA (JA precursor), JA, and JA-Ile in the rosette leaves of wild type (Col-0) and *vte4* and *vte1* mutants (see key) of *A. thaliana* grown under various P availabilities (+P, C, -P1 and -P2 represent various P concentrations in the nutrient solution; see Materials and methods for details). Data represent the mean mean \pm s.e of $n = 5$ individuals. Significant differences between treatments, genotypes and their interaction (treatment \times genotype) were analysed by two-way ANOVA ($P \leq 0.05$).

paradoxically increased longevity under severe P deficiency. Interestingly, accelerated senescence was also observed in transgenic tobacco plants with *a*-tocopherol deficiency (Abbasi *et al.*, 2007), and the same plants showed delayed senescence under salt stress (Asensi-Fabado *et al.*, 2014). It therefore appears that growth conditions strongly modulate the effects of vitamin E in the control of longevity. Although little is known about the specific roles of *a*- and γ -tocopherol in the control of longevity and senescence, our results suggest similar roles for both *a*- and γ -tocopherol in the control of longevity under some conditions (control, excess P and mild P deficiency) and different roles in others (severe P starvation). This suggests that the effects of tocopherols in the modulation of longevity under control conditions, excess P and mild P deficiency may have an important antioxidant component, since the antioxidant capacity of both tocopherol forms is similar in biological membranes (Kamal-Eldin and Appelqvist, 1996), but *a*-tocopherol may exert an additional specific role, which could not be mimicked by γ -tocopherol, under severe P limitation. Since Asensi-Fabado *et al.* (2014) have shown that sugar signalling (and not oxidative stress) is a key component of the observed phenotype in salt-stressed tobacco plants, it is tempting to speculate that altered cell signalling may be responsible for the increased

longevity observed in the present study in the *vte1* mutant under severe P starvation, an aspect that warrants further investigation.

Vitamin E paradoxically increased PSII inactivation in the wild type under severe P limitation

Tocopherols are unique in terminating lipid peroxidation chain reactions (Munné-Bosch and Alegre, 2002; Havaux *et al.*, 2005; Schneider, 2005; Traber and Stevens, 2011) and control singlet oxygen levels in thylakoid membranes in cooperation with carotenoids, thus preventing irreversible photo-inactivation of PSII (Munné-Bosch and Alegre, 2002; Havaux *et al.*, 2005). Previous studies using vitamin E-deficient *A. thaliana* mutants have shown that tocopherols can modulate extraplasmidic polyunsaturated fatty acid (PUFA) metabolism, this effect strongly modulating low-temperature adaptation (Maeda *et al.*, 2008). In addition, it has been suggested that vitamin E may be involved in cellular signalling by modulating the expression levels of some genes related to ethylene biosynthesis, perception and signalling (Cela *et al.*, 2011). Increased PSII inactivation, as indicated by drastic reductions in the *Fv/Fm* ratio, was observed in the wild type under severe P deficiency, thus indicating that vitamin E, and *a*-tocopherol in particular, accelerates senescence under severe P limitation. Since this effect appears to be specific for *a*-tocopherol and is not observed in the *vte4* mutant, it is likely that PSII inactivation results from accelerated autophagy during senescence irrespective of the antioxidant capacity of *a*-tocopherol in chloroplasts to protect the photosynthetic apparatus. It should be noted that wild-type plants contained not only more *a*-tocopherol but also more carotenoids, thus suggesting that the antioxidant capacity to control singlet oxygen accumulation is not only not compromised, but enhanced. It therefore appears that the senescence-promoting effect of *a*-tocopherol under severe P starvation is not associated with oxidative stress, but with non-antioxidant effects, as happens in salt-stressed tobacco plants (Asensi-Fabado *et al.*, 2014). The specific role of *a*-tocopherol in the control of autophagy processes, in particular those linked to sugar signalling, warrants further investigation.

Linking vitamin E and JAs in plants

Evidence obtained thus far in mutants defective in thermal energy dissipation and antioxidant protection suggest a link between increased reactive oxygen species levels, increased oxylipin levels and increased defences against certain pests or pathogens, so that a defect in photoprotective capacity can lead to altered responses to biotic stress (for a reviews see Demmig-Adams *et al.*, 2013, 2014). In our study, increased JA accumulation was observed in the *vte1* and *vte4* mutants, particularly in the *vte4* mutant, in which there was a 2-fold increase in OPDA level under severe P limitation, and in the *vte1* mutant, which showed sharp increases in both JA and JA-Ile levels under excess P, and additionally in JA levels under mild P starvation. The increased OPDA level in the *vte4* mutant under severe P limitation did not result in increased JA and/or JA-Ile levels, but was associated with reduced lipid hydroperoxide levels, thus suggesting increased channelling of oxylipins towards

OPDA under these conditions. OPDA serves as a precursor of JA, but it also activates biotic defence independently of JA (Danon *et al.*, 2005; Taki *et al.*, 2005). However, it is unknown why OPDA, and not other JAs, specifically accumulated in this mutant. By contrast, JA and/or JA-Ile accumulated in response to excess P or mild P deficiency in the *vte1* mutant. This was particularly true for JA, the *vte1* mutant showing 5- and 10-fold higher levels than the wild type under excess P and mild P starvation, respectively. A similar response was also observed in another *vte1* *A. thaliana* mutant line exposed to a combination of high light and low temperatures (Munné-Bosch *et al.*, 2007). It therefore appears that reduced photoprotection in vitamin E-deficient mutants favours the capacity to synthesize chemical defences, such as JAs, under abiotic stress conditions, thus suggesting a trade-off between different defence pathways in plants (photoprotection versus potential chemical defence to necrotrophs through JAs). It is concluded that tocopherols play an important role in controlling longevity, the effects depending on P availability. While both α - and γ -tocopherol prevent senescence under control conditions, excess P or mild P starvation, α -tocopherol, but not γ -tocopherol, accelerates senescence under severe P deficiency. Furthermore, vitamin E deficiency increases JAs levels, suggesting a trade-off between photoprotection and the activation of biotic defences.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are very grateful to the Serveis Científic-tècnics (University of Barcelona) for technical assistance and Kathleen Brückner (University of Kiel, Germany) for providing seeds of *vte1* and *vte4* mutants. We are also indebted to Melanie Morales, Maren Müller and Laura Siles (University of Barcelona) for their support in hormone and vitamin E analyses. Support for the research was received through grant BFU2012-32057 from the Ministry of Science and Innovation of the Spanish Government, and the ICREA Academia prize to S.M.B., funded by the Catalan Government. B.S. holds a fellowship from the Ministry of Science and Innovation of the Spanish Government.

LITERATURE CITED

Abbasi AR, Hajirezaei M, Hofius D, Sonnewald U, Voll LM. 2007. Specific roles of α - and γ -tocopherol in abiotic stress responses of transgenic tobacco. *Plant Physiology* 143: 1720–1738.

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.

Asensi-Fabado MA, Ammon A, Sonnewald U, Munné-Bosch S, Voll LM. 2014. Tocopherol deficiency reduces sucrose export from salt-stressed potato leaves independently of oxidative stress and symplastic obstruction by callose. *Journal of Experimental Botany* 66: 957–971.

Bergmüller E, Porfirova S, Dörmann P. 2003. Characterization of an *Arabidopsis* mutant deficient in α -tocopherol methyltransferase. *Plant Molecular Biology* 52: 1181–1190.

Bou R, Chen B, Guardiola F, Codony R. 2010. Determination of lipid and protein hydroperoxides using the fluorescent probe. *Food Chemistry* 123: 892–900.

Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, *et al.* 2001. Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* 13: 1499–1510.

Cela J, Chang C, Munné-Bosch S. 2011. Accumulation of γ - rather than α -tocopherol alters ethylene signaling gene expression in the *vte4* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 52: 1389–1400.

Cordella D, Drangerta J-O, White S, *et al.* 2009. The story of phosphorus: Global security and food for thought. *Global Environmental Change* 19:292–305.

Danon A, Miersch O, Felix G, Camp RG, Apel K. 2005. Concurrent activation of cell death-regulating signalling pathways by singlet oxygen in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 41: 68–80.

Demmig-Adams G, Garab, W Adams III, Govindjee. eds. *Non-photochemical quenching and energy dissipation in plants, algae and cyanobacteria. Advances in Photosynthesis and Respiration*, Vol. 40. Dordrecht: Springer.

Demmig-Adams B, Cohu CM, Amiard V, *et al.* 2013. Emerging trade-offs – impact of photoprotectants (PsbS, xanthophylls, and vitamin E) on oxylipins and biotic defense. *New Phytologist* 197: 720–729.

Demmig-Adams B, Stewart JJ, Adams WW III. 2014. Chloroplast photoprotection and the trade-off between abiotic and biotic defense. In: B Distelfeld A, Avni R, Fischer AM. 2014. Senescence, nutrient remobilization, and yield in wheat and barley. *Journal of Experimental Botany* 65: 3783–3798.

Duff SMG, Sarah G, Plaxton WC. 1994. The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiologia Plantarum* 90: 791–800.

Falk J, Munné-Bosch S. 2010. Tocochromanol functions in plants: antioxidant and beyond. *Journal of Experimental Botany* 61: 1549–1566.

Frank A. 2013. *Chemistry of plant phosphorus compounds*. Waltham, MA: Elsevier.

Genty B, Briantais JL, Baker NR. 1989. The relationship between quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990: 87–92.

Hammond JP, White PJ. 2008. Sucrose transport in the phloem: integrating root responses to phosphorus starvation. *Journal of Experimental Botany* 59: 93–109.

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.

Juvany M, Müller M, Munné-Bosch S. 2014. Photo-oxidative stress in emerging and senescing leaves: a mirror image? *Journal of Experimental Botany* 64: 3087–3098.

Kamal-Eldin A, Appelqvist L-Å. 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31: 671–701.

Lichtenthaler HK, Wellburn AR. 1983. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 11: 591–592.

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.

Maeda H, Sage TL, Isaac G, Welti R, DellaPenna D. 2008. Tocopherols modulate extraplastidic polyunsaturated fatty acid metabolism in *Arabidopsis* at low temperature. *Plant Cell* 20: 452–470.

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.

Munné-Bosch S. 2005. The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *Journal of Plant Physiology* 162: 743–748.

Munné-Bosch S, Alegre L. 2002. The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 57: 21–31.

Munné-Bosch S, Weiler EW, Alegre L, Müller M, Duchting P, Falk J. 2007. α -Tocopherol may influence cellular signaling by modulating jasmonic acid levels in plants. *Planta* 225: 681–691.

Munné-Bosch S, Queval G, Foyer CH. 2013. The impact of global change factors on redox signaling underpinning stress tolerance. *Plant Physiology* 161: 1–16.

Porfirova S, Bergmüller E, Trof S, Lemke R, Dörmann P. 2002. Isolation of an *Arabidopsis* mutant lacking vitamin E and identification of a cyclase essential for all tocopherol biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 99: 12495–12500.

Schneider C. 2005. Chemistry and biology of vitamin E. *Molecular Nutrition & Food Research* 49: 7–30.

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* 79: 2142–2148.

Simancas & Munné-Bosch — Vitamin E, phosphorus availability and longevity

- Taki N, Sasaki-Sekimoto Y, Obayashi T, *et al.* 2005. 12-Oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139: 1268–1283.
- Traber MG, Stevens JF. 2011. Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radical Biology and Medicine* 51: 1000–1013.
- White PJ, Hammond JP. 2008. *The ecophysiology of plant-phosphorus interactions*. Dordrecht: Springer.
- Wingler A, Von Schaewen A, Leegood RC, Lea PJ, Paul Quick W. 1998. Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars, and light: effects on NADH-dependent hydroxypyruvate reductase. *Plant Physiology* 116: 329–335.

Capítulo 2. Reprogramación transcripcional de los mecanismos de defensa en mutantes deficientes en Vitamina E de *Arabidopsis thaliana* L. expuestos a distintas disponibilidades de fósforo

Chapter 2: Defense-Related Transcriptional Reprogramming in Vitamin E-deficient Arabidopsis Mutants Exposed to Contrasting Phosphate Availability

Annapurna Devi Allu^{1†}, Bárbara Simancas^{2†}, Salma Balazadeh¹, Sergi Munné-Bosch²

¹ Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Instituto Max-Planck de Fisiología Molecular de Plantas (Alemania)

² Departamento de Biología Evolutiva, Ecología y Ciencias Ambientales, Unidad de Fisiología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, Barcelona, España.

† coautores (ambos autores han participado por igual en la elaboración del trabajo)

Publicado en **Frontiers in Plant Sciences** (2017) 8, 1396.
doi.org/10.3389/fpls.2017.01396



Resumen del Capítulo 2

En este trabajo se trató de estudiar el efecto de la deficiencia de vitamina E en *Arabidopsis thaliana* L. en relación al contenido de fitohormonas, nutrientes y de expresión de sus factores de transcripción en distintas disponibilidades de fósforo. Los mutantes estudiados fueron el *vte1* y *vte4* (con una inserción de T-DNA en la tocoferol ciclasa (VTE1) y γ -tocoferol metiltransferasa (VTE4) respectivamente). Las plantas se sometieron a dos concentraciones de P_i (solución control con 1mM de fosfato potásico y solución deficiente en P_i con 0.5mM), y tras una fase de recuperación, se regaron con solución control o de nuevo con solución deficiente en P_i para estudiar si existe algún tipo de memoria en su respuesta al estrés reiterado (*priming*).

En la planta silvestre, el contenido de α -tocoferol aumentó significativamente en respuesta al *priming*, junto con un incremento de su crecimiento, indicativo de un efecto de memoria ante el estrés reiterado. Sin embargo, este efecto estimulador del crecimiento no se observó en mutantes *vte*. El perfil hormonal reveló efectos significativos ante la distinta cantidad de P_i en el contenido de JA y SA, y los mutantes *vte* mostraron una mayor acumulación de ambas hormonas ante la menor cantidad de P_i . Además, el perfil de expresión de 1.880 factores de transcripción por qRT-PCR reveló un efecto pronunciado del *priming* en los niveles de transcripción de 45 factores de transcripción asociados principalmente con el crecimiento y el estrés. Por ello, se concluye que el α -tocoferol juega un papel importante en la respuesta de las plantas a la disponibilidad de P_i , no sólo protegiendo las plantas del estrés foto-oxidativo, sino también ejerciendo un control sobre la reprogramación transcripcional relacionada con el crecimiento y la defensa mediante la modulación hormonal.



Defense-Related Transcriptional Reprogramming in Vitamin E-Deficient Arabidopsis Mutants Exposed to Contrasting Phosphate Availability

Annapurna D. Allu^{1,2†}, Bárbara Simancas^{3†}, Salma Balazadeh^{1,2} and Sergi Munné-Bosch^{3*}

¹ Institute of Biochemistry and Biology, University of Potsdam, Potsdam-Golm, Germany, ² Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Potsdam, Germany, ³ Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Hongbo Gao,
Beijing Forestry University, China

Reviewed by:

Deqiang Duanmu,
Huazhong Agricultural University,
China
Keke Yi,
Chinese Academy of Agricultural
Sciences, China

*Correspondence:

Sergi Munné-Bosch
smunne@ub.edu

† These authors have contributed
equally to this work.

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 17 April 2017

Accepted: 26 July 2017

Published: 10 August 2017

Citation:

Allu AD, Simancas B, Balazadeh S
and Munné-Bosch S (2017)
Defense-Related Transcriptional
Reprogramming in Vitamin E-Deficient
Arabidopsis Mutants Exposed
to Contrasting Phosphate Availability.
Front. Plant Sci. 8:1396.
doi: 10.3389/fpls.2017.01396

Vitamin E inhibits the propagation of lipid peroxidation and helps protecting photosystem II from photoinhibition, but little is known about its possible role in plant response to Pi availability. Here, we aimed at examining the effect of vitamin E deficiency in *Arabidopsis thaliana vte* mutants on phytohormone contents and the expression of transcription factors in plants exposed to contrasting Pi availability. Plants were subjected to two doses of Pi, either unprimed (controls) or previously exposed to low Pi (primed). In the wild type, α -tocopherol contents increased significantly in response to repeated periods of low Pi, which was paralleled by increased growth, indicative of a priming effect. This growth-stimulating effect was, however, abolished in *vte* mutants. Hormonal profiling revealed significant effects of Pi availability, priming and genotype on the contents of jasmonates and salicylates; remarkably, *vte* mutants showed enhanced accumulation of both hormones under low Pi. Furthermore, expression profiling of 1,880 transcription factors by qRT-PCR revealed a pronounced effect of priming on the transcript levels of 45 transcription factors mainly associated with growth and stress in wild-type plants in response to low Pi availability; while distinct differences in the transcriptional response were detected in *vte* mutants. We conclude that α -tocopherol plays a major role in the response of plants to Pi availability not only by protecting plants from photo-oxidative stress, but also by exerting a control over growth- and defense-related transcriptional reprogramming and hormonal modulation.

Keywords: antioxidants, photosystem II, plastochromanol-8, priming, retrograde signaling, tocochromanols, vitamin E

INTRODUCTION

Tocopherol cyclase (VTE1), which is located in plastoglobules (Vidi et al., 2006), is a key enzyme for the biosynthesis of both plastochromanol-8 and vitamin E compounds (Sattler et al., 2003; Szymanska and Kruk, 2010). As the content of plastoglobules is in equilibrium with thylakoid membranes (Austin et al., 2006), both plastochromanol-8 and vitamin E compounds are found in

thylakoids. These together fulfill an antioxidant function protecting lipids from the propagation of lipid peroxidation and prevent photosystem II damage, the latter function being performed together with carotenoids (Munné-Bosch and Alegre, 2002; Havaux et al., 2005; Falk and Munné-Bosch, 2010; Zbiezjak et al., 2010; Kruk et al., 2014). Apart from this antioxidant function, tocopherols may play a major role in cellular signaling by influencing redox, hormonal, and sugar regulatory networks, an aspect that has already been shown in key developmental processes such as seed germination (Mène-Saffrané et al., 2010) or leaf senescence (Abbasi et al., 2009), and plant responses to abiotic stresses, including salinity (Abbasi et al., 2007; Cela et al., 2011; Asensi-Fabado et al., 2015), osmotic stress (Abbasi et al., 2007), high light (Munné-Bosch et al., 2007), low temperatures (Maeda et al., 2008), and water deficit (Cela et al., 2011). Although a previous study has shown that vitamin E and inorganic phosphate (Pi) availability exert a complex interplay in the control of longevity in *Arabidopsis thaliana* (Simancas and Munné-Bosch, 2015), nothing is known about the possible influence of vitamin E on plant response to contrasting Pi availability.

The response of plants to several environmental stress factors, including low phosphate availability in soils, involves intricate regulatory networks governed by various signaling molecules. Pi is a major macro element source for plant growth; hence one of the most prominent effects of Pi starvation is reduced plant growth (Marschner, 2012). However, to maintain cellular Pi homeostasis under conditions of Pi starvation, plants have evolved a series of adaptive responses such as limiting Pi consumption and internally adjusting Pi recycling (Sato and Miura, 2011). Several hormones such as abscisic acid (ABA), ethylene, auxin, and cytokinin have been shown to be involved in plant response to varying Pi availability conditions (Franco-Zorrilla et al., 2004; Rubio et al., 2009). Plants coordinate Pi homeostasis with its carbon status and photosynthesis through sophisticated mechanisms and phytohormones play a crucial role in cross-talking the Pi starvation with sugar signaling (Franco-Zorrilla et al., 2004; Wissuwa et al., 2005; Rubio et al., 2009). Cytokinins negatively regulate Pi starvation responses and its content is reduced under Pi starvation (Yang and Finnegan, 2010). Cytokinins are also proposed to be interacting with sugars in Pi starvation signaling (Franco-Zorrilla et al., 2005). Both auxin (auxin-dependent and independent) and ethylene pathways are known to regulate root architecture in response to Pi availability (Franco-Zorrilla et al., 2004; Rouached et al., 2010). Impaired ABA sensitivity (*abi2-1*) or biosynthesis (*aba1*) mutants display reduced Pi-responsive gene expression and anthocyanin accumulation (Trull et al., 1997; Ciereszko and Kleczkowski, 2002). Furthermore, the gibberellin-DELLA signaling pathway plays a role in the regulation of plant stature, root architecture changes, and anthocyanin accumulation under low Pi-conditions involving ubiquitin-mediated protein degradation (Jiang et al., 2007).

Extensive gene expression changes that integrate signals from external and internal factors are indispensable in the execution of evolved intricate adaptive strategies under low Pi conditions and are witnessed by transcriptome analysis in several plant

species (Yang and Finnegan, 2010). Transcription factors (TFs) are the major regulators of stress-associated gene expression changes. Several recent studies have identified TFs involved in the regulation of Pi availability-related gene expression changes. PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1 (PHR1), a member of the MYB TF super family was identified in a mutant screen, where the mutants are impaired in Pi-responsive transcript and anthocyanin accumulation (Rubio et al., 2001; Bari et al., 2006). *OsPHR1* and 2, the two *AtPHR1* orthologs in rice, have been identified to regulate the Pi-deficiency response similar to that in *Arabidopsis* (Zhou et al., 2008). Further, a Pi-starvation induced TF, MYB62, plays a major role during Pi limitation resulting in changes in root length, root phosphatase activity, and anthocyanin accumulation. The MYB62-mediated Pi starvation response has been proposed to act through the regulation of gibberellin levels (Devaiah et al., 2009; Yang and Finnegan, 2010). Few other TFs that were identified to have a functional role in the Pi starvation response include *Arabidopsis* ZAT6, bHLH32, PTF1, WRKY75, and rice *OsWRKY74*, among others (Yi et al., 2005; Chen et al., 2007; Devaiah et al., 2007a,b; Dai et al., 2016). Importantly, these TFs act as nodes in the crosstalk between Pi starvation- and hormone-signaling in regulating the plant response to Pi limitation (Rouached et al., 2010), but only a few TFs have been identified so far.

Despite Pi addition is a common practice to increase yield in cultivated plants and plant response to low Pi has been studied in detail, the underlying mechanisms explaining plant response to reiterated changes in Pi availability has been poorly studied to date. In poplar, it was found that stem cuttings derived from sites with lower Pi availability established worse, irrespective of Pi level after transplantation, which was correlated with differences in DNA methylation (Schönberger et al., 2016). Epigenetic modifications are of high interest to better understand priming or memory effects and may serve as an excellent basis to better exploit Pi resources, an important nutrient that is very likely to become limited in the near future (Herrera-Estrella and López-Arredondo, 2016). In this respect, current genetic resources in the model plant *A. thaliana* can be used to better understand priming effects in plant response to contrasting Pi availability.

Chloroplast-nuclear retrograde signaling regulates gene expression, but its integration with redox and hormonal signaling is still poorly understood (Pfannschmidt and Munné-Bosch, 2013). It has been shown that changes in the vitamin E composition in chloroplasts profoundly alters gene expression in the nucleus, particularly of ethylene-related signaling genes, including *ERF1* (Cela et al., 2011), an essential regulatory hub of ethylene, jasmonic acid, and ABA signaling (Müller and Munné-Bosch, 2015). Recently, transorganellar complementation has also revealed that vitamin E can access the lumen of the endoplasmic reticulum without necessarily involving transporters (Mehrshahi et al., 2013), which opens the possibility of vitamin E directly influencing redox signaling outside chloroplasts.

In the current study, with the aim of getting new insights into the possible retrograde signaling function of vitamin E as an antioxidant in chloroplasts, we examined the response of wild

type and vitamin E-deficient *A. thaliana* plants to contrasting levels of Pi availability, including a priming treatment. We aimed at understanding the effect of varying Pi availability on the expression of whole TFs that govern the downstream gene expression changes orchestrating plant growth and response to low Pi conditions. Emphasis was put on the possible effects of vitamin E deficiency on TFs and hormonal profiling.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material, Treatments, and Sampling

Seeds of *A. thaliana* Columbia ecotype (Col-0), and *vte1* (GK_111D07) and *vte4* (SALK_036736) mutants were used in this study. *vte1* and *vte4* mutants have T-DNA insertions in the *VTE1* and *VTE4* genes (Porfirova et al., 2002; Bergmüller et al., 2003), 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 (Figure 1).

Seeds were cold-stratified and sown in 0.1 L-pots in soil (Einheitserde GS90; Gebrüder Patzer) in a climate-controlled chamber with a 8-h day length provided by fluorescent light at $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a day/night temperature of 20/16.8°C and a relative humidity of 60/75% (day/night). Prior to treatments, plants were watered every third day during 23 days with high Pi nutrient solution containing 5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 5 mM KNO_3 , 2 mM MgSO_4 , 1 mM KH_2PO_4 , and 5 g/L iron chelate (EDTA FeNa). Next, plants were divided into four sets and were subjected to varying phosphate treatments (Figure 2). One set of plants was supplied with the same high Pi nutrient solution (containing 1 mM KH_2PO_4) every other day throughout the experiment (high Pi-plants). Contrasting Pi levels were then supplied to the other three set of plants by using 0.5 mM instead of 1 mM KH_2PO_4 in the nutrient solution (low Pi). This nutrient solution was supplied with 0.5 mM KCl to compensate for K deficiency. Typically, low Pi (0.1 mM) and high Pi (ranging between 0.5 and 2.5 mM) are used in studies on Pi starvation in *A. thaliana* (Williamson et al., 2001). However, our studies indicated that 0.5 mM Pi is an adequate concentration to induce priming effects ultimately resulting in enhanced growth (Figure 3).

Samplings were performed at midday (in the middle of the photoperiod) at the end of treatments. Whole rosettes of six individuals were used to estimate leaf water contents, chlorophyll levels, the F_v/F_m ratio, and the levels of plastochromanol-8 and vitamin E, as well as the TFs and hormonal profiling. Samples for biochemical and transcriptional analyses were collected, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

Leaf Water and Nutrient Content, Chlorophyll Level, F_v/F_m ratio and Lipid Peroxidation

Samples were weighed to estimate the fresh matter (FW), immersed in distilled water at 4°C for 24 h to estimate the turgid matter (TW) and then oven-dried at 80°C to constant

weight to estimate the dry matter (DW). Relative water content (RWC) was then calculated as $100 \times (\text{FW} - \text{DW}) / (\text{TW} - \text{DW})$. For analyses of macro- and micronutrients (P, S, Ca, Mg, K, Na, Mn, Zn, Fe, Mo, B, Cu, and Si), dried samples were weighed, digested with HNO_3 , and analyzed by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES). For pigment analysis, measurements were performed using a SPAD 502 Plus chlorophyll meter. The maximum efficiency of the photosystem II (F_v/F_m ratio) was determined measuring the chlorophyll fluorescence of leaves by using a pulse-modulated fluorometer (Mini PAM; Walz, Effeltrich, Germany) as described by Genty et al. (1989). The extent of lipid peroxidation was estimated by measuring the levels of malondialdehyde (MDA) in leaves. MDA levels were estimated spectrophotometrically following the thiobarbituric acid-reactive assay considering the effect of potential interfering compounds, as described (Hodges et al., 1999).

Tocochromanol Contents

For analyses of vitamin E and plastochromanol-8 contents, leaf samples (50 mg) were ground in liquid nitrogen and extracted with cold methanol (v/v) using ultra-sonication. After centrifuging at 8000 rpm for 10 min and 4°C, the supernatant was collected and the pellet re-extracted with the same solvent until it was colorless; then, supernatants were pooled, filtered, and injected into the HPLC. Tocochromanols were separated isocratically on a normal-phase HPLC system using a fluorescent detector as described (Cela et al., 2011). Compounds were identified by co-elution with authentic standards and quantified by using a calibration curve.

Transcription Factor Profiling

For the large-scale TF (a total of 1,880 TFs) profiling using qRT-PCR, total RNA was extracted from whole rosette leaves. Primer sequences are provided in Supplementary Table 10. Total RNA extraction, synthesis of cDNA, and qRT-PCR were performed as described (Caldana et al., 2007). ACTIN2 was used as reference gene. PCR reactions were run on an ABI PRISM 7900HT sequence detection system (Applied Biosystems Applied), and SYBR Green (Life Technologies) was used for visualizing amplified products.

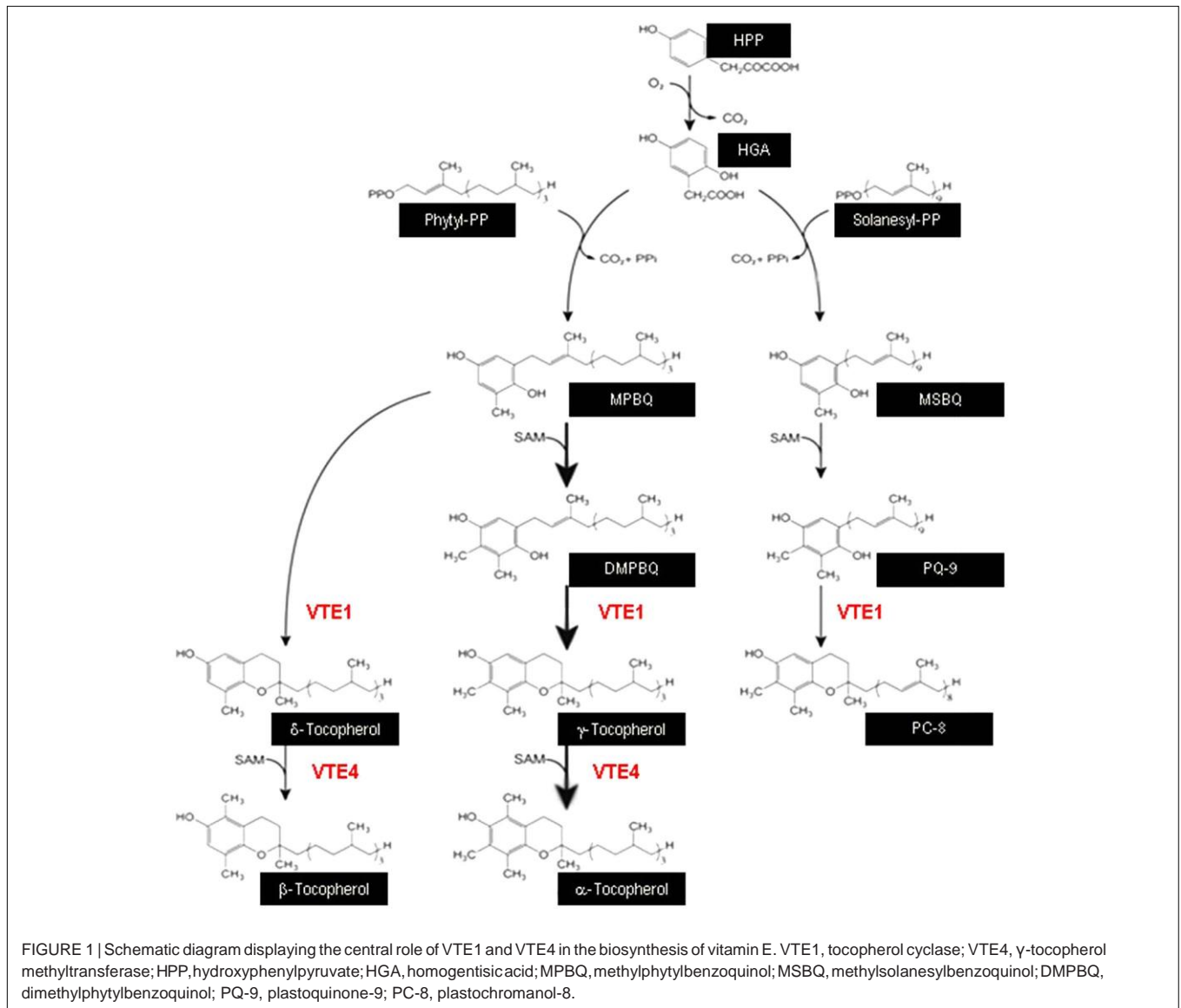
GO Enrichment Analysis

Gene ontology (GO) enrichment analysis for the priming specific TFs was performed using PLAZA 3.0 using default settings (Proost et al., 2015).

Clustering Analysis

Differentially expressed genes were visualized as heatmaps using multiple expression viewer (Mev¹; Saeed et al., 2003). Cluster analysis for differentially expressed genes was performed with Short Time-series Expression Miner (STEM) software using default settings (Ernst and Bar-Joseph, 2006).

¹<http://www.tm4.org/>



Hormonal Profiling

For analyses of cytokinins, auxin, gibberellins, ABA, salicylic acid, jasmonates, the ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, and melatonin, leaf samples (50 mg) were ground in liquid nitrogen and extracted with cold methanol:isopropanol:acetic acid (50:49:1, v/v/v) using ultrasonication. After centrifuging at 8000 rpm for 10 min and 4°C, the supernatant was collected and the pellet re-extracted with the same solvent until it was colorless; then, supernatants were pooled, filtered, and injected into the UHPLC-MS/MS. Phytohormones were separated using an elution gradient on a reverse-phase UHPLC system and quantified using tandem mass spectrometry in multiple reaction monitoring mode as described (Müller and Munné-Bosch, 2011). Recovery rates were calculated for each hormone on every sample by using deuterated compounds.

Statistical Analysis

Data was analyzed by using three-way and one-way factorial analysis of variance (ANOVA), and by additionally using Duncan *post hoc* tests to analyze for the effects of genotypes at each condition. In all cases, differences were considered significant at a probability level of $P < 0.05$. All statistical tests were carried out using the SPSS 20.0 statistical package.

RESULTS

Plant Response to Contrasting Phosphate Availability

In order to understand plant adaptive mechanisms to contrasting Pi availability, plants were grown in a controlled environment initially to attain uniform growth among all the genotypes under study. Later, one set of plants were supplied with the

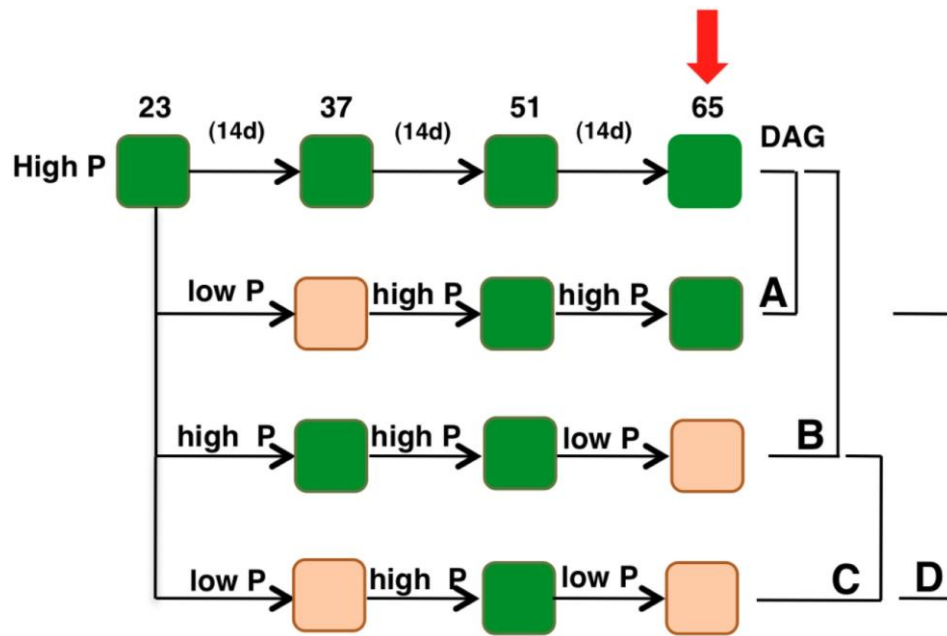


FIGURE 2 | Schematic diagram displaying the experimental plan. All the genotypes were grown with 1 mM potassium phosphate (hereafter called high Pi) for 23 days. Contrasting Pi levels were then supplied to the plants in three different sets. Orange blocks indicate periods during which the plants were supplied with 0.5 mM potassium phosphate (hereafter called low Pi). Arrow indicates the time point when sampling was performed. DAG, days after germination. (A–C) Show comparisons used for data analyses.

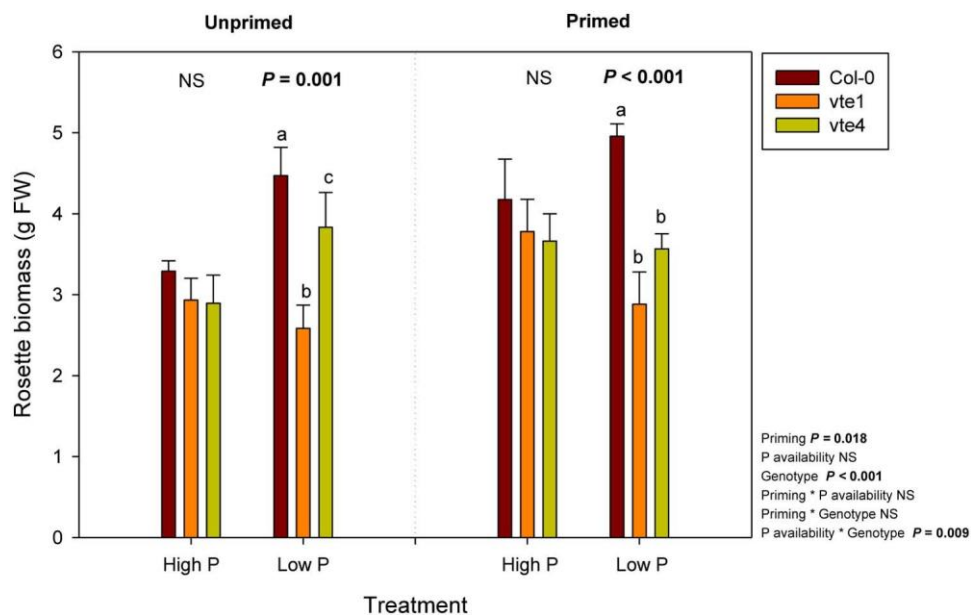


FIGURE 3 | Rosette biomass of vitamin E-deficient (*vte1* and *vte4* mutants) and wild-type plants of *Arabidopsis thaliana* exposed to contrasting Pi availability, including unprimed and primed plants. Data represent the mean \pm SE of $n = 6$ individuals. Significant differences between groups were tested by three-way analysis of variance (ANOVA, $P < 0.05$). Different letters significant differences between genotypes at any given treatment (Duncan *post hoc* tests, $P < 0.05$). NS, not significant.

same Pi concentration (hereafter called high Pi), whereas half the concentration (hereafter called low Pi, see “Materials and Methods”) was supplied to plants in three different sets to

understand plant response to contrasting Pi availability and priming effects. The first set included plants supplied with low Pi for 2 weeks and then returned to high Pi; the second set

included plants grown under high Pi condition and then exposed to low Pi for 2 weeks just prior to samplings. To capture the effects of priming, plants were exposed to low Pi, returned to high Pi condition and then later exposed to second spell of low Pi (**Figure 2**).

Rosette biomass was not affected by Pi availability, but it was significantly influenced by the genotype and priming. Plant biomass did not differ between genotypes under high Pi, either in unprimed or primed plants. However, rosette biomass was lower in the *vte1* mutant compared to wild-type plants at low Pi in unprimed plants, and in both mutants relative to the wild type in primed plants (**Figure 3**). Wild-type plants were the ones better adapted to low Pi in terms of biomass accumulation, so that priming had positive effects on plant growth. α -Tocopherol deficiency prevented the mutants to benefit from low Pi availability, as indicated by the smaller rosette biomass in both *vte* mutants compared to wild-type plants under primed conditions at low Pi (**Figure 3**). Despite these effects on growth, endogenous Pi concentrations did not differ between genotypes at any tested conditions (**Figure 4**). Furthermore, none of the other nutrients measured revealed any significant genotype-related difference ($P < 0.05$, ANOVA, Supplementary Figures 1, 2).

Tocochromanols, including α - and γ -tocopherol, as well as plastochromanol-8, were not detected in the *vte1* mutant, while both γ -tocopherol and plastochromanol-8 accumulated in the absence of α -tocopherol in the *vte4* mutant (**Figure 5**). In contrast, wild-type plants accumulated α -tocopherol in leaves, particularly at low Pi in primed condition. The contents of this antioxidant doubled at low Pi availability in primed compared to unprimed plants (**Figure 5**). The contents of γ -tocopherol also increased to a similar extent in the *vte4* mutant at low Pi in primed plants only. Plastochromanol-8 contents did not follow the same variations (**Figure 5**).

Changes in photo-oxidative stress markers, including chlorophyll contents, the maximum efficiency of PSII photochemistry (F_v/F_m ratio), and the extent of lipid peroxidation, estimated as MDA accumulation (**Figure 6**) paralleled those of rosette biomass (**Figure 3**), though effects were observed to a much more limited extent, particularly at low Pi in primed plants. Both chlorophyll contents and the F_v/F_m ratio were lower in the *vte1* mutant compared to wild-type plants under primed condition at low Pi. However, reductions in the F_v/F_m ratio were very small, the values in all plant genotypes being always above 0.75 (**Figure 6**). No significant differences in the extent of lipid peroxidation were observed between genotypes, Pi availability or priming (**Figure 6**).

Differential Expression Pattern of TFs to Varying Pi Availability

Transcription factors, the major regulators of gene expression changes play a pivotal role in plant stress responses. To identify such transcriptional regulators that may have possible roles in the regulation of plant response to low Pi conditions and capture the priming effect on plant's response to contrasting Pi availability, 1,880 Arabidopsis TFs expression was profiled under

experimental conditions described above using quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Obtained data was analyzed to identify TFs that respond differentially to varying low Pi conditions: (A) TFs responding to low Pi pre-treatment at high Pi, (B) TFs responding to a single low Pi episode, (C) Priming responsive TFs, and (D) TFs responding to recurrent low Pi stimuli (**Figure 2**).

In wild-type plants, a total of 454 TFs were differentially expressed with a 3- \log_2 fold change as cut-off (either up- or down-regulated) in any of the four comparisons performed, representing $\sim 24\%$ of TFs tested in this study (**Figure 7A** and Supplementary Table 1). Diverse expression patterns of these TFs under different conditions tested suggest a massive transcriptional re-programming involved in plant response to Pi availability. Differentially expressed TFs (DETFs) represented several TF families such as MYB, AP2-EREBP, bZIP, bHLH, AGL, and BBX, among others. These TFs were manually classified based on their expression pattern as either A, B or C specific (Supplementary Table 2). The "A" group contains 69 TFs that were specifically up- (43) or down-regulated (26) in response to low Pi pre-treatment at high Pi, representing 15% of total DETFs. Forty-six TFs ($\sim 10\%$ of total DETFs) expressed specifically to a single low Pi episode (B), but only four of them were up-regulated. Interestingly, $\sim 12\%$ of DETFs (29 up- and 24 down-regulated) were specifically expressed in response to priming treatment (C). These include several TFs functioning in response to plant growth or stress responses. For example, *SWI2C*, a core component of the SWI/SNF-type chromatin-remodeling complex C (CRCs), was up-regulated in a priming specific manner. *SWI2C* is a growth regulator and has been identified to interact with DELLA proteins (Sarnowska et al., 2013). Anthocyanin accumulation is a typical phenotypic response under Pi starvation (Morcuende et al., 2007); interestingly MYB111 and MYB113 involved in the regulation of anthocyanin production (Tohge et al., 2013) were repressed specifically in primed plants. Next, GO enrichment analysis was performed for the DETFs that showed priming specific expression using PLAZA 3.0 (Proost et al., 2015). Significantly over-represented GO terms describing the biological process include "gibberellin biosynthesis process," "ABA-activated signaling pathway," "regulation of triglyceride catabolic process," and "histone H3- and H4-acetylation" (Supplementary Figure 3). These GO terms indicate the underlying mechanism of priming effect on plant response to low Pi (Supplementary Figures 4–6).

Additionally, in order to visualize cluster profiles of the DETFs based on their expression direction and magnitude, STEM (STEM) was employed. A comparison of observed groups with those expected in random permutation enables to determine enrichment of the obtained clusters (Ernst et al., 2005; Ernst and Bar-Joseph, 2006). Such comparison of expression patterns resulted in profiles classified into 50 categories in the response of wild-type plants to contrasting Pi availability (**Figure 7B**). Out of the 50 possible clusters, eight clusters were found to be significant (P -value ≤ 0.05). Colored blocks in (**Figure 7B** and Supplementary Table 3) display expression profiles of significant clusters (clusters 6, 11, 20, 24, 31, 34, 44, and 45) arranged based on their significance. MYB TF family represented the highest

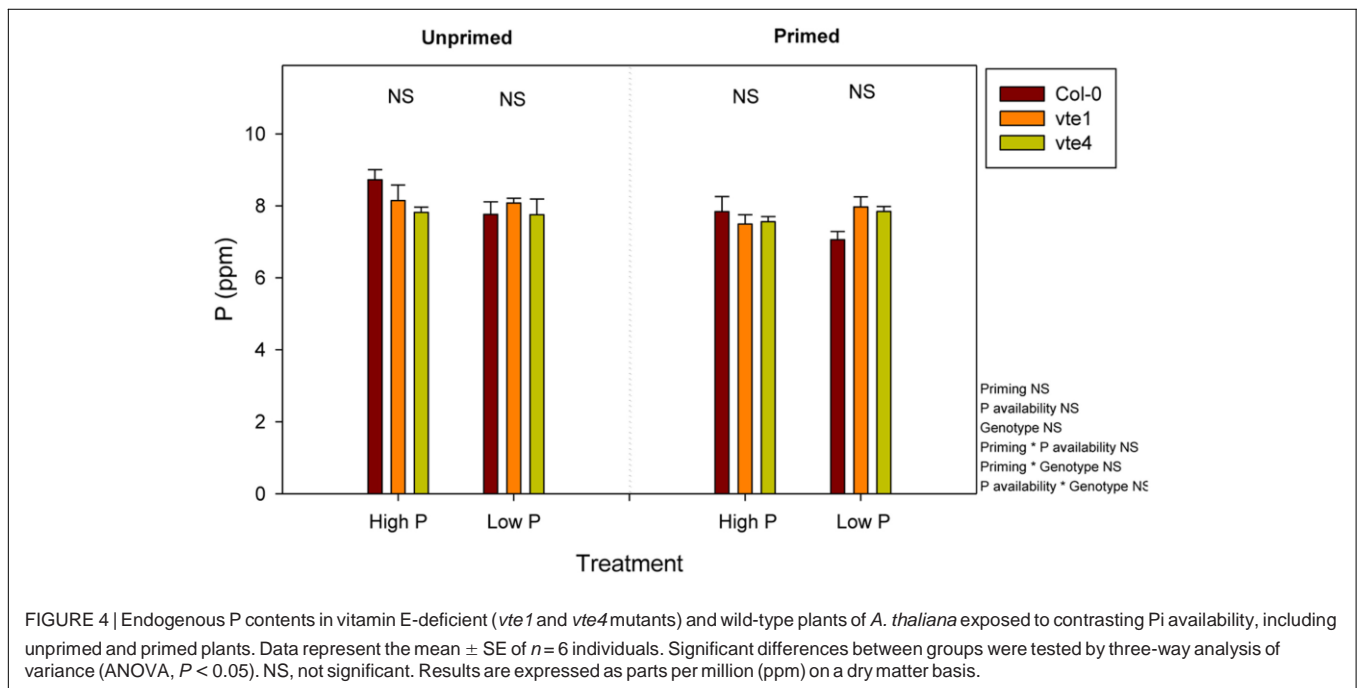


FIGURE 4 | Endogenous P contents in vitamin E-deficient (*vte1* and *vte4* mutants) and wild-type plants of *A. thaliana* exposed to contrasting Pi availability, including unprimed and primed plants. Data represent the mean \pm SE of $n=6$ individuals. Significant differences between groups were tested by three-way analysis of variance (ANOVA, $P < 0.05$). NS, not significant. Results are expressed as parts per million (ppm) on a dry matter basis.

number among the various cluster profiles, followed by AGL and bHLH TF families. Cluster profiles 6, 44, and 31 displayed 73, 67, and 47 TFs, respectively, representing larger cluster groups, among others. To understand the biological significance of the obtained cluster profiles, GO terms enriched in the TF clusters were analyzed. Profile 6 is enriched for TFs associated with GO terms “regulation of response to stimulus,” “response to jasmonic acid, endogenous stimulus, hormone, stress, acid chemical, oxygen containing compound, gibberellin, salicylic acid, and ethylene,” “regulation of signal transduction, jasmonic acid-mediated signaling pathway,” and “chromatin modification and organization,” among others. Profile 44 represents GO terms “regulation of cellular macromolecule biosynthetic process,” “nucleobase-containing compound metabolic process,” “organic substance biosynthesis and metabolic process,” and “root system development,” among others. Profile 31 represents “response to salt and osmotic stress, alcohol, lipid.”

Vitamin E Deficiency Alters Plant Response to Contrasting Pi Availability

Given the extensive expression changes of TFs under varying Pi availability in wild-type plants (Figure 7A), it was interesting to study how an altered tocopherol composition affects the expression of those transcriptional regulators under contrasting Pi availability. Toward this, we performed whole TF profiling in *vte1* and *vte4* mutants under the above described conditions (Figure 2). A total of 568 and 583 TFs were differentially expressed (both up- and down-regulated with 3-log₂ fold change as cut-off threshold) in *vte1* and *vte4* mutants compared to the wild type (Figure 8 and Supplementary Tables 4, 5) representing 30 and 31% of the total TFs analyzed, respectively. DETFs in the *vte1* mutant are represented by a mixture of TF families,

while TFs belonging to MYB, AGL, bZIP, bHLH TF families were abundant in the *vte4* mutant compared to the wild type. To identify TFs that exhibit condition specific expression patterns, manual classification was performed (Supplementary Tables 6, 7) as described above (see also Figure 2). In the *vte1* mutant, 49 TFs were specific to group A of which, 34 and 15 were up- and down-regulated, respectively, representing ~9% of the total DETFs. *vte4* mutant displayed ~8% TFs specific to group A with 14 and 29 up- and down-regulated, respectively. Contrasting to the wild type, the *vte1* mutant displayed more TFs specific to group B with 121 up-regulated and only 1 down-regulated (22% of DETFs). In the *vte4* mutant, around 8% (35 up- and 8 down-regulated) of total DETFs responded specifically to group B. The TFs involved in the regulation of anthocyanin were up-regulated in both the mutants compared to wild-type plants, suggesting that the mutants were experiencing stress under low Pi compared to the wild type. For example, in the *vte1* mutant, *MYB112* was induced in group A and *MYB114* up-regulated in both A and B, both known to be involved in the regulation of anthocyanin production (Tohge et al., 2013; Lotkowska et al., 2015). Furthermore, ~8% TFs displayed a priming specific (group C) expression pattern, of which 28 and 16 were up- and down-regulated in the *vte1* mutant compared to the wild type. Interestingly, several of these TFs showed an opposite priming specific expression pattern in wild-type plants. Priming repressed TFs in the wild type, *MYB111* and *MYB113* expression was induced in *vte1* primed plants, which suggests that these plants could not benefit from priming.

Varying number of TFs representing group specific expression pattern among *vte1* and *vte4* mutants was observed which might suggest diverse roles for the different tocopherol forms. As contrasting to *vte1*, *vte4* mutants displayed 24%.

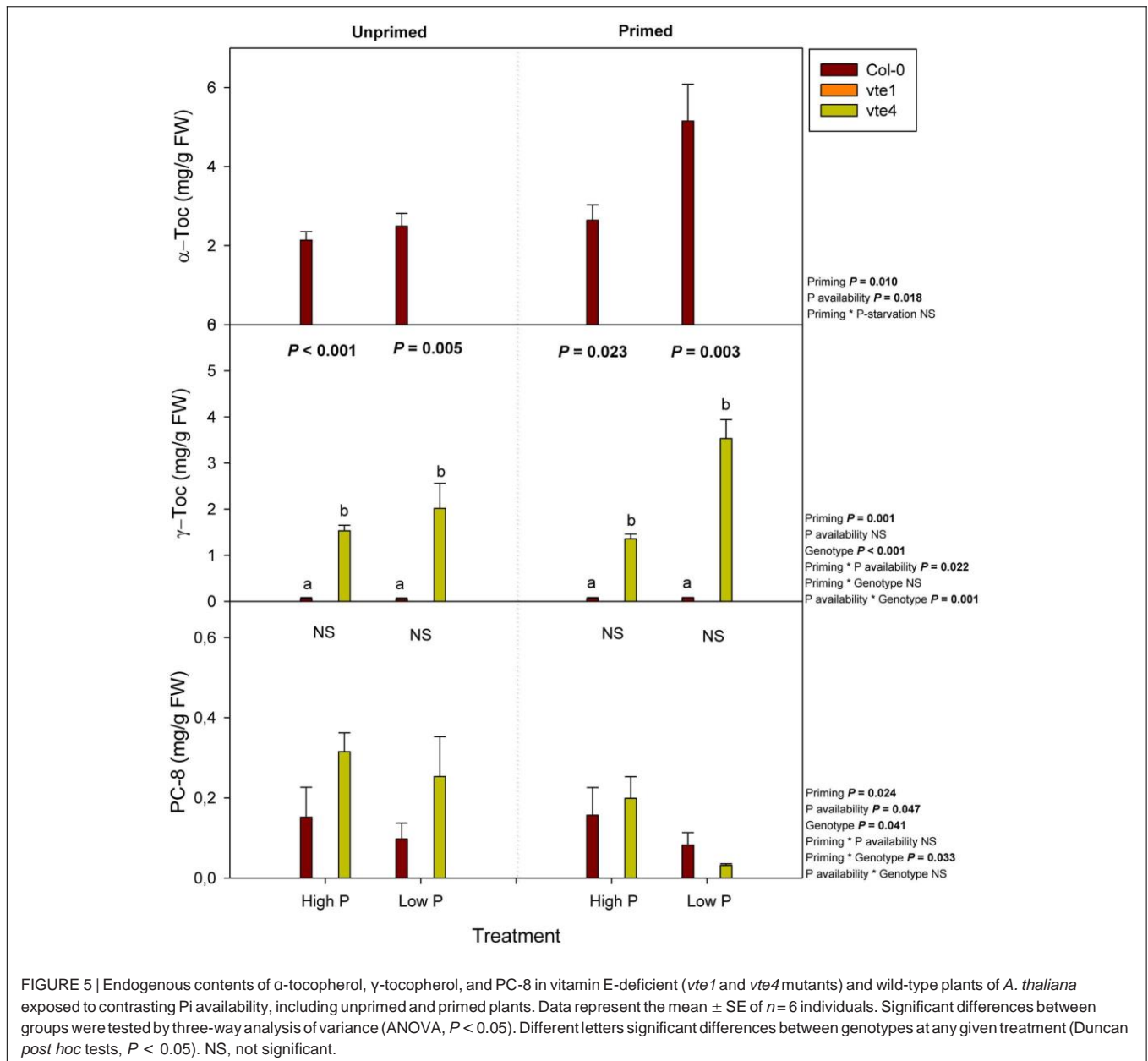


FIGURE 5 | Endogenous contents of α -tocopherol, γ -tocopherol, and PC-8 in vitamin E-deficient (*vte1* and *vte4* mutants) and wild-type plants of *A. thaliana* exposed to contrasting Pi availability, including unprimed and primed plants. Data represent the mean \pm SE of $n=6$ individuals. Significant differences between groups were tested by three-way analysis of variance (ANOVA, $P < 0.05$). Different letters significant differences between genotypes at any given treatment (Duncan *post hoc* tests, $P < 0.05$). NS, not significant.

(56 up- and 81 down-regulated) TFs with priming specific expression pattern compared to the wild type. *MYB111* expression was also increased in primed plants. Expression of *ZAT6*, a negative regulator of Pi homeostasis (Devaiah et al., 2007b) was up-regulated in the *vte4* mutant in a priming specific manner. Previously, expression of several ethylene signaling pathway genes such as *EIN2*, *EIN3*, *CTR1*, and *ERF1* has been reported to be up-regulated in the *vte4* mutant upon salt stress compared to wild-type plants (Cela et al., 2011). In the present study, expression of several ERFs was induced, while *EIN* and *EIL3* expression was repressed in primed *vte4* plants. GO enrichment analysis of the priming specifically expressed TFs revealed interesting over-represented GO terms such as “ethylene mediated signaling

pathway,” “cytokinin activated signaling pathway,” “TF import to nucleus,” and “histone H3 K27 methylation” in *vte1* mutant; “salicylic acid-mediated signaling pathway,” “sucrose-induced translational repression,” and “regulation of pectin biosynthesis and metabolism” in *vte4* mutant. Activation of cytokinin signaling pathway in *vte1* mutant indicate attenuated low Pi response in these plants, as cytokinins negatively regulate Pi starvation responses (Yang and Finnegan, 2010). Defense hormone SA-mediated signaling and pectin biosynthesis in the *vte4* mutant suggests activated defense response networks in *vte* mutants in response to priming. Further, positive effect of priming on the growth observed in the wild type was compromised in *vte* mutants possibly due to the tradeoff toward defense.

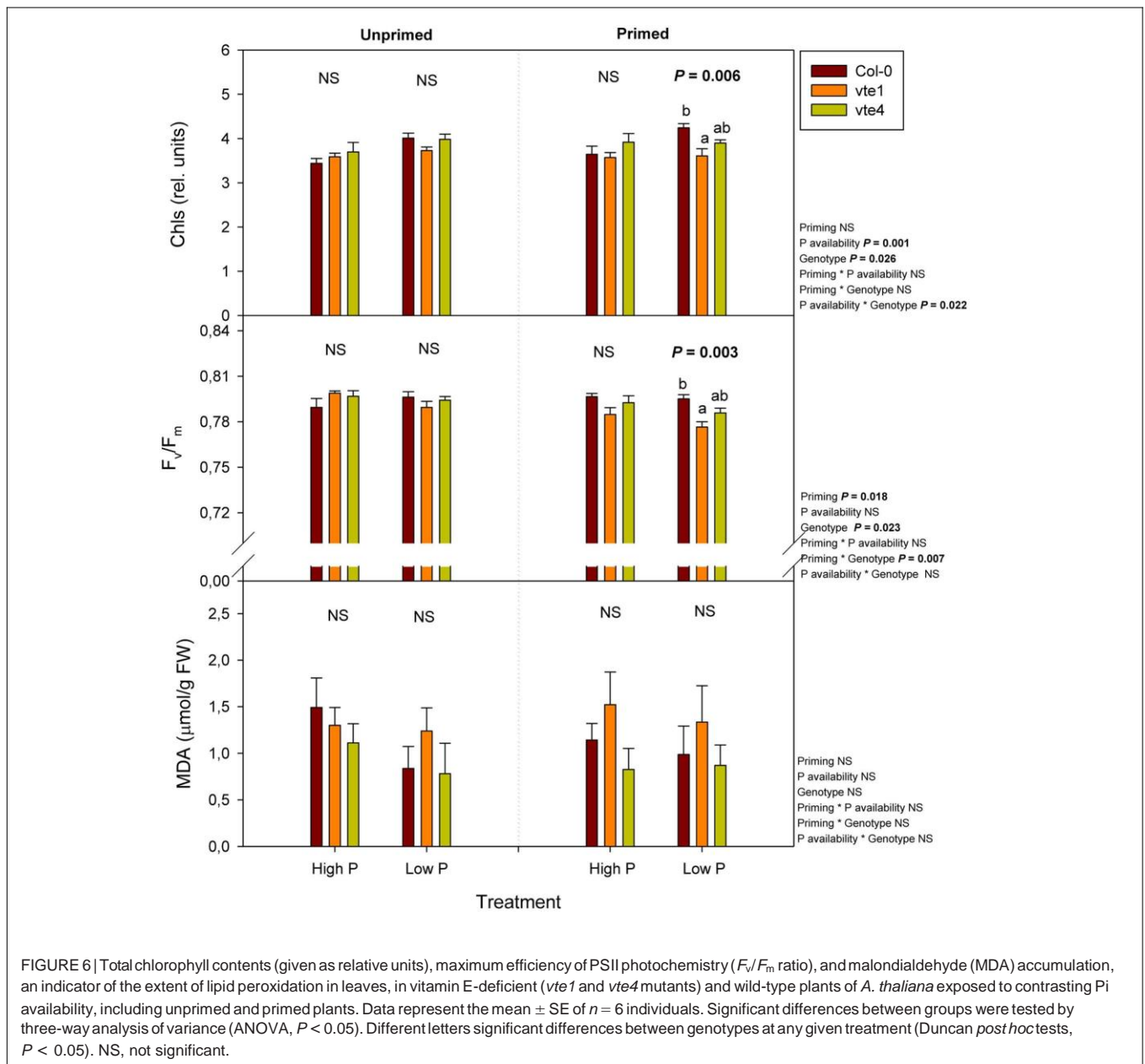


FIGURE 6 | Total chlorophyll contents (given as relative units), maximum efficiency of PSII photochemistry (F_v/F_m ratio), and malondialdehyde (MDA) accumulation, an indicator of the extent of lipid peroxidation in leaves, in vitamin E-deficient (*vte1* and *vte4* mutants) and wild-type plants of *A. thaliana* exposed to contrasting Pi availability, including unprimed and primed plants. Data represent the mean \pm SE of $n = 6$ individuals. Significant differences between groups were tested by three-way analysis of variance (ANOVA, $P < 0.05$). Different letters significant differences between genotypes at any given treatment (Duncan *post hoc* tests, $P < 0.05$). NS, not significant.

Next, to understand those expression patterns observed among different Pi availability conditions in both the mutants, first we clustered the DETFs into profiles using STEM. A total of 50 possible cluster profiles were obtained for both mutants, of which, 7 (5, 6, 24, 27, 44, 45, and 47) and 9 (5, 6, 12, 14, 23, 24, 27, 28, and 44) clusters were found to be significant in *vte1* and *vte4* mutants, respectively (Figures 9A,B and Supplementary Tables 8, 9). Further, these significant clusters were compared with the significant clusters obtained from wild-type plants using STEM, where the TFs in each cluster from the mutants were compared with their magnitude of expression and direction in the wild type. Interestingly, such correlation revealed opposite patterns for many of the cluster profiles between the mutants and the wild type (Figures 9A,B). To learn about the involvement

of tocopherols in mediating the plant response to contrasting Pi availability, these oppositely expressed TFs could serve as a valuable resource. Additionally, learning about the GO terms associated with these TFs would help to expand our knowledge in understanding the adaptive mechanisms associated with vitamin E under varying Pi availability. Interestingly, the largest cluster profiles 6 and 44 of wild-type plants showed good correlation with the cluster profiles of the *vte1* mutant. Wild type profile 6 and 44 in the *vte1* mutant displayed similar GO terms such as “response to: gibberellin, hormone, endogenous stimulus, organic substance, ethylene, lipid, jasmonic acid, salicylic acid, auxin, ABA, organic cyclic compound,” “regulation of: signaling, signal transduction, cell communication,” and “negative regulation of: cellular, macromolecule biosynthesis

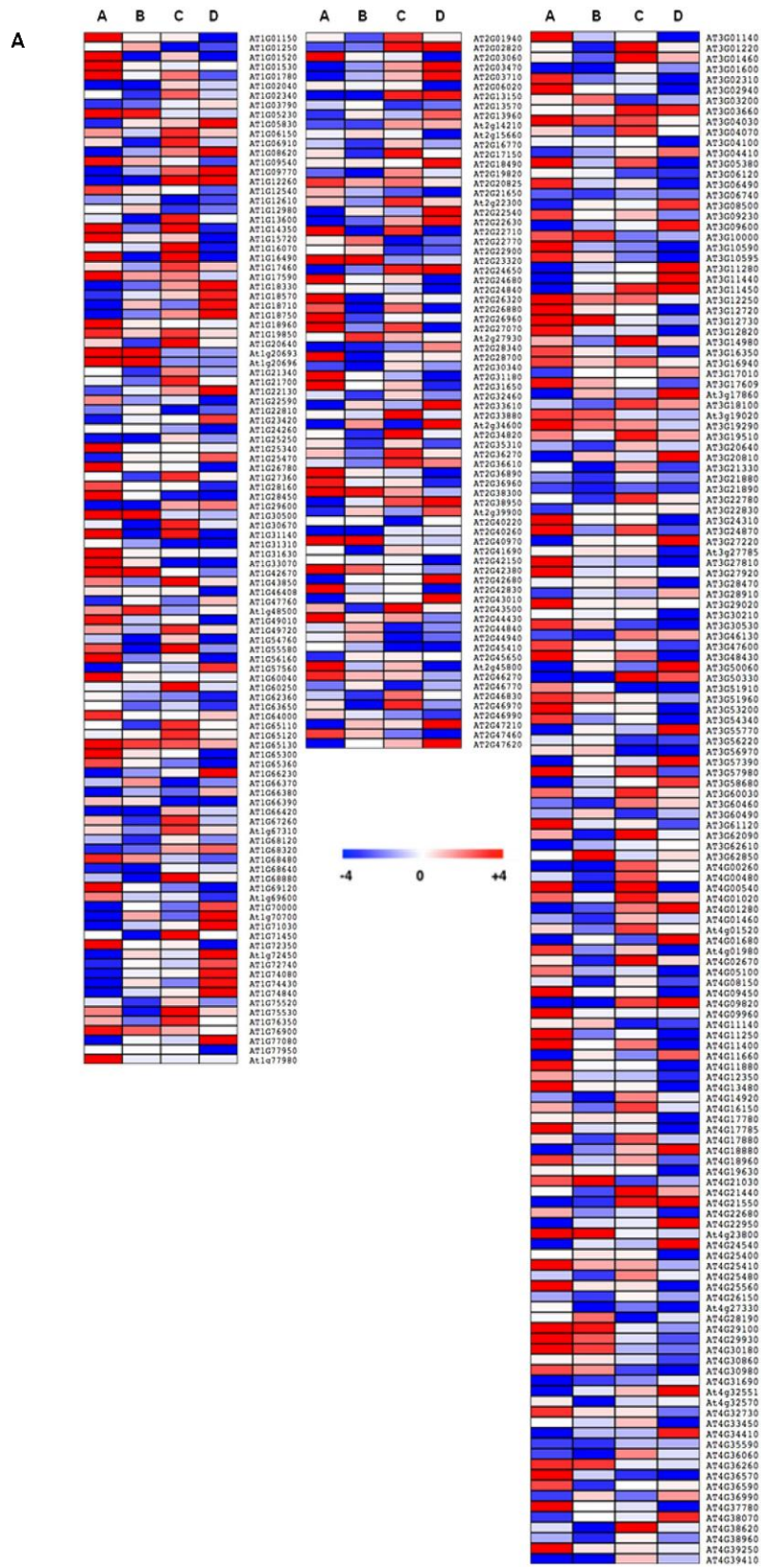


FIGURE 7 | Continued

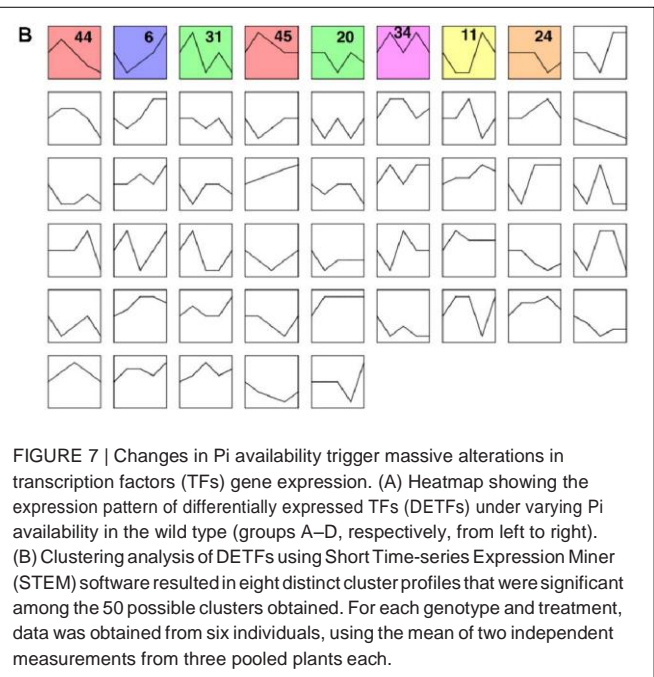
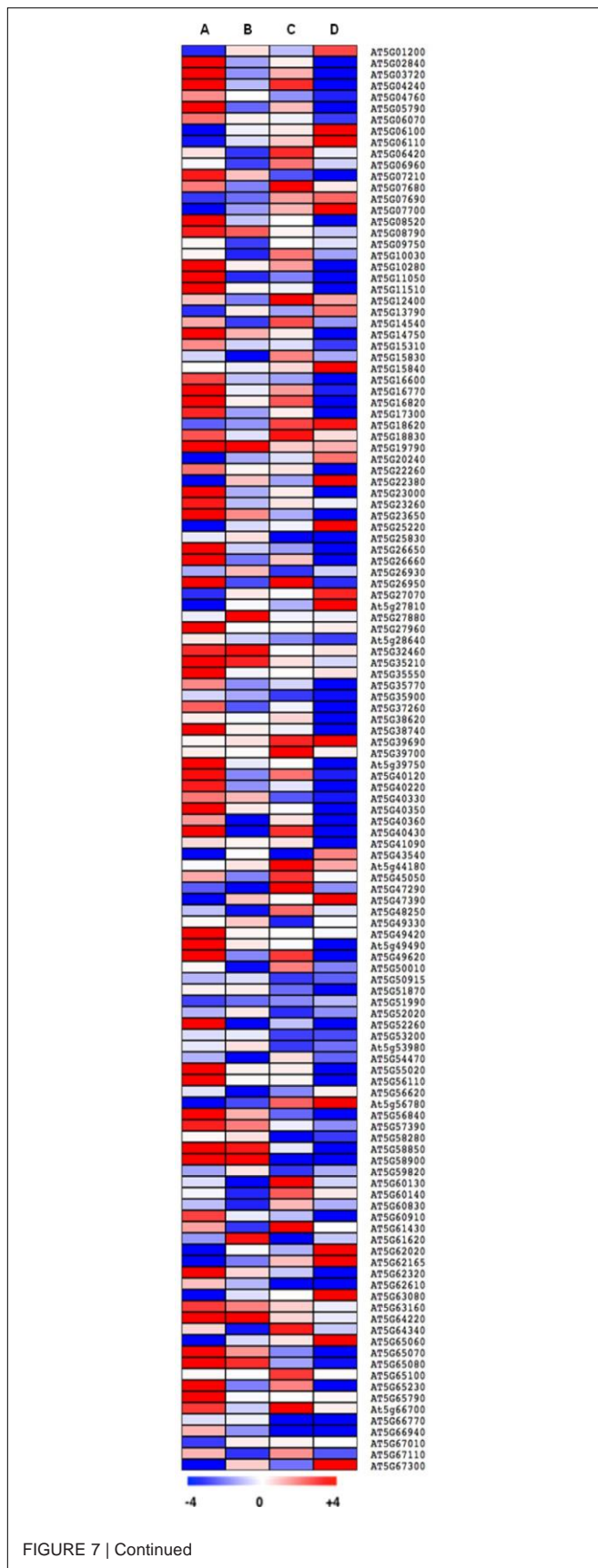


FIGURE 7 | Changes in Pi availability trigger massive alterations in transcription factors (TFs) gene expression. (A) Heatmap showing the expression pattern of differentially expressed TFs (DETFs) under varying Pi availability in the wild type (groups A–D, respectively, from left to right). (B) Clustering analysis of DETFs using Short Time-series Expression Miner (STEM) software resulted in eight distinct cluster profiles that were significant among the 50 possible clusters obtained. For each genotype and treatment, data was obtained from six individuals, using the mean of two independent measurements from three pooled plants each.

process, nucleobase-containing compound metabolic process” among others. Wild type profile 44 correlated with *vte1* profile 6 representing the GO terms “heterocyclic compound-, organic cyclic compound-, nucleic acid-binding,” and “protein dimerization activity.” Profile correlations between wild type and the *vte4* mutant as well showed significant GO enrichment terms. Wild type profile 6 and *vte4* profile 44 correlated TFs represented GO terms “response to gibberellin, stress, abiotic stress, osmotic stress, lipid, salicylates, ethylene,” “chromatin modification, organization,” and “histone modification,” among others. Wild type profile 23 and *vte4* profile 24 displayed GO terms “cellular response to: ethylene stimulus, hormone stimulus, organic substance, endogenous and chemical stimulus,” “ethylene activated signaling pathway,” “phosphorelay signal transduction system,” and “hormone-mediated signaling pathway”.

Hormonal Profiling Reveals Activated Defense Response in *vte* Mutants under Contrasting Pi Availability

Hormonal profiling revealed genotype-related differences, particularly for salicylic acid contents, which increased significantly in the *vte1* mutant compared to wild-type plants at low Pi, but in unprimed plants only. This effect was not observed in primed plants, because in this case salicylic acid contents increased similarly in the three genotypes at low Pi availability (Figure 10). Furthermore, enhanced jasmonic acid-isoleucine (JA-Ile) contents were observed in the *vte4* mutant compared to wild-type plants and the *vte1* mutant in primed plants at low Pi (Figure 10). No genotype-related differences were observed in the contents of cytokinins (Supplementary Figure 3), auxin (Supplementary Figure 7), gibberellins (Supplementary

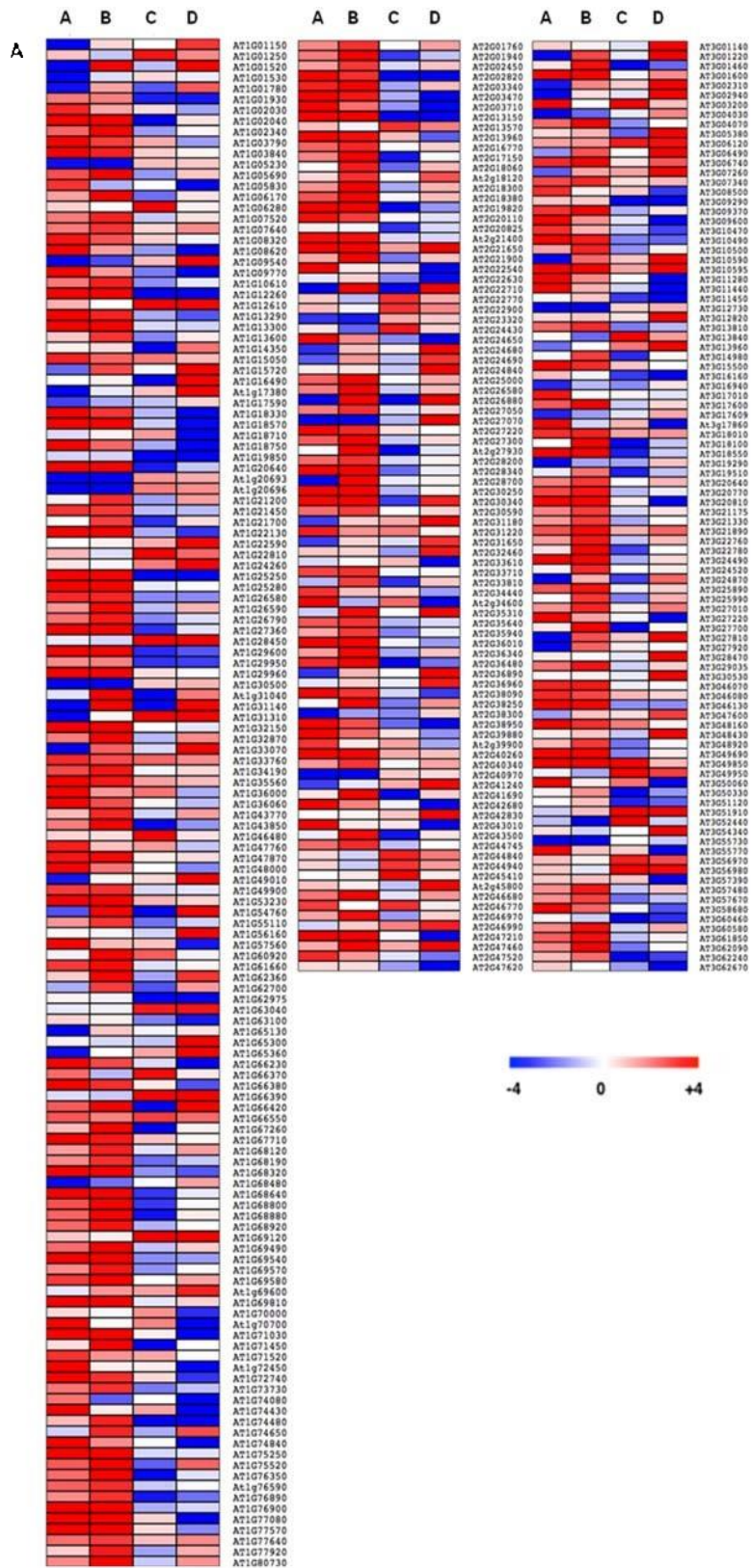


FIGURE 8 | Continued

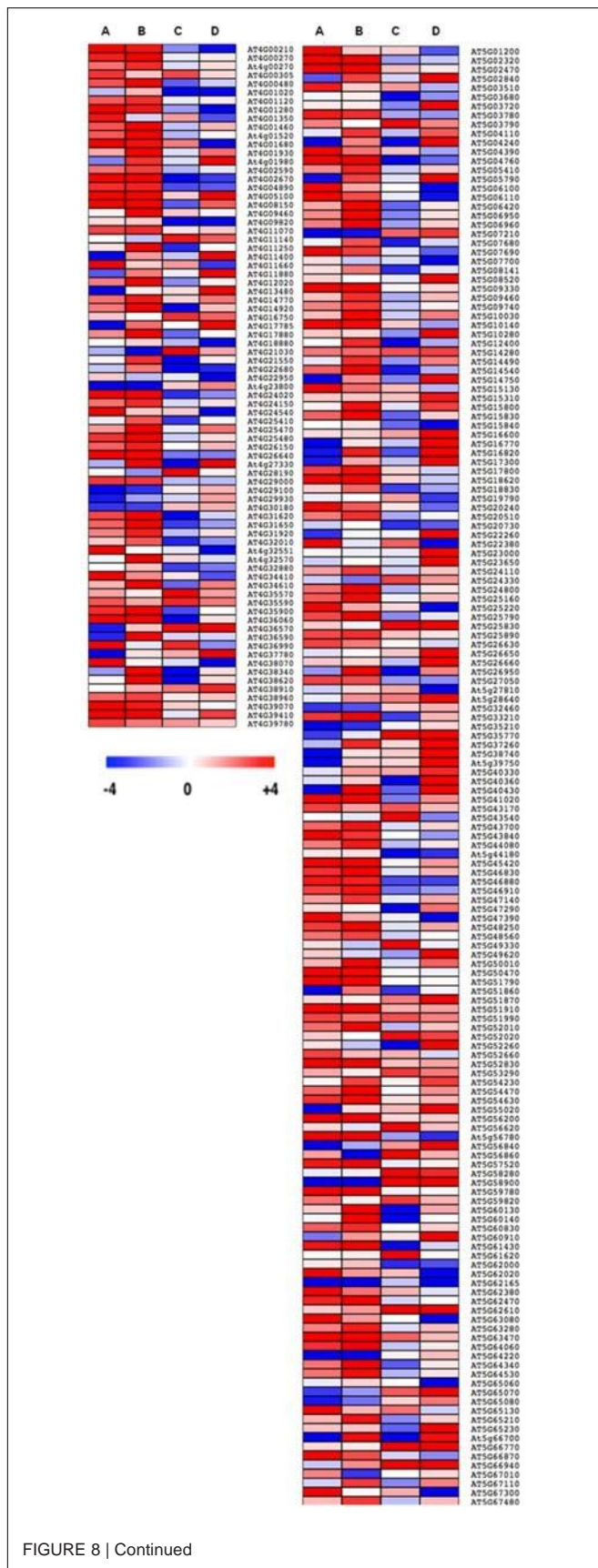


FIGURE 8 | Continued

Figure 8), ABA, the ethylene precursor, 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid, or melatonin (Supplementary Figure 9). Priming had significant effects on jasmonates, salicylates, and auxin contents; defense-related compounds such as jasmonic acid in particular, increasing, and indole-3-acetic acid contents decreasing, in primed plants (Figure 10 and Supplementary Figure 7). Low Pi availability increased the contents of *oxo*-phytodienoic acid and JA-Ile irrespective of priming, the latter particularly increasing in the *vte4* mutant in primed plants (Figure 10).

DISCUSSION

Phosphorus is one of the crucial macronutrients needed for the plants and its limitation leads to adaptations both at molecular, biochemical, and developmental level (Marschner, 2012). Our current study has shown that repeated exposure (priming) of plants to moderately low Pi availability condition improves growth in the model plant *A. thaliana*. Priming had a positive effect on plant growth in the wild type, but this effect was abolished in both *vte* mutants. Priming led to significant increases in α -tocopherol contents in the wild type, thus indicating α -tocopherol deficiency in both the *vte1* and *vte4* mutants may explain the genotype-related effects observed in the present study. It is noteworthy that both wild-type plants and the *vte4* mutant increased tocopherol levels (α - and γ -tocopherol, respectively) instead of those of plastochromanol-8 in response to priming, thus genotype-related effects on growth in primed plants may be related to changes in tocopherols rather than plastochromanol-8. Despite plastochromanol-8 antioxidant role in thylakoid membranes (Kruk et al., 2014), it seems that tocopherols play a prominent role over plastochromanol-8 in regulating plant response to contrasting Pi availability in *A. thaliana*. Vitamin E deficiency had slight effects on photoinhibition (as indicated by reductions in chlorophyll levels and the F_w/F_m ratio), particularly in the *vte1* mutant, but differences between genotypes were very small and lipid peroxidation (as indicated by MDA accumulation) kept unaltered, thus indicating that genotype-related effects on growth in primed plants might be mostly associated with mechanisms other than a slightly enhanced photo-oxidative stress in leaves due to α -tocopherol deficiency. Here, it is shown that an alteration in the vitamin E composition and contents in chloroplasts may influence growth and defense though modulation of specific clusters of gene expression and hormones.

Transcription factors regulate the majority of gene expression changes and thus play a crucial role in regulating the plant response to various stresses including Pi limitation (Wu et al., 2003). Several studies have focused on identifying such TFs that are involved in the regulation of plant response to Pi limitation. For example, Arabidopsis MYB62, ZAT6, bHLH32, PTF1, WRKY75 and rice OsWRKY74 are of those TFs whose role in the regulation of Pi response have been identified (Yi et al., 2005; Chen et al., 2007; Devaiah et al., 2007a,b, 2009; Dai et al., 2016). Previously, genome wide expression profiling revealed

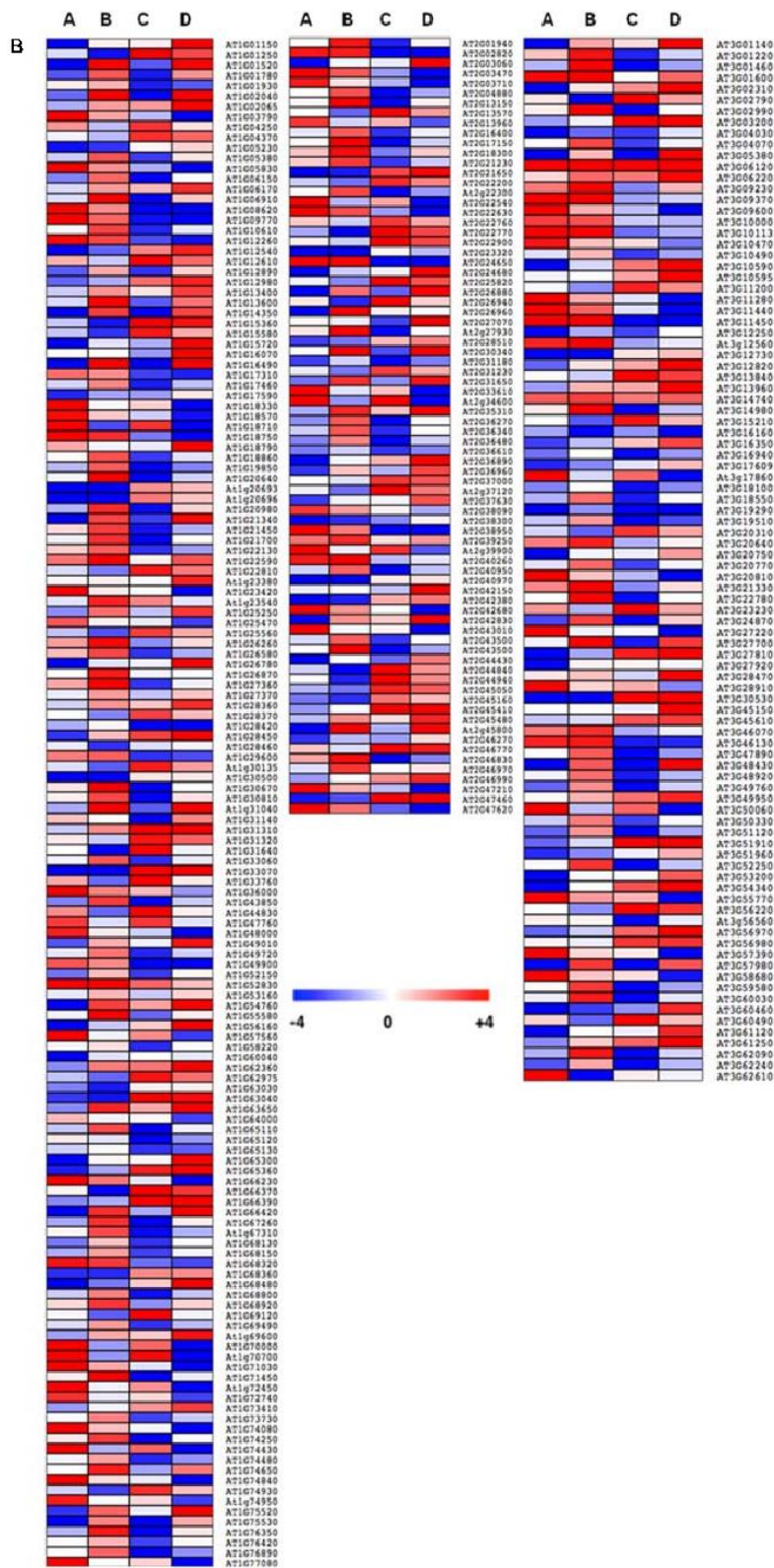


FIGURE 8 | Continued

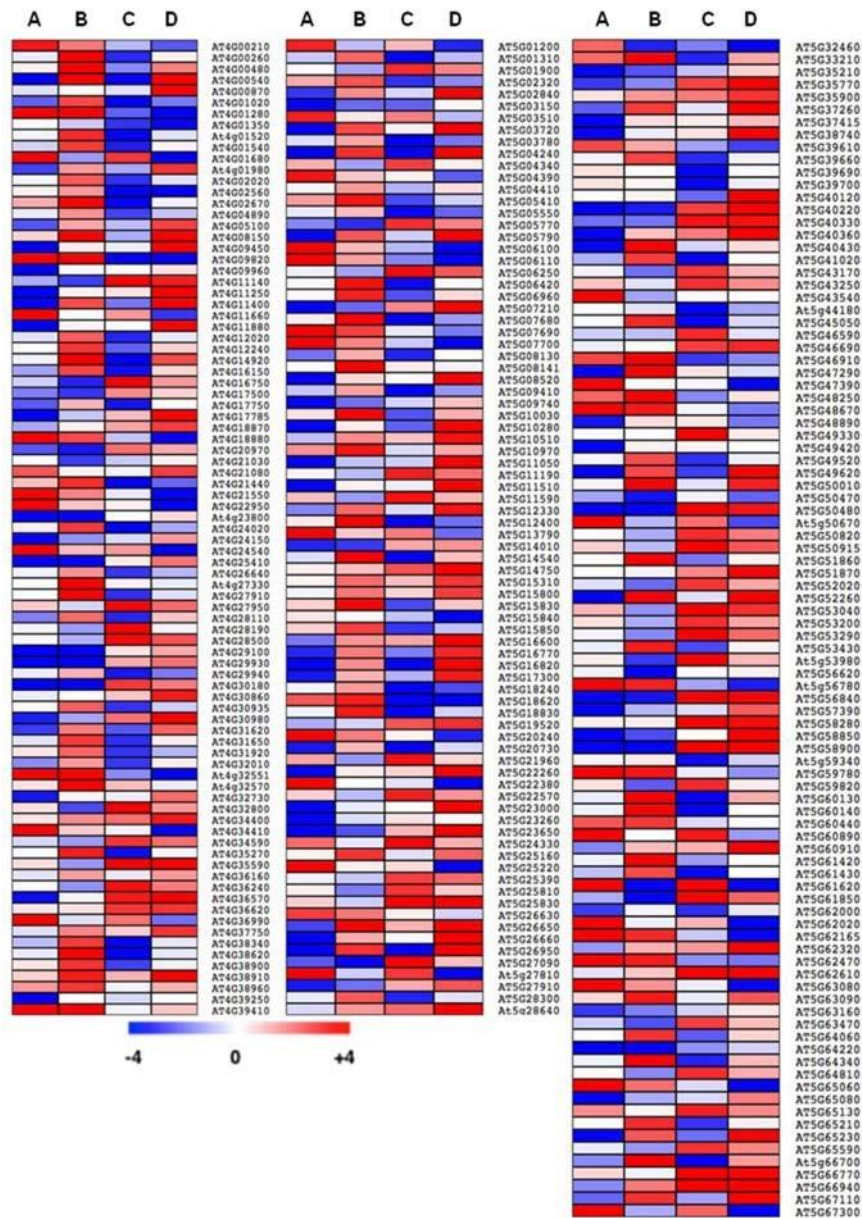


FIGURE 8 | Effect of vitamin E deficiency on TFs profile under contrasting Pi availability. Heatmap showing the expression pattern of DETFs under varying Pi conditions in *vte1*/wild type (A) and *vte4*/wild type (B). Results for comparisons A–D, respectively, are shown from left to right. For each genotype and treatment, data was obtained from six individuals, using the mean of two independent measurements from three pooled plants each.

specific sets of TFs to be involved in regulation of early and late Pi deficiency responses (Misson et al., 2005). In this study, qRT-PCR analyses of 1,880 TF genes revealed massive transcriptional reprogramming in response to different phosphate regimes. Our data show that priming had a clear positive effect on the response to Pi limitation in wild-type plants. Transcript levels of 45 TFs were specifically deregulated (29 up- and 24 down-regulated) in response to priming treatment. These TFs are mainly associated with regulation of plant growth or response to stresses. Moreover, among TFs specifically repressed in response to priming, *MYB111* and *MYB113*, TFs involved in anthocyanin

biosynthesis, were identified. This observation suggests that pre-exposure to a moderate Pi limitation renders the plant to efficiently safeguard when encountered with a second stress. Furthermore, priming specific induction of TF *SWI2C* involved in cross-talking with several hormonal pathways indicate a possible involvement of hormones in regulating the priming specific responses. Interestingly, priming specific TFs represent sets of TFs involved in stress responses such as *MYB102*, *ZAT12*, *MYB4R1*, *WOXY9A*, *HB22*, *HB52*, and *ANAC047*; disease responsive like *WRKY16* and *HAT3.1*; hormone related such as *AtABF1*, *ABI4*, *ABI5*, *ETHYLENE INSENSITIVE 3 FAMILY*

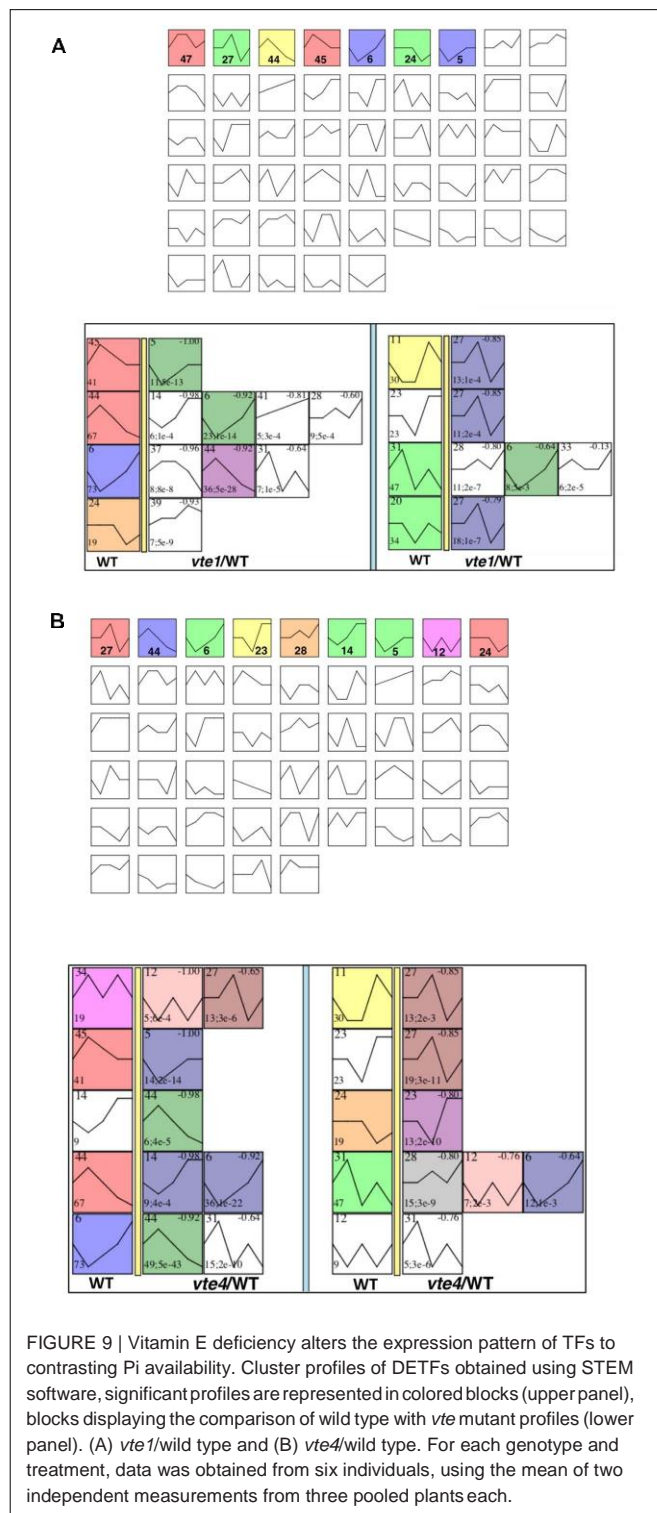


FIGURE 9 | Vitamin E deficiency alters the expression pattern of TFs to contrasting Pi availability. Cluster profiles of DETFs obtained using STEM software, significant profiles are represented in colored blocks (upper panel), blocks displaying the comparison of wild type with *vte* mutant profiles (lower panel). (A) *vte1*/wild type and (B) *vte4*/wild type. For each genotype and treatment, data was obtained from six individuals, using the mean of two independent measurements from three pooled plants each.

PROTEIN, and *ERF13*; development related like *SPL7*, *SPL12*, and *ULTULT1*; and *NLP5*, a TF involved in nitrate signaling. Enriched GO terms for the priming specifically expressed TFs display several interconnected pathways involved in the regulation of plant growth and stress responses. Regulation of

growth promoting hormone (gibberellin) biosynthesis correlated well with the increased rosette biomass of the wild-type plants under primed condition. Previous studies reported ABA to have a minimal role in mediating low Pi responses (Franco-Zorrilla et al., 2004), whereas in the current study, enriched ABA-activated signaling in primed plants may suggest its possible role in regulating efficient stress response. Post-translational modifications of histones at specific amino acid residues such as acetylation, SUMOylation (Small ubiquitin-related modifier), ubiquitination, phosphorylation indicates the integrity of the nucleosome in that region (Berger, 2007). In *Arabidopsis* Pi deficiency response pathway, At-SIZ1 was identified to function as a SUMO E3 ligase, which can mediate SUMOylation of AtPHR1. It can also associate with a putative ubiquitin conjugase AtPHO1/UBC24 in the SUMOylation pathway (Yang and Finnegan, 2010). Repression of target genes by endogenous or environmental cues can be achieved through reduction in histone acetylation levels, thus acetylation of histones is associated with gene activation (Dhar et al., 2014). Interestingly, histone H3 and H4 acetylation was over-represented in GO enrichment analysis for the priming specific TFs. It would be interesting to understand the possible link between histone acetylation and Pi responses, in particular upon priming.

Both *vte* mutants displayed distinct TF expression profile compared to wild-type plants under moderately low Pi availability. Induction of *MYB12* and *MYB14* (TFs involved in anthocyanin production) in the *vte1* mutant, and induction of *MYB62* (a repressor of Pi homeostasis) in both *vte1* and *vte4* mutants compared to the wild type indicate attenuated responses to Pi limitation in these plants. Furthermore, the *vte1* mutant displayed opposite expression pattern for several of the priming specific TFs found in wild-type plants, which may be linked to the lack of α -tocopherol in these mutants. Functional characterization of these TFs might give more insights into the role of α -tocopherol in regulating the plant response to Pi availability. Massive priming specific TF expression changes were also observed in the *vte4* mutant upon varying Pi availability, which include several TF families such as WRKY, bZIP, GATA, NAC, and ERF.

GO enrichment analysis clearly indicates the potential role of tocopherols in regulating priming. Activated cytokinin-mediated signaling pathway marks the underlying attenuated low Pi response in *vte1* mutant. More interestingly, *vte1* mutants display heterochromatin state; as methylation of H3 lysine, especially H3K27me3 has been identified to be a major chromatin silencing modification associated with 1000s of genes at the 5^j region (Zhang et al., 2007; Dhar et al., 2014). Activated TF import into nucleus in the *vte1* mutant provides a mechanism to translate signals from the cytosol to the nucleus, thus indicating vitamin E deficiency may profoundly alter signaling processes. Activated defense responses in *vte4* mutants suggest a possible tradeoff regulation between growth and defense response. Furthermore, sucrose-induced translational repression in the *vte4* mutant indicates sugar signaling is strongly influenced by the tocopherol composition, an aspect that has also been shown in salt-stressed potato plants (Asensi-Fabado et al., 2015). Further, comparing the cluster profiles of wild-type plants and the *vte* mutants displayed clusters enriched with opposite

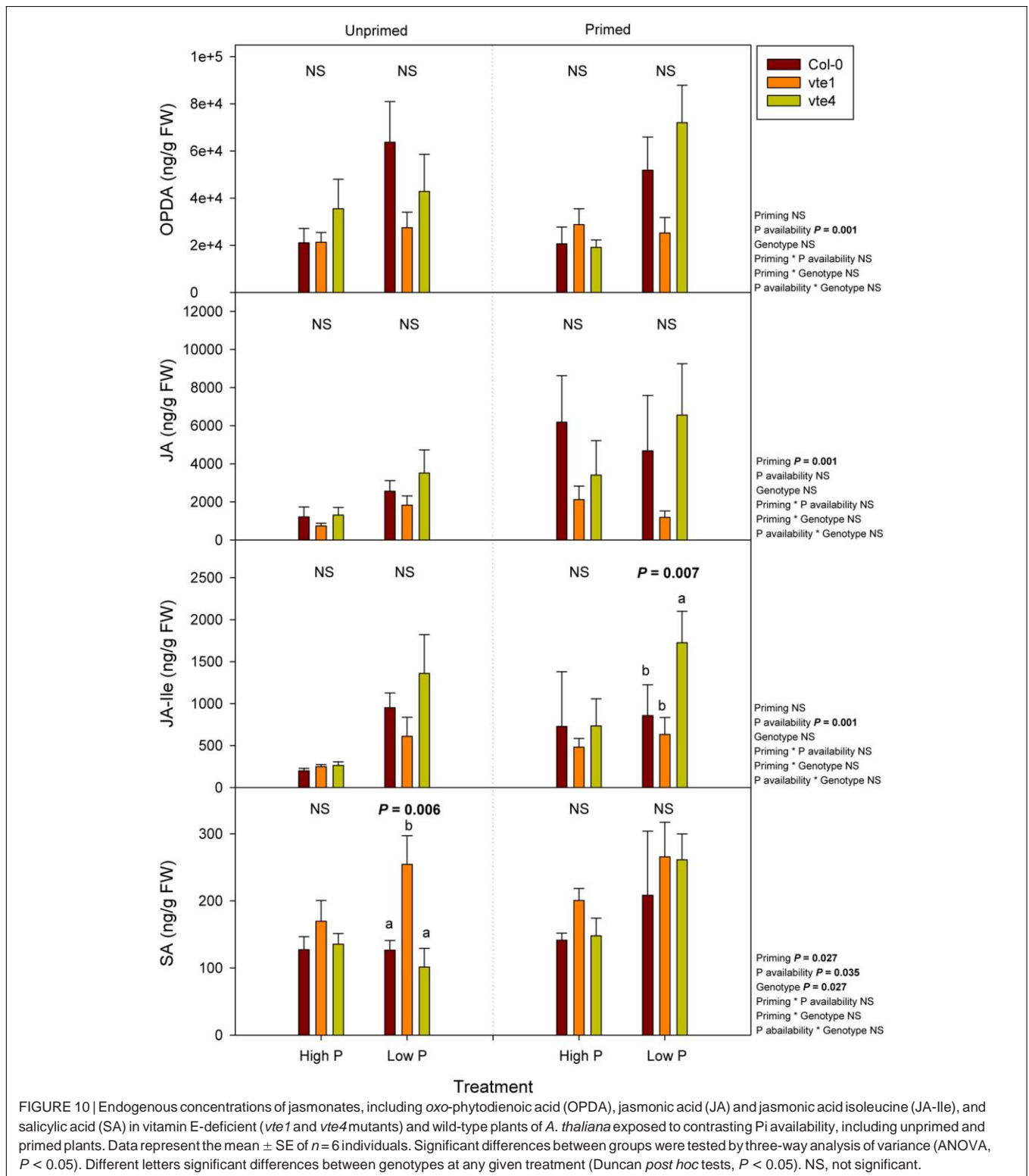


FIGURE 10 | Endogenous concentrations of jasmonates, including oxo-phytodienoic acid (OPDA), jasmonic acid (JA) and jasmonic acid isoleucine (JA-Ile), and salicylic acid (SA) in vitamin E-deficient (*vte1* and *vte4* mutants) and wild-type plants of *A. thaliana* exposed to contrasting Pi availability, including unprimed and primed plants. Data represent the mean \pm SE of $n = 6$ individuals. Significant differences between groups were tested by three-way analysis of variance (ANOVA, $P < 0.05$). Different letters significant differences between genotypes at any given treatment (Duncan *post hoc* tests, $P < 0.05$). NS, not significant.

TF expression patterns. Interestingly, the GO terms associated with those clusters are “response to gibberellin, jasmonates, salicylates, ABA, ethylene, lipid, auxin, organic cyclic compound” and “negative regulation of cellular, macromolecular biosynthesis

process,” among others. Changes related to growth promoting hormone gibberellin and stress hormones such as salicylates, jasmonates, ABA, and ethylene may further support a possible tradeoff scenario in these mutants compared to the wild type.

Indeed, results of hormonal profiling confirms a tradeoff between response to contrasting Pi availability and activation of defense-related compounds with increases in endogenous salicylic acid concentrations in the *vte1* mutant compared to the wild type at low Pi in unprimed plants, and enhanced JA-Ile levels in the *vte4* mutant compared to the wild type at low Pi in primed plants. In these two cases, these mutants grew less than the wild type and activated more chemical defenses. It is therefore likely that reduced growth and photoprotection in vitamin E-deficient mutants favors the capacity to synthesize chemical defenses, such as salicylates and jasmonates, under abiotic stress conditions, thus suggesting a tradeoff between growth and different defense pathways in plants (growth and photoprotection versus potential chemical defense to biotrophs and necrotrophs through salicylates and jasmonates, respectively), which is in agreement with previous studies (Demmig-Adams et al., 2013, 2014; Morales et al., 2015; Simancas and Munné-Bosch, 2015).

The present study shows a link between the capacity of plants to synthesize chloroplastic antioxidants and massive changes in gene expression, therefore suggesting vitamin E influences retrograde signaling an aspect that has been previously proposed (Hofius et al., 2004; Sattler et al., 2004; Munné-Bosch, 2005; Cela et al., 2011; Pfanschmidt and Munné-Bosch, 2013). In this respect, it has been previously shown that tocopherols play a major role in the regulation of fatty acid metabolism, not only from chloroplasts, but also from the endoplasmic reticulum, due to a continuous exchange of information between endoplasmic reticulum and chloroplast membranes that may help transfer signals from chloroplasts to the nucleus (Sattler et al., 2006; Mehrshahi et al., 2013, 2014). In the present study, pre-treatment with moderately low Pi (condition A) led to down- and up-regulation of MYB30 in the wild type and the *vte4* mutant, respectively. MYB30 is a TF that regulates very-long-chain fatty acid biosynthesis (Raffaele et al., 2008), therefore suggesting a link between vitamin E and fatty acid metabolism in plant response to low Pi. Furthermore, alterations in fatty acid metabolism due to the effects of tocopherol deficiency (in the *vte1* mutant) or an altered tocopherol composition (in the *vte4* mutant) may lead to profound changes in lipid peroxidation products, including alterations in both enzymatic (as shown here with jasmonate levels in the *vte4* mutant) and non-enzymatic lipid peroxidation

products, an aspect that warrants further investigation in *vte* mutants exposed to contrasting Pi availability. It is concluded that α -tocopherol may play a major role in plant response to contrasting Pi availability not only protecting plants from photo-oxidative stress, but also exerting a regulatory role on growth and defense through modulation of specific clusters of gene expression and hormones. Further research is, however, needed to better understand the metabolic and cellular processes linking vitamin E with retrograde signaling in plants.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SM-B and SB conceived the research plans. AA and BS performed the experiments. AA and SM-B wrote the article with contributions of BS and SB.

FUNDING

This work was supported by the Catalan Government (Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats Academia Award given to SM-B), the Spanish Government (project number BFU2015-64001-P/MINECO/FEDER), and the Max-Planck Institute of Molecular Plant Physiology.

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to Laura Siles and Maren Müller for their help with this work. We are also indebted to Serveis Científicotècnics for technical assistance. Plastochromanol-8 standard was kindly provided by Jerzy Kruk (Jagiellonian University, Krakow, Poland).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.01396/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Abbasi, A.-R., 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. *Plant Physiol.* 143, 1720–1738. doi: 10.1104/pp.106.094771
- Abbasi, A.-R., Saur, A., Hennig, P., Tschiersch, H., Hajirezaei, M., Hofius, D., et al. (2009). Tocopherol deficiency in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants leads to accelerated senescence. *Plant Cell Environ.* 32, 144–157. doi: 10.1111/j.1365-3040.2008.01907.x
- Asensi-Fabado, M. A., Ammon, A., Sonnewald, U., Munné-Bosch, S., and Voll, L. M. (2015). Tocopherol deficiency reduces sucrose export from salt-stressed potato leaves independently of oxidative stress and symplastic obstruction by callose. *J. Exp. Bot.* 66, 957–971. doi: 10.1093/jxb/eru453
- Austin, J. R., Frost, E., Vidi, P. A., Kessler, F., and Staehlin, L. A. (2006). Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes. *Plant Cell* 18, 1693–1703. doi: 10.1105/tpc.105.039859
- Bari, R., Pant, B. D., Stitt, M., and Scheible, W. R. (2006). PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiol.* 141, 988–999. doi: 10.1104/pp.106.079707
- Berger, S. L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447, 407–412. doi: 10.1038/nature05915
- Bergmüller, E., Porfirova, S., and Dörmann, P. (2003). Characterization of an *Arabidopsis* mutant deficient in γ -tocopherol methyltransferase. *Plant Mol. Biol.* 52, 1181–1190. doi: 10.1023/B:PLAN.0000004307.62398.91
- Caldana, C., Scheible, W. R., Mueller-Roeber, B., and Zuzic, S. (2007). A quantitative RT-PCR platform for high-throughput expression profiling of 2500 rice transcription factors. *Plant Methods* 3:7 doi: 10.1186/1746-4811-3-7
- Cela, J., Chang, C., and Munné-Bosch, S. (2011). Accumulation of γ - rather than α -tocopherol alters ethylene signaling gene expression in the *vte4* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 52, 1389–1400. doi: 10.1093/pcp/pcr085

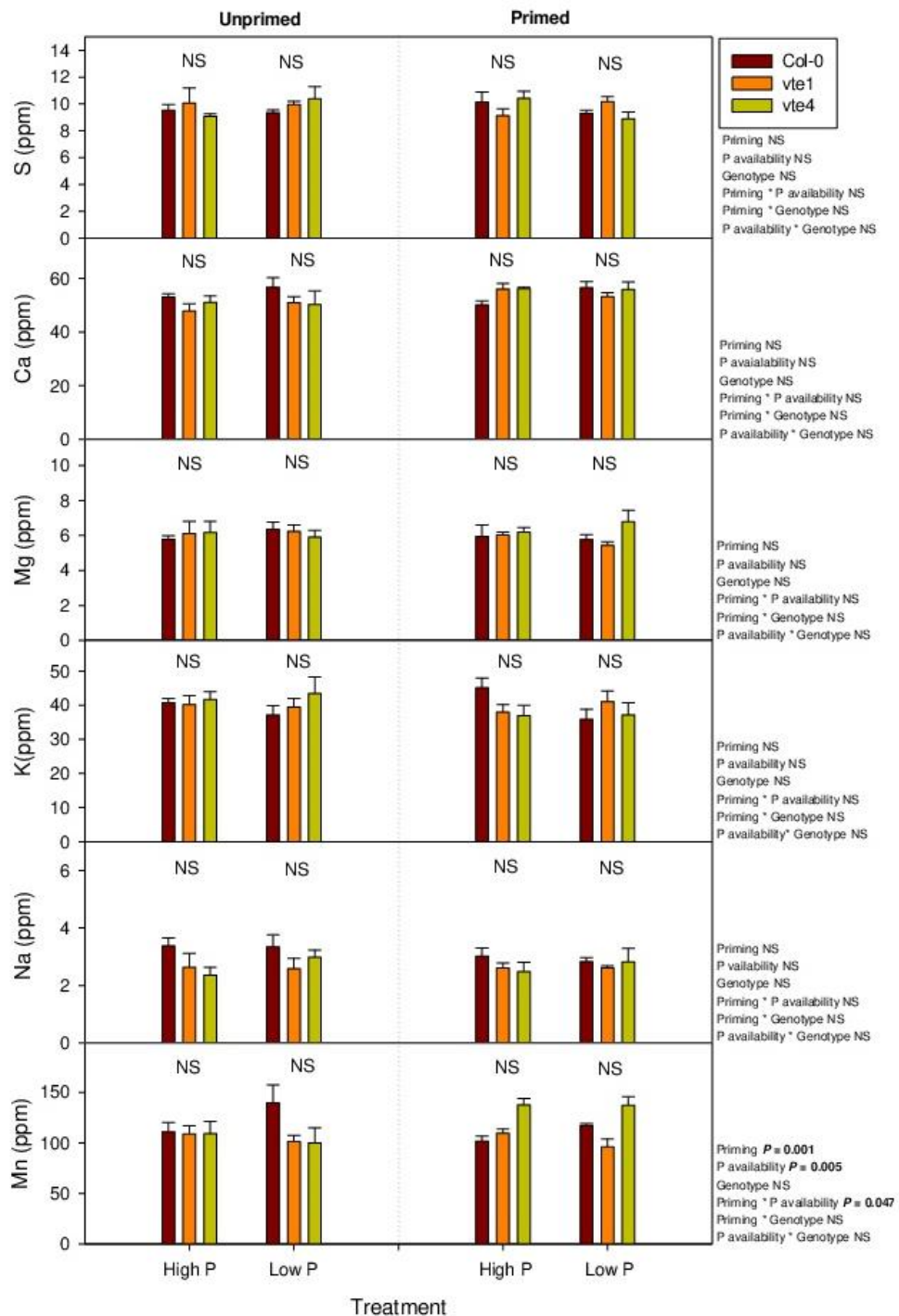
- Chen, Z. H., Nimmo, G. A., Jenkins, G. I., and Nimmo, H. G. (2007). BHLH32 modulates several biochemical and morphological processes that respond to Pi starvation in Arabidopsis. *Biochem. J.* 405, 191–198. doi: 10.1042/BJ20070102
- Ciereszkowa, I., and Kleczkowski, L. A. (2002). Effects of phosphate deficiency and sugars on expression of rab18 in Arabidopsis: hexokinase-dependent and okadaic acid-sensitive transduction of the sugar signal. *Biochim. Biophys. Acta* 1579, 43–49. doi: 10.1016/S0167-4781(02)00502-X
- Dai, X., Wang, W., and Zhang, W. H. (2016). OsWRKY74, a WRKY transcription factor, modulates tolerance to phosphate starvation in rice. *J. Exp. Bot.* 67, 947–960. doi: 10.1093/jxb/erv515
- Demmig-Adams, B., Cohu, C. M., Amiard, V., Zadelhoff, G., Veldink, G. A., Muller, O., et al. (2013). Emerging trade-offs – impact of photoprotectants (PsbS, xanthophylls, and vitamin E) on oxylipins and biotic defense. *New Phytol.* 197, 720–729. doi: 10.1111/nph.12100
- Demmig-Adams, B., Stewart, J. J., and Adams, W. W. III (2014). “Chloroplast photoprotection and the trade-off between abiotic and biotic defense,” in *Nonphotochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria. Advances in Photosynthesis and Respiration*, Vol. 40, eds B. Demmig-Adams, G. Garab, W. Adams III, and Govindjee (Dordrecht: Springer).
- Devaiah, B. N., Karthikeyan, A. S., and Raghothama, K. G. (2007a). WRKY75 transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 143, 1789–1801.
- Devaiah, B. N., Nagarajna, V. K., and Raghothama, K. G. (2007b). Phosphate homeostasis and root development in Arabidopsis are synchronized by the zing finger transcription factor ZAT6. *Plant Physiol.* 145, 147–159.
- Devaiah, B. N., Madhuvanthy, R., Karthikeyan, A. S., and Raghothama, K. G. (2009). Phosphate starvation responses and gibberellic acid biosynthesis are regulated by the MYB62 transcription factor in Arabidopsis. *Mol. Plant* 2, 43–58. doi: 10.1093/mp/ssn081
- Dhar, M. K., Vishal, P., Sharma, R., and Kaul, S. (2014). Epigenetic dynamics: role of epimarks and underlying machinery in plants exposed to abiotic stress. *Int. J. Genomics* 2014:187146. doi: 10.1155/2014/187146
- Ernst, J., and Bar-Joseph, Z. (2006). STEM: a tool for the analysis of short term series gene expression data. *BMC Bioinformatics* 7:191. doi: 10.1186/1471-2105-7-191
- Ernst, J., Nau, G. J., and Bar-Joseph, Z. (2005). Clustering short time series gene expression data. *Bioinformatics* 21, i159–i168. doi: 10.1093/bioinformatics/bti1022
- Falk, J., and Munné-Bosch, S. (2010). Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. *J. Exp. Bot.* 61, 1549–1566. doi: 10.1093/jxb/erq030
- Franco-Zorrilla, J. M., González, A., Bustos, R., Linhares, F., Leyva, A., and Paz-Ares, J. (2004). The transcriptional control of plant responses to phosphate limitation. *J. Exp. Bot.* 55, 285–293. doi: 10.1093/jxb/erh009
- Franco-Zorrilla, J. M., Marín, A. C., Leyva, A., and Paz-Ares, J. (2005). Interaction between phosphate-starvation, sugar, and cytokinin signaling in Arabidopsis and the roles of cytokinin receptors CRE1/AHK4 and AHK3. *Plant Physiol.* 138, 847–857. doi: 10.1104/pp.105.060517
- 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. doi: 10.1016/S0304-4165(89)80016-9
- 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. doi: 10.1105/tpc.105.037036
- Herrera-Estrella, L., and López-Arredondo, D. (2016). Phosphorus: the underrated element for feeding the world. *Trends Plant Sci.* 21, 461–463. doi: 10.1016/j.tplants.2016.04.010
- Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F., and Prange, R. K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207, 604–611.
- 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. doi: 10.1104/pp.104.043927
- Jiang, C., Gao, X., Liao, L., Harberd, N. P., and Fu, X. (2007). Phosphate starvation root architecture and anthocyanin accumulation responses are modulated by the gibberellin–DELLA signaling pathway in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 145, 1460–1467. doi: 10.1104/pp.107.103788
- Kruk, J., Szymanska, R., Cela, J., and Munné-Bosch, S. (2014). Plastochromanol-8: fifty years of research. *Phytochemistry* 108, 9–16. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.09.011
- Lotkowska, M. E., Tohge, T., Fernie, A. R., Xue, G.-P., Balazadeh, S., and Mueller-Roeber, B. (2015). The Arabidopsis transcription factor MYB112 promotes anthocyanin formation during salinity and under high light stress. *Plant Physiol.* 169, 1862–1880. doi: 10.1104/pp.15.00605
- 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. doi: 10.1105/tpc.107.054718
- Marschner, P. (2012). *Marschner’s Mineral Nutrition of Higher Plants*. Amsterdam: Elsevier.
- Mehrshahi, P., Johnny, C., and DellaPenna, D. (2014). Redefining the metabolic continuity of chloroplasts and ER. *Trends Plant Sci.* 19, 501–507. doi: 10.1016/j.tplants.2014.02.013
- Mehrshahi, P., Stefano, G., Andalaro, J. M., Brandizzi, F., Froehlich, J. E., and DellaPenna, D. (2013). Transorganellar complementation redefines the biochemical continuity of endoplasmic reticulum and chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 12126–12131. doi: 10.1073/pnas.1306331110
- Mène-Saffrané, L., Jones, A. D., and DellaPenna, D. (2010). Plastochromanol-8 and tocopherols are essential lipid-soluble antioxidants during seed desiccation and quiescence in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 17815–17820. doi: 10.1073/pnas.1006971107
- Misson, J., Raghothama, K. G., Jain, A., Jouhet, J., Block, M. A., Bliigny, R., et al. (2005). A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 11934–11939. doi: 10.1073/pnas.0505266102
- Morales, M., Garcia, Q. S., and Munné-Bosch, S. (2015). Ecophysiological response to seasonal variations in water availability in the arborescent, endemic plant *Vellozia gigantea*. *Tree Physiol.* 35, 253–265. doi: 10.1093/treephys/tpv012
- Morcuende, R., Bari, R., Gibon, Y., Zheng, W., Pant, B. D., Bläsing, O., et al. (2007). Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of Arabidopsis in response to phosphorus. *Plant Cell Environ.* 30, 85–112. doi: 10.1111/j.1365-3040.2006.01608.x
- Müller, M., and 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. doi: 10.1186/1746-4811-7-37
- Müller, M., and Munné-Bosch, S. (2015). Ethylene response factors: a key regulatory hub in hormone and stress signaling. *Plant Physiol.* 169, 32–41. doi: 10.1104/pp.15.00677
- Munné-Bosch, S. (2005). Linking tocopherols with cellular signaling in plants. *New Phytol.* 166, 363–366. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01411.x
- Munné-Bosch, S., and Alegre, L. (2002). The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21, 31–57. doi: 10.1080/0735-260291044179
- Munné-Bosch, S., Weiler, E. W., Alegre, L., Müller, M., Düchting, P., and Falk, J. (2007). α -Tocopherol may influence cellular signaling by modulating jasmonic acid levels in plants. *Planta* 225, 681–691. doi: 10.1007/s00425-006-0375-0
- Pfannschmidt, T., and Munné-Bosch, S. (2013). “Plastidial signaling during the plant life cycle,” in *Plastid Development in Leaves during Growth and Senescence, Advances in Photosynthesis and Respiration*, Vol. 36, eds B. Biswal, K. Krupinska, and U. C. Biswal (Dordrecht: Springer), 503–528.
- Porfirova, S., Bergmüller, E., Tropsch, 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. U.S.A.* 99, 12495–12500. doi: 10.1073/pnas.182330899
- Proost, S., Van Bel, M., Vaneecchoutte, D., Van de Peer, Y., Inzé, D., Mueller-Roeber, B., et al. (2015). PLAZA 3.0: an access point for plant comparative genomics. *Nucleic Acids Res.* 43, D974–D981. doi: 10.1093/nar/gku986
- Raffaele, S., Vaillau, F., Liger, A., Joubès, J., Miersch, O., Huard, C., et al. (2008). A MYB transcription factor regulates very-long-chain fatty acid biosynthesis for activation of the hypersensitive cell death response in Arabidopsis. *Plant Cell* 20, 752–767. doi: 10.1105/tpc.107.054858

- Rouached, H., Arpat, A. B., and Poirier, Y. (2010). Regulation of phosphate starvation responses in plants: Signaling players and cross-talks. *Mol. Plant* 3, 288–299. doi: 10.1093/mp/ssp120
- Rubio, V., Linhares, F., Solano, R., Martín, A. C., Iglesias, J., Leyva, A., et al. (2001). A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev.* 15, 2122–2133. doi: 10.1101/gad.204401
- Rubio, V., Bustos, R., Irigoyen, M. L., Cardona-Lopez, X., Rojas-Triana, M., and Paz-Ares, J. et al. (2009). Plant hormones and nutrient signaling. *Plant Mol. Biol.* 69, 361–373. doi: 10.1007/s11103-008-9380-y
- Saeed, A. I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., et al. (2003). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 34, 374–378.
- Sarnowska, E. A., Rolicka, A. T., Bucior, E., Cwiek, P., Tohge, T., Fernie, A. R., et al. (2013). DELLA-interacting SWI3C core subunit of switch/sucrose nonfermenting chromatin remodeling complex modulates gibberellin responses and hormonal cross talk in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 163, 305–317. doi: 10.1104/pp.113.223933
- Sato, A., and Miura, K. (2011). Root architecture remodeling induced by phosphate starvation. *Plant Signal. Behav.* 6, 1122–1126. doi: 10.4161/psb.6.8.15752
- Sattler, S. E., Cahoon, E. B., Coughlan, S. J., and Della Penna, D. (2004). Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell* 16, 1419–1432. doi: 10.1105/tpc.021360
- Sattler, S. E., Cahoon, E. B., Coughlan, S. J., and Della Penna, D. (2003). Characterization of tocopherol cyclases from higher plants and cyanobacteria. Evolutionary implications for tocopherol synthesis and function. *Plant Physiol.* 132, 2184–2195. doi: 10.1104/pp.103.024257
- Sattler, S. E., Mène-Saffrané, L., Farmer, E. E., Krischke, M., Mueller, M. J., and Della Penna, D. (2006). Nonenzymatic lipid peroxidation reprograms gene expression and activates defense markers in Arabidopsis tocopherol-deficient mutants. *Plant Cell* 18, 3706–3720. doi: 10.1105/tpc.106.044065
- Schönberger, B., Chen, X., Mager, S., and Ludewig, U. (2016). Site-dependent differences in DNA methylation and their impact on plant establishment and phosphorus nutrition in *Populus trichocarpa*. *PLoS ONE* 11:e0168623. doi: 10.1371/journal.pone.0168623
- Simancas, B., and Munné-Bosch, S. (2015). Interplay between Vitamin E and phosphorus availability in the control of longevity in *Arabidopsis thaliana*. *Ann. Bot.* 116, 511–518. doi: 10.1093/aob/mcv033
- Szymanska, R., and Kruk, J. (2010). Plastoquinol is the main prenyllipid synthesized during acclimation to high light conditions in Arabidopsis and is converted to plastochromanol by tocopherol cyclase. *Plant Cell Physiol.* 51, 537–545. doi: 10.1093/pcp/pcq017
- Tohge, T., Watanabe, M., Hoefgen, R., and Fernie, A. R. (2013). The evolution of phenylpropanoid metabolism in the green lineage. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 48, 123–152. doi: 10.3109/10409238.2012.758083
- Trull, M. C., Guiltinan, M. J., Lynch, J. P., and Deikman, J. (1997). The responses of wild-type and ABA mutant *Arabidopsis thaliana* plants to phosphorus starvation. *Plant Cell Environ.* 20, 85–92. doi: 10.1046/j.1365-3040.1997.d01-4.x
- Vidi, P. A., Kanwischer, M., Baginsky, S., Austin, J. R., Csucs, G., Dörmann, P., et al. (2006). Tocopherol cyclase (VTE1) localization and vitamin E accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles. *J. Biol. Chem.* 281, 11225–11234. doi: 10.1074/jbc.M511939200
- Williamson, L. C., Ribrioux, S. P. C. P., Fitter, A. H., and Leyser, H. M. O. (2001). Phosphate availability regulates root system architecture in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 126, 875–882. doi: 10.1104/pp.126.2.875
- Wissuwa, M., Gamat, G., and Ismail, A. M. (2005). Is root growth under phosphorus deficiency affected by source or sink limitations? *J. Exp. Bot.* 56, 1943–1950. doi: 10.1093/jxb/eri189
- Wu, X., Li, Y., Crise, B., and Burgess, S. M. (2003). Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* 300, 1749–1751. doi: 10.1126/science.1083413
- Yang, X. J., and Finnegan, P. M. (2010). Regulation of phosphate starvation responses in higher plants. *Ann. Bot.* 105, 513–526. doi: 10.1093/aob/mcq015
- Yi, K., Wu, Z., Zhou, J., Du, L., Guo, L., Wu, Y., et al. (2005). OsPTF1, a novel transcription factor involved in tolerance to phosphate starvation in rice. *Plant Physiol.* 138, 2087–2096. doi: 10.1104/pp.105.063115
- Zbierzak, A. M., Kanwischer, M., Wille, C., Vidi, P. A., Giavalisco, P., Lohmann, A., et al. (2010). Intersection of the tocopherol and plastoquinol metabolic pathways at the plastoglobule. *Biochem. J.* 425, 389–399. doi: 10.1042/BJ20090704
- Zhang, K., Sridhar, V. V., Zhu, J., and Kapoor, A. (2007). Distinctive core histone post-translational modification patterns in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 2:e1210. doi: 10.1371/journal.pone.0001210
- Zhou, J., Jiao, F. C., Wu, Z. C., Li, Y., Wang, X., He, X., et al. (2008). OsPHR2 is involved in phosphate-starvation signaling and excessive phosphate accumulation in shoots of plants. *Plant Physiol.* 146, 1673–1686. doi: 10.1104/pp.107.111443

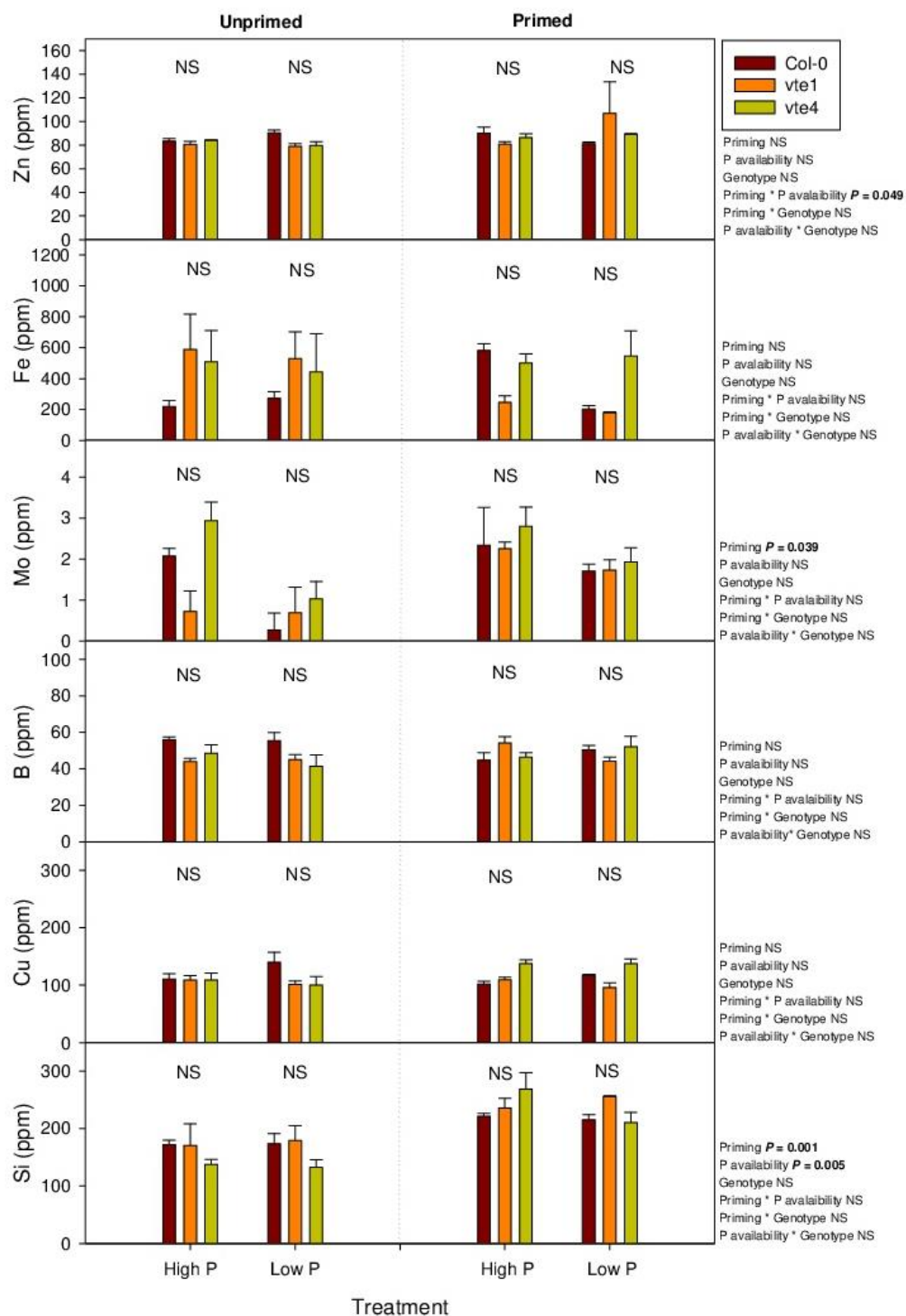
Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Allu, Simancas, Balazadeh and Munné-Bosch. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

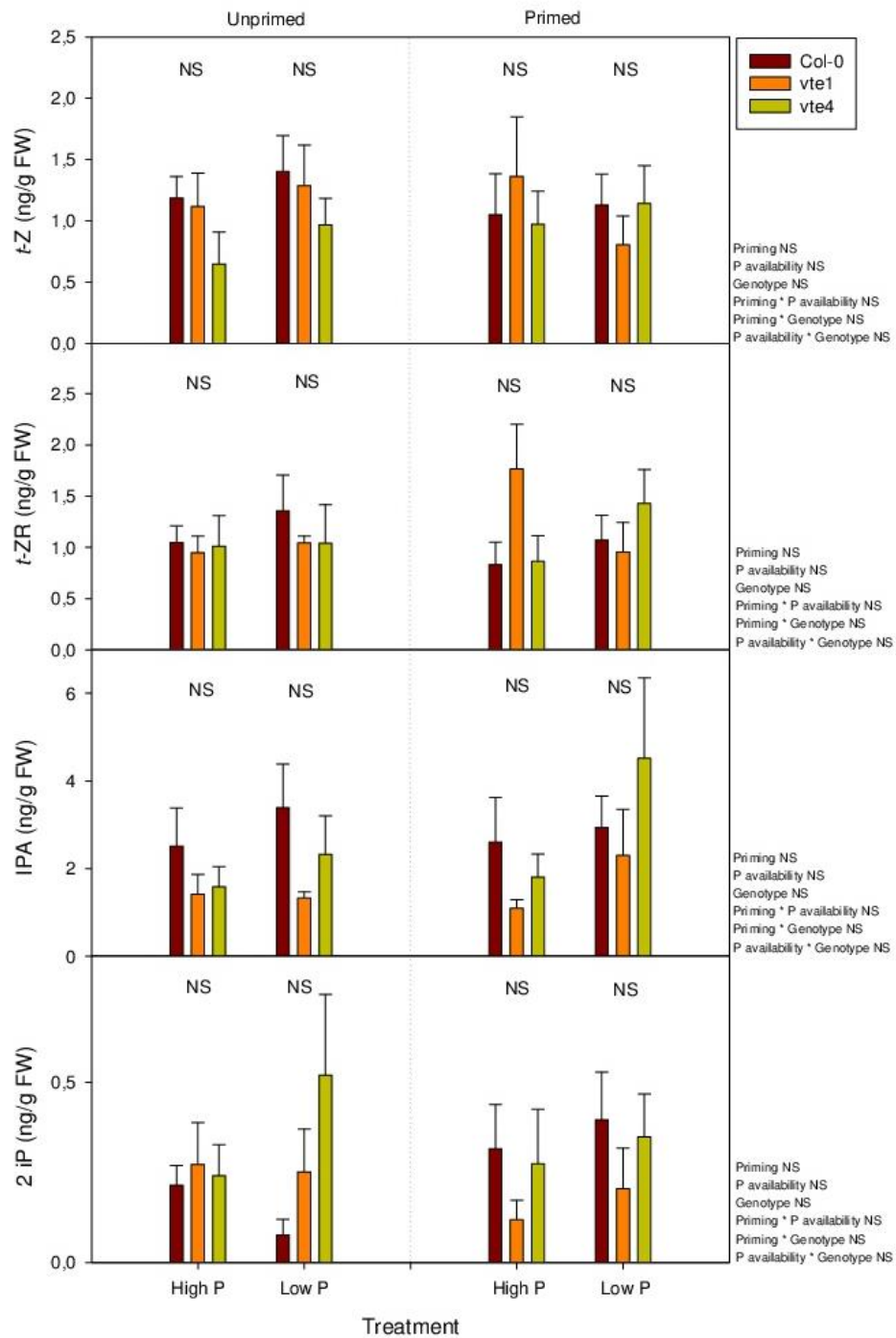
Suppl. Fig. 1. Endogenous S, Ca, Mg, K, Na and Mn levels in vitamin E-deficient (*vte1* and *vte4* mutants) and wild type plants of *Arabidopsis thaliana* exposed to contrasting Pi availability, including unprimed and primed plants. Data represent the mean \pm SE of n=6 individuals. Significant differences between groups were tested by three-way analysis of variance (ANOVA, $P < 0.05$). Different letters significant differences between genotypes at any given treatment (Duncan posthoc tests, $P < 0.05$). NS, not significant. Results are expressed as parts per million (ppm) on a dry matter basis.



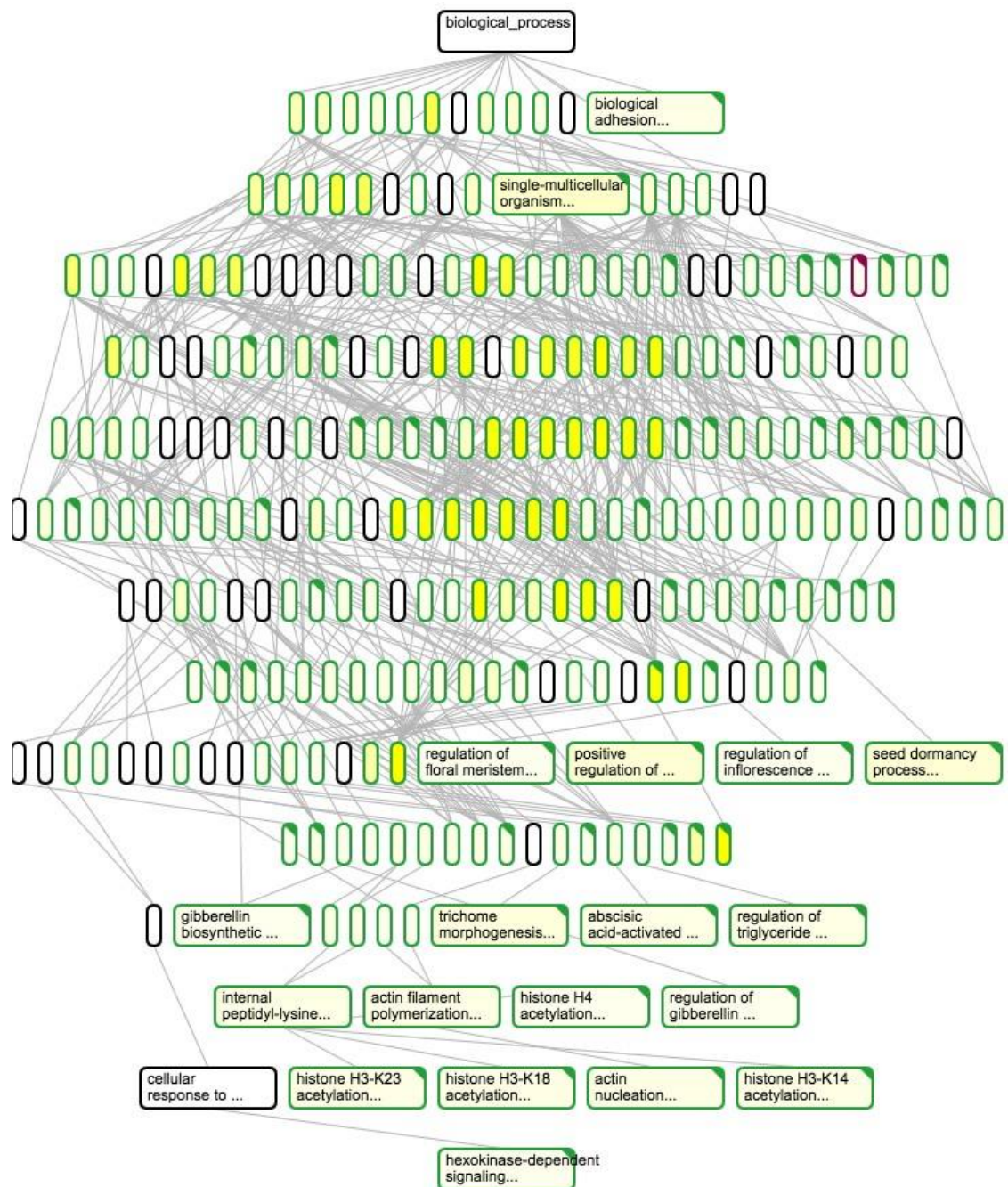
Suppl. Fig. 2. Endogenous Zn, Fe, Mo, B, Cu and Si levels in vitamin E-deficient (*vte1* and *vte4* mutants) and wild type plants of *Arabidopsis thaliana* exposed to contrasting Pi availability, including unprimed and primed plants. Data represent the mean \pm SE of n=6 individuals. Significant differences between groups were tested by three-way analysis of variance (ANOVA, $P < 0.05$). Different letters significant differences between genotypes at any given treatment (Duncan posthoc tests, $P < 0.05$). NS, not significant. Results are expressed as parts per million (ppm) on a dry matter basis.



Suppl. Fig. 3. Endogenous concentrations of cytokinins, including *trans*-zeatin (*t*-Z), *trans*-zeatin riboside (*t*-ZR), isopentenyladenosine (IPA) and 2-isopentenyladenine (2iP) in vitamin E-deficient (*vte1* and *vte4* mutants) and wild type plants of *Arabidopsis thaliana* exposed to contrasting Pi availability, including unprimed and primed plants. Data represent the mean \pm SE of n=6 individuals. Significant differences between groups were tested by three-way analysis of variance (ANOVA, $P < 0.05$). Different letters significant differences between genotypes at any given treatment (Duncan posthoc tests, $P < 0.05$). NS, not significant.



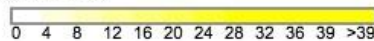
Suppl. Fig. 4. GO enrichment analysis for priming responsive TFs in wild-type plants. Several significantly over-represented GO terms ($P < 0.05$) were obtained for the priming responsive differentially expressed TFs from wild type plants using GO enrichment analysis tool in PLAZA 3.0.



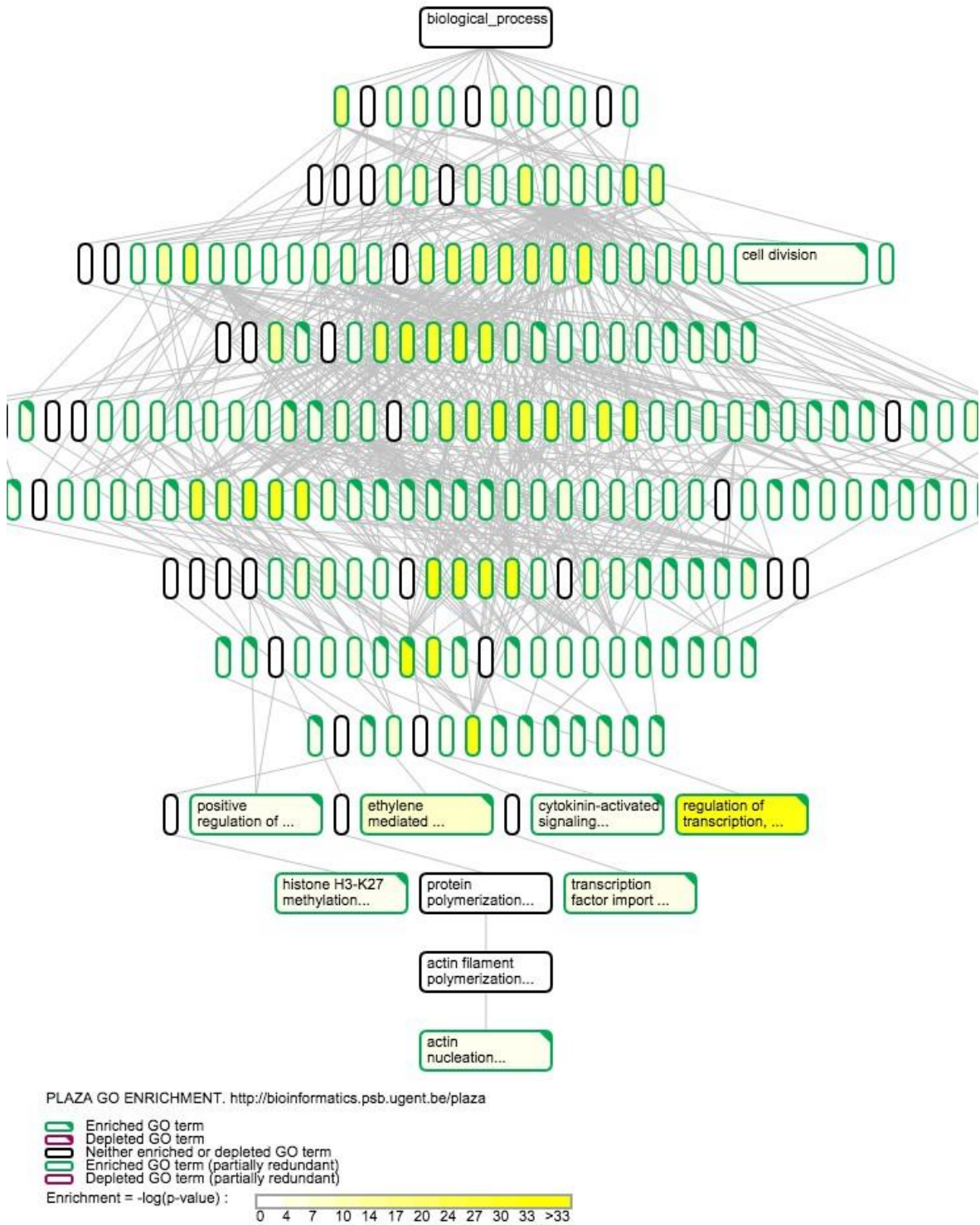
PLAZA GO ENRICHMENT. <http://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza>

- █ Enriched GO term
- █ Depleted GO term
- █ Neither enriched or depleted GO term
- █ Enriched GO term (partially redundant)
- █ Depleted GO term (partially redundant)

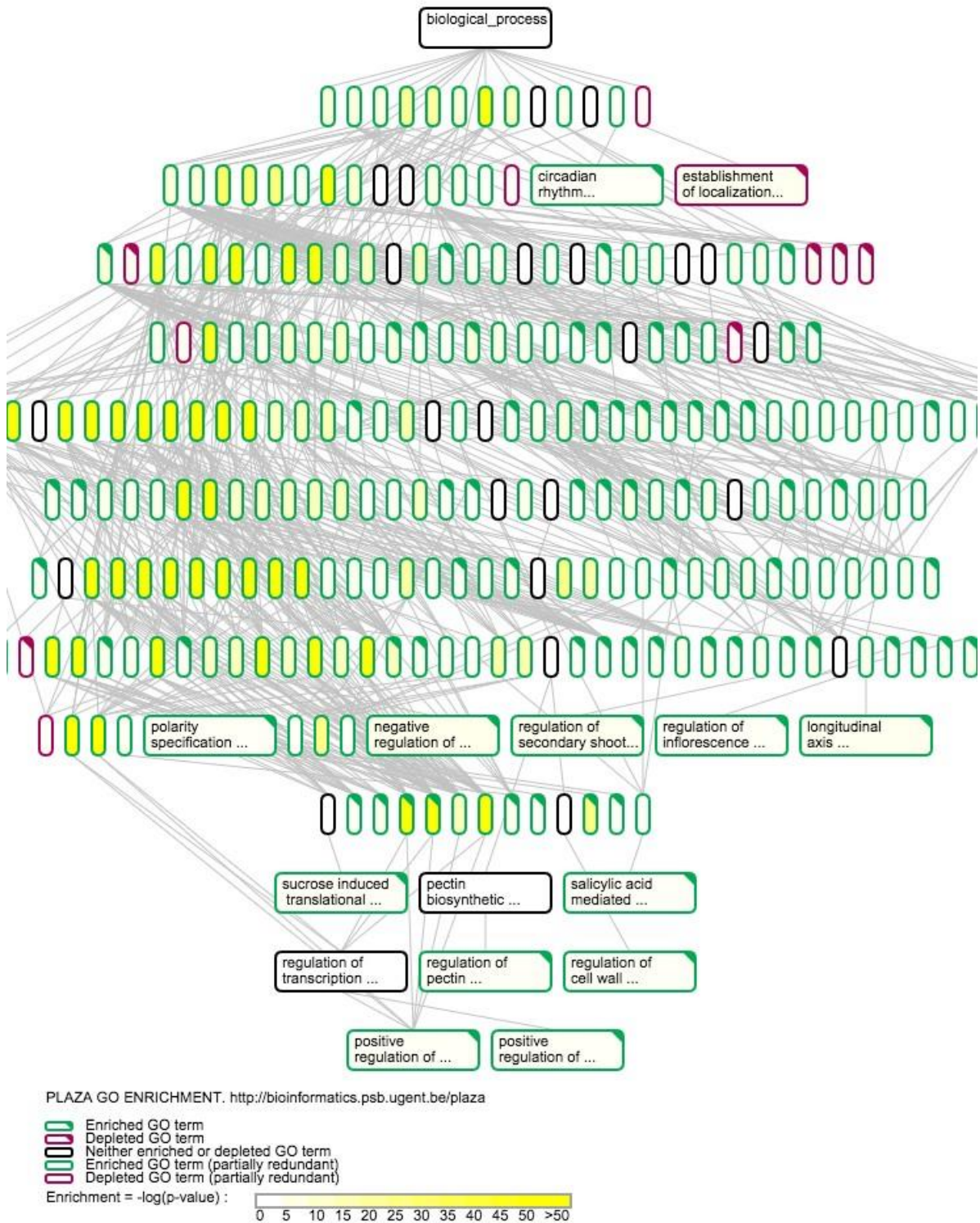
Enrichment = $-\log(p\text{-value})$:



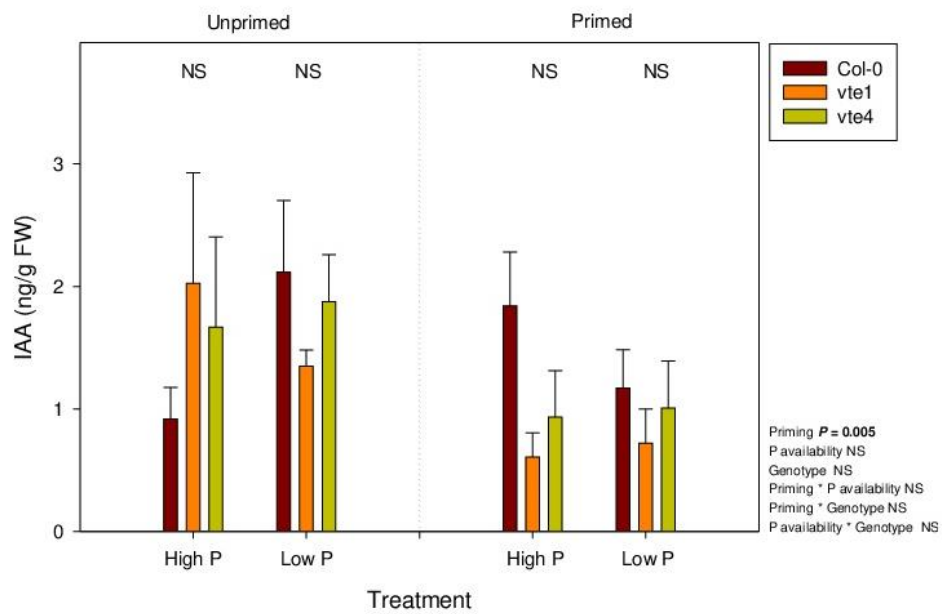
Suppl. Fig. 5. GO enrichment analysis for priming responsive TFs in *vte1*/wild type plants. Several significantly over-represented GO terms ($P < 0.05$) were obtained for the priming responsive differentially expressed TFs from *vte1*/WT plants using GO enrichment analysis tool in PLAZA 3.0.



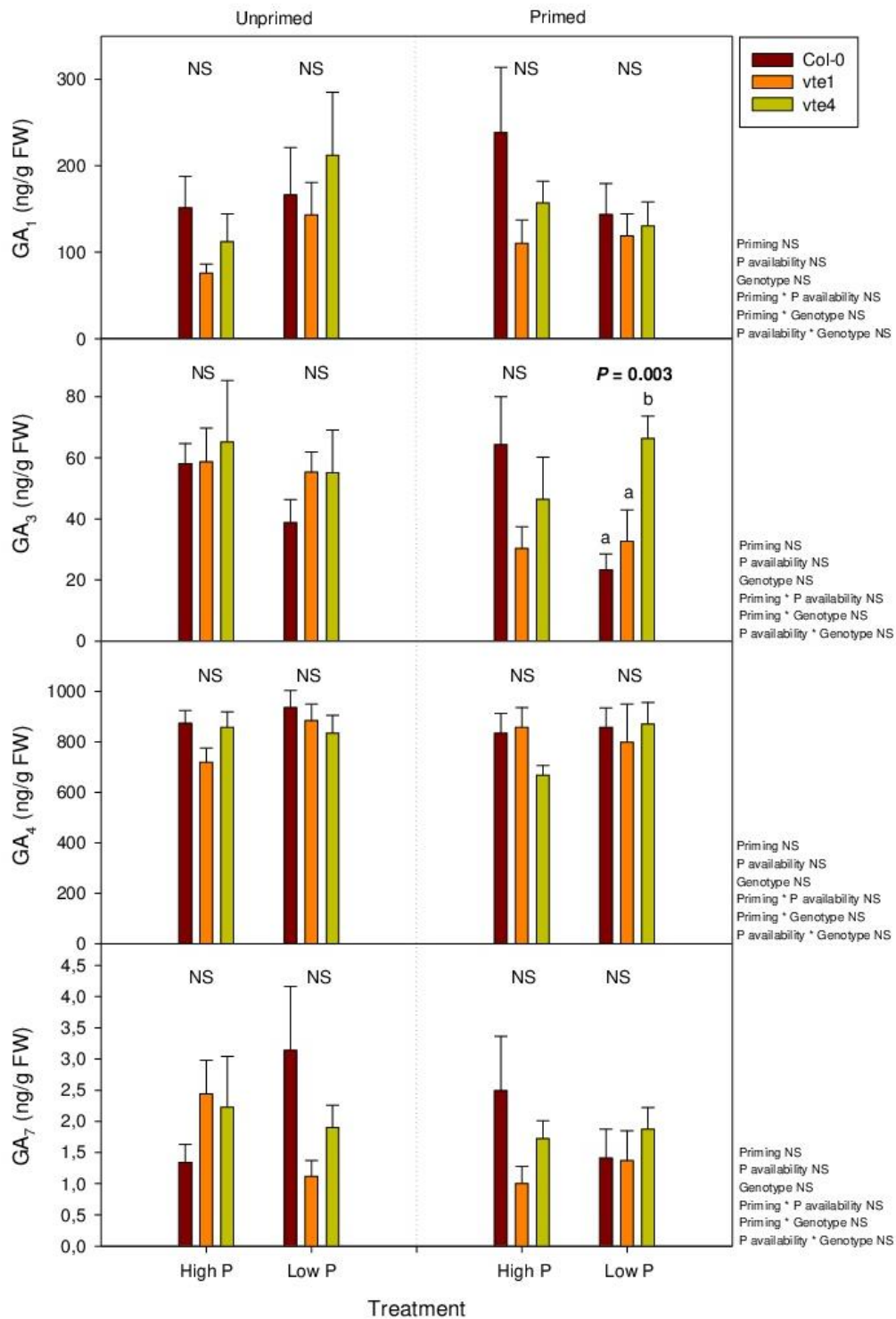
Suppl. Fig. 6. GO enrichment analysis for priming responsive TFs in *vte4*/wild type plants. Several significantly over-represented GO terms ($P < 0.05$) were obtained for the priming responsive differentially expressed TFs from *vte4*/WT plants using GO enrichment analysis tool in PLAZA 3.0.



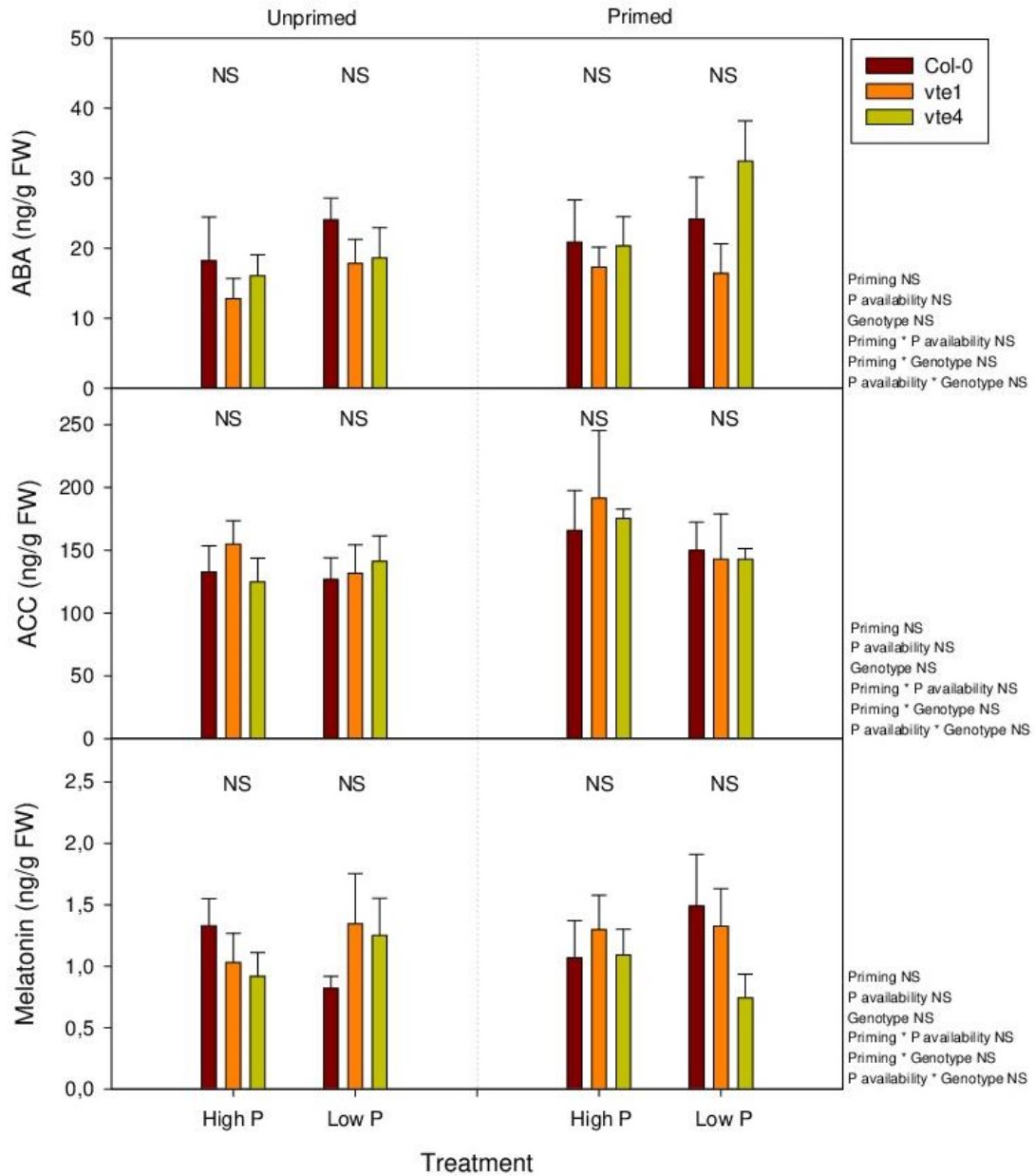
Suppl. Fig. 7. Endogenous concentrations of the auxin, indole-3-acetic acid (IAA) in vitamin E-deficient (*vte1* and *vte4* mutants) and wild type plants of *Arabidopsis thaliana* exposed to contrasting Pi availability, including unprimed and primed plants. Data represent the mean \pm SE of n=6 individuals. Significant differences between groups were tested by three-way analysis of variance (ANOVA, $P < 0.05$). Different letters significant differences between genotypes at any given treatment (Duncan posthoc tests, $P < 0.05$). NS, not significant.



Suppl. Fig. 8. Endogenous concentrations of gibberellins, including gibberellin 1 (GA₁), GA₃, GA₄ and GA₇ in vitamin E-deficient (*vte1* and *vte4* mutants) and wild type plants of *Arabidopsis thaliana* exposed to contrasting Pi availability, including unprimed and primed plants. Data represent the mean ± SE of n=6 individuals. Significant differences between groups were tested by three-way analysis of variance (ANOVA, *P*<0.05). Different letters significant differences between genotypes at any given treatment (Duncan posthoc tests, *P*<0.05). NS, not significant.



Suppl. Fig. 9. Endogenous concentrations of abscisic acid (ABA), the ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and melatonin in vitamin E- deficient (*vte1* and *vte4* mutants) and wild type plants of *Arabidopsis thaliana* exposed to contrasting Pi availability, including unprimed and primed plants. Data represent the mean \pm SE of n=6 individuals. Significant differences between groups were tested by three-way analysis of variance (ANOVA, $P < 0.05$). Different letters significant differences between genotypes at any given treatment (Duncan posthoc tests, $P < 0.05$). NS, not significant.



Capítulo 3. Diferencias entre machos y hembras en la fotoinhibición, el estrés foto-oxidativo y la fotoprotección en ortigas (*Urtica dioica* L.) expuestas a sequía y a deficiencia nutricional

Chapter 3 Sex-related differences in photoinhibition, photo-oxidative stress and photoprotection in stinging nettle (*Urtica dioica* L.) exposed to drought and nutrient deficiency

Bárbara Simancas¹, Marta Juvany¹, Alba Cotado¹ y Sergi Munné-Bosch¹

¹ Departamento de Biología Evolutiva, Ecología y Ciencias Ambientales, Unidad de Fisiología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, Barcelona, España

Publicado en **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** (2016) 156, 22-28.

doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.01.005



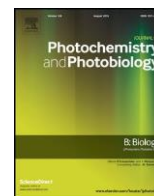
Resumen del Capítulo 3

Especies de plantas dioicas pueden mostrar diferentes necesidades nutricionales y además, pueden presentar diferentes tipos de respuesta frente al estrés oxidativo y frente a un estrés ambiental. Dentro de los estreses que más afectan a las plantas, la sequía y el déficit nutricional son los principales estreses abióticos que puede sufrir una planta en el medio natural. Por ello, este estudio trata de conocer si existen diferencias en el grado de estrés foto-oxidativo entre machos y hembras de individuos de *Urtica dioica* L. expuestos a una combinación de sequía severa y de disponibilidad nutricional y de fósforo. En primer lugar, se utilizó un conjunto de plantas cultivadas en condiciones de campo, expuestas a sequía extrema con o sin fertilizante NPK. En segundo lugar, se estudiaron plantas en macetas expuestas a sequía extrema y a distintas concentraciones de fósforo. Se midieron la relación F_v/F_m (máxima eficiencia del PSII), la capacidad de fotoprotección (niveles de carotenoides, incluido el ciclo de las xantofilas, y vitaminas C y E) y el grado de peroxidación lipídica (niveles de hidroperóxidos). Los resultados mostraron que una aplicación del fertilizante NPK tuvo un efecto positivo en las plantas afectadas por la sequía, reduciendo la peroxidación lipídica tanto en machos como en hembras. Sin embargo, la deficiencia de P_i condujo a una fotoinhibición residual (por la reducción de F_v/F_m) y mayor peroxidación lipídica sólo en las hembras. Con ello podemos concluir que la mayor disponibilidad de nutrientes en el suelo puede aliviar el estrés foto-oxidativo en sequía. Además, la planta *U. dioica* muestran dimorfismo secundario sexual en términos de fotoinhibición y el estrés foto-oxidativo, pero esto sólo es evidente cuando el estrés es muy fuerte.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jphotobiol

Sex-related differences in photoinhibition, photo-oxidative stress and photoprotection in stinging nettle (*Urtica dioica* L.) exposed to drought and nutrient deficiency



Bárbara Simancas, Marta Juvany, Alba Cotado, Sergi Munné-Bosch

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

a r t i c l e i n f o

Article history:

Received 28 October 2015

Received in revised form 18 December 2015

Accepted 5 January 2016

Available online 7 January 2016

Keywords:

Antioxidants

Dimorphism

Dioecy

P availability

Photo-oxidative stress

Photoprotection

Vitamin E

a b s t r a c t

Dimorphic plant species can show distinct nutrient needs due to sex-related differences in nutrient allocation to reproductive structures, which can potentially affect their sensitivity to photoinhibition and photo-oxidative stress. Here, we investigated sex-related differences in the extent of photo-oxidative stress in male and female individuals of *U. dioica* exposed to a combination of severe drought and nutrient starvation. Male and female individuals of *U. dioica* subject to severe drought stress were exposed to various levels of nutrient availability. First, a set of plants grown under field conditions and exposed to summer drought was used to test the effects of nutrient supply (given as NPK fertilizer). Secondly, the effects of various phosphate concentrations in the nutrient solution were tested in drought-stressed potted plants. The F_v/F_m ratio (maximum efficiency of PSII photochemistry), photoprotection capacity (levels of carotenoids, including the xanthophyll cycle, and vitamins C and E), and the extent of lipid peroxidation (hydroperoxide levels) were measured. Results showed that an application of the NPK fertilizer to the soil had a positive effect on drought-stressed plants, reducing the extent of lipid peroxidation in both males and females. P deficiency led to residual photoinhibition, as indicated by significant reductions in the F_v/F_m ratio, and enhanced lipid peroxidation in females, but not in males. We conclude that (i) increased nutrient availability in the soil can alleviate photo-oxidative stress in drought-stressed *U. dioica* plants, and (ii) *U. dioica* plants show sexual secondary dimorphism in terms of photoinhibition and photo-oxidative stress, but this is only apparent when stress inflicted on plants is very severe.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Abiotic stresses, such as water deficit and nutrient deficiencies, are the most limiting factors for plant productivity. The first symptom of water deficit in plants is a reduction in plant growth, which may follow with stomatal closure, reductions in photosynthesis, and if the stress is sustained in time can lead to photo-oxidative stress and damage the photosynthetic apparatus. Plants have evolved a plethora of mechanisms to circumvent the potential damaging effects of water deficit, from changes in leaf structure to global changes in gene expression [1]. Water deficit is usually associated with nutrient deficiency, since reduced water availability in the soil leads to severe nutrient deficiencies due to a reduced absorption of nutrients by roots. Such is the case that associations with mycorrhizal fungi can be one of the best protection mechanisms to withstand phosphorus (P) limitation in drought-stressed plants [2,3]. P is, together with nitrogen (N) and potassium (K), one of the most limiting nutrients for plant productivity. P is essential for the storage of genetic information, it plays a crucial role in cell membranes and in practically all energy transactions through

ATP, and it is both a substrate and a regulatory factor in photosynthesis and oxidative metabolism. Moreover, it participates in signal transduction through (de)phosphorylation reactions and, in the form of phospholipids, play a central role in membrane biochemistry [4,5].

Lipid peroxidation can be suppressed by non-polar antioxidants such as vitamin E, which together with vitamin C, carotenoids and other antioxidants prevent reactive oxygen species (ROS) accumulation, therefore keeping an adequate cellular redox state and protecting the photosynthetic apparatus from photo-oxidative damage [6]. Despite plants have evolved a plethora of interconnected photoprotective and antioxidant mechanisms to withstand photo-oxidative stress in leaves, drought stress sustained in time can lead to photo-oxidative damage. Although effects of P starvation on drought-stressed plants still need to be investigated, it is generally thought that the negative effects of drought may be exacerbated by nutrient deficiencies, such as reduced P availability, which is known to increase photo-oxidative stress in plants [7].

Several dioecious plants display secondary sexual dimorphisms, showing sex-related differences in plant response to abiotic stresses [8–11]. Under adverse conditions, the gender with the higher costs of reproduction may suffer the greatest physiological stress. It is generally assumed that female plants invest a greater amount of resources to

Corresponding author.

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

reproduction due to the formation not only of flowers, but also fruits and seeds, compared to males. Thus, females tend to suffer more the negative effects of stress than males [12–14]. Several studies have shown that females and males perform differently in their physiological response to cope with drought. Males tend to be more drought-tolerant than females [15,16], showing a more conservative use of water [17] and higher photosynthetic capacity [18]. Furthermore, females usually show higher oxidative stress [19] and reduced protection of the photosynthetic system [20] than males. Although sex-specific physiological responses to nutrient availability have been reported for some species [21], nothing is known about plant response to drought stress under various levels of nutrient availability in dimorphic species, and even less on the mechanisms underlying sex-related differences in photo-oxidative stress in dimorphic species.

Given the potential effect that sexual dimorphism may have in the response of drought-stressed plants to nutrient availability, we hypothesized that (i) an additional supply of nutrient (NPK) fertilizer in the soil may dampen the negative effects of drought stress more in females than in males, and (ii) P starvation will exacerbate the negative effects of drought stress more in females than males. With the aim of evaluating the effects of nutrient availability in the response of male and female individuals to drought stress, emphasis was put on studying the effects of NPK fertilizer and P starvation on the extent of photoinhibition, photoprotection, and photo-oxidative stress in *U. dioica* plants.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material and Sampling

Seeds of *Urtica dioica*, which were purchased in Spicegarden (www.spicegarden.eu, Germany), were sown in 0.1-L pots containing a mixture of peat:perlite:vermiculite (1:1:1, v/v/v) and plants were grown in a constant environment chamber (16 h photoperiod, 90–110 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, air temperature 21–23 °C). After two months of growth, 300 individuals were transferred to the greenhouse during 2nd April 2014.

For the first experiment (effects of NPK fertilization), 100 plants were immediately transferred to the Experimental Fields of Faculty of Biology of the University of Barcelona, where they were grown in a Calcic Luvisol (FAO) and exposed to Mediterranean field conditions. Plants were exposed to two nutrient availability regimes (50 plants per treatment) in two separate 27 m²-plots, 3 m apart, with and without an addition of NPK (1:1:1, v/v/v) fertilizer (Fertiberia, Madrid, Spain), which was applied during 9th April and 7th July at a rate of 120 Kg/ha. Since samplings were performed during 30th July 2014, plants were exposed to severe summer drought typical of the Mediterranean climate.

For the second experiment (effects of P availability), 120 greenhouse-grown potted plants were transferred outdoors at the experimental fields during 3rd May 2014 and exposed to three treatments (40 plants per treatment). The control (C) treatment contained 5 mL Ca(NO₃)₂ 1 M, 5 mL KNO₃ 1 M, 2 mL MgSO₄ 1 M, 1 mL KH₂PO₄ 1 M and 1 mL EDTA FeNa (iron chelate 5 g Fe/L) for 1 L of solution. The treatment enriched in phosphorus (+P) contained the same with one additional mL of KH₂PO₄ 1 M, while the -P1 treatment contained the same but with 0.5 mL KH₂PO₄ 1 M (50% less P), compared to controls. -P1 treatment was supplied with 0.5 mL KCl 1 M for one liter of solution to compensate K deficiency. All nutrient solutions were adjusted to a pH 6.5–7.0. Three phosphate (Pi) concentrations in the nutrient solution were therefore used: 2.0, 1.0 and 0.5 mM. Water deficit was imposed on plants by watering each plant with 600 mL nutrient solution per week during 6 weeks (from 3rd May to 18th June 2014), which led to a progressive loss of leaf water contents due to a high evapotranspiration demand. Samplings were performed during 18th June 2014.

For estimation of leaf water contents, chlorophyll fluorescence measurements and biochemical analyses, young fully-expanded, sun-exposed leaves from reproductive shoots were used. All measurements were made on leaves collected at midday (12 h solar time). In both experiments, plants were in the flowering stage, so males and females could be easily distinguished. For estimation of the levels of photosynthetic pigments (including xanthophylls), vitamins C and E, and the extent of lipid peroxidation, leaves were collected, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C until analyses.

2.2. Leaf Water Status and the F_v/F_m Ratio

Leaf water status was estimated by measuring the relative water content (RWC) of leaves, as follows. Leaves were collected, immediately weighed to estimate the fresh weight (FW), re-hydrated for 24 h at 4 °C to estimate the turgid weight (TW), and finally over-dried at 80 °C to constant dry weight (DW). RWC was calculated as $100 \times (FW - DW) / (TW - DW)$. Residual photoinhibition was estimated by measuring the maximum efficiency of photosystem II photochemistry (F_v/F_m ratio) by using a pulse-modulated fluorimeter mini-Pam (Walz, Effeltrich, Germany) after at least 1 h of dark adaptation, as described [22].

2.3. Photosynthetic Pigments

Samples were extracted in methanol and photosynthetic pigments, including components of the xanthophyll cycle, were measured by HPLC exactly as described [23]. The de-epoxidation state of the xanthophyll cycle (DPS) was measured as $(Z + 0.5 A) / (V + A + Z)$, where V, A and Z are violaxanthin, antheraxanthin and zeaxanthin, respectively.

2.4. Lipid Peroxidation Assay

Lipid peroxidation was determined by estimating the lipid hydroperoxide contents following the FOX method as described [24]. Briefly, leaf samples were ground in liquid nitrogen and extracted with methanol until the extract was colorless. After 45 min in a Branson 2510 ultrasonic cleaner (Bransonic), the samples were centrifuged for 15 min at 4 °C. To 50 μL of supernatant an equal volume of methanol was added and incubated for 30 min in darkness at room temperature. A negative control was performed by adding methanol containing 10 mM triphenylphosphine. Then, the sample was incubated in 190 μL freshly prepared FOX-2 reagent (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) with 10 μL sample (and respective negative controls, as well as standards ranging 0–20 μM H₂O₂ used for calibration) and the absorbance was measured at 560 nm.

2.5. Vitamin E Analyses

The extraction and analyses of tocopherols were performed as described [25]. Briefly, leaf samples were ground in liquid nitrogen and extracted with methanol until the extract was colorless. After 45 min in a Branson 2510 ultrasonic cleaner (Bransonic), the samples were centrifuged for 15 min at 4 °C and transferred to HPLC vials. The HPLC equipment consisted of a system with a PU-2089 controller pump, a AS-2055 Plus auto-sampler and an FP-1520 fluorescence detector (Jasco). For the separation of both tocopherols, an Inertsil 100 A (5 mm, 30_250 mm, GL Sciences Inc.) normal-phase column operating at room temperature was used. The mobile phase was a mixture of *n*-hexane and 1,4-dioxane (95.5: 4.5, v/v). The system worked a flow rate of 0.7 mL min⁻¹, injecting 10 μL per sample. Detection was carried out at 295 nm for excitation and at 330 nm for emission. Quantification was based on the fluorescence signal response compared with authentic standards of α - and γ -tocopherol (Sigma-Aldrich).

2.6. Statistical Analyses

Differences between treatments, sex and their interaction were evaluated by using two-way factorial analysis of variance (ANOVA) and were considered significant at a probability level of $P \leq 0.05$. Significant differences are shown in bold in the inlets of figures. Duncan post hoc analyses were applied when either treatment, sex or their interaction was significant, and different letters were used to indicate differences between means for each treatment and sex (Duncan post hoc tests,

$P \leq 0.05$). All statistical tests were carried out using the SPSS 15.0 statistical package (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results

3.1. Water Contents, F_v/fm Ratio and Extent of Lipid Peroxidation

The relative leaf water content (RWC) varied between 30% and 40% in all treatments, being indicative of the magnitude of stress imposed on

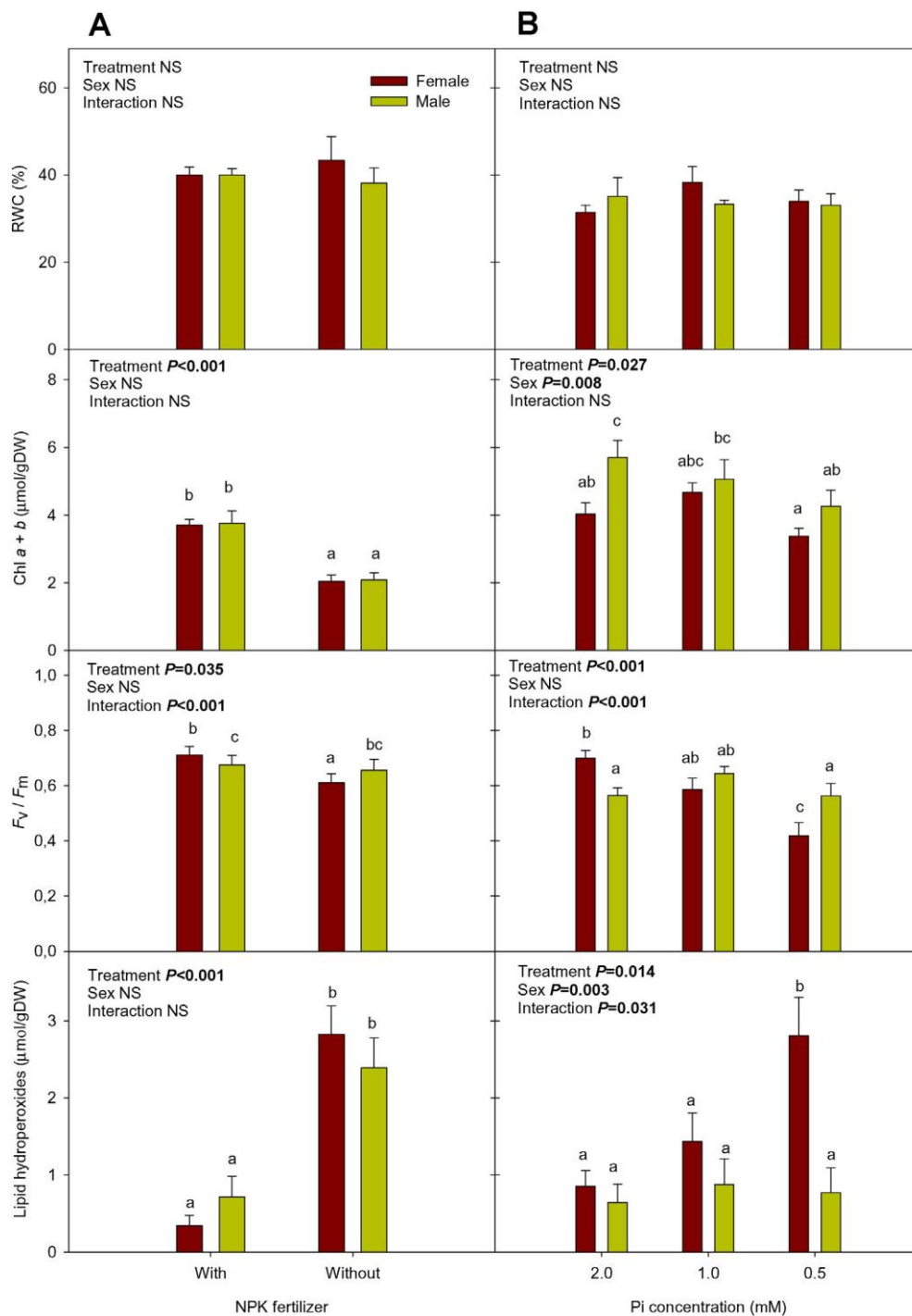


Fig. 1. Relative water content (RWC), chlorophyll (Chl) $a + b$ levels, maximum efficiency of PSII photochemistry (F_v/F_m ratio), an indicator of photoinhibition of the photosynthetic apparatus, and lipid hydroperoxide levels, an indicator of the extent of lipid peroxidation in leaves, in male and female plants of *U. dioica* exposed to severe drought, (A) with or without the effect of NPK fertilization, and (B) exposed to different phosphorus (P) regimes in potted plants. Data represent the mean \pm SE of $n = 6$ individuals. Significant differences between treatments, sex and their interaction (treatment \times sex) were analyzed by two-way factorial analyses of variance (ANOVA $P \leq 0.05$). Significant differences are shown in bold. Different letters indicate statistically significant differences using Duncan post hoc analyses (Duncan test, $P \leq 0.05$). NS, not significant.

plants (Fig. 1). Application of NPK fertilizer under field conditions did not have any positive effect on RWC values. Pulses of phosphate (Pi) at increasing concentrations did neither improve the RWC in potted plants (Fig. 1). Addition of NPK fertilizer in the field increased chlorophyll levels by 82% in both males and females, while Pi pulses exerted no effect in potted plants (Fig. 1). NPK application alleviated residual photoinhibition of the photosynthetic apparatus in females only,

as indicated by increases in the F_v/F_m ratio from 0.61 to 0.71. It is noteworthy that males showed higher F_v/F_m ratio than females without NPK fertilizer (Fig. 1). In potted plants, P deficiency led to residual photoinhibition of the photosynthetic apparatus in females, but not in males. Lipid hydroperoxide levels were reduced by 70% and 89% in males and females, respectively, with NPK fertilizer, while only females showed increased lipid peroxidation in response to increased P

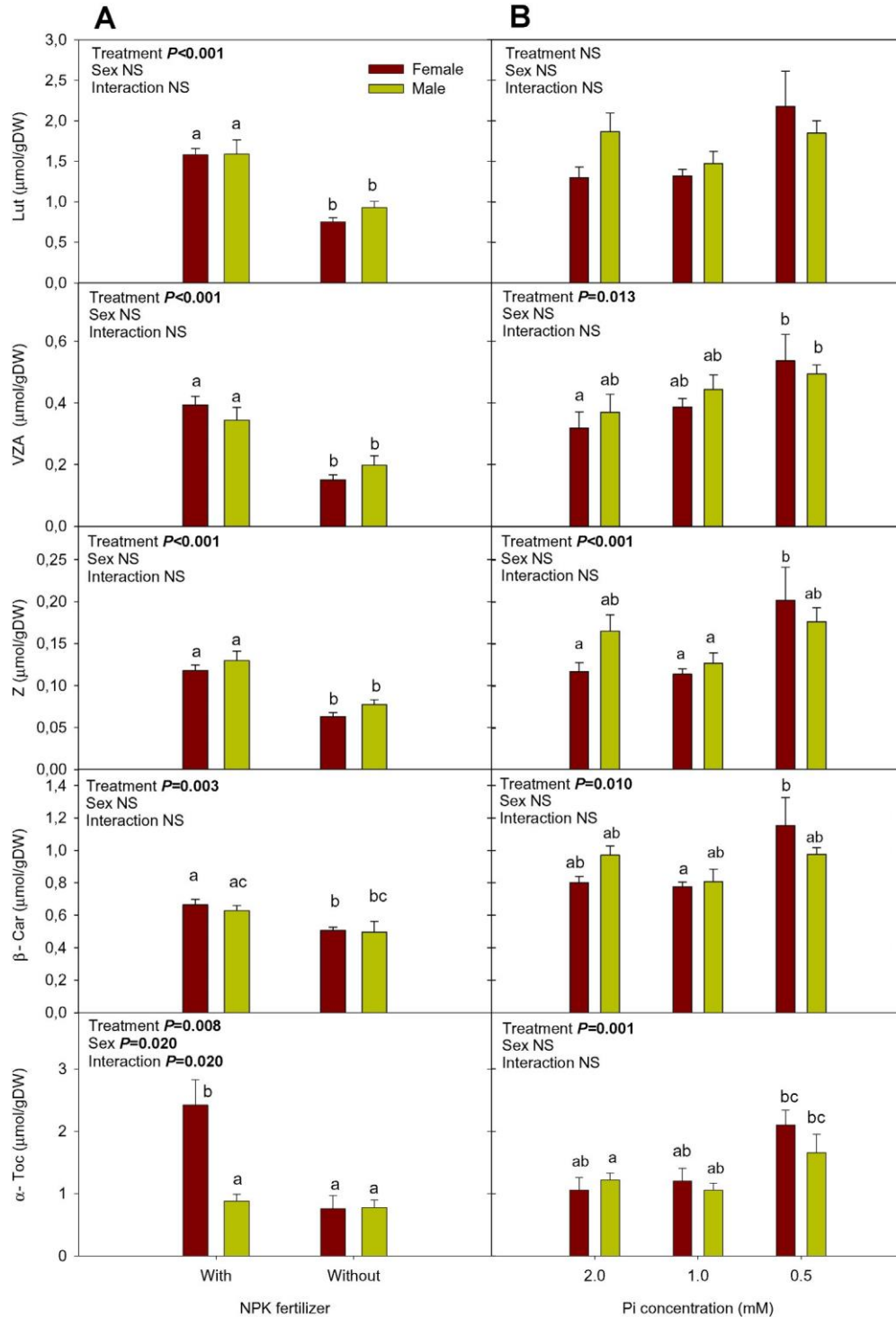


Fig. 2. Levels of lutein (Lut), the xanthophyll cycle pool (VZA), zeaxanthin (Z), β -carotene (β -Car) and α -tocopherol (α -Toc) in male and female plants of *U. dioica* exposed to severe drought, (A) with or without the effect of NPK fertilization, and (B) exposed to different phosphorus (P) regimes in potted plants. Data represent the mean \pm SE of $n = 6$ individuals. Significant differences between treatments, sex and their interaction (treatment \times sex) were analyzed by two-way factorial analyses of variance (ANOVA $P \leq 0.05$). Significant differences are shown in bold. Different letters indicate statistically significant differences using Duncan post hoc analyses (Duncan test, $P \leq 0.05$). NS, not significant.

starvation in potted plants (Fig. 1). In summary, addition of NPK fertilizer in the field resulted in improved chlorophyll levels and reduced lipid peroxidation in both males and females, and reduced residual photoinhibition in females only. In potted plants, increased residual photoinhibition paralleled enhanced lipid peroxidation under P starvation in females, while males were more resistant.

3.2. Photo- and Antioxidant Protection

Nutrient availability influenced the extent of photo- and antioxidant protection in drought-stressed plants differently in males and females. The levels of lutein, the xanthophyll cycle pool (VZA) and zeaxanthin increased in response to the addition of NPK fertilizer in both males

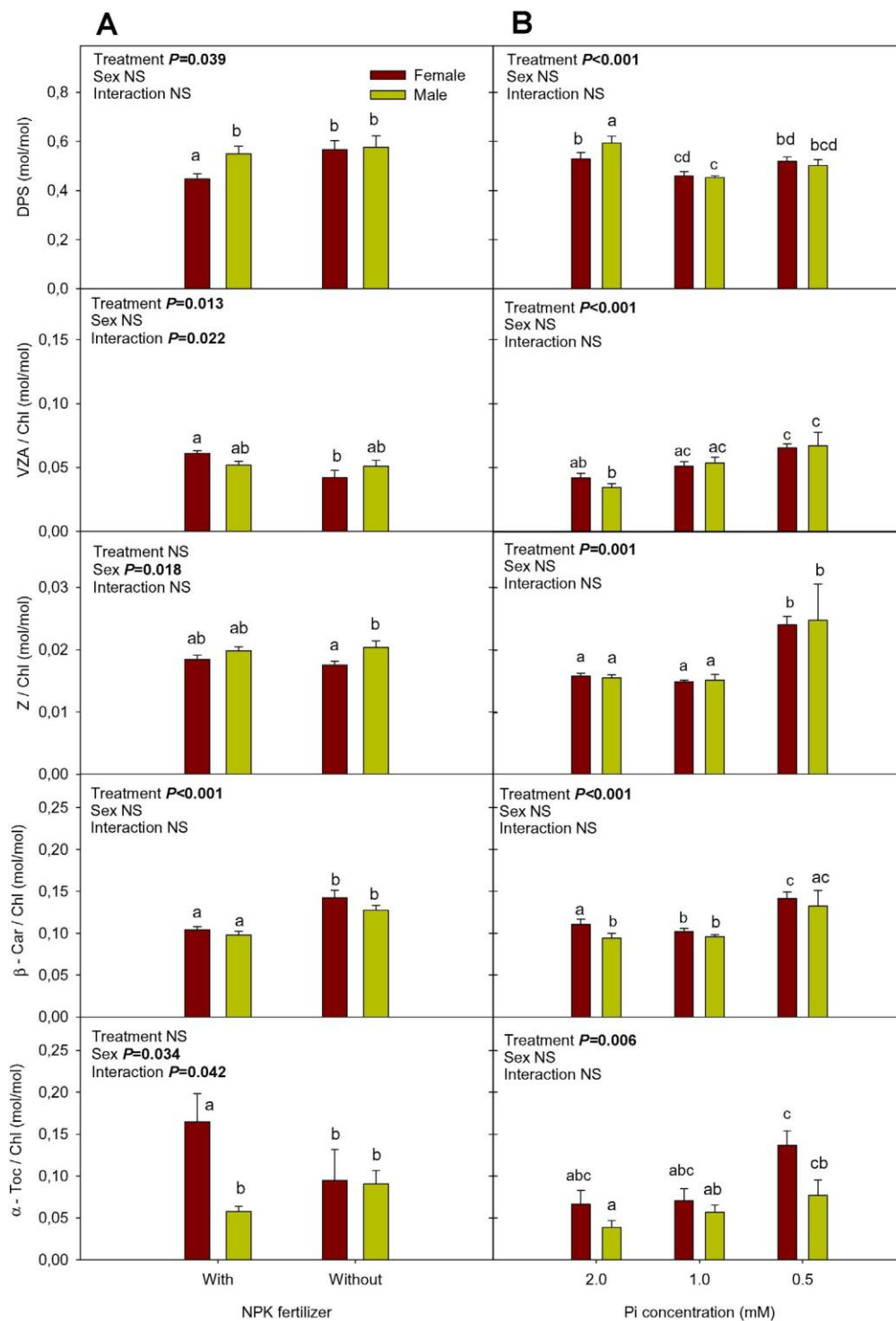


Fig. 3. De-epoxidation state of the xanthophyll cycle (DPS), and levels of the xanthophyll cycle pool (VZA), zeaxanthin (Z), β -carotene (β -Car) and α -tocopherol (α -Toc) per unit of chlorophyll $a + b$ (Chl) in male and female plants of *U. dioica* exposed to severe drought, (A) with or without the effect of NPK fertilization, and (B) exposed to different phosphorus (P) regimes in potted plants. Data represent the mean \pm SE of $n = 6$ individuals. Significant differences between treatments, sex and their interaction (treatment \times sex) were analyzed by two-way factorial analyses of variance (ANOVA $P \leq 0.05$). Significant differences are shown in bold. Different letters indicate statistically significant differences using Duncan post hoc analyses (Duncan test, $P \leq 0.05$). NS, not significant.

and females, while those of β -carotene and α -tocopherol increased with NPK but in females only (Fig. 2). Interestingly, this did result in reduced de-epoxidation state of the xanthophyll cycle (DPS) in response to the addition of NPK fertilizer in females only (Fig. 3). Furthermore, both males and females showed a significant reduction in the levels of β -carotene per unit of chlorophyll (β -Car/Chl ratio) in response to nutrient fertilization in the field (Fig. 3). Furthermore, the levels of lipophilic antioxidants, such as zeaxanthin, β -carotene and α -tocopherol, per unit of chlorophyll (Z/Chl, β -Car/Chl and α -Toc/Chl ratios, respectively) increased in response to P starvation in potted plants both in males and females (Fig. 3). Ascorbate levels decreased in males and increased in females in response to NPK fertilizer application in the field, while they kept unaffected by Pi pulses in potted plants (Fig. 4). The oxidation state of ascorbate was neither affected by treatments nor sex either in soil-grown or potted plants (Fig. 4). In summary, addition of NPK fertilizer in the field decreased the DPS and increased both α -tocopherol and ascorbate levels in females only. The photo- and antioxidant response to various levels of P availability did not differ between sexes in potted plants.

4. Discussion

Sexual dimorphism can lead to profound differences in secondary sexual characters, such as vegetative growth and plant response to both biotic and abiotic stresses; but the extent to which these stresses can affect photoinhibition, photoprotection and photo-oxidative stress in dimorphic plants is still very poorly understood. *U. dioica* has been used as a model to study secondary sexual dimorphism in plants, showing some advantages, such as clearly distinctive sexual characters, rapid growth, and a perennial growth habit. In previous studies, secondary sexual dimorphism was not apparent despite it was shown that abiotic stress can lead to alterations in sex ratios in this species [26, 27]. Here, in contrast, a clear secondary sexual dimorphism in terms of

plant response to abiotic stress was apparent, which may be associated with the severe stress imposed on plants. As stress is more severe, more clearly sexual dimorphic characters, such as photoinhibition and photo-oxidative stress, can be manifested. It is shown here that nutrient availability may influence mechanisms aimed at keeping an adequate cellular redox homeostasis in drought-stressed *U. dioica* plants, such as photoprotection by the xanthophyll cycle and activation of antioxidant defenses. Furthermore, the comparison of males and females illustrates the complexity of mechanisms evolved by plants to withstand photoinhibition and photo-oxidative stress.

4.1. Nutrient Fertilization Improves Plant Response to Drought Stress

Nutrient fertilization under field conditions improved pigment contents and reduced lipid peroxidation. In addition, NPK treatment alleviated residual photoinhibition, as indicated by the F_v/F_m ratio, in females only, thus indicating a more positive effect in females than males. This reduced residual photoinhibition was associated with higher contents of vitamins C and E in females compared to males. Vitamins C and E have both a role in photoprotection, ascorbate (vitamin C) controlling hydrogen peroxide levels in chloroplasts in the so-called Foyer-Halliwel-Asada cycle [28–30], and α -tocopherol modulating singlet oxygen levels and the extent of lipid peroxidation in chloroplasts [31,32]. In addition, in the latter function, α -tocopheroxyl radicals produced are recycled back to α -tocopherol by the action of ascorbate [33]. Therefore, higher vitamin C and E levels in females might have exerted a protective role in drought-stressed plants supplied with NPK fertilizer. It is very likely that these nutrients provide drought-stressed plants an improved nutrient homeostasis for the biosynthesis of these vitamins, an aspect that warrants further investigations. NPK fertilization might contribute to increase vitamin E biosynthesis by providing more N available for the synthesis of aromatic amino acids, and therefore favor the activity of tyrosine aminotransferase, a key

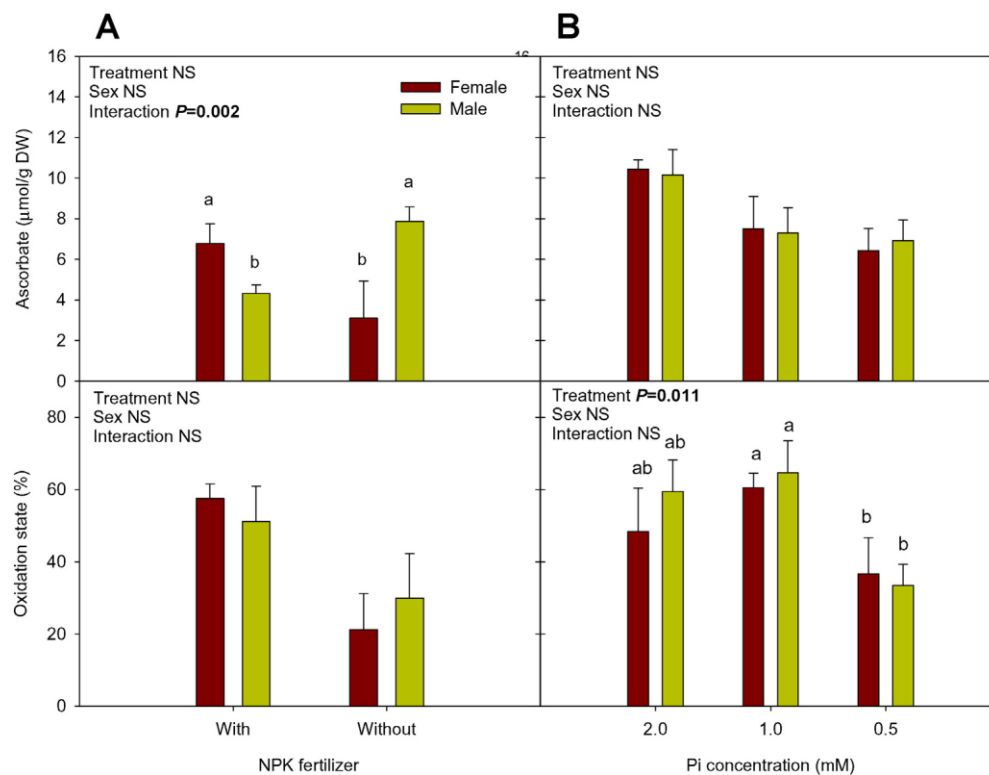


Fig. 4. Ascorbate levels and oxidation state of ascorbate (estimated as ratio of dehydroascorbate to total ascorbate) in male and female plants of *U. dioica* exposed to severe drought, (A) with or without the effect of NPK fertilization, and (B) exposed to different phosphorus (P) regimes in potted plants. Data represent the mean \pm SE of $n = 6$ individuals. Significant differences between treatments, sex and their interaction (treatment \times sex) were analyzed by two-way factorial analyses of variance (ANOVA $P \leq 0.05$). Significant differences are shown in bold. Different letters indicate statistically significant differences using Duncan post hoc analyses (Duncan test, $P \leq 0.05$). NS, not significant.

enzyme in α -tocopherol biosynthesis [34]. It is therefore likely that NPK fertilization exerts a positive role on amino acid metabolism, being drought-stressed plants more able to divert part of the amino acids to vitamin E biosynthesis. It is interesting to note that this effect was not observed under higher P supply in potted plants, thus indicating that it is an N specific effect. It is still however to be determined if K from the NPK fertilizer exerts an additional positive role on vitamin E biosynthesis in drought-stressed *U. dioica* plants, since other studies have shown that high doses of KCl in the nutrient solution can significantly increase tocopherol levels in salt-stressed plants [35].

4.2. Sex-Related Differences in the Plant Response to P Starvation

Pi starvation can lead to photoinhibition of the photosynthetic apparatus and therefore cause photo-oxidative stress and eventually damage the photosynthetic apparatus [7]. Depending on the magnitude of stress, in terms of duration and severity, P starvation symptoms range from reduced growth (with anthocyanin accumulation in some species), to photoinhibition, photo-oxidative stress, irreversible injuries to the photosynthetic apparatus, and finally organ and plant death. In the present study, plants were severely drought-stressed and exposed to pulses of various Pi concentrations in the nutrient solution. P deficiency caused residual photoinhibition, as indicated by reductions in the F_v/F_m ratio in females only. In parallel with reductions in the F_v/F_m ratio, female plants showed increased lipid peroxidation, as indicated by lipid hydroperoxide accumulation. It appears therefore that females show more sensitivity to photoinhibition and lipid peroxidation than males under P starvation, which is in agreement with studies performed in *Populus cathayana* [36]. It is noteworthy, however, that photo- and antioxidant response (in terms of carotenoids, tocopherols and ascorbate) to various levels of P availability did not differ between sexes in potted plants. It is therefore needed that future studies examine to what extent sex may affect the actual rate of photoinhibition and recovery of PSII efficiency by using specific inhibitors of PSII efficiency recovery, so that the causes of sex-related differences in photoinhibition in plants exposed to a combination of drought stress and P starvation can be determined.

5. Conclusions

It is concluded that increased nutrient availability in the soil can alleviate residual photoinhibition and photo-oxidative stress in leaves of drought-stressed *U. dioica* plants. These plants show sexual secondary dimorphism in terms of photoinhibition, photo-oxidative stress and photoprotection, females being more sensitive to P starvation than males, although this was only apparent when stress infringed on plants was very severe (under a combination of drought stress and P starvation).

Acknowledgements

We are very grateful to the Serveis de Camps Experimentals and Serveis Científico-tècnics (University of Barcelona) for technical assistance. Support for the research was received through grant BFU2012-32057 from the Ministry of Science and Innovation of the Spanish Government, and the ICREA Academia prize to S. Munné-Bosch, funded by the Catalan Government.

References

[1] M.M. Chaves, J. Flexas, C. Pinheiro, Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell, *Ann. Bot.* 103 (2012) 551–560.
 [2] J.M. Ruiz-Lozano, R. Porcel, G. Bárzana, R. Azcón, R. Aroca, Contribution of arbuscular mycorrhizal symbiosis to plant drought tolerance: State of the art, in: *Aroca R (Ed.), Plant Responses to Drought Stress 2012*, pp. 335–362.

[3] F. Rapparini, J. Peñuelas, Mycorrhizal Fungi to Alleviate Drought Stress on Plant Growth, in: M. Miransari (Ed.), *Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses*, vol. 1 2014, pp. 21–42.
 [4] P.J. White, J.P. Hammond, *The Ecophysiology of Plant-Phosphorus Interactions*, The Netherlands, Springer, Dordrecht, 2008.
 [5] A. Frank, *Chemistry of Plant Phosphorus Compounds*, Elsevier, Waltham, MA, USA, 2013.
 [6] S. Munné-Bosch, G. Queval, C.H. Foyer, The impact of global change factors on redox signaling underpinning stress tolerance, *Plant Physiol.* 161 (2013) 1–16.
 [7] I. Hernández, S. Munné-Bosch, Linking phosphorous availability with photo-oxidative stress in plants, *J. Exp. Bot.* 66 (2015) 2889–2900.
 [8] J.R. Obeso, The costs of reproduction in plants, *New Phytol.* 155 (2002) 320–348.
 [9] M. Juvany, S. Munné-Bosch, Sex-related differences in stress tolerance in dioecious plants: a critical appraisal in a physiological context, *J. Exp. Bot.* 66 (2015) 6083–6092.
 [10] S. Munné-Bosch, Sex ratios in dioecious plants in the framework of global change, *Environ. Exp. Bot.* 109 (2015) 99–102.
 [11] S.C.H. Barrett, J. Hough, Sexual dimorphism in flowering plants, *J. Exp. Bot.* 64 (2013) 67–82.
 [12] H. Zhao, Y. Li, X. Zhang, H. Korpelainen, C. Li, Sex-related and stage-dependent source-to-sink transitions in *Populus cathayana* grown at elevated CO₂ and elevated temperature, *Tree Physiol.* 32 (2012) 1325–1338.
 [13] C. Li, Y. Zhang, J. Luo, H. Korpelainen, C. Li, Sex-specific responses of *Populus yunnanensis* exposed to elevated CO₂ and salinity, *Physiol. Plant.* 147 (2013) 477–488.
 [14] M. Juvany, M. Müller, M. Pintó-Marijuan, S. Munné-Bosch, Sex-related differences in lipid peroxidation and photoprotection in *Pistacia lentiscus*, *J. Exp. Bot.* 65 (2014) 1039–1049.
 [15] R. Retuerto, B. Fernandez-Lema, S. Rodriguez-Roiloa, J.R. Obeso, Gender, light and water effects in carbon isotope discrimination, and growth rates in the dioecious tree *Ilex aquifolium*, *Funct. Ecol.* 24 (2000) 529–537.
 [16] L.S. Dudley, Ecological correlates of secondary sexual dimorphism in *Salix glauca* (Salicaceae), *Am. J. Bot.* 93 (2006) 1775–1783.
 [17] C. Li, J. Ren, J. Luo, R. Lu, Sex-specific physiological and growth responses to water stress in *Hippophae rhamnoides* L. population, *Acta Physiol. Plant.* 26 (2004) 123–129.
 [18] X. Xu, G. Peng, C. Wu, H. Korpelainen, C. Li, Drought inhibits photosynthetic capacity more in females than in males of *Populus cathayana*, *Tree Physiol.* 28 (2008) 1751–1759.
 [19] L. Chen, S. Zhang, H. Zhao, H. Korpelainen, C. Li, Sex-related adaptive responses to interaction of drought and salinity in *Populus yunnanensis*, *Plant Cell Environ.* 33 (2010) 1767–1778.
 [20] S. Zhang, L. Chen, B. Duan, H. Korpelainen, C. Li, *Populus cathayana* males exhibit more efficient protective mechanisms than females under drought stress, *For. Ecol. Manag.* 275 (2012) 68–78.
 [21] D. Montesinos, P. Villar-Salvador, P. García-Fayos, M. Verdú, Genders in *Juniperus thurifera* have different functional responses to variations in nutrient availability, *New Phytol.* 193 (2012) 705–712.
 [22] B. Genty, J.L. Briantais, N.R. Baker, The relationship between quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence, *Biochim. Biophys. Acta* 990 (1989) 87–92.
 [23] 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.
 [24] R. Bou, R. Codony, A. Tres, et al., Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation-xylenol orange method: a review of the factors that influence the method's performance, *Anal. Biochem.* 377 (2008) 1–15.
 [25] J. Cela, C. Chang, S. Munné-Bosch, Accumulation of γ - rather than α -tocopherol alters ethylene signaling gene expression in the *vt4* mutant of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiol.* 52 (2011) 1389–1400.
 [26] M. Oñate, S. Munné-Bosch, Influence of plant maturity, shoot reproduction and sex on vegetative growth in the dioecious plant *Urtica dioica*, *Ann. Bot.* 104 (2009) 945–956.
 [27] M. Oñate, J. Blanc, S. Munné-Bosch, Influence of stress history on the response of the dioecious plant *Urtica dioica* L. to abiotic stress, *Plant Ecol. Divers.* 4 (2011) 45–54.
 [28] C.H. Foyer, B. Halliwell, The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism, *Planta* 133 (1976) 21–25.
 [29] C.H. Foyer, G. Noctor, Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context, *Plant Cell Environ.* 28 (2005) 1056–1071.
 [30] K. Asada, Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions, *Plant Physiol.* 141 (2006) 391–396.
 [31] M. Havaux, F. Eymery, S. Porfiriova, P. Rey, P. Dörmann, Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell* 17 (2005) 3451–3469.
 [32] S. Munné-Bosch, The role of α -tocopherol in plant stress tolerance, *J. Plant Physiol.* 162 (2005) 743–748.
 [33] S. Munné-Bosch, L. Alegre, The function of tocopherols and tocotrienols in plants, *Crit. Rev. Plant Sci.* 57 (2002) 21–31.
 [34] I. Sandorf, H. Holländer-Czytko, Jasmonate is involved in the induction of tyrosine aminotransferase and tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*, *Planta* 216 (2002) 173–179.
 [35] T. Tounekti, A.M. Vadel, M. Oñate, H. Khemira, S. Munné-Bosch, Salt-induced oxidative stress in rosemary plants: damage or protection? *Environ. Exp. Bot.* 71 (2011) 298–305.
 [36] S. Zhang, H. Jiang, H. Zhao, H. Korpelainen, C. Li, Sexually different physiological responses of *Populus cathayana* to nitrogen and phosphorus deficiencies, *Tree Physiol.* 34 (2014) 343–354.

Capítulo 4. La deficiencia de fósforo en la fase de transición incrementa el *sex ratio* y los niveles del ácido 12-oxo-fitodienoico en hembras de *Urtica dioica*

Chapter 4 Phosphate starvation during the transition phase increases the sex ratio and 12-oxo-phytodienoic acid contents in females of *Urtica dioica*

Bárbara Simancas¹, Alba Cotado¹, Maren Müller¹ y Sergi Munné-Bosch¹

¹Departamento de Biología Evolutiva, Ecología y Ciencias Ambientales, Unidad de Fisiología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, Barcelona, España

Publicado en **Experimental Environmental Botany** (2018) 145,39-46.

doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.10.013



Resumen del Capítulo 4

La fase de transición en las plantas, marcada por el inicio de la floración y de la producción de semillas (madurez sexual), es muy sensible a cambios en el medio. Además, pueden existir diferencias importantes entre machos y hembras ante la diferente disponibilidad de P_i . Por ello, este trabajo trata de estudiar cómo la disponibilidad de P_i afecta a machos y hembras durante la fase de transición y en qué medida responden de manera diferente a las concentraciones de P_i en términos de acumulación de nutrientes, crecimiento, contenido de fitohormonas y activación de las defensas químicas, con especial énfasis en los JAs. Los resultados mostraron que la reducción de la disponibilidad de P_i retrasa la maduración de la planta tanto en machos como en hembras, incrementando también el número de hembras en relación a los machos (mayor *sex ratio*), probablemente para favorecer la supervivencia de la población bajo estrés. Las hembras se ven más afectadas ante la menor concentración de P_i , como indica sus niveles de hidropéroxidos lipídicos. Además, la disponibilidad reducida de P_i condujo a un mayor contenido de ácido 12 *oxo*-fitodienoico (OPDA, precursor de los JAs), en las hembras. Este aumento del OPDA no fue acompañado por incrementos en otros JAs, ni JA libre ni conjugado con aminoácidos, lo que sugiere papeles defensivos específicos para el OPDA en las hembras. Para concluir, observamos que la deficiencia en P_i aumenta el número de hembras, lo que muestra la gran capacidad de adaptación de las especies dioicas a la disponibilidad reducida de nutrientes. Los resultados sugieren un *trade-off* o compromiso entre la capacidad de producir defensas químicas y los mecanismos de respuesta ante el estrés abiótico, confirmando además el marcado dimorfismo sexual secundario que hay entre machos y hembras.



Research paper

Phosphate starvation during the transition phase increases the sex ratio and 12-oxo-phytodienoic acid contents in females of *Urtica dioica*



Bárbara Simancas, Alba Cotado, Maren Müller, Sergi Munné-Bosch*

Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, University of Barcelona, Faculty of Biology, Avinguda Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Sexual dimorphism
Chemical defence
Jasmonates
Sex ratios
Nutrient availability
Phosphate starvation

ABSTRACT

The transition phase in plants, which is marked by the onset of flowering and seed production, is very sensitive to the physical environment. Moreover, dimorphic plant species can show important sex-related differences in the response to nutrient availability. How availability of inorganic phosphate (Pi) during the transition phase influences sex ratios and whether or not male and female plants respond differently to nutrient stress is still however very poorly understood. Here, we examined whether contrasting Pi availability during the transition phase may influence sexual differentiation in stinging nettle (*U. dioica* L.) plants. We also evaluated to what extent males and females respond differently to varying Pi concentrations in terms of nutrient accumulation, C and N isotopic composition, photo-oxidative stress and hormone profiling. Results showed that reduced Pi availability delays plant maturation in males, causing as well an increase in the sex ratio towards females. Females showed enhanced lipid peroxidation (as indicated by higher lipid hydroperoxide contents) compared to males under Pi starvation, but sexes did not differ in photosystem II efficiency. Furthermore, reduced Pi availability led to enhanced 12-oxo-phytodienoic acid contents, the immediate precursor of jasmonic acid, particularly in females. This increase was, however, not accompanied by increases in other jasmonates, neither free nor conjugated jasmonic acid, thus suggesting a specific role for 12-oxo-phytodienoic acid in chemical defense in females under Pi starvation. Sex biased ratios in favour of females over males and enhanced 12-oxo-phytodienoic acid contents in the former under Pi starvation illustrate the great adaptive capacity of dimorphic species to reduced nutrient availability.

1. Introduction

Plants are exposed to varying degrees of stress factors during their lifetime. Stress can be biotic, imposed by other organisms, or abiotic, arising from an excess or deficit of a given stress factor (e.g. water, nutrients, light, temperature, etc) in the physical environment (Levitt, 1986). Many factors can affect plant response to abiotic stress, including the duration of the stress, its severity, previous exposure to stress, the part of the plant being examined, and the phase of plant growth or development when it is occurring (Bray, 1997). How a stress factor can influence sex lability in dimorphic species has been studied previously (reviewed by Korpelainen, 1998; Sakai and Weller, 1999; Barrett, 2002), but it is still poorly understood. In general, environmental stresses caused by less-than-optimal light, nutrition, weather or water conditions often favour maleness (Korpelainen, 1998; Munné-Bosch, 2015). However, this topic is still insufficiently explored considering the high diversity of dimorphic species and stress factors. For instance, to our knowledge the influence of Pi starvation during the

transition phase on sex determination in dioecious perennial plants has not been explored thus far.

It is generally assumed that plant maturity, which is marked by the onset of flowering and seed production, has drastic effects on the capacity of plants to respond to stress (Bond, 2000). For example, it has been generally accepted that females often show higher proportional investments in reproduction than males in dioecious plant species (Hancock and Bringham, 1980). However, the theory that females grow less than males as a consequence of higher investment in reproduction appears to be true for some woody perennials, but it is not so clear or not generally applicable in herbaceous perennials (Obeso, 2002; Barrett and Hough, 2013; Juvany and Munné-Bosch, 2015). Indeed, recent in-depth analyses at the physiological level suggest that sex-related differences observed in dioecious species are highly species-specific (Juvany and Munné-Bosch, 2015) and may well respond to long-term compensatory mechanisms (Obeso, 2002). Therefore, it is essential to get further insight into our current knowledge on plant response to abiotic stress in dimorphic species, considering not only the

* Corresponding author.

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

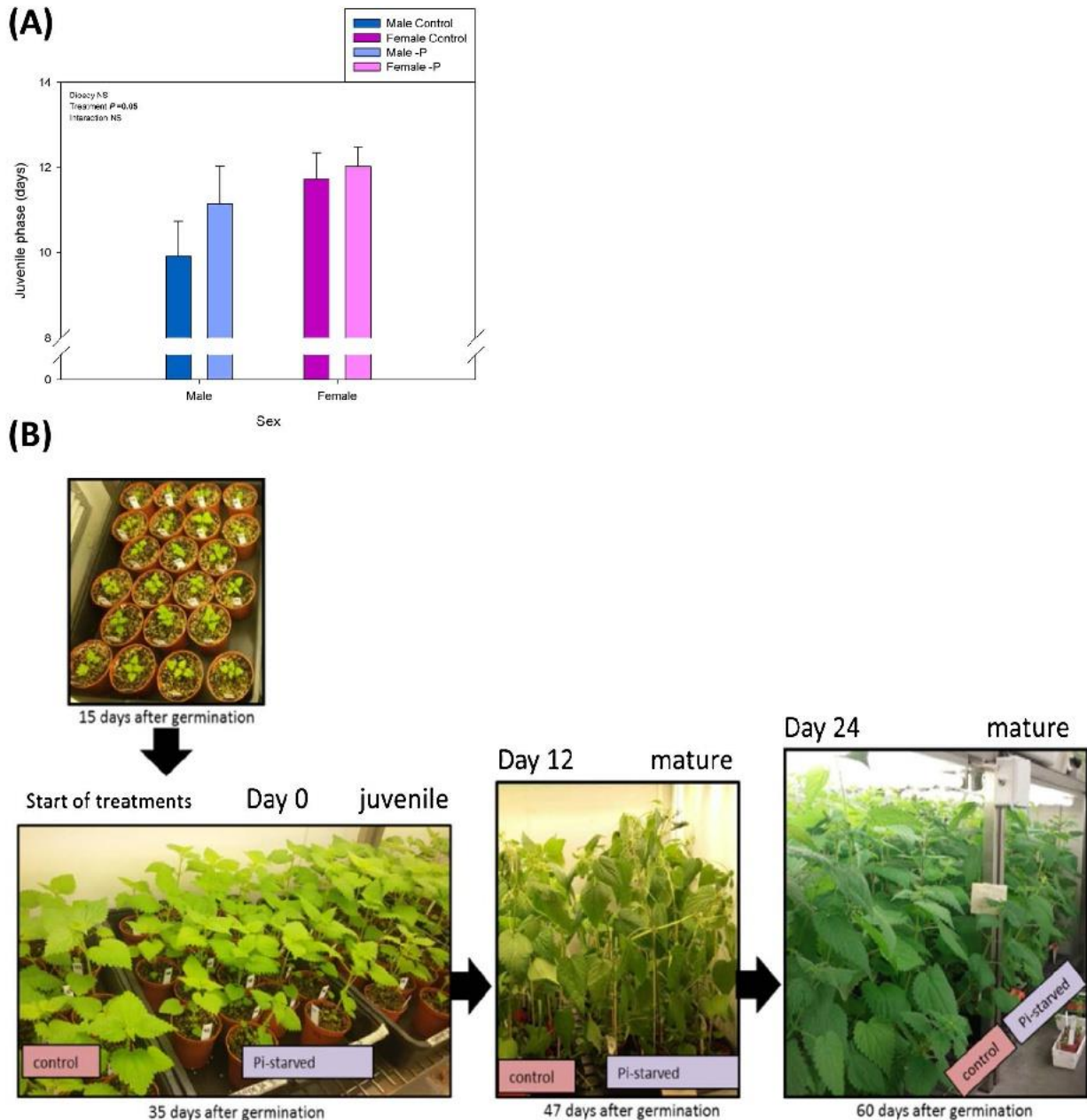


Fig. 1. (A) Length of the juvenile phase, estimated as days from germination to flowering in *U. dioica* either under Pi starvation or control conditions. The sex ratio in Pi-starved and control plants was 2.0 and 1.6, respectively. Data represent the mean \pm S.E. of $n = 20$ males and 35 females. Significant differences between sexes (dioecy), treatments and its interaction were examined through two-way factorial analyses of variance (ANOVA, $P \leq 0.05$). NS, not significant. (B) Phenotype of plants during the sampling dates at 0, 12 and 24 days after the start of treatments (Pi-starved vs. control plants).

differences caused by sex, but also integrating a better knowledge of what are the causes of biased sex ratios found in nature, an aspect that requires special attention in the frame of climate change (Munné-Bosch, 2015).

Phosphorus (P) is one of the most abundant macronutrients in plant tissues, but the low availability of this element in the soil is often the limiting factor for plant growth and development. P is essential for the storage of genetic information (is necessary for forming nucleic acids and other essential cellular components), it plays a crucial role in cell membranes (such as the formation of membrane phospholipids), as well as in practically all energy transactions through ATP, and it is both a substrate and a regulatory factor in photosynthesis and oxidative metabolism, among others. The chemical form of P taken up by plants is inorganic phosphate (Pi), mostly in the form of orthophosphate (H_2PO_4^-) under physiological pH (Ullrich-Eberius et al., 1984; Furihata

et al., 1992). Due to its chemical properties, Pi is easily immobilized in the soil by forming insoluble complexes or precipitates with metals (Al or Fe in acidic soils and Mg or Ca in calcareous soils, Manning, 2008). Thus, Pi is one of the most important mineral nutrients limiting plant growth and development (Marschner, 2012).

Urtica dioica, often called common nettle or stinging nettle, is a dioecious, herbaceous and perennial plant distributed widely in many parts of the world (Taylor, 2009). Nettles have a strong association with human activity. In some cases, human and animal waste may be responsible for elevated levels of P and N in the soil, providing an ideal environment for nettles (Bolòs and Vigo, 1984). Here, we examined the effects of Pi starvation on sex expression and the response of males and females in terms of nutrient accumulation, C and N isotopic composition, photo-oxidative stress markers and hormone profiling. All measurements were performed in a growth chamber, which allowed

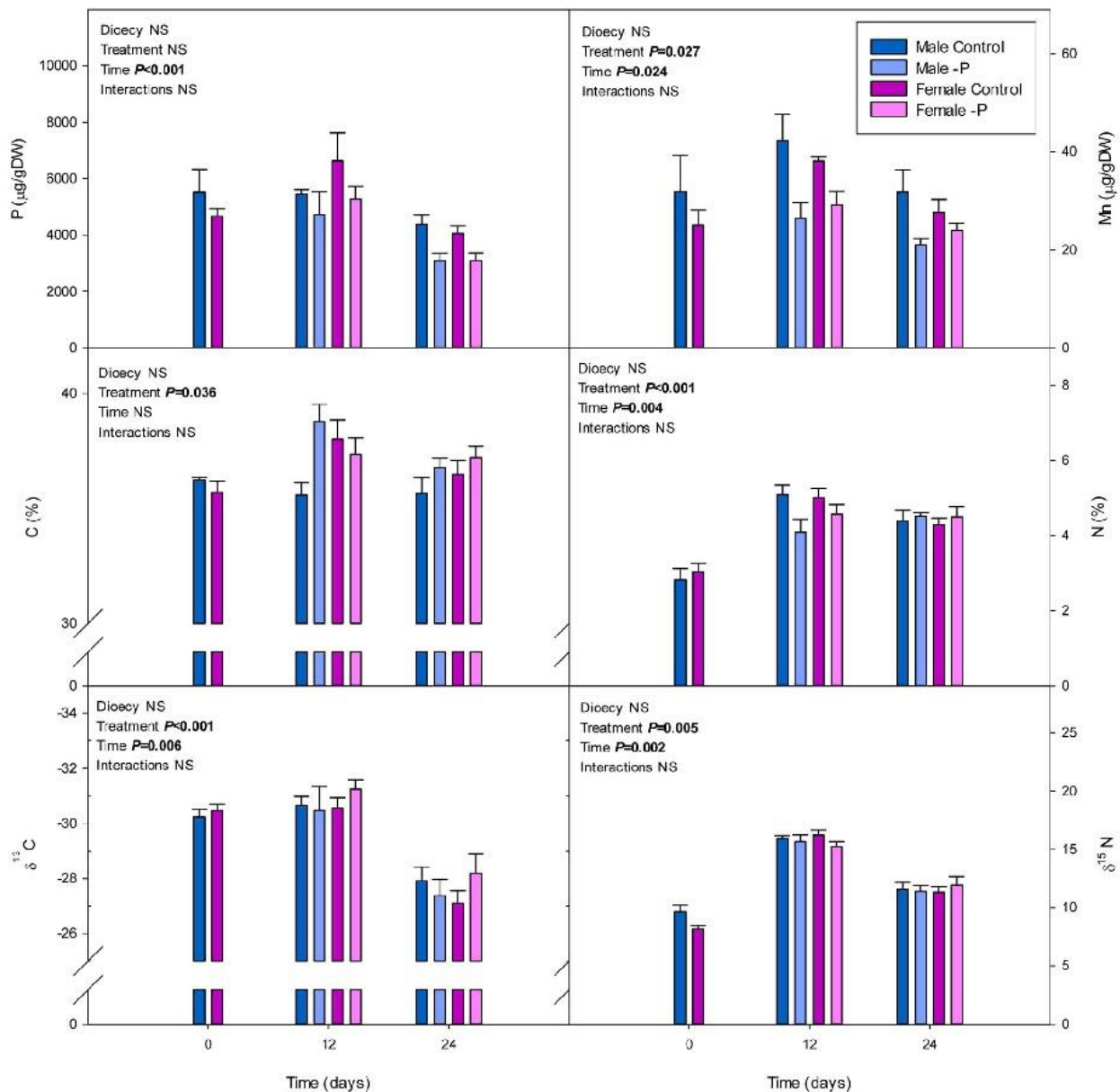


Fig. 2. Amount of P and Mn, C and N contents, and $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in leaves of *U. dioica* plants either under Pi starvation or control conditions. Data represent the mean \pm S.E. of n = 5. Significant differences between sexes, treatments, time and their interactions are shown (ANOVA, $P \leq 0.05$). NS, not significant.

comparing the stress response of male and female plants under identical environmental conditions.

2. Materials and methods

2.1. Plant material, treatments and sampling

Urtica dioica L. a dioecious, herbaceous and perennial plant that requires high levels of P and other nutrients, was used for experiments. Seeds of *U. dioica*, which were purchased in Spicegarden (www.spicegarden.eu, Germany), were sown in 0.1-L pots containing a mixture of peat:perlite:vermiculite (1:1:1, v/v/v) and plants were grown in a constant environment chamber with 16-h photoperiod, $120 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, and air temperature 21–23 °C. After 15 days of growth, plants were transplanted to 0.5-L pots and were maintained in the same conditions. Irrigation was provided with freshly-prepared Hoagland nutrient solution every 2 days. One-hundred twenty plants were growing into 6 large trays (with 20 plants per tray). Each individual was marked and its position randomly changed when irrigated

to prevent potential tray effects.

Treatments, which started 35 days after germination consisted in watering the plants every 2 days with two different nutrient solutions (here called Control and -P). The Control solution contained 5 mL $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1 M, 5 mL KNO_3 1 M, 2 mL MgSO_4 1 M, 2 mL KH_2PO_4 1 M and 1 mL EDTA FeNa (iron chelate 5 g Fe/L) for 1 L of solution. The -P treatment contained the same but with 0.5 mL KH_2PO_4 1 M (75% less P), compared to controls. All nutrient solutions were adjusted to a pH 6.5–7.0. Samplings were performed at 0, 12 and 24 d of the start of treatments, so that plants were at the juvenile (0 d) and mature (12 and 24 d) stages. The sampling at 0 d was a few days before the juvenile-mature transition phase, at the start of treatments; sampling at 12 d was performed when first flowers appeared, and sampling at 24 d was performed with fully differentiated flowers in both males and females (Fig. 1). -P treatment in the juvenile phase, and just prior to the transition phase, allowed us to measure the influence of Pi starvation on sex ratios. At every sampling time point, we measured plant height and the number of leaves per plants, and, in a fully-expanded young leaf per plant, the relative water content (RWC), the maximum efficiency of PSII

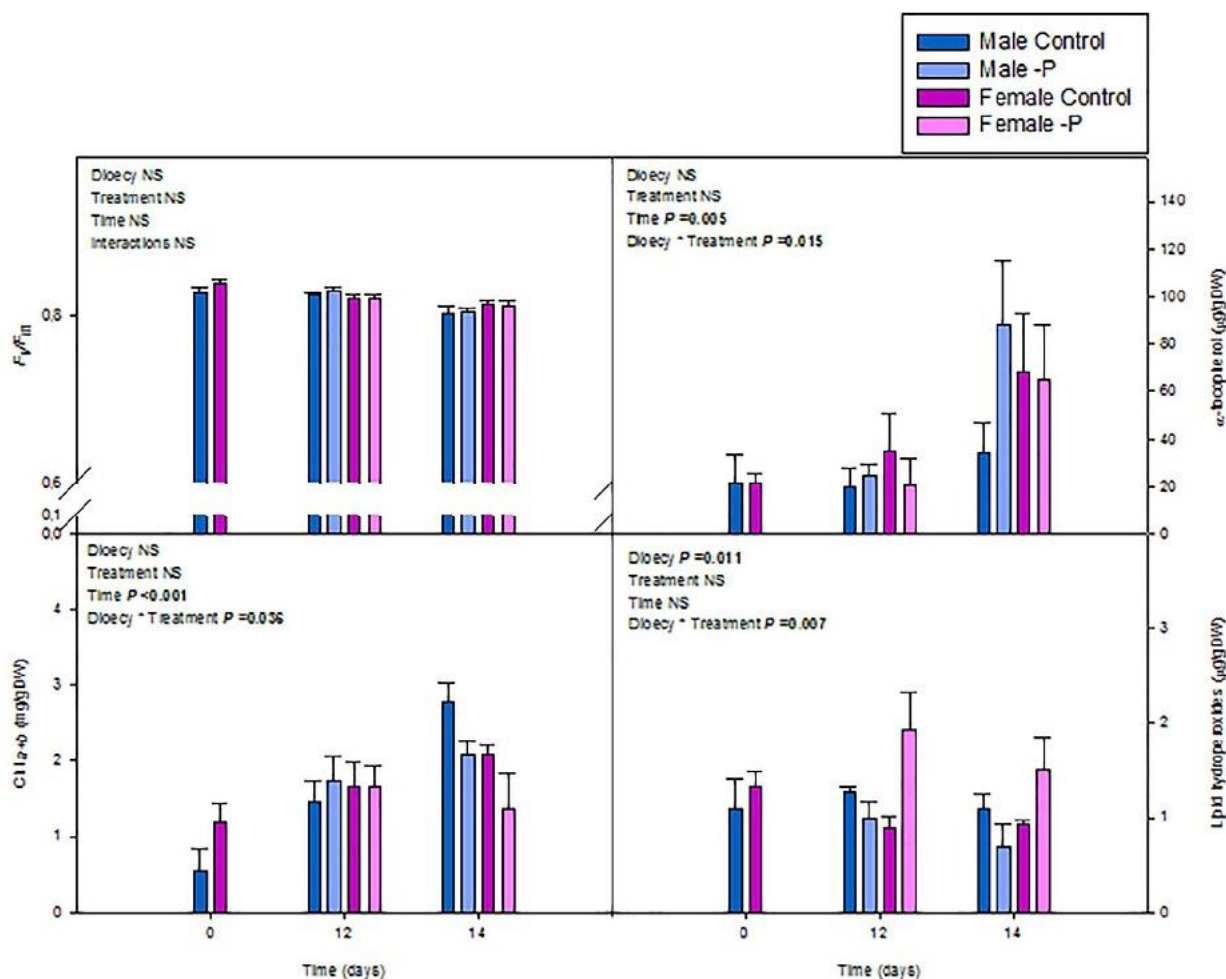


Fig. 3. Maximum efficiency of photosystem II (F_v/F_m ratio), chlorophyll (Chl) a + b contents, the extent of lipid peroxidation (estimated as lipid hydroperoxide contents) and α -tocopherol contents in leaves of *U. dioica* plants either under Pi starvation or control conditions. Data represent the mean \pm S.E. of $n = 5$. Significant differences between sexes, treatments, time and their interactions are shown (ANOVA, $P \leq 0.05$). NS, not significant.

photochemistry (F_v/F_m ratio), pigment and vitamin E contents, the extent of lipid peroxidation, nutrient composition, C and N isotopic composition and hormone profiling in leaves of 12 males and 12 females. For pigment, vitamin E, lipid peroxidation and hormone profiling, leaves were collected, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

2.2. Water status, leaf mass area and the F_v/F_m ratio

Leaves were weighed and leaf area was immediately measured using a flatbed scanner (model GT-5000; Epson, Nagano, Japan) and an image-processing program. Then, leaves were 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, and DW is the dry weight after oven-drying the leaves. The leaf mass area was determined as $\text{DW}/\text{leaf area}$. Residual photoinhibition was estimated by measuring the maximum efficiency of photosystem II photochemistry (F_v/F_m ratio) by using a pulse-modulated fluorimeter mini-Pam (Walz, Effeltrich, Germany) after at least 1 h of dark adaptation, as described (Genty et al., 1989).

2.3. Pigments and tocopherol analyses and lipid peroxidation assay

Samples were extracted in methanol and analysed spectrophotometrically to estimate chlorophyll contents as described

(Lichtenhaler and Wellburn, 1983). The extraction and HPLC analyses of tocopherols were performed as described (Cela et al., 2011). Lipid peroxidation was determined by estimating the lipid hydroperoxide contents following the FOX method as described (Bou et al., 2008).

2.4. Hormone profiling

The plant hormones, including abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA), the ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), the auxin, indole-3-acetic acid (IAA), the cytokinins, *trans*-zeatin (*t*-Z), its riboside (*t*-ZR), 2-isopentenyl adenine (2iP) and its riboside, isopentenyl adenosine (IPA), the gibberellins GA₁, GA₃, GA₄ and GA₇, and the jasmonates, jasmonic acid (JA), its precursor 12-*oxo*-phytyldienoic acid (OPDA), and its amino acid conjugates (JA-Ile, JA-Leu, JA-Met, JA-Phe, and JA-Val) were extracted and quantified by UPLC/ESI-MS/MS as described (Müller and Munné-Bosch, 2011).

2.5. Nutrient profiling and C and N isotope composition

The amounts of C and N, and $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ were measured by elemental analysis coupled to isotope ratio mass spectrometry (EA-IRMS). $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ express the difference in $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratios between samples and standards respectively. The standard for C is Pee Dee Belemnite (PDB), and for N it is atmospheric nitrogen, which is isotopically constant and designated as 0‰ (Mariotti et al., 1988). The $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values are given as (‰), where:

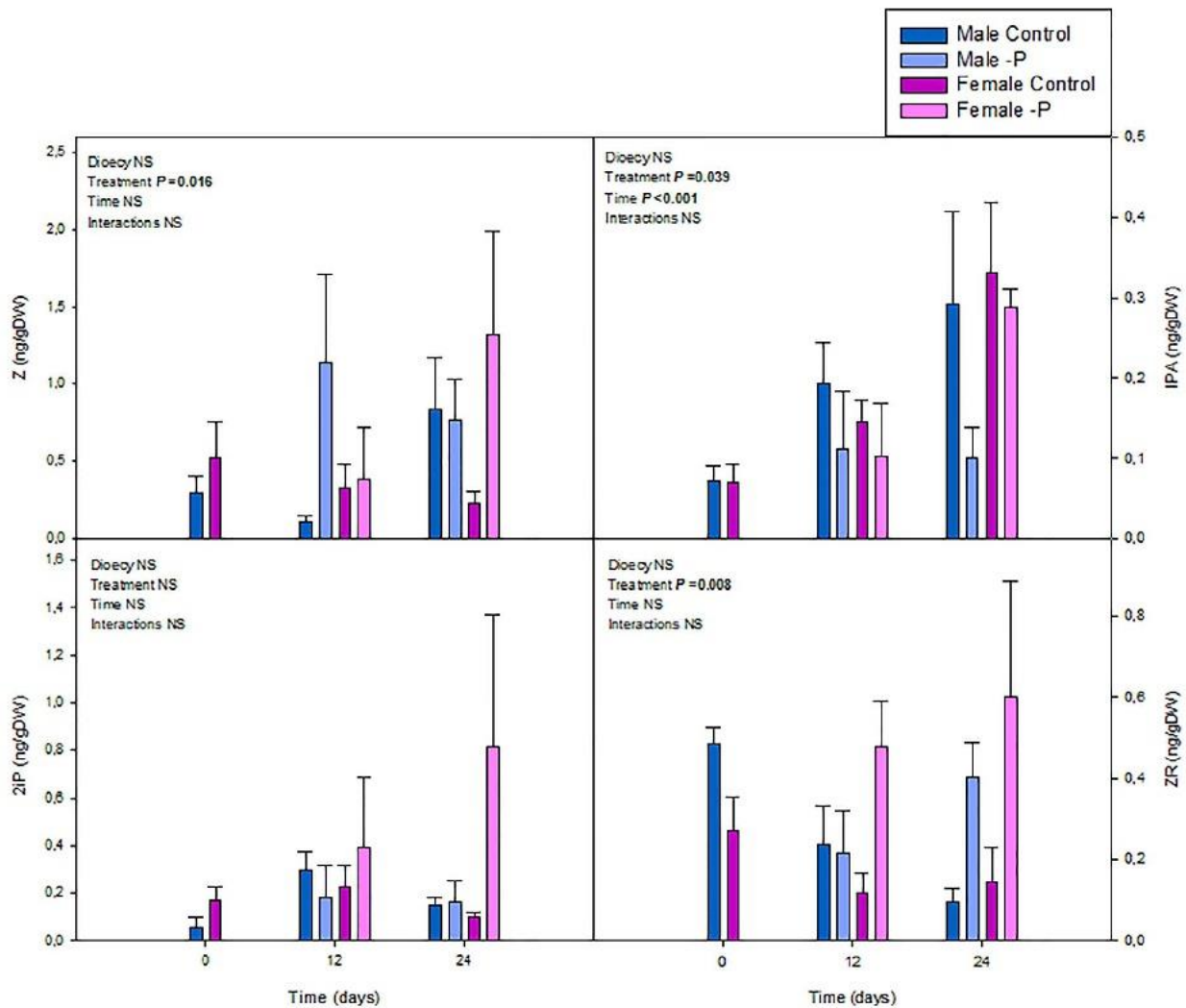


Fig. 4. Endogenous contents of gibberellins, including GA₁, GA₃, GA₄ and GA₇ in leaves of *U. dioica* plants either under Pi starvation or control conditions. Data represent the mean \pm S.E. of $n = 5$. Significant differences between sexes, treatments, time and their interactions are shown (ANOVA, $P \leq 0.05$). NS, not significant.

$$\delta^{13}C = [(^{13}C/^{12}C \text{ sample} - ^{13}C/^{12}C \text{ standard}) / ^{13}C/^{12}C \text{ standard}] \times 1000$$

$$\delta^{15}N = [(^{15}N/^{14}N \text{ sample} - ^{15}N/^{14}N \text{ standard}) / ^{15}N/^{14}N \text{ standard}] \times 1000$$

The amounts of the other macro- and micronutrients were measured by induction coupled plasma-optical emission spectroscopy (ICP-OES) as described (Morales et al., 2015).

2.6. Statistical analyses

The effect of treatments, sex and time (and their interactions) was evaluated by using three-way factorial analysis of variance (ANOVA) and differences were considered significant at a probability level of $P \leq 0.05$. Significant differences are shown in bold in the inlets of figures. All statistical tests were carried out using the SPSS 22 statistical package (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results

3.1. Maturity and growth

Pi deficiency for 12 d during the juvenile phase caused a small (1,2 d), but significant delay in maturation in males, but not in females (Fig. 1). In other words, females matured more slowly than males under

control conditions, but not under Pi deficiency. Furthermore, Pi starvation during the juvenile phase increased the sex ratio from 1.6 in controls to 2.0, thus indicating female over male production in juveniles under stress conditions was favoured. The height and number of leaves per plant, as well as the leaf mass per area (LMA) ratio increased as plants grew and matured over time, but no sex-related differences were observed (Suppl. Fig. 1). Sexes neither differed in the RWC, which was kept around 80% throughout the experiment (Suppl. Fig. 1).

3.2. Nutrient profiling and C and N isotope composition

Most of the macro- and micronutrients analyzed in leaves did not show differences between treatments or sexes (Suppl. Fig. 2). The amount of P in leaves decreased with time, particularly at 24 d of treatments, but no differences were observed between sexes. Pi starvation led to marginal decreases in the amount of P in leaves ($P = 0.069$, Fig. 2). However, manganese (Mn) contents decreased significantly under Pi starvation, particularly in males (Fig. 2), and both Na and K contents decreased with maturity (Suppl. Fig. 2), but without differences between sexes. Pi starvation influenced the amounts of C and N in leaves, as well as their isotopic composition, but no differences between sexes occurred (Fig. 2). N contents and N isotope composition ($\delta^{15}N$) increased after 12 days from the start of Pi starvation (Fig. 2), concomitantly with the time of sexual differentiation (Fig. 1B), but differences were attenuated later and values did not differ between sexes (Fig. 2).

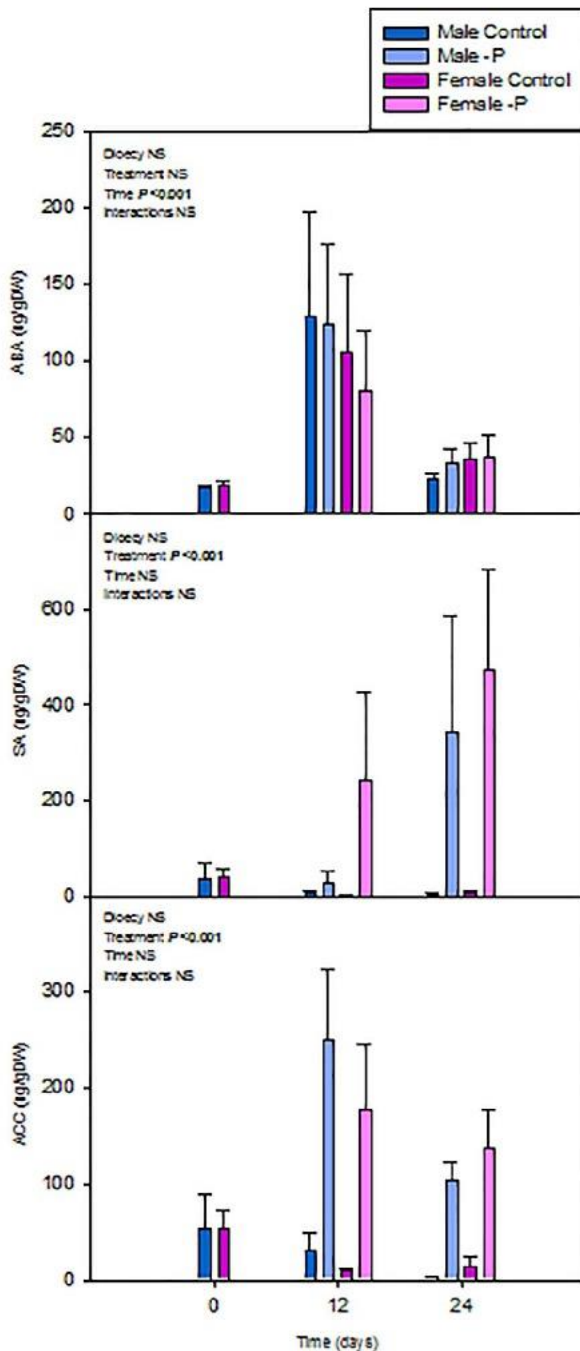


Fig. 5. Endogenous contents of abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA) and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in leaves of *U. dioica* plants either under Pi starvation or control conditions. Data represent the mean \pm S.E. of $n = 5$. Significant differences between sexes, treatments, time and their interactions are shown (ANOVA, $P \leq 0.05$). NS, not significant.

3.3. Photo-oxidative stress markers

The maximum efficiency of photosystem II (F_v/F_m ratio) kept unaltered throughout the experiment with values around 0.80 in both treatments and sexes (Fig. 3), thus indicating absence of residual photoinhibition. Among the vitamin E compounds (α -, β -, γ - and δ -tocopherols and the corresponding tocotrienols), only α -tocopherol was found at quantifiable amounts. α -Tocopherol contents increased with maturity and under Pi starvation, but in males only, resulting in a significant sex \times treatment interaction ($P = 0.015$, Fig. 3). This interaction also appeared in the chlorophyll (Chl) a + b contents, with

smaller values for Pi-starved males compared to controls at 24 d of treatment (Fig. 3). On the other hand, females showed enhanced lipid peroxidation, as indicated by increased lipid hydroperoxide contents, under Pi starvation (Fig. 3).

3.4. Hormone profiling

Among the gibberellins (GAs) analyzed, GA_1 and GA_4 were the most abundant and, in both cases, their contents decreased in Pi-starved plants irrespective of sex (Fig. 4). GA_7 contents increased with plant maturity in both males and females irrespective of Pi availability. GA_3 was neither altered by plant maturity, Pi availability nor sex (Fig. 4). Plant maturity increased ABA contents irrespective of sex and Pi availability (Fig. 5), the maximum contents observed at 12 d of treatment, thus preceding GA_3 increases (Fig. 4). Pi starvation increased both salicylic acid (SA) and ACC (ethylene precursor) contents in both males and females (Fig. 5). Among the jasmonates analyzed, jasmonic acid (JA) was the most abundant form in control plants, while its precursor, 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA) was the most abundant form in Pi-starved plants, particularly in females (Fig. 6). In other words, Pi deficiency specifically increased OPDA contents, particularly in females. This appeared to be caused, at least in part, by a smaller conversion to JA, whose contents decreased in Pi-starved plants of both sexes, but was mostly due to an enhanced lipid peroxidation, as indicated by higher hydroperoxide contents in females under Pi starvation (Fig. 3). The amount of JA conjugates decreased with Pi starvation similarly in both males and females, particularly the contents of JA-Val, JA-Met and JA-Leu. Variations in the contents of JA-Phe were only marginally significant under Pi deficiency ($P = 0.058$), and those of JA-Ile were not significantly altered ($P > 0.10$, Fig. 6). Therefore, OPDA contents followed a pattern similar to those of lipid hydroperoxides, increasing under Pi starvation, particularly in females, while contents of JA and its conjugated forms decreased under Pi starvation, similarly in males and females (Figs. 3 and 6). Males and females did not differ in the endogenous contents of auxins, cytokinins and melatonin in leaves (Suppl. Figs. 4 and 5).

4. Discussion

Sexual dimorphism can lead to profound differences in secondary sexual characters, such as vegetative growth and activation of chemical defences under stress, but the extent to which the trade-off between reproductive effort, vegetative growth and stress resilience is still poorly understood in dimorphic plant species (Obeso, 2002; Barrett and Hough, 2013; Juvany and Munné-Bosch, 2015; Morales and Munné-Bosch, 2016). *U. dioica* plants represent a particular model of interest for the study of sexual dimorphism in plants, since it is a perennial herb with a short lifespan and ruderal growth habit, which is characterized by rapid growth and the development of dimorphic sexual characters very quickly in development, thus making studies of sex lability and secondary sexual dimorphism easily affordable. It is shown here that *U. dioica* plants shift the sex ratio towards females under Pi starvation, preferentially enhancing as well the amount of chemical defences in females, as indicated by increased OPDA contents in leaves of females over males in Pi-starved plants. It appears, therefore, that this plant species favours the production of females over males under Pi deficiency, thus probably compensating the possible negative effects of this stress on seed production at the population level, an aspect that warrants further investigation in plants grown in their natural habitat.

Dimorphic plant species can show sex lability and sex-related differences in the response to nutrient availability and other abiotic stresses, this effect being particularly influenced not only by the plant species but also by the physical environment where plants are growing. *U. dioica* is a nitrophilous plant that requires large amounts of P, N and other nutrients, and it is typically found in environments with high water availability. It should be noted that Pi starvation can negatively

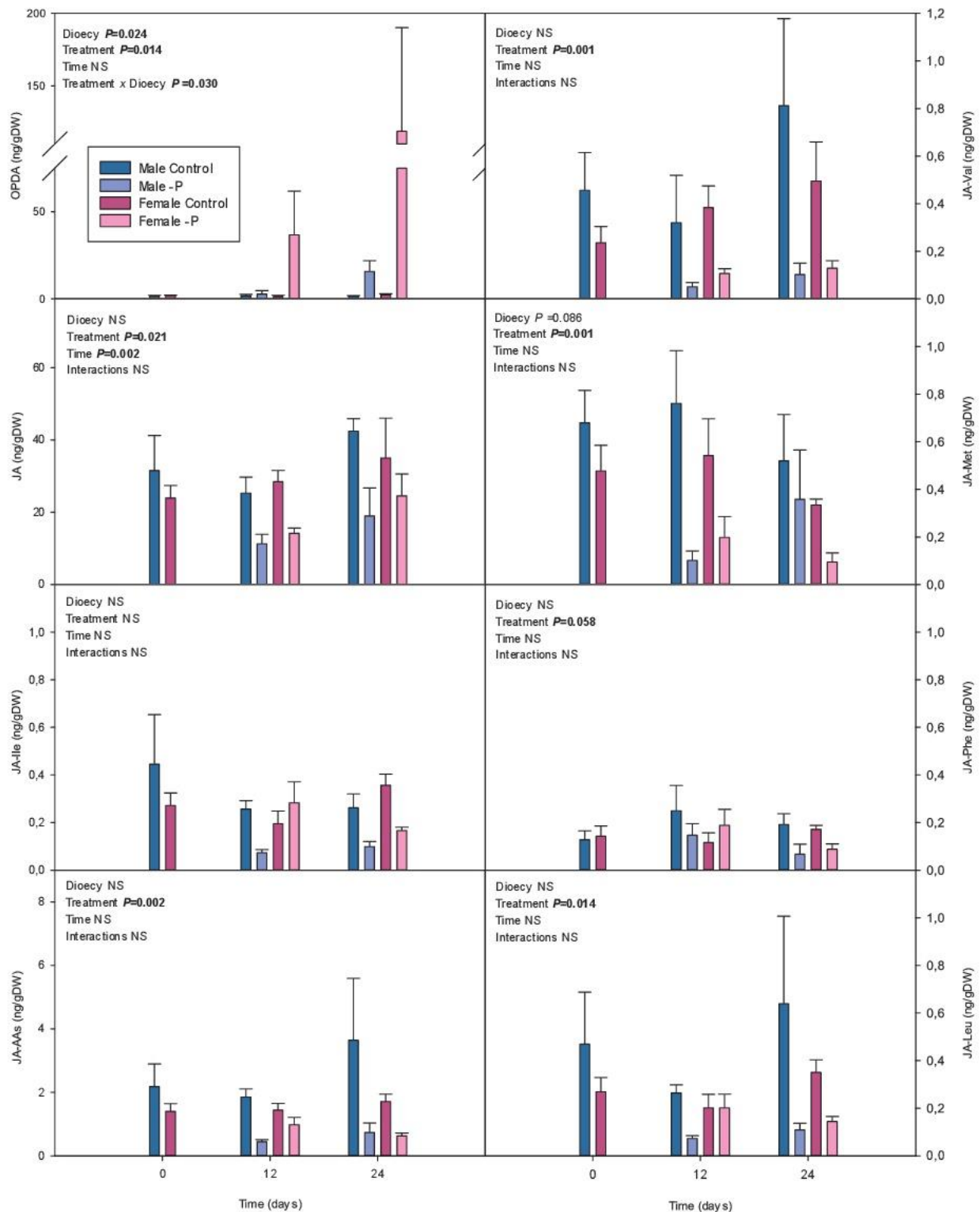


Fig. 6. Endogenous contents of jasmonic acid (JA), its precursor, 12-oxo-phytyldienoic acid (OPDA), and JA conjugates (JA-Ile, JA-Leu, JA-Met, JA-Phe, and JA-Val), the total amount of JA conjugates is also shown as JA-AAAs) in leaves of *U. dioica* plants either under Pi starvation or control conditions. Data represent the mean \pm S.E. of $n = 5$. Significant differences between sexes, treatments, time and their interactions are shown (ANOVA, $P \leq 0.05$). NS, not significant.

affect both pollen and seed production in plant populations. It is generally assumed that a female invests a greater amount of resources to reproduction due to the formation not only of flowers, but also of seeds and fruits, compared to males. Moreover, under adverse conditions, the gender with the higher costs of reproduction may suffer the greatest physiological stress. Therefore the population that invests in a larger number of individuals of the gender with the higher reproductive costs

will be more likely to survive to such stress (Mopper and Whitham, 1992; Barrett and Hough, 2013). In our study, not only the sex ratio shifted towards females under Pi starvation, but also maturation time was influenced by this stress, particularly in males. A slight, but significant increase in the time to maturation was observed in males, thus leading to a better synchronization of putative pollination events under Pi starvation compared to control conditions. This illustrates that

juvenile plants respond against Pi starvation by shifting not only the sex ratio towards females, but also by influencing the timing of flowering in a sex-dependent manner, thus favouring potential reproductive events under Pi starvation. This may indeed provide important compensation effects at the population level in the long term.

Sex-related differences in the response of plants to Pi deficiency were reflected by an increase of endogenous hydroperoxide and OPDA contents in leaves. This might partly be due to an enhanced lipid peroxidation in females caused, at least in part, by the inability of females to increase α -tocopherol contents under Pi starvation. Males increased (by 3 fold) the contents of this antioxidant in Pi-starved plants, but females did not. Since α -tocopherol is preventing the propagation of lipid peroxidation in photosynthetic membranes (Munné-Bosch and Alegre, 2002), this might lead to enhanced lipid peroxidation and consequently higher hydroperoxide contents, which may be used as a substrate for jasmonate biosynthesis (Wasternack and Hause, 2007), therefore favouring jasmonate synthesis in females compared to males under Pi starvation. Although it might be expected that these higher contents of OPDA in females would lead to an increase of JA and/or its conjugated forms (Vick and Zimmerman, 1984), enhanced lipid peroxidation in females under Pi starvation was specifically leading to increased OPDA contents only. Photo-oxidative stress markers showed, indeed, that females were able to defend themselves notably well from Pi starvation (at least as efficiently as males), as indicated by the absence of residual photoinhibition and the maintenance of high growth rates (as indicated by the plant height and number of leaves). The major difference in the jasmonate profiling was therefore observed in the contents of OPDA only. This is particularly interesting, since OPDA has been shown to have a differential effect to that exerted by JA in herbivore defence (Bosch et al., 2014). Therefore, enhanced OPDA contents in females under Pi starvation might lead to sex-related differences in particular aspects of herbivore defence (e.g., constitutive vs. induced and/or local vs. systemic herbivore defence), an aspect that warrants further investigation. It is also interesting to note that reduced activation of antioxidant defences under Pi starvation, in this case the accumulation of vitamin E, in females compared to males led to changes in the accumulation of chemical defences, thus suggesting a possible involvement of photoprotectants in the modulation of oxylipin contents and biotic defence (Munné-Bosch et al., 2007; Demmig-Adams et al., 2013) and, ultimately, a role for antioxidants in the regulation of plant trade-offs (Morales and Munné-Bosch, 2016).

It is concluded that juveniles of *U. dioica* plants respond to Pi deficiency by shifting the sex ratio towards females and by increasing the chemical defences in the form of enhanced OPDA accumulation, particularly in females, thus illustrating sex-related differences in the adaptive capacity of dimorphic species to nutrient starvation. Further studies of the causes and consequences of sex lability at the population level in this plant species are warranted.

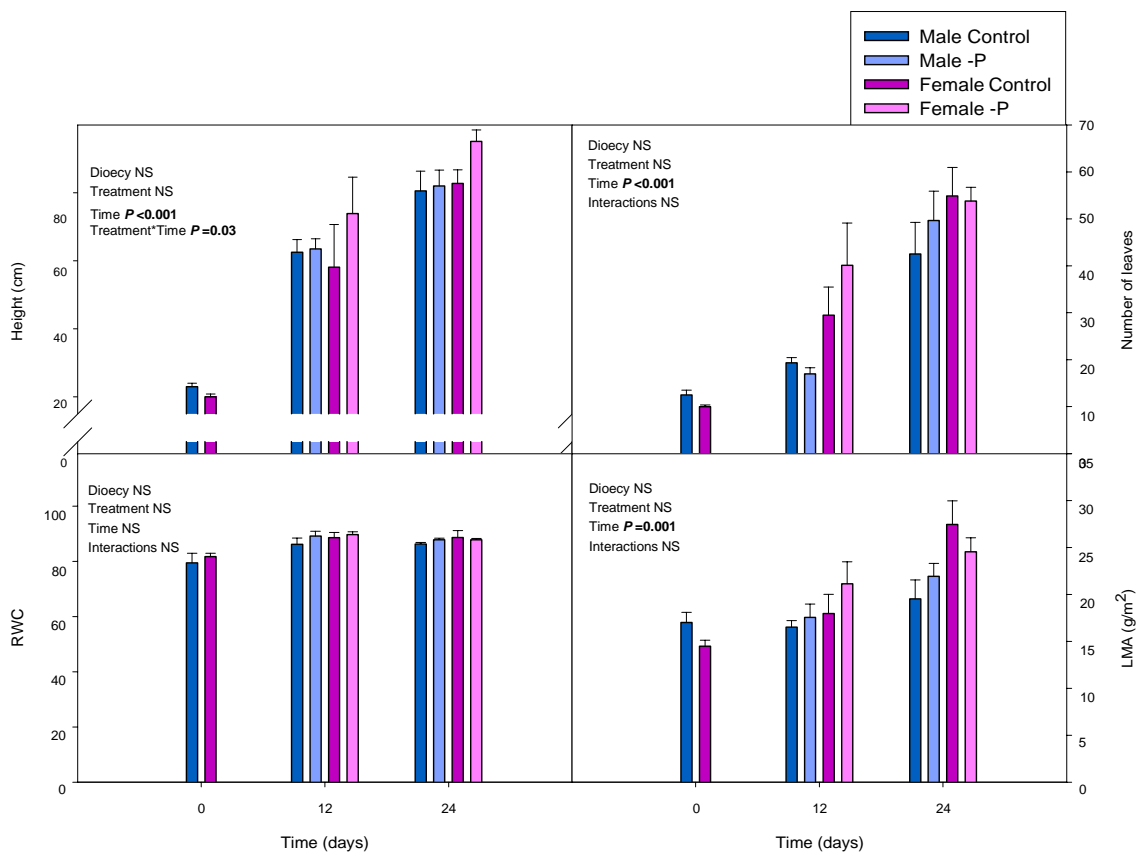
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.10.013>.

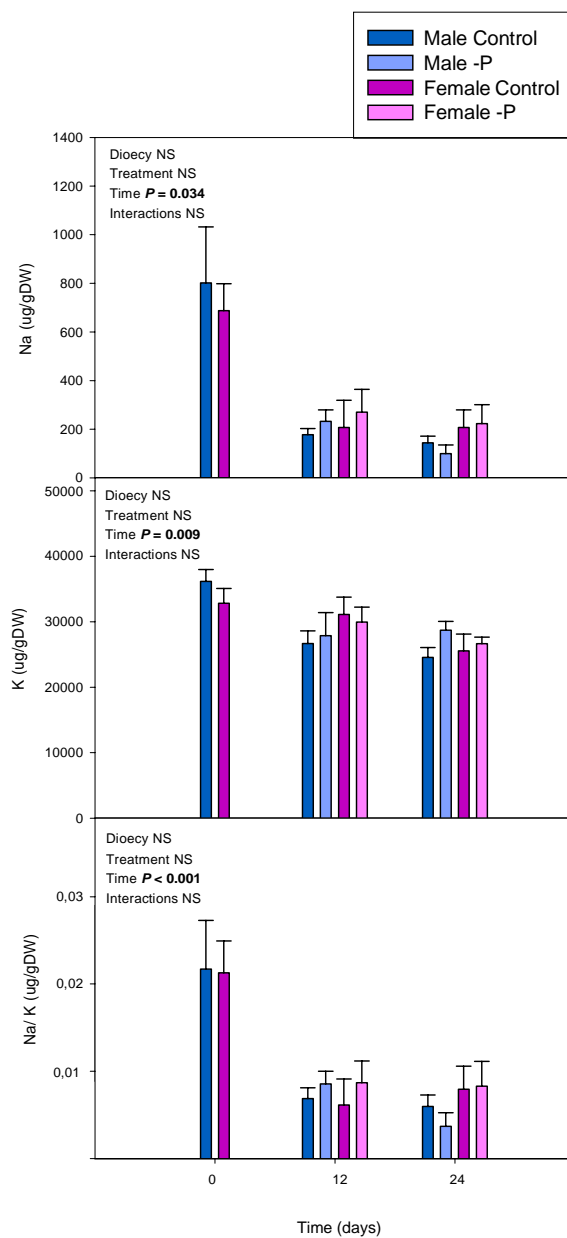
References

- Barrett, S.C.H., Hough, J., 2013. Sexual dimorphism in flowering plants. *J. Exp. Bot.* 64, 67–82.
- Barrett, S.C.H., 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nat. Rev. Gen.* 3, 274–284.
- Boïds, O., Vigo, J., 1984. Flora dels Països Catalans, vol. 1 Editorial Barcino, Barcelona.
- Bond, B.J., 2000. Age-related changes in photosynthesis of woody plants. *Trends Plant Sci.* 5, 349–353.
- Bosch, M., Wright, L.P., Gershenzon, J., Wasternack, C., Hause, B., Schaller, A., Stintzi, A., 2014. Jasmonic acid and its precursor 12-oxophytodienoic acid control different aspects of constitutive and induced herbivore defenses in tomato. *Plant Physiol.* 166, 396–410.
- Bou, R., Codony, R., Tres, A., Decker, E.A., Guardiola, F., 2008. Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation-xylenol orange method: a review of the factors that influence the method's performance. *Anal. Biochem.* 377, 1–15.
- Bray, E.A., 1997. Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci.* 2, 48–54.
- Cela, J., Chang, C., Munné-Bosch, S., 2011. Accumulation of γ - rather than α -tocopherol alters ethylene signaling gene expression in the *vtc4* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 52, 1389–1400.
- Demmig-Adams, B., Cohu, C.M., Amiard, V., Zadelhoff, G., Veldink, G.A., Müller, O., Adams III, W.W., 2013. Emerging trade-offs—impact of photoprotectants (PsbS, xanthophylls, and vitamin E) on oxylipins and biotic defense. *New Phytol.* 197, 720–729.
- Furihata, T., Suzuki, M., Sakurai, H., 1992. Kinetic characterization of 2 phosphate-uptake systems with different affinities in suspension cultured *Catranthus roseus* protoplasts. *Plant Cell Physiol.* 33, 1151–1157.
- Genty, B., Briantais, J.L., Baker, N.R., 1989. The relationship between quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990, 87–92.
- Hancock, J.F., Brighurst, R.S., 1980. Sexual dimorphism in the strawberry *Pragaria chiloensis*. *Evolution* 34, 762–768.
- Juvany, M., Munné-Bosch, S., 2015. Sex-related differences in stress tolerance in dioecious plants: a critical appraisal in a physiological context. *J. Exp. Bot.* 66, 6083–6092.
- Korpelainen, H., 1998. Labile sex expression in plants. *Biol. Rev.* 73, 157–180.
- Levitt, J., 1986. Recovery of turgor by wilted, excised cabbage leaves in the absence of water uptake. *Plant Physiol.* 82, 147–153.
- Lichtenhaler, H.K., Wellburn, A.R., 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.* 11, 591–592.
- 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 Meth.* 7, 37.
- Manning, D.A., 2008. Phosphate minerals, environmental pollution and sustainable agriculture. *Elements* 4, 105–108.
- Mariotti, A., Landreau, A., Simon, B., 1988. ¹⁵N isotope bio-geochemistry and natural denitrification process in groundwater: application to the chalk aquifer of northern France. *Geochim. Cosmochim. Acta* 52, 1869–1878.
- Marschner, H., 2012. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, London.
- Mopper, S., Whitham, T.G., 1992. The plant stress paradox: effects on pinyon sawfly sex ratios and fecundity. *Ecology* 73, 515–525.
- Morales, M., Munné-Bosch, S., 2016. Oxidative stress: a master regulator of plant trade-offs? *Trends Plant Sci.* 21, 996–999.
- Morales, M., Garcia, Q.S., Munné-Bosch, S., 2015. Ecophysiological response to seasonal variations in water availability in the arborescent, endemic plant *Vellozia gigantea*. *Tree Physiol.* 35, 253–265.
- Munné-Bosch, S., Alegre, L., 2002. The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21, 31–57.
- Munné-Bosch, S., Weiler, E.W., Alegre, L., Müller, M., Düchting, P., Falk, J., 2007. α -Tocopherol may influence cellular signaling by modulating jasmonic acid levels in plants. *Planta* 109, 99–102.
- Munné-Bosch, S., 2015. Sex ratios in dioecious plants in the framework of global change. *Environ. Exp. Bot.* 109, 99–102.
- Obeso, J.R., 2002. The costs of reproduction in plants. *New Phytol.* 155, 321–348.
- Sakai, A.K., Weller, S.G., 1999. Gender and sexual dimorphism in flowering plants: a review of terminology, biogeographic patterns, ecological correlates, and phylogenetic approaches. In: Geber, M.A., Dawson, T.E., Delph, L.F. (Eds.), *Sexual and Gender Dimorphism in Flowering Plants*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, pp. 1–31.
- Taylor, K., 2009. Biological flora of the British Isles: *Urtica dioica* L. *J. Ecol.* 97, 1436–1458.
- Ullrich-Eberius, C.I., Novacky, A., Vanbel, A.J.E., 1984. Phosphate uptake in *Lemma gibba* G1: energetics and kinetics. *Planta* 161, 46–52.
- Vick, B.A., Zimmerman, D.C., 1984. Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiol.* 75, 458–461.
- Wasternack, C., Hause, B., 2007. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the review in *annals of botany*. *Ann. Bot.* 111, 1021–1058.

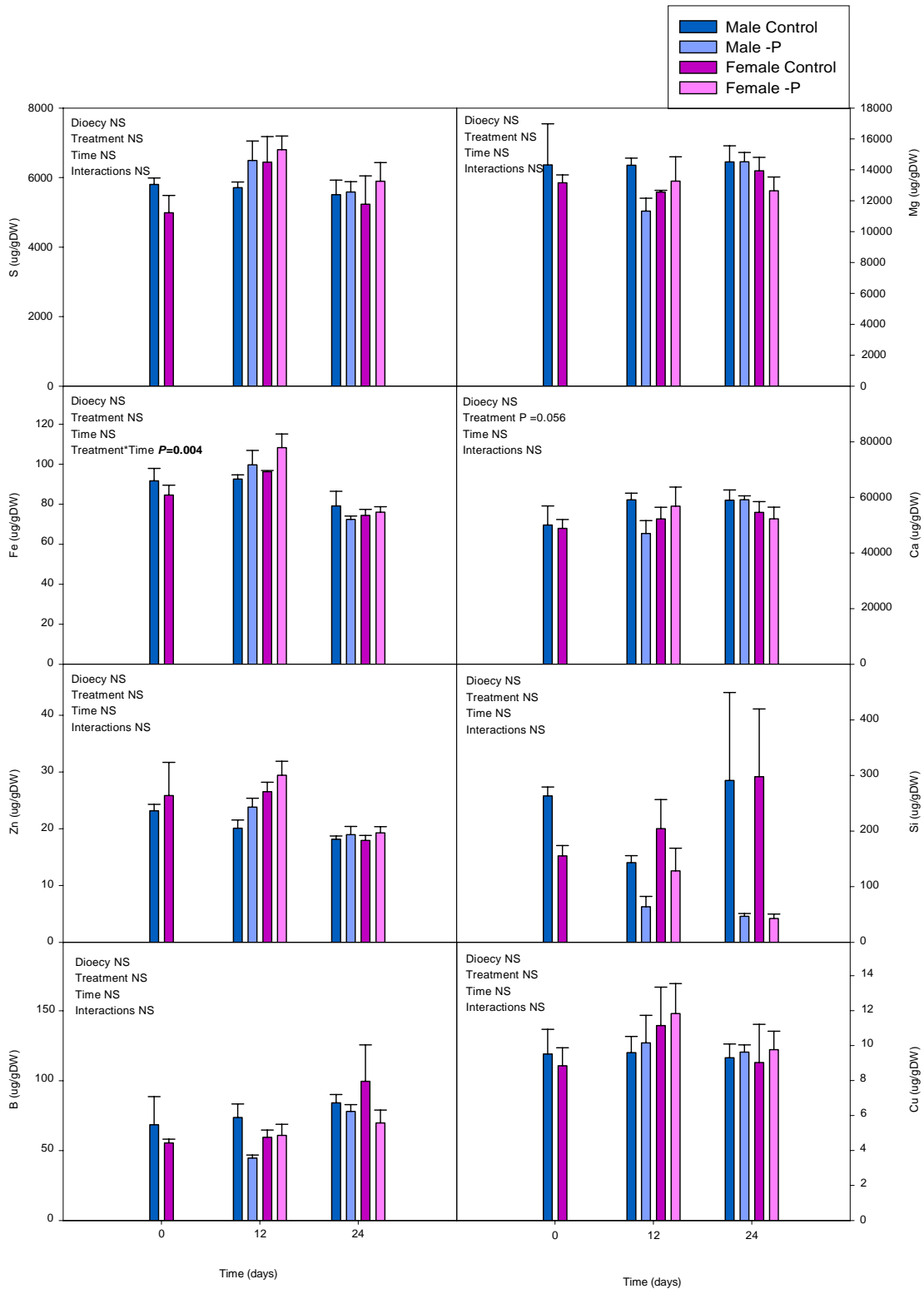
Suppl. Fig. 1. Plant height, number of leaves per plant, relative leaf water content (RWC, in percentage) and leaf mass per area (LMA) in *U. dioica* either under Pi starvation or control conditions. Data represent the mean \pm S.E. of $n \geq 5$. Significant differences between sexes, treatments, time and their interactions are shown (ANOVA, $P \leq 0.05$). NS, not significant.



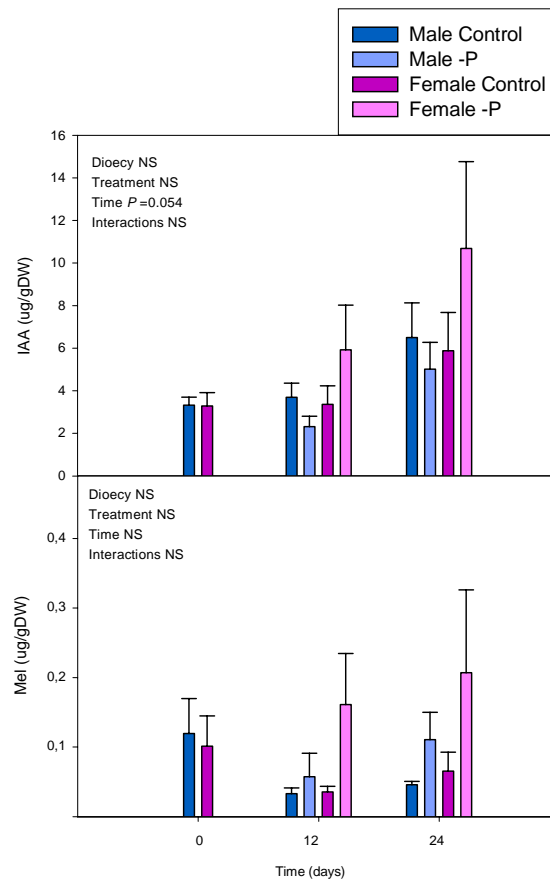
Suppl. Fig. 2. Amount of Na and K, and Na/K ratio in leaves of *U. dioica* plants either under Pi starvation or control conditions. Data represent the mean \pm S.E. of n=5. Significant differences between sexes, treatments, time and their interactions are shown (ANOVA, $P \leq 0.05$). NS, not significant.



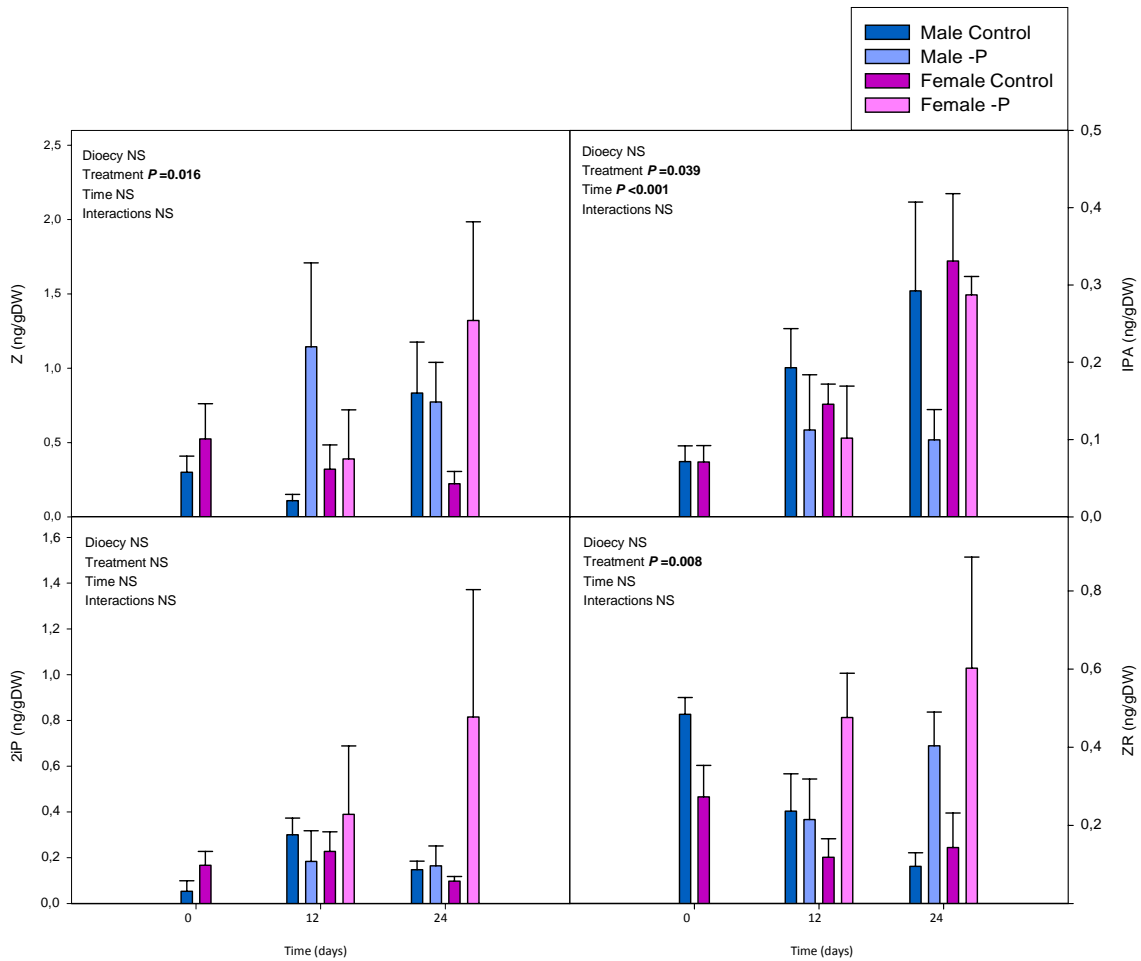
Suppl. Fig. 3. Amounts of S, Mg, Fe, Ca, Zn, Si, B and Cu in leaves of *U. dioica* plants either under Pi starvation or control conditions (with 0.5 or 2mM H₂PO₄). Data represent the mean ± S.E. of n=5. Significant differences between sexes, treatments, time and their interactions are shown (ANOVA, P≤0.05). NS, not significant.



Suppl. Fig. 4. Endogenous contents of the auxin indole-3-acetic acid (IAA) and melatonin (Mel) in leaves of *U. dioica* plants either under Pi starvation or control conditions. Data represent the mean \pm S.E. of n=5. Significant differences between sexes, treatments, time and their interactions are shown (ANOVA, $P \leq 0.05$). NS, not significant.



Suppl. Fig. 5. Endogenous contents of cytokinins, including *trans*-zeatin (Z), 2-isopenteniladenine (2iP), isopentenyladenosine (IPA) and zeatin riboside (ZR) in leaves of *U. dioica* plants either under Pi starvation or control conditions. Data represent the mean \pm S.E. of $n=5$. Significant differences between sexes, treatments, time and their interactions are shown (ANOVA, $P \leq 0.05$). NS, not significant.



DISCUSIÓN



1. La vitamina E influye en el desarrollo de la planta según la disponibilidad de fósforo

Papel de la vitamina E en la longevidad

La vitamina E es un potente antioxidante capaz de prevenir la oxidación de moléculas y componentes celulares. Las plantas utilizan la vitamina E para combatir el exceso de ROS (estrés oxidativo) que se producen por factores ambientales (estreses bióticos y abióticos) y por el paso del tiempo.

Los resultados de la presente Tesis muestran la importancia del papel protector de la vitamina E ante una deficiencia de fósforo. La falta de vitamina E que presentan los mutantes *vte1* y *vte4* produjo un descenso de su longevidad y de su periodo de senescencia en los tratamientos con una deficiencia no severa durante el primer capítulo.

Además, en el Capítulo 2 el mutante *vte1* (que no presenta ni α - ni γ -tocoferol) presentó una mayor fotoinhibición (como lo indican las reducciones de los niveles de clorofilas y la relación F_v/F_m) en comparación a los genotipos con tocoferoles. Por otro lado, el *priming* (o estrés reiterado de la menor disponibilidad de fósforo) condujo a aumentos significativos en los contenidos de α -tocoferol en el genotipo silvestre. Ello podría indicar de nuevo que la vitamina E y en concreto el α -tocoferol, ante deficiencias leves de P_i , es fundamental para la protección frente al estrés foto-oxidativo (Munné-Bosch y Alegre, 2002; Havaux *et al.*, 2005).

Paradójicamente los resultados obtenidos en el primer capítulo sugieren que la producción del α -tocoferol, ante una deficiencia severa de P_i reduce la longevidad y pierde su papel protector. Las plantas de *A. thaliana* sin

tocoferoles (mutante *vte1*) presentaban una longevidad mayor (senescencia retardada) que plantas con α -tocoferol bajo la deficiencia severa, lo cual también se observó en plantas de tabaco transgénicas sin α -tocoferol (Abbasi *et al.*, 2007), y bajo estrés salino (Asensi-Fabado *et al.*, 2014).

Nuestros resultados sugieren así que los tocoferoles proporcionan una mayor longevidad en condiciones de control, exceso de P_i y deficiencia leve de P_i , fundamentalmente por su capacidad antioxidante, pero ante una deficiencia severa de P_i los tocoferoles (y en concreto el α -tocoferol) dejan de favorecer una mayor longevidad. Por ello observamos un aumento en la inactivación del PSII (menor F_v/F_m) en el genotipo silvestre y valores mayores de hidroperóxidos lipídicos en comparación con las plantas mutantes. Ello podría ser debido a que la producción de α -tocoferol tendría costes superiores para la planta ante una deficiencia muy severa, dejando de ser ventajoso su papel antioxidante. Este efecto parece ser específico del α -tocoferol ya que no se observa en el mutante *vte4*, de forma que la síntesis del precursor γ -tocoferol no parece ejercer efectos negativos ante la deficiencia severa.

También es conveniente señalar que las plantas con α -tocoferol expuestas a una deficiencia severa poseen más carotenoides que los mutantes *vte*, lo que sugiere que la función antioxidante de los tocoferoles podría ser sustituida por la de los carotenoides. Además, cabe destacar que tanto las plantas de tipo silvestre como el mutante *vte4* aumentaron ligeramente los niveles de PC-8 ante una deficiencia de P_i reiterada. Se ha descrito que el PC-8 puede ejercer un papel antioxidante en las membranas tilacoidales (Kruk *et al.*, 2014), sin embargo parece que son los tocoferoles los que juegan un papel predominante en la respuesta de la planta a la falta de P_i en *A. thaliana*.

En el caso de la ortiga, especie dioica, se ha observado que el género más vulnerable ante la sequía y déficit nutricional son las hembras. Las hembras presentan mayor fotoinhibición y daño ante la sequía, sin embargo son capaces de sintetizar mayor cantidad de antioxidantes (vitamina E y ascorbato) que los machos ante el aporte nutricional (tratamiento con fertilizante rico en N, P y K (NPK)). Es muy probable que el aporte de nutrientes (NPK) favorezca la biosíntesis de estas vitaminas en las hembras, debido a que observamos ante el tratamiento NPK mayor cantidad de antioxidantes, menor cantidad de hidroperóxidos lipídicos y una mayor F_w/F_m y contenido de clorofilas ante el estrés severo por sequía en las hembras.

Además de la vitamina E, el ascorbato también participa activamente en la fotoprotección al controlar los niveles de H_2O_2 (Foyer y Halliwell, 1976; Foyer y Noctor, 2005; Asada, 2006). Así mismo, el ascorbato también participa en el reciclaje del tocoferol (Figura 3; Munné-Bosch y Alegre, 2002). De aquí la importancia de producir distintos antioxidantes para responder al estrés, tal como se ha observado en nuestro estudio con un aumento tanto del α -tocoferol como del ascorbato ante la falta de P_i , protegiendo ambos contra el estrés foto-oxidativo en la ortiga.

La vitamina E no sólo afecta a la longevidad de las plantas, también influye en el tiempo de floración y en su senescencia. De nuevo, solo en el caso de la deficiencia severa de P_i , el genotipo silvestre presenta un menor periodo de senescencia, debido a su menor longevidad (Capítulo 1). Y aunque en el primer capítulo no observamos diferencias en el tiempo de floración entre los distintos tratamientos, en el Capítulo 3 las ortigas ante una deficiencia de P_i presentan un retraso en su madurez sexual (indicado con una mayor longitud de su fase juvenil) y por lo tanto un retraso de su floración.

Cabe remarcar que la presencia del α -tocoferol y del γ -tocoferol influyen positivamente en la floración de las plantas, por ello el mutante carente de estos tocoferoles (el mutante *vte1*, Capítulo 1) muestra un retraso en su tiempo de floración en todos los tratamientos. Mientras que ambas formas de tocoferol parecen participar de forma similar en la floración de la planta, como ocurre en su capacidad antioxidante y participación en la estabilidad de las membranas biológicas (Kamal-Eldin y Appelqvist, 1996).

Papel de la vitamina E en el crecimiento

Como hemos visto anteriormente, la vitamina E influye en la longevidad de la planta y en su tiempo de floración. Además, el contenido de vitamina E también influye en su crecimiento y en su biomasa. Resulta curioso que la biomasa de la roseta en el Capítulo 1 sea mayor en el mutante *vte1* en las concentraciones con mayor cantidad de fósforo. Ello puede deberse a que hay un retraso en el crecimiento y desarrollo de la planta ante la falta de vitamina E, de forma que las rosetas fueron muestreadas en un periodo más senescente en las plantas con vitamina E y por el contrario en un periodo menos senescente (y con mayor peso) en el mutante *vte1*.

Por otro lado, en el Capítulo 2, donde el muestreo se realizó en tejidos no senescentes, el mutante sin tocoferoles (*vte1*) presenta mucha menor biomasa de roseta ante el tratamiento bajo en fósforo, con una reducción de su biomasa en más de un tercio, tal como se ha observado en otros trabajos con estos mutantes (Ellouzi *et al.*, 2013). Esta gran diferencia solo la observamos ante el tratamiento bajo en fósforo, lo que demuestra el papel fundamental de la vitamina E en el desarrollo y crecimiento de la planta ante condiciones de estrés.

Aunque los resultados de la biomasa de roseta en el Capítulo 1 y 2 podrían parecer contradictorios, parecen deberse a las condiciones de crecimiento y al momento del muestreo en cada caso. Merece la pena recordar que en el primer capítulo las mediciones de biomasa se realizaron cuando apareció la primera silícula o fruto de color amarillo (primer signo de senescencia), momento elegido también para realizar el muestreo bioquímico, alrededor de 42-45 días después de la germinación de cada planta. Además el estudio se realizó en una cámara de crecimiento de día largo (16h de luz y 8h de oscuridad), lo que produce un crecimiento y desarrollo muy rápido de la planta y menor biomasa de su roseta basal.

Por otro lado, el estudio del Capítulo 2 está realizado en una cámara de crecimiento de día corto (8h de luz y 16h de oscuridad) para promover un desarrollo más lento de la planta y con ello producir una mayor roseta basal (debido a la necesidad de una mayor cantidad del material vegetal para el estudio bioquímico y transcripcional). Asimismo, el muestreo fue realizado en un estadio temprano del desarrollo (apenas el 30% desarrollaron su primera flor), de forma que aunque el muestreo se realizó 65 días después de su germinación, las plantas no mostraban ningún signo de senescencia debido al retraso del desarrollo producido en cámaras de crecimiento de día corto.

De ese modo, se observa que ante una edad tardía de la planta y en tejidos senescentes, la falta de tocoferoles (como se observa en el mutante *vte1*) podría aumentar la biomasa de la planta, frente a tejidos más jóvenes (como se observa en el Capítulo 2) dónde la falta de tocoferoles provoca una reducción de su biomasa ante la falta de fósforo. Es posible que esto se deba a que en tejidos muy senescentes la vitamina E pierda su papel protector y pueda incluso limitar el crecimiento.

Además de la vitamina E, la menor disponibilidad de P_i también influye notablemente en el desarrollo y biomasa de la planta. En el primer capítulo la biomasa de la roseta y la biomasa reproductiva se ven reducidos ante la deficiencia severa de P_i , corroborando que se trata de un elemento esencial para el desarrollo de la planta. Para completar nuestro estudio sobre cómo la disponibilidad de fósforo puede afectar a las plantas, debemos también considerar que es un estrés muy común en suelos naturales al que las plantas deben responder en repetidas ocasiones a lo largo de su vida. Sin embargo, existen pocos estudios donde las plantas sean sometidas a ciclos de estrés reiterados (lo que se conoce como *priming*), es decir, que respondan varias veces a un mismo estrés tras su recuperación, como ocurre en el medio natural.

Importancia del *priming*

Siempre que hablamos de estrés las plantas pueden clasificarse como sensibles o tolerantes. Una planta es sensible a un estrés cuando éste le ocasiona un daño o incluso la muerte, mientras que se hace referencia a la tolerancia como la capacidad de la planta para hacer frente a condiciones desfavorables. Se espera que la respuesta de algunas plantas ante un solo episodio de estrés o frente a repetidos episodios sea diferente, gracias a su capacidad de aclimatarse, mejorar y aprender ante el estrés conocido. La capacidad de los organismos de responder mejor a un estrés concreto cuando la planta ya ha estado previamente expuesta a dicho estrés en comparación con las plantas que se enfrentan a él por primera vez, es lo que se conoce como "*priming*" o memoria (Trewavas 2003, 2005). Es necesario distinguir la aclimatación o el *priming* de la adaptación, que es la resistencia

determinada genéticamente, adquirida por procesos de selección tras numerosas generaciones (Bray, 2000).

En este caso, el *priming* se refiere a la preparación o adaptación de una planta, tras un estrés previo de falta de P_i , para responder mejor ante un nuevo déficit de fósforo. En otras palabras, es la habilidad de la planta de “aprender” del estrés pasado para responder mejor al estrés reiterado, activando su sistema defensivo o activando sus antioxidantes y moléculas para tolerarlo. Sin embargo, esa mejor respuesta para resistir frente a un estrés en ocasiones puede comprometer la productividad de la planta a corto plazo (Bruce *et al.*, 2007).

Los resultados obtenidos en el Capítulo 2 muestran que el *priming* tuvo un claro efecto positivo en la respuesta a la limitación de P_i , donde se demuestra que la exposición repetida de las plantas al estrés puede mejorar su crecimiento. El *priming* realizado en *A. thaliana* tuvo un efecto positivo en el crecimiento de la planta, aunque dicho efecto se abolió en ambos mutantes *vte* (*vte4* y *vte1*), remarcando la importancia del α -tocoferol en la respuesta frente al estrés. Además, el *priming* produce un gran incremento de los tocoferoles, fundamentalmente del α -tocoferol.

Por otro lado, en términos de ontología genética (GO), el uso reiterado de una menor cantidad de P_i (o *priming*) muestra varias vías interconectadas de TFs implicadas en la regulación de crecimiento de las plantas y las respuestas al estrés. Todo ello demuestra la gran relación que existe entre la vitamina E y el crecimiento de la planta.

Factores de transcripción y señalización

En las plantas hay tres genomas, el genoma nuclear, mitocondrial y plastidial. El genoma nuclear contiene la mayoría de los genes necesarios para el desarrollo de la planta, mientras que en el genoma mitocondrial y plastidial solo persisten algunos de los genes requeridos para las funciones de estos orgánulos. Los genes nucleares en plantas presentan estructuras complejas y el ADN se encuentra empaquetado mediante unas proteínas (histonas) para formar nucleosomas. Además, presentan regiones codificantes, que se transcriben, y regiones no codificantes; las regiones del gen que se transcriben y codifican para una proteína son llamadas exones, mientras que las regiones no codificantes son llamadas intrones.

Por otro lado, la transcripción es el proceso donde la información codificada en el ADN pasa a ARN mensajero (ARNm), en cuyo proceso son eliminados los intrones presentes. La síntesis del ARNm la realiza la ARN polimerasa II, pero para la iniciación y progresión del proceso se necesita la participación de gran número de proteínas y otras moléculas. Entre ellos destacan los llamados factores de transcripción (TFs, de las siglas en inglés “*transcription factors*”) que posibilitan el acoplamiento de la ARN polimerasa II al promotor del gen en concreto y la síntesis del mensajero.

Los TFs son los principales reguladores de los cambios de expresión génica asociados al estrés, regulando la expresión de un gen o de un grupo de genes, aunque también es frecuente que regulen a otros TF (Riechmann *et al.*, 2000). De modo que el conjunto de los TFs que se expresan en una célula dibuja una red transcripcional cuyas conexiones determinan el conjunto de genes que se expresarán en un determinado momento (transcriptoma). Por

ello el estudio de la red de TFs expresados en una planta es fundamental para conocer su respuesta ante un estrés o condición junto con su patrón específico de genes sobre-expresados o sub-expresados en cada caso. Además, factores externos como el estatus nutricional, concentración de hormonas o estrés ambiental pueden actuar como elementos respuesta, alterando también la expresión de algunos genes y la expresión diferencial de TFs. Estos elementos respuesta suelen tener una región corta y altamente conservada del ADN que permite una respuesta particular a ese factor. Por ejemplo, la región ABRE (elemento de respuesta al ácido abscísico), que se ha encontrado en alrededor de 2000 genes de *A. thaliana*, estaría actuando como un elemento respuesta ya que la localización de estas secuencias en el promotor de un gen promueven la expresión de dicho gen ante la presencia de ácido abscísico.

La falta de un nutriente esencial, como es el fósforo, y la presencia o ausencia de vitamina E también podrían actuar como elemento respuesta modificando la red de TFs de la planta y con ello la expresión de sus genes y su respuesta ante el estrés. Por ello, nos planteamos el estudio desarrollado en el Capítulo 2. Nuestro estudio de 1880 TFs, nos permitió conocer el patrón de casi la totalidad de TFs de mutantes *vte* de *A. thaliana* en diferentes condiciones de fósforo. *A. thaliana* presenta un total de 45555 proteínas y un total de 2304 TFs de los cuáles 2147 indican secuencias únicas de proteínas (Riaño-Pachón *et al.*, 2007 y Guo *et al.*, 2008), de modo que el estudio de 1880 TF supone casi la totalidad de los TFs descritos.

Los TFs suelen dividirse en una serie de familias y subfamilias de genes que codifican para proteínas relacionadas. En plantas se han identificado hasta ahora 68 familias de TFs. Las familias de TFs más numerosas son: MYB-(R1), R2R3, AP2/EREBP, BHLN, NAC, C2H2 (Zn), HB, MADS, BZIP, WRKY (Zn), GARP, Dof (Zn), CO-like (Zn) y GATA (Zn). Las relaciones y cambios de dominio entre

las principales familias de TF en plantas están detallados en el trabajo realizado por Riechmann *et al.* (2000).

Varios estudios recientes han identificado algunos TFs implicados en la regulación de los cambios de expresión génica relacionados con la distinta disponibilidad de P_i . A nivel molecular, PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1 (PHR1) es descrito como el TF principal en la respuesta transcripcional ante una deficiencia de P_i (Rubio *et al.*, 2001), debido a que la planta adquiere el P_i a través de sus transportadores PHT1 de sus raíces (Poirier y Jung, 2015).

El TF PHR1 se identificó como miembro de la superfamilia de MYB (superfamilia de TFs que participan en procesos de desarrollo y respuestas defensivas en plantas) y participa en la morfología del sistema radicular y en la acumulación de antocianinas (Rubio *et al.*, 2001, Bari *et al.*, 2006). Por otro lado, OsPHR1 y 2, los dos ortólogos AtPHR1 en el arroz, han sido identificados como reguladores de la respuesta a deficiencia de P_i similar a la de *A. thaliana* (Zhou *et al.*, 2008). Además, el MYB62 también es un TF inducido por la falta de P_i , produce cambios en la longitud de la raíz, aumentando la actividad de la fosfatasa de la raíz y la acumulación de antocianinas, mediado por los niveles de giberelinas (Devaiah *et al.*, 2009, Yang y Finnegan, 2010). Otros TFs descritos en Arabidopsis que participan en la respuesta a la falta de P_i son ZAT6, bHLH32, PTF1, WRKY75 y en arroz OsWRKY74 (Yi *et al.*, 2005, Devaiah *et al.*, 2007a, Devaiah *et al.*, 2007b, Dai *et al.*, 2016), aunque sólo unos pocos TFs han sido identificados hasta ahora. Sin embargo, se desconoce cómo se ve afectada la red completa de TFs en plantas ante la menor cantidad de P_i y muy especialmente ante diferentes condiciones del estrés y cantidad de vitamina E.

El fenotipo observado en los mutantes *vte1* y *vte4* es similar, ambos muestran una reducción del crecimiento en el tratamiento con *priming* (*primed-low P*) en comparación al genotipo silvestre (como observamos en la roseta de la biomasa, Figura 3 del Capítulo 2). Ello quiere decir que el *priming* ha favorecido un mayor crecimiento ante la presencia de α -tocoferol, habiendo memoria en su respuesta ante la menor cantidad de P_i . Por otro lado, los mutantes *vte* muestran un perfil de expresión de TF distinto a las plantas con α -tocoferol ante las diferentes condiciones estudiadas (Tabla 3).

En la Tabla 3 se observa el número de TFs que modificaron su expresión sobre-expresándose (*up-regulado*) y sub-expresándose (*down-regulado*) en las tres condiciones estudiadas. Resulta curioso como en la condición A el genotipo silvestre presenta mayor expresión de TF que los mutantes, pudiendo sugerir que el genotipo Col-0 responde mejor a la recuperación de un estrés. Por otro lado, ante la condición B, es el mutante *vte1* el que presenta mucha mayor expresión, siendo además la gran mayoría de TF sobre-expresados, sugiriendo que ante un estrés aislado de déficit de P_i , el mutante *vte1*, al no poseer tocoferoles, debe desarrollar otros mecanismos de defensa y respuesta. Por último, ante la condición C, donde medimos la diferencia de expresión entre una respuesta al *priming* o no, el mutante *vte4* es el que presenta mayor expresión. Ello podría deberse a que este mutante sintetiza mayor cantidad de oxilipinas (OPDA y JA) en su respuesta al *priming*, de modo que pese a su carencia de α -tocoferol la mayor cantidad de γ -tocoferol podría adaptarle para responder más eficientemente a un estrés reiterado (mostrando además mayores valores en GA3 ante el *priming* que el resto de genotipos).

Tabla 3. La tabla resume los resultados principales observados en el estudio transcripcional realizado en mutantes deficientes en vitamina E (*vte4* y *vte1*) de *Arabidopsis thaliana* y su genotipo silvestre, donde se muestra que TFs muestran sobre-expresión (*up-regulated*) o sub-expresión (*down-regulated*) respecto al patrón en tres condiciones de estudio. En la condición A aparecen los TFs que responden diferencialmente a un pretratamiento bajo en P_i tras su recuperación, en la condición B aparecen los TFs que responden a un tratamiento bajo en P_i único y la condición C aparecen los TFs que responden a un tratamiento con *priming*, es decir, con una exposición previa de dicho estrés (el tratamiento bajo en P_i).

<i>A. thaliana</i> Capítulo 2	Condición A TFs que responden al pretratamiento bajo en P_i	Condición B TFs que responden a un tratamiento bajo en P_i	Condición C TFs que responden a un tratamiento con bajo P_i tras una exposición anterior (<i>priming</i>)
Col-0	69 TFs (43 up-/26 down-regulated)	46 TFs (6 up-/40 down-regulated)	53 TFs (29 up-/24 down-regulated)
<i>vte4</i>	43 TFs (14 up-/29 down-regulated)	43 TFs (35 up-/8 down-regulated)	122 TFs (56 up-/81 down-regulated)
<i>vte1</i>	49 TFs (34 up-/15 down-regulated)	122 TFs (121 up-/1 down-regulated)	44 TFs (28 up-/16 down-regulated)

Resulta curioso observar que en la condición C (que nos indica la diferencia entre una respuesta primada o no) tanto el mutante *vte4* como el *vte1* presentan sobre-expresión de numerosos TFs relacionados con la respuesta al etileno (como puede observarse en las tablas suplementarias del Capítulo 2). De modo que la vitamina E parece participar en la señalización celular mediante la modulación de los niveles de expresión de genes relacionados con la biosíntesis de etileno. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el trabajo de Cela *et al.* (2011), y muestra que en ambos casos la falta de vitamina E podría causar algún tipo de estrés a la planta, activando la síntesis

de etileno. Además, el etileno es una hormona inhibidora del crecimiento, lo que concuerda con el fenotipo observado en ambos mutantes con relación al genotipo silvestre, al presentar menor crecimiento.

Además, el mutante *vte1* mostró un patrón de expresión opuesto para varios de los TF específicos del *priming*, lo cual pudiera estar relacionado también con su falta de tocoferoles. Así mismo, se demuestra que una alteración en los contenidos de vitamina E puede influir en el crecimiento y en los mecanismos de defensa a través de la modulación de TF que regulan la expresión génica y la síntesis de hormonas. De ese modo, la relación entre la capacidad de las plantas para sintetizar antioxidantes cloroplásticos (como la vitamina E) y cambios masivos en la expresión génica nuclear, sugiere que la vitamina E influye en la señalización retrógrada, un aspecto que se había propuesto anteriormente (Sattler *et al.*, 2004; Munné-Bosch, 2005; Pfannschmidt y Munné-Bosch, 2013).

Por otro lado, nuestros resultados muestran que los niveles de transcripción de 45 TFs fueron específicamente desregulados (29 sobre y 24 sub-expresados) en respuesta al tratamiento *priming* (de un mismo estrés reiterado). Estos TFs se asocian principalmente con la regulación del crecimiento, y entre los TFs específicos de la respuesta al *priming* se identificaron los TFs MYB111 y MYB113, implicados en la biosíntesis de antocianinas. Esta observación sugiere que la pre-exposición a una limitación moderada de P_i hace que la planta se proteja eficazmente cuando se encuentra de nuevo ante el estrés. Además, el *priming* también induce el TF SWI2C, implicado en la regulación de varias vías hormonales, lo que indica una posible implicación de las hormonas en la regulación de las respuestas específicas al *priming*. Curiosamente, el *priming* produce también cambios en TFs implicados en las respuestas de estrés, las respuestas a

enfermedades, los niveles de hormonas, con su desarrollo y con la señalización del nitrato, entre otros.

Es importante considerar que la alteración de la expresión de los genes diana por señales endógenas o ambientales, además de por TFs, se puede lograr mediante la reducción de los niveles de acetilación de histonas (Dhar *et al.*, 2014). Es conocido que la organización de la cromatina y la modificación de las histonas H3 y H4 también afectan a la transcripción de los genes, donde la acetilación de las histonas forma nucleosomas menos compactos y generalmente más accesibles a los TFs. Así mismo, la histona H3 y H4 también se encontraba sobre-expresada en *priming*, aunque se desconocen los detalles de la relación entre la acetilación de histonas y la respuesta al P_i .

Por otro lado, al comparar la expresión transcripcional entre plantas con falta de P_i inicial y posteriormente recuperadas con plantas que no han sufrido ese estrés inicial (condición A del Capítulo 2), el TF MYB30 presenta una expresión superior en el mutante *vte4*. Se trata de un TF que regula la biosíntesis de ácidos grasos de cadena muy larga, lo que sugiere un vínculo entre la vitamina E y el metabolismo de los ácidos grasos en la respuesta de la planta a bajas concentraciones de P_i . Además, las alteraciones en el metabolismo de los ácidos grasos debido a los efectos de la deficiencia de vitamina E, pueden conducir a cambios profundos en los productos de peroxidación lipídica (con altos niveles de JAs en el mutante *vte4*, por ejemplo, observados en los capítulos 1 y 2) e incluyendo alteraciones enzimáticas. Además, el estudio de TFs indica que la señalización del azúcar está fuertemente influenciada por la composición de tocoferol, aspecto que también se ha demostrado en plantas de patata (Asensi-Fabado *et al.*, 2014). Aunque sin lugar a duda, las relaciones entre la señalización del azúcar y la vitamina E merecen mayor investigación.

Para una mayor comprensión sería necesaria una futura caracterización funcional de los TF estudiados, para conocer la función de cada uno y de la vitamina E en la respuesta de las plantas a la baja disponibilidad de fósforo. De ese modo, los mecanismos que relacionan deficiencias en la vitamina E junto con los cambios masivos en la expresión de los TF observados podrían estar relacionados con otros antioxidantes cloroplásticos y/o el metabolismo de otros compuestos (ya sea ácidos grasos o azúcares).

2. Importancia de los jasmonatos y otras hormonas ante la distinta disponibilidad de fósforo

Las hormonas vegetales controlan gran cantidad de procesos fisiológicos en la planta, por lo que conocer su concentración endógena y la regulación de su síntesis mediante expresión génica es fundamental para comprender cómo responde una planta ante un estrés.

Muchas hormonas vegetales juegan un papel importante en la adaptación de las plantas al déficit de P_i , pero la mayoría de los estudios hasta ahora han estado enfocados a los cambios hormonales relacionados con la arquitectura de su sistema radicular (Niu *et al.*, 2013).

Bajo la deficiencia de P_i , algunas hormonas inhiben el crecimiento primario de la raíz mientras estimulan el crecimiento de las raíces laterales y de los pelos radiculares. La deficiencia de P_i se asocia con una mayor sensibilidad a la auxina a través de la sobreexpresión del receptor de auxina TIR1 (Pérez-Torres *et al.*, 2008) y una disminución de la síntesis de citoquininas por señalización del CRE1 (Franco-Zorrilla *et al.*, 2002).

En el caso del ABA, estudios anteriores muestran que esta hormona ejerce un papel mínimo en la respuesta a déficit de fósforo (Franco-Zorrilla *et al.*, 2004). En nuestros estudios sólo observamos un incremento del ABA en el Capítulo 4 a los 12 días del inicio del tratamiento, debido probablemente al momento de diferenciación sexual y desarrollo de las flores (Koshita *et al.*, 1999), sin observar cambios entre tratamientos de P_i ni entre géneros. Tampoco observamos diferencias en las concentraciones de ABA entre los mutantes *vte* ante las bajas disponibilidades de P_i , de forma que parece que el ABA no parece tener un papel importante en la respuesta al déficit de P_i .

Por otro lado, los niveles endógenos de giberelinas (GAs: hormonas que participan activamente en el crecimiento longitudinal del tallo) confirman un descenso del crecimiento por la falta de P_i , como se ha observado en trabajos anteriores (Jiang *et al.*, 2007). El tratamiento con menor cantidad de P_i reduce notablemente la cantidad de las GAs en ortigas (Capítulo 4). El descenso solo se observa en las GAs que se encuentran en mayor proporción en la planta, la GA_1 y la GA_4 principalmente, mientras que no se observa en el resto de GAs o en *Arabidopsis*, al no tratarse de un déficit de P_i suficiente para dicha planta.

En el Capítulo 4 también observamos que las ortigas ante el tratamiento con bajo P_i presentan altos niveles de hormonas de respuesta a estreses, como el SA, ACC (precursor de etileno) y el OPDA (precursor de JAs), este último sólo en las hembras. El aumento de ACC puede deberse en parte a la falta de manganeso (Mn) que también observamos en los tratamientos con baja disponibilidad de P_i . Debido que el Mn es un metal que participa en la conversión del ACC en etileno (Bousquet y Thimann, 1984). En otros estudios también se ha observado un aumento en los niveles de etileno ante la falta

de P_i , al igual que en las estrigolactonas, mientras que los brasinoesteroides disminuyen (Ma *et al.*, 2003; Mayzlish-Gati *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2014).

Por otro lado, en *Arabidopsis* también observamos un aumento de las hormonas de respuesta al estrés ante la menor disponibilidad de fósforo. La comparación de los perfiles de TFs entre plantas de tipo silvestre y los mutantes *vte* del Capítulo 2 muestra patrones de expresión opuestos en los GO asociados con respuesta a la GAs, JAs, SA, ABA, etileno y auxinas. Estos resultados confirman un compromiso o *trade-off* entre la producción de hormonas de respuesta al estrés (defensas químicas) con los niveles de vitamina E y el crecimiento de la planta ante la menor cantidad de P_i . Ello puede observarse en el mutante *vte1* (sin tocoferoles), al producir mayor cantidad de SA reduce su tamaño. De forma que la menor fotoprotección de este mutante, al carecer de vitamina E, podría favorecer la capacidad de sintetizar defensas químicas (SA) a cambio de un menor crecimiento ante el estrés. Todo ello sugiere un equilibrio entre el crecimiento y las diferentes vías de defensa en las plantas y su fotoprotección, lo que está de acuerdo con estudios previos (Demmig- Adams *et al.*, 2013, 2014; Morales *et al.*, 2015).

En la ortiga el aumento de SA y OPDA confirma el estrés por sequía que sufren las hembras. Aun así, las hembras presentan mayor tamaño que los machos, remarcando el compromiso entre el crecimiento y las diferentes vías de defensa en las plantas de nuevo, como también se ha observado en estudios previos (Demmig-Adams *et al.*, 2013). Aunque el incremento de JAs y/o OPDA es mayor en las plantas deficientes en vitamina E o en las plantas hembras, de forma generalizada observamos que la deficiencia de P_i incrementa la producción de JAs (como puede observarse en los altos valores de JAs en el tratamiento -P2 en el genotipo silvestre del Capítulo 1).

Tabla 4. La tabla resume los resultados observados en las hormonas vegetales analizadas en *A. thaliana*, en los genotipos Col-0, *vte4* y *vte1* los resultados observados en *U. dioica*, diferenciándose individuos macho y hembra, ante la deficiencia de fósforo. Las hormonas analizadas son: citocininas (CKs, incluye trans-zeatina, trans-zeatina ribosido, isopenteniladenosina y 2-isopenteniladenina), auxinas, giberelinas (GAs, incluye giberelina 1, 3, 4 y 7), ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (SA), precursor del etileno (ACC), precursor de jasmonatos (OPDA), ácido jasmónico (JA), ácido jasmónico-interleucinas (JA-Ile) y formas conjugadas del JA (JA-AAs).

<i>A. thaliana</i> Capítulos 1 y 2	Hormonas del crecimiento	Hormonas de respuesta a estreses abióticos	Hormonas de respuesta a estreses bióticos
Col-0	-CKs, auxinas, GAs	-ABA, SA, ACC	↑ OPDA, JA, JA-Ile
<i>vte4</i>	-CKs, auxinas, GAs	-ABA, SA, ACC	↑ OPDA ↑ JA, JA-Ile
<i>vte1</i>	-CKs, auxinas, GAs	↑ SA -ABA, ACC	↑ OPDA, JA, JA-Ile
<i>U. dioica</i> Capítulo 4	Hormonas del crecimiento	Hormonas de respuesta a estreses abióticos	Hormonas de respuesta a estreses bióticos
machos	↓ GAs	↑ SA, ACC -ABA	↑ OPDA ↓ JA, JA-Ile, JA-AAS
hembras	↓ GAs	↑ SA, ACC -ABA	↑ OPDA ↓ JA, JA-Ile, JA-AAS

De modo que una falta de P_i favorece y activa la resistencia ante estreses bióticos como la herbivoría al incrementar la producción de JAs. Estos resultados se han repetido en estudios recientes realizados en raíces y brotes de *Arabidopsis*, donde la deficiencia de P_i conduce a un aumento en la síntesis de JA / JA-IIe y a una activación de la vía de señalización de JA en *Arabidopsis* (Khan *et al.*, 2016).

La Tabla 4 resume los resultados principales observados en los análisis de hormonas realizados en *A. thaliana* y *U. dioica*, ante la deficiencia de fósforo. En *A. thaliana* se estudiaron los genotipos Col-0 (silvestre), *vte4* (con γ -tocoferol principalmente) y *vte1* (sin α - ni γ -tocoferol), y en *U. dioica* plantas macho y hembra. Al comparar los resultados de ambas plantas en condiciones deficientes de P_i (Tabla 4), observamos que hay unas tendencias generales de hormonas en modelos de plantas muy distintos.

Es conocido que la deficiencia de fósforo produce retraso y descenso del crecimiento de la planta al tratarse de un macroelemento esencial para la planta. Sin embargo esta tendencia sólo se observa en las ortigas, donde aparece un pronunciado descenso de las GAs (hormonas del crecimiento) en machos y hembras, debido a que el tratamiento con menor concentración de fósforo en *Arabidopsis* no resultó ser muy deficiente para esta planta.

Por otro lado, existe una tendencia a presentar mayores niveles de hormonas de respuesta a estrés abiótico o biótico (mayor SA y JAs), especialmente en aquellos genotipos o individuos más vulnerables ante el estrés, como es el caso de los mutantes *vte* y los individuos hembras en el caso de las ortigas. En ambos casos, los mutantes y los individuos hembras presentan mayor cantidad de OPDA, la hormona precursora de los JAs, sin mostrar curiosamente diferencias en el resto de jasmonatos.

Importancia de los jasmonatos

Debemos considerar que inicialmente un estrés abiótico incrementa la producción de oxilipinas (JAs) debido fundamentalmente a que la concentración existente de antioxidantes es insuficiente para controlar los niveles de ROS, siendo muchas veces estas oxilipinas las que regulen la síntesis de estos antioxidantes (Demmig-Adams *et al.*, 2013). Por ejemplo, en trabajos previos con aplicaciones de JAs, se observaron aumentos en la cantidad de vitamina E y carotenoides (Gala *et al.*, 2005).

En el Capítulo 1 se observó un aumento de la acumulación de algunos JAs en los mutantes *vte1* y *vte4*, siendo el doble los valores de OPDA bajo limitación de P_i severa en el mutante *vte4*. El aumento del OPDA en las plantas deficientes en vitamina E se podría asociar con altos niveles de hidroperóxidos lipídicos, sugiriendo un aumento de la canalización de oxilipinas hacia OPDA bajo estas condiciones. Ya que altos niveles de hidroperóxidos, causados por su deficiencia en vitamina E, pueden influir positivamente en los niveles de JA y sus precursores (Vick y Zimmerman, 1984), como ya hemos comentado anteriormente, ver Figura 14. Aunque debemos considerar que los niveles de hidroperóxidos eran también muy elevados en el genotipo silvestre al tratarse de un estrés severo en la condición de 0,1 mM de P_i .

Por otro lado, en el Capítulo 2, dónde de nuevo analizamos los JAs, observamos de nuevo un aumento del OPDA en el mutante *vte4* ante el estrés reiterado o *priming*, al igual que valores más altos en el JA y JA-Ile (forma activa descrita para *Arabidopsis* (Staswick y Tiryaki, 2004)).

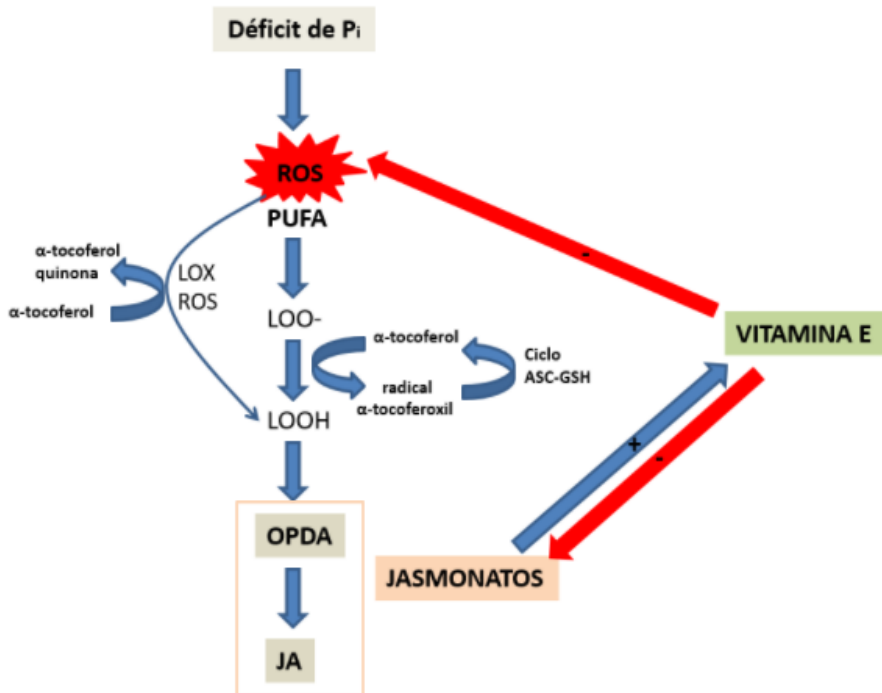


Figura 14. Papel de la vitamina E como punto de control en la respuesta al estrés causado ante el déficit de fósforo (Pi). El estrés favorece la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Estos producen el incremento de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) que participan en la síntesis de jasmonatos, OPDA como precursor y ácido jasmónico (JA) y sus derivados. Los jasmonatos incrementan la síntesis de vitamina E (α -tocoferol) y la producción de vitamina E a su vez regula la producción de JA. La vitamina E, como antioxidante, combate la formación de ROS y de LOOH (siendo reciclada en el ciclo del ascorbato-glutatión (ciclo ASC-GSH)).

En el Capítulo 4 la falta de P_i en las ortigas produce también un aumento significativo de OPDA y de hidroperóxidos lipídicos en el género más vulnerable, las hembras. Este aumento de hidroperóxidos se podría relacionar también con el gran aumento del OPDA observado.

Resulta muy curioso que en el Capítulo 1 y 4 observemos un gran incremento del OPDA ante el estrés, y que dicho incremento no se traduzca en un aumento del JA y otros jasmonatos. El OPDA sirve como un precursor de JA, pero también activa la defensa biótica independientemente de JA (Danon *et al.*, 2005; Taki *et al.*, 2005). Sin embargo, se desconoce por qué el OPDA, y no otros JAs, se encuentran acumulados en las plantas más vulnerables (el mutante deficiente en vitamina E y las ortigas hembras). Ello nos sugiere que las plantas más vulnerables frente al estrés presentan una reducción de la fotoprotección que sin embargo favorece su capacidad de sintetizar defensas químicas, tales como JAs y el OPDA en condiciones de estrés abiótico. De ese modo observamos un *trade-off* entre diferentes vías de defensa en las plantas (fotoprotección frente a la síntesis de defensas químicas, a través de JAs). Nuestros resultados se apoyan en otros estudios donde se ha descrito que altas concentraciones de compuestos encargados de la disipación térmica y/o de antioxidantes en el cloroplasto, reducen la producción de oxilipinas, mientras que bajas concentraciones de estos antioxidantes o su ausencia (como ocurriría en nuestro estudio con los mutantes *vte*) incrementan la producción de oxilipinas (Demmig-Adams *et al.*, 2013).

En el trabajo realizado por Demmig-Adams *et al.* (2013) se observan como distintos mutantes de *Arabidopsis* en algún componente del sistema de fotoprotección en el cloroplasto (mutantes con deficiencias en PsbS, zeaxantina o luteína y vitamina E) presentan mayores niveles endógenos del JA y del OPDA. De manera que estos resultados remarcan la idea que observamos en nuestro estudio, la existencia de un *trade-off* o compromiso entre desarrollar defensas abióticas o bióticas, donde las plantas con menores mecanismos de defensa abiótica (como es el caso de mutantes *vte* o de las hembras) presentan mayor capacidad de síntesis de hormonas de

respuesta a estreses bióticos. De ese modo parece que las oxilipinas (OPDA y JAs) juegan un papel muy importante en la interacción entre estreses abióticos y bióticos (actuando como “*crosstalk*”, según Demmig-Adams *et al.*, 2013).

Las formas conjugadas, como los JA-AAs, producen modificaciones en las hormonas que pueden alterar en mayor o menor medida su estabilidad, actividad y función. En estudios previos se ha observado que la síntesis de aminoácidos (AAs) a penas se modificaba frente al estrés oxidativo, mientras que sí lo hacía frente a un estrés osmótico o de sequía (Less y Galili, 2008). Sin embargo, no hay estudios sobre los niveles de AAs ante deficiencias nutricionales. Sería interesante investigar si hay mayor o menor síntesis de AAs ante la falta de fósforo, ya que hemos observado que sus conjugados con el jasmónico (el JA-Ile, Ja-Val, JA-Met, JA-Phe y JA-Leu) varían enormemente su síntesis ante la menor disponibilidad de fósforo, reduciéndose sus valores en todos los casos (Capítulo 4).

Todo ello remarca la compleja red de interacciones existente entre los JAs, formas conjugadas, la vitamina E y parámetros indicativos del estado fisiológico de la planta, que además varían enormemente según el modelo de planta y las condiciones de estudio. Es muy necesario realizar nuevos estudios centrados específicamente en el papel y regulación del OPDA y del resto de los JAs en la respuesta al estrés. Para la mayor comprensión y aplicación de esta hormona vital en la respuesta de las plantas al estrés biótico, pero también como hemos visto en el estrés abiótico.

3. Interacción del fósforo y otros nutrientes

Una interacción entre nutrientes se da cuando el nivel de un nutriente influye en la respuesta o cantidad de otro nutriente en la planta. Las interacciones positivas del fósforo con otros nutrientes están bien documentadas (Domínguez *et al.*, 2012). El fósforo y el N están involucrados en funciones vitales para las plantas, como son la fotosíntesis, formación de proteínas y la fijación (simbiótica) de N. El beneficio principal de la aplicación conjunta de fertilizantes con P_i y nitrógeno amoniacal es el incremento de absorción de P_i por las plantas debido a que la solubilidad del P_i se incrementa. Además, la aplicación del P_i junto a otros nutrientes esenciales como el K, S, Fe, Mg, y otros micronutrientes mejoran notablemente la producción y desarrollo de las plantas (Robson y Pitman, 1983; Aerts y Chapin, 1999). Aunque para la correcta aplicación de nutrientes en el suelo deben considerarse las propiedades físicas y químicas del suelo, y las condiciones de estrés de la planta, como la sequía o la deficiencia de nutrientes.

Muchas veces el estudio de las deficiencias nutricionales debe ir unido al estudio del déficit hídrico (o sequía), ya que ambos estreses están íntimamente relacionados y muchas veces van asociados. En el tercer capítulo, las plantas se sometieron a sequía severa (típica del verano en la región mediterránea) y se expusieron a diversas concentraciones de P_i en la solución nutritiva. La sequía causó fotoinhibición residual y mayor peroxidación lipídica en hembras, como indica la acumulación de hidroperóxidos lipídicos. Sus efectos fueron suavizados ante el aporte nutricional de NPK, favoreciendo una adecuada homeostasis redox celular. Así, la fertilización con NPK podría contribuir a incrementar la biosíntesis de

la vitamina E al proporcionar más N para la síntesis de aminoácidos aromáticos y por lo tanto favorecer la actividad de la tirosina aminotransferasa, enzima clave en la biosíntesis de α -tocoferol (Sandorf y Holländer-Czytko, 2002). Por lo tanto, es probable que la fertilización con NPK ejerza un papel positivo en el metabolismo de aminoácidos, siendo las plantas sometidas a la sequía más capaces de desviar parte de los aminoácidos a la biosíntesis de vitamina E.

Es interesante observar que este efecto no se observó en los distintos tratamientos con P_i en maceta, lo que indica que podría ser un efecto del N específico y no del P, al menos en el caso de las hembras. Sin embargo, merece tener en cuenta que el K, también a partir del fertilizante NPK, podría así mismo favorecer la biosíntesis de la vitamina E en sequía, debido a que otros estudios han demostrado que altas dosis de KCl en la solución nutritiva pueden aumentar significativamente los niveles de tocoferol en las plantas con estrés salino (Tounekti *et al.*, 2011). Sea tanto por el N, por el K o por ambos a la vez, el aporte de NPK mejora la fotoprotección de las plantas (y de las hembras principalmente) ante la sequía.

Por otro lado, en el Capítulo 2 se estudió el perfil nutricional de *A.thaliana* en hojas y en el Capítulo 4 en *U.dioica*. En el caso de *A. thaliana*, no observamos diferencias en la cantidad de P_i en las hojas, debido a que la deficiencia no fue elevada (siendo la concentración de P_i en la solución nutritiva 0,5mM, mientras que en el primer capítulo la concentración que más efecto causó fue a 0,1mM). Es muy probable que debido a que no se trataba de una deficiencia de fósforo suficiente para *A. thaliana*, no observemos diferencias en el resto de macro y micro-nutrientes en sus hojas.

En la ortiga, las plantas machos y hembras no mostraron diferencias significativas en la mayoría de los macro y micronutrientes, al igual que entre los distintos tratamientos. Sin embargo sí se observó una disminución del P_i presente en hojas, junto con una disminución significativa del Mn en los tratamientos deficientes en P_i , lo que concuerda con el trabajo de Allen *et al.* (2007), donde las deficiencias de Mn y de P_i suelen ir asociadas. La interacción P_i /Mn puede desarrollarse cuando la disponibilidad de Mn se incrementa debido a altos niveles de P_i en el suelo. En algunos suelos se cree que esto puede ser debido a los cambios en el pH (acidez) con alta fertilización fosfatada. En nuestro caso, la menor cantidad de Mn observada en el tratamiento con menor P_i , puede favorecer el gran aumento del ACC (precursor inmediato del etileno) que observamos, debido a que es un metal esencial para la conversión del ACC al etileno (Boller *et al.*, 1979; Bousquet y Thimann, 1984), acumulándose así el precursor.

Además, a lo largo del tiempo se produjo un incremento del porcentaje del N y de los isótopos $\delta^{13}C$ y $\delta^{15}N$ estudiados. Estos incrementos de N y C en las hojas se producen tras la maduración de las plantas, lo que explica dichas diferencias. Podría parecer que el porcentaje del N influye en la madurez de las plantas, como se ha observado en el algodón (McConnel *et al.*, 1993). Por ello, en el Capítulo 3 las ortigas hembras (siendo el género más vulnerable ante la sequía) presentaron mejor respuesta y estado fisiológico ante el aporte de N. Ello confirma que además del P_i , muy necesario en el desarrollo del polen por ejemplo (Lau y Stephenson, 1994), el N es fundamental en el proceso de diferenciación y madurez sexual de las plantas.

Con relación a los valores de los isótopos medidos, los valores de $\delta^{13}\text{C}$ se calculan respecto al estándar PDB y se basa en la fijación biológica de CO_2 al discriminar contra ^{13}C , correlacionándose fuertemente con la eficiencia del uso del agua en las hojas (Farquhar *et al.*, 1982). Es decir, a más negativos sean los valores de $\delta^{13}\text{C}$, mejor estado hídrico de la planta y mayor capacidad de hacer la fotosíntesis al tener sus estomas más abiertos. En nuestro caso, al no mostrar diferencias entre machos y hembras de *U. dioica*, como ocurre también con sus valores de RWC, parece que no hay diferencias en la eficacia del uso del agua entre sexos. En el caso del N, debido a que la proporción de ^{15}N en el aire es constante (0,366 %), ésta se utiliza como estándar. Las reacciones biológicas (asimilación, nitrificación y desnitrificación) controlan la dinámica del ciclo del N, dando como resultado un empobrecimiento en ^{15}N respecto del sustrato. De modo que mayores valores de $\delta^{15}\text{N}$ indican mayores tasas de asimilación del N, y si observamos un aumento puede deberse a la excreción preferente de ^{14}N . En nuestro caso no se observan diferencias entre machos y hembras (como ocurre con el resto de nutrientes), y su aumento tras la maduración puede deberse por tal proceso. Como resumen, no se observaron diferencias entre los sexos en ninguno de los nutrientes estudiados en las hojas.

4. Dimorfismo sexual

Se ha observado que algunas plantas dioicas muestran dimorfismo sexual secundario en su respuesta ante estreses abióticos (Obeso, 2002; Juvany y Munné-Bosch, 2015). Debido a que el género con mayores costes reproductivos podría sufrir un mayor estrés fisiológico ante condiciones adversas. El esfuerzo o coste reproductivo está definido como las pérdidas

del futuro potencial reproductivo como consecuencia de la inversión actual en reproducción (Jöhnsson, 2000). De ese modo, el esfuerzo reproductivo incluye el gasto energético para reproducirse competitivamente y los gastos relacionados con la formación de las estructuras reproductoras (Obeso, 2002). Por ello, el esfuerzo reproductivo está también relacionado con el modelo de supervivencia de las plantas (anual, bianual o perenne). Las plantas perennes por ejemplo, distribuyen sus recursos gradualmente en el tiempo, de forma que en el periodo juvenil los recursos se invierten en su crecimiento y defensa para adquirir un tamaño mínimo.

Las plantas son consideradas juveniles hasta que sobrepasan la fase de transición, marcada por su maduración y diferenciación sexual con el desarrollo de sus flores. Una vez que desarrolla flores y/o frutos se considera una planta madura (Bond, 2000) y su energía se invierte tanto en su reproducción como en su continuo crecimiento. Está descrito que las plantas hembras presentan generalmente mayor esfuerzo reproductivo, debido a la producción de semillas y frutos, además de las flores (Hancock y Bringhurst, 1980; Leigh y Nicotra, 2003; Zunzuneghi *et al.*, 2006), lo que produce diferencias fisiológicas entre sexos. También existen estudios que demuestran que las plantas hembras tienen mayor inversión de nutrientes en la reproducción y menor en su crecimiento (Gross y Soule, 1981; Korpelainen, 1992). Aunque en otros estudios sobre herbáceas perennes, las hembras presentar mayor vigor (crecimiento) que los machos y en otros casos no se han observado diferencias entre sexos (Harris y Pannell, 2008; Barret y Hough, 2013).

Existen muchas evidencias de que las plantas macho y hembra responden diferente ante los estreses, por ello nos hemos planteado su estudio frente a distintas disponibilidades de P_i , con especial atención en los niveles endógenos de vitamina E y JAs. Para poder describir y entender el dimorfismo sexual (caracteres sexuales secundarios) que existe en el desarrollo y la respuesta de la planta a la menor disponibilidad de P_i , estudiado en los capítulos 3 y 4 de la Tesis en la planta *U. dioica*.

El Capítulo 3 ha tratado de estudiar si existe dimorfismo sexual en los mecanismos de fotoinhibición, fotoprotección y estrés foto-oxidativos ante la menor cantidad de fósforo y sequía. Mientras que el Capítulo 4 ha tratado de conocer en qué medida la falta de fósforo puede afectar a la madurez, el crecimiento, los nutrientes y los niveles hormonales entre machos y hembras. En el tercer capítulo observamos un claro dimorfismo sexual secundario en la respuesta de la planta al severo estrés abiótico severo (sequía junto a déficit nutricional o déficit de P_i). Las fuertes diferencias observadas entre machos y hembras pueden estar asociadas con el alto estrés impuesto a las plantas, ya que fue necesario realizar un estrés muy severo para manifestar las diferencias asociadas con su fotoinhibición y estrés foto-oxidativo. La fertilización con nutrientes (como se observa en el tratamiento con NPK) mejora la respuesta de la planta al estrés de la sequía, mejorando el contenido de pigmentos, reduciéndose su peroxidación lipídica y su fotoinhibición (menor cantidad de hidroperóxidos lipídicos y mayor F_v/F_m), sobre todo en el caso de las hembras. Además, las hembras presentaron mayor cantidad de vitamina E y de ascorbato, de forma que la mayor disponibilidad de nutrientes puede influir en los mecanismos dirigidos a mantener una adecuada homeostasis redox celular en la sequía.

En el Capítulo 4 el *sex ratio* en ambos tratamientos fue mayor que uno (el *sex ratio* en el tratamiento control fue de 1,59, mientras que en el tratamiento deficiente en P_i aumentó a 2,0), por lo que hubo más plantas hembras que machos en ambos casos. Estos resultados concuerdan con el trabajo de Freeman *et al.* (1976), donde explica que los machos son más abundantes en los climas xéricos, mientras que las hembras son más abundantes en zonas húmedas, siendo las ortigas típicas de zonas húmedas y sombrías. Esta distribución diferencial de los sexos en función del clima podría ser una estrategia para maximizar la producción de semillas de las hembras y la dispersión de polen de los machos, además de minimizar la competencia entre los sexos. Además, hubo un incremento notable en el número de hembras en el tratamiento deficiente en P_i , de modo que las ortigas favorecen la mayor proporción de hembras para favorecer la supervivencia del género más vulnerable al estrés, como se ha observado en otros trabajos (Mopper y Whitham, 1992).

También se observó que la deficiencia de P_i produce un retraso en la maduración tanto en hembras como en machos. Y sorprendentemente se observaron diferencias entre plantas machos y hembras en los niveles de JAs. Las hembras pese a tener menores niveles de antioxidantes (vitamina E), producen mayor cantidad de oxilipinas (OPDA), apoyando la idea de la existencia de un *trade-off* entre defensas bióticas y abióticas. Con estos trabajos confirmamos que existe un marcado dimorfismo sexual en relación a parámetros de maduración, desarrollo, producción de antioxidantes y niveles de JAs.

5. Algunas aplicaciones y limitaciones de los estudios

Desde mi punto de vista hay que destacar la necesidad de profundizar en el conocimiento de cómo el fósforo afecta a las plantas, un macroelemento esencial para su desarrollo y cada vez más escaso en los suelos naturales. Con la presente tesis se han abordado nuevas ideas que aportan “pistas” sobre qué puntos de vista deben profundizarse en futuras investigaciones.

En los cuatro capítulos se remarca el papel de la vitamina E como antioxidante esencial en respuestas contra estrés abiótico (como puede ser la deficiencia de P_i). Los niveles de tocoferoles se ven muy alterados en casos de deficiencia nutricional en los distintos modelos de planta estudiados, incluyendo plantas macho y hembra e incluso en plantas mutantes con la ruta de síntesis de la vitamina E alterada. La Tesis confirma que, además de su importancia para combatir el exceso de ROS, la vitamina E regula la longevidad y participa en señalización celular tras el estudio transcripcional. Además de participar indirectamente en la señalización celular por limitar la producción de hidroperóxidos lipídicos (y con ello reducir la formación de JAs), participa muy probablemente de forma retrógrada, ya que los distintos mutantes estudiados mostraron patrones de TF muy distintos entre sí. El estudio de los 1880 TFs en mutantes deficientes en vitamina E, abre la puerta a nuevas preguntas y posibilidades para continuar con el estudio de deficiencias nutricionales, del *priming* y del papel de la vitamina E en la señalización celular. Sería necesario concretar en el papel de cada uno de los TF con expresión diferencial según cantidad de vitamina E o el tratamiento, para conocer verdaderamente su aplicabilidad.

Por otro lado, en la presente Tesis se han aportado nuevas aproximaciones en el estudio de cómo afecta la distinta disponibilidad de fósforo a la planta, elemento que a diferencia del N, existen muy pocos estudios al respecto. En los capítulos de esta Tesis se han estudiado diferentes concentraciones de P_i en forma de solución nutritiva con mayor o menor concentración de H_2PO_4 (desde 0,1 a 2 mM) en plantas en macetas o plantadas en campo, y en cámaras de crecimiento controlado o en el medio exterior. Todas las opciones son válidas, pero debemos tener muy en cuenta nuestro modelo de estudio (por ejemplo, una concentración de 0,5mM para *A. thaliana* no supone una gran deficiencia de P_i , mientras que para la ortiga sí). El estudio con diferentes concentraciones de P_i requiere controlar en todo momento las concentraciones del resto de nutrientes necesarios de la planta (para evitar otras deficiencias), la conductividad y el pH de la solución nutritiva (fundamental para que el fósforo sea asimilable por la planta). Además, debemos considerar una periodicidad de riego adecuada a las características de nuestra planta modelo, y determinar cuál es la mejor forma de realizar estas deficiencias (deficiencia por riego de solución nutritiva, aplicación en suelo o radicular, aplicación foliar, cultivo hidropónico...). Nuestra elección dependerá en muchos casos de las limitaciones metodológicas y de espacio o tiempo que tengamos, pero fundamentalmente nuestra elección deberá depender de la pregunta que queremos responder con nuestro trabajo.

Tradicionalmente los estudios sobre deficiencias nutricionales se han hecho en cultivos hidropónicos, debido a que es más fácil controlar las condiciones de la solución nutritiva y la cantidad que es absorbida por la planta. Sin embargo a penas hay estudios sobre deficiencias de fósforo en plantas sobre sustrato. Es importante tener presente que el estudio del fósforo es mucho más complejo que el de otros nutrientes, debido a su facilidad de formar

precipitados en el suelo y dejando de estar disponible para la planta. Por ese motivo hemos tratado de innovar y realizar el déficit nutricional sobre sustrato de tierra, asemejándolo lo máximo posible a las condiciones naturales de desarrollo de las plantas o cultivos. De ese modo, al trabajar en macetas de tierra o en campo, la deficiencia nutricional simula en mayor cantidad las condiciones normales de asimilación de estos nutrientes y de desarrollo de la planta. Sin embargo, en la hidroponía la planta es dependiente completamente del cuidado del hidrocultor y además es un cultivo que requiere de grandes inversiones e instalaciones y muchas veces no resulta económicamente rentable para el agricultor.

A parte de ofrecer distintas opciones para estudiar la falta de fósforo en plantas, es importante recalcar la gran profundidad de los análisis realizados. En *A. thaliana* y *U. dioica* se ha estudiado el perfil hormonal completo, incluyendo las hormonas “clásicas”, el ácido salicílico y las oxilipinas, dónde muchos de los JAs del Capítulo 4 apenas habían sido descritos y estudiados previamente. Intentamos medir etileno, pero al ser una hormona volátil tuvimos dificultades metodológicas para llevarlo a cabo. Sin embargo, cuantificamos el precursor inmediato del etileno (ACC), para tener una idea de cómo se ve afectado ante la falta de P_i y de vitamina E.

La información que nos aportan las diferentes hormonas es enorme y ello nos motiva a seguir investigando sobre sus funciones y relaciones. Queda claro que la complejidad de relaciones e interacciones entre las hormonas vegetales y con otras moléculas (como en nuestro caso la vitamina E) es enorme y requiere de muchos más estudios para su comprensión.

Según nuestro trabajo, la división clásica de hormonas de respuesta a estrés abiótico y biótico no queda clara, ya que los JAs (tradicionalmente descrita como una hormona de respuesta a estrés biótico) adquieren un papel protagonista ante la respuesta al déficit de P_i (estrés abiótico). Además, se sugiere que existe un *trade-off* o un compromiso entre producir compuestos de defensas química u hormonas y mecanismos de respuesta a estrés foto-oxidativo o abiótico. Según parece, las plantas con menores mecanismos de respuesta a estreses abióticos y fotoprotectores (como era el caso de los mutantes *vte* y de las hembras en el caso de las ortigas), desarrollan mayor cantidad de defensas químicas de respuesta a estreses bióticos (como son los JAs). De esa forma, las plantas con mayor tolerancia al estrés abiótico (como es el genotipo silvestre o la planta macho) limitan su producción de oxilipinas, siendo más susceptibles a patógenos o herbívoros. Pese a su complejidad, es muy importante conocer los posibles *trade-off* entre defensas bióticas y abióticas para poder anticiparse a cómo responderá una planta a un estrés y en qué medida puede ser más o menos tolerante.

También es importante destacar el avance realizado en estudios entre machos y hembras, fundamentalmente por la escasez de trabajos sobre dioecia en plantas perennes. En la ortiga observamos un marcado dimorfismo sexual secundario en sus respuestas al estrés. Nuestros estudios apoyan la idea de que las hembras son más vulnerables al estrés foto-oxidativo y abiótico, probablemente por los mayores costes reproductores que sufren. Sin embargo producen mayor cantidad de oxilipinas (OPDA), apoyando nuestra idea inicial del *trade-off* entre defensas bióticas y abióticas. Además, resulta muy curioso como la población favorece a las hembras (mayor *sex ratio*) para garantizar su supervivencia, al ser el género más vulnerable al estrés.

CONCLUSIONES



-La vitamina E juega un papel importante en el control de la longevidad en *A. thaliana* y sus efectos dependen de la disponibilidad de fósforo. El α -tocoferol incrementa la longevidad y previene la senescencia de las plantas en condiciones control, exceso de fósforo o leve deficiencia de fósforo. Paradójicamente, las plantas salvajes mostraron mayor fotoinhibición y senescencia ante una deficiencia severa de fósforo.

-Los mutantes deficientes en vitamina E presentan una reducción de su crecimiento y mecanismos de fotoprotección, sin embargo tienen mayores contenidos de jasmonatos. Ello sugiere la existencia de un compromiso entre activar los mecanismos de fotoprotección y activar o sintetizar defensas bióticas o químicas (hormonas como los jasmonatos) ante una menor disponibilidad de fósforo.

-La vitamina E afecta a procesos de señalización celular desde un punto de vista indirecto, debido a que la vitamina E limita la producción de hidroperóxidos lipídicos regulando la síntesis de jasmonatos, defensas químicas que pueden influir sobre la señalización celular. La deficiencia en α -tocoferol conlleva una reprogramación transcripcional de numerosos factores de transcripción relacionados con el crecimiento y las defensas químicas de las plantas.

-El *priming* provoca aumentos significativos en la síntesis de α -tocoferol junto con un incremento de su crecimiento, indicativo del efecto de memoria ante el estrés reiterado. Además, el *priming* produce cambios en los niveles de transcripción de 45 factores de transcripción fuertemente asociados con el crecimiento y la respuesta al estrés en las plantas.

- La ortiga muestra un marcado dimorfismo sexual secundario en términos de fotoinhibición, estrés oxidativo y fotoprotección, siendo las hembras más sensibles a la falta de fósforo que los machos, aunque esto sólo es evidente ante un estrés muy severo.

-La menor disponibilidad de fósforo en el medio incrementa la proporción de hembras, lo que sugiere un mecanismo de supervivencia a nivel poblacional al favorecer al género más vulnerable frente al estrés. Además, los contenidos de ácido 12 *oxo*-fitodienoico aumentan más en hembras que en machos, sugiriendo un papel defensivo específico de este compuesto.

-En general, los individuos con menor activación de mecanismos de fotoprotección (mutantes *vte* y ortigas hembra) presentan un incremento de la síntesis de los jasmonatos ante la menor disponibilidad de fósforo, sugiriendo un compromiso entre la activación de mecanismos de defensa fotoprotectora (relacionados con la respuesta a estreses abióticos) con la síntesis de defensas químicas relacionadas con estreses bióticos.

REFERENCIAS



- Abbasi, A., Hajirezaei, M., Hofius, D., Sonnewald, U., Voll, L.M. (2007) Specific roles of α - and γ -tocopherol in abiotic stress responses of transgenic tobacco. *Plant Physiology*. 143: 1720-1738
- Abbasi, A., Saur, A., Hennig, P., Tschiersch, H., Hajirezaei, M., Hofius, D., Sonnewald, V., Voll, L.M. (2009) Tocopherol deficiency in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants leads to accelerated senescence. *Plant Cell Environmental*. 32: 144-157
- Abdala, G., Miersch, O., Kramell, R., Vigliocco, A., Agostini, E., Forchetti, G., Alemano, S. (2003) Jasmonate and octadecanoid occurrence in tomato hairy roots. Endogenous level changes in response to NaCl. *Plant Growth Regulation*. 40: 21-27
- Abreu, M.E., Munné-Bosch, S. (2009) Salicylic acid deficiency in NahG transgenic lines and sid2 mutants increases seed yield in the annual plant *Arabidopsis thaliana*. *Journal Experimental Botany*. 60: 1261-1271
- Aerts, R., Chapin, F. S. (1999) The mineral nutrition of wild plants revisited: a re-evaluation of processes and patterns. *Advances in ecological research*. 30: 1-67
- Allen, M. D., Kropat, J., Tottey, S., Del Campo, J. A., & Merchant, S. S. (2007) Manganese deficiency in *Chlamydomonas* results in loss of photosystem II and MnSOD function, sensitivity to peroxides, and secondary phosphorus and iron deficiency. *Plant physiology*. 143: 263-277
- Anderson, J.M. (1986) Photoregulation of the composition, function and structure of thylakoid membranes. *Annual Review Plant Physiology*. 37: 93-136
- Apel, K., Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review Plant Biology*. 55: 373-399
- Asada, K. (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*. 141: 391–396.
- Asensi-Fabado, M. A., Ammon, A., Sonnewald, U., Munné-Bosch, S., Voll, L. M. (2014) Tocopherol deficiency reduces sucrose export from salt-stressed potato leaves independently of oxidative stress and symplastic obstruction by callose. *Journal of Experimental Botany*. 66: 957-971
- Avanci, N.C., Luche, D.D., Goldman, G.H., Goldman, M.H.S. (2010) Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. *Genetic and Molecular Research*. 9: 484-505
- Balzer, I., Hardeland, R. (1996) Melatonin in Algae and Higher Plants-Possible New Roles as a Phytohormone and Antioxidant. *Plant Biology*. 109: 180-183
- Bari, R., Pant, B.D., Stitt, M., and Scheible, W.R. (2006) PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiology*. 141: 988-999
- Barrett, S.C.H., Hough, J. (2013) Sexual dimorphism in flowering plants. *Journal of Experimental Botany*. 64: 67-82
- Bartoli, C.G., Casalongue, C.A., Simontacchi, M., Márquez-García, B., Foyer, C.H. (2013) Interactions between hormone and redox signaling pathways in the control of growth and cross tolerance to stress. *Environmental and Experimental Botany*. 94: 73-88

- Bates, T. R., Lynch, J. P. (2001) Root hairs confer a competitive advantage under low phosphorus availability. *Plant and Soil*. 236: 243-250
- Battle, R.W., Laidman, D.L., Gaunt, J.K. (1977) The relationship between floral induction and γ -tocopherol concentrations in leaves of *Xanthium strumarium* L. *Biochemical Society Transactions*. 5: 322-324
- Bennett, E.M., Carpenter, S.R., Caraco, N.F. (2001) Human impact on erodable phosphorus and eutrophication: a global perspective. *Bioscience*. 51: 227–234
- Bergmüller, E., Porfirova, S., Dörmann, P. (2003) Characterization of an *Arabidopsis* mutant deficient in γ -tocopherol methyltransferase. *Plant Molecular Biology*. 52: 1181-1190
- Boller, T., Hener, R. C., Kende, H. (1979) Assay for and enzymatic formation of an ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, *Planta*. 145: 293-303
- Bond, B. J. (2000) Age-related changes in photosynthesis of woody plants. *Trends in plant science*. 5: 349-353
- Borsani, O., Valpuesta, V., Botella, M.A. (2001) Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology*. 126: 1024-1030
- Bou, R., Codony, R., Tres, A., Decker, E. A., Guardiola, F. (2008) Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation–xylenol orange method: A review of the factors that influence the method’s performance. *Analytical biochemistry*. 377: 1-15
- Bousquet, J. F. y Thimann, K. V. (1984) Lipid peroxidation forms ethylene from 1-aminocyclopropano-1-carboxylic acid and may operate in leaf senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 81: 1724-1727
- Bruce, T.J.A., Matthes, M.C., Napier, J.A., Pickett, J.A. (2007) Stressful “memories” of plants : Evidence and possible mechanisms. *Plant Science*. 173: 603-608
- Bussotti, F., Ferrini, F., Pollastrini, M., Fini, A. (2014) The challenge of Mediterranean sclerophyllous vegetation under climate change: From acclimation to adaptation. *Environmental and Experimental Botany*. 103: 80-98
- Caldana, C., Scheible, W. R., Mueller-Roeber, B., Ruzicic, S. (2007) A quantitative RT-PCR platform for high-throughput expression profiling of 2500 rice transcription factors. *Plant Methods*. 3: 7
- Cavagnaro, T.R., Smith, S.E., Dickson, S. (2001) Backseat driving? Accessing phosphate beyond the rhizosphere-depletion zone. *Trends in Plant Science*. 6: 194-195
- Cela, J., Chang, C., Munné-Bosch, S. (2011) Accumulation of γ -rather than α -tocopherol alters ethylene signaling gene expression in the *vte4* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and cell physiology*. 52: 1389-1400
- Cheng, Z., Sattler, S., Maeda, H., Sakuragi, Y., Bryant, D. A., DellaPenna, D. (2003) Highly divergent methyltransferases catalyze a conserved reaction in tocopherol and plastoquinone synthesis in cyanobacteria and photosynthetic eukaryotes. *The Plant Cell*. 15: 2343-2356

- Chow, C. K. (1991) Vitamin E and oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 11: 215-232
- Ciereszkoa, I., and Kleczkowsk, L.A. (2002) Effects of phosphate deficiency and sugars on expression of rab18 in *Arabidopsis*: hexokinase-dependent and okadaic acid-sensitive transduction of the sugar signal. *Biochimica Biophysica Acta*. 1579: 43-49
- Collakova, E., DellaPenna, D. (2001) Isolation and functional analysis of homogentisate phytyltransferase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 127: 1113-1124
- Cooney, R. V., Franke, A. A., Harwood, P. J., Hatch-Pigott, V., Custer, L. J., Mordan, L. J. (1993) Gamma-tocopherol detoxification of nitrogen dioxide: superiority to alpha-tocopherol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 90: 1771-1775
- Creelman, R.A., Mullet, J.E. (1997) Biosynthesis and actions of jasmonates in plants. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 48: 355-381
- Dai, A. (2012) Increasing drought under global warming in observations and models. *Nature Climate Change*. 3: 52-58
- Dai, X., Wang, W., and Zhang, W.H. (2016) OsWRKY74, a WRKY transcription factor, modulates tolerance to phosphate starvation in rice. *Journal Experimental Botany*. 67: 947-960
- Dall'Osto, L., Cazzaniga, S., North, H., Marion-Poll, A., & Bassi, R. (2007) The *Arabidopsis* aba4-1 mutant reveals a specific function for neoxanthin in protection against photooxidative stress. *The Plant Cell*. 19: 1048-1064
- Danon, A., Miersch, O., Felix, G., Den Camp, R.G.L.O., Apel, K. (2005) Concurrent activation of cell death-regulating signaling pathways by singlet oxygen in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 41: 68-80
- Davies, W. J., Zhang, J. (1991) Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual review of plant biology*. 42: 55-76
- De las Rivas, J. (2000) La luz y el aparato fotosintético. En *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Mc Graw Hill (Madrid)
- DellaPenna, D. (2005) A decade of progress in understanding vitamin E synthesis in plants. *Journal Plant Physiology*. 162: 729-737
- Demmig-Adams, B., Adams, W.W. (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., Cohu, C. M., Amiard, V., Zadelhoff, G., Veldink, G. A., Muller, O., & Adams, W. W. (2013) Emerging trade-offs—impact of photoprotectants (PsbS, xanthophylls, and vitamin E) on oxylipins as regulators of development and defense. *New Phytologist*. 197: 720-729

- Demmig-Adams, B., Stewart, J. J., Adams, W. W. (2014) Multiple feedbacks between chloroplast and whole plant in the context of plant adaptation and acclimation to the environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 369: 201-244
- Desel, C., Krupinska, K. (2005) The impact of tocochromanols on early seedling development and NO release. *Journal of plant physiology*. 162: 771-776
- Desikan, R., Neill, S.J., Hancock, J.T. (2000) Hydrogen peroxide-induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Free Radical Biology and Medicine*. 28: 773-778
- Devaiah, B.N., Karthikeyan, A.S., Raghothama, K.G. (2007a) WRKY75 transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 143: 1789-1801
- Devaiah, B.N., Nagarajna, V.K., Raghothama, K.G. (2007b) Phosphate homeostasis and root development in *Arabidopsis* are synchronized by the zinc finger transcription factor ZAT6. *Plant Physiology*. 145: 147-159
- Devaiah, B.N., Madhuvanathi, R., Karthikeyan, A.S., Raghothama, K.G. (2009) Phosphate starvation responses and gibberellic acid biosynthesis are regulated by the MYB62 transcription factor in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*. 2: 43-58
- Dhar, S. S., Alam, H., Li, N., Wagner, K. W., Chung, J., Ahn, Y. W., Lee, M. G. (2014) Transcriptional repression of histone deacetylase 3 by the histone demethylase KDM2A is coupled to tumorigenicity of lung cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*. 289: 7483-7496
- Domínguez, M.T., Aponte, C., Pérez-Ramos, I.M., García, L.V., Villar, R., Marañón, T. (2012) Relationships between leaf morphological traits, nutrient concentrations and isotopic signatures for Mediterranean woody plant species and communities. *Plant and Soil*. 357: 407-424
- Ellouzi, H., Hamed, K. B., Cela, J., Müller, M., Abdelly, C., Munné-Bosch, S. (2013) Increased sensitivity to salt stress in tocopherol-deficient *Arabidopsis* mutants growing in a hydroponic system. *Plant signaling and behavior*. 8: e23136
- Fahrenholz, S.R., Doleiden, F.H., Trozzolo, A.M., Lamola, A.A. (1974) Quenching of singlet oxygen by α -tocopherol. *Photochemical Photobiology*. 20: 505-509
- Falk, J., Munné-Bosch, S. (2010) Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. *Journal Experimental Botany*. 61: 1549-1566
- Farquhar, G. D., O'Leary, M. H., Berry, J. A. (1982) On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Functional Plant Biology*. 9: 121-137
- Fertiberia. (2005) Normas para la fertilización en la producción integrada. (en línea) España Disponible en: <http://www.fertiberia.es/>
- Foyer, C.H. y Halliwell, B. (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*. 133: 21-25

- Foyer, C.H y Noctor, G. (2005) Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environmental*. 28: 1056-1071
- Foyer, C.H. y Noctor, G. (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidant and Redox Signaling*. 11: 861-905
- Foyer, C.H. y Noctor, G. (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology*. 155: 2-18
- Franco-Zorrilla, J. M., Martín, A. C., Solano, R., Rubio, V., Leyva, A., Paz-Ares, J. (2002) Mutations at CRE1 impair cytokinin-induced repression of phosphate starvation responses in Arabidopsis. *Plant Journal*. 32: 353-360
- Franco-Zorrilla, J.M., González, A., Bustos, R., Linhares, F., Leyva, A., and Paz-Ares, J. (2004) The transcriptional control of plant responses to phosphate limitation. *Journal Experimental Botany*. 55: 285-293
- Franco-Zorrilla, J.M., Martín, A.C., Leyva, A., and Paz-Ares, J. (2005) Interaction between phosphate-starvation, sugar, and cytokinin signaling in Arabidopsis and the roles of cytokinin receptors CRE1/AHK4 and AHK3. *Plant Physiology*. 138: 847-857
- Freeman, D. C., Klikoff, L. G., Harper, K. T. (1976) Differential resource utilization by the sexes of dioecious plants. *Science*. 193: 597-599
- Fryer, M.J. (1992) The antioxidant effects of thylakoid vitamin E (α -tocopherol). *Plant Cell Environmental*. 15: 381-392
- Furihata, T., Suzuki, M., Sakurai, H. (1992) Kinetic characterization of 2 phosphate-uptake systems with different affinities in suspensioncultured *Cataranthus roseus* protoplasts. *Plant and Cell Physiology*: 33: 1151-1157
- Gala, R., Mita, G., Caretto, S. (2005) Improving alpha-tocopherol production in plant cell cultures. *Journal of Plant Physiology*. 162: 782-784
- Gamaley, I.A., Klyubin, I.V. (1999) Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions. *International Review Cytology*. 188: 203-255
- Gaspar, T.H., Kevers, C., Faivre-Rampanti, O., Crèvecoeur, M., Penel, C.L., Greppin, H., Doomes, J. (2003) Changing concepts in plant hormone action. *In Vitro Cell Development Biology*. 39: 85-106
- Gidda, S.K., Miersch, O., Levitin, A., Schmidt, J., Wasternack, C., Varin, L. (2003) Biochemical and molecular characterization of a hydroxyjasmonate sulfotransferase from Arabidopsis thaliana. *Journal of Biological Chemistry*. 278: 17895-17900
- Gill, S. S., Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*. 48: 909-930
- Guo, J., Wu, J., Ji, Q., Wang, C., Luo, L., Yuan, Y., Wang, J. (2008). Genome-wide analysis of heat shock transcription factor families in rice and Arabidopsis. *Journal of genetics and genomics*. 35: 105-118

- Gross, L.J., Soule, J.D. (1981) Differences in biomass allocation to reproductive and vegetative structures of males and females plants of dioecious perennial herb, *Silene alba*. *American Journal of Botany*. 68: 801-807
- Ha, S., Tran, L.S. (2014) Understanding plant responses to phosphorus starvation for improvement of plant tolerance to phosphorus deficiency by biotechnological approaches. *Critical Reviews in Biotechnology*. 34: 16-30
- Hancock, J.F., Bringham, R.S. (1980) Sexual dimorphism in the strawberry *Fragaria chiloensis*. *Evolution*. 34: 762-768
- Harris, M.S., Pannell, J.R. (2008) Roots, shoots and reproduction: sexual dimorphism in size and costs of reproductive allocation in an annual herb. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 275: 2595-2602
- 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
- Heitz, T., Bergey, D.R., Ryan, C.A. (1997) A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiology*. 114: 1085-1093
- Hernández, I., Munné-Bosch, S. (2015) Linking phosphorus availability with photo-oxidative stress in plants. *Journal of experimental botany*. 66: 2889-2900
- Herrmann, K. M., Weaver, L. M. (1999) The shikimate pathway. *Annual review of plant biology*. 50: 473-503
- Hinsinger, P. (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and soil*. 237: 173-195
- Hinsinger, P., Plassard, C., Tang, C., Jaillard, B. (2003) Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. *Plant and soil*. 248: 43-59
- Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F., Prange, R. K. (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*. 207: 604-611
- Hofius, D., Hajirezaei, M. R., Geiger, M., Tschiersch, H., Melzer, M., Sonnewald, U. (2004) RNAi-mediated tocopherol deficiency impairs photoassimilate export in transgenic potato plants. *Plant Physiology*. 135: 1256-1268
- 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
- Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I., Okada, K. (2001) The defective in anther dehiscence1 gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 13: 2191-2209

- Jahns, P., Holzwarth, A. R. (2012) The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1817: 182-193
- Jiang, C., Gao, X., Liao, L., Harberd, N.P., Fu, X. (2007) Phosphate starvation root architecture and anthocyanin accumulation responses are modulated by the gibberellin–DELLA signaling pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 145: 1460-1467
- Jönsson, K.I. (2000) Life history consequences of fixed costs of reproduction. *Ecoscience*. 7: 423-427
- Juvany, M., Munné-Bosch, S. (2015) Sex-related differences in stress tolerance in dioecious plants: a critical appraisal in a physiological context. *Journal of experimental botany*. 66: 6083-6092
- Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L. (1996) The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*. 31: 671-701
- 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 Physiology*. 137: 13-723
- Kaul, S., Koo, H. L., Jenkins, J., Rizzo, M., Rooney, T., Tallon, L. J., Feldblyum, T., Nierman, W., Benito, M. I., Lin, X., Town, C., Venter, J. C., Fraser, C. M., Tabata, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Kotani, H., (y otros 136 autores) y Town, C. D. (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 408: 796-815.
- Khan, G. A., Vogiatzaki, E., Glauser, G., Poirier, Y. (2016) Phosphate deficiency induces the jasmonate pathway and enhances resistance to insect herbivory. *Plant physiology*. 00278
- Koch, M., Lemke, R., Heise, K.P., Mock, H.P. (2003) Characterization of gamma-tocopherol methyltransferases from *Capsicum annuum* L and *Arabidopsis thaliana*. *European Journal Biochemical*. 270: 84-92
- Korpelainen, H. (1992) Patterns of resource allocation in male and female plants of *Rumex acetosa* and *R. acetosella*. *Oecologia*. 89: 133-139
- Koshita, Y., Takahara, T., Ogata, T., Goto, A. (1999) Involvement of endogenous plant hormones (IAA, ABA, GAs) in leaves and flower bud formation of satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Scientia Horticulturae*. 79: 185-194
- Koussevitzky, S., Nott, A., Mockler, T. C., Hong, F., Sachetto-Martins, G., Surpin, M., (y otros autores) Chory, J. (2007) Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science*. 316: 715-719
- Kramell, R., Miersch, O., Atzorn, R., Parthier, B., Wasternack, C. (2000) Octadecanoid-derived alteration of gene expression and the “oxylipin signature” in stressed barley leaves, implications for different signaling pathways. *Plant Physiology*. 123: 177-188

- Kramell, R., Schmidt, J., Herrmann, G., Schliemann, W. (2005) N-(Jasmonoyl)tyrosine-derived compounds from flowers of broad beans (*Vicia faba*). *Journal of Natural Products* 68: 1345-1349
- Kruk, J., Szymańska, R., Cela, J., Munne-Bosch, S. (2014) Plastochromanol-8: fifty years of research. *Phytochemistry*. 108: 9-16
- Landgraf, P., Feussner, I., Hunger, A., Scheel, D., Rosahl, S. (2002) Systemic accumulation of 12-oxo-phytodienoic acid in SAR-induced potato plants. *European Journal of Plant Pathology*. 108: 279-283
- Lau, T. C., Stephenson, A. G. (1994) Effects of soil phosphorus on pollen production, pollen size, pollen phosphorus content, and the ability to sire seeds in *Cucurbita pepo* (*Cucurbitaceae*). *Sexual Plant Reproduction*. 7: 215-220
- Laudert, D., Weiler, E.W. (1998) Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *The Plant Journal*. 15: 675-684
- Leigh, A., Nicotra, A.B. (2003) Sexual dimorphism in reproductive allocation and water use efficiency in *Maireana pyramidata* (*Chenopodiaceae*), a dioecious, semi-arid shrub. *Australian Journal of Botany*. 51: 509-514
- Less, H., Galili, G. (2008) Principal transcriptional programs regulating plant amino acid metabolism in response to abiotic stresses. *Plant Physiology*. 147: 316-330
- Li, Z., Keasling, J.D., Niyogi, K.K. (2012) Overlapping photoprotective function of vitamin E and carotenoids in *Chlamydomonas*. *Plant Physiology*. 158: 313-323
- Lichtenthaler, H. K., Wellburn, A. R. (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents.
- Lichtenthaler, H. K. (1999) The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual review of plant biology*. 50: 47-65
- López-Bucio, J., Hernández-Abreu, E., Sánchez-Calderón, L., Nieto-Jacobo, M. F., Simpson, J., Herrera-Estrella, L. (2002) Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant physiology*. 129: 244-256
- Lynch, J. (1995) Root architecture and plant productivity. *Plant physiology*. 109: 7-13
- Ma, Z., Baskin, T. I., Brown, K. M., Lynch, J. P. (2003) Regulation of root elongation under phosphorus stress involves changes in ethylene responsiveness. *J Exp Bot* 54:1269-1280
- Mahajan, S., Tuteja, N. (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics*. 444: 139-158
- Manning, D. A. C. (2008) Phosphate minerals, environmental pollution and sustainable agriculture. *Elements*. 4: 105-108
- Mariotti, A., Landreau, A., Simon, B. (1988) 15N isotope bio- geochemistry and natural denitrification process in groundwater: Application to the chalk aquifer of northern France. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 52: 1869-1878

- Marschner, H. (2012) Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, London.
- Mayzlish-Gati, E., De-Cuyper, C., Goormachtig, S., Beeckman, T., Vuylsteke, M., Brewer, P. B., Beveridge, C. A., Yermiyahu, U., Kaplan, Y., Enzer, Y. (2012) Strigolactones are involved in root response to low phosphate conditions in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 160: 1329-1341
- McConnell, J. S., Baker, W. H., Miller, D. M., Frizzell, B. S., Varvil, J. J. (1993) Nitrogen fertilization of cotton cultivars of differing maturity. *Agronomy Journal*. 85: 1151-1156
- Mène-Saffrané, L., Jones, A. D., DellaPenna, D. (2010) Plastochromanol-8 and tocopherols are essential lipid-soluble antioxidants during seed desiccation and quiescence in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107: 17815-17820
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*. 7: 405-410
- Mishima, S., Itahashi, S., Kimura, R., Inoue, T. (2003) Trends of phosphate fertilizer demand and phosphate balance in farmland soils in Japan. *Soil Science and Plant Nutrition*. 49: 39-45
- Mooney, B. P., Miernyk, J. A., Randall, D. D. (2002) The complex fate of α -ketoacids. *Annual review of plant biology*. 53: 357-375
- Mopper, S., Whitham, T. G. (1992) The plant stress paradox: effects on pinyon sawfly sex ratios and fecundity. *Ecology*. 73: 515-525
- Morales, M., Garcia, Q. S., Munné-Bosch, S. (2015) Ecophysiological response to seasonal variations in water availability in the arborescent, endemic plant *Vellozia gigantea*. *Tree physiology*. 35: 253-265
- Munné-Bosch, S., Alegre, L. (2002) The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Reviews in Plant Science*. 21: 31-57
- Munné-Bosch S., Peñuelas J. (2003) Photo- and antioxidative protection during summer leaf senescence in *Pistacia lentiscus* L. grown under Mediterranean field conditions. *Annals of Botany*. 92: 385-391.
- Munné-Bosch, S. (2005) The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *Journal of Plant Physiology*. 162: 743-748
- Munné-Bosch, S. (2007) α -Tocopherol: A Multifaceted Molecule in Plants. *Vitamins & Hormones*. 76, 375-392
- Munné-Bosch, S., Weiler, E. W., 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
- Munné-Bosch, S., Falara, V., Pateraki, I., López-Carbonell, M., Cela, J., 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. *Journal Plant Physiology*. 166: 136-145

- Mussig, C., Biesgen, C., Lisso, J., Uwer, U., Weiler, E.W., Altmann, T. (2000) A novel stress-inducible 12-oxophytodi-enoate reductase from *Arabidopsis thaliana* provides a potential link between Brassinosteroid-action and Jasmonic-acid synthesis. *Journal of Plant Physiology*. 157: 143-152
- Niki, E., Tsuchiya, J., Tanimura, R., Kamiya, Y. (1982) Regeneration of vitamin E from α -chromanoxyl radical by glutathione and vitamin C. *Chemical Letter*. 6: 789-792
- Niyogi, K. K. (1999) Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*. 50: 333-359
- Niu, Y.F., Chai, R.S., Jin, G.L., Wang, H., Tang, C.X., Zhang, Y.S. (2013) Responses of root architecture development to low phosphorus availability: a review. *Annals of Botany*. 112: 391-408
- Noctor, G., Foyer, C. H. (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*. 49: 249-279
- Norris, S. R., Shen, X., DellaPenna, D. (1998) Complementation of the *Arabidopsis pds1* mutation with the gene encoding p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Plant Physiology*. 117: 1317-1323
- Obeso, J. R. (2002) The cost of reproduction in plants. *New Phytologist*. 155: 321-348
- Packer, J.E., Slater, T.F., Willison, R.L. (1979) Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature*. 278: 737-738
- Pfannschmidt, T. (2003) Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends Plant Science*. 8: 1360-1385
- Pfannschmidt, T., Munné-Bosch, S. (2013) Plastid signaling during the plant life cycle. In *Plastid development in leaves during growth and senescence*. Springer Netherlands. 503-528
- Plaxton, W. C., Carswell, M. C. (1999) Metabolic aspects of the phosphate starvation response in plants. *Plant responses to environmental stresses: from phytohormones to genome reorganization*. Marcel Dekker, New York. 349-372
- Poirier, Y., Bucher, M. (2002) Phosphate transport and homeostasis in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book*.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99: 12495-12500
- Radwanski, E. R., Last, R. L. (1995) Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics. *The Plant Cell*. 7: 921
- Raghothama, K. G., Karthikeyan, A. S. (2005) Phosphate acquisition. *Plant and Soil*. 274: 37-49
- Rao, S. S. R., Vardhini, B. V., Sujatha, E., Anuradha, S. (2002) Brassinosteroids—a new class of phytohormones. *Current Science*. 1239-1245

- Riaño-Pachón, D. M., Ruzicic, S., Dreyer, I., Mueller-Roeber, B. (2007) PlnTFDB: an integrative plant transcription factor database. *BMC bioinformatics*. 8: 42
- Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C. Z., Keddie, J., Creelman, R. (2000) *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*. 290: 2105-2110
- Robson, A. D., Pitman, M. G. (1983) Interactions between nutrients in higher plants. In *Inorganic plant nutrition*. Springer Berlin Heidelberg. 147-180
- Rohmer M (2003) Mevalonate-independent methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. *Pure and Applied Chemistry*. 75: 375-387
- Rouached, H., Arpat, A.B., Poirier, Y. (2010) Regulation of phosphate starvation responses in plants: Signaling players and cross-talks. *Molecular Plant*. 3: 288-299
- Rubio, V., Linhares, F., Solano, R., Martín, A.C., Iglesias, J., Leyva, A., Paz-Ares, J. (2001) A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Development*. 15: 2122-2133
- Russin, W. A., Evert, R. F., Vanderveer, P. J., Shankey, T. D., Briggs, S. P. (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
- Ryter, S. W., Tyrrell, R.M. (1998) Singlet molecular oxygen ($^1\text{O}_2$): A possible effector of eukaryotic gene expression. *Free Radical Biology Medical*. 24: 1520-1534
- Sadre, R., Gruber, J., Frentzen, M. (2006) Characterization of homogentisate prenyltransferase involved in plastoquinone-9 and tocochromanol biosynthesis. *FEBS Letters*. 580: 5357-5362
- Sakano, K. (1990) Proton/phosphate stoichiometry in uptake of inorganic phosphate by cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.). *Plant Physiology*. 93: 479-483
- 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, S. E., Cahoon, E. B., Coughlan, S. J., DellaPenna, D. (2003) Characterization of tocopherol cyclases from higher plants and cyanobacteria. Evolutionary implications for tocopherol synthesis and function. *Plant Physiology*. 132: 2184-2195
- Sattler, S. E., Gilliland, L. U., 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, S.E., Mène-Saffrané, L., Farmer, E.E., Krischke, M., Mueller, M.J., DellaPenna, D. (2006) Nonenzymatic lipid peroxidation reprograms gene expression and activates defense markers in *Arabidopsis* tocopherol-deficient mutants. *Plant Cell*. 18: 3706-3720
- Schachtman, D. P., Reid, R. J., Ayling, S. M. (1998) Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiology*. 116: 447-453

- Schaller, F. (2001) Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules. *Journal of experimental botany*. 52: 11-23
- Schaller, F., Schaller, A., Stintzi, A. (2005) Biosynthesis and metabolism of jasmonates. *Journal of Plant Growth Regulation*. 23: 179-199
- Schindler, D. W. (1977) Evolution of phosphorus limitation in lakes. *Science*. 195: 260-262
- Seo, H. S., Song, J.T., Cheong, J. J., Lee, Y. H., Lee, Y. W., Hwang, I., Lee, J. S., Choi, Y. D. (2001) Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 98: 4788-4793
- Seto, Y., Kameoka, H., Yamaguchi, S., & Kyojuka, J. (2012) Recent advances in strigolactone research: chemical and biological aspects. *Plant and Cell Physiology*. 53: 1843-1853
- Shintani, D., DellaPenna, D. (1998) Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. *Science*. 282: 2098-2100
- Soll, J., Schultz, G. (1979) Comparison of geranylgeranyl and phytyl substituted methylquinols in the tocopherol synthesis of spinach chloroplasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 91: 715-720
- Soll, J., Schultz, G., Joyard, J., Douce, R., Block, M. A. (1985) Localization and synthesis of prenylquinones in isolated outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 238: 290-29
- Staswick, P. E., Tiryaki, I. (2004) The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 16: 2117-2127
- Stelmach, B. A., Muller, A., Hennig, P., Laudert, D., Andert, L., Weiler, E. W. (1998) Quantitation of the octadecanoid 12-oxo-phytodienoic acid, a signaling compound in plant mechanotransduction. *Phytochemistry*. 47: 539-546
- Stelmach, B. A., Muller, A., Hennig, P., Gebhardt, S., Schubert-Zsilavec, M., Weiler, E. W. (2001) A novel class of oxylipins, sn1-O-(12-oxophytodienoyl)-sn2-O-(hexadecatrienoyl)-monogalactosyldiglyceride, from *Arabidopsis thaliana*. *Journal Biological Chemistry*. 276: 12832-12838
- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J., Farmer, E. E. (2001) Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 98: 12837-12842.
- Sugiura, M. (1992) The chloroplast genome. *Plant Molecular Biology*. 19: 149-168
- Sun, Q., Zybaylov, B., Majeran, W., Friso, G., Olinares, P.D.B. (2009) PPDB, the plant proteomics database at Cornell. *Nucleic Acids Research*. 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. *Journal Nutritional Biochemistry*. 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

- Taki, N., Sasaki-Sekimoto, Y., Obayashi, T., Kikuta, A., Kobayashi, K., Ainai, T., Yagi, K., Sakurai, N., Suzuki, H., Masuda, T. (2005) 12-oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 139: 1268-1283
- Tardieu, F., Davies, W. J. (1992) Stomatal response to abscisic acid is a function of current plant water status. *Plant physiology*. 98: 540-545
- Thorner, J. P., Morishige, D. T., Anandan, S., Peter, G. F. (1991) Chlorophyll-carotenoid proteins of higher plant thylakoids. En (Scheer, ed) *Chlorophylls*. CRC Press, USA.
- Tounekti, T., Vadel, A. M., Oñate, M., Khemira, H., Munné-Bosch, S. (2011) Salt-induced oxidative stress in rosemary plants: damage or protection?. *Environmental Experimental Botany*. 71: 298–305
- Tramontano, W. A., Ganci, D., Pennino, M., Dierenfeld, E. S. (1992) Age dependent α -tocopherol concentrations in leaves of soybean and pinto beans. *Phytochemistry*. 31: 3349-3351
- Trebst, A. (2003) Function of β -carotene and tocopherol in photosystem II. *Z Naturforsch* 58: 609-620
- Trewavas, A. (2003) Aspects of plant intelligence. *Annals of Botany*. 92: 1–20
- Trull, M. C., Gultinan, M. J., Lynch, J. P., Deikman, J. (1997) The responses of wild-type and ABA mutant *Arabidopsis thaliana* plants to phosphorus starvation. *Plant Cell Environmental*. 20: 85-92
- Ullrich-Eberius, C. I., Novacky, A., Fischer, E., Luttge, U. (1981) Relationship between energy-dependent phosphate uptake and the electrical membrane potential in *Lemna gibba* G1. *Plant Physiology*. 67: 797-801
- Ullrich-Eberius, C. I., Novacky, A., Vanbel, A. J. E. (1984) Phosphate uptake in *Lemna gibba* G1: energetics and kinetics. *Planta*. 161: 46-52
- Vick, B. A., Zimmerman, D. C. (1984) Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiology*. 75: 458-461
- Vidi, P. A., Kanwischer, M., Baginsky, S., Austin, J. R., Csucs, G., Dormann, P., Kessler, F., Brehelin, C. (2006) Tocopherol cyclase (VTE1) localization and vitamin E accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles. *Journal Biology Chemistry*. 281: 11225-11234
- Wang, X., Quinn, P. J. (2000) The location and function of vitamin E in membranes. *Molecular Membrane Biology*. 17: 143-156
- Wasternack, C., Hause, B. (2002) Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 72: 165-221
- Wasternack, C. (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany*. 100: 681-697

- Weber, H., Chételat, A., Reymond, P., Farmer, E. E. (2004) Selective and powerful stress gene expression in *Arabidopsis* in response to malondialdehyde. *The Plant Journal*. 37: 877-888
- Webster, J. E. (2015) Phosphorous in Plants. In *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*. 47-49
- Williamson, L. C., Ribrioux, S. P., Fitter, A. H., & Leyser, H. O. (2001) Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant physiology*. 126: 875-882
- Yang, X. J., Finnegan, P. M. (2010) Regulation of phosphate starvation responses in higher plants. *Annuals of Botany*. 105: 513-526
- Yi, K., Wu, Z., Zhou, J., Du, L., Guo, L., Wu, Y., and Wu, P. (2005) OsPTF1, a novel transcription factor involved in tolerance to phosphate starvation in rice. *Plant Physiology*. 138: 2087-2096
- Zhou, J., Jiao, F.C., Wu, Z.C., Li, Y., Wang, X., He, X., Zhong, W., and Wu, P. (2008) OsPHR2 is involved in phosphate-starvation signaling and excessive phosphate accumulation in shoots of plants. *Plant Physiology*. 146: 1673-1686
- Zunzunegui, M., Díaz Barradas, M.C., Clavijo, A., Álvarez Cansino, L., Ain Lhout, F., García Novo, F. (2006) Ecophysiology, growth timing and reproductive effort of three sexual forms of *Corema album* (Empetraceae). *Plant Ecology*. 183: 34-46



