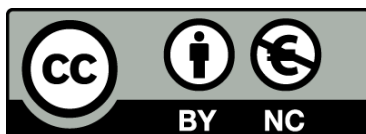




UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

**Vitamina E: ubiqüitat tissular i relació
amb els jasmonats, claus de la interacció entre la
resposta a l'estrès abiòtic i biòtic en plantes**

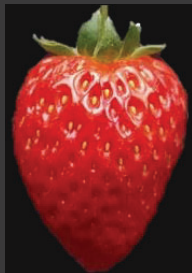
Andrea Casadesús Cabral



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 4.0. España de Creative Commons.**

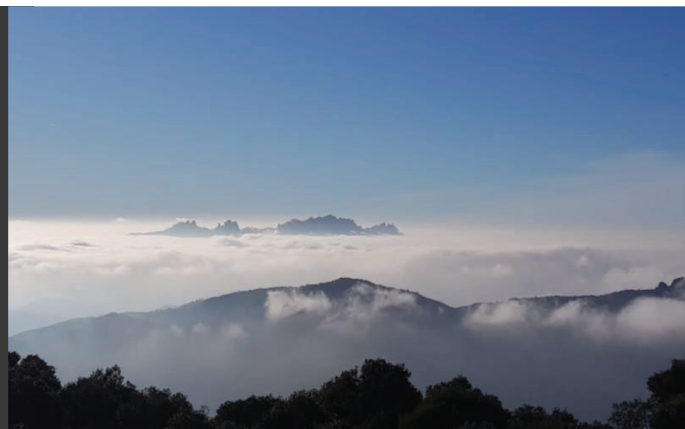
This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0. Spain License.**



ANDREA CASADESÚS CABRAL

Vitamina E: ubiqüitat tissular i relació amb els jasmonats, claus de la interacció entre la resposta a l'estrés abiòtic i biòtic en plantes

TESI DOCTORAL 2022



Vitamina E: ubiqüitat tissular i relació amb els jasmonats, claus de la interacció entre la resposta a l'estrés abiòtic i biòtic en plantes

Andrea Casadesús Cabral





UNIVERSITAT DE
BARCELONA



IRBio
Institut de Recerca de la Biodiversitat

Barcelona, juny de 2022

Vitamina E: ubiqüitat tissular i relació amb els jasmonats, claus de la interacció entre la resposta a l'estrès abiòtic i biòtic en plantes

Memòria presentada per Andrea Casadesús Cabral per optar al grau de
doctora per la Universitat de Barcelona

Programa de doctorat d'Ecologia, Ciències Ambientals i Fisiologia Vegetal de
la Universitat de Barcelona.

El present treball ha estat realitzat al Departament de Biologia Evolutiva,
Ecologia i Ciències Ambientals de la Universitat de Barcelona sota la direcció
del Dr. Sergi Munné Bosch.

Doctoranda:

Director i tutor:

Andrea Casadesús Cabral

Sergi Munné Bosch

Se'n va l'estiu.
Breu i ardorós, ha estat
profundament intens i torbador.
Un somni s'ha esvanit per sempre,
i ara el vent
me n'anuncia un altre.

No detura
mai el seu curs, la vida.
I és el creure
que l'amor allibera, el que em manté
amb els ulls expectants altra vegada.

Final d'estiu, Miquel Martí i Pol

A la meva família.

AGRAÏMENTS

Al meu director de tesi, Sergi Munné, per confiar en mi i donar-me l'oportunitat d'aprendre tantes coses. Per ensenyar-me el camí de la ciència i donar-me eines per anar sempre més enllà dels objectius plantejats. Per ensenyar-me a ser pragmàtica, no només en la ciència, i poder arribar tant lluny com vulgui. Pel seu suport.

Al tot el grup Antiox pel seu suport tant físic com emocional i per ser un grup tant meravellós i excepcional i en especial al grup de PhDs per ensenyar-me el luxe de treballar en un equip de veritat. A la Maren i la Marta per animar-me sempre i ensenyar-me a treballar molt i molt bé, a l'Alba Cotado, la Vero i la Paula per acollir-me al grup i fer-me sentir part d'un grup on la passió per la ciència uneix a les persones en un camí que compartit és molt bonic. A la Paula especialment per ensenyar-me a ser curosa i conseqüent. A la Melanie per ensenyar-me que fer ciència és compatible amb una vida plena d'emocions i aventures. A l'Erola per transmetre'm sempre calma i relativitat. A la Marina per fer-me de mentora i donar-me la confiança per començar a creure en mi, i per ensenyar-me que mai val la pena patir per la feina. A la Camila per fer-me sentir sempre com a casa, entre família, i demostrar-me que la vida amb amor és molt agradable, inclús els moments més estressants. A la Celia per transmetre'm sempre tanta alegria i suport, i ensenyar-me que la millor estratègia és aprendre a ser feliç amb les mínimes necessitats. A en David per ajudar-me en moments difícils i fer-me riure tant tantes vegades. A l'Alba Arabia, la Tania, la Laia i la Sabina per ser tant properes i portar amb elles un aire tant fresc que es contagia, i ensenyar-me que la feina forma part de la vida i que les emocions també en formen part i l'enriqueixen. A tots els alumnes, en Ricard, l'Íñigo, la Sandra, l'Estrella, en Vicent i la Rachida, per ajudar-me tant en la meva tesi i per fer que tot fos molt més fàcil i divertit treballant colze amb colze.

A tots els meus amics, que m'han donat sempre tot el seu amor i suport, que tant m'ha ajudat a seguir endavant. En especial als amics de la carrera, sobretot a la Cèlia i la Naiana, que m'han acompanyat sempre en l'aventura de viure envoltats de biologia. Sense tot ells i elles seria una persona buida.

A la meva família. Als meus avis per animar-me sempre a estudiar i a fer un doctorat, i recordar-me sempre que el que fem és magnífic. Als meus tiets i tietes, en especial a la Marisol per transmetre'm la seva passió per la biologia i la docència quan estudiava a l'institut. A les meves cosines que són una xarxa de suport increïble que em dona tanta seguretat i tranquil·litat, passi el que passi.

Als meus pares, que tanta energia i esforços han destinat en la meva educació, que ho han donat tot per tal que jo tingués una vida plena i em desenvolupés com a persona. Per transmetre'm uns valors tant bonics sobre la vida i les persones i per estimar-me tant. Per ser l'origen de la meva vida i ajudar-me sempre per sobre de tot. Al meu pare especialment que m'hagi ensenyat que puc aprendre coses de qualsevol

persona i a la meva mare que m'hagi transmès el seu amor per la vida. Al meu germà, per ser una persona tant preciosa i donar-me sempre la mà. Per fer equip i camí amb mi, i ensenyar-me que la vida és per viure-la al màxim o res.

A en Ferran, per estimar-me i cuidar-me sempre tant. Per donar-me la seva amistat i el seu suport incondicional. Per fer-me la vida més fàcil i ajudar-me en els moments complicats. Per ensenyar-me que els petits detalls són les peces que conformen el món on vivim i que per insignificants que semblin poden ser molt bonics. Per ensenyar-me que mai res és blanc o negre i per compartir el camí amb mi. Per ser el meu company de vida.

La vida, igual que la ciència, és una aventura meravellosament apassionant. A cada cantonada hi ha nous reptes esperant-te i el seu camí t'aporta sempre molt més de l'esperat. L'aprenentatge està en el propi camí, en el qual un ésser pensant, tant petit com insignificant dins d'un gran univers, es desenvolupa interaccionant amb altres éssers i elements naturals, tant intensament i tant en primera persona, sense ser conscient que tot conforma una xarxa tant gran i tant sòlida d'interaccions que, quan pren un xic de consciència sobre el seu lloc en l'univers, tant insignificant i significatiu alhora, tant llunyà i tant proper, tant gran i tant petit, tant coherent i tant contradictori, queda meravellat de la bellesa de ser un ésser viu. La natura i la ciència ens ensenyen a viure i la pròpia vida ens ensenya a fer ciència, poder-ho experimentar en primera persona és un plaer.

A tots els lectors d'aquesta tesi, gràcies per dedicar una part del vostre temps a llegir aquestes pàgines. Espero de tot cor que ho gaudiu.

RESUM

Tots els organismes fotosintètics són capaços de sintetitzar vitamina E, la qual s'acumula de forma ubiqua en els teixits vegetals, tant en els fotosintètics com en els no fotosintètics. Mentre que la vitamina E és un important antioxidant cloroplàstic que respon als estressos ambientals, els jasmonats, hormones derivades de la peroxidació lipídica en els cloroplasts, són reguladors essencials de la resposta a l'estrès biòtic. La relació entre aquestes dues famílies moleculars juga un paper important en el control de l'estat redox cloroplàstic sota condicions d'estrès, el qual és determinant en la senyalització retrògrada. A més, aquesta relació és de gran rellevància fisiològica donada la implicació de la vitamina E i dels jasmonats en la resposta a l'estrès abiòtic i biòtic, respectivament. En aquest treball s'estudia, per una banda, la presència i funció de la vitamina E en teixits tant fotosintètics com no fotosintètics en *Fragaria x ananassa* var. Albion sota condicions controlades d'estrès hídric, planta que ens ofereix una singular varietat de teixits no fotosintètics en el fals fruit (receptacle i aquenis), i per altra banda, s'estudia la relació de la vitamina E amb els jasmonats i la seva implicació en la interacció entre la resposta a l'estrès abiòtic i biòtic en un arbust mediterrani (*Cistus albidus* L.) en condicions naturals on coincideixen diversos estressos abiòtics i biòtics. Els resultats posen en rellevància la universalitat de la vitamina E en teixits fotosintètics i no fotosintètics, tant en plantes d'interès agronòmic com en plantes d'interès ecològic. A més, la relació entre la vitamina E i els jasmonats resulta ser bidireccional, essent compatible l'acumulació d'ambdós però amb algunes limitacions. La possible implicació d'aquesta relació en la interacció entre la resposta a l'estrès abiòtic i biòtic es discuteix en relació a l'estudi de *C. albidus* sota condicions naturals de convergència d'estressos. A més, es posa de manifest la relació d'aquesta espècie amb l'herbivorisme i el parasitisme causat per *Cytinus hypocistis*, planta holoparàsita que també acumula vitamina E en els seus teixits no fotosintètics. En conclusió, la vitamina E es troba de forma ubiqua en plantes (tant en les que realitzen fotosíntesi com en plantes holoparàsites), s'acumula tant en teixits fotosintètics com en teixits no fotosintètics, i en conjunt juga un paper fonamental en la resposta de les plantes a l'estrès, tant pel seu paper antioxidant com

per la seva relació amb els jasmonats, la qual cosa pot tenir implicacions ecofisiològiques en la interacció entre la resposta a l'estrès abiòtic i biòtic.

ABSTRACT

All the photosynthetic organisms are capable of synthesising vitamin E, which is accumulated in both photosynthetic and non-photosynthetic tissues. While vitamin E is an important chloroplastic antioxidant that responds to environmental stresses, jasmonates, hormones that derive from lipid peroxidation in chloroplasts, are essential regulators of the response to biotic stress. The relationship between these molecular families plays a key role in the control of the chloroplastic redox state under stress conditions, which is a determinant in retrograde signalling. Furthermore, this relationship is important from a physiological point of view due to the involvement of vitamin E and jasmonates in the abiotic and biotic stress response, respectively. In the present study, the presence and function of vitamin E in both photosynthetic and non-photosynthetic tissues are studied on the one hand in *Fragaria x Ananassa* var. Albion under controlled conditions of drought stress. This plant offers us a singular variety of non-photosynthetic tissues in the false fruit (flesh and achenes). On the other hand, the relationship between vitamin E and jasmonates and its implication in the interaction between the abiotic and biotic stress responses is studied in a Mediterranean shrub (*Cistus albidus* L.) under natural conditions where abiotic and biotic stresses converge. Results highlight the universality of vitamin E in photosynthetic and non-photosynthetic tissues, both in plants of agronomical and ecological interest. Furthermore, the relationship between vitamin E and jasmonates is bidirectional so their accumulation is compatible but with some limitations. The possible implication of this relationship in the abiotic and biotic stress response interaction is discussed in relation to the study of *C. albidus* under natural conditions where stresses converge. In addition, the relationship between this species and herbivory and parasitism caused by *Cytinus hypocistis*, an holoparasitic plant that also accumulates vitamin E in its non-photosynthetic tissues, is highlighted. It is concluded that vitamin E is accumulated widely in plant tissues, both in photosynthetic and non-photosynthetic plants and tissues, and it plays a key role in plant stress response, because of its

antioxidant function but also because of its relationship with jasmonates, which could have ecophysiological implications in the interaction between abiotic and biotic stress response.

ÍNDEX

ABREVIATURES.....	i
INTRODUCCIÓ.....	1
1. La vitamina E.....	1
1.1 Distribució.....	1
1.2 Estructura i síntesi.....	2
1.3 Funció.....	3
1.3.1 Funció antioxidant en teixits fotosintètics.....	3
1.3.2 Sensor d'estrès i senyalització.....	4
1.3.3 Possible funció en teixits no fotosintètics.....	5
2. Jasmonats.....	5
2.1 Estructura i síntesi.....	5
2.2 Senyalització.....	7
2.3 Funció.....	7
3. Relació entre la vitamina E i els jasmonats.....	9
3.1 Relació entre les molècules fotoprotectors i la síntesi d'oxilipines.....	9
3.2 Relació entre la vitamina E i els jasmonats.....	10
3.3 Implicacions ecofisiològiques d'aquesta relació.....	12
4. Estrès abiòtic i biòtic.....	12
4.1 Definició d'estrès.....	12

4.2 Resposta de les plantes a l'estrès.....	13
4.3 Interacció entre estrès abiòtic i biòtic.....	14
5. Models d'estudi.....	16
5.1 Plantes d'interès agronòmic.....	16
5.1.1 <i>Fragaria x ananassa</i> cv. Albion.....	17
5.2 Plantes d'interès ecològic.....	18
5.2.1 <i>Cistus albidus</i> L.....	19
5.2.2 <i>Cytinus hypocistis</i> L.....	20
OBJECTIUS.....	25
INFORME DEL DIRECTOR DE TESI.....	29
RESULTATS.....	35
Capítol 1: Acumulació diferencial de tococromanols en teixits fotosintètics i no fotosintètics de plantes de maduixera sotmeses a estrès hídric reiterat.....	35
Capítol 2: Relació entre els jasmonats i l'acumulació de vitamina E en les plantes: un cas d'estudi en l'arbust mediterrani <i>Cistus albidus</i> L.....	49
Capítol 3: Contrast estacional en la incidència de l'estrès abiòtic i l'herbivorisme en plantes de <i>Cistus albidus</i> L. en el seu hàbitat natural en una muntanya mediterrània.....	69
Capítol 4: Interaccions planta holoparàsita-hoste entre <i>Cytinus hypocistis</i> i <i>Cistus albidus</i> en el seu hàbitat natural mediterrani: una aproximació espai-temporal.....	93
DISCUSSIÓ.....	157
1. La universalitat de la vitamina E en plantes.....	157

2. La relació bidireccional entre la vitamina E i els jasmonats en plantes.....	169
3. Implicacions fisiològiques de la relació entre la vitamina E i els jasmonats en condicions naturals amb combinació d'estressos.....	167
4. Relació entre l'estrès abiòtic i l'herbivorisme en arbustos mediterranis.....	173
5. Interaccions planta holoparàsita-hoste en ecosistemes mediterranis.....	179
6. Establiment del parasitisme: efectes locals.....	182
7. Tolerància al parasitisme: efectes sistèmics.....	186
8. Efecte de la combinació d'estressos.....	189
9. Límits del parasitisme a nivell d'ecosistema.....	194
CONCLUSIONS.....	201
BIBLIOGRAFIA.....	205
ANNEX I: Resposta de <i>Cistus albidus</i> a l'herbivorisme en condicions naturals.....	245
ANNEX II: Interaccions planta holoparàsita-hoste i el seu impacte en els ecosistemes mediterranis.....	253

ABREVIATURES

AOC: al·lè òxid ciclasa

AOS: al·lè òxid sintasa

JA: àcid jasmònic

JA-Ile: jasmonoil-isoleucina

MeJA: metil jasmonat

MGGBQ: 2-metil 1-6-geranilgeranil-1,4-benzoquinol

MPBQ: 2-metil 1-6-fetil-1,4-benzoquinol

OPDA: àcid *cis*(+)-12-oxo-fitodienoic

ROS: espècies reactives de l'oxigen

INTRODUCCIÓ



INTRODUCCIÓ

1. La vitamina E

1.1 Distribució

La vitamina E es troba en tots els organismes fotosintètics del regne vegetal. Tot i així, no tots els components d'aquesta família molecular es troben alhora en tots aquests organismes (Falk i Munné-Bosch, 2010). La família de la vitamina E està formada pels tocoferols i els tocotrienols. Mentre que totes les plantes fotosintètiques presenten tocoferols, els tocotrienols són presents només en determinats grups vegetals sense relació filogenètica. A més a més, aquests compostos no es troben sempre als mateixos òrgans ni teixits. Tant els tocoferols com els tocotrienols es presenten en quatre homòlegs en la natura, α , β , γ , i δ . Les fulles, els teixits fotosintètics primordials en les plantes, acumulen principalment tocoferols, sobretot α -tocoferol. El γ -tocoferol es troba en majors concentracions en altres teixits, com fruits i llavors, que no són teixits fotosintèticament actius, igual que el β - i el δ - tocoferol. Els tocotrienols, en canvi, no es troben en cap teixit fotosintètic madur sinó que només s'han trobat en òrgans de reserva, fruits i llavors, en diferents proporcions entre els homòlegs α , β , γ , i δ , segons l'espècie vegetal (Horvath et al., 2006).

A nivell taxonòmic i tissular doncs, la vitamina E com a conjunt es presenta de forma ubiqua. A nivell subcel·lular però, es troba en localitzacions molt concretes relacionades amb la seva biosíntesi i funció. Específicament es troba als plastidis. De plastidis n'hi ha de diversos tipus, tots diferenciats a partir del proplast, el precursor de tots els plastidis (Jarvis i López-Juez, 2013). En aquells teixits que presenten cloroplasts, els tocoferols es troben a les membranes plastidials, als plastoglòbuls, i a les membranes tilacoidals (Lichtenthaler et al., 1981; Grumbach et al., 1983; Soll et al., 1985; Fryer et al., 1992; Vidi et al., 2006). Dins d'aquestes membranes, es troben concretament en la matriu lipídica (Boonnoy et al., 2018). En aquells teixits que presenten altres tipus de plastidis, els tocoferols i tocotrienols es creu que es troben

en amiloplasts, leucoplasts o cromoplasts, segons el teixit en qüestió (Munné-Bosch i Alegre, 2002).

1.2 Estructura i síntesi

La vitamina E és una família de compostos que es troba dins del grup dels tococromanols. Els tococromanols són compostos amfipàtics formats per un anell cromanol amb un grup hidroxil, que és polar, i una cadena lateral hidrocarbonada que és hidrofòbica. Així doncs, són molècules amfipàtiques que es situen en la interfase lípid-aquosa de les membranes, tot mantenint la cadena hidrofòbica ancorada a les membranes lipídiques, mentre que l'anell queda a la superfície (Boonnoy et al., 2018). Segons el grau d'insaturació de la cadena lateral es diferencien el tocoferols dels tocotrienols, presentant els primers una cadena totalment saturada, i els segons tres

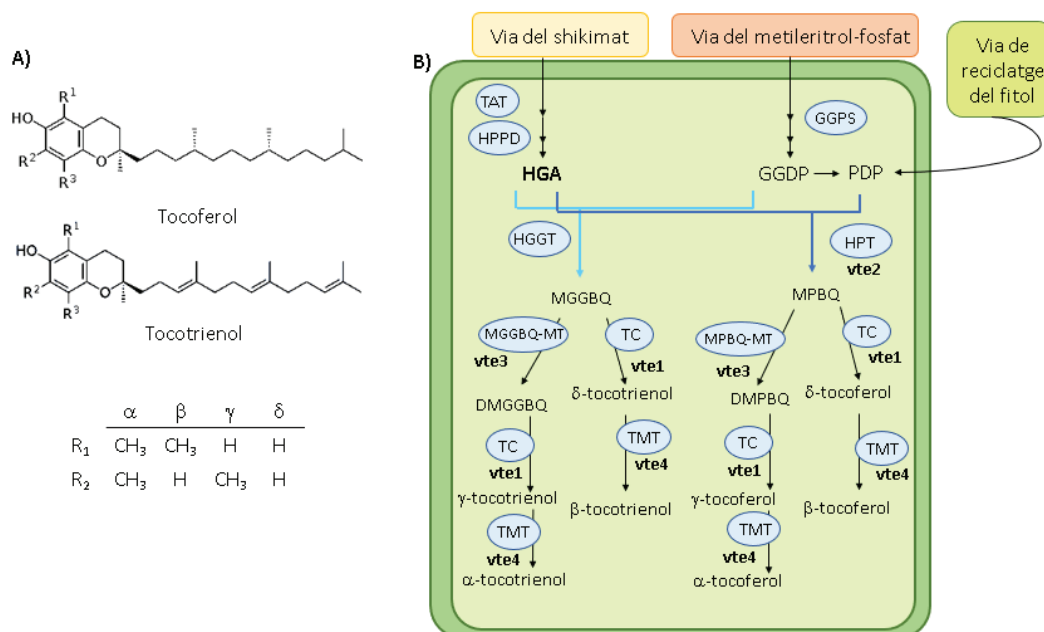


Figura 1. Estructura i síntesi de la vitamina E. A) Estructura química dels tocoferols i tocotrienols. B) Via de síntesi dels tocoferols i tocotrienols. DMGGBQ: 2,3-dimetil 1-6-geranilgeranil-1,4-benzoquinol, DMPBQ: 2,3-dimetil-6-fitol-1,4-benzoquinona, GGDP: geranilgeranil difosfat, GGPS: geranilgeranil difosfat sintasa, HGA: homogentisat, HGGT: homogentisat geranilgeranil transferasa, HPPD: hidroxifenilpiruvat dioxigenasa, HPT: homogentisat fitiltransferasa (vte2), MGGBQ: 2-metil 1-6-geranilgeranil-1,4-benzoquinol, MGGBQ-MT: 2-metil-1-6-geranilgeranil-1,4-benzoquinol metil transferasa (vte3), MPBQ: 2-metil 1-6-fitol-1,4-benzoquinol, MPBQ-MT: 2-metil 1-6-fitol-1,4-benzoquinol metil transferasa (vte3), PDP: fitil difosfat, TC: tocoferol ciclase (vte1), TMT: tocoferol metil transferasa (vte4), TAT: tirosina aminotransferasa.

insaturacions en els carbonis 3', 7', i 11' de la cadena lateral (**Figura 1A**). Els diferent homòlegs trobats a la natura (α , β , γ , i δ - tocoferols i tocotrienols) difereixen en el nombre i la posició de grups metil en el seu anell aromàtic. Aquestes lleugeres variacions estructurals comporten diferències en la seva funció i acumulació (Müller et al., 2010).

Els gens que codifiquen per als enzims de síntesi de vitamina E es troben al genoma nuclear i els enzims es localitzen dins els plastidis. En primer lloc, la homogentisat fitiltransferasa (vte2) condensa l'homogentisat, provinent de la via del shikimat, amb el fitol difosfat per a la síntesi dels tocoferols (**Figura 1B**). D'altra banda, en la biosíntesi de tocotrienols l'homogentisat geranilgeranil transferasa o la homogentisat fitiltransferasa condensa l'homogentisat amb el geranilgeranil difosfat provinent de la via del metileritrol fosfat (Yang et al., 2011; Zeng et al., 2020). En aquest pas es formen el MPBQ per a la síntesi de tocoferols, i el MGGBQ per a la síntesi de tocotrienols. Per a formar els homòlegs γ i α , el MPBQ o el MGGBQ són metilats pels enzims MPBQ- o MGGBQ-metil transferasa (vte3) i llavors es produeix una ciclació catalitzada per la tocoferol ciclasa (vte1) i una metilació catalitzada per la tocoferol metil transferasa (vte4). El mateix procés, però sense l'actuació de vte3, dona lloc als homòlegs δ i β . A més a més, també és important la via de reciclatge del fitol provinent de la degradació de clorofil·la on participen les quinases fitol quinasa i fitil fosfat quinasa (vte5 i vte6), que proveeix de fitol difosfat a la via de síntesi de vitamina E (Valentin et al., 2006; vom Dorp et al., 2015).

1.3 Funció

1.3.1 Funció antioxidant en teixits fotosintètics

La seva especial funció antioxidant en resposta a l'estrès és la que posa en rellevància la importància de la vitamina E en les plantes. La vitamina E és un grup d'antioxidants lipofílics capaços de desactivar física i químicament les espècies reactives de l'oxigen (ROS), principalment el singlet d'oxigen (1O_2) i el radical hidroxil ($OH\cdot$). Forma part de la maquinària de fotoprotecció de les plantes però el que la fa realment especial és la seva exclusiva capacitat de frenar la propagació de la peroxidació lipídica. L' α -tocopherol es considera la forma més activa tot i que, malgrat

la seva reduïda distribució, l' α -tocotrienol resulta ser més eficient en diferents models de membrana (Serbinova et al., 1991; Müller et al., 2010). El model d'actuació més plausible és que, mentre la cua hidrofòbica de la molècula es manté en la fase lipídica de les membranes, el cap polar queda a la superfície, i a partir de ràpids moviments de “flip-flop” en la bicapa lipídica, el cap és capaç de desactivar el $^1\text{O}_2$ o els radicals peroxils lipídics ($\text{LOO}\cdot$) tot cedint un electró en el primer cas, o cedint l'hidrogen del seu grup hidroxil en el segon. Finalment, la forma de vitamina E oxidada, es recicla mitjançant l'ascorbat, el qual es reciclarà gràcies al glutatió (Munné-Bosch i Alegre, 2002; Boonnoy et al., 2018).

1.3.2 Sensor d'estrès i senyalització

La vitamina E participa no només en la resposta sinó també en la senyalització dels estressos ambientals. Existeix un gran nombre d'exemples de la resposta de la vitamina E als estressos i de la seva crucial participació en l'aclimatació de la planta (Hasanuzzaman et al., 2014). Concretament, és especialment útil com a sensor i protector d'estressos ambientals en les plantes que habiten els ecosistemes mediterranis (Fernández-Marín et al., 2017), ja que juga un paper important en la protecció de la sequera i la alta il·luminació, condicions característiques d'aquest clima (Munné-Bosch i Alegre, 2002). A més a més, en alguns casos s'ha associat una funció diferencial per a les diferents formes de vitamina E. De forma general, l' α -tocoferol es manifesta com el més essencial en la protecció contra diversos estressos (Munné-Bosch, 2005), però en alguns casos el γ -tocoferol sembla tenir rols específics i diferencials, com en el cas de la dessecació (Abbasi et al., 2007).

A més, s'ha suggerit recentment la participació de la vitamina E en la senyalització retrògrada, del cloroplast cap al nucli, portant a l'aclimatació sota situacions d'estrès. Com a antioxidant cloroplàstic, a través de la modulació de l'acumulació de ROS i d'oxilipines de senyalització, com per exemple els jasmonats, podria influenciar la informació redox que emergeix del cloroplast cap al nucli (Munné-Bosch i Alegre, 2002; Miret i Munné-Bosch 2015). Addicionalment, s'ha suggerit que la vitamina E podria conduir a l'aclimatació mitjançant la modulació de l'acumulació de 3'-fosfoadenosina 5'-fosfat (un inhibidor d'exoribonucleases implicat en la protecció de

microRNAs que donen lloc a tolerància a la calor) fet que modularia l'expressió gènica en el nucli (Fang et al., 2019; Munné-Bosch, 2019). Tot plegat però, s'ha de mirar des d'un punt de vista integratiu, tenint en compte la coordinació de diversos mecanismes de senyalització retrògrada entre el cloroplast i el nucli.

1.3.3 Possible funció en teixits no fotosintètics

Els teixits que presenten cloroplasts sempre han estat el focus d'atenció en l'estudi de la vitamina E, però aquesta també es troba en teixits vegetals no fotosintètics. En aquests teixits, l'acumulació de vitamina E s'ha demostrat principalment en llavors, però també en molts fruits i en algunes flors, on jugaria un paper important en el procés de desenvolupament d'aquests òrgans, amb una forta relació amb la degradació dels cloroplasts que té lloc durant aquest procés (Gramegna et al., 2018; Muñoz et al., 2018). En les llavors, és essencial per a la longevitat gràcies al seu paper en la prevenció de la peroxidació lipídica dels lípids que aquesta emmagatzema (Sattler et al., 2004; Valentin et al., 2006). També en altres teixits no fotosintètics com el tubercle de la patata (Spychalla i Desborough, 1990), els nòduls i les arrels de lleguminoses (Soba et al., 2020), les arrels de pastanaga (Luby et al., 2014), o en els rizomes de *Cymodocea nodosa* (Munné-Bosch et al., 2022), s'ha demostrat l'acumulació de vitamina E. En la majoria dels casos, responent a estressos abiòtics, la funció de la vitamina E en aquests teixits no fotosintètics seria també la protecció enfront la peroxidació lipídica. Encara que alguns gens de síntesi de vitamina E s'han identificat en alguns dels teixits no fotosintètics esmentats, aquest aspecte sembla estar encara poc clarificat (Muñoz i Munné-Bosch, 2019).

2. Jasmonats

2.1 Estructura i síntesi

Els jasmonats són fitohormones que es troben en totes les plantes. Són oxilipines derivades de la peroxidació lipídica, enzimàtica i no enzimàtica, de les membranes cloroplàstiques. Són doncs, àcids grassos oxigenats. La forma més coneguda és l'àcid jasmònic (JA), però s'han identificat més de 30 formes de jasmonats diferents, ja siguin actives o inactives (Wasternack i Strnad, 2016; Ali i Baek, 2020). El JA és un

àcid oxo-monocarboxílic que pot donar moltes altres formes de jasmonats mitjançant la descarboxilació, la hidroxilació, l'esterificació, o la conjugació amb aminoàcids, que dona com a resultat, entre d'altres, la jasmonoil-isoleucina (JA-Ile), la forma més activa dels jasmonats. La diversitat en la seva estructura comporta implicacions en la seva activitat. De fet, se sap que l'activitat es pot reduir o incrementar gràcies a la metilació o la conjugació, i que el grup *keto* al C6 del seu anell de ciclopentanona és essencial per a la seva activitat (Wasternack, 2007).

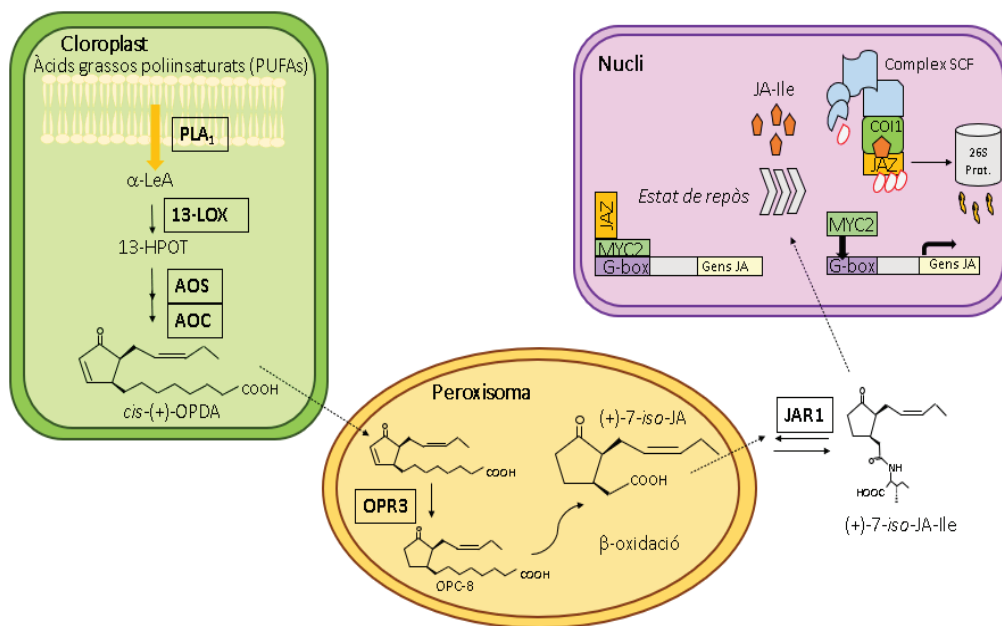


Figura 2. Via de síntesi i de senyalització dels jasmonats. L'OPDA es sintetitza al cloroplast, és transportat al peroxisoma on es transforma en JA el qual és conjugat amb isoleucina al citoplasma per formar JA-Ile. Aquest s'encarrega de la senyalització al nucli. α -LeA: àcid α -linolènic, 13-LOX: lipoxigenasa 13, 13-HPOT: àcid 13-hidroperoxioctadecatrienoic, 26S prot: 26S proteasoma, AOC: al·lè òxid ciclasi, AOS: al·lè òxid sintasi, COI1: proteïna F-box, Complex SCF: complex que consisteix en una quinasa, la proteïna cullin1, una proteïna F-box i un enzim de conjugació d'ubiquïtina, JA: àcid jasmònic, JA-Ile: jasmonoil-isoleucina, JAR1: JA-amino àcid sintasi, JAZ: proteïnes repressores amb domini jasmonat-zim, MYC2: factor de transcripció *bHLHzip* MYC2, OPC-8: àcid 3-oxo-2-(2-pentenil)-ciclopentà-1-octanoic, OPDA: àcid *cis*(+)-12-oxo-fitodienoic, OPR3: OPDA reductasi 3, PLA₁: fosfolipasa A₁.

La síntesi de jasmonats té lloc en tres compartiments cel·lulars diferents. Concretament els jasmonats deriven de l'àcid α -linolènic format a partir dels àcids grassos poliinsaturats de la membrana cloroplàstica per l'acció de la fosfolipasa A₁ (Figura 2). Tot seguit, l'acció de la lipoxigenasa 13 oxigena l'àcid α -linolènic al carboni 13 obtenint així un hidroperòxid lipídic. Aquesta peroxidació lipídica també es pot

donar espontàniament degut a l'acció de les ROS. L'acció de la al·lè òxid sintasa (AOS) forma un òxid al·lè molt inestable que la al·lè òxid ciclasa (AOC) fa servir com a substrat per formar l'àcid *cis*(+)-12-oxo-fitodienoic (OPDA), considerat el precursor dels jasmonats (Brash et al., 1988; Hamberg i Fahlstadius, 1990; Song i Brash, 1991). En aquest punt de la via de síntesi, l'OPDA és transportat del cloroplast cap al peroxisoma, on la OPDA reductasa 3 redueix l'OPDA. A partir d'aquí, comença el procés de β -oxidació on la cadena lateral pentenil i la molècula és escurçada fins a obtenir el JA, més concretament el (+)-7-*iso*-JA (Cruz-Castillo et al., 2004; Koo et al., 2006). Finalment, al citoplasma, mitjançant la JA-amino sintetasa, el JA es conjuga amb diferents aminoàcids per formar, per exemple, la (+)-7-*iso*-JA-Ile (Westfall et al., 2012, **Figura 2**).

2.2 Senyalització

Les formes de jasmonats amb més clara implicació en la via de senyalització dels jasmonats són l'OPDA, el JA, la JA-Ile, i el metil jasmonat (MeJA). En les plantes trobem principalment dues vies diferents de senyalització del cloroplast cap al nucli per part dels jasmonats. Per una banda, la clàssica via del JA/MeJA/JA-Ile (**Figura 2**), molt ben caracteritzada a dia d'avui. Es basa en el model de JA-Ile com a únic lligand específic del complex co-receptor SCF^{COI1} mentre que el JA o el MeJA actuen com a transmissors de la senyal a nivell sistèmic (Xu et al., 2002; Thines et al., 2007). Aquest complex interactua i ubiquitinitza les proteïnes repressores JAZ, que seran eliminades al proteosoma, alliberant així els factors de transcripció, com el MYC2, que activen l'expressió gènica de resposta als jasmonats. D'altra banda, l'OPDA ha demostrat exercir una senyalització independent del COI1 (Taki et al., 2005). La caracterització d'aquesta via de senyalització però, resta fragmentada i poc clarificada. Es creu que pot estar més relacionada amb la senyalització redox per part de les oxilipines pròpiament, que forma part de la senyalització per part les espècies electròfiles reactives (Alméras et al., 2003; Heitz, 2016). Fins i tot s'ha suggerit que l'OPDA-Ile podria jugar un paper en aquesta via alternativa de senyalització dels jasmonats (Wasternack i Hause, 2016).

2.3 Funció

Els jasmonats regulen un gran nombre de processos fisiològics en les plantes. En coordinació amb la resta de fitohormones, participen en multitud d'aspectes de la història de vida de les plantes. El seu rol principal s'atribueix a la resposta a l'estrès biòtic però el seu paper en la resposta a l'estrès abiòtic o en processos del desenvolupament és també de gran rellevància (Wasternack, 2007). Des de la germinació de llavors fins al desenvolupament d'òrgans reproductius, el JA, en coordinació amb les altres fitohormones, duen a terme una cadena de senyalització que donarà lloc a canvis en l'expressió gènica per tal que cada òrgan de la planta funcioni en harmonia amb el moment de desenvolupament i la situació vital on es troba. A la dècada dels 80, els primers processos on es va descriure la implicació dels jasmonats van ser la inhibició del creixement de l'arrel o la promoció de la senescència foliar (Ueda i Kato, 1980; Dathe et al., 1981), però des d'aleshores molts altres processos com per exemple la formació d'arrels laterals i adventícies, la formació de tricomes, el moviment de les fulles, o el gravitropisme s'han anat afegint a la llista (Wasternack i Hause, 2013).

Els jasmonats també participen en la xarxa de coordinació per a donar resposta als estressos abiòtics. La interacció amb les altres fitohormones és essencial en aquest aspecte (Per et al., 2018). La implicació dels jasmonats en la resposta a estressos abiòtics s'ha demostrat en un gran nombre d'ocasions. De forma general en plantes model, s'ha demostrat que exerceixen un paper protector davant de condicions de sequera i de salinitat (Savchenko et al., 2014; Zhao et al., 2014), d'estrès per fred i calor (Sharma i Laxi, 2016), d'estrès per ions metàl·lics (Chen et al., 2021), o d'estrès per rajos UV-B i per ozó (Sasaki-Sekimoto et al., 2005). El mecanisme d'acció dels jasmonats en la resposta a estressos abiòtics sembla estar estretament lligat amb la inducció de síntesi d'antioxidants enzimàtics (Cao et al., 2009; Fedina et al., 2009; Piotrowska et al., 2009; Brossa et al., 2011; Qiu et al., 2014). Normalment el paper protector davant situacions d'estrès abiòtic s'atribueix a la via clàssica del JA, però en el cas de la sequera o el xoc tèrmic s'ha demostrat també una paper diferencial de l'OPDA en la interacció amb l'àcid abscísic per a la

regulació de l'obertura estomàtica. Tot i així, resten molts aspectes per clarificar en aquest cas sobre el mecanisme d'acció (Savchenko i Dehesh 2014; Liu i Park, 2021)

Els jasmonats, juntament amb els salicilats, són els principals actors en la defensa sistèmica de les plantes contra l'estrès biòtic. Els patògens necrotròfics, els insectes, els herbívors, o els microorganismes desencadenen la resistència sistèmica induïda controlada per la via de senyalització dels jasmonats, que desemboca en l'activació de diferents mecanismes de defensa com són la síntesi de substàncies tòxiques o de cal·losa, el *priming*, o la comunicació amb plantes veïnes (Choudhary et al., 2007; Pieterse et al., 2014). La resposta dels jasmonats a l'estrès biòtic ha estat molt estudiada al llarg de la història i s'ha aconseguit elucidar el mecanisme d'acció força acuradament, posant de manifest el paper fonamental de la JA-Ile per a l'execució de la resposta (Koo et al., 2009). A més, la translocació de jasmonats pels vasos conductors, concretament d'OPDA, o la seva síntesi al llarg d'aquests, suggereix que la senyal sistèmica que activa la resposta és una molècula de la família dels jasmonats (Hause et al., 2003; Schulze et al., 2019; Wang et al., 2020) tot i que alguns autors apunten a que més aviat la senyal és elèctrica (Maffei et al., 2004; Zimmermann et al., 2009; Mousavi et al., 2013) i que aquesta despolarització de les membranes és la que activa la síntesi sistèmica de jasmonats (Farmer et al., 2020).

3. Relació entre la vitamina E i els jasmonats

3.1 Relació entre les molècules fotoprotectores i la síntesi d'oxilipines

Fa més de 1000 milions d'anys, l'endosimbiosi entre un protist unicel·lular heterotròfic i un cianobacteri fotosintètic van donar lloc al cloroplast (McFadden, 2001; Price et al., 2012). Aquest orgànul cel·lular és el responsable de dur a terme la fotosíntesi i per tant la seva protecció i comunicació amb el nucli cel·lular és fonamental. Ja que és un compartiment d'alta activitat energètica, la formació de ROS és molt considerable, sobretot als complexos d'absorció de la llum i de transport d'electrons (Pitzschke et al., 2006). També cal tenir en compte que tots els tipus d'estrès deriven en la formació de ROS al cloroplast, que a part d'exercir una funció de senyalització també poden provocar greus danys (Suzuki et al., 2012). Les plantes però, han desenvolupat diversos mecanismes per a reduir el risc de patir danys

fotooxidatius associats a aquestes ROS. Les molècules fotoprotectores que treballen per a reduir-ne l'acumulació en són un de molt important. Un gran exemple són la vitamina E i els carotenoides.

Les oxilipines són molècules senyalitzadores que deriven de la peroxidació lipídica de les membranes cloroplàstiques produïda per l'acumulació de ROS (principalment $^1\text{O}_2$) o de forma enzimàtica (Triantaphylidès et al., 2008). Els jasmonats o l'àcid malondialdehid són exemples d'aquestes espècies electròfiles reactives que participen en la senyalització retrògrada per a una acurada coordinació dels processos de desenvolupament i de defensa a l'estrès (Weber et al., 2004; Muñoz i Munné-Bosch, 2020). D'una banda, la relació entre les oxilipines i les molècules fotoprotectores és doncs aparentment, una relació d'antagonisme. Mentre les primeres es formen a partir de la peroxidació lipídica, les segones s'encarreguen d'evitar-la, evidenciant un aparent compromís entre les funcions de cadascuna (Demmig-Adams et al., 2013). D'altra banda però, s'ha observat que les oxilipines senyalitzadores indueixen la síntesi d'antioxidants, tant enzimàtics com no enzimàtics (Sandorf i Holländer-Czytko, 2002; Sasaki-Sekimoto et al., 2005; Wolucka et al., 2005; Farooq et al., 2016).

3.2 Relació entre la vitamina E i els jasmonats

Tant la localització d'aquestes molècules com la seva naturalesa són claus per entendre la seva relació. El cloroplast és el focus d'atenció en aquest aspecte. En primer lloc, la vitamina E i els jasmonats coincideixen a la membrana cloroplàstica, essent els jasmonats oxilipines producte de la peroxidació lipídica d'aquestes membranes, on els tococromanols, exercint la seva funció antioxidant, en redueixen la presència (**Figura 3A**; Morales i Munné-Bosch, 2015). En segon lloc, convergeixen als plastoglòbuls, que juguen un paper important en l'emmagatzematge i en la via de reciclatge tant dels tococromanols com dels jasmonats, on s'hi ha localitzat l'enzim tocoferol ciclase (vte1) i oxidoreductases que participen en la reducció dels tococromanols oxidats, i enzims clau en la formació de jasmonats com la AOC o la AOS que formen OPDA a partir dels àcids grassos derivats de la membrana (**Figura 3B**, van Wijk i Kessler, 2007).

Si bé l'estudi en plantes model ens ajuda a comprendre els processos fisiològics vegetals de forma controlada, l'estudi en plantes no model, especialment en condicions naturals, és fonamental per a entendre aquests processos de manera més holística, tenint en compte les diferències entre espècies i la influència del gran nombre de factors que formen part de la història de vida d'una planta. Malauradament, la informació sobre la relació entre l'acumulació de vitamina E i els jasmonats és extremadament escassa en plantes no model en condicions naturals. A dia d'avui hi ha pocs estudis on es mesurin simultàniament els nivells de jasmonats i de vitamina E, però encara menys on s'avalui la seva relació. Existeixen però alguns estudis on s'ha avaluat aquesta correlació sota condicions naturals. En aquests estudis, les plantes estudiades en condicions naturals patien estrès per sequera, i en la majoria dels casos es van observar fortes correlacions negatives entre la vitamina E i els jasmonats (Fleta-Soriano et al., 2015 ; Morales et al., 2015; Cotado i Munné-Bosch, 2020). Tot i així, en condicions naturals encara no s'han observat exemples de la inducció de la síntesi de vitamina E per part dels jasmonats demostrada en plantes model

3.3 Implicacions ecofisiològiques d'aquesta relació

Partint de la base que la vitamina E és essencial per a l'aclimatació de les plantes a certs tipus d'estrès abiòtic, com la sequera i l'alta irradiació lumínica, i que els jasmonats ho són per a la defensa contra l'estrès biòtic, les possibles implicacions ecofisiològiques de la seva relació ressalten en condicions naturals on és comú que convergeixin aquests dos tipus d'estrès. Tot i que els estudis esmentats anteriorment suggereixen que la relació trobada podria tenir implicacions en el compromís entre la resposta a l'estrès abiòtic i biòtic, no hi ha cap estudi on apareguin els dos tipus d'estrès alhora. A més a més, donat que les correlacions trobades difereixen entre les diferents formes tant de vitamina E com de jasmonats, i que cada una d'aquestes formes sembla tenir una funció diferencial (veure subapartats 1.3 i 2.3), les implicacions d'aquesta relació podrien tenir diferents vessants. Amb tot, les evidències obtingudes fins al moment semblen indicar una gran complexitat de la relació entre la vitamina E i els jasmonats, i, tot i tenint en compte la dificultat d'estudiar-la de manera comprensiva en plantes no model i en condicions naturals,

és essencial omplir els buits que existeixen actualment en el coneixement d'aquesta relació degut a les importants implicacions que podria tenir en l'ecofisiologia vegetal.

4. Estrès abiòtic i biòtic

4.1 Definició d'estrès

L'estrès en les plantes va ser definit per primera vegada com "l'estat en el qual les creixents demandes a les que es veu sotmesa una planta porten a una desestabilització inicial de les funcions, seguida d'una normalització i resistència millorada, i que "si els límits de tolerància s'excedeixen així com la capacitat adaptativa és sobrecarregada, pot resultar en danys permanents o fins i tot en la mort" (Larcher, 1980). Es va observar que l'estrès contenia elements tant constructius com destructius i es van introduir els conceptes d'"eu-stress", quan es tracta d'un estrès suau que resulta en efectes positius per la planta, i "distress" quan l'estrès inhibeix el creixement i promou la senescència i la mort (Lichtenthaler 1988). L'estrès es considera abiòtic si és causat per factors ambientals com la irradiació solar, la sequera, la temperatura, etc., i biòtic si és causat per un ésser viu, com per exemple herbívors, patògens, o paràsits (Verma et al., 2013).

4.2 Resposta de les plantes a l'estrès

En tots els casos, les plantes es serveixen de la coordinació de dues grans vies de senyalització, les hormones i les ROS, per a donar una resposta i poder aclimatar-se a la situació d'estrès (Fujita et al., 2006). Les principals hormones implicades en la resposta a l'estrès són l'àcid abscísic, l'àcid salicílic, el JA, i l'etilè. Cada situació és diferent segons el tipus d'estrès, el grau, i el moment de desenvolupament que visqui la planta, a més de la seva història de vida particular. Per tal de respondre adequada i concretament, la coordinació de les vies de senyalització així com el balanç i la interacció de les diferents fitohormones implicades és vital (Rejeb et al., 2014). En general, trobem tres grans nivells en aquesta resposta que han de ser entesos com una xarxa de senyalització complexa i altament interconnectada. El primer nivell, que involucra les ROS, el calci, les fitohormones de resposta a l'estrès, i on participen les

cascades de senyalització de quinases, i un segon nivell on els factors de transcripció juguen el seu paper per a modular l'expressió gènica al tercer nivell (**Figura 4**).

Sota una situació d'estrès, els plastidis (com el cloroplast), funcionen com a principals sensors. Inicialment la senyalització retrògrada, altament relacionada amb l'estat redox plastidial, transmet la senyal dels plastidis cap al nucli. Les principals senyals que participen en aquesta senyalització són les ROS (Crawford et al., 2018), el calci (Navazio et al., 2020), i alguns metabòlits com el β -ciclocitral o la 3'-fosfoadenosina 5'-fosfat (Jiang i Dehesh, 2021). El paper de les fitohormones en la resposta a l'estrès és transversal. Les vies de senyalització hormonals poden ser activades en aquest punt de manera paral·lela com a resposta sistèmica primerenca a l'estrès o fins i tot algunes hormones, com els jasmonats, són en si mateixes participants clau d'aquesta senyalització retrògrada (Liu i Park, 2021). Aquestes senyals interaccionen amb la xarxa de senyalització citosòlica, les quinases, i a partir de la regulació de factors de transcripció es modula l'expressió gènica al nucli cel·lular per a donar resposta local i sistèmica a l'estrès (Guo et al., 2016; Mielecki et al., 2020).

4.3 Interacció entre estrès abiòtic i biòtic

Mentre que l'àcid abscísic és essencial per a la resposta a l'estrès abiòtic (Tuteja, 2007), l'àcid salicílic, el JA i l'etilè ho són per a la resposta a l'estrès biòtic (Yang et al., 2019). Quan les plantes es veuen sotmeses a una combinació d'estressos, abiòtics i biòtics, la coordinació de la resposta augmenta en complexitat. Sota diversos stressos, la resposta de les plantes no és additiva responant a cada un dels stressos simples alhora, sinó que el resultat de la combinació és únic i altament complex (Atkinson et al., 2015; Gill et al., 2020). Ho és perquè, a part de tots els factors que intervenen en la resposta d'una planta a un estrès simple, que en última instància dona resposta al compromís entre la defensa i el creixement (Zhang et al., 2020), en aquesta situació apareix un nou element a tenir en compte, la prioritització o no entre stressos, inclús de manera diferencial a nivell tissular (Berens et al., 2019; Saijo i Loo, 2019; Wolinska i Berens, 2019). Així doncs, amb infinitat de factors que afecten a la resposta final de la planta a cada situació concreta d'estrès, com per

exemple el grau d'estrès o l'edat, la regulació de la interacció entre l'estrès abiòtic i biòtic resulta una matèria altament complexa però no del tot desconeguda.

La resposta a la combinació d'estressos abiòtics i biòtics és un aspecte a tractar en diversos nivells. En un primer nivell s'interconnecten les vies de senyalització hormonal i de les ROS que responen a cada tipus d'estrès. A més, interaccionen ambles cascades de senyalització conduïdes per les quinases, les MAPK. Seguidament, tot això desemboca en la regulació de factors de transcripció, en el cas de combinació d'estressos en són exemples els MYC o els WRKY, que donaran lloc finalment a l'expressió gènica de resposta (**Figura 4**, Fujita et al., 2006; Atkinson et al., 2015). Amb tot, aquests factors de transcripció, les cascades de MAPK, les fitohormones, les ROS, o fins i tot els reguladors del metabolisme de les ROS semblen ser importants candidats com a punt de convergència entre la resposta a l'estrès abiòtic i biòtic.

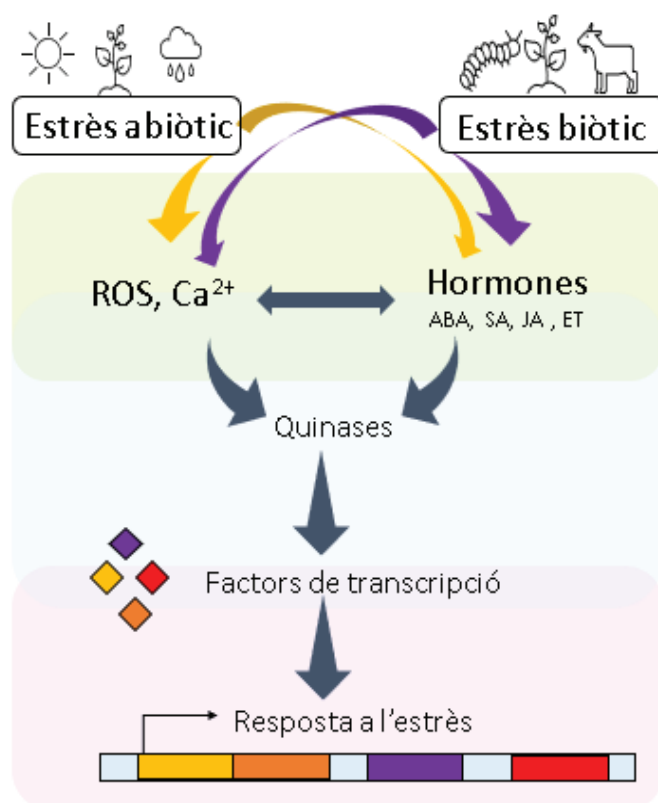


Figura 4. Esquema simplificat de les cascades de senyalització en resposta a l'estrès abiòtic i biòtic en les plantes. ABA: àcid abscísic, ET: etilè, JA: àcid jasmònic, SA: àcid salicílic. Adaptat de Fujita et al., 2006.

En essència, la resposta final ha de ser òptima per a maximitzar les defenses a ambdós estressos tant com sigui possible per a sobreviure. Com a sensor d'estrès primari, el cloroplast és un compartiment cel·lular clau en la interacció entre la resposta a la convergència d'estressos degut al seu paper en la senyalització retrògrada que dona lloc a l'aclimatació (Anderson et al., 1997; Muñoz i Munné-Bosch, 2020). Així, les xarxes de senyalització redox cloroplàstiques són un punt convergent entre l'estrès abiòtic i biòtic ja que hi interaccionen importants reguladors del metabolisme de les ROS en situacions de convergència d'estressos. Les ROS interaccionen allà amb molècules involucrades amb el seu metabolisme com per exemple antioxidants com la vitamina E, i les oxilipines, com són els jasmonats, que deriven de la peroxidació lipídica que les ROS provoquen (Demmig-Adams et al., 2013, 2014; Cella et al., 2018; Demmig-Adams et al., 2019). Així doncs, la comprensió de les relacions entre les molècules implicades en aquestes xarxes de senyalització, ens ajudarà indubtablement a descobrir noves claus de la resposta a la combinació d'estressos abiòtics i biòtics.

Les respostes a l'estrès abiòtic i biòtic utilitzen senyals i vies de senyalització comunes. És per això que la combinació d'estressos pot resultar en tolerància creuada o en compromís entre la defensa als diferents tipus d'estrès. Així doncs, el fet de patir aquests dos tipus d'estrès alhora pot derivar en major tolerància a tots dos tipus d'estrès o pot resultar en la prioritització d'una de les dues respostes en detriment de l'altra (Foyer et al., 2016; Berens et al., 2019). A més a més, seguint la teoria de la defensa òptima, aquest resultat seria teixit-específic, és a dir que la prioritització seria diferent en els diferents teixits de la planta (Wolinska i Berens, 2019). Múltiples factors afecten al balanç entre les respostes que dona lloc a la prioritització o tolerància final. Per exemple, el genotip de la planta, l'edat, l'estat del desenvolupament, o la naturalesa i el grau de l'estrès biòtic patit, així com la de l'abiòtic (Saijo i Loo, 2019). Amb tot, en condicions naturals on les plantes es veuen exposades a constants compromisos entre el creixement, la reproducció, i la defensa, és el compromís i no la tolerància creuada entre la defensa als diferents tipus d'estrès el que té conseqüències ecofisiològiques vitals.

5. Models d'estudi

5.1 Plantes d'interès agronòmic

En l'estudi de plantes d'interès agronòmic, al ser plantes extensament estudiades, partim de l'avantatge d'una base sòlida del coneixement de l'espècie o del gènere i del seu comportament. Aquestes espècies amb gran interès agronòmic degut al seu cultiu per al consum humà, es fan servir sovint com a model de recerca. Així, l'interès econòmic i social incentiva i genera coneixement sobre una espècie vegetal. D'aquesta manera, alhora d'estudiar processos fisiològics que hagin estat menys estudiats en les plantes, serà més senzill entendre'ls primer en les plantes de les quals ja disposem de gran quantitat d'informació que ens ajudarà a comprendre millor allò que estem estudiant.

5.1.1 *Fragaria x ananassa* cv. Albion

Degut al seu sabor, i a l'alt contingut en nutrients essencials i compostos beneficiosos per a la salut humana, el consum de maduixots és apreciat mundialment. El cultiu de maduixeres genera actualment una producció mundial de 9 milions de tones de mitjana, essent Espanya el tercer productor del món (**Figura 5D**, FAO, 2022). Els principals compostos beneficiosos són antioxidants hidrosolubles com la vitamina C o els compostos fenòlics, principalment les antocianines, però també ens proveeixen d'antioxidants liposolubles com la vitamina E (Giamperi et al., 2012, 2014). *Fragaria x ananassa* és l'espècie de maduixera més cultivada mundialment degut a la seva superioritat respecte la qualitat del fruit i es fa servir en molts casos com a model d'estudi ja que, a part de ser la que realment utilitza i consumeix la societat a nivell mundial avui en dia, és més apte per a l'estudi dels fruits que *Fragaria vesca* (Liston et al., 2014; Carvalho et al., 2016; Fierascu et al., 2020).

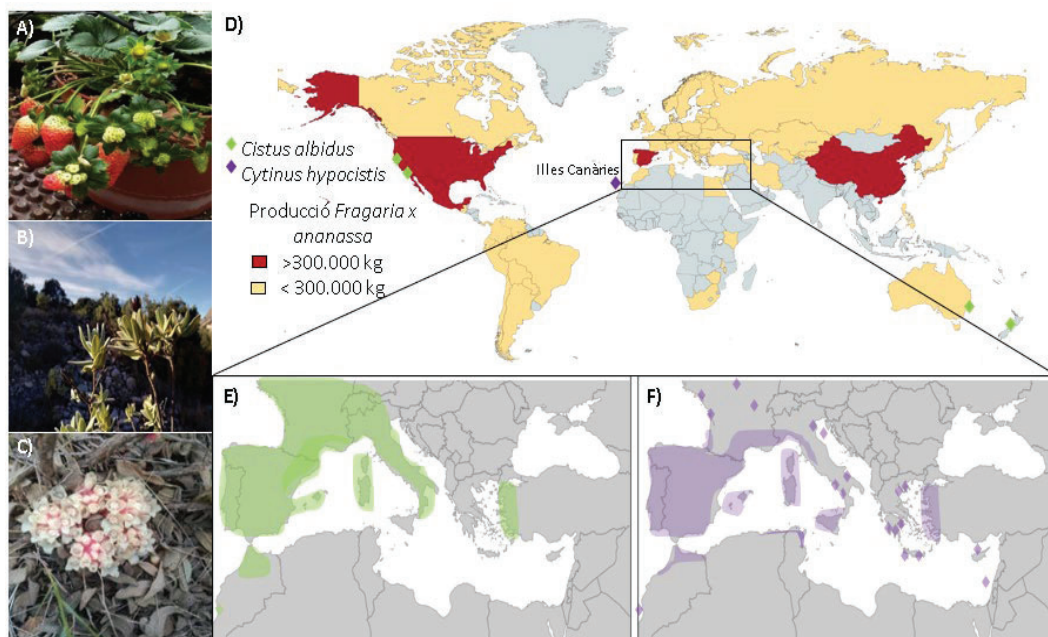


Figura 5. Mapa de distribució dels models d'estudi. A) Fotografia de *Fragaria x ananassa* cv. Albion, B) Fotografia de *C. albidus*, C) Fotografia de *C. hypocistis*, D) Mapa on es representa la distribució mundial del cultiu de *Fragaria x ananassa* així com la distribució de *C. albidus* L., i *C. hypocistis* L., exceptuant la regió mediterrània que es mostra només en detall en E) *C. albidus* L., i F) *C. hypocistis* L.

El maduixot és un fruit agregat, format pel receptacle floral carnós i pels veritables fruits anomenats aquenís, que contenen les llavors. Durant el desenvolupament del fruit agregat, té lloc el procés de degradació dels cloroplasts, sense conversió a cromoplasts (plastidis especialitzats en l'acumulació de carotenoides, Perkins-Veazie, 1995). Així doncs, els teixits resultants, el receptacle en els diferents estadis de maduració de blanc a vermell, i els aquenís, no contenen clorofil·la i són teixits no fotosintètics. El maduixot és un fruit amb una elevada capacitat antioxidant (Henning et al., 2010). La capacitat antioxidant que pot aportar al consumidor, així com el contingut de compostos antioxidants, està però compartimentada en les diferents parts del fruit agregat i a més a més depèn de la bioaccessibilitat dels diferents teixits. La contribució dels aquenís al total del fruit agregat és molt important en quant al contingut d'antioxidants (un 40%) però encara més en la capacitat antioxidant, contribuint en un 80% a la capacitat del fruit agregat sencer abans de ser digerit (Ariza et al., 2016). Tot i que la composició tissular i la contribució a la capacitat antioxidant de compostos fenòlics i antocianines és coneguda, la distribució tissular de la vitamina E en aquest model no ha estat investigada fins a l'actualitat.

5.2 Plantes d'interès ecològic

Actualment s'estima que existeixen més de 350.000 espècies de plantes al planeta Terra (Christenhusz i Byng, 2016). L'estudi de plantes d'interès ecològic ens permet integrar el coneixement adquirit prèviament en altres espècies en un escenari global, avaluant si un procés fisiològic succeeix de manera similar en moltes espècies vegetals i és universal en el regne vegetal o és més aviat espècie-específic. A part d'això, en el camp de l'ecofisiologia vegetal hi ha plantes d'interès ecològic que són especialment útils per a estudiar determinats aspectes, sobretot si s'estudien en condicions naturals, ja que ens permeten realitzar estudis des d'un prisma més realista, tenint en compte que les plantes estan adaptades al seu hàbitat i que a la natura existeixen moltíssims factors que afecten a molts processos alhora.

Els ecosistemes mediterranis són valorats mundialment degut a la seva gran biodiversitat i vulnerabilitat. Ocupant menys del 5% de la superfície terrestre acullen quasi el 20% de les espècies de plantes vasculars (Cowling et al., 1995). Les espècies vegetals que habiten aquests ecosistemes es caracteritzen per ser escleròfil·les i resistents a la baixa disponibilitat d'aigua i de nutrients (Sardans i Peñuelas, 2013). Malauradament, en l'actualitat aquests ecosistemes ja estan patint les conseqüències del canvi climàtic. Principalment, l'augment en l'aridesa i en les temperatures amenacen a les comunitats arbustives, que alhora són essencials per pal·liar-ne l'efecte negatiu ja que confereixen plasticitat a l'ecosistema (Peñuelas et al., 2017; Rodríguez-Ramírez et al., 2017; IUCN, 2019). A més, és ja un dels ecosistemes particularment més afectats mundialment per aquest escenari de canvi global en el qual ens trobem (IPCC, 2022). És per què són ecosistemes de prioritat conservativa doncs, que les espècies mediterrànies són de gran interès ecològic (Myers et al., 2000).

5.2.1 *Cistus albidus* L.

C. albidus és un arbust natiu de la regió mediterrània. Va aparèixer fa un milió d'anys durant el Pleistocè quan el clima mediterrani ja estava ben establert (Guzmán et al., 2009; Fernández-Mazuecos i Vargas, 2010). Forma part de la família Cistaceae, la qual consisteix en vuit gèneres, *Cistus*, *Fumana*, *Halimium*,

Helianthemum, *Hudsonia*, *Lechea* i *Tuberaria*, tots amb flors hermafrodites, actinomorfes, i hipògines, amb tres o cinc sèpals oposats als pètals (Guzmán i Vargas, 2009). El gènere *Cistus* es divideix en dos grans llinatges, el de flors blanques i el de flors liles. És aquest últim el que inclou a *C. albidus* L. Les espècies d'aquests gènere participen en la successió primària després d'un incendi. A més, presenten gran plasticitat fenotípica en resposta a la disponibilitat d'aigua i són capaços d'establir simbiosi micorrízica amb un gran ventall de fongs. És per això que habiten la majoria d'hàbitats dels ecosistemes mediterranis (**Figura 5**, Giovannetti i Fontana, 1982; Roy i Sonié 1992; Grant et al., 2005).

C. albidus és un arbust molt resistent als estressos. És semi-caducifoli i això implica la senescència i abscisió foliar d'una part de les seves fulles en els períodes més desfavorables (Correia i Ascensão, 2017). Aquesta estratègia, a més d'un gran nombre d'adaptacions fisiològiques i de respostes d'aclimatació, li permeten superar els períodes d'estrès típics del clima mediterrani, caracteritzats per la sequera, l'alta irradiació lumínica, la temperatura, l'escassetat de nutrients al sòl, i pertorbacions com la pastura i el foc (Correia et al., 1992; Cowling et al., 1995; Cabal et al., 2017; Rodríguez-Ramírez et al., 2017). La variació diürna, estacional, i de desenvolupament de l'angle foliar li permeten a aquest arbust evitar la fotoinhibició causada per l'excés de llum (Pérez-Llorca et al., 2019a). A més, els nivells elevats de vitamina E a les fulles, així com de xantofil·les i antioxidants enzimàtics, contribueixen enormement a l'aclimatació d'aquest arbust durant els períodes d'estrès per sequera o per alta irradiació en combinació amb el fred (Munné-Bosch et al., 2003; Brossa et al., 2015; Pérez-Llorca et al., 2019a, 2019b). A més a més, el JA juga un paper clau en la resposta d'aclimatació de *C. albidus* a la sequera regulant els nivells d'antioxidants enzimàtics (Brossa et al., 2015).

5.2.2 *Cytinus hypocistis* L.

A vegades ens passa per alt, però no totes les plantes realitzen la fotosíntesi. Actualment es considera que existeixen més de 4500 espècies de plantes paràsites que habiten en la majoria d'ecosistemes del món (Westwood et al., 2010). Degut al seu estil de vida, originat almenys 12 vegades independents al llarg de l'evolució, les

plantes paràsites presenten nombroses modificacions morfològiques. Principalment reduccions en molts dels seus òrgans (Twyford, 2018). Les plantes paràsites es basen en l'adquisició de recursos, tals com l'aigua, el carboni i els nutrients, del seu hoste per a la seva supervivència. Aquests peculiars éssers vegetals es nodreixen generalment a partir d'un òrgan molt especialitzat anomenat haustori, que és el que estableix la connexió amb el sistema vascular del seu hoste (Yoshida et al., 2016). La classificació d'aquest grup de plantes es basa per una banda en el lloc d'unió amb l'hoste, i per altra banda en la capacitat o no de dur a terme la fotosíntesi. Mentre que les plantes hemiparàsites disposen de cloroplasts funcionals, les holoparàsites no, i per tant són plantes no fotosintètiques i obligadament paràsites, i representen un 10% del total de plantes paràsites (Nickrent, 2002; Wicke et al., 2016).

Nativa de la regió mediterrània, *C. hypocistis* és una planta holoparàsita d'arrel. És d'especial importància en els ecosistemes mediterranis ja que la regió mediterrània és un dels dos centres de diversificació del gènere juntament amb la Macaronèsia. L'altre és a Sudàfrica i Madagascar (Webb, 1964; Visser, 1981). El gènere *Cytinus* compren vuit espècies. En la regió mediterrània, hi són presents *C. hypocistis* i *C. ruber* (**Figura 5C**), tot i que la segona és ara considerada *C. hypocistis* subsp. *clusii*, que parasiten arbustos de la família Cistaceae (de Vega et al., 2008). És difícil d'observar ja que el seu cos vegetatiu és endofític i es desenvolupa dins les arrels de l'hoste, connectant amb els seus vasos conductors a través de l'haustori (de Vega et al., 2007). Al nivell del sòl només emergeixen les inflorescències, que juntament amb l'espècie de l'hoste són el que determinen els cinc grups genètics diferencials de l'espècie *C. hypocistis*. *C. hypocistis* subsp. *clusii* presenta inflorescències de colors entre blanc marfil i rosa i parasita precisament a *C. albidus* (de Vega et al., 2008). Aquestes inflorescències havien estat tradicionalment consumides pels infants a les comunitats rurals d'Espanya i a part de pel seu enorme interès ecofisiològic, aquesta espècie també ha estat estudiada per a les seves propietats nutricionals i antioxidants (Tardío et al., 2006; Silva et al., 2019, 2020).

OBJECTIUS



OBJECTIUS

L'objectiu principal d'aquesta tesi és estudiar la ubiqüitat tissular de la vitamina E en les plantes així com la seva relació amb els jasmonats i la implicació d'aquesta en la interacció entre les respostes a l'estrès abiòtic i biòtic.

Per tal d'assolir aquest objectiu es van plantejar diversos objectius específics:

- i. Determinar la presència i el perfil de vitamina E en teixits fotosintètics (fulles) i no fotosintètics (fals fruit) de *Fragaria x ananassa* cv. Albion en condicions controlades com a planta que presenta una singular varietat de teixits no fotosintètics
- ii. Avaluar la resposta de la vitamina E a l'estrès hídric en teixits fotosintètics i no fotosintètics en el model d'estudi *Fragaria x ananassa* cv. Albion
- iii. Estudiar la relació de les diferents formes de vitamina E amb els jasmonats en les fulles de diferents espècies amb especial atenció a l'arbust mediterrani *C. albidus* L. en condicions naturals durant l'hivern
- iv. Estudiar estacionalment la convergència d'estressos abiòtics i biòtics en l'arbust mediterrani *C. albidus* L. en condicions naturals
- v. Avaluar la implicació de la relació entre la vitamina E i els jasmonats en la interacció entre la resposta a l'estrès abiòtic i biòtic en l'arbust mediterrani *C. albidus* L. en condicions naturals
- vi. Determinar la presència i el perfil de vitamina E en la planta holoparàsita *C. hypocistis* L. com a planta que presenta teixits no fotosintètics singulars

INFORME DEL DIRECTOR DE TESI



Barcelona, 25 de maig de 2022

El Dr. Sergi Munné Bosch, com a director de la Tesi Doctoral titulada **“Vitamina E: ubiquïtat tissular i relació amb els jasmonats, claus de la interacció entre la resposta a l’estrès abiòtic i biòtic en plantes”** presentada per la doctoranda Andrea Casadesús Cabral,

INFORMA sobre el factor d’impacte i la participació de la doctoranda en cadascun dels articles inclosos en la memòria d’aquesta Tesi Doctoral

Capítol 1. Article **“Differential accumulation of tocochromanols in photosynthetic and non-photosynthetic tissues of strawberry plants subjected to reiterated water deficit”**, publicat a la revista *Plant Physiology and Biochemistry*, índex d’impacte (2020) de 4.270. En aquest treball es fa un estudi dels nivells de vitamina E, els quals són analitzats per cromatografia líquida d’alta resolució (HPLC), en una varietat comercial de maduixots, incloent estudis per analitzar les variacions en la composició i continguts de vitamina E en teixits fotosintètics (fulles) i no fotosintètics (falsos fruits en diversos estadis de desenvolupament), així com en les seves diferents parts (incloent fruits veritables, els aquenís), tant en etapes productives com no productives del cultiu. Es descriu de forma original que la vitamina E, i més concretament l’ α -tocoferol, es troba de forma ubiqüa en els teixits fotosintètics i no fotosintètics analitzats en aquesta espècie, i que els aquenís són una font molt important de vitamina E. La doctoranda ha realitzat tot el mostreig, les anàlisis de les mostres, el tractament estadístic i l’elaboració dels resultats coordinant tot un equip de treball al laboratori, i a més ha participat en el disseny experimental i discussió dels resultats, constant per tant com a primera autora del treball. La doctoranda ha demostrat una gran capacitat de treball individual i en equip, mostres de lideratge, així com un excel·lent maneig en els mostres i en l’ús de l’HPLC per a les anàlisis de vitamina E. La doctoranda demostra també una gran capacitat d’anàlisi i interpretació dels resultats, no només de resultats d’interès en el camp de la bioquímica i fisiologia vegetal, sinó també pel camp de l’alimentació.

Capítol 2. Article **“Linking jasmonates with vitamin E accumulation in plants: a case study in the Mediterranean shrub *Cistus albidus* L.”**, publicat a la revista *Planta*, índex d’impacte (2020)



de 4.116. En aquest treball s'examinen les variacions en els continguts endògens de vitamina E, amb un èmfasi especial en la seva possible relació amb l'acumulació de jasmonats durant tres hiverns en plantes de *C. albidus* en el seu hàbitat natural. Es fan també dos estudis complementaris, el primer amb discs de fulles per estudiar la relació inversa, és a dir com els jasmonats poden afectar l'acumulació de vitamina E, i el segon, un estudi bibliogràfic complementari de meta-anàlisi de dades per elucidar els factors clau de la bidireccionalitat de la relació entre jasmonats i vitamina E en totes les espècies vegetals estudiades fins aquell moment. Cal destacar la importància de l'estudi en quan a la dificultat d'analitzar diferents els resultats de diferents aproximacions experimentals (metanàlisi, estudi de laboratori amb discs de fulles, i estudi de camp amb dades acumulades de diversos anys). Es descriu per primera vegada de forma molt robusta la bidireccionalitat en la relació entre la vitamina E, un antioxidant cloroplàstic, i els jasmonats, hormones resultants de la peroxidació lipídica. La doctoranda ha realitzat tots els mostreig, les anàlisis de les mostres, el tractament estadístic i l'elaboració dels resultats, i a més ha participat en el disseny experimental i discussió dels resultats, constant per tant com a primera autora del treball. La doctoranda ha demostrat una gran capacitat de treball, així com excel·lents aptituds en l'anàlisi estadístic i interpretació de les dades en estudis complementaris però a la vegada molt diferents entre ells. La doctoranda mostra una gran maduresa científica, tant en la part de camp com en la de laboratori, dominant una gran varietat de *know-hows* en el camp de l'ecofisiologia vegetal.

Capítol 3. Article “Contrasting seasonal abiotic stress and herbivory incidence in *Cistus albidus* L. plants growing in their natural habitat in a Mediterranean mountain”, enviat per a la seva publicació a la revista *Journal of Arid Environments*, índex d'impacte (2020) de 2.211. En aquest treball es descriu, entre altres aspectes, l'estacionalitat en la incidència d'estrès abiòtic, i les seves implicacions a nivell fisiològic en fulles, i l'estrès biòtic, concretament per herbivorisme. Cal destacar l'aproximació experimental, amb un caire molt més enfocat en l'àmbit ecològic que en els anteriors capítols, original i amb un alt valor científic, ja que es demostra per primera vegada el grau de coincidència d'aquests estressos tant diferents en plantes de *C. albidus* creixent en condicions naturals. La doctoranda ha realitzat tots els mostreigs i anàlisis de les mostres, ha realitzat el tractament estadístic i l'elaboració dels resultats, i a més ha participat en el disseny experimental i discussió dels resultats, constant per tant com a primera autora del treball. La doctoranda demostra una gran capacitat de treball, així com d'anàlisi i interpretació dels resultats en el camp de l'ecologia, a més d'un excel·lent maneig al laboratori.

Capítol 4. Article “Holoparasitic plant-host interaction between *Cytinus hypocistis* and *Cistus albidus* in their natural Mediterranean habitat: a spatiotemporal approach”, enviat



per a la seva publicació a la revista *Plant Physiology*, índex d'impacte (2020) de 8.340. En aquest darrer treball experimental es descriu la importància de la relació entre una planta holoparàsita i el seu hoste, així com els mecanismes d'acció implicats en la resposta a aquesta interacció tant a nivell local (haustori-arrel) com a nivell sistèmic (fulles). Cal destacar que s'inclouen diversos experiments de gran complexitat d'execució degut a l'aproximació espai-temporal utilitzada en la que es combinen estudis de les relacions espacials a nivell d'arrel-haustori de pocs mil·límetres amb efectes espacials a escala geogràfica de diversos kilòmetres, tenint en compte a més a més, els efectes temporals (estacionals) en la resposta sistèmica (en fulles) d'aquesta relació entre la planta paràsita i l'hoste. La doctoranda ha realitzat tots els mostreigs, les anàlisis de les mostres, el tractament estadístic i l'elaboració dels resultats, i a més ha participat en el disseny experimental i discussió dels resultats, constant per tant com a primera autora del treball. La doctoranda ha demostrat una gran capacitat de treball i ha participat també activament en la redacció de l'article com en els altres capítols de la tesi. La doctoranda mostra un excel·lent maneig no només en el camp de la bioquímica i fisiologia vegetal, sinó també en el camp de l'ecologia. La doctoranda demostra un excel·lent grau de maduresa científica.

Annex 2. Article “Holoparasitic plant-host interactions and their impact on Mediterranean ecosystems”, publicat a la revista *Plant Physiology*, factor d'impacte (2020) de 8.340. La doctoranda escriu la primera versió de l'article de revisió i ajuda a preparar diverses figures, mostrant una excel·lent maduresa intel·lectual.

I, per que així consti als efectes oportuns,

Dr. Sergi Munné Bosch

RESULTATS



CAPÍTOL 1



Acumulació diferencial de tococromanols en teixits fotosintètics i no fotosintètics de plantes de maduixera sotmeses a estrès hídric reiterat

Chapter 1. Differential accumulation of tocochromanols in photosynthetic and non-photosynthetic tissues of strawberry plants subjected to reiterated water deficit.

Andrea Casadesús, Alba Arabia, Ricard Pujolriu, Sergi Munné-Bosch

Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Institute of Nutrition and Food Security (INSA), University of Barcelona, Barcelona, Spain

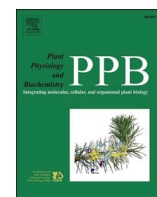
Publicat a Plant Physiology and Biochemistry 2020, 155: 868-87

Els tococromanols són un grup d'antioxidants liposolubles que inclouen els tocoferols, els tocotrienols, i el plastocromanol-8. En aquest estudi, es va examinar la possible acumulació diferencial de tococromanols als teixits fotosintètics i no fotosintètics (incloent les fulles i els falsos fruits) de maduixeres (*Fragaria x ananassa* cv. Albion) i es va avaluar les seves variacions endògenes en resposta a un dèficit hídric reiterat durant el període vegetatiu (no productiu) i el període reproductiu (productiu). A més, vam avaluar la concentració de tococromanols als aquenis (fruits veritables) i al receptacle del maduixot als estadis de color blanc i completament vermell, ambdós sota condicions òptimes i d'estrès. Els resultats van mostrar que les fulles acumulaven majoritàriament α -tocoferol, essent presents en baixes quantitats el plastocromanol-8 i el γ -tocoferol. En contrast, els falsos fruits no van acumular plastocromanol-8, essent el γ -tocoferol el major tococromanol als aquenis (fruit veritable) i l' α -tocoferol al receptacle. Mentre que el contingut d' α -tocoferol a les fulles va augmentar fins a set vegades després de 12 setmanes d'estrès durant el període productiu, es va mantenir inalterat durant el període no productiu. Ni el contingut de plastocromanol-8 ni el de γ -tocoferol va augmentar a les fulles de les plantes estressades. D'entre els compostos examinats, el receptacle de les maduixes va acumular només α -tocoferol, tant a l'estadi blanc com al completament vermell. Es conclou que (i) l' α -tocoferol és el major tococromanol a les fulles, mentre que el γ -tocoferol és el major tococromanol als aquenis, (ii) el dèficit hídric reiterat promou l'acumulació d' α -tocoferol a les fulles i de γ -tocoferol als fruits, (iii) l' α -tocoferol no només s'acumula als teixits fotosintètics (fulles i falsos fruits en estadis verds) sinó que també als teixits no fotosintètics (receptacle dels falsos fruits als estadis blancs i completament vermell), i (iv) els aquenis (fruits veritables) del maduixot són una font extraordinària de tocoferols.



Contents lists available at ScienceDirect

Plant Physiology and Biochemistry

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

Research article

Differential accumulation of tocochromanols in photosynthetic and non-photosynthetic tissues of strawberry plants subjected to reiterated water deficit

Andrea Casadesús^a, Alba Arabia^a, Ricard Pujolriu^a, Sergi Munné-Bosch^{a,b,*}^a Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain^b Institut de Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA), University of Barcelona, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Fragaria x ananassa
Rosaceae
Strawberries
Tocochromanols
Plastochromanol-8
 α -Tocopherol
 γ -Tocopherol
Achene
Flesh

ABSTRACT

Tocochromanols are a group of lipid-soluble antioxidants that include tocopherols, tocotrienols and plastochromanol-8. Here, we examined a putative differential accumulation of tocochromanols in photosynthetic and non-photosynthetic tissues (including leaves and whole fruits) of strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Albion) plants and evaluated their endogenous variations in response to a reiterated water deficit during a vegetative (non-productive) and a fruiting (productive) period. In addition, we evaluated the concentration of tocochromanols in achenes (true fruits) and flesh of strawberries (whole fruits) at the white and full-red stages both under optimal and stress conditions. Results showed that leaves mainly accumulated α -tocopherol, with plastochromanol-8 and γ -tocopherol being present at low amounts. In contrast, whole fruits did not accumulate plastochromanol-8, γ -tocopherol being the major tocochromanol in the achenes (true fruit) and α -tocopherol in the flesh. While α -tocopherol content in leaves increased up to seven-fold after 12 weeks of stress during the fruiting period, it kept unaltered during the vegetative period. Neither plastochromanol-8 nor γ -tocopherol contents increased in leaves of stressed plants. During the fruiting period, γ -tocopherol content increased in whole fruits of stressed plants (most of it being accumulated in the achenes). Among the compounds examined, the flesh of strawberries accumulated α -tocopherol only, both at the white and full-red stages. It is concluded that (i) α -tocopherol is the major tocochromanol in leaves, while γ -tocopherol is the major tocochromanol in achenes (ii) reiterated water deficit promotes the accumulation of α -tocopherol in leaves and γ -tocopherol in fruits, (iii) α -tocopherol not only accumulates in photosynthetic tissues (leaves and whole fruits at green stages), but also in non-photosynthetic tissues (flesh of whole fruits at the white and full-red stages), and (iv) achenes (true fruits) of strawberry plants are an extraordinary rich source of tocopherols.

1. Introduction

Tocochromanols are a group of prenyl lipids with antioxidant properties that include tocopherols, tocotrienols and plastochromanol-8 (PC-8). Tocopherols are amphipathic molecules formed by a chromanol head and a phytol chain and depending on the degree and position of methyl groups in the former four homologues may occur, including the α -, β -, γ - and δ -tocopherols (Munné-Bosch and Alegre, 2002; Atkinson et al., 2008). γ -Tocopherol is the precursor of α -tocopherol, the latter being considered the principal component of the vitamin E group of compounds, not only because it has a strong antioxidant activity, but also because it is transported by the human body by a

tocopherol-transfer protein with high specificity for α -tocopherol (Atkinson et al., 2008; Azzì, 2010). In plants, an α -tocopherol-binding protein located in chloroplasts of tomato leaves has recently been discovered (Bermúdez et al., 2018). This protein may transport α -tocopherol (probably together with other prenyl lipids) between the plastid compartments and/or at the interface between chloroplasts and the endoplasmic reticulum, influencing inter-organelle lipid metabolism (Bermúdez et al., 2018; Muñoz and Munné-Bosch, 2019). Contrary to tocopherols, tocotrienols and PC-8 are not universal in the plant kingdom (Falk and Munné-Bosch, 2010; Kruk et al., 2014). Plant species, organ/tissue and growth conditions strongly determine the contents of tocochromanols in plants, with tocopherols being generally

* Corresponding author. Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain.
E-mail address: smunne@ub.edu (S. Munné-Bosch).

<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.06.038>

Received 26 May 2020; Received in revised form 23 June 2020; Accepted 23 June 2020

Available online 10 July 2020

0981-9428/© 2020 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

predominant in photosynthetic tissues and their contents increasing in response to a variety of stresses (Munné-Bosch, 2005; Kruk et al., 2014; Muñoz and Munné-Bosch, 2019). Aside from chloroplast plastoglobuli, where tocopherols are synthesized and accumulated (Block et al., 2013), these compounds are found in the chloroplast membrane and in thylakoids, where they exert an antioxidant role (Kruk et al., 2014; Muñoz and Munné-Bosch, 2019). The antioxidant activity of PC-8 is like that of γ -tocopherol and γ -tocotrienol in biological membranes (Siger et al., 2014) and stronger than that of α -tocopherol in some cases, particularly in the most hydrophobic environments within the lipid membrane (Obranić et al., 2015). The latter may be partly attributed to the prenyl chain, which is more unsaturated in PC-8 compared to that of tocopherols and can therefore more efficiently quench singlet oxygen. All tocopherols are excellent quenchers and scavengers of singlet oxygen and other reactive oxygen species, and they play a major role in inhibiting the propagation of lipid peroxidation in biological membranes (Kruk et al., 2014; Muñoz and Munné-Bosch, 2019). However, it is still poorly understood why some plant species specifically accumulate PC-8 and tocotrienols aside from tocopherols in some of their organs and tissues, and whether the various tocopherols exert a redundant antioxidant role in plants.

Water deficit is a major factor limiting crop productivity worldwide. Plant response to water deficit occurs at multiple scales, from reduced growth and increased root/shoot ratio at the whole-plant level, to the activation of stress-related response genes at the molecular level (Hong-bo et al., 2008; Aroca, 2012). The latter leads to the activation of several redox and antioxidant-related defense pathways that operate at multiple levels within the cell (Hong-bo et al., 2008; Munné-Bosch et al., 2013). Antioxidant compounds modulate the extent of reactive oxygen species accumulation and redox signaling in plants, which is a key component of stress acclimation (Foyer and Noctor, 2009; Munné-Bosch et al., 2013). Among various antioxidants, water deficit leads to the accumulation of tocopherols (Munné-Bosch, 2005). For instance, enhanced accumulation of PC-8, α - and γ -tocopherols occurs in leaves of maize plants exposed to reiterated water deficit (Fleta-Soriano and Munné-Bosch, 2017). Vitamin E accumulation in leaves has also been shown to occur in several other crops, including tomato (Loyola et al., 2012), kale (Podda et al., 2019), barley (Marok et al., 2013) and fig trees (Gjolami et al., 2012). In addition, vitamin E has also been shown to increase in fruits and/or seeds of plants exposed to water deficit, such as grapevines (Savoi et al., 2016) and almond trees (Kodad et al., 2018).

Strawberries are widely consumed around the world. Their global production is more than five million tons, being China the first producer country and Spain the first in exportation (FAO, 2018). Strawberries are highly appreciated for their organoleptic characteristics and benefits on human health. Major beneficial phytochemical compounds include water-soluble antioxidants, such as vitamin C and phenolic compounds, but lipid-soluble antioxidants, such as vitamin E, are also present (Giampieri et al., 2012). Strawberries are whole fruits formed by the fleshy floral receptacle and the true fruits (achenes), and the distribution of antioxidant compounds within the whole fruits, although still little explored, is important to understand their benefits. Despite their small size, achenes contribution to the total antioxidant capacity of strawberries has indeed been shown to be very high (Ariza et al., 2016).

The aim of the present study was to shed light on the distribution of tocopherols in photosynthetic and non-photosynthetic tissues of plants using not only leaves but also whole fruits of strawberry plants (*Fragaria × ananassa* [Duchesne ex Weston] Duchesne ex Rozier) as an excellent model to examine whether the various tocopherols exert a redundant antioxidant role in plants. With this purpose, we evaluated the presence of tocopherols in photosynthetic and non-photosynthetic tissues of strawberry plants and assessed the influence of stress conditions, induced by a reiterated water deficit, on the tocopherol content of strawberry leaves and fruits.

2. Materials and methods

2.1. Growth conditions, treatments and samplings

Forty strawberry plants (*Fragaria × ananassa* [Duchesne ex Weston] Duchesne ex Rozier) of the “Albion” variety, which were obtained from Lurberry (Gipuzkoa, Spain) on March 19th, 2018, were grown each in 3 dm³ pots in a greenhouse at the experimental fields of the University of Barcelona (Barcelona, NE Spain) with a distance between pots of 20 cm, using a substrate based on 50% of peat, 25% of perlite, 25% of vermiculite, CaCO₃ at 1 g/L and essential micronutrients at 0.05 g/L. After 3 months of growth, they received a first vernalization treatment based on 30 days of low temperatures (4 °C) during the night. This first exposure to low temperatures did not induce flowering, so plants were still in a vegetative (non-productive) stage. Experiments started one month later during September 12th, 2018 in the greenhouse by establishing two irrigation treatments: half of the plants were used as controls and the other half exposed to water deficit conditions. Control plants were subjected to daily, constant irrigation with Hoagland nutritive solution at pot field capacity, according to their evapotranspirative demand, while the water deficit treatment was established by irrigating plants twice a week (once with 0.5 L of Hoagland solution and once with tap water).

During the vegetative (non-productive) period, samplings were carried out on September 12th 2018 (week 0, start of the experiment), September 27th 2018 (week 2), October 11th 2018 (week 4), November 8th 2018 (week 8) and December 5th 2018 (week 12). Daily mean temperature in the greenhouse ranged between 16 and 27 °C, decreasing from the start to the end of the study period, and daily mean relative humidity ranged between 35 and 80% (Suppl. Fig. 1). During the fruiting (productive) period, samplings were carried out during March 6th 2019 (week 0, start of treatments), March 21st 2019 (week 2), April 4th 2019 (week 4), May 2nd 2019 (week 8) and May 30th 2019 (week 12). Daily mean temperature in the greenhouse ranged between 15 and 24 °C, increasing from the start to the end of the study period, and daily mean relative humidity ranged between 30% and 75% (Suppl. Fig. 1). All samplings were performed at predawn (1 h before sunrise). Between the end of the vegetative period and the start of the fruiting period, plants were subjected to low temperatures outdoors during winter receiving a second vernalization treatment, and all plants were equally watered with Hoagland solution at pot field capacity. This second exposure to low temperatures led to reach the minimum required number of low temperature exposure for vernalization, which induced flowering, so plants rapidly attained the productive, fruiting stage.

At the start of water deficit treatments, both during the non-productive and the productive periods, all plants were randomly selected for establishing control and stress conditions, and 10 randomly selected plants per treatment were used at each sampling point. Two young, fully developed leaves were collected at each sampling point. One of them was immediately frozen in liquid nitrogen and then kept at −80 °C to be used for subsequent biochemical analyses. The other was used to determine the maximum efficiency of photosystem II (F_v/F_m) *in situ* with a mini-PAM II (Photosynthesis Yield Analyser, Walz, Germany) and the relative water content [RWC, calculated as $100 \times (FW - DW) / (TW - DW)$], where FW is the fresh weight, TW is the turgid weight after 24 h immersed in water, and DW is the dry weight after drying in the oven at 80 °C]. Furthermore, fruit production was measured once a week during the productive period to estimate the influence of water deficit on accumulated fruit production. Accumulated fruit production was estimated as the number of fruits and the FW of all fruits produced per plant during a period of 12 weeks.

Fruit sampling for biochemical analyses was carried out during the reproductive stage at week 4 (April 4, 2019). Between three and four strawberries from each treatment were collected at five different fruit developmental stages from different individuals, including “small green” (SG), “big green” (BG), “white type” (WT), “partial red” (PR) and

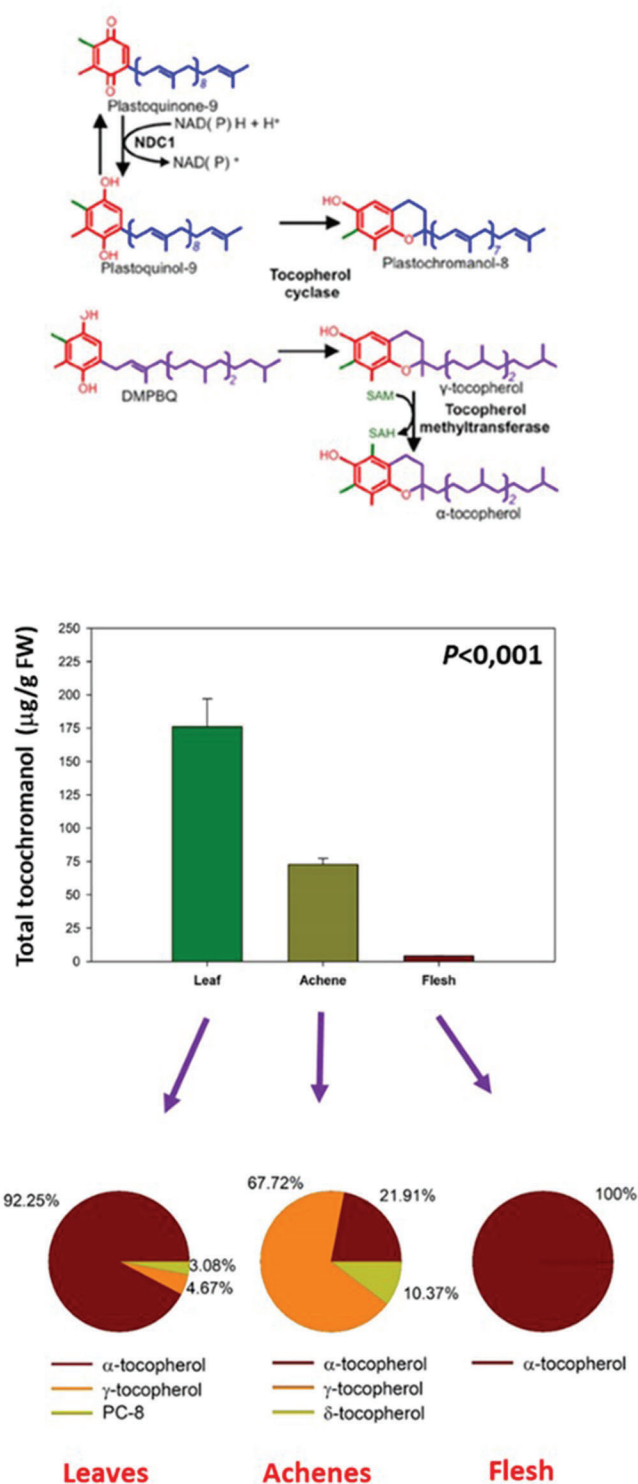


Fig. 1. Tocochromanol composition of leaves, achenes and flesh of whole fruits in strawberry plants. Data are the means $\pm$ SE of $n = 10$ individuals for leaves and $n = 6$ for achenes and flesh. Results of statistics are shown in the insets. The tocochromanol biosynthesis pathway is also shown for reference.

“full red” (FR). Whole fruits were immediately frozen in liquid nitrogen and then kept at -80°C to be used for subsequent biochemical analyses. In addition, we manually separated all the achenes from the flesh of three WT and three FR strawberries for each treatment to study the distribution of tocochromanols in the whole fruit. Dissection forceps was used to collect achenes, which were immediately cleaned with distilled

water. Achenes and flesh (without achenes) were frozen in liquid nitrogen and then kept at -80°C to be used for biochemical analyses.

2.2. Tocochromanol analyses

Tocochromanol analyses included the four tocopherol homologues, the four tocotrienol homologues and PC-8. Analyses were performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) using methanolic extracts as described by Cela et al. (2011). One hundred mg of well powered fresh leaves were used for the extract, and after repeated extraction with 300 μL of methanol, the supernatants were pooled and filtered using a 0.22 μm PTFE filter (Waters, Milford, MA, USA), and then subsequently injected into the HPLC system (consisting on a Waters 600 controller pump, Waters 714 plus auto-sampler and Jasco FP-1520 fluorescence detector). The mobile phase was a mixture of *n*-hexane and 1,4-dioxane (95.5:4.5, v/v) at a flow rate of 1.1 mL/min. Tocochromanols were separated on a normal-phase column (Inertsil 100A, 5 μm , 30 $\times$ 250 mm, GL Sciences Inc, Japan). Fluorescence detection was at an excitation wavelength of 295 nm and emission at 330 nm. Standards of tocopherols (Sigma-Aldrich) and PC-8 (provided by J. Kruk, Jagellonian University) were used for calibration.

2.3. Photosynthetic pigments analyses

Photosynthetic pigments, including chlorophyll *a* and *b*, were analyzed using UV/Visible spectroscopy of double beam as described by Oliván and Munné-Bosch (2010). Methanolic extracts were prepared using 100 mg of well powered fresh leaves and were diluted 1:5 (v/v). The absorbance was read at 470 nm, 653 nm and 666 nm using a CE Aquarius UV/Visible Spectrophotometer (Cecyl Instruments Ltd, Cambridge, UK) and pigment concentrations were obtained using the equations developed by Loyola et al. (2012).

2.4. Statistical analyses

To determine the effect of “treatment” and “time”, multifactorial analyses of two fixed factors using two-way ANOVA test were performed. Normality and homoscedasticity of residues were checked as described by Zuur et al. (2009). Correlations between tocochromanols and chlorophylls content were tested with Pearson’s correlation test. All results were considered significant when $P \leq 0.05$. All statistical tests were performed using R statistical software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

3. Results and discussion

Tocochromanols are amphipathic molecules found in biological membranes of a huge diversity of organisms, from cyanobacteria to angiosperms and humans (Falk and Munné-Bosch, 2010). The capacity to synthesize tocopherols seems, however, to be restricted to cyanobacteria and organisms containing chloroplasts as a holdover from its algal past, including all organisms pertaining to the plant kingdom or the malaria parasite (*Plasmodium falciparum*, Nair and Striepen, 2011; Sussmann et al., 2017), where tocopherols occur universally. Here we show a tissue-specific accumulation of various tocochromanol forms in strawberry plants with tocopherols being accumulated not only in photosynthetic tissues (leaves) but also in non-photosynthetic tissues (fruits), while PC-8 accumulates at low amounts in photosynthetic tissues (leaves) only. Among tocochromanols, α -tocopherol was the only form present in the flesh of fruits at the white and full-red stages, thus indicating that this was the only form present both in photosynthetic and non-photosynthetic tissues. While γ -tocopherol may play a significant role as a precursor of α -tocopherol, PC-8 accumulation may exert at best a minor or redundant antioxidant role in strawberry plants.

3.1. Differential tocochromanol composition in leaves and fruits

Tocochromanols were found both in photosynthetic tissues (leaves) and non-photosynthetic tissues (fruits) of strawberry plants. However, tocochromanol composition strongly differed between tissues. Strawberry leaves contained around 175 µg/g fresh weight (FW) of total tocochromanols under control conditions, being α -tocopherol the most abundant form (92.3%), followed by γ -tocopherol and PC-8 (4.7% and 3.0%, respectively, Fig. 1). True fruits (achenes), which contained 75 µg/g FW of total tocochromanols, that is 43% of the amount found in leaves, accumulated α , γ , and δ -tocopherols, but not PC-8. The α -tocopherol precursor, γ -tocopherol, and not the α homologue was the most abundant form among tocochromanols (67.7% compared to 21.9% for γ - and α -tocopherols, respectively) while δ -tocopherol represented the 10.4%. PC-8 was neither found in the flesh of whole fruits, where α -tocopherol was the only tocochromanol present (4 µg/g FW, that is 2% of the amount found in leaves). PC-8 has been shown to occur in various plant species and plant organs, including both photosynthetic tissues (leaves) and non-photosynthetic tissues (fruits and seeds, Kruk et al., 2014). In strawberry plants, PC-8 appears to be present at low amounts and occurs in photosynthetic tissues only. Interestingly, tocopherol cyclase (VTE1) uses both plastoquinol-9 and dimethylbenzoquinol to form PC-8 and γ -tocopherol, respectively, and γ -tocopherol is the immediate precursor of α -tocopherol (Block et al., 2013). It is likely that a low specificity of VTE1 for plastoquinol-9 in photosynthetic tissues and the absence of this substrate in non-photosynthetic tissues may explain the differential accumulation of PC-8 in leaves and fruits of strawberry plants. In any case, however, the low amounts of PC-8 in leaves and its absence in fruits strongly suggest that this tocochromanol plays, if any, a very minor antioxidant role compared to that exerted by α -tocopherol. Furthermore, it should be noted that tocotrienols were not found to occur in either of the tissues examined in the present study, which supports the contention that α -tocopherol is the most important tocochromanol in strawberry plants.

3.2. Influence of stress conditions on tocochromanol composition in leaves

Water stress conditions led to severe reductions in vegetative growth and yield. Despite both control and stressed plants showed RWC above 80% and F_v/F_m values above 0.75 throughout the study (Fig. 2), thus indicating absence of photoinhibitory damage to the photosynthetic

apparatus (Takahashi and Badger, 2011), vegetative biomass was reduced by 70% in stressed plants compared to control ones (Fig. 3). Fruit production was also strongly reduced due to stress conditions, the accumulated number of fruits and total biomass of fruits per plant being reduced by 23% and 65%, respectively, in stressed plants compared to control plants (Fig. 3). Under these conditions, both tocochromanol content and composition were strongly altered. α -Tocopherol content increased under stress conditions, in particular during the fruiting (productive) period, when the amount of this antioxidant reached a maximum of 700 µg/g FW after 12 weeks of treatment (values two- and seven-fold higher than those found for control plants at week 12 and the start of experiments, respectively, Fig. 4). When expressed on a chlorophyll basis, similar differences in tocochromanol content in response to water deficiency were observed (Fig. 4), since chlorophyll contents did not differ largely between both plant groups (Fig. 2). α -Tocopherol content corresponded to 99% of the total tocochromanol content in leaves of stressed plants at the end of the experiment, thus confirming that PC-8 played at best a very minor role as an antioxidant in strawberry plants, also under stress conditions. This strongly differs from that observed in other crops exposed to water deficit, such as maize plants, in which PC-8 increased significantly under water stress (Fleta-Soriano and Munné-Bosch, 2017). In contrast to what occurs in maize plants, where PC-8 contents account for more than 25% of the total tocochromanols in leaves, strawberry plants constitutively accumulated very low amounts of PC-8 in leaves (3% of total tocochromanols, Fig. 1, with this percentage decreasing to <1% under severe stress conditions, Fig. 4). Taken together, these results confirm that PC-8, contrary to tocopherols, is not a universal antioxidant in the plant kingdom and suggest that PC-8 may be redundant to α -tocopherol, at least in all those plant species and organs where both accumulate simultaneously. Finally, it is worth mentioning that γ -tocopherol content in leaves was strongly influenced by the productive stage of plants, leaves of fruiting plants showing up to 4-fold higher γ -tocopherol content than vegetative plants. It is tempting to speculate that γ -tocopherol not only functions as the immediate precursor of α -tocopherol, but it might be additionally involved in plant reproduction, as it has been suggested by early studies of tocopherol function in flowering regulation of *Fragaria vesca* L. var. *semperflorens* (Sironval and El Tannir-Lomba, 1960). Further research is however needed to explore this possibility, since it is also likely that in this case γ -tocopherol solely serves as a precursor of α -tocopherol and its accumulation in leaves of reproductive plants simply reflects a higher need

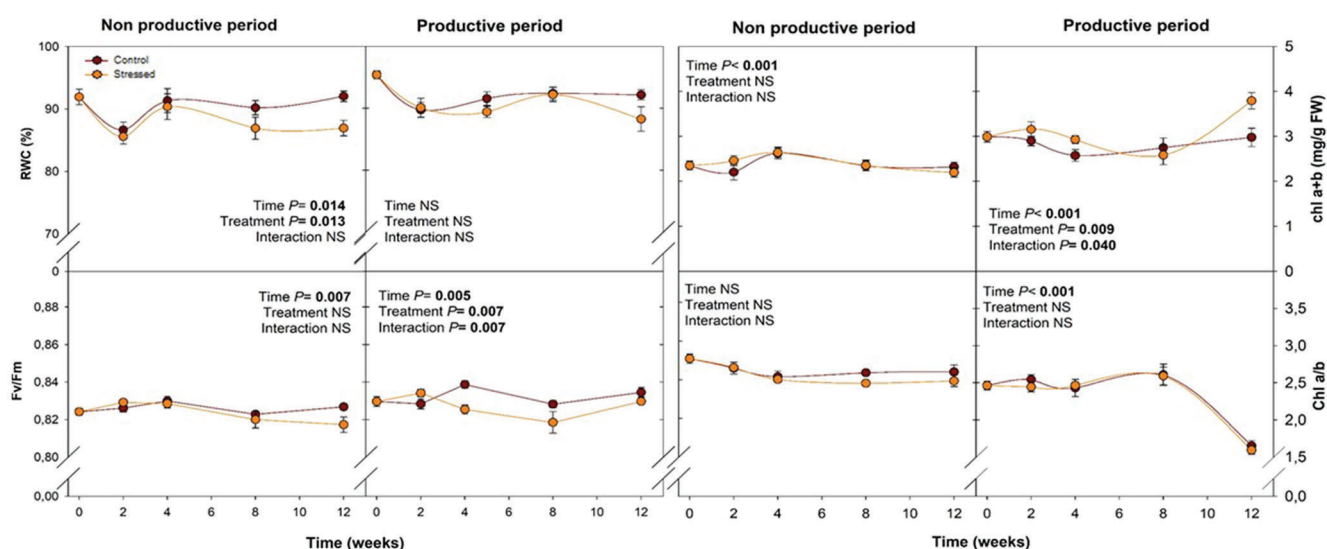


Fig. 2. Variations in the relative water content (RWC), maximum efficiency of PSII photochemistry (F_v/F_m ratio), chlorophyll (Chl) a+b contents and Chl a/b ratio in leaves of strawberry plants under control and stressed conditions during the vegetative (non-productive) and fruiting (productive) periods. Data are the means $\pm$ SE of $n = 10$ individuals. Results of statistics are shown in the inlets.

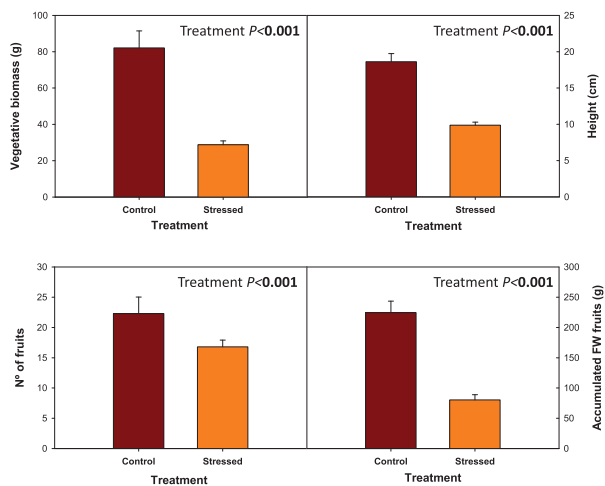


Fig. 3. Effects of reiterated water deficit on vegetative growth and fruit production in strawberry plants. Water deficit in stressed plants caused reductions in growth and fruit production. Data are the means $\pm$ SE of $n = 10$ individuals. Results of statistics are shown in the inlets.

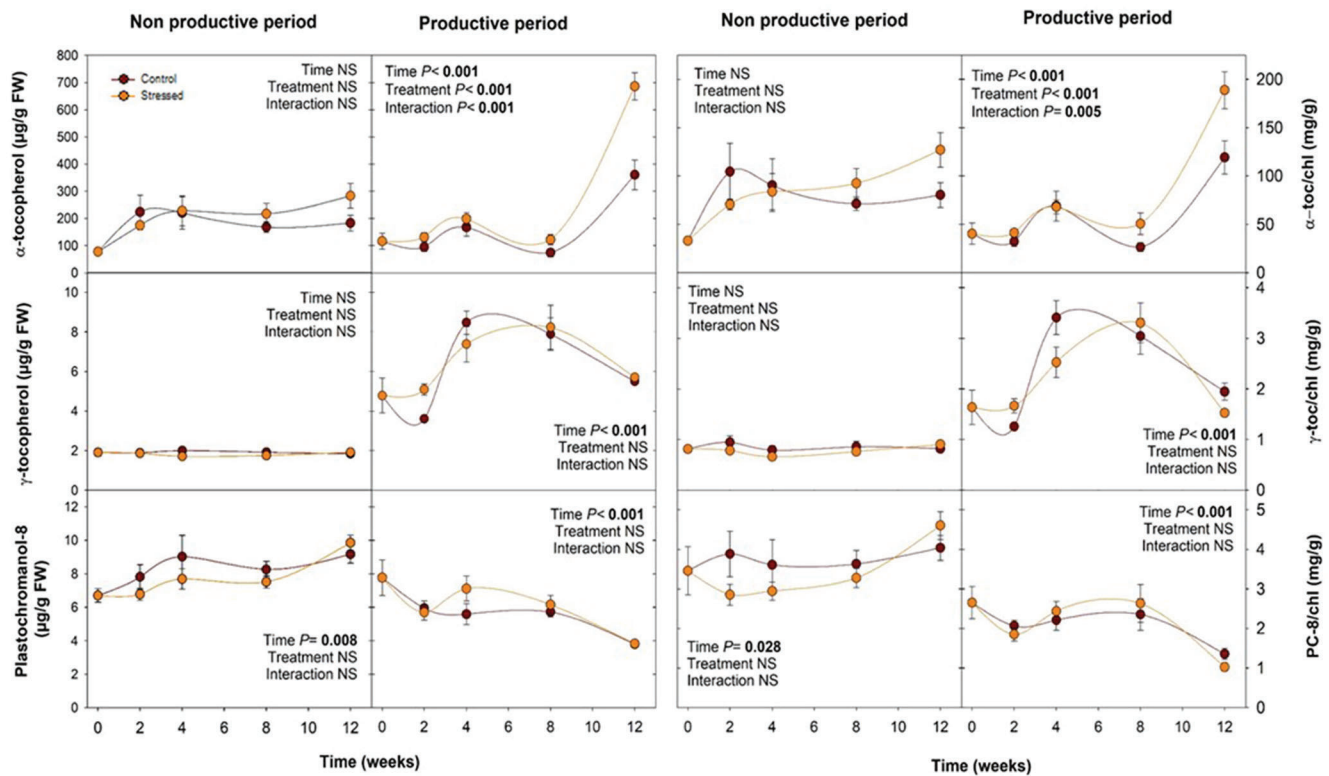


Fig. 4. Variations in the endogenous contents of tocopherols in leaves and tocopherols/chlorophylls ratio of strawberry plants under control and stressed conditions during non-productive and productive periods. Data are the means $\pm$ SE of $n = 10$ individuals. Results of statistics are shown in the inlets.

for α -tocopherol biosynthesis (γ -tocopherol accumulation acting as a reservoir of the most active antioxidant α -tocopherol).

3.3. Stress conditions shift tocopherol composition in strawberry fruits

Water deficit not only reduced yield but shifted the tocochromanol composition of strawberry fruits. Whole fruits of strawberry plants accumulated tocopherols only (neither PC-8 nor tocotrienols were found), and the contents of tocopherols were influenced by both stress conditions and the fruit developmental stage (Fig. 5A). Mature strawberries (whole fruits) contained below 10 $\mu\text{g/g}$ FW of total tocochromanols under control conditions, that is 6% of the amount found in leaves, being both α - and γ -tocopherols quite abundant but with non-detectable PC-8 and tocotrienols (<0.01 $\mu\text{g/g}$ FW). α -Tocopherol content decreased during fruit development, with maximum levels observed at the early, small green (SG) stage, and minimum levels occurring at full maturity or full red (FR) stage (Fig. 5). Interestingly, however, not only ripen fruits contained tocopherols, but also fruits with a completely white appearance (Fig. 6). At this stage the content of α -tocopherol in

the flesh (with achenes excluded) was ca. 5 $\mu\text{g/g}$ FW, and this homologue was the only tocopherol form found in the flesh at the WT stage, since γ -tocopherol accumulated in the achenes (true fruits) only (Fig. 6). This is an example of α -tocopherol accumulation in a white, non-photosynthetic tissue in plants, and although it is not the only example found in the literature (e.g. tepals of *Lilium* flowers, Arrom and Munné-Bosch, 2010), it opens new questions on the metabolic origin of this tocochromanol in non-photosynthetic tissues (strawberry fruits at the white and full-red stages). It is possible that part or all of this α -tocopherol content, which was still quite high in the flesh of whole fruits at the white stage (around 5 $\mu\text{g/g}$ FW), still remains in the fruit as part of remnant chloroplast membranes that have been degraded during fruit ripening. It is interesting to note, however, that the flesh of whole fruits at a later stage of ripening (full-red stage) kept α -tocopherol contents above 3 $\mu\text{g/g}$ FW, the contents of this antioxidant not being significantly affected by the water deficit treatment. Therefore, it is likely that the flesh of the maturing whole fruit still maintains the capacity to synthesize tocopherols and specifically accumulates α -tocopherol, an aspect that requires further investigation.

γ -Tocopherol content was not influenced by fruit developmental stage, but by stress conditions. Fruits from stressed plants contained more γ -tocopherol than fruits from control plants (Fig. 5). However, these differences were due to water deficit effects on the water content of fruits, since γ -tocopherol content did not differ between fruits of control plants and stressed plants in the achenes neither at the WT and FR stages (Fig. 6). In other words, although γ -tocopherol content in whole fruits increased in response to stress conditions, and this is an interesting observation in terms of food chemistry, this was caused by the production of smaller and drier fruits in stressed plants compared to control plants. Furthermore, a strong correlation was found (considering all tissues studied together) between vitamin E and chlorophyll contents (Fig. 7). Although this is in agreement with the idea that vitamin E is synthesized and exerts an antioxidant role mainly in chloroplasts, therefore highlighting the link between tocochromanols and chloroplasts; the presence of α -tocopherol in the flesh of whole fruits at the white stage poses intriguing questions about the possible extra-chloroplastic location of vitamin E in plants (Muñoz and Munné-Bosch, 2019).

3.4. Achenes are an extraordinary source of vitamin E

Vitamin E is an essential micronutrient for humans. The recommended intake ranges between 3 and 15 mg per day depending on the countries and the age but the global intake is in suboptimal levels (Péter et al., 2015). Its biological role has been largely associated with its antioxidant properties protecting cell membranes from oxidative damage, but it appears that its beneficial effects may also be due to the modulation of signal transduction and gene expression, with differential roles for the α and γ vitamers. The major emerging novel functions for vitamin E described in humans are related with modulation of inflammatory processes and with cytoprotection in the liver and in the brain (Galli et al., 2017; Reboul, 2017). In this sense, it is worth mentioning that tocopherol contents are very high in true fruits (achenes) of strawberry plants, especially γ -tocopherol. While whole fruits accumulate less tocopherols than vitamin E-rich fruits, such as olives, blackberries, mamey sapote, avocados or kiwis (Food Data Central of USDA), the true fruit (achenes) of strawberry plants accumulates two-fold higher amounts of vitamin E than olives on a fresh matter basis (75 $\mu\text{g/g}$ FW vs. 38 $\mu\text{g/g}$ FW, Food Data Central of USDA). These results are in agreement with other studies, which showed higher antioxidant content in achenes than flesh, indicating that strawberry achenes are an important source of bioactive compounds (Ariza et al., 2016). It should be noted, however, that not all tocopherols occur in the form of the most active vitamin E, α -tocopherol, but most of it accumulates in the form of its precursor γ -tocopherol, which once ingested cannot be converted to α -tocopherol in the human body.

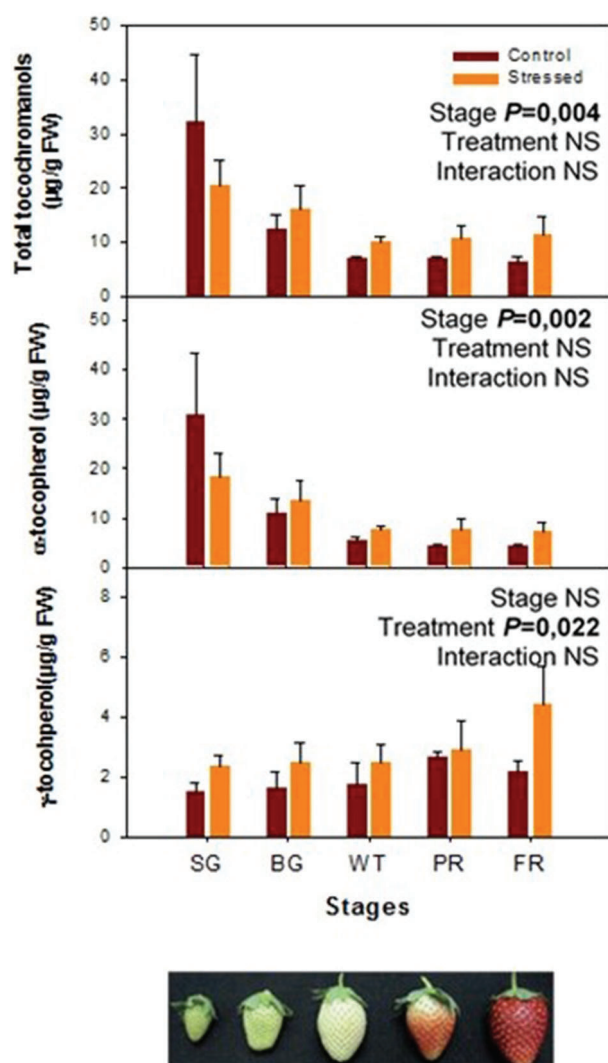


Fig. 5. Variations in the endogenous contents of tocochromanols in whole fruits of strawberry plants at various developmental stages under control and stressed conditions. Data are the means $\pm$ SE of $n = 3-4$. Results of statistics are shown in the inlets. Fruit developmental stages: SG, small green; BG, big green; DG, de-greening; WT, white; PR, partial red; FR, full red. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Fruit		Vitamin E ($\mu\text{g/g}$ FW)
	Olives (green, pickled)	38,1
	Blackberries	25,1
	Mamey sapote	21,1
	Avocado	20,7
	Kiwi	14,6
	Strawberries	2,9
This study: whole false fruit		6,37
flesh		4
achenes		75

Data obtained from the Food Data Central of USDA

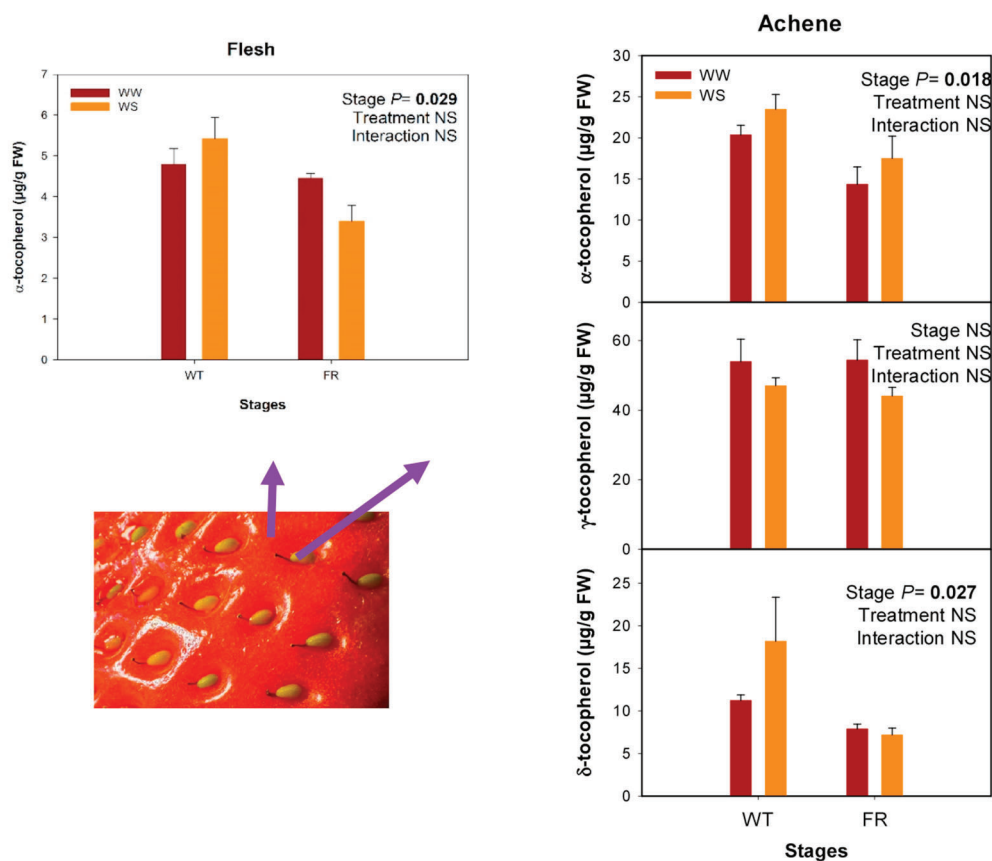


Fig. 6. Variations in the endogenous contents of tocopherols in the flesh and achenes of whole fruits at various developmental stages under control and stressed conditions. Data are the means $\pm$ SE of $n = 3$. Fruit developmental stages: WT, white; FR, full red. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

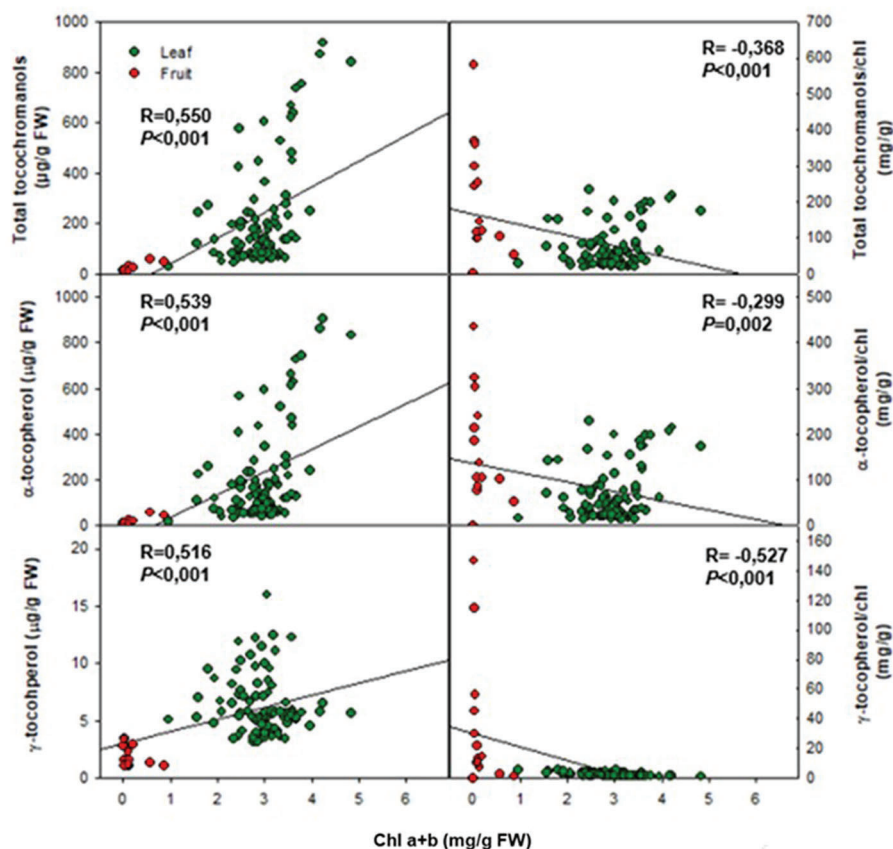


Fig. 7. Relationship between the contents of chlorophyll *a*+*b* and tocopherols, both expressed on a (A) fresh weight and (B) chlorophyll basis, in leaves (in green) and whole fruits (in red) of strawberry plants. Results of Pearson regression analyses are shown in the inlets. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

4. Conclusions

Tocopherols differentially accumulate on strawberry plants depending on the tissue, growth conditions and developmental stage. Although vitamin E accumulation strongly correlates with chlorophyll contents, and hence with chloroplasts, in leaves and fruits, several factors influence their tocopherol content and composition. α -Tocopherol is the major tocopherol in leaves, while γ -tocopherol is the major tocopherol in true fruits, achenes representing one of the fruits with the highest vitamin E contents. Stress conditions promote the accumulation of tocopherols, but not that of PC-8, shifting the tocopherol composition of both leaves and fruits, thus suggesting PC-8 plays at best a minor antioxidant role in strawberry plants, contrary to tocopherols. α -Tocopherol not only accumulates in photosynthetic tissues (at very high amounts in leaves and whole fruits at green stages), but also in non-photosynthetic tissues (although to a lesser extent, in the flesh at the white stage), in strawberry plants. Overall, results suggest that α -tocopherol not only plays a role in photosynthetic tissues but also in non-photosynthetic tissues of strawberry plants, γ -tocopherol may play a significant role as a precursor of α -tocopherol, and finally PC-8 accumulation may exert at best a minor or redundant antioxidant role in strawberry plants. Further research is however needed to better understand the biosynthesis, transport and function of these antioxidants in plants.

Author contributions

SMB conceived and designed the study with the help of AC and AA. AC, AA and RP performed experiments. SMB wrote the manuscript with the help of AC. AC and AA prepared all figures. All authors contributed

to the discussion of ideas, revised and approved the final manuscript.

CRediT authorship contribution statement

Andrea Casadesús: Conceptualization, Software, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing - original draft. **Alba Arabia:** Software, Formal analysis, Investigation. **Ricard Pujolriu:** Formal analysis, Investigation. **Sergi Munné-Bosch:** Conceptualization, Project administration, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Supervision, Funding acquisition.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We thank APC Europe S.L. and to Experimental Fields of the University of Barcelona for their contribution to the experimental infrastructure. We are also indebted to the Generalitat de Catalunya for the 2017 SGR 980 grant and ICREA Academia award given to SMB.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.06.038>.

References

- Ariza, M., Reboredo-Rodríguez, P., Mazzoni, L., Forbes-Hernández, T., Giampieri, F., et al., 2016. Strawberry achenes are an important source of bioactive compounds for human health. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1103.
- Aroca, R., 2012. *Plant Responses to Drought Stress: from Morphological to Molecular Features*. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- Arrom, L., Munné-Bosch, S., 2010. Tocopherol composition in flower organs of *Lilium* and its variations during natural and artificial senescence. *Plant Sci.* 179, 289–295.
- Atkinson, J., Epand, R.F., Epand, R.M., 2008. Tocopherols and tocotrienols in membranes: a critical review. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 739–764.
- Azzi, A., 2010. Many tocopherols, one vitamin E. *Mol. Aspect. Med.* 61, 92–103.
- Bermúdez, L., et al., 2018. A tomato tocopherol-binding protein sheds light on intracellular α -tocopherol metabolism in plants. *Plant Cell Physiol.* 59, 2188–2203.
- Block, A., et al., 2013. Functional modeling identifies paralogous solanesyl-diphosphate synthases that assemble the side chain of plastoquinone-9 in plastids. *J. Biol. Chem.* 288, 27594–27606.
- 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 Cell Physiol.* 52, 1389–1400.
- Falk, J., Munné-Bosch, S., 2010. Tocochromanols functions in plants: antioxidation and beyond. *J. Exp. Bot.* 61, 1549–1566.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2018. *Agriculture Database*. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- Fleta-Soriano, E., Munné-Bosch, S., 2017. Enhanced plastochromanol-8 accumulation during reiterated drought in maize (*Zea mays* L.). *Plant Physiol. Biochem.* 112, 283–289.
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2009. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants Redox Signal.* 11, 861–905.
- Galli, F., Azzi, A., Birringer, M., Cook-Mills, J., Eggersdorfer, M., et al., 2017. Vitamin E: emerging aspects and new directions. *Free Radic. Biol. Med.* 102, 16–36.
- Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J.M., Quiles, J., Mezzetti, B., Battino, M., 2012. The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition* 28, 9–19.
- Gjolami, M., Rahemi, M., Kholdebarin, B., Rastegar, S., 2012. Biochemical responses in leaves of four fig cultivars subjected to water stress and recovery. *Sci. Hortic.* 148, 109–117.
- Hong-bo, S., et al., 2008. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *C. R Biol* 331, 433–441.
- Kodad, O., Company, R., Alonso, J.M., 2018. Genotypic and environmental effects on tocopherol content in almond. *Antioxidants* 7, 6.
- Kruk, J., Szymanska, R., Cela, J., Munné-Bosch, S., 2014. Plastochromanol-8: fifty years of research. *Phytochemistry* 108, 9–16.
- Loyola, J., Verdugo, I., González, E., Casaretto, J., Ruiz-Lara, S., 2012. Plastidic isoprenoid biosynthesis in tomato: physiological and molecular analysis in genotypes resistant and sensitive to drought stress. *Plant Biol.* 14, 149–156.
- Marok, M., Tarrago, L., Ksas, B., Henri, P., Arous-Belbachir, O., et al., 2013. A drought-sensitive barley variety displays oxidative stress and strongly increased contents in low-molecular weight antioxidant compounds during water deficit compared to a tolerant variety. *J. Plant Physiol.* 170, 633–645.
- Munné-Bosch, S., 2005. The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *J. Plant Physiol.* 162, 743–748.
- Munné-Bosch, S., Alegre, L., 2002. The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21, 31–57.
- Munné-Bosch, S., Queval, G., Foyer, C.H., 2013. The impact of global change factors on redox signaling underpinning stress tolerance. *Plant Physiol.* 161, 5–19.
- Muñoz, P., Munné-Bosch, S., 2019. Vitamin E: biosynthesis, transport and function. *Trends Plant Sci.* 24, 1040–1051.
- Nair, S.C., Striepen, B., 2011. What do human parasites do with a chloroplast anyway? *PLoS Biol.* 9, e1001137.
- Obranović, M., Škevin, D., Kraljić, K., Pospišil, M., Nederal, S., Blekić, M., Putnik, P., 2015. Influence of climate, variety and production process on tocopherols, plastochromanol-8 and pigments in flaxseed oil. *Food Technol. Biotechnol.* 53, 496–504.
- Oliván, A., Munné-Bosch, S., 2010. Diurnal patterns of α -tocopherol accumulation in Mediterranean plants. *J. Arid Environ.* 74, 1572–1576.
- Péter, S., Friedel, A., Roos, F.F., Wyss, A., Eggersdorfer, M., et al., 2015. A systematic review of global α -tocopherol status as assessed by nutritional intake levels and blood serum concentrations. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 85, 261–281.
- Podda, A., Pollastri, S., Bartolini, P., Pisuttu, C., Pellegrini, E., et al., 2019. Drought stress modulates secondary metabolites in *Brassica oleracea* L. convar. *acephala* (DC) Alef, var. *sabellica* L. *J. Sci. Food Agric.* <https://doi.org/10.1002/jsfa.9816>.
- Reboul, E., 2017. Vitamin E bioavailability: mechanisms of intestinal absorption in the spotlight. *Antioxidants* 6, 95.
- Savoi, S., Wong, D., Arapistas, P., Miculan, M., Bucchetti, B., et al., 2016. Transcriptome and metabolite profiling reveals that prolonged drought modulates the phenylpropanoid and terpenoid pathway in white grapes (*Vitis vinifera* L.). *BMC Plant Biol.* 16, 67.
- Siger, A., Kachlicki, P., Czubiński, J., Polcyn, D., Dwiecki, K., Nogala-Kalucka, M., 2014. Isolation and purification of plastochromanol-8 for HPLC quantitative determinations. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 116, 413–422.
- Sironval, C., El Tannir-Lomba, J., 1960. Vitamin E and flowering of *Fragaria vesca* L. var. *semperflorens* Duch. *Nature* 185, 855–856.
- Sussmann, R.A.C., Fotoran, W.L., Kimura, E.A., Katzin, A.M., 2017. *Plasmodium falciparum* uses vitamin E to avoid oxidative stress. *Parasites Vectors* 10, 461.
- Takahashi, S., Badger, M.R., 2011. Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends Plant Sci.* 16, 53–60.
- Zuur, A., Ieno, E., Elphick, C., 2009. A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods Ecol. Evol.* 1, 3–14.

CAPÍTOL 2



Relació entre els jasmonats i l'acumulació de vitamina E en les plantes: un cas d'estudi en l'arbust mediterrani *Cistus albidus* L.

Chapter 2. Linking jasmonates with vitamin E accumulation in plants: a case study in the Mediterranean shrub *Cistus albidus* L.

Andrea Casadesús, Rachida Bouchikh, Marina Pérez-Llorca, Sergi Munné-Bosch

Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Research Institute in Biodiversity (IrBio), University of Barcelona, Barcelona, Spain

Publicat a Planta, 2021, 253:36.

Mentre la vitamina E és coneguda per les seves propietats antioxidants, estant involucrada en la resposta de les plantes a l'estrès abiòtic, els jasmonats estan generalment relacionats amb la resposta a l'estrès biòtic en les plantes. Estudar-los en plantes no model sota condicions naturals és crucial pel coneixement de la seva relació, la qual cosa ajudarà a entendre millor els mecanismes i els límits de tolerància a l'estrès per implementar millors estratègies de conservació en ecosistemes vulnerables. Es va estudiar un arbust típicament mediterrani, l'estepa blanca (*C. albidus*), sota condicions naturals durant tres hiverns i es van analitzar l' α - i γ -tocoferol, i les tres principals formes de jasmonats, l'OPDA, el JA, i la JA-Ile. Els resultats van mostrar que els continguts de JA es correlacionaven positivament amb l'acumulació de vitamina E, particularment amb el γ -tocoferol, el precursor de l' α -tocoferol (la forma més activa de vitamina E). Aquest resultat va ser confirmat mitjançant aplicacions exògenes de MeJA en discs foliars sota condicions controlades, on augmentaven els nivells de γ -tocoferol amb l'aplicació de 0.1 mM MeJA i d' α -tocoferol a 1 mM MeJA. A més a més, una meta-anàlisi complementaria amb els treballs prèviament publicats va revelar una correlació positiva entre el JA i la vitamina E, tot i que aquesta variava segons l'espècie i les condicions. Es va observar però, una forta correlació negativa entre els tocoferols totals i l'OPDA (el precursor del JA localitzat als cloroplasts). Aquest efecte antagonista va ser observat entre l' α -tocoferol i l'OPDA però no entre el γ -tocoferol i l'OPDA. Es conclou que (i) les variacions en els jasmonats i la vitamina E degudes a la variabilitat anual, interindividual, i de l'orientació solar, són compatibles amb una regulació parcial de l'acumulació de vitamina E per part dels jasmonats, (ii) la vitamina E podria exercir també un paper en la modulació de la biosíntesi de l'OPDA, amb un efecte menor, si n'hi hagués, sobre els altres jasmonats, i (iii) podria existir un compromís entre l'acumulació de vitamina E i jasmonats en la regulació de la resposta a l'estrès abiòtic i biòtic en les plantes.



Linking jasmonates with vitamin E accumulation in plants: a case study in the Mediterranean shrub *Cistus albidus* L.

Andrea Casadesús^{1,2} · Rachida Bouchikh¹ · Marina Pérez-Llorca¹ · Sergi Munné-Bosch^{1,2} 

Received: 3 October 2020 / Accepted: 5 January 2021 / Published online: 18 January 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH, DE part of Springer Nature 2021

Abstract

Main conclusion Jasmonic acid positively modulates vitamin E accumulation, but the latter can also partly influence the capacity to accumulate the jasmonic acid precursor, 12-*oxo*-phytodienoic acid, in white-leaved rockrose (*Cistus albidus* L.) plants growing in their natural habitat. This study suggests a bidirectional link between chloroplastic antioxidants and lipid peroxidation-derived hormones in plants.

Abstract While vitamin E is well known for its antioxidant properties being involved in plant responses to abiotic stress, jasmonates are generally related to biotic stress responses in plants. Studying them in non-model plants under natural conditions is crucial for the knowledge on their relationship, which will help us to better understand mechanisms and limits of stress tolerance to implement better conservation strategies in vulnerable ecosystems. We studied a typical Mediterranean shrub, white-leaved rockrose (*Cistus albidus*) under natural conditions during three winters and we analyzed both α and γ -tocopherol, and the three main jasmonates forms 12-*oxo*-phytodienoic acid (OPDA), jasmonic acid (JA), and jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile). We found that JA contents positively correlated with vitamin E accumulation, most particularly with γ -tocopherol, the precursor of α -tocopherol (the most active vitamin E form). This finding was confirmed by exogenous application of methyl jasmonate (MeJA) in leaf discs under controlled conditions, which increased γ -tocopherol when applied at 0.1 mM MeJA and α -tocopherol at 1 mM MeJA. Furthermore, a complementary meta-analysis study with previously published reports revealed a positive correlation between JA and vitamin E, although this relationship turned to be strongly species specific. A strong negative correlation was observed, however, between total tocopherols and OPDA (a JA precursor located in chloroplasts). This antagonistic effect was observed between α -tocopherol and OPDA, but not between γ -tocopherol and OPDA. It is concluded that (i) variations in jasmonates and vitamin E due to yearly, inter-individual and sun orientation-driven variability are compatible with a partial regulation of vitamin E accumulation by jasmonates, (ii) vitamin E may also exert a role in the modulation of the biosynthesis of OPDA, with a much smaller effect, if any, on other jasmonates, and (iii) a trade-off in the accumulation of vitamin E and jasmonates might occur in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants.

Keywords Abiotic stress · α -Tocopherol · γ -Tocopherol · Jasmonic acid · Jasmonoyl-isoleucine · 12-*oxo*-phytodienoic acid · Sun orientation · Trade-offs

Abbreviations

JA	Jasmonic acid
JA-Ile	Jasmonoyl- isoleucine
MeJA	Methyl jasmonate
MeOPDA	Methyl 12- <i>oxo</i> -phytodienoic acid
OPDA	12- <i>oxo</i> -Phytodienoic acid
ROS	Reactive oxygen species
TAT	Tyrosine aminotransferase

Communicated by Dorothea Bartels.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03570-y>.

✉ Sergi Munné-Bosch
smunne@ub.edu

Extended author information available on the last page of the article

Introduction

The relationship between vitamin E and jasmonates in plant stress responses has gained interest throughout the last decade after the discovery that photoprotective molecules in the chloroplast may influence oxylipin biosynthesis in plants (see Demmig-Adams et al. 2013, 2014). Both the regulation of jasmonates by vitamin E and vice versa have been shown to occur in model plants. On one hand, the role of jasmonates signalling on vitamin E biosynthesis has been demonstrated to occur in *Arabidopsis thaliana* (Sandorf and Holländer-Czytko 2002). The enzyme tyrosine aminotransferase (TAT), which is involved in the early steps of the tocopherol biosynthetic pathway to produce homogentisate, is induced at the mRNA and protein levels by methyl jasmonate (MeJA), methyl 12-*oxo*-phytodienoic acid (MeOPDA) and wounding (Lopukhina et al. 2001; Sandorf and Holländer-Czytko 2002). The induction of TAT by MeJA occurred earlier and was induced more strongly than by MeOPDA and wounding. The induction of TAT by MeJA led to a very large increase in the contents of α -tocopherol and its precursor, γ -tocopherol, thus highlighting the importance of including both forms of vitamin E in the study. In addition, application of MeOPDA and wounding in mutant plants impaired in JA biosynthesis did not result in TAT induction, hence indicating that it is JA and not OPDA the active jasmonate form inducing TAT. Induction of tocopherols biosynthesis by MeJA was also observed in cell cultures of *Amaranthus caudatus* and in sunflower plants (Gala et al., 2005; Antognoni et al., 2009). On the other hand, the putative regulatory role of vitamin E upon jasmonates accumulation and its involvement in cellular signalling was also proposed several years ago (Munné-Bosch et al. 2007). Under high light and cold conditions, a *vte1* mutant of *A. thaliana* (deficient in both α - and γ -tocopherol biosynthesis) showed two-fold higher JA contents than the wild type. Results on the same direction linking vitamin E with jasmonates were also observed in the *vte4* mutant of *A. thaliana* (deficient in α -tocopherol but not γ -tocopherol) under phosphate starvation, but in this case OPDA, rather than JA, contents were higher in the mutant than in the wild type (Simancas and Munné-Bosch 2015).

Studying the relationship between vitamin E and jasmonates in mutants of model plants is very useful for understanding basic plant physiological processes, but it lacks representativity of what really occurs in nature, since plants are exposed to a number of different stresses under natural field conditions. It is in this situation when compromises between the activation of various defence responses could emerge. Unfortunately, there are still few of such studies in non-model plants under natural

conditions, where specific environments and stress combinations may force plants to prioritize between diverse stress defensive responses. Therefore, it appears difficult to draw unequivocal conclusions in studies using model plants under controlled conditions, and separating the pleiotropic effects from causal relationships in genetically modified organisms remains challenging, making necessary complementary studies under more realistic field conditions. Here, we provide a case study that tries to fill this gap and underline the need for testing new models in nature, in this case by exploring the putative bidirectional link between hormones and antioxidants (more specifically jasmonates and tocopherols, respectively) in plants. Furthermore, meta-analyses studies of experiments performed under natural conditions may not only help to test the universality of the bidirectional link between hormones and antioxidants in the plant kingdom, but also unravel the limits of laboratory findings obtained in model plants.

While jasmonates are well established as signalling phytohormones in biotic stress responses (namely necrotrophic pathogens and wounding), vitamin E has recently been proposed as an environmental stress sensing and signalling compound beyond its antioxidant role in chloroplasts (Muñoz and Munné-Bosch 2019; Munné-Bosch 2019). The metabolic framework of the chloroplast in response to stress implies a complex relationship between these two compound families. On the one hand, vitamin E (mainly α -tocopherol) acts as an antioxidant in (physical) quenching and (chemical) scavenging of reactive oxygen species (ROS), preventing lipid peroxidation on account of their double bounds in the phytol moiety and hydroxyl groups in the chromanol ring (Falk and Munné-Bosch 2010; Kruk et al. 2014). Therefore, since jasmonates are oxylipins derived from the lipid peroxidation of chloroplastic membranes, an accumulation of vitamin E in response to abiotic stress could reduce jasmonates contents compromising the biotic stress response (Morales and Munné-Bosch 2015). In addition to this key relationship with jasmonates, vitamin E may play another pivotal role in stress sensing and signalling. It has been suggested that vitamin E could promote stress acclimation by retrograde signalling from chloroplast to nuclei and alter gene expression through accumulation of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphate, an inhibitor of exoribonucleases, to protect microRNAs from degradation (Muñoz and Munné-Bosch 2019; Munné-Bosch 2019).

Diverse functions on stress responses have been associated with different forms of vitamin E and jasmonates. α -Tocopherol generally plays a more essential role than γ -tocopherol against several abiotic stresses (see Munné-Bosch 2005), even though γ -tocopherol is the precursor of α -tocopherol and appears to have some relevance under certain stresses only, such as desiccation tolerance (Abbasi et al. 2007). However, it has also been reported that they could be

interchangeable in the response to water stress in *A. thaliana* (Cela et al. 2011). In addition, under biotic stress, and highlighting the relationship with jasmonates, differential tocopherol accumulation (with mutants preferentially accumulating either α - or γ -tocopherol) leads to altered susceptibility to *Botrytis cinerea* (Cela et al. 2018). It is generally accepted that JA and OPDA are independent messengers and control different sets of jasmonate-responsive genes, and that JA-Ile is the most bioactive form in the jasmonate signalling pathway, at least in the model plant *A. thaliana* (Wasternack and Hause 2013), although some results suggest that this might not always be the case in non-model plants (Cotado et al. 2018). In addition to the biotic stress response, this pathway has been related with a number of abiotic stress responses such as salt or water stress and, in crosstalk with other phytohormone and plant growth regulators, is involved in developmental processes such as root growth or germination (Wasternack and Hause 2013; Per et al. 2018). OPDA has been described to be a regulator of redox homeostasis in *Arabidopsis*, tendril coiling, fertility, embryo development, or seed germination inhibition (Wasternack and Hause 2013; Maynard et al. 2018). Furthermore, each jasmonates form seems to have its own role in the biotic stress response. JA, OPDA and JA-Ile present a different kinetic profile, different abundance patterns and, the OPDA signalling pathway has been proved to be independent from JA after wounding (Taki et al. 2005; Heitz 2016). Thus, it is likely that the relationship between the different forms of vitamin E and jasmonates could be different and may have different implications on plant performance under natural conditions.

Cistus albidus is an endemic shrub that is adapted to Mediterranean-type ecosystems since the Pleistocene and now occupies most of the habitats of these ecosystems (Guzmán et al. 2009). Plant biodiversity in Mediterranean-type ecosystems is driven by climatic factors such as drought, high temperatures and high light conditions in addition to the nutrient scarcity of soils and common perturbations as fire and grazing (Cowling et al. 1995; Cabal et al. 2017; Rodríguez-Ramírez et al. 2017). *C. albidus* success lies in their participation in primary succession after a fire event and their high phenotypic plasticity in response to water availability (Roy and Sonié 1992; Grant et al. 2005). Vitamin E has been demonstrated to be involved in the response of this plant species to drought and high light stress (Munné-Bosch et al. 2003; Oliván and Munné-Bosch 2010) and jasmonates are well accepted to be involved in its biotic response as grazing (Pieterse et al. 2014). In addition, Mediterranean climate provides specific environmental conditions which are useful to assess the relationship between vitamin E and jasmonates. Winter and summer are the most stressful seasons (Loreto and Bonghi 1989; Oliveira and Peñuelas 2002; Martínez-Ferri et al. 2004; Silva-Cancino et al. 2011; Morales et al. 2016), given that temperatures may eventually

lead to freezing in winter and reach values above 35 °C in some cases in summer, while rainfalls are usually gathered in spring and autumn (Köppen 1936). Thus, the aim of the current study was to clarify the relationship between the different forms of vitamin E and jasmonates in non-model plants studying this relationship in a Mediterranean shrub, *Cistus albidus* growing under natural field conditions.

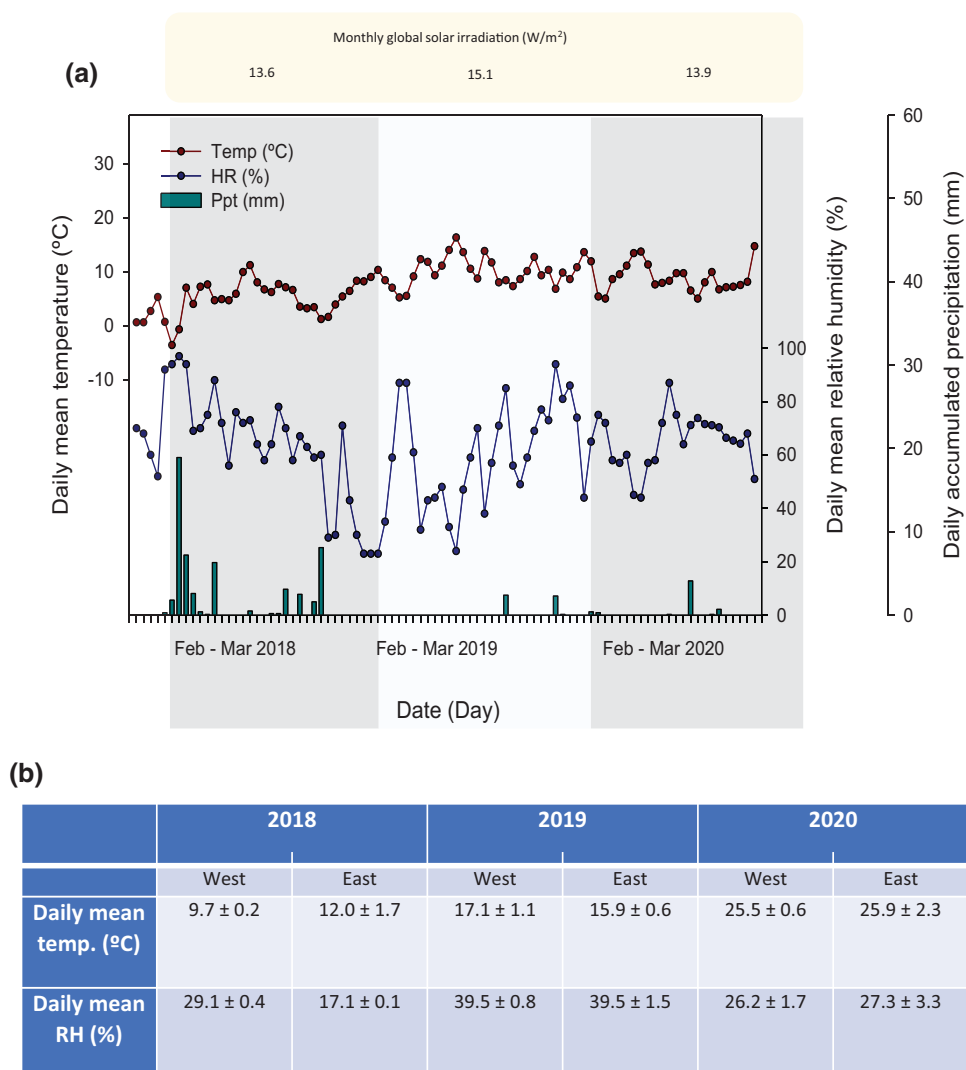
Materials and methods

We studied a natural population of *Cistus albidus* growing under natural conditions at the Montserrat Natural Park, Spain (41.586N 1.830E, 1100 m.a.s.l.) during three consecutive winters (2018, 2019 and 2020). We randomly selected 70 individuals the first winter and 100 on the second and third winters. In order to study the effect of microhabitat, half of the selected individuals were growing in the east-oriented mountainside, while the other half were oriented to the west. Environmental data including solar radiation, temperature, relative humidity and precipitation were obtained with a weather station from the Meteorological Service of Catalonia (MeteoCat) situated at 916 m. a.s.l. at Monistrol de Montserrat (NE Spain). Furthermore, temperature and relative humidity were registered in each mountainside with a portable thermohygrometer (DO9847 Multifunction Meter, Delta Ohm, Padova, Italy).

Samplings

All samplings were performed under Mediterranean winter conditions (Fig. 1a), always at midday on sunny, clear days on the 22nd of March 2018, 11th of March 2019 and 11th of March 2020. The first year was characterized by a rainy winter with cold weather, with a daily mean temperature of 4.5 °C during the previous month before sampling; the second year was characterized by milder temperatures but very scarce rainfall (total accumulated precipitation during the previous month before sampling was 2.4 mm); and the third year was intermediate, with a daily mean temperature of 9.1 °C, relative humidity of 67.1% and an accumulated precipitation of 8.1 mm during the previous month of sampling during winter. During the sampling days, temperature and relative humidity differed in each mountainside only very slightly, registering a very low relative humidity in the east-oriented side during 2018 (Fig. 1b). One apical fully developed leaf of shoots (on the third node) was sampled and used for leaf hydration and chlorophyll fluorescence measurements (F_v/F_m). Two equivalent leaves (of another shoot but equally apical, fully developed and from the third node) were collected, immediately frozen in liquid nitrogen and kept at −80°C until biochemical analyses in the laboratory,

Fig. 1 Climatological conditions during the study. **a** Solar radiation, temperature, relative humidity and precipitation. **b** Temperature and relative humidity during the days of measurement



which included the analysis of endogenous contents of jasmonates, vitamin E and chlorophylls.

Chlorophyll fluorescence and leaf hydration

Maximum efficiency of photosystem II (F_v/F_m) was measured with a fluorimeter Mini-PAM II (Photosynthesis yield analyser, Walz, Germany) in leaves sampled and adapted to dark conditions for 1 h. Leaf hydration (H) was calculated using the following formula ($H = FW - DW/DW$) based on the FW, measured with a precision scale on the sampling day, and the DW, measured after drying the leaf in the oven at 65 °C (Munné-Bosch et al. 2003).

Jasmonates analyses

Extraction and UPLC/ESI-MS/MS analysis of jasmonates, including OPDA, JA and JA-Ile, were performed as described by Müller and Munné-Bosch (2011). An initial

extraction was performed using 100 mg of well-powdered fresh leaf in 500 µL of pure methanol. After adding the deuterium-labelled internal standards, the mixture was vortexed, ultra-sonicated for 30 min (Branson 2510 ultrasonic cleaner, Branson, Danbury, CT, USA), vortexed again and centrifuged at 4 °C for 10 min at 600g. The supernatant was collected, and two re-extractions of the pellet were performed to obtain a volume of the final extract (made of pooled supernatants) of 1 mL. After filtration using a 0.22 µm PTFE filter (Phenomenex, Torrance, CA, USA), the extract was injected into the UPLC/ESI-MS/MS system and jasmonates were analyzed using the negative ion mode as described by Müller and Munné-Bosch (2011).

Vitamin E analyses

Vitamin E analyses included the two major tocopherol homologues, α -tocopherol and γ -tocopherol. Extractions were performed as above, and samples were analyzed

by high-performance liquid chromatography (HPLC) as described by Cela et al. (2011). The extract was filtered using a 0.22 µm PTFE filter (Phenomenex) and injected into the HPLC system (consisting on a Waters 600 controller pump, a Waters 714 plus auto-sampler and a Jasco FP-1520 fluorescence detector). The mobile phase was a mixture of *n*-hexane and 1,4-dioxane (95.5:4.5, v/v) at a flow rate of 0.7 mL/min. Tocopherol homologues were separated on a normal-phase column (Inertsil 100A, 5 µm, 30×250 mm, GL Sciences, Torrance, CA, USA). Fluorescence detection was at an excitation wavelength of 295 nm and emission at 330 nm. Standards of α -tocopherol and γ -tocopherol (Sigma–Aldrich) were used for quantification.

Chlorophyll content

Chlorophyll *a* and *b* were quantified as described by Oliván and Munné-Bosch (2010). 100 µL of the methanolic extract, which was obtained as described before, were diluted 1/10 (v:v) with pure methanol and absorbance was read at 470 nm, 653 nm and 666 nm with a UV/Visible double beam CE Aquarius spectrophotometer (Cecyl Instruments Ltd, Cambridge, UK). To quantify pigment concentrations the equations of Lichtenthaler and Wellburn (1983) were used.

Statistical analyses

A two-way ANOVA was used to determine the effect of “orientation” and “year”. Multiple comparisons were tested with the Tukey’s post hoc test. All differences were considered significant when $P \leq 0.05$. Normality and homoscedasticity of residues were checked as described by Zuur et al. (2009). All statistical tests were performed using R statistical software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Exogenous application experiment

For the study of exogenous JA application under laboratory conditions, leaf discs of 0.8 cm diameter (five replicates per treatment and time point of measurement, each replicate consisting in a Petri dish with 15 discs obtained from different leaves and plants randomly) were obtained from *C. albidus* plants growing in the Experimental Fields of the Faculty of Biology at the University of Barcelona (Barcelona, NE Spain) during November 10th, 2020. Discs were obtained from leaves and immediately immersed in a 10 mM potassium phosphate buffer (pH=6) solution containing the corresponding MeJA concentration and exposed at 21 °C, 12 h:12 h photoperiod (light:darkness), photosynthetically-active photon flux density of 110 µmol m⁻² s⁻¹ and 60% relative humidity during the experiment in a Sanyo versatile environmental test chamber (Sanyo, Osaka, Japan). For

MeJA treatments, discs were treated with either 1 mM or 0.1 mM of MeJA solution, containing 0.01% ethanol and 0.1% Tween-20 (Sigma–Aldrich, Darmstadt, Germany). Control discs were treated with distilled water containing 0.01% ethanol and 0.1% Tween-20. Before and at 2, 4, 6, 24 and 48 h of applications, discs were collected, immersed in liquid nitrogen and then stored at –80 °C for further analysis of vitamin E and chlorophyll contents, which were performed as described before. Furthermore, we obtained the DNA sequence of the negative strand on JBrowse database (jbrowse.arabidopsis.org) of the genes involved in tocopherol biosynthesis in *A. thaliana* to search for possible jasmonate responsive elements in their promoter region. We tried to identify the open reading frame (ORF) including the promoter region, the first start codon (ATG) and the exons using data available in the same database, and in the successful cases, we searched for jasmonate responsive elements described in other studies (Suppl. Table S1).

Meta-analysis study

We used Scopus database to search for relevant studies on the link between jasmonates and vitamin E by checking all published articles containing the words: (“tocopherol” OR “vitamin E”) AND “jasmonic acid”, (“tocopherol” OR “vitamin E”) AND “jasmonate*”, (“tocopherol” OR “vitamin E”) AND “JA”, (“tocopherol” OR “vitamin E”) AND “oxy-lipin*”, (“tocopherol” OR “vitamin E”) AND “OPDA”, (“tocopherol” OR “vitamin E”) AND “12-oxo-phytodienoic acid”, (“tocopherol” OR “vitamin E”) AND “jasmonoyl”. We did not include any filter on publication period coverage, but included articles written in English only. A total number of 74 articles were found following these criteria (see the flow diagram in Suppl. Fig. S1, which was prepared according to the methodology described by Moher et al. 2009).

As eligibility criteria, we considered high quality data if: (i) the raw data of α -tocopherol and JA contents were available on a dry matter basis, instead of using results on a fresh weight basis to prevent a bias due to different water contents, (ii) presented individual values, not mean of a group, as a better approach for the pairwise comparison of the contents of α -tocopherol and JA, and (iii) studies were performed in natural field conditions or under greenhouse, growth chambers or laboratory controlled conditions, but always using leaves, not in cell cultures, since the latter are not always representative or comparable. After applying the aforementioned eligibility criteria, 11 articles could be used for a quantitative analysis of the data (Suppl. Fig. S1 and Suppl. Table S2).

To perform the regression analysis, we pooled all data together (from 1340 individuals), quantified the correlation between α -tocopherol and JA contents by Spearman’s rank correlation test and fitted a proper regression model when

the correlation between the two variables was not lineal. Since data were from different species and environmental conditions, we tested the effect of both factors on the contents of tocopherols and JA applying one-way ANOVA using a GLS model. The model was validated visually by checking the normality and homoscedasticity (Zuur et al. 2009). The correlation between α -tocopherol and JA was then assessed in each category of “conditions” and “species” separately by Spearman’s rank correlation test. For the evaluation of the effect sizes in each study we used Spearman’s correlation coefficient (ρ) since in meta-analysis, when the association between two variables is of interest, Pearson’s correlation coefficient (r) is commonly used as an effect-size measure but Spearman’s coefficient is equal to Pearson’s when $n > 90$, as occur in our study (Rosenberg et al. 2013). All the results were considered significant when $P \leq 0.05$ and all statistical analysis were performed using R statistic software (R Development Core Team 2018).

Results

Vitamin E accumulation correlates positively with JA but negatively with OPDA

Under Mediterranean winter conditions, plants were exposed to low daily mean temperatures and precipitation was scarce, most particularly during 2019 (Fig. 1). However, the population of *C. albidus* studied did not present photoinhibition in any of the three winters (2018, 2019 and 2020, Fig. 2) showing F_v/F_m values above 0.75. Low total chlorophyll content was found during the winter of 2019, with values being strongly influenced by sun orientation, East-oriented

plants showing 50% higher values than West-oriented ones. Leaf hydration was also the lowest during the winter of 2019, although sun orientation did not affect this parameter. Vitamin E contents, expressed as total tocopherols (γ - plus α -tocopherol), fluctuated from 400 to 700 $\mu\text{g/g DW}$, being α -tocopherol the most abundant form and the only homologue affected by sun orientation (Fig. 3a). γ -Tocopherol content was under 10 $\mu\text{g/g DW}$ in winters of 2018 and 2020 but above 20 $\mu\text{g/g DW}$ in the winter of 2019. We observed α -tocopherol contents close to 400 $\mu\text{g/g DW}$ in winters of 2018 and 2020, but values reached up to 600 $\mu\text{g/g DW}$ in the winter of 2019. In this winter, East-oriented plants showed 25% lower contents of α -tocopherol than West-oriented ones, leading to significant differences in total tocopherols content (Fig. 3a). Jasmonates contents also fluctuated through the three winters and between sun orientations (Fig. 3b). We found strong differences in OPDA contents in 2018 and 2019 winters depending on sun orientation. While East-oriented plants displayed values around 1200 ng/g DW during the winter of 2018, plants growing in West orientation showed contents of 100 ng/g DW only. Minimum contents of OPDA were found during winter 2019, but with 90% higher values in East-oriented plants compared to West-oriented ones. OPDA contents ranged between 700 and 800 ng/g DW during the winter of 2020, with no differences between sun orientations. JA contents showed a similar pattern in response to sun orientations. We observed higher contents of JA in the East orientation in 2018 (68%) and 2019 (70%) winters but no differences were observed in 2020. In addition, contents of JA were higher in 2019 than in the other winters, being above 200 ng/g DW this year but below this value in the other winters. Finally, JA-Ile showed the most pronounced difference through different

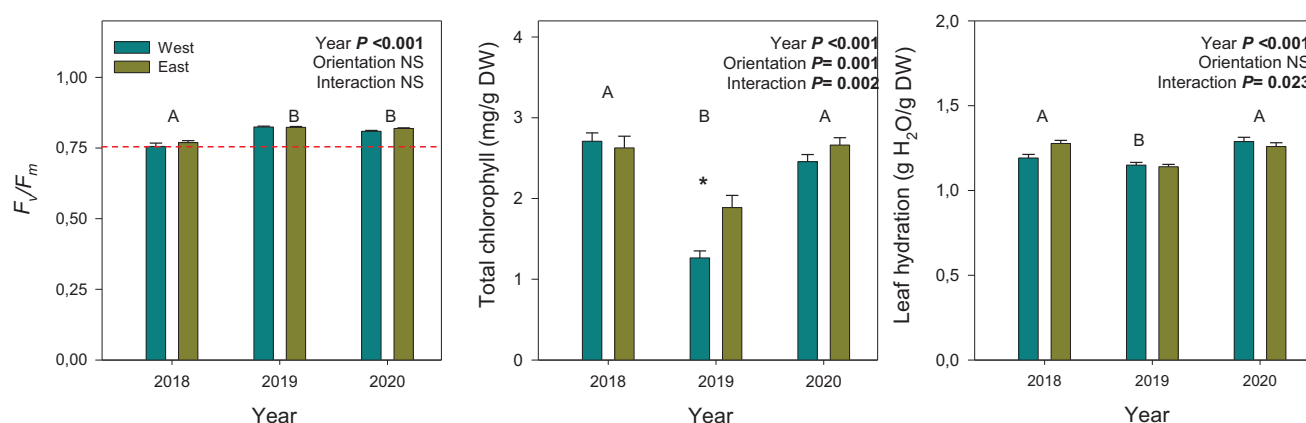


Fig. 2 Physiological status of the *Cistus albidus* population through the three winters classified by sun orientation of the growing site. Maximum efficiency of photosystem II (F_v/F_m), total chlorophyll content (mg/g DW) and leaf hydration (g H₂O/g DW) are shown. Data are mean of $n = 35 \pm \text{SE}$ for 2018 and $n = 50 \pm \text{SE}$ for 2019 and

2020. P values of two-ways ANOVA are in the inlets and P values > 0.05 were considered no significant (NS). Different letters represent differences between years and asterisk represent differences between sun orientation groups of the same year

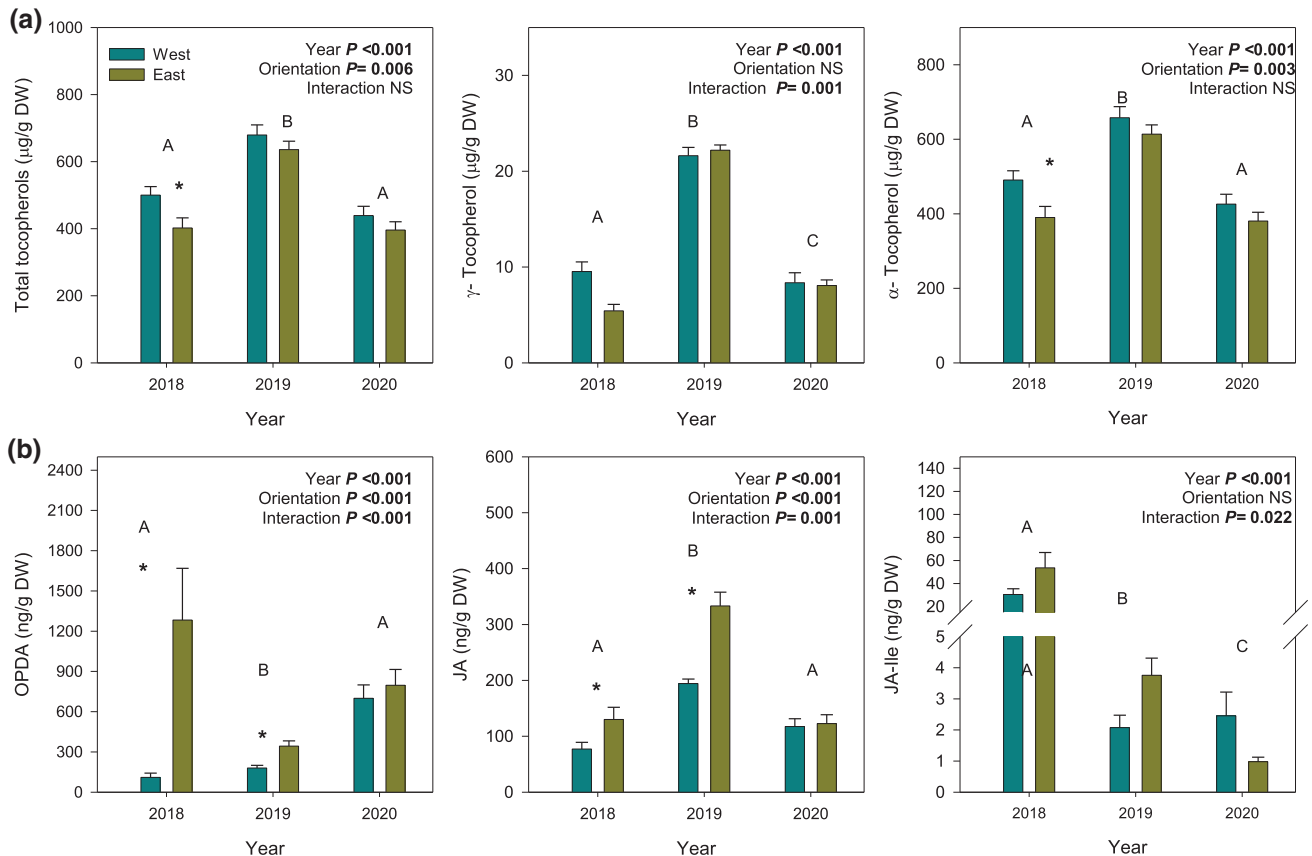


Fig. 3 Foliar vitamin E and jasmonates contents of the *Cistus albidus* population through the three winters classified by sun orientation of the growing site. **a** Total tocopherols (γ and α), γ -tocopherol and α -tocopherol contents expressed in $\mu\text{g/g DW}$. **b** 12-*oxo*-phytodienoic (OPDA), jasmonic acid (JA) and jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) contents expressed in ng/g DW . Data are mean of $n=35 \pm \text{SE}$ for 2018

and $n=50 \pm \text{SE}$ for 2019 and 2020. P values of two-ways ANOVA are in the insets and P values > 0.05 were considered no significant (NS). Different letters represent differences between years and asterisk represent differences between sun orientation groups of the same year

years. While JA-Ile contents ranged between 30 and 50 ng/g DW during the winter of 2018, values kept under 5 ng/g DW with no differences between orientations during the winters of 2019 and 2020 (Fig. 3b).

In the case of *C. albidus* under natural Mediterranean winter conditions, we found a negative correlation between accumulation of vitamin E and OPDA but a positive one between JA and vitamin E (Fig. 4). While the relationship between JA and either α -tocopherol or total tocopherols followed a very slight positive correlation ($\rho = 0.15$, $P = 0.016$, and $\rho = 0.17$, $P = 0.008$, respectively, Fig. 4b), a stronger linear positive correlation was found between JA and γ -tocopherol ($\rho = 0.39$, $P < 0.001$, Fig. 4a). The latter correlation fitted even better with a peak function showing the maximum peak and subsequent decay at a JA concentration of 250 ng/g DW (Fig. 4a). In contrast, total tocopherols negatively correlated with OPDA (Fig. 4c). This negative correlation, even if not that strong, was also found between each form of vitamin E and OPDA (Fig. 4b). No significant correlation was found between either α -tocopherol or total

tocopherols and JA-Ile, although we found a slight negative correlation fitted with a hyperbolic decay function for γ -tocopherol and JA-Ile ($R = 0.2$, $P < 0.001$, Fig. 4b).

The positive correlation between vitamin E and JA accumulation is strongly species specific

We found a positive correlation between JA and α -tocopherol contents when all data from all species examined from the literature survey were pooled together. While a linear correlation was significant, a logarithmic function fitted even better to the data (Fig. 5). Given that plants analyzed in the studies used for the meta-analysis were subjected to different experimental conditions such as “controlled conditions” (including studies both in growth chambers and in greenhouses) and “natural conditions” (all of them obtained under field conditions), we examined this variable as a potential factor and indeed observed an effect on the content of both α -tocopherol ($P < 0.001$) and JA ($P < 0.001$). When each condition evaluated separately, the correlation

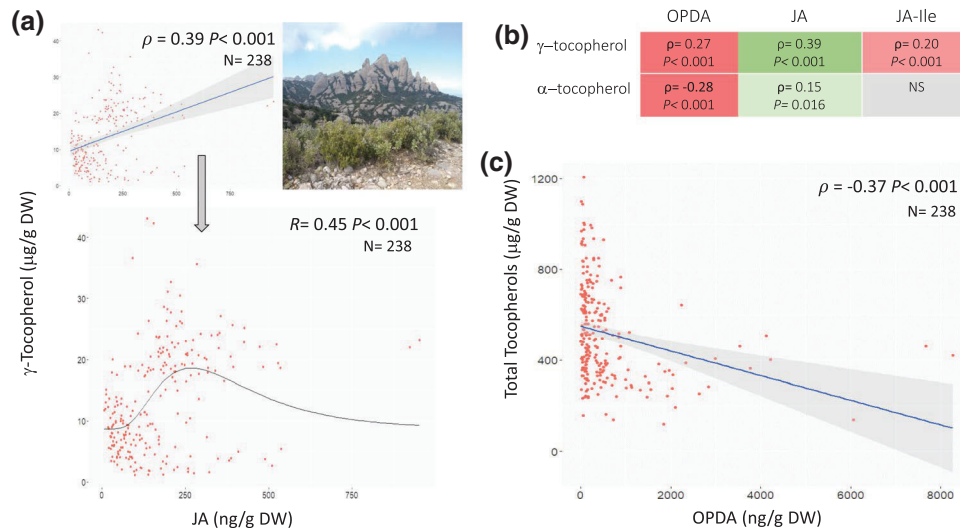


Fig. 4 Data of the *Cistus albidus* population during the three winters. **a** Spearman's linear correlation between γ -tocopherol and JA and the same data fitted with a peak function, $f = y_0 + a \cdot \exp(-0.5 \cdot (\ln(x/x_0)/b)^2)$. **b** Table of linear (showing Spearman's coefficient ρ) and non-linear (showing correlation coefficient R) correlations between both forms of vitamin E (α and γ -tocopherol) and all forms of jasmonates analyzed (12-*oxo*-phytodienoic acid: OPDA, jasmonic acid: JA, and

jasmonoyl-isoleucine: JA-Ile). Green cells represent positive correlation and red cells negative correlation. **c** Correlation between total tocopherols and OPDA. Spearman's correlation coefficient is represented as " ρ " and correlation coefficient of non-linear correlation is represented as " R ". P values of statistical test are in the inlets and P values > 0.05 were considered not significant (NS). N is the number of individuals used in the analysis

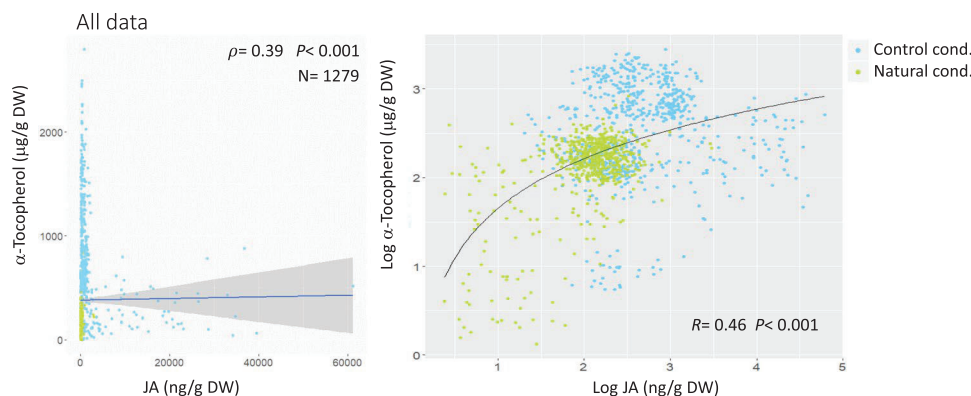


Fig. 5 Correlation between α -tocopherol and jasmonic acid (JA) when all data of the analysis were pooled. **a** Linear correlation. **b** Data transformed to logarithm, $f = \text{if } [x > 0; y_0 + a \cdot \ln(\text{abs}(x)); 0]$. Spearman's correlation coefficient is represented as " ρ " and correla-

tion coefficient of non-linear correlation is represented as " R ". P values of statistical test are in the inlets and P values > 0.05 were considered not significant (NS). n is the number of individuals used in the analysis

was very weak ($\rho = 0.17$, $P < 0.001$) even with logarithmic function in experiments performed under controlled conditions. However, the correlation observed was stronger under natural conditions, in particular when data was log transformed (Fig. 6). The effect of "species" on the content of α -tocopherol and JA was found to be significant ($P < 0.001$) with a strong variability of results depending on the species and number of individuals included in the analyses (Suppl. Table S3). Unfortunately, studies found in the literature survey did not allow to perform a similar test between vitamin E and the JA precursor, OPDA, since the latter has not been

included in previous studies dealing with vitamin E in plants growing under natural field conditions.

Influence of exogenous jasmonates application on tocopherol contents

To test whether α and γ -tocopherol contents may be modulated by JA, methyl jasmonate (MeJA) at two different concentrations was applied to leaf discs under laboratory conditions. While MeJA applied at low concentrations (0.1 mM) caused a significant increase of γ -tocopherol contents, which

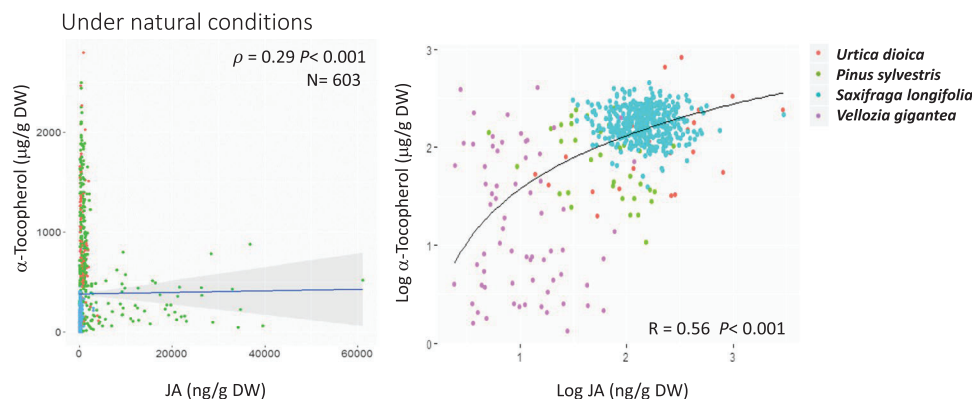


Fig. 6 Correlation between α -tocopherol and jasmonic acid (JA) when only the data from individuals under natural conditions were pooled. (left) linear correlation and (right) data transformed to logarithm, $f = \text{if } [x > 0; y_0 + a \cdot \ln(\text{abs}(x)); 0]$. Spearman's correlation coef-

ficient is represented as “ ρ ” and correlation coefficient of non-linear correlation is represented as “ R ”. P values of statistical test are in the insets and P values > 0.05 were considered not significant (NS). n is the number of individuals used in the analysis

peaked at 48 h of treatment; MeJA at high concentrations (1 mM) had the opposite effect, causing a reduction by 65% in γ -tocopherol content relative to the control (Fig. 7). Indeed, the highest concentrations of MeJA had a negative impact on the contents of γ -tocopherol, which decreased from 22 to 8 g/g DW at 48 h of treatment, but increased α -tocopherol contents from 130 to 200 $\mu\text{g/g DW}$, leading to a slight increase in total tocopherol contents (Fig. 7). These differences due to MeJA treatments were particularly observed when tocopherols were expressed on a chlorophyll basis, with increases in total tocopherols due to the γ -tocopherol increase at 0.1 mM MeJA, and with increases in total tocopherols due to α -tocopherol increases at 1 mM MeJA (Fig. 8). Therefore, a dose-dependent effect was found between exogenous MeJA applications and the contents of γ - and α -tocopherols in *C. albidus* leaf discs. Interestingly, we found a jasmonate responsive element in the promoter region of two of the tocopherol biosynthesis genes examined in the *A. thaliana* sequence database: tocopherol cyclase (*TC* or *VTE1*) and γ -tocopherol methyl transferase (*TMT* or *VTE4*, see Suppl. Figs. S2 and S3 for complete sequences). Specifically, we found the same G-box like element in the promoter regions of the two genes: 5'-CACGTT-3' that is the relative sequence in the negative DNA strand from 5'-AAC GTG-3' of the positive DNA strand described to be a jasmonate responsive element in the *VSP1* gene in *A. thaliana* (Guerineau et al., 2003).

Discussion

The relationship between vitamin E and jasmonates has been considered of physiological relevance due to the implication of this group of chloroplastic antioxidants and oxylipins on abiotic and biotic stress responses (Deming-Adams et al.,

2013). Both abiotic and biotic stresses converge in ROS production in the chloroplast and ROS enhance both antioxidants and oxylipins production. In addition, biotic stress induces enzymatic lipid peroxidation, leading to the formation of several oxylipins, including jasmonates (Farmer and Mueller 2013; Alché 2019; Muñoz and Munné-Bosch 2020). Even though the relationship between the antioxidant system and oxylipins is generally well accepted, the bidirectional link between them and its biological significance is not well established yet. On the one hand, oxylipin messenger compounds, including OPDA, JA and MeJA, have been demonstrated to induce antioxidant production, including both enzymatic antioxidants, such as superoxide dismutase and ascorbate peroxidase, and non-enzymatic, low-molecular-weight antioxidant compounds, such as vitamin E, vitamin C and glutathione (Sandorf and Holländer-Czytko 2002; Sasaki-Sekimoto et al. 2005; Wolucka et al. 2005; Farooq et al. 2016). These findings highlight the importance of oxylipins signaling under stressful situations, in such a way that a positive feedback between antioxidants and lipid peroxidation-derived compounds contribute to maintain an adequate cellular redox homeostasis under stress. On the other hand, the accumulation of some antioxidants and photoprotectants have shown to be in apparent compromise with that of non-enzymatically and enzymatically derived oxylipins, such as OPDA and JA (see Deming-Adams et al. 2013; Ayala et al. 2014), which suggests some limitations in the response of the antioxidant system and jasmonate signaling pathway under stressful situations, so that an antioxidant overproduction under abiotic stress might result in reduced defenses against biotic stress mediated by jasmonates. These relationships are of importance in plants living in ecosystems where abiotic stress is imperative, such as in the Mediterranean-type ecosystems, where drought, high light and extreme temperatures have forced plants to

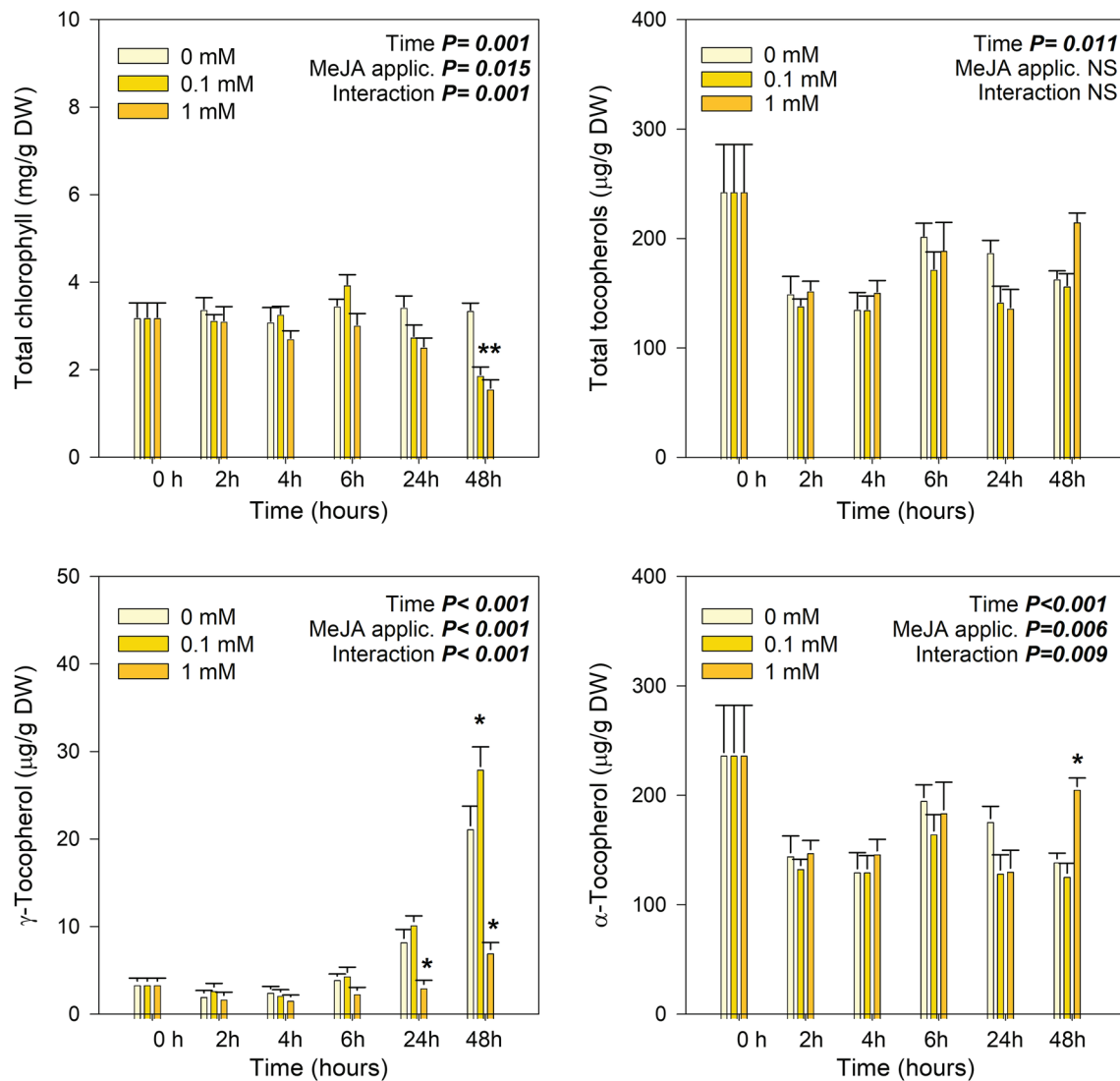


Fig. 7 Influence of JA applications on chlorophyll and tocopherol contents, including chlorophyll a + b, total tocopherols, α -tocopherol and γ -tocopherol contents in *C. albidus* leaf discs. MeJA was applied directly on foliar discs and both pigment and tocopherol contents measured just prior to application (0 h) and after 2 h, 4 h, 6 h, 24 h

and 48 h. Data shows the mean $\pm$ SE of $n=5$ discs, which were obtained from different leaves (each from a different plant). Differences were analyzed by two-way ANOVA ($P<0.05$). NS not significant

adapt to persistent stressful situations. Furthermore, vitamin E appears to be a good sensor of abiotic stresses in plants contributing to chloroplast-to-nucleus retrograde signaling, besides its well-known role in photoprotection in chloroplasts (Munné-Bosch 2019; Muñoz and Munné-Bosch 2019). Aside from influencing the accumulation of lipid hydroperoxides, which are used as a precursor for jasmonate biosynthesis, it has been shown that vitamin E can inhibit LOX activity (Lebold and Traber 2014; Jiang 2017), although it is still unknown whether or not this effect may also be exerted in 13-LOX, which catalyzes the first step in OPDA biosynthesis (Farmer and Mueller 2013). The relationship between vitamin E and jasmonates might therefore

be crucial in better understanding the biology of plants living in their natural habitat, since several abiotic stresses can occur concomitantly to a number of biotic perturbations.

Jasmonic acid, as a phytohormone, is required in low concentrations to exert its signalling role, while OPDA, as a JA precursor, is generally found at higher concentrations. However, each form of jasmonates seems to play its own role, since JA, OPDA and JA-Ile generally present a specific kinetic profile and the OPDA signalling pathway has proved to be independent from JA under wounding (Taki et al. 2005; Heitz 2016). In the present study, we found a relationship between jasmonates and vitamin E in the study of the Mediterranean shrub *C. albidus* under natural field

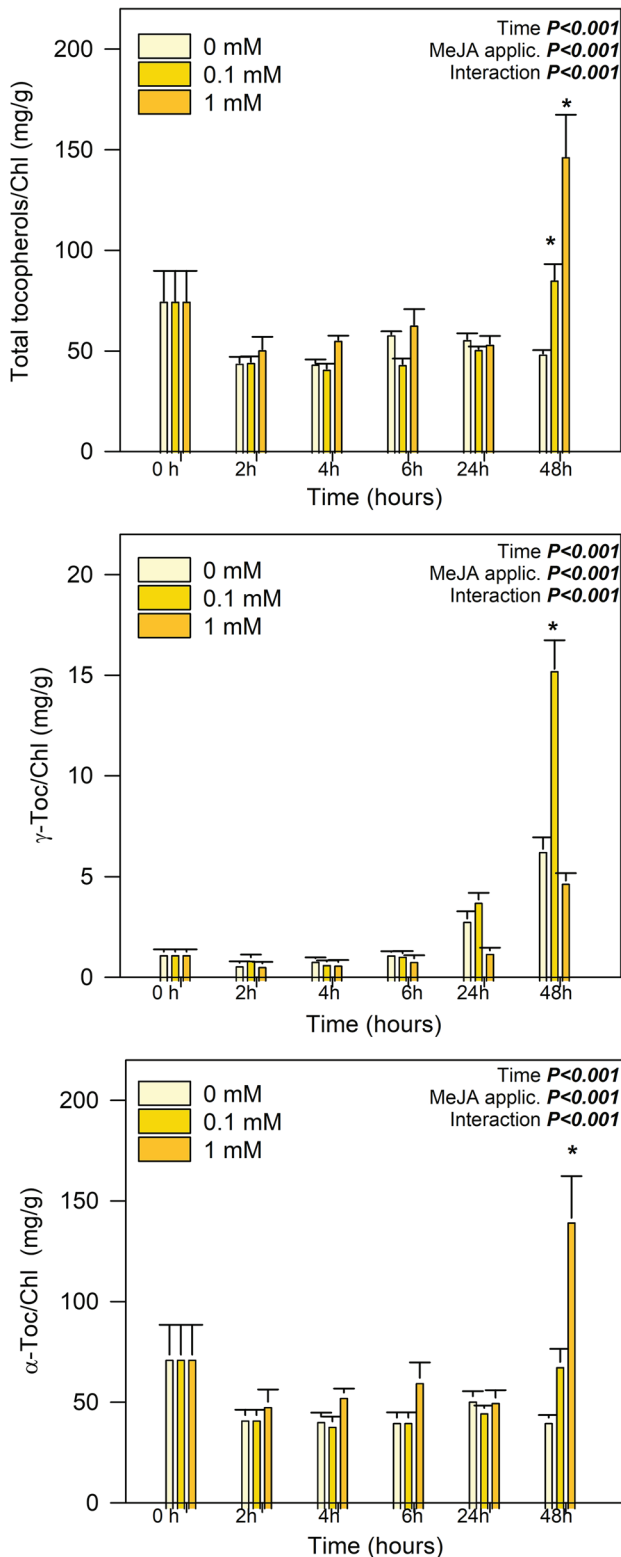


Fig. 8 Influence of JA applications on tocopherol contents per unit of chlorophyll a+b, including the total tocopherols, α -tocopherol and γ -tocopherol per Chl ratio in *C. albidus* leaf discs. Data shows the mean $\pm$ SE of $n=5$ discs, as described for Fig. 7. Differences were analyzed by two-way ANOVA ($P<0.05$). NS not significant. Chl, chlorophyll a+b

conditions, in the experiment using leaf discs of *C. albidus* under controlled laboratory conditions, and in the analysis of data from other species where the positive correlation between JA and tocopherols was stronger under natural than under controlled conditions. Exogenous application of MeJA increased the contents of either γ or α -tocopherol, depending on the concentration applied. This result was supported by sequence analysis of tocopherol biosynthesis genes, which revealed jasmonate responsive elements in VTE1 and VTE4 of *A. thaliana*, the two latter steps in α -tocopherol biosynthesis (Fig. 9). Furthermore, a positive correlation was found between JA and tocopherols in *C. albidus* plants growing under natural field conditions, the correlation being more significant between JA and γ -tocopherol than between JA and α -tocopherol. Furthermore, the correlation between JA and γ -tocopherol decayed after JA concentrations of 250 ng/g DW. Furthermore, a negative correlation between the production of vitamin E and the accumulation of OPDA occurred in *C. albidus* plants growing under natural conditions. Accordingly, another study found a negative correlation between α -tocopherol and linolenic acid (a fatty acid used in the biosynthesis of OPDA) in *A. ordosiea* under salt stress, while JA correlated positively with α -tocopherol (Chen et al. 2017). A key point to understand this relationship [between vitamin E and the capability to synthesize jasmonates (OPDA)] could be the elevated demand of OPDA for jasmonates biosynthesis, compared to lower concentrations required for JA signaling and the fact that both vitamin E and OPDA are localized in the chloroplast, while JA and JA-Ile are found outside the chloroplasts (Muñoz and Munné-Bosch 2020). This finding may have important implications in our understanding of the crosstalk between biotic and abiotic stress responses (Deming-Adams et al. 2013; Morales and Munné-Bosch 2015). While vitamin E is an important antioxidant in the scavenging of ROS and it is the only antioxidant capable of preventing the propagation of lipid peroxidation in chloroplasts in response to abiotic stresses, playing therefore an essential function in photoprotection and in plants response to a number of abiotic stresses (Falk and Munné-Bosch 2010; Kruk et al. 2014), jasmonates demand may particularly increase under biotic stress (Heyer et al. 2018). Although vitamin E content increases with abiotic stress and vitamin E accumulation influences OPDA contents, results suggest that the activation of defence responses triggered by JA and JA-Ile are still possible under these conditions, not only because vitamin E is only influencing the overall oxylipin production and not the enzymes downstream of OPDA in JA and JA-Ile biosynthesis, but also because OPDA is needed at very low amounts to activate a hormonal action through the biosynthesis of the jasmonates JA and JA-Ile. In other words, even when vitamin E is present at high concentrations in chloroplasts, a relatively small fraction of OPDA can lead to very large

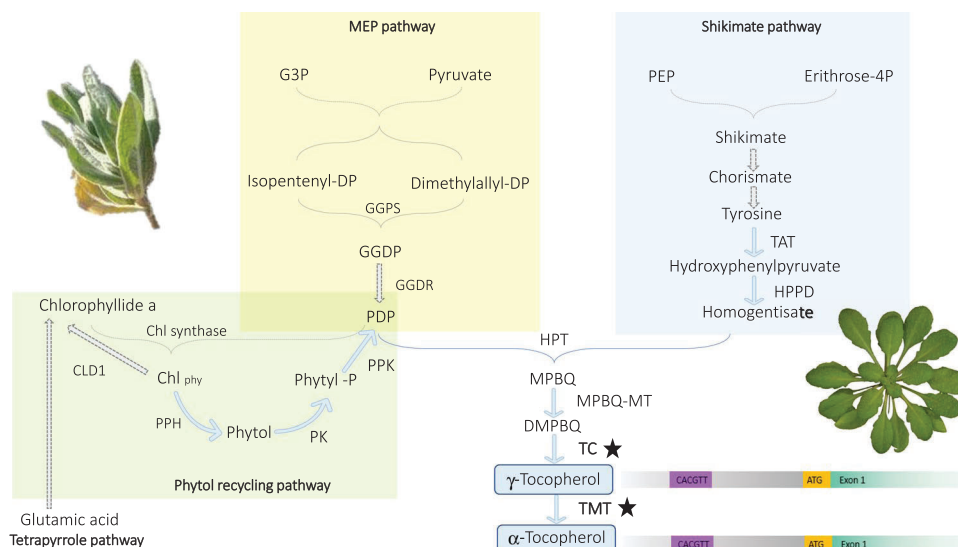


Fig. 9 Simplified scheme of tocopherols biosynthesis in plants. The sequence with the jasmonates responsive element in the promoter regions of TC and TMT are shown. Stars represent genes in which we found jasmonates responsive elements in their promoter region in *A. thaliana* in accordance to the sequence database (see materials and methods for details). *CLD1* chlorophyll dephytylase, *DMPBQ* dimethylphytylbenzoquinol, *G3P* glyceraldehyde-3P, *GGDP* geranylgeranyl diphosphate, *GGDR* geranylgeranyl diphosphate reduc-

tase, *GGPS* geranylgeranyl diphosphate synthase, *HPPD* hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, *HPT* homogentisate phytyl transferase, *MEP* methylerythritol phosphate, *MPBQ* methylphytylbenzoquinol, *MPBQ-MT* *MPBQ* methyltransferase, *PDP* phytyl diphosphate, *PEP* phosphoenolpyruvate, *PK* phytyl kinase, *PPH* pheophytin pheophorbide hydrolase, *PPK* phytyl phosphate kinase, *TAT* tyrosine aminotransferase, *TC* tocopherol cyclase, *TMT* tocopherol methyltransferase

increases in JA and JA-Ile, because (i) these enzymatic reactions do not appear to be under control of vitamin E, and (ii) the latter are found and play a hormonal role at much lower concentration compared to OPDA.

During Mediterranean winters, photoinhibition is frequent due to relatively low temperatures and high solar irradiance concomitant with drought (Oliveira and Peñuelas 2002; Martínez-Ferri et al. 2004; Morales et al. 2016). Despite the presence of these conditions during our study, the population of *C. albidus* did not present winter photoinhibition. It is known that vitamin E is an efficient antioxidant mechanism to avoid this photoinhibition (Falk and Munné-Bosch 2010; Kruk et al. 2014) and we observed α -tocopherol contents above 370 $\mu\text{g/g}$ DW and low levels of chlorophylls indicating that the population was facing abiotic stress at the same time efficiently preventing photoinhibitory damage (Oliván and Munné-Bosch 2010; Pérez-Llorca et al. 2019). Furthermore, although not quantified in our study, the *C. albidus* population could be exposed to biotic stress since after the observation of elevated contents of OPDA (around 1200 ng/g DW) and, at lower level, JA-Ile (about 60 ng/g DW), we recorded high presence of herbivory damage in the population and we observed the presence of herbivores such as goats and caterpillars during the study (data not shown). In addition, the sun orientation in the growing site strongly affected jasmonate contents, which is in accordance with another study where herbivory induced jasmonates content,

and these differed between *Asclepias syriaca* individuals exposed to sun or shade (Agrawal et al. 2012). Thus, in regard to diverse functions suggested for the different forms of jasmonates (see Taki et al. 2005; Wasternack and Hause 2013; Heitz 2016; Maynard et al. 2018; Per et al. 2018) and the difference in concentration required for each function (Taki et al. 2005; Heitz 2016), the relationship of vitamin E with JA and OPDA observed in this study could have eco-physiological implications in *C. albidus* when facing combined abiotic and biotic stress, which usually converge in the Mediterranean winter, mainly due to the negative correlation between vitamin E accumulation and the jasmonates biosynthesis capability represented by OPDA.

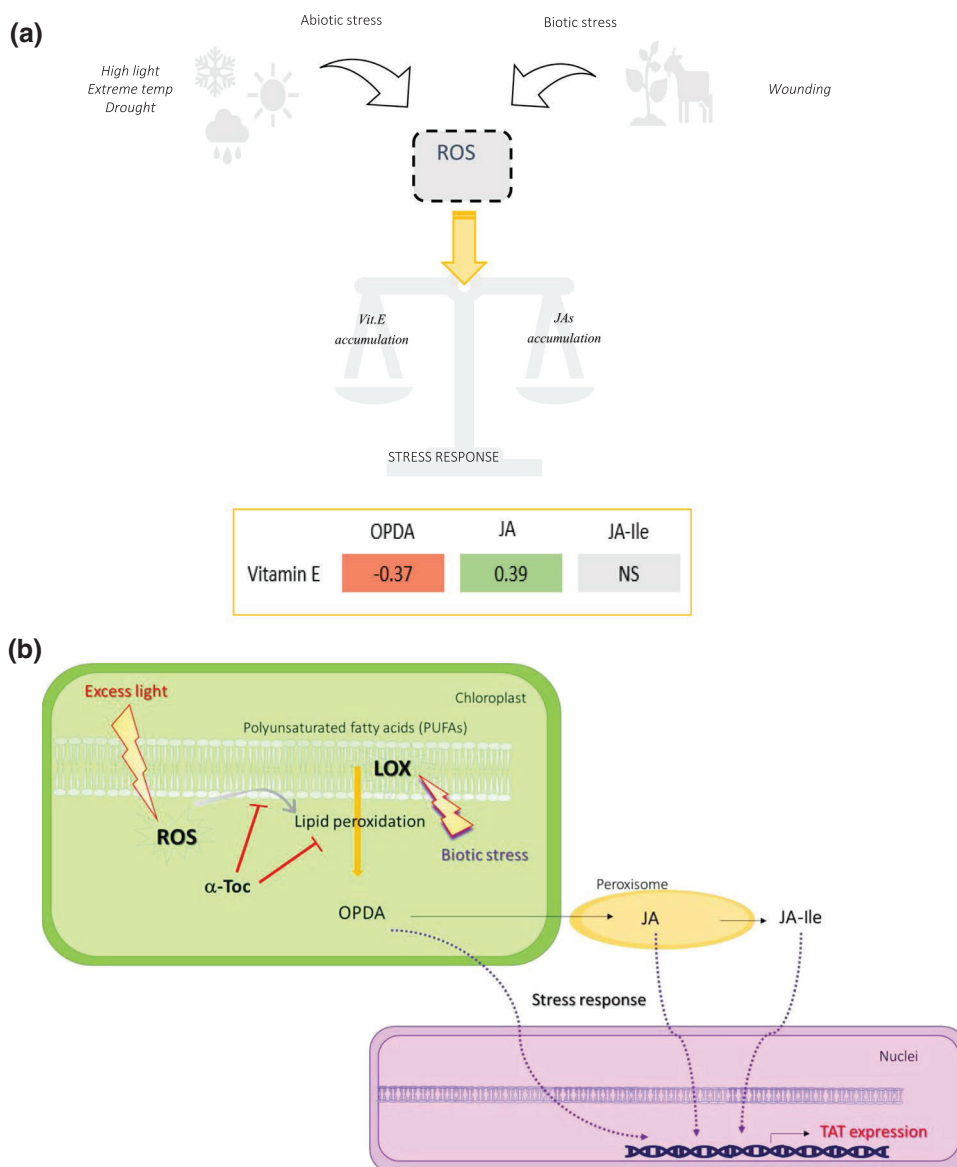
Taking together, the results of the relationship between jasmonates and vitamin E from the *C. albidus* study under natural conditions and those from the literature survey showed that the relationship between jasmonates and vitamin E could be positive or negative depending on the form and the demanded concentration. These compounds are closely related with both biotic and abiotic stresses since all stresses derive in ROS formation in chloroplasts (see Huang et al. 2019) and ROS induce both vitamin E and oxylipins production, so vitamin E and jasmonates are fully related with the redox state of the chloroplast and the cell. As products derived from lipid peroxidation of chloroplastic membranes, oxylipins reflect the redox state of the cell under stressful conditions (Gollan et al. 2015; Maynard et al. 2018;

Muñoz and Munné-Bosch 2020; Unal et al., 2020), so as signals derived of the redox balance of the chloroplast and being influenced by the accumulation of tocopherols, the bidirectional link between vitamin E and jasmonates may be seen as an essential part of a robust network of compounds determining the redox biology of the cell, together with ROS and reactive electrophile species (RES) involved in the retrograde and systemic stress signaling (Suzuki et al. 2012; Dietz et al. 2019; Muñoz and Munné-Bosch 2020). This supports the contention that vitamin E plays a role in stress sensing and signalling by modulating not only ROS accumulation (Maruta et al. 2016) but also by influencing the accumulation of oxylipins, including OPDA (Fig. 10a). The relationship between vitamin E and JA accumulation (positive correlation) and between vitamin E accumulation and the capability to synthesize jasmonates (OPDA, negative

correlation) leads to a fine-tune regulated network for coordinated plant stress response (Fig. 10b). However, further investigation is needed to better understand this complex network as well as the relationship between both forms of vitamin E and JA-Ile. In addition, it would be interesting to add the other elements that could be involved in this network. For instance, the G-box like elements found in VTE1 and VTE4 genes of *A. thaliana* (see Suppl. Figs. S2 and S3) are responsive to both jasmonates and ethylene (Memelink 2009) and previous studies have shown a role for ethylene signaling in the modulation of tocopherol biosynthesis genes (Cela et al. 2009).

It is concluded that there is a negative correlation between vitamin E and OPDA accumulation in *C. albidus* under natural Mediterranean winter, but a positive one between JA and α -tocopherol, both in *C. albidus* under natural conditions

Fig. 10 **a** Schematic representation of the model suggested in the current study and simplified table of the most representative linear correlations found between vitamin E (one of each forms or total tocopherols) in *C. albidus* during three consecutive winters. Mediterranean environmental conditions such as high light, extreme temperatures and drought produce abiotic stress to *C. albidus*, while typical perturbations of Mediterranean-type ecosystems such as wounding infringes biotic stress to them. Abiotic and biotic stress converge in reactive oxygen species (ROS) formation in the chloroplast which induces both vitamin E (vit. E) and jasmonates (JAs) production. The relationship between vitamin E and jasmonates accumulation (negative with OPDA and positive with JA) leads to a fine-tune regulated network for coordinated plant stress response. It is suggested that vitamin E-jasmonates play a major role in the regulation of biotic and abiotic stress responses and their cross-talk in plants. **b** Schematic and simplified representation of the metabolic framework of vitamin E and jasmonates in response to stresses. ROS: reactive oxygen species, α -toc: α -tocopherol, OPDA: 12-*oxo*-phytodienoic acid, JA: jasmonic acid, JA-Ile: jasmonoyl-isoleucine



and in all data extracted from the literature survey. The relationship between vitamin E and jasmonates did depend on the jasmonate form, the concentration and the conditions of the studies, therefore suggesting different implications of this relationship in the response of plants to combined abiotic and biotic stresses and highlighting the importance of analyzing more than just one jasmonate and vitamin E form in ecophysiological studies. It is suggested that both vitamin E and jasmonates, and more specifically its bidirectional link, are central players of the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants.

Author contribution statement AC and SMB conceived and designed the study. AC and RB performed experiments and biochemical analysis with the help of MPL. AC wrote the manuscript with the help of SMB. AC prepared all figures and analyzed the data. All authors contributed to the discussion of ideas, revised and approved the final manuscript.

Acknowledgments We are very grateful to A.D. Allu, I. Aranjuelo, M.A. Asensi-Fabado, O. Buchner, A. Cotado, H. Ellouzi, E. Fleta-Soriano, H. Holländer-Czytko, M. Juvany, M. Mencuccini, M. Morales, M. Oñate, J. Polo, and B. Simancas for their help with the literature survey. We are grateful to the Experimental Field Facilities and the Scientific-Technical Facilities of the University of Barcelona for technical assistance. This research was supported by Grant PID2019-110335GB-I00/AEI/FEDER from the Spanish Government.

References

- 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 Physiol* 143:1720–1738
- Abreu ME, Munné-Bosch S (2009) Salicylic acid deficiency in *NahG* transgenic lines and *sid2* mutants increases seed yield in the annual plant *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 60:1261–1271
- Agrawal A, Kearney E, Hastings A, Ramsey T (2012) Attenuation of jasmonate burst, plant defensive traits, and resistance to specialist monarch caterpillars on shaded common milkweed (*Asclepias syriaca*). *J Chem Ecol* 38:893–901
- Alche JD (2019) A concise appraisal of lipid oxidation and lipoxidation in higher plants. *Redox Biol* 23:101136
- Antognoni F, Faudale M, Poli F, Biondi S (2009) Methyl jasmonate differentially affects tocopherol content and tyrosine amino transferase activity in cultured cells of *Amaranthus caudatus* and *Chenopodium quinoa*. *Plant Biol* 11:161–169
- Asensi-Fabado MA, Cela J, Müller M, Arrom L, Chang C, Munné-Bosch S (2012) Enhanced oxidative stress in the ethylene-insensitive (*ein3-1*) mutant of *Arabidopsis thaliana* exposed to salt stress. *J Plant Physiol* 169:360–368
- Asensi-Fabado MA, Oliván A, Munné-Bosch S (2013) A comparative study of the hormonal response to high temperatures and stress reiteration in three Labiatae species. *Environ Exp Bot* 94:57–65
- Ayala A, Muñoz M, Argüelles S (2014) Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Ox Med Cel Long* 2014:360438
- Buchner O, Roach T, Gertzen J, Schenk S, Karadar M, Stöggli W et al (2017) Drought affects the heat-hardening capacity of alpine plants as indicated by changes in xanthophyll cycle pigments, singlet oxygen scavenging, α -tocopherol and plant hormones. *Environ Exp Bot* 133:159–175
- Cabal C, Ochoa-Hueso R, Pérez-Corona M, Manrique E (2017) Long-term simulated nitrogen deposition alters the plant cover dynamics of a Mediterranean rosemary shrubland in Central Spain through defoliation. *Environ Sci Pollut Rev* 24:26227–26237
- Casadesús A, Polo J, Munné-Bosch S (2019) Hormonal effects of an enzymatically hydrolyzed animal protein-based biostimulant (Pepton) in water-stressed tomato plants. *Front Plant Sci* 10:758
- Cela J, Falk J, Munné-Bosch S (2009) Ethylene signaling may be involved in the regulation of tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 583:992–996
- 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 Cell Physiol* 52:1389–1400
- Cela J, Tweed JKS, Sivakumaran A, Lee MRF, Mur LAJ, Munné-Bosch S (2018) An altered tocopherol composition in chloroplasts reduces plant resistance to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol Biochem* 127:200–210
- Chen Z, Zhang L, Miao X, Hu X, Nan S et al (2017) Effect of salt stress on fatty acid and α -tocopherol metabolism in two desert shrub species. *Planta* 247:499–511
- Cotado A, Müller M, Morales M, Munné-Bosch S (2018) Linking jasmonates with pigment accumulation and photoprotection in a high-mountain endemic plant, *Saxifraga longifolia*. *Environ Exp Bot* 154:56–65
- Cowling R, Rundel P, Lamont B, Arroyo M, Arianoutsou M (1995) Plant diversity in Mediterranean-climate regions. *Trees* 11:362–366
- Demmig-Adams B, Cohu CM, Amiard V, Zadelhoff G, Veldink GA et al (2013) Emerging trade-offs-impact of photoprotectants (PsbS, xanthophylls, and vitamin E) on oxylipins as regulators of development and defense. *New Phytol* 197:720–729
- Demmig-Adams B, Stewart JJ, Adams WW III (2014) Chloroplast photoprotection and the trade-off between abiotic and biotic defense. In: Demmig-Adams B, Garab G, Adams W (eds) Non-photochemical quenching and energy dissipation in plants, algae and cyanobacteria. Springer, Switzerland, pp 631–643
- Dietz KJ, Wesemann C, Wegener M, Seidel T (2019) Toward and integrated understanding of retrograde control of photosynthesis. *Antioxid Redox Signal* 30:1186–1205
- Falk J, Munné-Bosch S (2010) Tocochromanols functions in plants: antioxidation and beyond. *J Exp Bot* 61:1549–1566
- Farmer EE, Mueller MJ (2013) ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annu Rev Plant Biol* 64:429–450
- Farooq M, Gill R, Islam F, Ali B, Liu H et al (2016) Methyl jasmonate regulates antioxidant defense and suppresses arsenic uptake in *Brassica napus* L. *Front Plant Sci* 7:468
- Fleta-Soriano E, Munné-Bosch S (2017) Enhanced plastochromanol-8 accumulation during reiterated drought in maize (*Zea mays* L.). *Plant Physiol Biochem* 112:283–289
- Fleta-Soriano E, Pintó-Marijuan M, Munné-Bosch S (2015) Evidence of drought stress memory in the facultative CAM, *Aptenia cordifolia*: possible role of phytohormones. *PLoS ONE* 10:8
- Fleta-Soriano E, Díaz L, Bonet E, Munné-Bosch S (2017) Melatonin may exert a protective role against drought stress in maize. *J Agron Crop Sci* 203:268–294
- Gala R, Mita G, Caretto S (2005) Improving α -tocopherol production in plant cell cultures. *J Plant Physiol* 162:782–784

- Gollan P, Tikkanen M, Aro EM (2015) Photosynthetic light reactions: integral to chloroplast retrograde signalling. *Curr Opin Plant Biol* 27:180–191
- Grant O, Incoll L, McNeilly T (2005) Variation in growth responses to availability of water in *Cistus albidus* populations from different habitats. *Funct Plant Biol* 32:817–829
- Guerineau F, Bendjdia M, Zhou DX (2003) A jasmonate-responsive element within the *A. thaliana* vsp1 promoter. *J Exp Bot* 54:1153–1162
- Guzmán B, Lledó M, Vargas P (2009) Adaptive radiation in Mediterranean *Cistus* (Cistaceae). *PLoS ONE* 4:e6362
- Heitz T, Smirnova E, Wiedemann E, Aubert Y, Pinot F, Ménard R (2016) The rise and fall of jasmonate biological activities. In: Nakamura Y, Li-Beisson Y (eds) *Lipids in plant and algae development*. Springer, Switzerland, pp 405–426
- Heyer M, Reichelt M, Mithöfer A (2018) A holistic approach to analyze systemic jasmonate accumulation in individual leaves of *Arabidopsis* rosettes upon wounding. *Front Plant Sci* 9:1569
- Huang H, Ullah F, Zhou DX, Yi M, Zhao Y (2019) Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Front Plant Sci* 10:800
- Jian Q (2017) Natural forms of vitamin E as effective agents for cancer prevention and therapy. *Adv Nutr* 8:850–897
- Köppen W (1936) Das geographische system der klimate In: Teil C (Ed), *Handbuch der klimatologie*, Berlin, Germany, pp 6–44
- Kruk J, Szymańska R, Cela J, Munné-Bosch S (2014) Plastochromanol-8: fifty years of research. *Phytochemistry* 108:9–16
- Lebold K, Traber M (2014) Interactions between α -tocopherol, polyunsaturated fatty acids, and lipoxygenases during embryogenesis. *Free Rad Biol Med* 66:13–19
- Lichtenthaler H, Wellburn A (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochem Soc Trans* 11:591–592
- Lopukhina A, Dettenberg M, Weiler EW, Holländer-Czytko H (2001) Cloning and characterization of a coronatine-regulated tyrosine aminotransferase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 126:1678–1687
- Loreto F, Bongio G (1989) Combined low temperature-high light effects on gas exchange properties of jojoba leaves. *Plant Physiol* 91:1580–1585
- Martínez-Ferri E, Manrique E, Valladares F, Balaguer L (2004) Winter photoinhibition in the field involves different processes in four co-occurring Mediterranean tree species. *Tree Physiol* 24:981–990
- Maruta T, Sawa Y, Shigeoka S, Ishikawa T (2016) Diveristy and evolution of ascorbate peroxidase functions in chloroplasts: more than just a classical antioxidant enzyme? *Plant Cell Physiol* 57:1377–1386
- Maynard D, Gröger H, Dierks T, Dietz KJ (2018) The function of the oxylipin 12-oxophytodienoic acid in cell signaling, stress acclimation, and development. *J Exp Bot* 69:5341–5354
- Memelink J (2009) Regulation of gene expression by jasmonate hormones. *Phytochemistry* 70:1560–1570
- Mencuccini M, Oñate M, Peñuelas J, Rico L, Munné-Bosch S (2014) No signs of meristem senescence in old Scot pine. *J Ecol* 102:555–565
- Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG (2009) Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. *PLoS Med* 6:e1000097
- Morales M, Munné-Bosch S (2015) Secret of long life lies underground. *New Phytol* 205:463–467
- Morales M, García QS, Munné-Bosch S (2015) Ecophysiological response to seasonal variations in water availability in the arborescent, endemic plant *Vellozia gigantea*. *Tree Physiol* 35:253–265
- Morales M, Pintó-Marijuan M, Munné-Bosch S (2016) Seasonal, sex-and plant size-related effects on photoinhibition and photoprotection in the dioecious Mediterranean dwarf palm *Chamaerops humilis*. *Front Plant Sci* 7:1116
- 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. *J Plant Physiol* 162:743–748
- Munné-Bosch S (2019) Vitamin E function in stress sensing and signaling in plants. *Dev Cell* 48:291–292
- Munné-Bosch S, Jubany-Marí T, Alegre L (2003) Enhanced photo- and antioxidative protection, and hydrogen peroxide accumulation in drought-stressed *Cistus clusii* and *Cistus albidus* plants. *Tree Physiol* 23:1–12
- Munné-Bosch S, Weiler EW, Alegre L, Müller M, Dürsting P, Falk J (2007) α -Tocopherol may influence cellular signaling by modulating jasmonic acid levels in plants. *Planta* 225:681–691
- Munné-Bosch S, Cotado A, Morales M, Fleta-Soriano E, Vilellas J, García MB (2016) Adaptation of the long-lived monocarpic perennial *Saxifraga longifolia* to high altitude. *Plant Physiol* 172:765–775
- Muñoz P, Munné-Bosch S (2019) Vitamin E in plants: biosynthesis, transport, and function. *Trends Plant Sci* 24:1040–1051
- Muñoz P, Munné-Bosch S (2020) Oxylipins in plastidial retrograde signaling. *Redox Biol* 37:101717
- Oliván A, Munné-Bosch S (2010) Diurnal patterns of α -tocopherol accumulation in Mediterranean plants. *J Arid Environ* 74:1572–1576
- Oliveira G, Peñuelas J (2002) Comparative protective strategies of *Cistus albidus* and *Quercus ilex* facing photoinhibitory winter conditions. *Environ Exp Bot* 47:281–289
- Oñate M, Munné-Bosch S (2009) Influence of plant maturity, shoot reproduction and sex on vegetative growth in the dioecious plant *Urtica dioica*. *Ann Bot* 104:945–956
- Per TS, Khan MIR, Anjum NA, Masood A, Hussain SJ, Khan NA (2018) Jasmonates in plants under abiotic stresses: crosstalk with other phytohormones matters. *Environ Exp Bot* 145:104–120
- Pérez-Llorca M, Casadesús A, Müller M, Munné-Bosch S (2019) Leaf orientation as part of the leaf developmental program in the semi-deciduous shrub, *Cistus albidus* L.: diurnal, positional and photoprotective effects during winter. *Front Plant Sci* 10: 767
- Pieterse C, Zamioudis C, Berendsen R, Weller D, Van Wees S, Bakker P (2014) Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu Rev Phytopathol* 52:347–375
- Rodríguez-Ramírez N, Santonja M, Blady V, Ballini C, Montès N (2017) Shrub species richness decreases negative impacts of drought in a Mediterranean ecosystem. *J Veg Sci* 28:966–985
- Rosenberg MS, Rothstein HR, Gurevitch J (2013) Effect sizes: conventional choices and calculations. In: Koricheva J, Gurevitch J, Mengersen K (eds) *Handbook of meta-analysis in ecology and evolution*. Princeton University Press, Princeton, USA, pp 62–71
- Roy J, Sonié L (1992) Germination and population dynamics of *Cistus* species in relation to fire. *J Appl Ecol* 29:647–655
- 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
- Sasaki-Sekimoto Y, Taki N, Obayashi T, Aono M, Matsumoto F et al (2005) Coordinated activation of metabolic pathways for antioxidants and defence compounds by jasmonates and their roles in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J* 44:653–668
- Silva-Cancino M, Esteban R, Aretxe U, García-Plazaola J (2011) Patterns of spatio-temporal distribution of winter chronic photoinhibition in leaves of three evergreen Mediterranean species with contrasting acclimation responses. *Physiol Plant* 144:289–301

- Simancas B, Munné-Bosch S (2015) Interplay between vitamin E and phosphorus availability in the control of longevity in *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot* 116:511–518
- Suzuki N, Koussevitzky S, Mittler R, Miller G (2012) ROS and redox signalling in the response of plants
- Taki N, Sasaki-Sekimoto Y, Obayashi T, Kikuta A, Kobayashi K 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 Physiol* 139:1268–1283
- Unal D, García-Caparrós P, Kumar V, Dietz KJ (2020) Chloroplast-associated molecular patterns as concept for fine-tuned operational retrograde signalling. *Phil Trans R Soc B* 375:20190443
- Wasternack C, Hause B (2013) Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann Bot* 111:1021–1058
- Wolucka B, Goossens A, Inzé D (2005) Methyl jasmonate stimulates de novo biosynthesis of vitamin C in plant cell suspensions. *J Exp Bot* 56:2527–2538
- Zuur A, Ieno E, Elphick C (2009) A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods Ecol Evol* 1:3–14

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

CAPÍTOL 3



Contrast estacional en la incidència de l'estrès abiòtic i l'herbivorisme en plantes de *Cistus albidus* L. en el seu hàbitat natural en una muntanya mediterrània

Chapter 3. Contrasting seasonal abiotic stress and herbivory incidence in *Cistus albidus* L. plants growing in their natural habitat in a Mediterranean mountain

Andrea Casadesús, Rachida Bouchikh, Sergi Munné-Bosch

Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Research Institute in Biodiversity (IrBio), University of Barcelona, Barcelona, Spain

Enviat a Journal of Arid Environments, 21/02/2022, ID del manuscrit: JAE22-097

Les àrees muntanyoses del clima mediterrani es caracteritzen per les dures condicions d'estrès abiòtic per les plantes. La sequera, l'alta irradiància, i les temperatures extremes són els principals factors abiòtics que modulen la biodiversitat arbustiva en aquestes àrees. Tot i així, la possible influència addicional de l'herbivorisme sobre aquestes comunitats arbustives és poc coneguda. Es va estudiar la incidència dels estressos abiòtic i biòtic en un arbust mediterrani representatiu, *C. albidus*, creixent en condicions naturals, posant èmfasis en l'aparició estacional de l'estrès abiòtic i l'herbivorisme, així com la possible influència de l'orientació solar de la vessant de creixement i de l'edat de la planta sobre la resposta a l'estrès. Es va observar fotoinhibició a principis d'estiu coincidint amb la combinació de condicions de sequera, alta irradiància, i altres temperatures (per sobre els 35°C al juliol). Durant aquest període, els individus creixent en la vessant est van experimentar major depressió en l'eficiència del PSII que els que creixien a la vessant oest. En l'orientació est també es va observar una lleugera reducció en el contingut hídric foliar al final de l'estiu. Tot i això, en l'orientació est els danys causats per herbivorisme, principalment per les cabres, foren menors en comparació a l'orientació oest durant l'hivern. L'edat de la planta no va influenciar la pressió d'herbivorisme ni la resposta a l'estrès abiòtic. Es conclou que *C. albidus* és un arbust altament tolerant tant a l'estrès abiòtic com biòtic en les àrees muntanyoses mediterrànies, mostrant únicament una lleugera fotoinhibició a principis d'estiu i lleus símptomes d'herbivorisme a l'hivern.

Contrasting seasonal abiotic stress and herbivory incidence in *Cistus albidus* L. plants growing in their natural habitat in a Mediterranean mountain

Andrea Casadesús^{a,b}, Rachida Bouchikh^a, Sergi Munné-Bosch^{a,b,*}

^a*Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain*

^b*Institute of Research of Biodiversity (IrBio), University of Barcelona, Barcelona, Spain*

*Correspondence: smunne@ub.edu

ABSTRACT

Mediterranean climate mountain areas are characterized by stressful abiotic conditions for plants. Drought, high light, and extreme temperature are the main abiotic factors driving shrub biodiversity in these areas. Little is known, however, to what extent herbivory may additionally influence these shrub communities. We studied the incidence of abiotic and biotic stresses in a Mediterranean representative shrub, *Cistus albidus*, growing under natural conditions, with an emphasis on the seasonal occurrence of abiotic stress and herbivory, as well as the possible influence of sun orientation of the growing site, and plant ageing on the stress response. Photoinhibition occurred during early summer coinciding with a combination of drought, high light, and high temperatures (above 35°C in July). East-oriented individuals experienced greater depressions in PSII efficiency than west-oriented ones during this period. East orientation also slightly reduced leaf water content during late summer. However, east orientation reduced herbivory-related damage during winter, particularly from goats. Plant age neither influenced herbivory pressure nor the stress response to abiotic stress factors. It is concluded that *C. albidus* is a highly tolerant shrub to both abiotic and biotic stress factors in Mediterranean mountain areas, showing only a slight photoinhibition during early summer and mild symptoms of herbivory attack in winter.

Keywords: age-related changes; *Cistus albidus* L.; herbivory; multiple stresses; seasonal variations; sun orientation

1. Introduction

Plant response to the environment is a complex process triggered by a combination of climatic variables and both abiotic and biotic factors converge in space and time to finely modulate plant life. Mediterranean stressful seasons are usually summer and winter due to extreme temperatures, elevated solar irradiance, and drought. Typical Mediterranean climate (*Csa* in the Köppen classification, Köppen, 1936) is temperate, characterized by dry summers (with less than 30 mm in the driest month) and relatively low temperatures during winter (although they can reach below 0°C as elevation and distance from the sea increase). In Mediterranean-type ecosystems, aside from drought, high light, and extreme temperatures, major pressure factors for plant diversity also include herbivory and common perturbations such as fire.

Shrubland communities' biodiversity is crucial to confer plasticity to these vulnerable ecosystems to alleviate the negative effects of climate change, such as increased water scarcity (Cowling et al., 1995; Cabal et al., 2017; Rodríguez-Ramírez et al., 2017). *Cistus albidus* is considered an ancient and well-adapted shrub of these ecosystems. It presents a plethora of adaptations to common stresses of Mediterranean-type ecosystems. As an obligate seeder, it is involved in the primary succession after a fire event (Roy and Sonié, 1992) and various of its features, such as its semi-deciduous strategy, its high phenotypic plasticity to water scarcity, and several morphological and physiological acclimation responses, allow this shrub to overcome stressful seasons (Correia et al., 1992; Grant et al., 2005; Correia and Ascensão, 2017; Oliveira and Peñuelas, 2000; 2004, Munné-Bosch et al., 2003; Pérez-Llorca et al., 2019).

Plant ageing at the organism level has garnered great interest in the last decades, but it is still a quite enigmatic biological process. Several unsolved questions remain, such as its relationship with the senescence of single organs, mechanisms of senescence avoidance at the organism level, or the potential of plants to attain near immortality (Thomas 2002; 2013; Munné-Bosch 2020; Cannon et al., 2022). Plant ageing is associated with several metabolic and physiological changes that occur with time, many of them associated with plant maturity and increased size that may not necessarily lead to senescence (i.e., increased mortality as plants age), including changes in leaf morphology, changes in redox homeostasis, reductions in photosynthetic rates or alterations in the plant reproductive

strategy (Thomas 2013; Mencuccini and Munné-Bosch, 2018; Munné-Bosch 2007, 2020). Although molecular mechanisms remain relatively unknown, it has been shown that the mechanisms underlying the response of plants to abiotic stresses change as plant ages (Rankenberg et al., 2021). On the other hand, plant age-related effects on susceptibility to pathogen infection have also been described in some plant species, commonly reducing the susceptibility to pathogen infection as plant ages, which is named age-related resistance (Kus et al., 2002; Barton and Koricheva, 2010; Yang et al., 2020). In *C. albidus*, plant ageing has been shown to affect reproductive traits such as flower bud vigour, flower production, rates of embryo abortion, and seed vigour, showing that ageing does not negatively influence overall fecundity through compensatory effects (Oñate and Munné-Bosch, 2010; Müller et al., 2014). However, as it occurs with other perennials, very little is still known about age-related changes in plant response to both abiotic and biotic stress factors in this plant species.

Here, we aimed at studying the response of *C. albidus* to abiotic and biotic stresses under natural conditions in a Mediterranean mountain area, with an emphasis on the occurrence of abiotic stress and herbivory in relation to seasonal environmental variations, sun orientation of the growing site, and plant ageing. We hypothesized that herbivory may superimpose to abiotic stress factors and negatively impact plant performance under natural conditions, being the effects more evident as plants aged.

2. Methods

2.1. Study site, experimental design, and samplings

The study was performed from May to December 2019 in a natural population of *Cistus albidus* growing at 1100 m.a.s.l. under natural conditions in Montserrat Natural Park (Spain, 41.586N 1.830E). We randomly selected 100 individuals of the population, 50 growing on the east-facing slope and 50 of them on the west-facing slope of the mountainside. Monitoring of environmental data was provided by a weather station from the Meteorological Service of Catalonia (MeteoCat) situated on a south-facing slope at 916 m.a.s.l. at Monistrol de Montserrat (NE Spain). The temperature and relative humidity of each mountainside were recorded during the sampling days using a portable thermohygrometer (DO9847 Multifunction Meter, Delta Ohm, Padova, Italy, **Fig. 1**).

Samplings were performed on 27th May, 22nd July, 30th September, and 23rd December 2019. Environmental conditions were typical of Mediterranean mountain areas. Monthly mean temperatures during winter ranged between 5-10°C with lowest daily minimum temperature close to 0°C, while in summer the monthly average was over 20°C, with highest daily maximum temperatures occasionally above 30°C. During the period of study, most of the rainfall was recorded in autumn while September was the driest month with a total accumulated precipitation of 33 mm (**Fig. 1**). All samplings were performed at midday on sunny, clear days, except during 30th September, when little high clouds occurred. From a phenological perspective, we observed flowering in May while fruiting and major leaf shedding occurred in July.

2.2. Abiotic stress markers

Two fully expanded, sun-exposed, and undamaged apical leaves were sampled for each individual and sampling time to study abiotic stress markers. One of these leaves was used for leaf water content and chlorophyll fluorescence measurements, while the other was immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until analysis for chlorophylls. Leaf hydration and relative water content of leaves were measured as described by Munné-Bosch et al. (2003) based on fresh weight, turgid weight (after 24h of soaking the leaf in distilled water), and dry weight (after drying the leaf in the oven at 65°C to constant weight). Maximum efficiency of photosystem II (F_v/F_m), which was used as an indicator of photoinhibition, was measured based on chlorophyll fluorescence measured using a fluorimeter Mini-PAM II (Photosynthesis yield analyser, Walz, Germany) after 1h of dark adaptation of leaves. For estimation of chlorophyll contents, 50 mg of leaf were extracted in 500 µl of methanol containing 0.01% butylated hydroxytoluene using ultrasonication for 30 min (Branson 2510 ultrasonic cleaner, Branson, Danbury, CT, USA). The extract was centrifugated at 13000 rpm at 4°C, and the supernatant was collected. This process was repeated twice with 250 µl of solvent. Absorbance was read at 470 nm, 653 nm, 666 nm, and 750 nm using a UV/Visible double beam CE Aquarius spectrophotometer (Cecyl Instruments Ltd, Cambridge, UK) and chlorophyll *a* and *b* contents were estimated using the equations described by Lichtenthaler and Wellburn (1983).

2.3. Biotic stress markers

Each plant was meticulously examined for herbivore pressure. Photographs of all damaged leaves were taken to subsequently count and classify insect-damaged and goat-damaged leaves. The type of damage was easily identified by the marks left on leaves. Then, the total number of affected leaves per individual was counted and the percentage of affected leaves estimated.

2.4. Plant ageing

Plant height and trunk perimeter were measured in all individuals, and plant age estimated as described by Siles et al. (2017). Furthermore, two fully expanded, sun-exposed, and undamaged apical leaves were sampled for each individual and sampling time to study oxidative stress indicators as additional potential plant ageing markers. For the measurement of these additional markers (vitamin E and lipid hydroperoxides), leaves were immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until biochemical analyses. Vitamin E analysis was performed by HPLC as described by Cela et al. (2011) using a normal-phase column (Inertsil 100A, 5 μ m, 30 $\times$ 250 mm, GL Sciences, Torrance, CA, USA) and fluorescence detection at an excitation wavelength of 295 nm and emission at 330 nm. Standards of α -tocopherol and γ -tocopherol (Sigma–Aldrich) were used for quantification. Lipid peroxidation was estimated by measuring the amounts of lipid hydroperoxides using the FOX assay as described by Bou et al. (2008).

2.5. Statistical analyses

A two-way ANOVA was used to determine the effect of “orientation” or “age” and “time” using the GLS model to deal with the heterogeneity of data. Multiple comparisons were tested with Tukey’s post hoc test. All differences were considered significant when $P \leq 0.05$. Normality and homoscedasticity of residues were checked as described by Zuur et al. (2009). Correlation analyses were performed using Spearman’s rank correlation test. All statistical tests were performed using R statistical software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

3. Results and discussion

3.1. East orientation increases abiotic stress during summer

It is known that seasonality strongly affects the stress susceptibility of native flora in Mediterranean-type ecosystems, with summer and winter being the main stressful seasons throughout the year. Although summer drought is becoming more common in the Mediterranean region under the current global change scenario and this condition triggers potential damage to the photosynthetic apparatus (Werner et al., 1999; Oliveira and Peñuelas, 2001; Munné-Bosch et al., 2003; Grant et al., 2005; Jubany-Marí et al., 2009; Alderotti et al., 2020), how microclimatic conditions, such as sun orientation, influence plant stress responses is still little explored. Photoinhibition to the photosynthetic apparatus, as indicated by reductions in the F_v/F_m ratio, occurred in *C. albidus* plants during the summer (July), in parallel with reductions in leaf water and chlorophyll contents, but this photoinhibition was particularly observed in East-oriented plants, concomitant with reductions in the chlorophyll *a/b* ratio (**Fig. 2**). The asymmetry in microclimatic conditions during summer might have resulted in more stressful conditions in plants on the east-facing versus the west-facing slope. Given that the chlorophyll *a/b* ratio, but not total chlorophyll or leaf water contents differed between East and West individuals, it is likely that these slight variations may be more triggered by differences in incident light than by changes in air temperatures. However, interpretation of any mechanisms responsible for different levels of PSII efficiency, or whether depressions in PSII efficiency are consequential to the plant, requires additional measures. Different levels of PSII efficiency might indeed be attributed to different causes, including (i) different ratios of PSI to PSII and the relative contribution of fluorescence emitted from the chlorophyll associated with each group of centres, (ii) state transitions, (iii) chloroplast movements (positioning of chloroplasts for maximum exposure to incident light versus minimum exposure to incident light along different sides of the mesophyll cells), (iv) engagement of zeaxanthin (and antheraxanthin) in photoprotective energy dissipation, (v) transient inactivation of PSII centres, or (vi) disassembly of PSII centres (Demmig-Adams and Adams, 2018; Malnoë, 2018). Many of these may occur when the source to sink ratio of the plant increases (i.e., when the rate of photosynthesis is downregulated as the supply of photosynthate exceeds the needs of the plant, such as when plants cease to grow in response to drought and high temperature, Adams III et al., 2013). When this is the case, reductions in PSII efficiency are an

appropriate, regulatory response of the photosynthetic apparatus to the source-sink imbalance and may not be considered as a damage. Since all data were collected at midday, it could be that the greater level of depression in PSII efficiency in plants on the east-facing slope resulted from the fact that the plants were receiving direct sunlight all morning long (since the sun rises in the east) whereas the plants on the west-facing slope would only receive the greatest level of direct sunlight as the sun set in the west in the later afternoon. Further research is therefore needed to understand the underlying causes triggering such sun orientation differences in photoinhibition in *C. albidus* plants growing in their natural habitat.

3.2. East orientation reduces herbivory pressure during winter

Herbivory modulates shrub dynamics in Mediterranean ecosystems by exerting pressure under specific species, individuals, and tissues. While maximum abiotic stress was suffered in summer, maximum herbivory pressure was observed in winter, including both insect and wild goat herbivory (**Fig. 3**). We observed hole feeding and margin feeding behaviour, commonly attributed to Coleoptera, Orthoptera, Lepidoptera and Hymenoptera (Carvalho et al., 2014). Although it is well known that insect herbivory in Mediterranean-type shrublands ecosystems is driven by seasonality and leaf phenology, little or nothing is known about insect herbivory in *Cistus* species. It has been demonstrated that plant stress can affect selectivity by insect herbivores as well as the nutritional value and secondary compounds accumulation (Meyer et al., 2006; Staley et al., 2006; Ribeiro-Neto et al., 2012). In addition, the semi-deciduous strategy of *Cistus albidus* could also affect herbivory susceptibility since leaf shedding has been proven to reduce herbivory pressure in evergreen shrubs and trees with large variation in leaf retention (Karban, 2007, 2008). Selective seasonal herbivory by goats have been registered in *Cistus* spp. Goats have great seasonal adaptability in Mediterranean ecosystems selecting particular plant species, mostly woody species, in each season, probably depending on the nutritional aspects such as the crude protein percentage, bit mass, nitrogen and secondary compounds, or trichome density, and not necessarily depending on the availability (Papachristou, 2000; Molina-Montenegro et al., 2006; Mancilla-Leytón et al., 2012, 2013, 2014; Chebli et al., 2020). It is known that winter leaves of *Cistus albidus* are richer in nitrogen than summer leaves, so it might be related to the selection of this species particularly in winter by goats (Correia et al., 1992).

3.3. Plant ageing does not increase stress sensitivity

Plant ageing has been demonstrated to influence stress susceptibility and response in several species (Rankenberg et al., 2021). However, very few studies have been performed in Mediterranean shrubs growing in their natural habitat, except for one study performed in *C. albidus* plants showing that plant shrinkage under natural conditions is an effective strategy to prevent the tear and wear of aging and that plants develop compensatory mechanisms at the reproduction level (including changes in flowering, fruit and seed production) that prevent senescence in terms of seed yield and viability (Müller et al., 2014). Other studies in the congener *C. clusii* under semi-controlled conditions have shown that as plants increase in size and mature they respond differently to stress, both in terms of foliar ABA accumulation and response to photo-oxidative stress (Munné-Bosch and Lalueza, 2007). The present study shows no effects of plant ageing in stress sensitivity by comparing mature plants of different ages; plant aging neither negatively affecting the plant response to abiotic nor to biotic stress in any of the variables studied (**Fig. 4**). The average trunk diameter of the studied population was 5.4 cm, which corresponded to an average age of 10.6 years. Therefore, we selected two groups for analyses, one below and the other above this average, so that as the oldest individual was 17 years old, two groups with ages 5-10 years and 11-17 years were compared. Neither the herbivory pressure nor the abiotic stress markers differed on plants from these age groups (**Fig. 4**), thus indicating a similar stress sensitivity. Indeed, Spearman rank's correlation analyses (considering plant age as a continuous independent variable in the X axis and using no age groups) confirmed that plant ageing did not have any significant effect on any of the studied parameters ($P > 0.05$).

4. Conclusion

It is concluded that *C. albidus* was a highly tolerant shrub to both abiotic and biotic stresses in Mediterranean mountain areas, showing only a slight photoinhibition during early summer and mild symptoms of herbivory attack in winter. Furthermore, seasonal and sun orientation driven variability revealed an antagonistic relationship between the occurrence of abiotic stress and herbivory-induced damage, and plant ageing did not negatively influence the plant stress response (neither to abiotic stress factors nor herbivory). Therefore, we rejected the hypothesis that herbivory may superimpose to abiotic stress factors and negatively impact plant performance under natural conditions, and

that these effects are more evident as plants age. Indeed, results show the extraordinary capacity of this plant species to adapt to Mediterranean climatic conditions in mountain areas.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We are very grateful to Montserrat Natural Park for their help in access permission and to the Experimental Field Facilities and the Scientific-Technical Facilities of the University of Barcelona for their technical assistance. We are indebted to the Catalan Government for the 2017 SGR 980 grant and the ICREA Academia award given to S.M.-B.

Author contributions

AC and SMB conceived and designed the study. AC and RB performed experiments and biochemical analyses. AC and SMB wrote the manuscript. AC prepared all figures and analysed the data. All authors revised and approved the final manuscript.

References

- Adams III W.W., Müller O., Cohu C.M., Demmig-Adams B. (2013) May photoinhibition be a consequence, rather than a cause, of limited plant productivity? *Photosynthesis Research*, **117**, 31-44.
- Alderotti F., Brunetti C., Marino G., Centritto M., Ferrini F., Giordano C., Tattini M., Moura B.B., Gori A. (2020) Coordination of morpho-physiological and metabolic traits of *Cistus incanus* L. to overcome heatwave-associated summer drought: a two-year on-site field study. *Frontiers in Ecology and Evolution*, **8**, 576296.
- Barton K.E., Koricheva J. (2010) The ontogeny of plant defense and herbivory: characterizing general patterns using meta-analysis. *The American Naturalist*, **175**, 4.
- 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.
- Cabal C., Ochoa-Hueso R., Pérez-Corona M., Manrique E. (2017) Long-term simulated nitrogen deposition alters the plant cover dynamics of a Mediterranean rosemary shrubland in Central Spain through defoliation. *Environmental Science and Pollution Research*, **24**, 26227-26237.
- Cannon C.H., Piovesan G., Munné-Bosch S. (2022) Old and ancient trees are life history lottery winners and vital evolutionary resources for long-term adaptive capacity. *Nature Plants*, **8**, 136-145.
- Carvalho M., Wilf P., Barrios H., Windsor D., Currano E., Labandeira C., Jaramillo, C.A. (2014) Insect leaf-chewing damage tracks herbivore richness in modern and ancient forests. *PLoS ONE*, **9**, e94950.

- 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.
- Cheblil Y., El Otmani S., Chentouf M., Hornick J.L., Bindelle J., Cabraux J.F. (2020) Foraging behaviour of goats browsing in southern Mediterranean forest rangeland. *Animals*, **10**, 196.
- Correia O., Ascensão L. (2017) Summer semi-deciduous species of the Mediterranean landscape: a winning strategy of *Cistus* species to face the predicted changes of the Mediterranean climate. In: Ansari A, Gill S, Abbas Z, Naeem M (Ed), *Plant biodiversity*, London, UK, pp 195-217.
- Correia O., Martins A.C., Catarino F. (1992) Comparative phenology and seasonal foliar nitrogen variation in Mediterranean species of Portugal. In: Université d'Aix-Marseille III (Ed), *Ecologia Mediterranea XVIII*, Marseille, France, pp 7-18.
- Cowling R., Rundel P., Lamont B., Arroyo M., Arianoutsou M. (1995) Plant diversity in mediterranean-climate regions. *Trends in Ecology and Evolution*, **11**, 362-366.
- Demmig-Adams B., Adams III W.W. (2018) An integrative approach to photoinhibition and photoprotection of photosynthesis. *Environmental and Experimental Botany*, **154**, 1-3.
- Grant O., Incoll L., McNeilly T. (2005) Variation in growth responses to availability of water in *Cistus albidus* populations from different habitats. *Functional Plant Biology*, **32**, 817-829.
- Jubany-Marí T., Munné-Bosch S., López-Carbonell M., Alegre L. (2009) Hydrogen peroxide is involved in the acclimation of the Mediterranean shrub, *Cistus albidus* L., to summer drought. *Journal of Experimental Botany*, **60**, 107-120.
- Karban R. (2007) Deciduous leaf drop reduces insect herbivory. *Oecologia*, **153**, 81-88.

- Karban R. (2008) Leaf drop in evergreen *Ceanothus velutinus* as a means of reducing herbivory. *Ecology*, **89**, 2446-2452.
- Köppen W. (1936) Das geographische system der climate. In: Teil C (Ed), Handbuch der klimatologie, Berlin, Germany, pp 6–44.
- Kus J.V., Zaton K., Sarkar R., Cameron R.K. (2002) Age-related resistance in Arabidopsis is a developmentally regulated defense response to *Pseudomonas syringae*. *The Plant Cell*, **14**, 479-490.
- Lichtenthaler H., Wellburn A. (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, **11**, 591-592.
- Malnoë A. (2018) Photoinhibition or photoprotection of photosynthesis? Update on the (newly termed) sustained quenching component qH. *Environmental and Experimental Botany*, **154**, 123-133.
- Mancilla-Leytón J.M., Farnés C., Vicente M. (2012) Selection of browse species and energy balance of goats grazing on forest understory vegetation in Doñana Natural Park (SW Spain). *Livestock Science*, **148**, 237-242.
- Mancilla-Leytón J.M., Joffre R., Vicente M. (2014) Effect of grazing and season on the chemical composition of Mediterranean shrub species in Doñana Natural Park, Spain. *Journal of Arid Environments*, **108**, 10-18.
- Mancilla-Leytón J.M., Mejías R.P., Vicente A.M. (2013) Shrub vegetation consumption by goats in the southwestern Iberian Peninsula. *Livestock Science*, **153**, 108-115.
- Mencuccini M., Munné-Bosch S. (2018) Physiological and biochemical processes related to ageing and senescence in plants. In (Ed) Shefferson R, Jones O, Salguero-Gómez R, The Evolution of Senescence in the Tree of Life Cambridge University Press, pp 257-283.

- Meyer S.T., Roces F., Wirth R. (2006) Selecting the drought stressed: effects of plant stress on intraspecific and within-plant herbivory patterns of the leaf-cutting ant *Atta colombica*. *Functional Ecology*, **20**, 973-981.
- Molina-Montenegro M., Ávila P., Hurtado R., Valdivia A., Gianoli E. (2006) Leaf trichome density may explain herbivory patterns of *Actinote* sp. (Lepidoptera: Acraeidae) on *Liabum mandonii* (Asteraceae) in a mountain humid forest (Nor Yungas, Bolivia). *Acta Oecologica*, **30**, 147-150.
- Müller M., Siles L., Cela J., Munné-Bosch S. (2014) Perennially young: seed production and quality in controlled and natural populations of *Cistus albidus* reveal compensatory mechanisms that prevent senescence in terms of seed yield viability. *Journal of Experimental Botany*, **65**, 287-297.
- Munné-Bosch S. (2007) Aging in perennials. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **26**, 123-138.
- Munné-Bosch S., Alegre L. (2002) Plant aging increases oxidative stress in chloroplasts. *Planta*, **214**, 608-615.
- Munné-Bosch S., Jubany-Marí T., Alegre L. (2003) Enhanced photo- and antioxidative protection, and hydrogen peroxide accumulation in drought-stressed *Cistus clusii* and *Cistus albidus* plants. *Tree Physiology*, **23**, 1-12.
- Munné-Bosch S., Lalueza P. (2007) Age-related changes in oxidative stress markers and abscisic acid levels in a drought-tolerant shrub, *Cistus clusii* grown under Mediterranean field conditions. *Planta*, **225**, 1039-1049.
- Munné-Bosch S. (2020) Long-Lived trees are not immortal. *Trends in Plant Science*, **25**, 9.
- Oliveira G., Peñuelas J. (2000) Comparative photochemical and phenomorphological responses to winter stress of an evergreen (*Quercus ilex* L.) and a semi-deciduous (*Cistus albidus* L.) Mediterranean woody species. *Acta Oecologica*, **21**, 97-107.

- Oliveira G., Peñuelas J. (2001) Allocation of absorbed light energy into photochemistry and dissipation in a semi-deciduous and an evergreen Mediterranean woody species during winter. *Australian Journal of Plant Physiology*, **28**, 471-480.
- Oliveira G., Peñuelas J. (2004) Effects of winter cold stress on photosynthesis and photochemical efficiency of PSII of the Mediterranean *Cistus albidus* L. and *Quercus ilex* L. *Plant Ecology*, **175**, 179-191.
- Oñate M., Munné-Bosch S. (2010) Loss of flower bud vigour in the Mediterranean shrub *Cistus albidus* L. at advanced developmental stages. *Plant Biology*, **12**, 475-483.
- Papachristou T.G. (2000) Dietary selection by goats and sheep in kermes oak shrublands of northern Greece: Influence of shrub cover and grazing season. In: Ledin I, Morand-Fehr P (Eds) *Sheep and goat nutrition: Intake, digestion, quality of products and rangelands*, Zaragoza, pp. 161-164.
- Pérez-Llorca M., Casadesús A., Munné-Bosch S., Müller M. (2019) Contrasting patterns of hormonal and photoprotective isoprenoids in response to stress in *Cistus albidus* during a Mediterranean winter. *Planta*, **250**, 1409-1422.
- Rankenberg T., Geldhof B., van Veen H., Holsteens K., Van de Poel B., Sasidharan R. (2021) Age-dependent abiotic stress resilience in plants. *Trends in Plant Science*, **26**, 692-705.
- Ribeiro-Neto J., Pinho B., Meyer S., Wirth R., Leal I. (2012) Drought stress drives intraspecific choice of food plants by *Atta* leaf-cutting ants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **144**, 209-215.
- Rodríguez-Ramírez N., Santonja M., Blady V., Ballini C., Montès N. (2017) Shrub species richness decreases negative impacts of drought in a Mediterranean ecosystem. *Journal of Vegetation Science*, **28**, 985-966.
- Roy J., Sonié L. (1992) Germination and population dynamics of *Cistus* species in relation to fire. *Journal of Applied Ecology*, **29**, 647-655.

- Siles L., Müller M., Cela J., Hernández I, Alegre L., Munné-Bosch S. (2017) Marked differences in seed dormancy in two populations of the Mediterranean shrub, *Cistus albidus*. *Plant Ecology and Diversity*, **10**, 231-240.
- Staley J., Mortimer S., Masters G., Morecroft M., Brown V., Taylor M. (2006) Drought stress differentially affects leaf-mining species. *Ecological Entomology*, **31**, 460-469.
- Thomas H. (2002) Ageing in plants. *Mechanisms of Ageing and Development*, **123**, 747-753.
- Thomas H. (2013) Senescence, ageing and death of the whole plant. *New Phytologist*, **197**, 696-711.
- Werner C., Correia O., Beyschlag W. (1999) Two different strategies of Mediterranean macchia plants to avoid photoinhibition damage by excessive radiation levels during summer drought. *Acta Oecologica*, **20**, 15-23.
- Yang L.H., Cenzer M.L., Morgan L.J., Hall G.W. (2020) Species-specific, age-varying plant traits affect herbivore growth survival. *Ecology*, **101**, e03029.
- Zuur A., Ieno E., Elphick C. (2009) A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods in Ecology and Evolution*, **1**, 3–14.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Environmental conditions in the Montserrat mountains during the experimental period. (a) Air temperatures and relative humidity during the measurement days comparing the two sun orientations, and (b) mean daily temperatures and relative humidity, together with precipitation, recorded at the closest meteorological station (see material and methods for details). Arrows in days of measurement.

Fig. 2. Abiotic stress markers in leaves of the *Cistus albidus* population during the year of study as affected by sun orientation of the growing site. (a) Maximum efficiency of photosystem II photochemistry (Fv/Fm), (b) relative water content (RWC), (c) hydration (H), (d) chlorophyll a/b ratio (mg/mg) and (e) total chlorophyll content. Data are mean of $n=50\pm SE$. *P* values of two-ways ANOVA are in the inlets and *P* values $> 0,05$ were considered not significant (NS). Different letters represent differences between seasons and asterisk represents differences between sun orientation groups of the season.

Fig. 3. Herbivory damage recorded during the study as affected by sun orientation of the growing site and expressed as (a) the number of leaves affected by herbivory, (b) percentage of herbivory-damaged leaves from total leaves of the plant and (c) the number of leaves affected by goats or insects. Data are mean of $n=50\pm SE$. *P* values of two-way ANOVAs are in the inlets and *P* values $> 0,05$ were considered not significant (NS). Different letters represent differences between seasons and asterisks represent differences between sun orientation.

Fig. 4. Influence of plant age on abiotic stress markers and herbivory damage during the study. (a) Individual main stem perimeter distribution of the population studied. Population mean and percent deviation are in the inlet. (b) Herbivory damage of the *Cistus albidus* population during the study as influenced by the season and age groups, expressed as the percentage of damaged leaves. *P* values of two-way ANOVA are in the inlets ($P>0,05$ were considered not significant [NS]). Different letters represent differences between seasons and asterisks represent differences between age groups. (c) Results of the two-way ANOVAs for each variable studied with factors “Time” and “Age”. Data are mean of $n=48\pm SE$ for 5-10 years old group and $n=50\pm SE$ for 11-17 years old group.

Figure 1

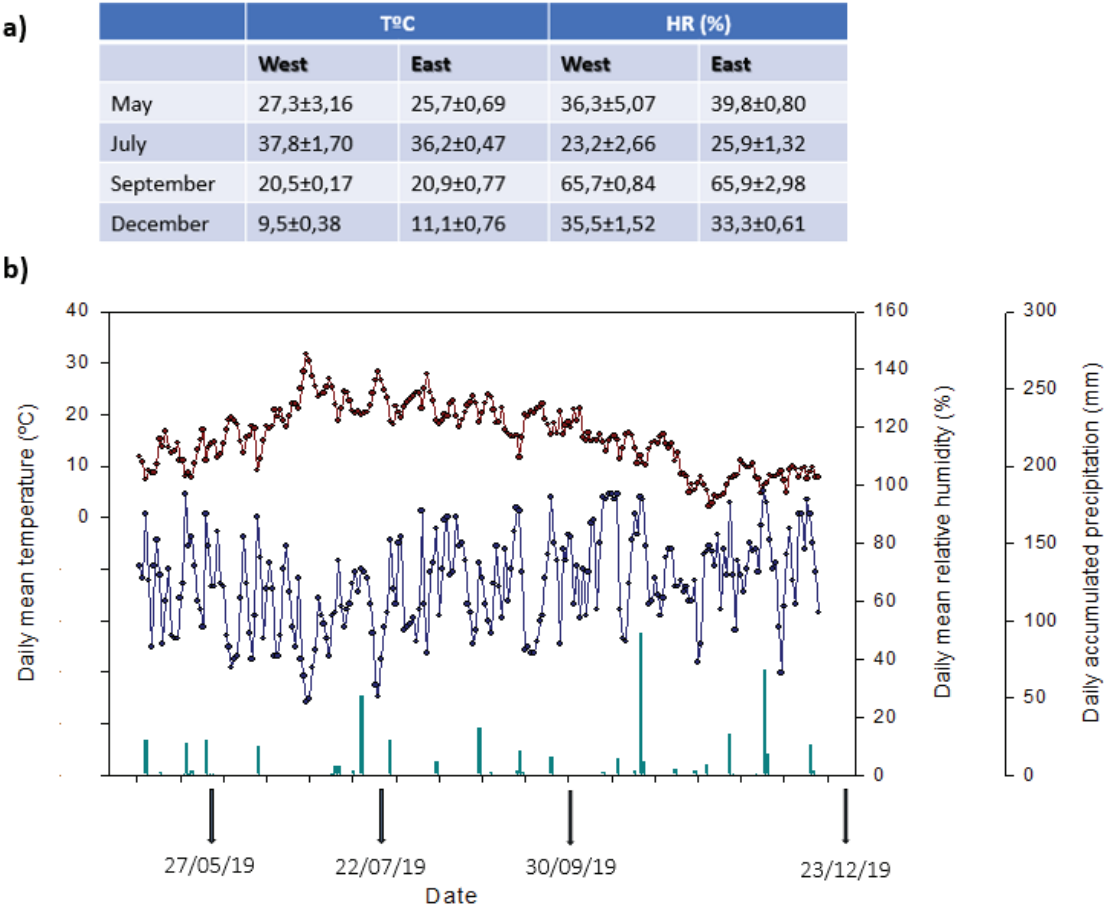


Figure 2

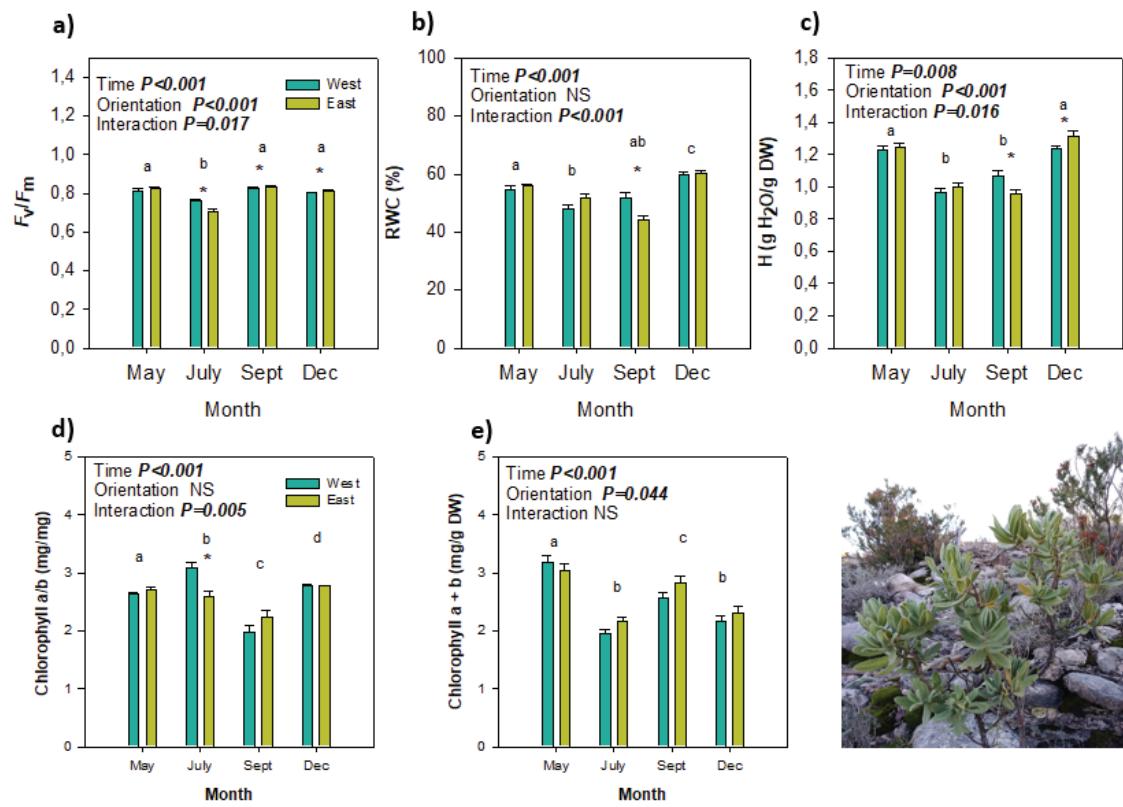


Figure 3

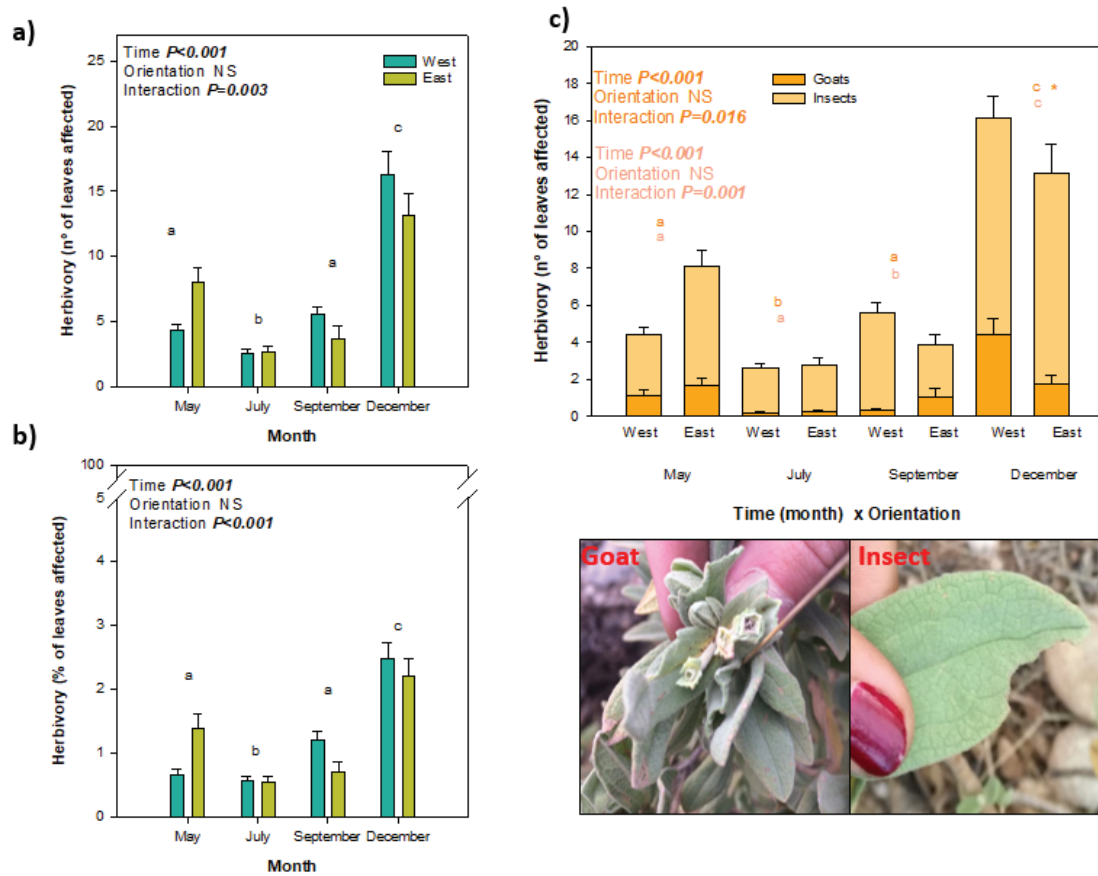
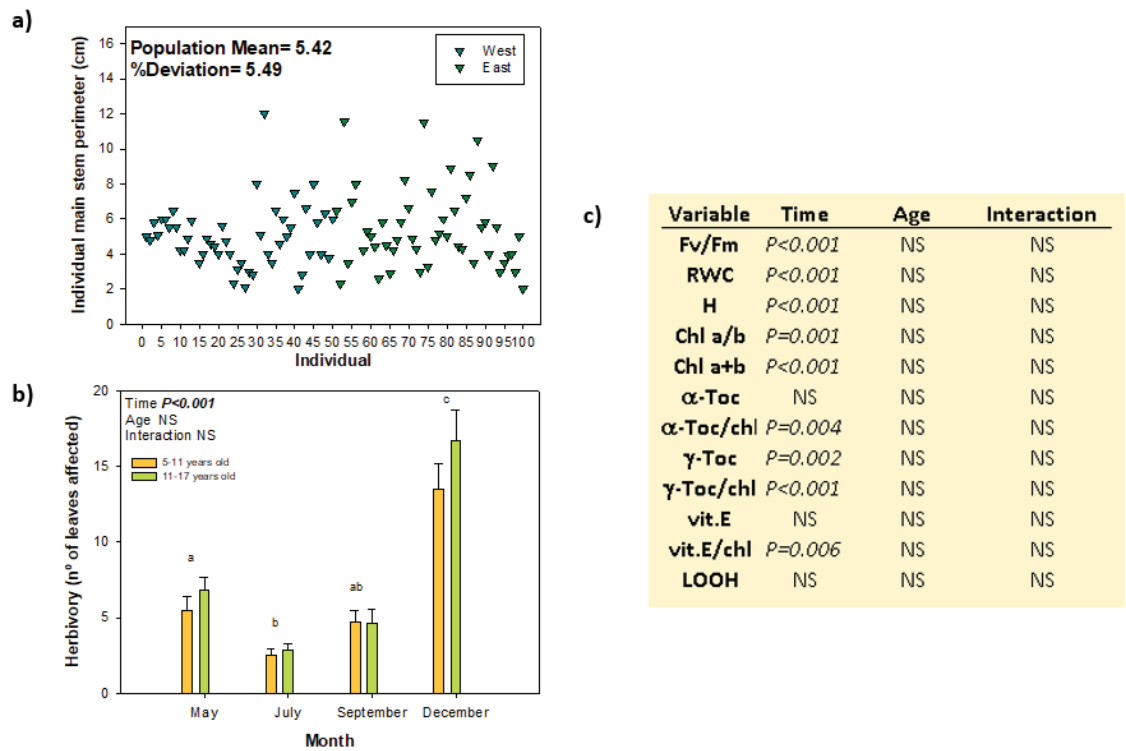


Figure 4



CAPÍTOL 4



Interaccions planta holoparàsita-hoste entre *Cytinus hypocistis* i *Cistus albidus* en el seu hàbitat natural mediterrani: una aproximació espai-temporal

Chapter 4. Holoparasitic plant-host interaction between *Cytinus hypocistis* and *Cistus albidus* in their natural Mediterranean habitat: a spatiotemporal approach

Andrea Casadesús, Sergi Munné-Bosch

Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Research Institute in Biodiversity (IrBio), University of Barcelona, Barcelona, Spain

Enviat a Plant Physiology, 17/05/2022, ID manuscrit: PP2022-RA-00689

Els ecosistemes mediterranis representen una oportunitat única per a estudiar les interaccions planta holoparàsita-hoste. Es van estudiar les senyals hormonals locals i sistèmiques que participen en la relació entre l'arbust dominant *C. albidus* i la planta holoparàsita d'arrel *C. hypocistis* al seu hàbitat natural. Es van examinar la interacció (i) a nivell local, mesurant el perfil hormonal de la zona d'interacció entre la planta holoparàsita i l'hoste, composta de teixits no fotosintètics (l'arrel de *C. albidus* i l'haustori de *C. hypocistis*), i (ii) a nivell sistèmic, examinant el perfil hormonal juntament amb l'estat fisiològic de les fulles de plantes parasitades i no parasitades. A més, es va explorar com les variacions temporals (efectes estacionals) i la localització geogràfica (efectes poblacionals i microclimàtics) influenciaven la resposta sistèmica hormonal i fisiològica de les fulles, mesurant tres poblacions a la primavera i a l'estiu. Els resultats aporten pistes sobre l'estrès local causat pel paràsit i les relacions font-embornal del sistema, principalment influenciades per les citocinines. A més, els jasmonats van activar una resposta de defensa a les fulles, molt lluny del punt d'infecció. El parasitisme no va tenir cap impacte negatiu important sobre l'hoste, almenys tal i com indiquen els marcadors d'estrès fisiològic a les fulles. Inclús es van observar alguns efectes compensatoris (augment en el contingut de clorofil·les), tot i que només durant les suaus condicions ambientals de la primavera. Es conclou que (i) les citocinines i els jasmonats juguen un rol important a nivell local i sistèmic, respectivament, en la resposta hormonal de *C. albidus* enfront l'estrès biòtic causat per *C. hypocistis* creixent al seu hàbitat natural, i (ii) que les aproximacions espai-temporals són essencials per examinar les interaccions planta holoparàsita-hoste en condicions naturals.

Holoparasitic plant-host interaction between *Cytinus hypocistis* and *Cistus albidus* in their natural Mediterranean habitat: a spatiotemporal approach

Andrea Casadesús^{1,2} and Sergi Munné-Bosch^{1,2}

1 Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain

2 Institute of Research of Biodiversity (IRBio), University of Barcelona, Barcelona, Spain

*Author for correspondence: smunne@ub.edu

Running title: Hormones in holoparasitic plant-host interaction

Abstract

Mediterranean-type ecosystems provide a unique and challenging opportunity to study holoparasitic plant-host interactions. We studied local and systemic hormonal signals underpinning the relationship between the dominant shrub *Cistus albidus* and the root holoparasitic plant *Cytinus hypocistis* in their natural habitat. We examined the interaction (i) locally, by measuring the hormonal profiling of the interaction zone between the holoparasitic plant and the host, composed of non-photosynthetic tissues (*C. albidus* root and *C. hypocistis* haustorium), and (ii) systemically, by examining the hormonal profiling, together with the physiological status, of leaves from infected and uninfected plants. Furthermore, we explored how temporal variation (seasonal effects) and geographical location (microclimatic and population effects) influenced the systemic hormonal and physiological response of leaves by measuring three populations in spring and summer. Results shed light on parasite-caused local stress and the source-sink relations of this system, mainly influenced by cytokinins. Jasmonates triggered a defense response in

leaves, far from the infection point. Parasitism did not have any major negative impact on the host, as indicated by physiological stress markers in leaves. Rather, some compensatory effects were observed (increased chlorophyll contents), although these occurred under the mildest environmental conditions of spring only. We conclude that (i) cytokinins and jasmonates play a major role at the local and systemic level, respectively, in the hormonal response of *C. albidus* to the biotic stress caused by *C. hypocistis* growing in their natural habitat, and that spatiotemporal approaches are essential to examine holoparasitic host-plant interactions in the field.

Keywords: biotic stress, *Cistus albidus*, *Cytinus hypocistis*, holoparasitism, jasmonates, trade-off, non-photosynthetic tissues, phytohormones.

INTRODUCTION

After billions of years of plant evolution, some plants have lost the capacity to transform sunlight into energy. These are the holoparasitic plants (Westwood et al., 2010). By taking water, carbon, and nutrients from their host, holoparasitic plants can negatively impact the ecophysiology of the shrub community in natural Mediterranean ecosystems, so that they can directly cause productivity and reproductive output losses in the host in the short term. However, in the long term they can indirectly increase biodiversity by altering the balance between competitively dominant species and subordinate species, among other positive effects (Press and Phoenix, 2005; Casadesús and Munné-Bosch, 2021; Těšitel et al., 2021). In Mediterranean-type ecosystems, there is an ancient relationship between the competitively dominant shrubs of the *Cistaceae* family and the widely-distributed and paradigmatic root holoparasitic genus *Cytinus*. This genus is composed of eight species, of which *C. hypocistis* and *C. ruber* (now considered *C. hypocistis* subsp. *clusii*) are present in the Mediterranean region. They show extreme morphological modifications. Their vegetative body is reduced to an endophytic structure that develops inside the host's roots and is connected by a continuous vessel called the haustorium (de Vega et al., 2007). Sturdy inflorescences (monoecious in the Mediterranean region) emerge at soil level. The color of the inflorescence and the host species determine five different genetic races of *C. hypocistis* haustorium (de Vega et al., 2008). For instance, *C. hypocistis* subsp. *clusii*, with ivory-white to pink flowers, parasitizes *Cistus albidus*, representing a unique and challenging opportunity to study holoparasitic plant-host interactions in Mediterranean-type ecosystems (Casadesús and Munné-Bosch, 2021).

Phytohormones are vital regulators of physiological processes in plants, and they are crucial players in holoparasitic plant-host interaction. Jasmonic acid (JA) and salicylic acid (SA) are known to participate in the biotic stress response at systemic level, but they

have also been suggested to be involved in the host defense response in the initial stages of holoparasite infection (Gutjahr and Paszkowski, 2009; Torres-Vera et al., 2016). The function of abscisic acid (ABA) in plants is mainly related to halting growth in response to abiotic stress and regulating stomatal closure in response to drought, but it has been proposed that it is also involved in host defense in the early stages of holoparasitic plant infection (Tuteja, 2007; Torres-Vera et al., 2016). In addition, other phytohormones such as strigolactones, auxins, gibberellins, and cytokinins, are involved in processes related to seed germination, haustorium induction, and source-sink relations in this fascinating interaction between parasitic plants and their hosts. Unfortunately, however, very little is still known on the hormonal signals modulating holoparasitic plant-host interaction in Mediterranean-type ecosystems, most specifically in studies performed in plants growing in their natural habitat (see Casadesús and Munné-Bosch, 2021).

Vitamin E is an important set of lipophilic antioxidants synthesized in plastids which can prevent lipid peroxidation of membranes and of quenching and scavenging ROS in response to stress. This vitamin, which includes α , β , δ , γ - tocopherols and tocotrienols, is synthesized by all photosynthetic organisms. Its function is attributed to the double bonds in the phytyl moiety and hydroxyl groups in the chromanol ring, and a difference in the position and saturation of the hydrophobic chain is what determines the different homologues (Falk and Munné-Bosch, 2010). α -Tocopherol, the main form of vitamin E, has been demonstrated to be one of the most highly responsive antioxidants to environmental change in several representative Mediterranean plants, including *C. albidus*, and it is therefore a useful stress marker (Fernández-Marín et al., 2017). Indeed, the accumulation of vitamin E (α -tocopherol) is a common response to abiotic stress, especially in Mediterranean plants. Beyond its photoprotective and antioxidant role in the chloroplast (Krieger-Liszkay and Trebst, 2006; Havaux et al., 2015; Kumar et al., 2021),

vitamin E has been proposed to participate in stress sensing and signaling, probably due to its modulation of lipid peroxidation in thylakoid membranes, acting in cooperation with other retrograde signaling effectors, and especially due to its modulation of signaling oxylipins such as jasmonates (Muñoz and Munné-Bosch, 2019; Casadesús et al., 2021), thus playing a potential role in holoparasitic plant-host interactions. In recent years, the bidirectional relationship of the chloroplast-derived oxylipin jasmonates with the chloroplastic antioxidant vitamin E has also been proposed to be central in the regulation of biotic and abiotic stress response in plants (Demmig-Adams et al., 2013, 2014; Muñoz and Munné-Bosch, 2019; Casadesús et al., 2021), but this relationship has still not been examined in holoparasitic plant-host interactions. Although vitamin E function is generally studied in photosynthetic tissues, no studies have focused thus far on the possible role of tocopherols in holoparasitic plants. Among vitamin E compounds, tocotrienols have also been studied in non-photosynthetic tissues such as seeds, fruits, flowers, and tubers, where they probably protect the stored lipids and membranes from oxidation (see Falk and Munné-Bosch, 2010; Muñoz and Munné-Bosch, 2019). However, the synthesis and function of vitamin E in non-chloroplastic tissues that contain other plastid types remain poorly known.

Controlling the spread of parasitic plants in natural ecosystems requires understanding the interaction between parasites and hosts. Although several studies have identified several factors and processes underlying holoparasitic plant-host interactions, knowledge of the mechanisms underlying the interactions between host and parasitic plants, specifically at the interface between the two organisms, is still relatively limited, most particularly under field conditions (Jhu et al., 2022; Munné-Bosch, 2022). In the present study, we aimed at better understanding the local and systemic stress responses occurring in *C. albidus* L. in response to the holoparasitic plant *C. hypocistis* L. in spring

and summer in plants growing in their natural habitat, paying particular attention to the role of phytohormones and the putative relationship between vitamin E and jasmonates. Additionally, we aimed to compare the hormonal signals involved in the systemic physiological response of photosynthetic tissues (leaves) of host plants upon infection to those involved in the local biochemical interaction between the holoparasitic plant and the host, analyzing the non-photosynthetic tissues involved in the points of contact between them (including host roots and parasite haustorium).

Results

Vitamin E and phytohormones in non-photosynthetic tissues involved in the host-holoparasite interaction

We studied differences in phytohormone levels between leaves (photosynthetic tissues) and in the interaction zone between the holoparasitic plant and the host (non-photosynthetic tissues), the later to assess the response at local level. A differential phytohormone profile was observed between *C. albidus* leaves and roots and *C. hypocistis* haustorium (**Figure 1, Suppl. Figs. 1-6**). Non-photosynthetic tissues at the parasite-host interaction zone, and most particularly the haustorium, contained higher content of active cytokinin, 2-isopentenyl adenine (**Figure 1**) and ABA (**Suppl. Fig. 4**), but *trans*-zeatin (*t*-Z) type cytokinins were the only ones affected by parasitism. The active cytokinin *t*-Z and its precursor *t*-ZR increased in the root when the holoparasite was present. Furthermore, *t*-ZR content was significantly higher in the basal than the apical haustorium, showing values of 78 and 13 ng/g dry weight (DW), respectively (**Figure 1**).

We used vitamin E as a stress marker to assess holoparasitic plant-host interaction at the local level. On average, α -tocopherol showed levels of between 17 and 27 $\mu\text{g/g}$ DW in the three parts studied of *C. albidus* root (distal, medial, and proximal to the holoparasite vegetative body). These concentrations were about 92-95% lower than the lowest concentration found in leaves, but the content of α -tocopherol in *C. albidus* roots was affected by parasitism, increasing when the root holoparasite was present and thus indicating local stress in roots (**Figure 2**). However, malondialdehyde (MDA) contents, an indicator of the extent of lipid peroxidation, did not increase in roots of infected plants compared to non-infected ones. In contrast to the vitamin E profile of *C. albidus* leaves, γ -tocopherol was not found in roots. Neither leaves nor roots contained β and δ -tocopherols

and α , β , δ , γ -tocotrienols. A completely different vitamin E profile was found in the haustorium. In this non-photosynthetic tissue, we found trace (non-quantifiable) amounts of α -tocopherol and γ -tocotrienol ($<0.5 \mu\text{g/g DW}$) in both basal and apical haustorium. γ -Tocopherol was not found, but α -tocotrienol was present in the highest concentration of all vitamin E homologues in this tissue (6 g/g DW on average, **Figure 2**).

Holoparasitism by *C. hypocistis* increased jasmonate content but did not negatively affect leaf physiology of *C. albidus* growing in their natural habitat

We studied differences in various physiological stress markers and phytohormone levels in leaves of one hundred plants (half infected and half uninfected) growing in Catalonia (NE Spain) to assess the temporal (seasonal) variations in the plant response at systemic level. Environmental conditions during the days of measurement, which were typically Mediterranean, revealed significant increases in air temperature from spring to summer, reaching temperatures up to 37°C at midday in July. Environmental conditions, in terms of average temperature, relative humidity and solar radiation impacting on plants, did not differ between uninfected and infected plants (**Suppl. Table 1**). A significant increase in the contents of 12-*oxo*-phytodienoic acid (OPDA), the precursor of JA and jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile), was observed in infected relative to uninfected plants during spring, while the JA-Ile (the main bioactive form of jasmonates) leaf content of infected shrubs increased during the summer only, reaching values of 1300 ng/g DW (**Figure 3**). Contents of cytokinins (**Suppl. Fig. 7**), gibberellins (**Suppl. Fig. 8**) and auxin (**Suppl. Fig. 9**) in leaves of *Cistus albidus* plants during the study were not influenced by parasitism, except for an interaction between parasitism and season in ABA contents, which revealed that this hormone increases more in infected than uninfected shrubs during summer (**Figure 3**). This systemic response at the foliar level was paralleled with enhanced contents of vitamin E in

infected shrubs, and most notably in γ -tocopherol, which increased 3-fold in regard to uninfected shrubs, despite the extent of lipid peroxidation kept unaltered (**Figure 4**). Despite the stress caused on plants, parasitism did not negatively affect any of the other physiological stress markers in leaves (including leaf water and pigment content, maximum efficiency of PSII and extent of lipid peroxidation), neither during spring nor summer (**Figure 4, Suppl. Fig. 10**). Rather, it slightly improved leaf hydration and total chlorophylls contents during spring. These compensatory effects were observed during the milder conditions of spring, but not during summer (**Figure 4**).

Microclimatic and population-related effects on systemic signals and impact of holoparasitism

Population and microclimatic effects on *C. albidus* response to the parasite was examined by comparing the environmental conditions, hormonal profiling, and physiological status of leaves in three populations located in Catalonia (NE Spain, **Table 1**), two of them in the coast and the other one more distant geographically (**Suppl. Fig. 11**). Climatic conditions were typically Mediterranean in the three populations, with the northernmost population (population 2) showing highest levels of infection (**Suppl. Fig. 11**). This population was also the one most exposed to drought, as indicated by monthly accumulated precipitation (**Suppl. Figs. 12-15**). No differences were observed from a phenological perspective, with flowering in May and fruiting in July in the three studied populations.

The three populations seemed to tolerate parasitism very well both during spring and summer but showed some differences in the mechanisms underlying plant response to a combination of biotic (holoparasitism) and abiotic stress (summer drought). While populations 2 and 3 seemed to be the ones showing strongest compensatory mechanisms in terms of enhanced chlorophyll contents in leaves during spring (**Figure 5**), they were also

the ones showing more stress in infected plants during the summer, as indicated by enhanced contents of γ -tocopherol in population 3 (**Figure 6**) and of ABA contents in population 2 (**Figure 7**). Furthermore, in population 3 we did not observe an increase in the JA-Ile (the main bioactive form of jasmonates) leaf content of infected shrubs in summer as we did in the other two populations, in which a 5-fold increase was observed in JA-Ile leaf content of infected shrubs, reaching values of 1600 ng/g DW (**Figure 8**).

Discussion

A crucial cytokinin role in the host-holoparasite interaction at the local level

Source-sink relations are crucial in holoparasitic plant-host interaction, and the master regulators of these kinds of relationship are cytokinins. Of all the growth-related phytohormones studied in *C. albidus* root (cytokinin, auxin, gibberellin, ABA, SA and jasmonates), a parasitism effect was only found in the *t*-Z type cytokinins. Cytokinins are mobile adenine derivatives synthesized in shoots and roots and translocated systemically in long-distance transport through the vascular system. Specifically, the *t*-Z type cytokinins are mainly synthesized in roots and translocated root-to-shoot by the ABC transporter ABCG14 (Lacombe and Achard, 2016). Apart from their functions in cell division and differentiation and leaf senescence, they are essential in parasitic plant-host interaction. Their importance is highlighted not only by their involvement in haustorium induction, but also by their effect on host root morphology and their regulation of source-sink relations in plants (Spallek et al., 2017; Casadesús and Munné-Bosch, 2021; McIntyre et al., 2021). Lacking photosynthesis, holoparasitic plants depend on the host for carbon, water, nutrients, and photoassimilates, acting as an extra sink for the host. Host photosynthesis can be stimulated by this extra demand, but this compensatory response is limited (Watling and Press, 2001). Cytokinins positively affect plant photosynthesis and stomatal opening, but they exert transcriptional regulation in several genes encoding invertases and transporters involved in the source-sink transport of sucrose and amino acids (Acharya and Assmann, 2009; McIntyre et al., 2021). In addition, it has been suggested that the cytokinin composition profile in the parasite *Cuscuta japonica* may facilitate source-sink relations with the host, highlighting the possible different roles of each type of cytokinin in parasitic plant-host interaction (Furuhashi et al., 2014). Overall, our results suggest that the cytokinin profile in the interaction tissues (both the host root and the parasite haustorium),

specifically the *t*-Z type cytokinin, may have an important function in source-sink relations in the *C. albidus*-*C. hypocistis* interaction.

Vitamin E is involved in the holoparasite plant-host interaction at the local level

Vitamin E has been extensively studied in photosynthetic tissues, but less is known about vitamin E in non-photosynthetic tissues and even less in non-photosynthetic plants. This is the first time that vitamin E has been detected in *C. albidus* roots and in the haustorium of an achlorophyllous holoparasitic plant, and that their levels have been shown to be affected in roots of any plant species by parasitism. The fact that key enzymes in vitamin E biosynthesis are all localized in the plastids or plastoglobuli renders vitamin E synthesis in non-photosynthetic tissues or its transport through the phloem a matter of debate (Bermúdez et al., 2018; Muñoz and Munné-Bosch, 2019). α -Tocopherol has been determined in similar amounts in roots of other species affected by abiotic stress and developmental stage (Luby et al., 2014; Soba et al., 2020), but no studies have been performed in biotic stress conditions induced by parasitism. Our results suggest that vitamin E is involved in the host-holoparasite interaction at the local level in roots. The presence of vitamin E (α -tocotrienol) in the haustorium of *C. hypocistis* sheds some light into some questions. Although the plastid genome of *C. hypocistis* shows a strong reduction compared to its photosynthetic relatives (Roquet et al., 2016, see also Wicke et al., 2013), this holoparasitic plant is capable of synthesizing vitamin E. Even so, a completely different vitamin E profile was found in the haustorium compared with the host root (α -tocotrienol instead of α -tocopherol), and no tocotrienol was found in host roots evidencing that the non-green holoparasitic plant *C. hypocistis* keeps its own metabolic machinery to synthesize vitamin E. Furthermore, the parasite induced α -tocopherol synthesis in the host root, thus showing that vitamin E elicitation by the host is triggered by biotic stress. Vitamin

E could exert a protective function here in response to stress, as indicated by MDA levels in roots, which did not differ between infected and uninfected plants. We can also speculate that it possibly acts to facilitate sucrose transport between the source (host) and the sink (parasite), as has been proposed for *Cuscuta spp.* (van der Kooij et al., 2005). Taken together, these findings highlight the involvement of vitamin E in the holoparasitic plant-host interaction. In addition, they strongly suggest that the non-photosynthetic plant *C. hypocistis* is capable of synthesizing its own vitamin E, although further research is required to unravel its function there and why it accumulates α -tocotrienol instead of α -tocopherol.

Systemic signals involved in host defense and foliar physiological status

An evaluation of the temporal (seasonal) influence on the holoparasitic plant-host interaction focused on systemic effects (including hormonal profiling analyses and a characterization of the foliar physiological status) revealed a major involvement of jasmonates in holoparasitic plant-host interactions with a marked seasonal effect. While the jasmonate precursor OPDA increased in infected plants in spring, the active jasmonate form JA-Ile increased in response to holoparasitism during the summer, thus confirming the major defensive role hormones play in holoparasitic plant-host interaction, but also highlighting the importance of studying hormone dynamics under more realistic natural conditions (Nguyen et al., 2016). Jasmonates have been proposed as a point of convergence between biotic and abiotic stress responses, such as MYC or WRKY TFs, MAPK cascades, and ROS or master regulators of the ROS metabolism (Atkinson and Urwin, 2012; Atkinson et al., 2014), and in this respect, the chloroplast (where jasmonates are initially synthesized in leaves) is an essential site since this is where sunlight is transformed into energy. As such, jasmonates can be considered a primary sensor of environmental changes that, by retrograde signaling, leads to acclimation (Muñoz and Munné-Bosch, 2019). Therefore, jasmonates are reliable signals that host plants have evolved to respond to

holoparasitic plants, as it occurs with other hormones that play a key role also in the parasite and play a role in host specificity (Bouwmeester et al., 2021).

Aside from jasmonates, we also found an increase in ABA contents in infected compared to uninfected plants during the summer, thus suggesting ABA may be triggering defence signals together with jasmonates in the host response to the holoparasitic plant during the most stressful conditions of summer. To shed more light into this question, we examined population- and microclimatic-related effects by comparing the hormonal profiling and foliar physiological status of three populations. Interestingly, most striking differences were observed in population 2, which was the one more exposed to drought stress and the only one showing significant increases in ABA during summer in infected plants, and population 3, which was the one found at the highest altitude and the only one showing significant, albeit very slight reductions in the F_v/F_m ratio and enhanced foliar γ -tocopherol contents in infected plants during the summer. Enhanced ABA contents in population 2 and slightly lower F_v/F_m ratio together with enhanced foliar γ -tocopherol contents in population 3 suggest an increased abiotic stress in these populations compared to population 1 and, most importantly, indicate that the host defense response is modulated by population and microclimatic factors. Indeed, as is well known, drought stress and higher altitudes accentuate the abiotic stresses affecting Mediterranean shrubs, and *C. albidus* is no exception. Indeed, drought shapes all Mediterranean-type ecosystems and altitude is a pivotal factor for segregation of species of this genus (García-Plazaola et al., 2000; Al-Qura'n 2007). Intriguingly, parasitism also seemed to positively affect populations 2 and 3 during spring, where infected individuals presented higher H and Chl a+b values. In line with the host quality hypothesis, this could be the result of parasite selection of the best host, which has greater access to resources such as water, or the result of the cross-tolerance phenomenon (Watson 2000; Foyer et al., 2016). Conversely,

parasitism negatively influenced the highest population in summer (when the individuals were also subject to abiotic stress), as discussed before. Thus, the impact of parasitism on the host was clearly accentuated by drought and by increasing altitude, where a trade-off between abiotic and biotic stress appeared under a stress combination scenario.

In addition, the infected individuals of population 3 showed elevated vitamin E content in summer. The importance of the relationship between vitamin E and jasmonates has been repeatedly highlighted in the last decade (Demmig-Adams et al., 2013, 2014; Muñoz and Munné-Bosch, 2019; Casadesús et al., 2021). At least in the case of *C. albidus*, this relationship is bidirectional. While JA could favor vitamin E accumulation in leaves, a negative correlation has been found between foliar vitamin E and the capacity to synthesize jasmonates, seen as the precursor OPDA, as we observed in the current study (**Suppl. Figs. 16 and 17**, Casadesús et al., 2021). In the current situation, the trade-off between abiotic stress (summer) and biotic stress (parasitism) that emerged in the highest population, could be mediated in part by the negative relationship between vitamin E, as an abiotic stress response element, and jasmonates, as an element of the biotic stress response. Taken together, our results suggest that the relationship between vitamin E and jasmonates may form part of a robust network regulating the interaction of biotic and abiotic stress responses and could have important implications for plant performance in *C. albidus* under natural Mediterranean conditions.

Conclusions

We conclude that for our understanding of phytohormones especially, but also vitamin E, in the response of Mediterranean shrubs to holoparasitic plants, despite their difficulties and limitations, studies can only be performed through the lens of the complexity of the spatiotemporal interactions in their natural Mediterranean habitat. Results suggest that while cytokinins play a crucial role locally in the interaction between the host and the holoparasite under natural conditions, probably related to source-sink relations, jasmonates are essential in the host response at the systemic level. Furthermore, we have determined the presence of vitamin E in the non-photosynthetic tissues of the system studied, which is a striking evolutionary finding that raises several outstanding questions. Furthermore, we have also shown that hormonal response and physiological status of the host is modulated by population- and microclimatic-related effects. Overall, our results shed new light on our understating of holoparasitic plant-host interaction in natural Mediterranean-type ecosystems, which may ultimately help better manage the biodiversity of these unique ecological communities.

Materials and methods

Plant material, experimental design and growth conditions

All experiments were performed in *Cistus albidus* L. growing under natural Mediterranean conditions in Catalonia (NE Spain) during 2021. We performed three subsets of experiments, including (1) spatial evaluation of the holoparasitic plant-host interaction: local effects, (2) temporal (seasonal) evaluation of the holoparasitic plant-host interaction: systemic effects, and (3) spatial evaluation of the geographical (microclimatic and population-related) effects on systemic signals. In all experiments, when *C. hypocistis* inflorescences were visible in spring, we meticulously dug the rhizosphere zone of plants to ensure that roots of the host plant were infected by the underground holoparasitic plant and then randomly selected infected and uninfected individuals, which were situated at least 1 km away from the infected plants (we established a safe distance from the infected individuals and meticulously searched for the parasitic plant to ensure its absence).

For the spatial evaluation of the holoparasitic plant-host interaction, including local effects at the root-haustorium interface (experiment 1), the study was performed in *C. albidus* growing under natural Mediterranean conditions in the Natural Park of Montgrí i les Illes Medes (Catalonia, NE Spain). We selected individuals that were all of a similar height and perimeter in order to eliminate age and size effects, and we sampled roots, including three parts of the *C. albidus* root of all infected and uninfected individuals and haustorium of the holoparasitic plant, including two parts of the haustorium of *C. hypocistis* L. that were infecting *C. albidus*. For tissue zonation studies, samples were taken from zones proximal, medial, and distal to the holoparasitic plant (equivalent parts of the root were sampled in uninfected individuals), and haustorium samples were divided into basal (the physical contact zone between the host root and the parasite) and apical zones. Samples

were taken on 4th May and immediately frozen in liquid nitrogen and maintained at -80°C until performing biochemical (hormonal profiling, vitamin E and lipid peroxidation) analysis. As this experiment included destructive analyses in roots, these plants were not used for the other two experiments.

For the evaluation of the temporal (seasonal) influence on the holoparasitic plant-host interaction (experiment 2), which was focused on systemic effects (including hormonal profiling analyses and a characterization of the foliar physiological status through the evaluation of stress markers), the study was performed by taking samples both during spring (May) and summer (July) from approximately 100 *C. albidus* individuals (half infected with *C. hypocistis* and half uninfected) from natural populations growing under Mediterranean conditions in Natural Parks of Catalonia (NE Spain). The monitoring of temperature and relative humidity of each zone on sampling days using a portable thermo-hygrometer (DO9847 Multifunction Meter, Delta Ohm, Padova, Italy) allowed us to exclude environmental differences between infected and uninfected plants. We selected individuals that were all of a similar height and perimeter in order to eliminate age and size effects.

For the study of the microclimatic and population-related effects on systemic signals (experiment 3), samples that were taken from May to July 2021 in the previous experiment from three different populations of *C. albidus* growing under natural Mediterranean conditions were selected. We took samples from 15 infected plants and 15 uninfected plants from each of the three selected populations, the first growing in the Natural Park of Montgrí i les Illes Medes (Population 1, at 55-113 m.a.s.l.), the second a bit northern but also in the coast in the Natural Park of Cap de Creus (Population 2, at 340-530 m.a.s.l.), and the third with a more continental location in Catalonia in the Natural Park of Sant Llorenç del Munt i l'Obac (Population 3, at 792-911 m.a.s.l.). The temperature and

relative humidity of each zone were recorded on sampling days using a portable thermo-hygrometer (DO9847 Multifunction Meter, Delta Ohm, Padova, Italy). Monitoring of climate data was provided by weather stations near the populations studied (Meteorological Service of Catalonia; MeteoCat). Again, individuals were all of a similar height and perimeter in order to eliminate age and size effects.

For experiments 2 and 3, samplings were performed on 4th May and 21st July 2021 in population 1, 27th May and 22nd July in population 2, and 26th May and 20th July in population 3 by collecting fully developed, sun-exposed, and undamaged apical leaves from *C. albidus* individuals. Leaves were sampled on clear, sunny days at midday (at maximum incident daily solar radiation), and immediately frozen in liquid nitrogen and maintained at -80°C until performing biochemical (hormonal profiling, vitamin E and lipid peroxidation) analysis.

Biochemical analyses

A methanolic extract was always used as the starting point for all biochemical analyses including hormonal profiling analysis and determination of chlorophylls and vitamin E. This extract was obtained using 100 mg of well-powdered fresh leaf in 500 µl of methanol with 0.01% butylated hydroxytoluene (BHT) to avoid the oxidation of compounds. For roots, it was obtained using 50 mg of well-powered fresh tissue in 500 µl of methanol with 0.01% BHT, and for haustorium, using 50 mg of well-powered freeze-dried tissue in 500 µl of methanol with 0.01% BHT. This was vortexed before and after ultrasonication for 30 minutes (Branson 2510 ultrasonic cleaner, Branson, Danbury, CT, USA), centrifugated at 13000 rpm at 4°C, and the supernatant was collected. This process was repeated twice with 500 µl of solvent for leaves and 250 µl for roots and haustorium, until obtaining a final volume of extract of 1.5 mL and 1 mL, respectively.

Hormonal profiling

Phytohormone profiling included analyses of jasmonates, more specifically OPDA, JA and JA-Ile; salicylic acid (SA), ABA, cytokinins, including *t*-Z, *t*-ZR, isopentenyladenosine and isopentenyladenine; gibberellins, including GA₄ and GA₇; and auxin, indole-3-acetic acid. The extraction process was performed as explained above, but deuterium-labeled internal standards were added (Olchemim, Olomouc, Czech Republic) before vortexing. The extract was injected into the UHPLC/ESI-MS/MS system after filtration using a 0.22 µm PTFE filter (Phenomenex, Torrance, CA, USA), and hormones were analyzed using the positive and the negative ion mode as described by Müller and Munné-Bosch (2011).

Physiological stress markers

Maximum efficiency of photosystem II (F_v/F_m) was measured in leaves based on chlorophyll fluorescence using a fluorimeter Mini-PAM II (Photosynthesis yield analyzer, Walz, Germany) after 1 h adaptation of leaves to dark. Relative leaf water content and leaf hydration were measured as described by Munné-Bosch et al. (2003).

For chlorophyll analysis, 100 µl of leaf extract as obtained before was then diluted 1/10 (v/v) with pure methanol and absorbance was read at 470 nm, 653 nm, 666 nm, and 750 nm using a UV/Visible double beam CE Aquarius spectrophotometer (Cecil Instruments Ltd, Cambridge, UK). To quantify chlorophyll *a* and *b* content of samples, we used the equations described by Lichtenthaler and Wellburn (1983).

For vitamin E analysis in leaves, roots and haustoria, including α , β , γ , δ -tocopherols and α , β , γ , δ -tocotrienols, the methanolic extracts obtained as described before were used and separation and quantification by HPLC were performed as described by Cela et al. (2011) after filtration using a 0.22 µm PTFE filter (Phenomenex, Torrance, CA, USA). This was then injected into the HPLC system (consisting of a Waters 600 controller

pump, a Waters 714 plus auto-sampler, and a Jasco FP-1520 fluorescence detector). The mobile phase was a mixture of *n*-hexane and 1,4-dioxane (95.5:4.5, v/v) at a flow rate of 0.7 mL/min. Tocopherol homologues were separated in a normal-phase column (Inertsil 100A, 5 μ m, 30 $\times$ 250 mm, GL Sciences, Torrance, CA, USA). Fluorescence was detected at an excitation wavelength of 295 nm and emission at 330 nm. Standards of all homologues analyzed (Sigma–Aldrich) were used for quantification.

For determining the MDA content in leaves, roots and haustoria, the thiobarbituric acid (TBA)-reactive substances assay, was used as in Hodges et al. (1999). In brief, samples were extracted with 80 % (v/v) ethanol containing 0.01 % (w/v) BHT, then vortexed for 20 s and exposed to ultrasonication for 30 min (Bransonic ultrasonic bath 2800) and then vortexed again for 20 s and exposed to ultrasonication for 15 min. After a centrifugation process at room temperature for 10 min at 13000rpm, the supernatant was recovered, and the pellet re-extracted twice using the same procedure to final volume of 3 mL. Then, two tubes for sample were used: (a) -TBA, with 1 mL extract + 1 mL 20 % trichloroacetic acid (w/v) with 0.01 % BHT (w/v) and (b) +TBA, with 1 mL extract + 1 mL 20 % trichloroacetic acid (w/v), 0.01 % BHT (w/v) and 0.65 % thiobarbutiric acid (w/v). Tubes were incubated at 95 °C for 25 min. Subsequently, the reaction was stopped by maintaining them at 4 °C for 10 min. After centrifugation at 1091 g at room temperature for 5 min, MDA content in samples were analyzed by spectrophotometry and quantified using the equations developed by Hodges et al. (1999).

Statistical analysis

A two-way ANOVA was performed to determine the effect of “Season” and “Parasitism” in leaves using the LM model to deal with data heterogeneity, and the GLS model for “Tissue” and “Parasitism” in roots using the GLS model to deal with data heterogeneity.

The effect of “Tissue” in haustoria was analyzed using a one-way ANOVA. A three-way ANOVA was performed to determine the effect of “Season”, “Population” and “Parasitism” in leaves using the LM model to deal with data heterogeneity. Multiple comparisons were tested with Tukey’s post hoc test. All differences were considered significant when $P \leq 0.05$. Normality and homoscedasticity of residues were checked as described by Zuur et al. (2009). Correlation analyses were performed using Spearman’s rank correlation test. All statistical tests were performed using R statistical software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Acknowledgements

We are very grateful to Montgrí i les Illes Medes Natural Park, Cap de Creus Natural Park, and Sant Llorenç del Munt i l’Obac Natural Park for their help in access permission and to the Experimental Field Facilities and the Scientific-Technical Facilities of the University of Barcelona for technical assistance. We are also indebted to all members of the research team for their help with samplings and biochemical analyses. This work was funded by the Spanish Government through project reference number PID2019-110335GB-I00 and by the Catalan Government through an ICREA academia award to SMB.

Author contributions

AC and SMB conceived and designed the study. AC performed experiments and biochemical analysis. SMB wrote the manuscript with the help of AC. AC prepared all figures and analyzed the data with the help of SMB. Both authors contributed to the discussion of ideas and revised and approved the final manuscript.

References

- Acharya N, Assmann S** (2009) Hormone interactions in stomatal function. *Plant Mol Biol* **69**: 451-462
- Al-Qura'n S** (2007) Vegetation structure of Ajlun woodlands in northern Jordan. *J Sustain For* **24**: 51-60
- Atkinson NJ, Jain R, Urwin PE** (2014) The response of plants to simultaneous biotic and abiotic stress. In: Mahalingam R (Eds). *Combined stresses in plants*. Springer International Publishing, Switzerland. pp 181-201
- Atkinson NJ, Urwin PE** (2012) The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *J Exp Bot* **63**: 3523-3544
- Bermúdez L, del Pozo T, Lira B, Godoy F, Boos I, Romanò C, et al.** (2018) A tomato tocopherol-binding protein sheds light on intracellular α -tocopherol metabolism in plants. *Plant Cell Physiol* **59**: 2188-2203
- Bouwmeester H, Li C, Thiombiano B, Rahimi M, Dong M** (2021) Adaptation of the parasitic plant lifecycle: germination is controlled by essential host signaling molecules. *Plant Physiol* **185**: 1292–1308
- Casadesús A, Bouchikh R, Pérez-Llorca M, Munné-Bosch S** (2021) Linking jasmonates with vitamin E accumulation in plants: a case study in the Mediterranean shrub *Cistus albius* L. *Planta* **235**: 36
- Casadesús A, Munné-Bosch S** (2021) Holoparasitic plant-host interactions and their impact on Mediterranean ecosystems. *Plant Physiol* **185**: 1325-1338
- 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 Cell Physiol* **52**: 1389-1400

- de Vega C, Berjano R, Arista M, Ortiz P, Talavera S, Stuessy T** (2008) Genetic races associated with the genera and sections of host species in the holoparasitic plant *Cytinus* (Cytinaceae) in the Western Mediterranean basin. *New Phytol* **178**: 875-887
- de Vega C, Ortiz P, Arista M, Talavera S** (2007) The endophytic system of Mediterranean *Cytinus* (Cytinaceae) developing on five host Cistaceae species. *Ann Bot* **100**: 1209-1217
- Demmig-Adams B, Cohu C, Amiard V, Zadelhoff G, Veldink G, Muller O, Adams W** (2013) Emerging trade-offs – impact of photoprotectants (PsbS, xanthophylls, and vitamin E) on oxylipins as regulators of development and defense. *New Phytol* **197**: 720-729
- Demmig-Adams B, Stewart JJ, Adams WW** (2014) Chloroplast photoprotection and the trade-off between abiotic and biotic defense. In: Demmig-Adams B, Garab G, Adams W (Eds.). *Nonphotochemical quenching and energy dissipation in plants, algae and cyanobacteria*. Springer, Switzerland. pp 631–643
- Falk J, Munné-Bosch S** (2010) Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. *J Exp Bot* **61**: 1549-1566
- Fernández-Marín B, Hernández A, García-Plazaola JL, Esteban R, Miguez F, et al.** (2017) Photoprotective strategies of Mediterranean plants in relation to morphological traits and natural environmental pressure: a meta-analytical approach. *Front Plant Sci* **8**: 1051
- Foyer C, Rasool B, Davey J, Hancock R** (2016) Cross-tolerance to biotic and abiotic stresses in plants: a focus on resistance to aphid infestation. *J Exp Bot* **67**: 2025-2037
- Furuhashi T, Kojima M, Sakakibara H, Fukushima A, Hirai M, Furuhashi K** (2014) Morphological and plant hormonal changes during parasitization by *Cuscuta japonica* on *Momordica charantia*. *J Plant Interact* **1**: 220-232

- 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
- García-Plazaola J, Hernández A, Becerril J** (2000) Photoprotective response to Winter stress in evergreen Mediterranean ecosystems. *Plant Biol* **2**: 530-535
- Gutjahr C, Paszkowski U** (2009) Weights in the balance: jasmonic acid and salicylic acid signaling in root-biotroph interactions. *Mol Plant Microbe Interact* **22**: 763-772
- Hodges MD, De Long JM, Forney CM, Prange RK** (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
- Jhu M, Farhi M, Wang L, Zumstein K, Sinha NR** (2022) Investigating host and parasitic plant interaction by tissue-specific gene analyses on tomato and *Cuscuta campestris* interface at three haustorial developmental stages. *Front Plant Sci* **12**: 764843
- Krieger-Liszkay A, Trebst A** (2006) Tocopherol is the scavenger of singlet oxygen produced by the triplet states of chlorophyll in the PSII reaction centre. *J Exp Bot* **57**: 1677-1684
- Kumar A, Prasad A, Sedlarova S, Kale R, Frankel LK, Sallans L, Bricker TM, Pospisil P** (2021) Tocopherol controls D1 amino acid oxidation by oxygen radicals in Photosystem II. *Proc Natl Acad Sci USA* **118**: e2019246118
- Lacombe B, Achard P** (2016) Long-distance transport of phytohormones through the plant vascular system. *Curr Opin Plant Biol* **34**: 1-8
- Lichtenthaler H, Wellburn A** (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochem Soc Transact* **11**: 591-592

- Luby C, Maeda H, Goldman I** (2014) Genetic and phenological variation of tocochromanol (vitamin E) content in wild (*Daucus carota* L. var. *carota*) and domesticated carrot (*D. carota* L. var. *sativa*). *Hortic Res* **1**: 14015
- McIntyre K, Bush D, Argueso C** (2021) Cytokinin regulation of source-sink relationships in plant-pathogen interactions. *Front Plant Sci* **12**: 677585
- 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
- Munné-Bosch S** (2022) Spatiotemporal limitations in plant biology research. *Trends Plant Sci* **27**: 346-354
- Munné-Bosch S, Jubany-Marí T, Alegre L** (2003) Enhanced photo- and antioxidative protection, and hydrogen peroxide accumulation in drought-stressed *Cistus clusii* and *Cistus albidus* plants. *Tree Physiol* **23**: 1-12
- Muñoz P, Munné-Bosch S** (2019) Vitamin E in plants: biosynthesis, transport, and function. *Trends Plant Sci* **24**: 1040-1051
- Nguyen D, Rieu I, Mariani C, van Dam NM** (2016) How plants handle multiple stresses: hormonal interactions underlying responses to abiotic stress and insect herbivory. *Plant Mol Biol* **91**: 727-740
- Press M, Phoenix G** (2005) Impacts of parasitic plant on natural communities. *New Phytol* **166**: 737-751
- Roquet C, Coissac E, Cruaud C, Boleda M, Boyer F, et al.** (2016) Understanding the evolution of holoparasitic plants: the complete plastid genome of the holoparasite *Cytinus hypocistis* (Cytinaceae). *Ann Bot* **118**: 885-896
- Soba D, Müller M, Aranjuelo I, Munné-Bosch S.** (2020) Vitamin E in legume nodules: occurrence and antioxidant function. *Phytochemistry* **172**: 112261

- Spallek T, Melnyk C, Wakatake T, Zhang J, Sakamoto Y, Kiba T, et al. (2017)** Interspecies hormonal control of host root morphology by parasitic plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **114**: 5283-5288
- Těšitel J, Li AR, Knotková K, McLellan R, Bandaranayake P, Watson S (2021)** The bright side of parasitic plants: what are they good for?. *Plant Physiol* **185**: 1309-1324
- Torres-Vera R, García J, Pozo M, López-Ráez J (2016)** Expression of molecular markers associated to defense signaling pathways and strigolactones biosynthesis during the early interaction tomato-*Phelipanche ramosa*. *Physiol Molec Plant Pathol* **94**: 100-107
- Van der Kooij T, Krupinska K, Krause K (2005)** Tocochromanol content and composition in different species of the parasitic flowering plant genus *Cuscuta*. *J Plant Physiol* **162**: 777-781
- Watling J, Press M (2001)** Impacts of infection by parasitic angiosperms on host photosynthesis. *Plant Biol* **3**: 244-250
- Watson D (2009)** Determinants of parasitic plant distribution: The role of host quality. *Botany* **87**: 16-21
- Westwood JH, Yoder JI, Timko, MP, de Pamphilis CW (2010)** The evolution of parasitism in plants. *Trends Plant Sci* **15**: 227-235
- Wicke S, Müller KI, de Pamphilis CW, Quandt D, Wickett NJ, Zhang Y Renner SS, Schneeweis GM (2013)** Mechanisms of functional and physical genome reduction in photosynthetic and nonphotosynthetic parasitic plants of the broomrape family. *Plant Cell* **25**: 3711-3725
- Zuur A, Ieno E, Elphick C (2009)** A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Meth Ecol Evol* **1**: 3–14

Table 1. Results of three-way ANOVAs for each of the studied parameters to evaluate the possible effect of geographical location (population), aside from seasonal (season) and holoparasitic plant (parasite) effects. Interactions between factors are also considered. See in materials and methods for details of the experimental design. *P* values are shown when differences were significant ($P<0.05$). NS denotes non-significant differences ($P>0.05$).

Variable	Season	Parasite	Population	Season x Parasite	Season x Population	Parasite x Population	Season x Parasite x Population
RWC	<0.001	NS	<0.001	NS	<0.001	NS	NS
H	<0.001	<0.001	<0.001	NS	<0.001	<0.001	0,002
Chl a+b	<0.001	<0.001	<0.001	0,001	NS	<0.001	NS
Chl a/b	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
F_v/F_m	0,0101	NS	<0.001	NS	NS	0,004	NS
α -Toc	<0.001	NS	<0.001	NS	0,034	<0.001	0,004
γ -Toc	<0.001	0,008	NS	<0.001	NS	0,029	NS
α -Toc/Chl	<0.001	NS	<0.001	NS	<0.001	0,038	NS
γ -Toc/Chl	<0.001	0,018	NS	0,003	NS	NS	NS
MDA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
OPDA	<0.001	0,021	0,002	NS	NS	0,002	0,001
JA	0,042	NS	NS	NS	NS	NS	0,022
JA-Ile	NS	<0.001	NS	0,017	NS	NS	NS
ABA	NS	NS	0,007	0,021	NS	NS	NS
SA	0,006	NS	NS	NS	NS	NS	NS

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Comparison of cytokinin content (**A-D**) between host leaves and non-photosynthetic tissues (roots and haustorium) forming the interaction zone between *Cistus albidus* and *Cytinus hypocistis* under natural conditions, (**F-I**) distal, medial, and proximal root, and (**K-M**) basal and apical haustorium. (**E,J,O**) Photographs of tissues analyzed. Data are the mean of $n=15\pm\text{SE}$. P values of two- or one-way ANOVA are given in the insets and P values < 0.05 were considered significant. Different letters represent differences between tissues. *t-Z*, *trans*-zeatin; *t-ZR*, *trans*-zeatin riboside; 2iP, 2-isopentenyl adenine; IPA, isopentenyl adenosine; NS, non-significant.

Figure 2. Comparison of vitamin E content and extent of lipid peroxidation, estimated as malondialdehyde accumulation (**A-D**) between host leaves and non-photosynthetic tissues (roots and haustorium) forming the interaction zone between *Cistus albidus* and *Cytinus hypocistis* under natural conditions, (**E,F**) distal, medial, and proximal root, and (**H,I**) basal and apical haustorium. (**G**) Chemical formula of vitamin E compounds found in the tissues analyzed. Data are the mean of $n=15\pm\text{SE}$. P values of two- or one-way ANOVA are given in the insets and P values < 0.05 were considered significant. Different letters represent differences between tissues. α -Toc, α -tocopherol; γ -Toc, γ -tocopherol; α -TT, α -tocotrienol; Vit. E, total vitamin E; MDA, malondialdehyde; NS, non-significant; ND, not detected.

Figure 3. Jasmonates, abscisic acid and salicylic acid content in leaves of *Cistus albidus* plants during the study, as influenced by season and parasitism. (**A**) 12-*oxo*-phytydienoic acid (OPDA, ng/g DW), (**B**) jasmonic acid (JA, ng/g DW), (**C**) jasmonoyl isoleucine (JA-Ile, ng/g DW), (**D**) abscisic acid (ABA, ng/g DW), and (**E**) salicylic acid (SA, ng/g DW). Data are the mean of $n=50\pm\text{SE}$. P values for two-way ANOVA are given in the insets and

P values > 0.05 were considered non-significant (NS). Different letters represent differences between seasons and differences between infected and uninfected groups in the same season.

Figure 4. Foliar physiological status of *Cistus albidus* plants during the study, as influenced by season and parasitism. (A) leaf relative water content (RWC), (B) leaf hydration (H), (C) total chlorophyll content (Chl a+b), (D) chlorophyll (Chl) a/b ratio, (E) maximum efficiency of photosystem II (F_v/F_m), (F) α -tocopherol ($\mu\text{g/g DW}$), (G) γ -tocopherol ($\mu\text{g/g DW}$), (H) malondialdehyde contents, an indicator of lipid peroxidation (MDA, $\mu\text{mol/g DW}$). Data are the mean of $n=50\pm\text{SE}$. P values for two-way ANOVA are given in the insets and P values < 0.05 were considered significant. Different letters represent significant differences between seasons and differences between infected and uninfected groups in the same season. NS, non-significant.

Figure 5. Physiological parameters of leaves in which the three natural *Cistus albidus* populations differed during the study, as influenced by season and parasitism. (A) Leaf hydration (H), (B) total chlorophyll (Chl a+b), and (C) maximum efficiency of PSII (F_v/F_m). Data are the mean of $n=15\pm\text{SE}$. P values for two-way ANOVA are given in the insets and P values > 0.05 were considered non-significant (NS). Different letters represent differences between seasons and differences between infected and uninfected groups in the same season.

Figure 6. Vitamin E content of leaves in the three natural *Cistus albidus* populations during the study, as influenced by season and parasitism. (A) α -Tocopherol ($\mu\text{g/g DW}$), and (B) γ -tocopherol ($\mu\text{g/g DW}$). Data are the mean of $n=15\pm\text{SE}$. P values for two-way ANOVA are given in the insets and P values > 0.05 were considered non-significant (NS). Different

letters represent differences between seasons and differences between infected and uninfected groups in the same season.

Figure 7. Absciscic acid (ABA) content of leaves in the three natural *Cistus albidus* populations during the study, as influenced by season and parasitism. Data are the mean of $n=15\pm\text{SE}$. *P* values for two-way ANOVA are given in the insets and *P* values > 0.05 were considered non-significant (NS). Different letters represent differences between seasons and differences between infected and uninfected groups in the same season.

Figure 8. Jasmonate content of leaves in the three natural *Cistus albidus* populations during the study, as influenced by season and parasitism. (A) 12-*oxo*-phytodienoic acid (OPDA), (B) jasmonic acid (JA), and (C) jasmonoyl isoleucine (JA-Ile), all expressed as ng/g DW. Data are the mean of $n=15\pm\text{SE}$. *P* values for two-way ANOVA are given in the insets and *P* values > 0.05 were considered non-significant (NS). Different letters represent differences between seasons and differences between infected and uninfected groups in the same season.

Figure 1

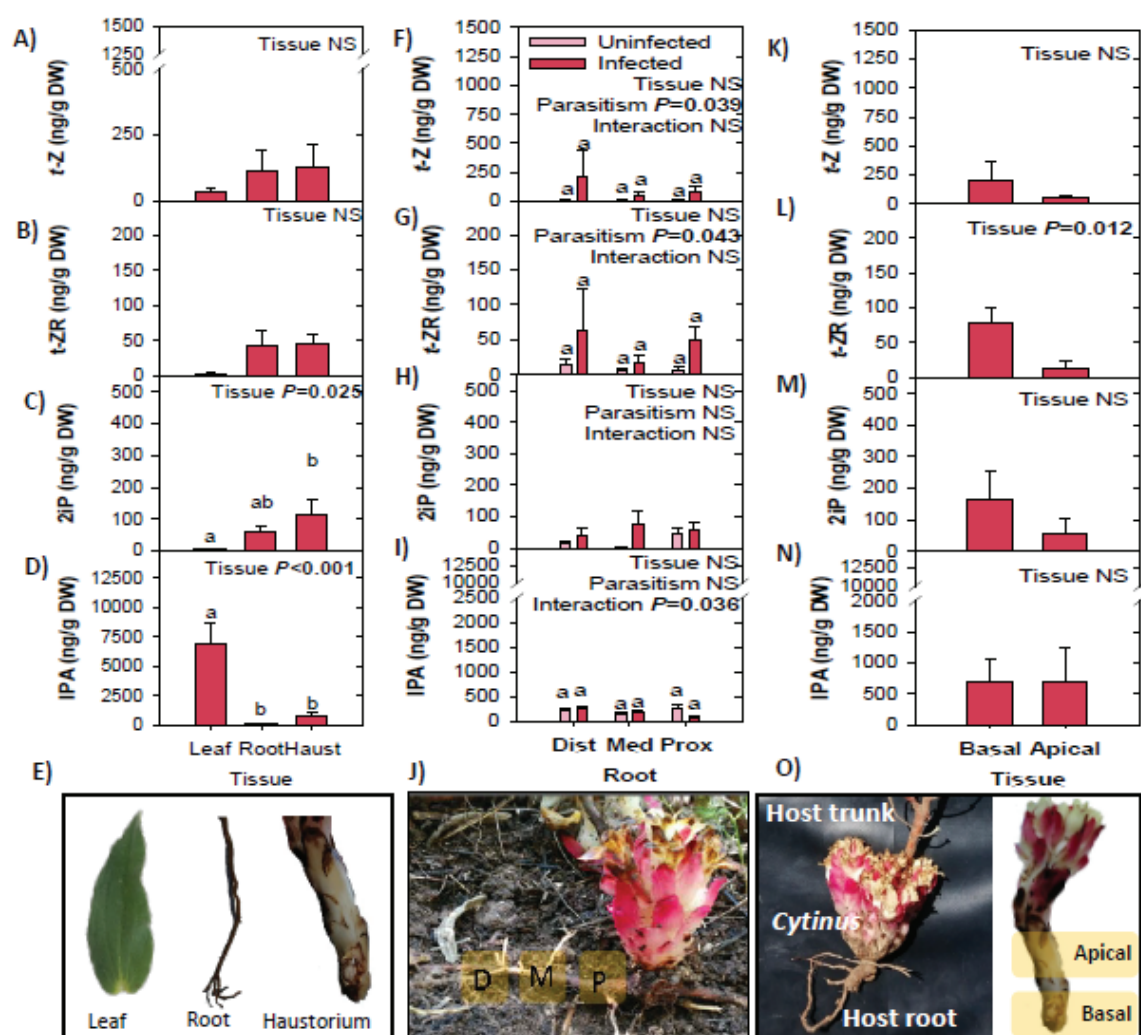


Figure 2

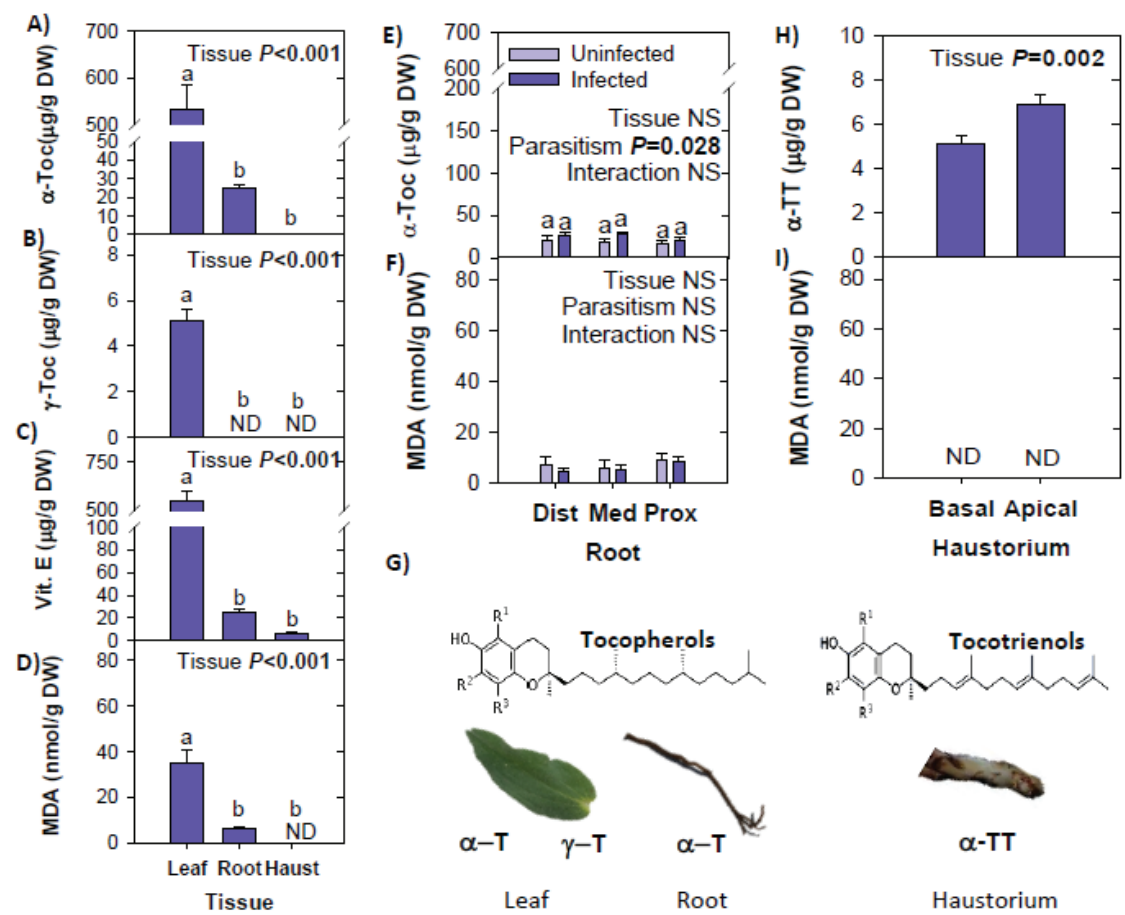


Figure 3

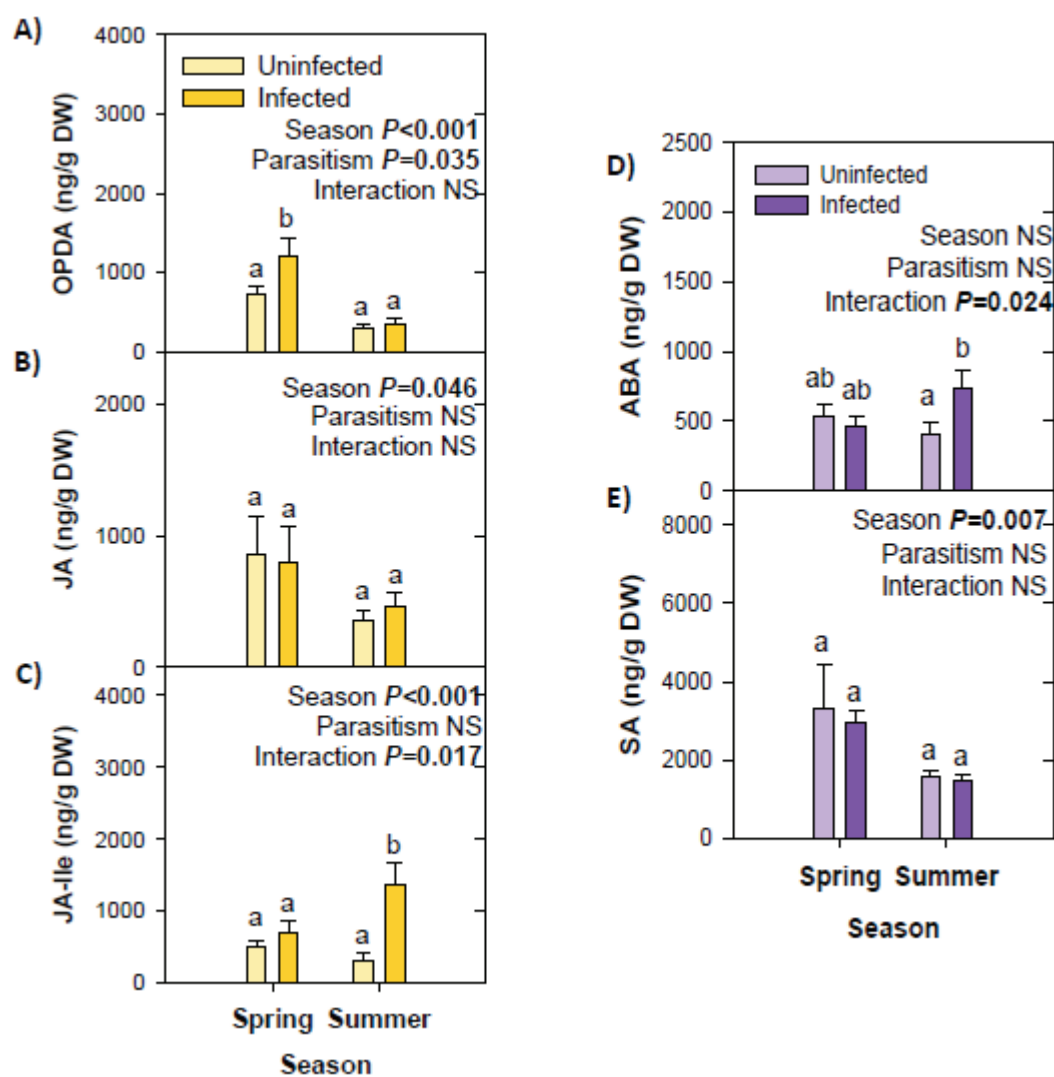


Figure 4

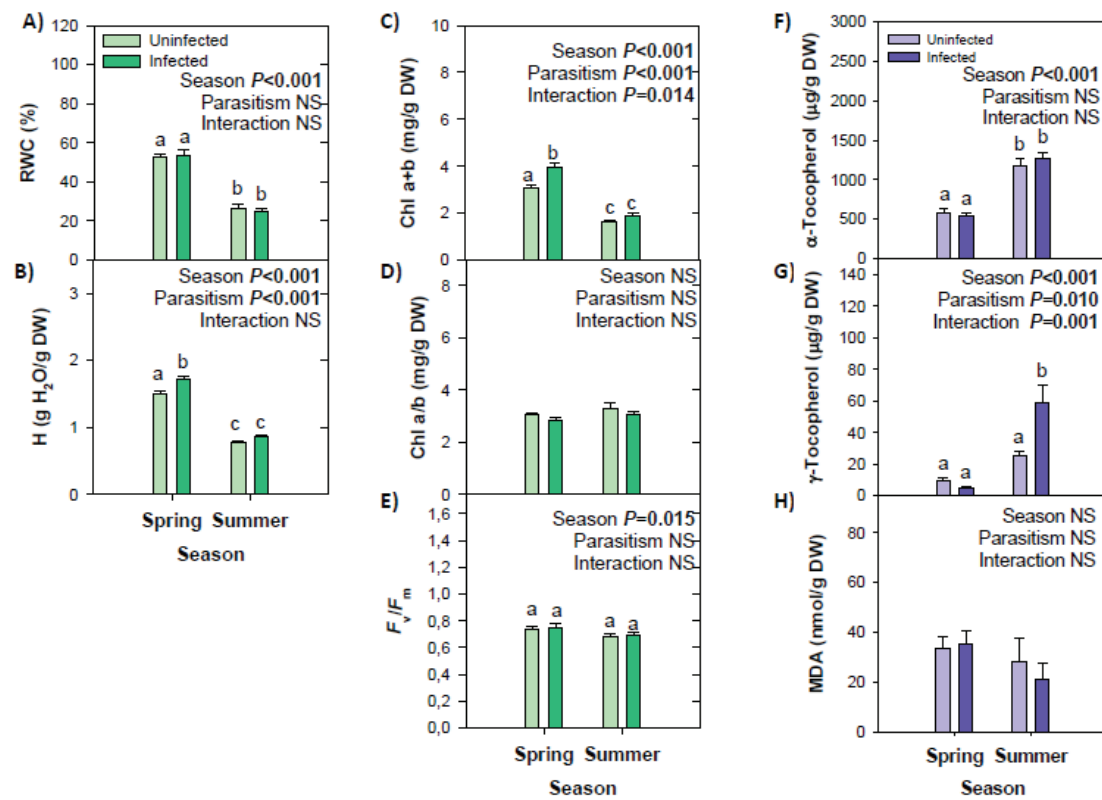


Figure 5

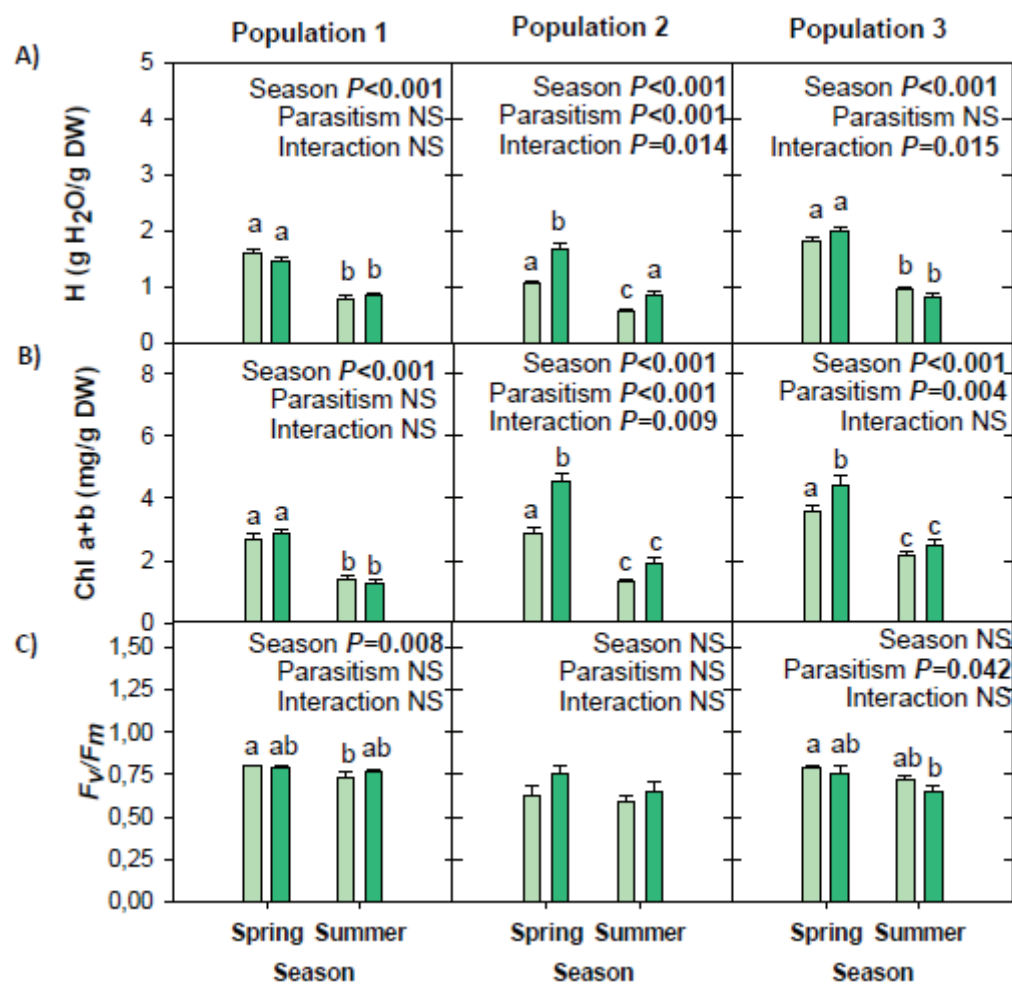


Figure 6

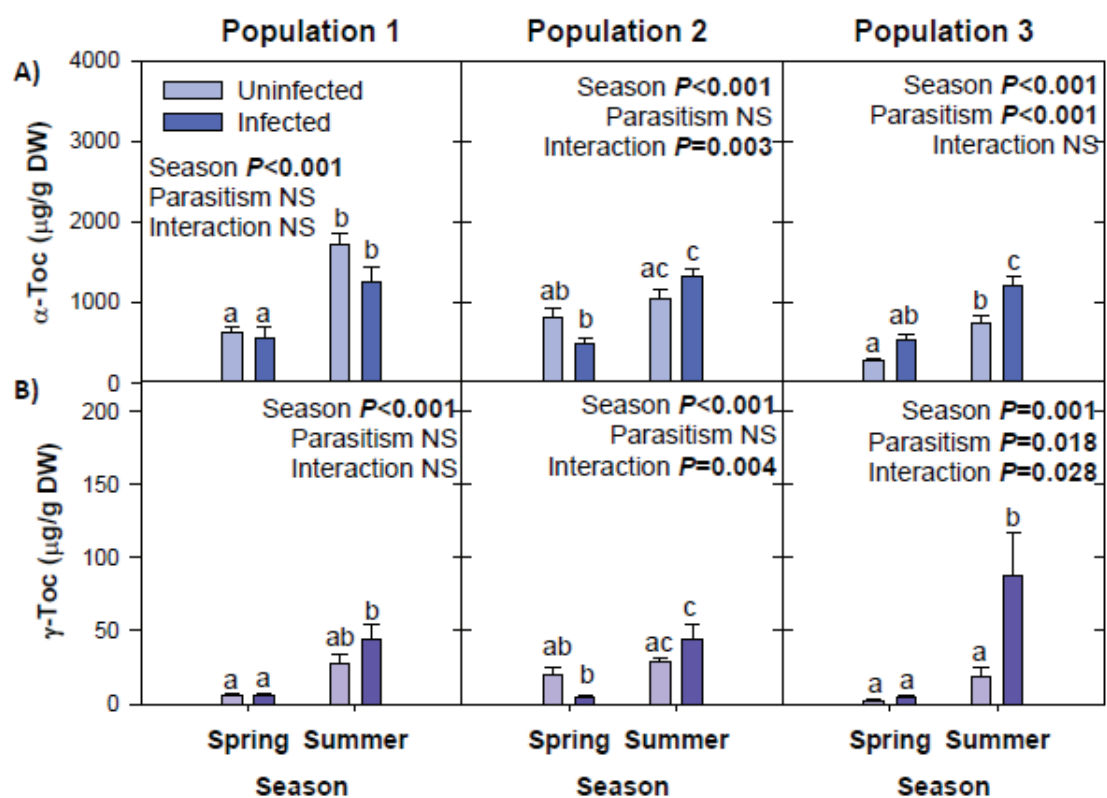


Figure 7

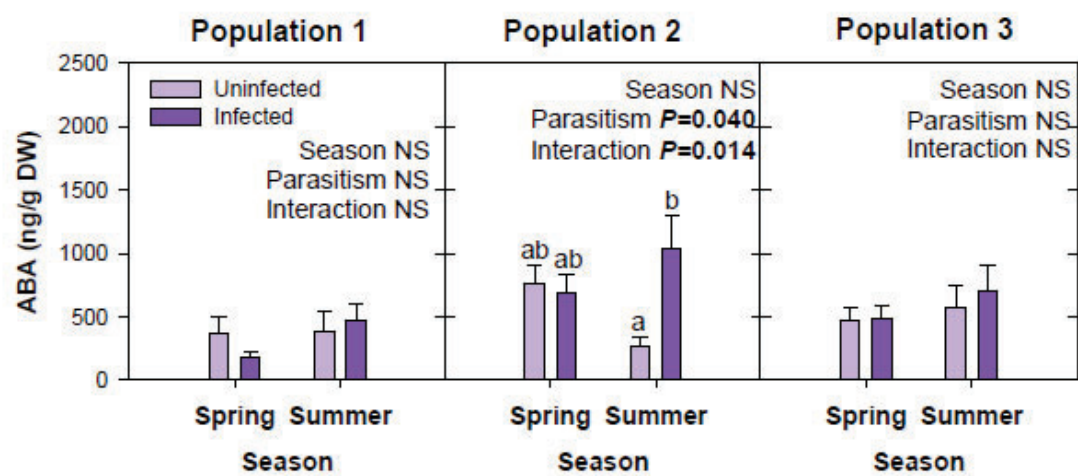
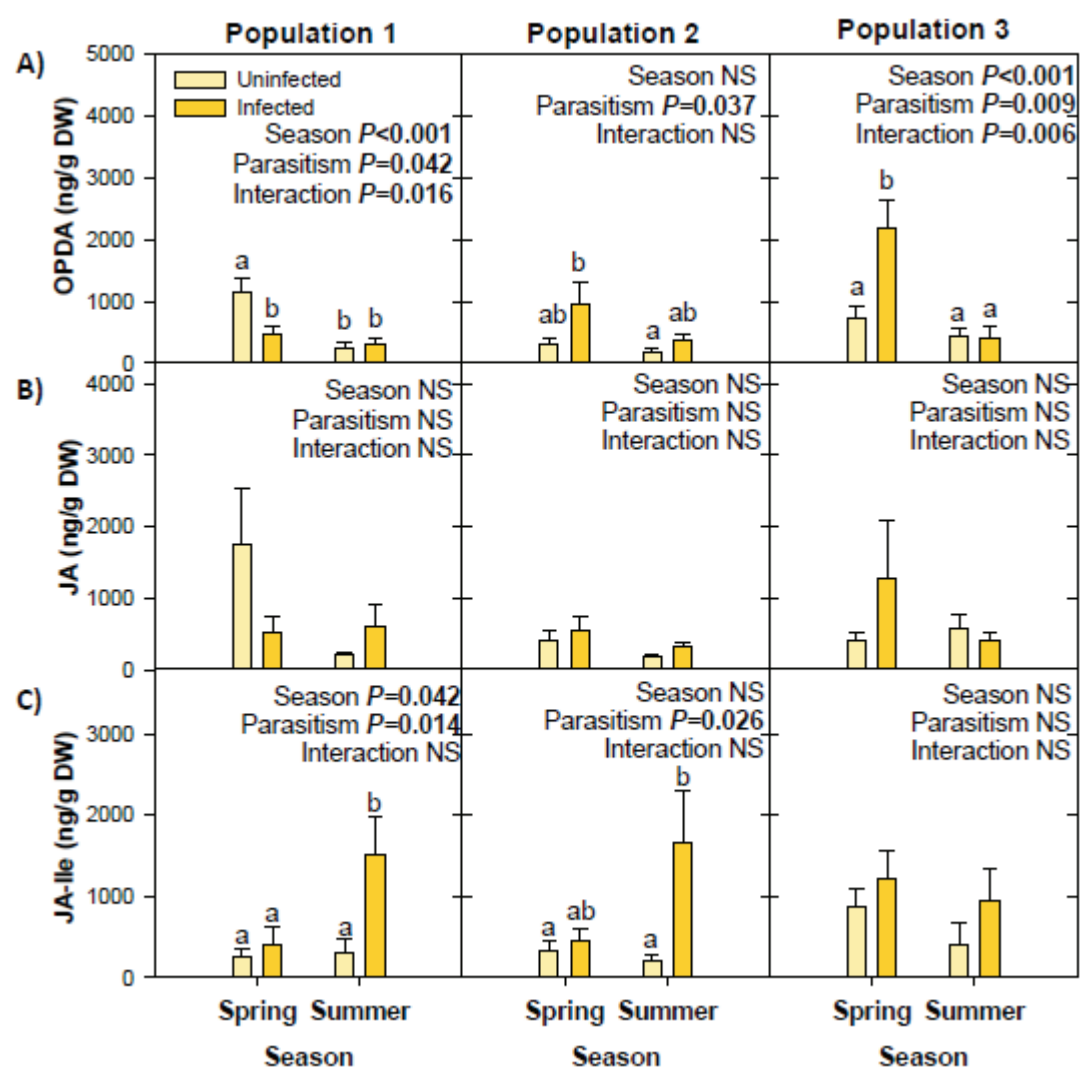


Figure 8

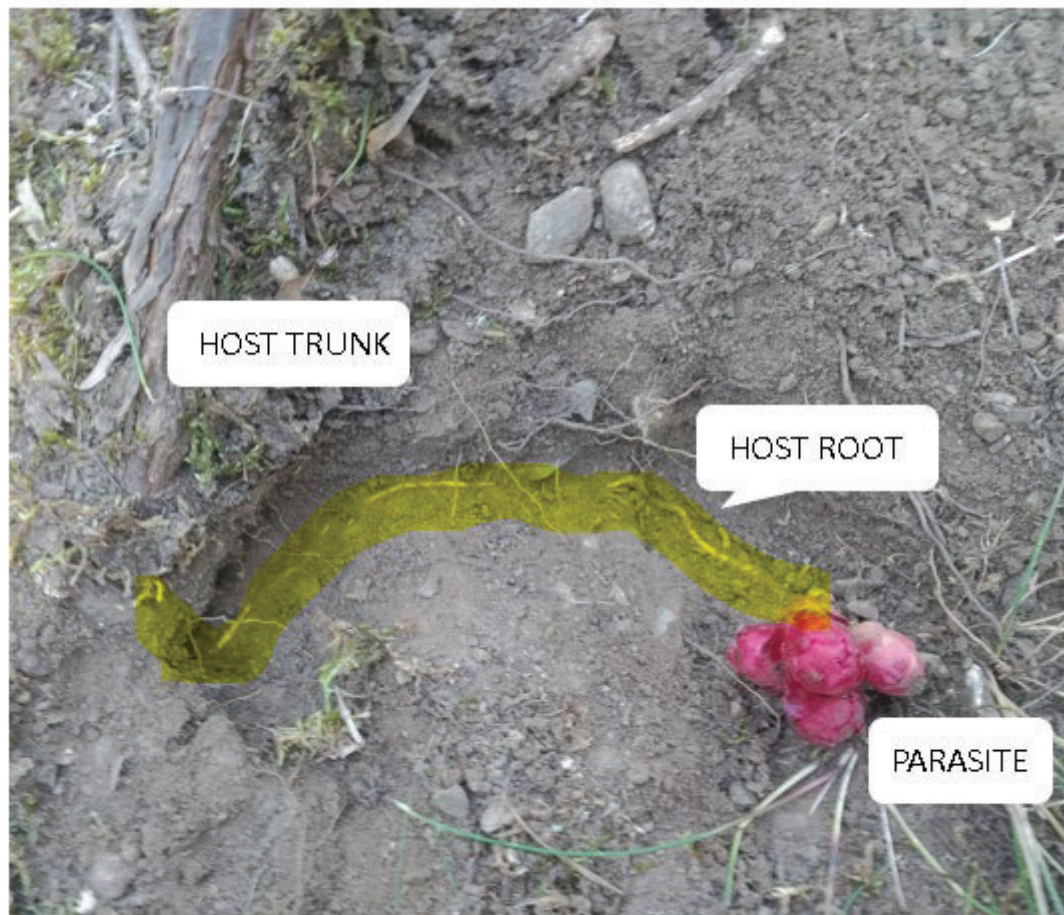


SUPPORTING INFORMATION

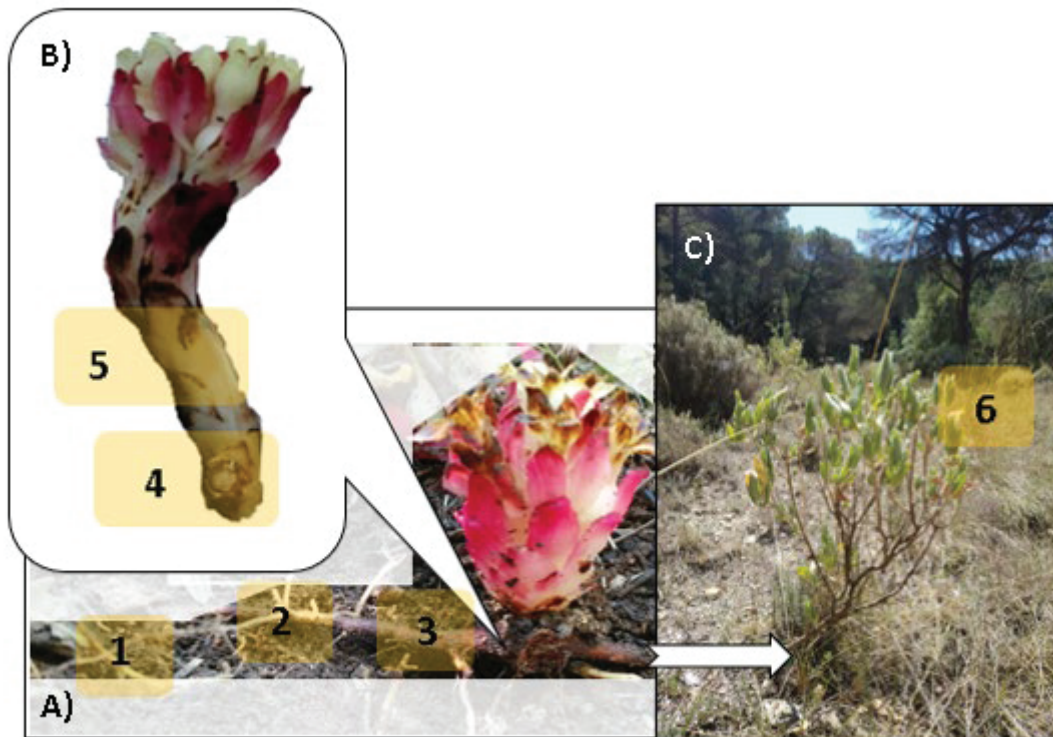
Suppl. Table 1. Environmental conditions prevailing at midday during the days of measurement in spring (May) and summer (July) 2021. The average and standard error (SE) is shown. No significant differences were found between environmental conditions in which uninfected and infected plants were grown either during spring or summer (Student's *t*-test, $P>0.05$).

Spring	Parasitism	T		RH		PAR	
		(°C)		(%)		(mmol/m ² ·s)	
	Uninfected	31.0	2,8	32.6	5.4	1966	68
	Infected	27.7	1.6	35.0	3.3	1932	96
Summer							
	Uninfected	36.9	2.5	30.9	3.6	2025	45
	Infected	37.0	0,8	30.6	3.5	2008	11

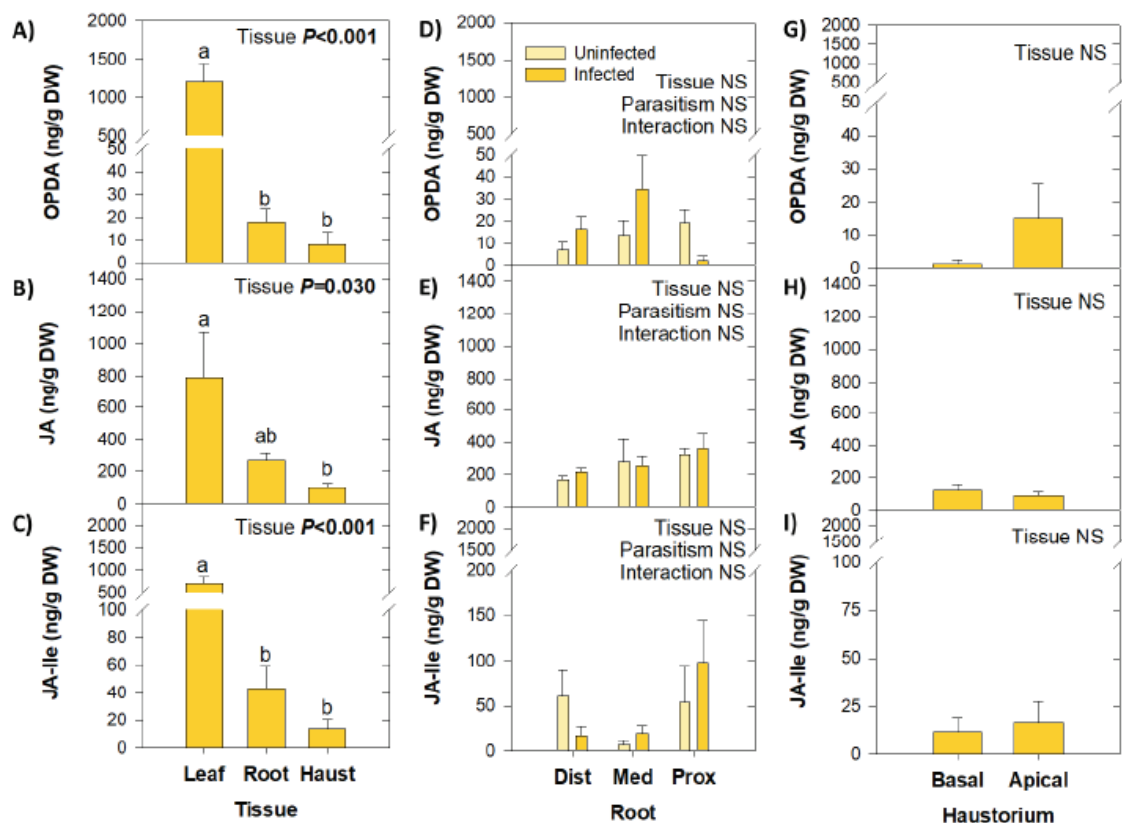
Suppl. Fig. 1. Schematic view of the detection of infection by *Cytinus hypocistis* in *Cistus albidus* shrubs under natural conditions. *C.albidus* root is highlighted in yellow.



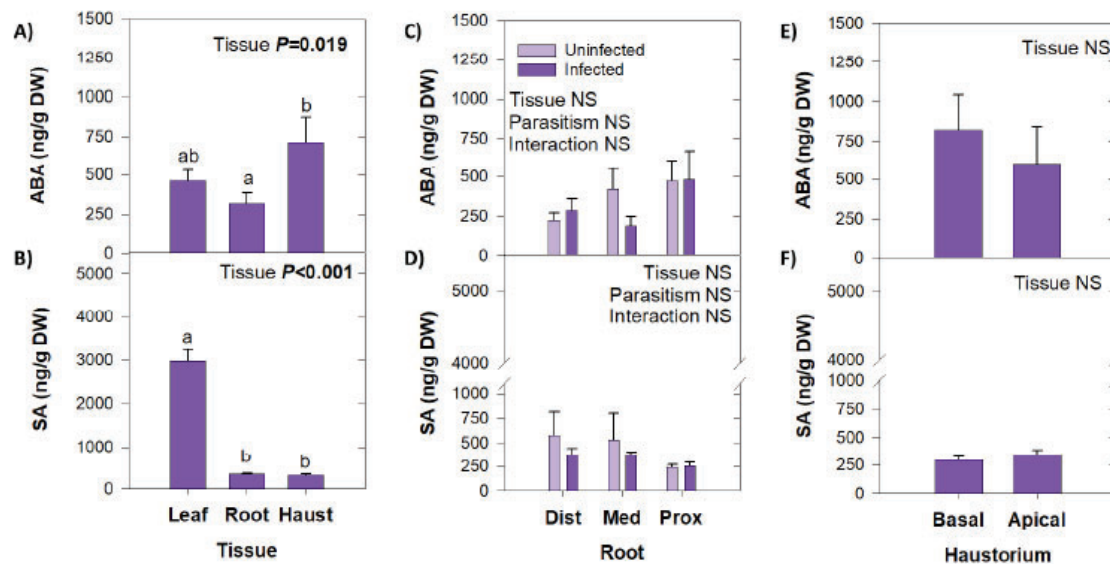
Suppl. Fig. 2. Schematic view of all tissues sampled in the study. 1: distal root, 2: medial root, 3: proximal root, 4: basal haustorium, 5: apical haustorium, 6: host leaf.



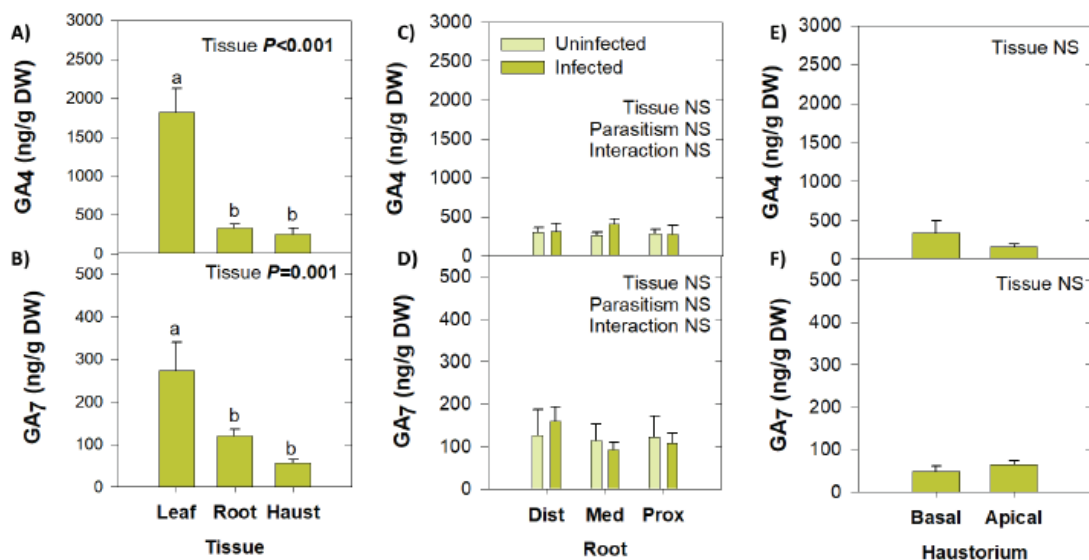
Suppl. Fig. 3. Comparison of jasmonate content (A-C) between host leaves and non-photosynthetic tissues (roots and haustorium) forming the interaction zone between *Cistus albidus* and *Cytinus hypocistis* under natural conditions, (D-F) distal, medial, and proximal root, and (G-I) basal and apical haustorium. Data are the mean of $n=15 \pm \text{SE}$. P values of two- or one-way ANOVA are given in the insets and P values < 0.05 were considered significant. Different letters represent differences between tissues. OPDA, 12-*oxo*-phytodienoic acid; JA, jasmonic acid; JA-Ile, jasmonoyl isoleucine; NS, non-significant.



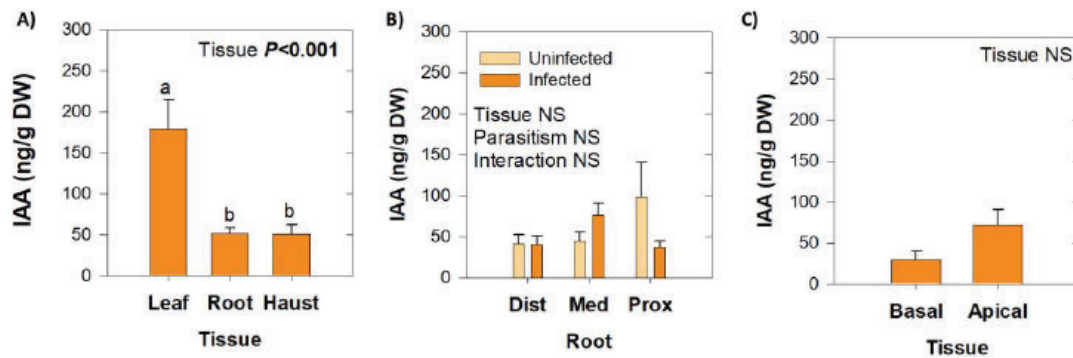
Suppl. Fig. 4. Comparison of abscisic acid (ABA) and salicylic acid (SA) content (A, B) between host leaves and non-photosynthetic tissues (roots and haustorium) forming the interaction zone between *Cistus albidus* and *Cytinus hypocistis* under natural conditions, (C, D) distal, medial, and proximal root, and (E, F) basal and apical haustorium. Data are the mean of $n=15\pm\text{SE}$. P values of two- or one-way ANOVA are given in the insets and P values < 0.05 were considered significant. Different letters represent differences between tissues. NS, non-significant.



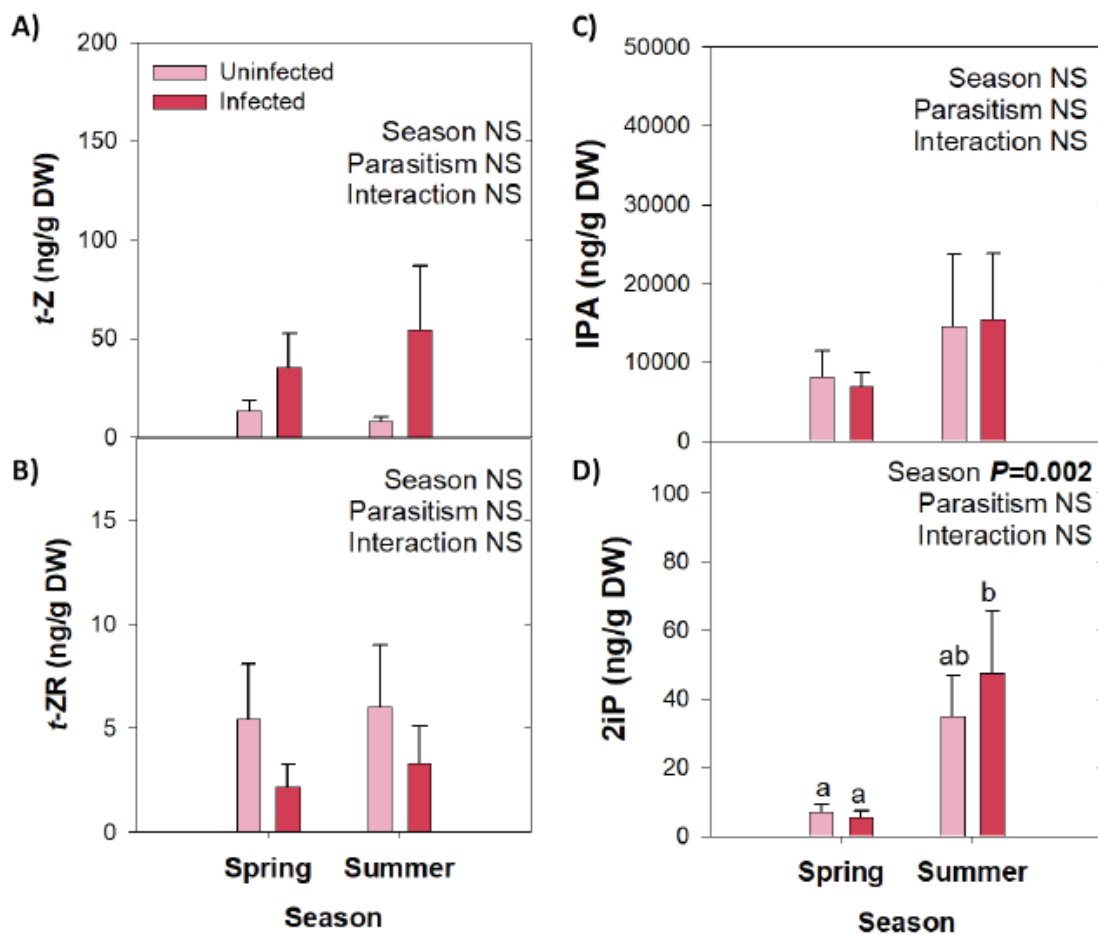
Suppl. Fig. 5. Comparison of gibberellin content (A, B) between host leaves and non-photosynthetic tissues (roots and haustorium) forming the interaction zone between *Cistus albidus* and *Cytinus hypocistis* under natural conditions, (C,D) distal, medial, and proximal root, and (E,F) basal and apical haustorium. Data are the mean of $n=15 \pm \text{SE}$. P values of two- or one-way ANOVA are given in the insets and P values < 0.05 were considered significant. Different letters represent differences between tissues. GA₄, gibberellin 4; GA₇, gibberellin 7; NS, non-significant.



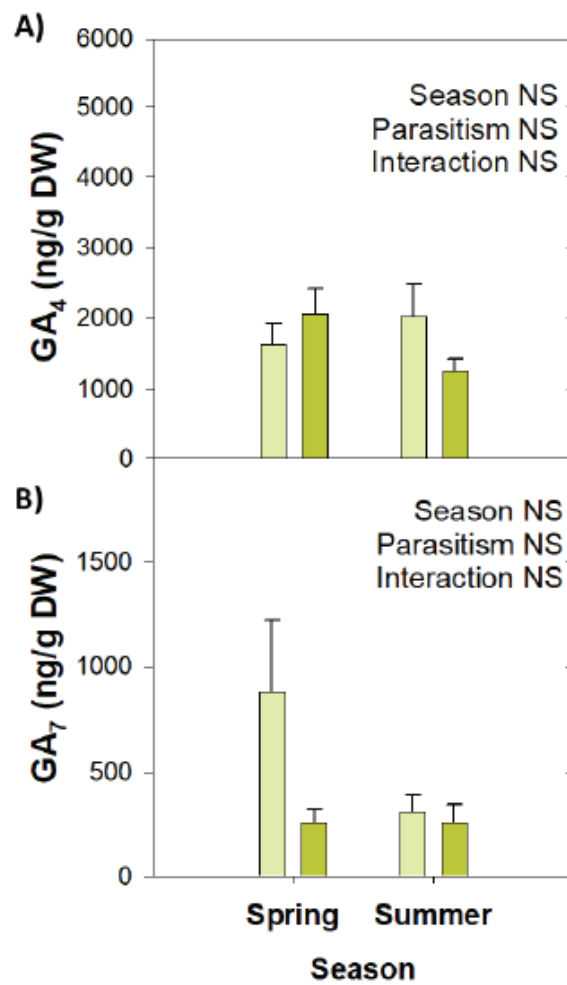
Suppl. Fig. 6. Comparison of auxin, indole-3-acetic acid (IAA) content (A) between host leaves and non-photosynthetic tissues (roots and haustorium) forming the interaction zone between *Cistus albidus* and *Cytinus hypocistis* under natural conditions, (B) distal, medial, and proximal root, and (C) basal and apical haustorium. Data are the mean of $n=15\pm\text{SE}$. P values of two- or one-way ANOVA are given in the insets and P values < 0.05 were considered significant. Different letters represent differences between tissues. NS, non-significant.



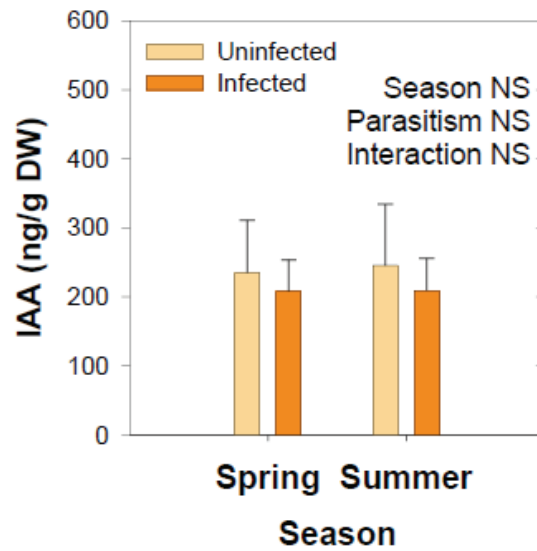
Suppl. Fig. 7. Cytokinin content in leaves of *Cistus albidus* plants during the study, as influenced by season and parasitism. (A) *t*-zeatin (*t*-Z, ng/g DW), (B) *t*-zeatin riboside (*t*-ZR, ng/g DW), (C) isopentenyl adenosine (IPA, ng/g DW), and (D) isopentenyl adenine (2iP, ng/g DW). Data are the mean of $n=50\pm\text{SE}$. *P* values for two-way ANOVA are given in the insets and *P* values > 0.05 were considered non-significant (NS). Different letters represent differences between seasons and between infected and uninfected groups in the same season



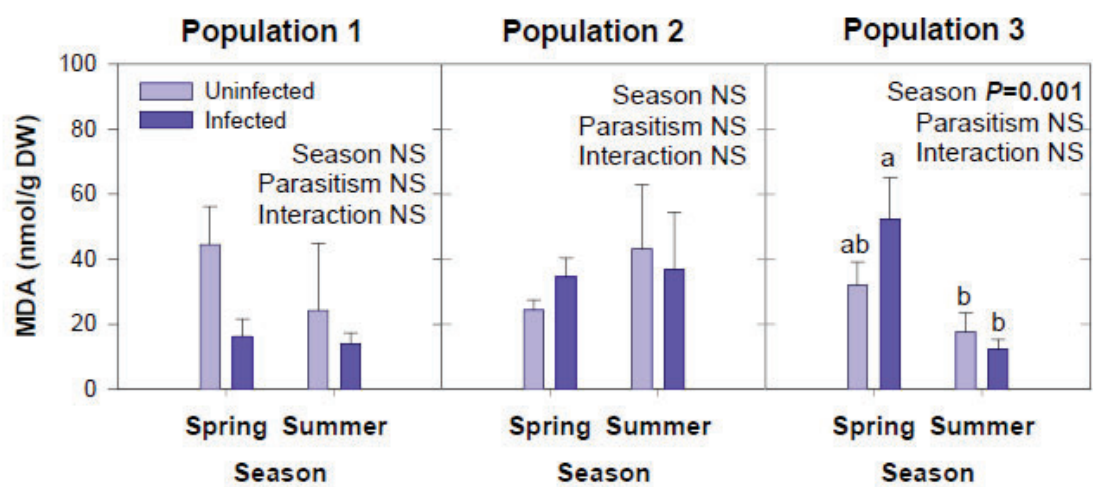
Suppl. Fig. 8. Gibberellin content in leaves of *Cistus albidus* plants during the study, as influenced by season and parasitism. (A) Gibberellin 4 (GA₄, ng/g DW), and (B) Gibberellin 7 (GA₇, ng/g DW). Data are the mean of $n= 50\pm\text{SE}$. *P* values for two-way ANOVA are given in the insets and *P* values > 0.05 were considered non-significant (NS).



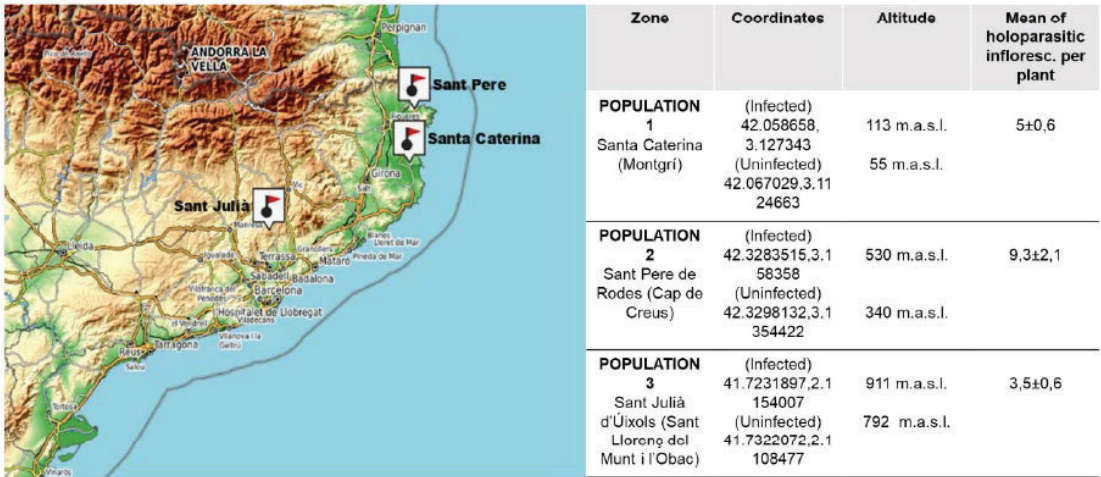
Suppl. Fig. 9. Auxin (indole-3-acetic acid, IAA) content in leaves of *Cistus albidus* plants during the study, as influenced by season and parasitism. Data are the mean of $n=50 \pm \text{SE}$. P values for two-way ANOVA are given in the insets and P values > 0.05 were considered non-significant (NS).



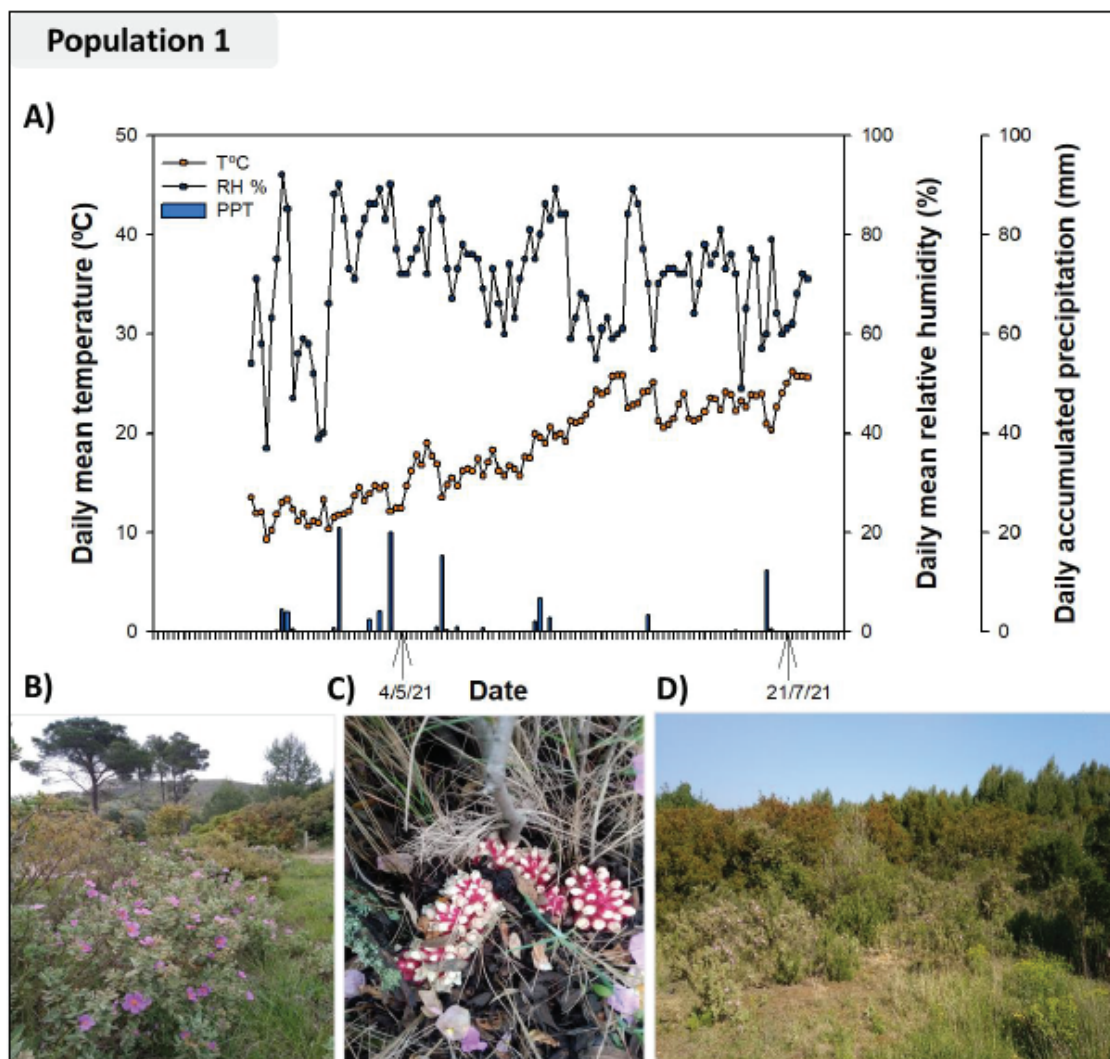
Suppl. Fig. 10. Malondialdehyde (MDA) content, an indicator of the extent of lipid peroxidation, in leaves of the three studied populations of *Cistus albidus* during the study, as influenced by season and parasitism. Data are the mean of $n=50\pm\text{SE}$. P values for two-way ANOVA are given in the insets and P values > 0.05 were considered non-significant (NS). Different letters represent differences between seasons and between infected and uninfected groups in the same season.



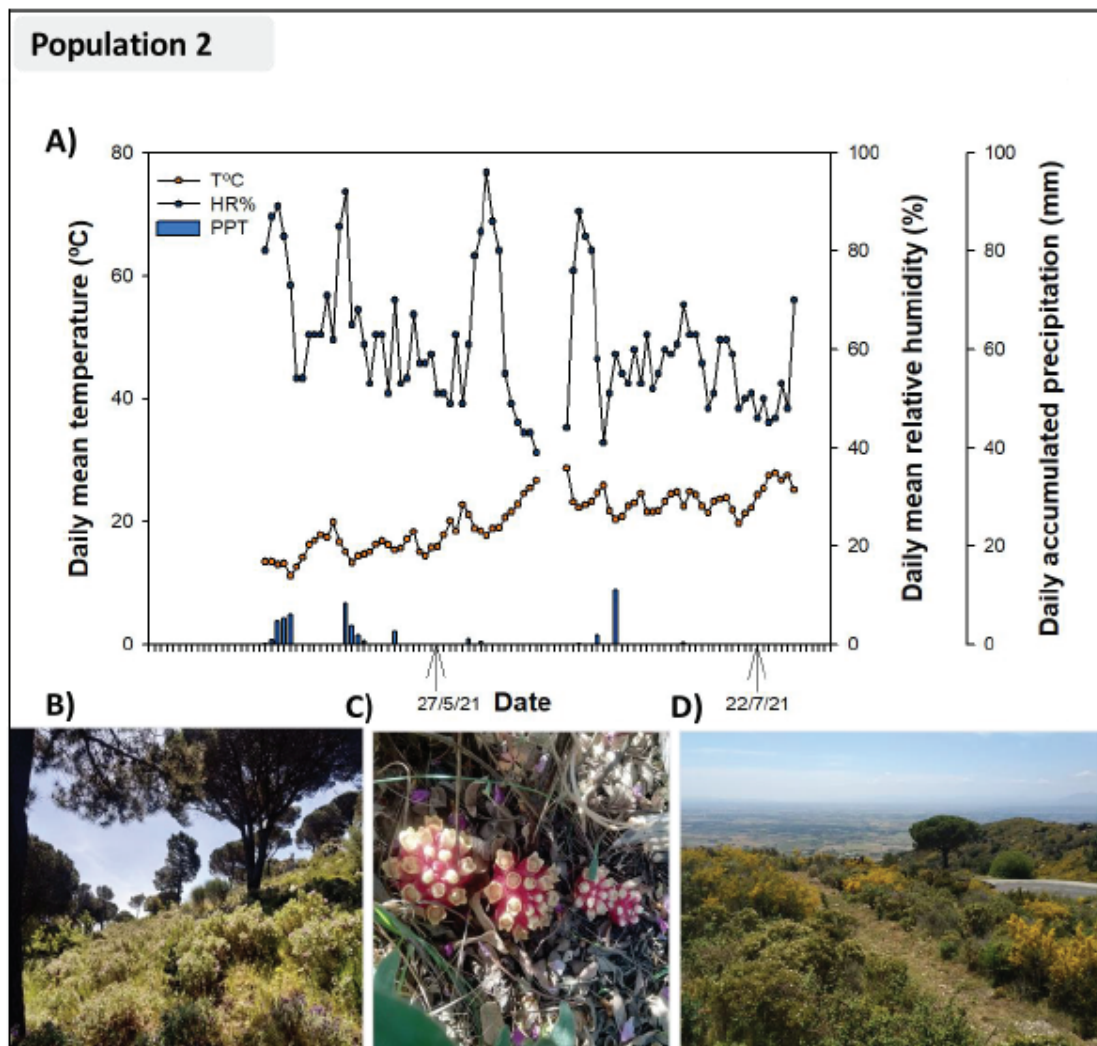
Suppl. Fig. 11. Geolocation and main characteristics of the three natural populations studied. Coordinates, altitude, and mean of holoparasitic inflorescences per plant are shown.



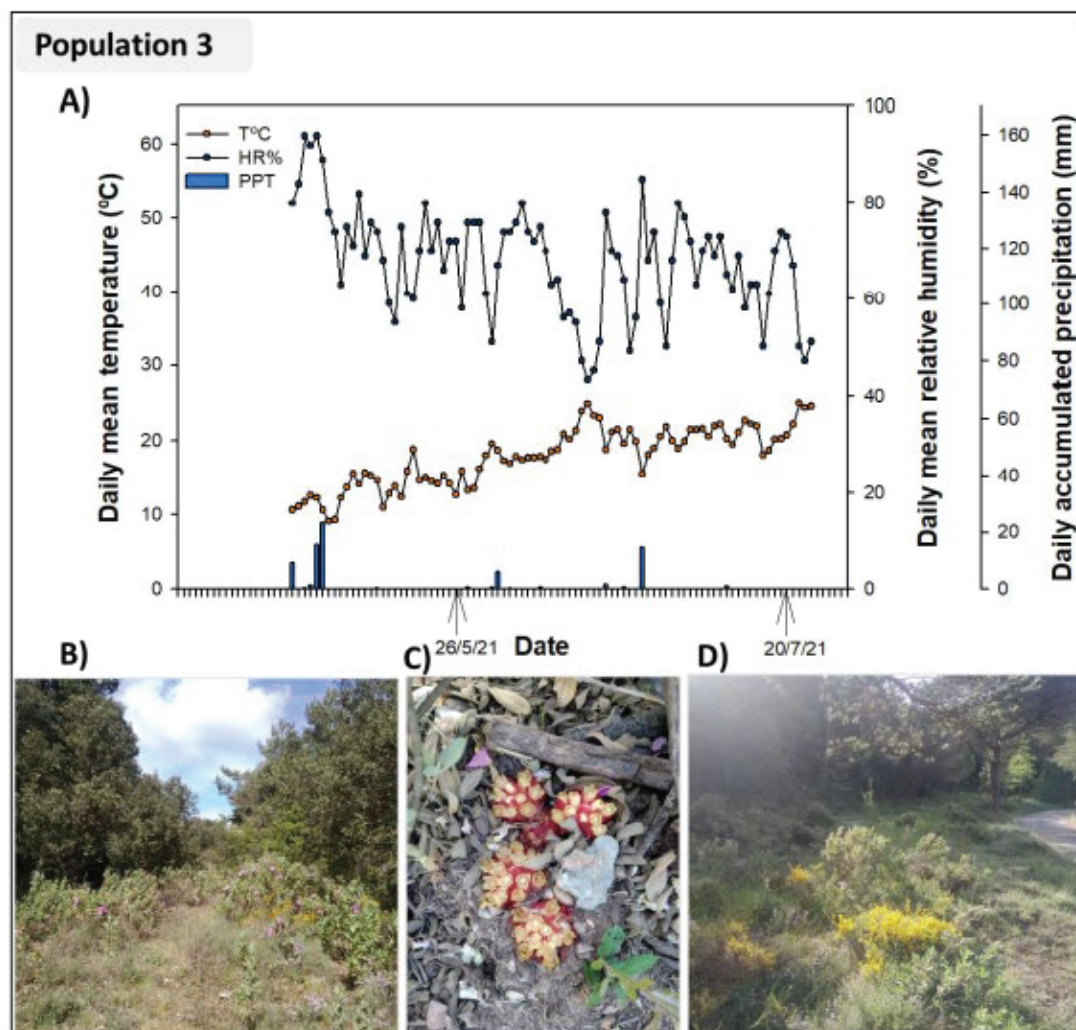
Suppl. Fig. 12. Climatic data for population 1, situated in the Natural Park of Montgrí i les Illes Medes, at 55-113 m.a.s.l. The weather station was located at Torroella de Montgrí (approximately 7 km from the population studied). Sampling dates are indicated by an arrow on the x axis. Photographs show the infected zone of *Cistus albidus*, the root holoparasitic plant *Cytinus hypocistis*, and the uninfected zone (from the right to the left).



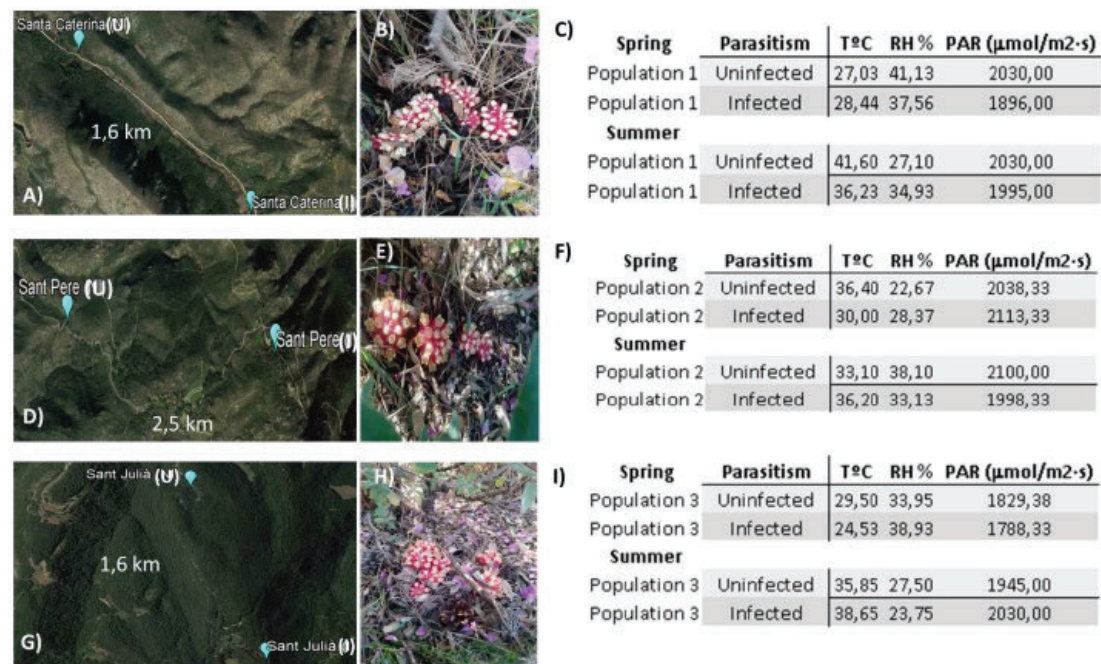
Suppl. Fig. 13. Climatic data for population 2, situated in the Natural Park of Cap de Creus, at 340-530 m.a.s.l. The weather station was located at Portbou (approximately 25 km from the population studied). Sampling dates are indicated by an arrow on the x axis. Photographs show the infected zone of *Cistus albidus*, the root holoparasitic plant *Cytinus hypocistis*, and the uninfected zone (from the right to the left).



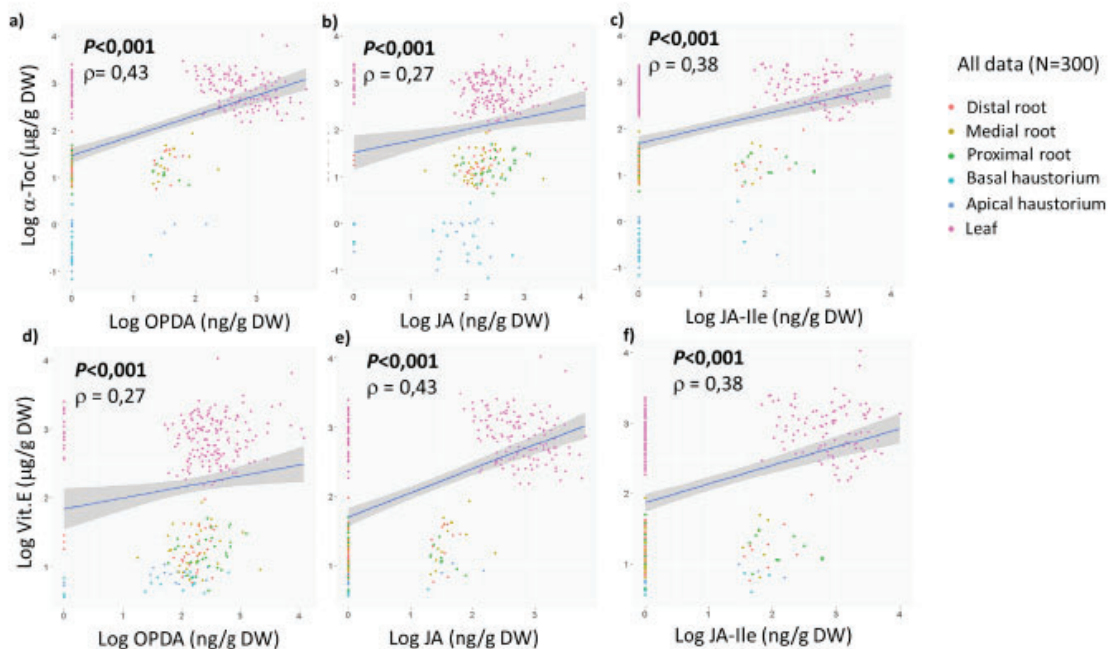
Suppl. Fig. 14. Climatic data for population 3, situated in the Natural Park of Sant Llorenç del Munt I l'Obac, at 792-911 m.a.s.l. The weather station was located at Sant Llorenç Savall (approximately 9 km from the population studied). Sampling dates are indicated by an arrow on the x axis. Photographs show the infected zone of *Cistus albidus*, the root holoparasitic plant *Cytinus hypocistis*, and the uninfected zone (from the right to the left).



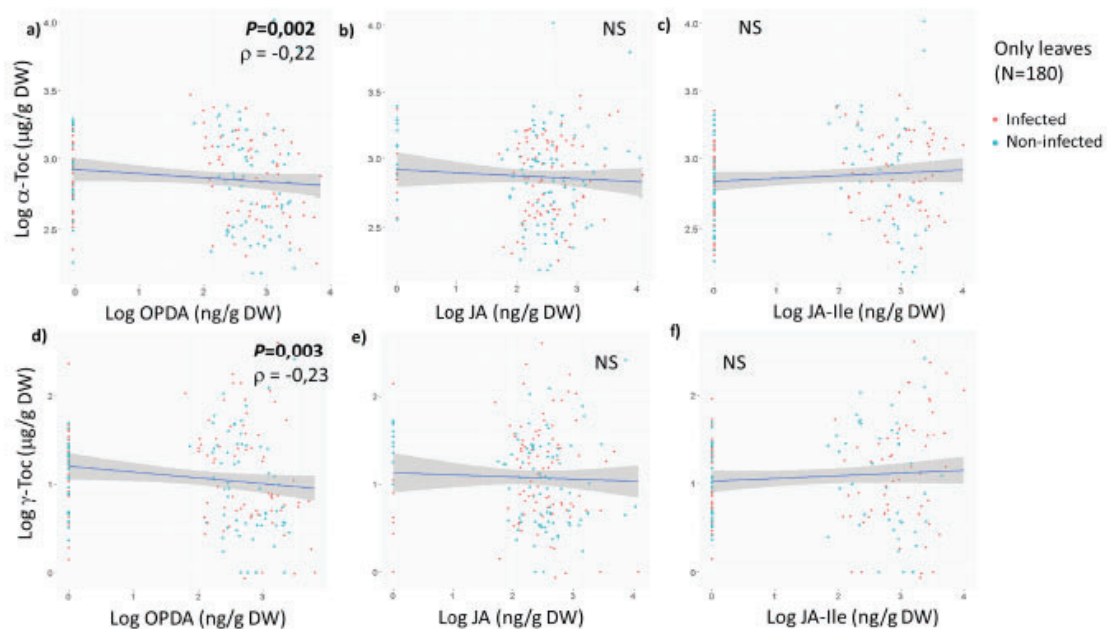
Suppl. Fig. 15. Photograph of the geographical location and sampled individuals, together with the climatic data recorded during sampling in each study area. (A-C) Population 1, (D-F) Population 2, and (G-I) Population 3. Distance between infected (I) and uninfected (U) individuals under natural conditions is shown. Temperature (°C), relative humidity (%), and photosynthetic active radiation (PAR, $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) are also shown.



Suppl. Fig. 16. Spearman's rank correlation between vitamin E and jasmonates in all photosynthetic and non-photosynthetic tissues. Data have been log transformed to better fit the model. (A) α -tocopherol ($\mu\text{g/g DW}$) and 12-*oxo*-phytodienoic acid (OPDA, ng/g DW) correlation, (B) α -tocopherol ($\mu\text{g/g DW}$) and jasmonic acid (JA, ng/g DW) correlation, (C) α -tocopherol ($\mu\text{g/g DW}$) and jasmonoyl isoleucine (JA-Ile, ng/g DW) correlation, (D) vitamin E (α -tocopherol + γ -tocopherol, $\mu\text{g/g DW}$) and 12-*oxo*-phytodienoic acid (OPDA, ng/g DW) correlation, (E) vitamin E (α -tocopherol + γ -tocopherol, $\mu\text{g/g DW}$) and jasmonic acid (JA, ng/g DW) correlation, (F) vitamin E (α -tocopherol + γ -tocopherol, $\mu\text{g/g DW}$) and jasmonoyl isoleucine (JA-Ile, ng/g DW) correlation. All data are considered ($N=300$). P values for the Spearman's rank correlation test and correlation coefficient (ρ) are given in the insets and P values > 0.05 were considered non-significant (NS). Different colors represent different tissues explained in the legend.



Suppl. Fig. 17. Spearman's rank correlation between vitamin E and jasmonates in leaves. Data have been log transformed to better fit the model. (A) α -tocopherol ($\mu\text{g/g DW}$) and 12-*oxo*-phytodienoic acid (OPDA, ng/g DW) correlation, (B) α -tocopherol ($\mu\text{g/g DW}$) and jasmonic acid (JA, ng/g DW) correlation, (C) α -tocopherol ($\mu\text{g/g DW}$) and jasmonoyl isoleucine (JA-Ile, ng/g DW) correlation, (D) γ -tocopherol ($\mu\text{g/g DW}$) and 12-*oxo*-phytodienoic acid (OPDA, ng/g DW) correlation, (E) γ -tocopherol ($\mu\text{g/g DW}$) and jasmonic acid (JA, ng/g DW) correlation, and (F) γ -tocopherol ($\mu\text{g/g DW}$) and jasmonoyl isoleucine (JA-Ile, ng/g DW) correlation. Only leaf data are considered (N=180). *P* values for the Spearman's rank correlation test and correlation coefficient (ρ) are in the inlets and *P* values > 0.05 were considered non-significant (NS). Different colors represent different tissues explained in the legend.



DISCUSSIÓ



DISCUSSIÓ

1. La universalitat de la vitamina E en plantes

La vitamina E es troba de forma ubiqua en tots els teixits vegetals, tant en els fotosintètics com en els no fotosintètics. D'origen cianobacteric, la vitamina E ha anat augmentant els seus nivells progressivament en l'evolució des de les algues verdes fins a les angiospermes (Sattler et al., 2003; Esteban et al., 2009). La majoria dels teixits vegetals acumulen l' α -tocoferol com a forma principal de vitamina E (Munné-Bosch, 2007) tal i com hem observat en aquesta tesi (**Figura 6**), però també existeixen teixits que acumulen tocotrienols en comptes de tocoferols (**Figura 6**, Siles et al., 2013). El sòlid coneixement sobre la localització de l' α -tocoferol al cloroplast (Lichtenthaler et al., 1981; Grumbach et al., 1983; Soll et al., 1985; Fryer et al., 1992; Vidi et al., 2006), fa evident la presència de vitamina E als teixits fotosintètics on actua com a potent molècula fotoprotectora, com per exemple l' α -tocoferol a les fulles de *C. albidus*, que en contenen entre 100 i 1000 $\mu\text{g/g}$ de pes sec (**Capítol 2, Figura 6**).

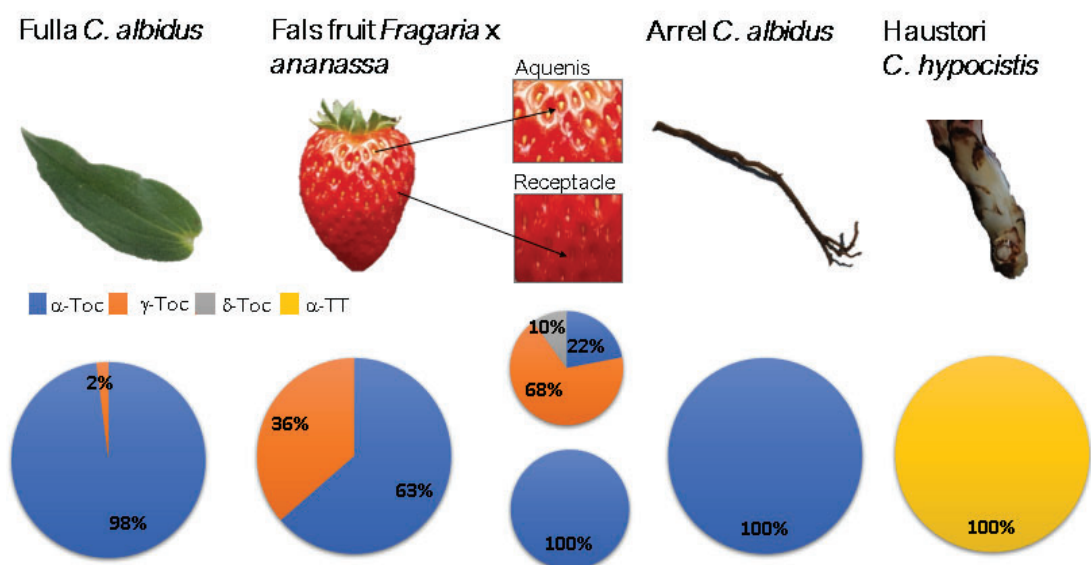


Figura 6. La ubiquïtat tissular de la vitamina E. Es representen els continguts de vitamina E en els diferents teixits analitzats en la present tesi. α -toc: α -tocoferol, γ -toc: γ -tocoferol, δ -toc: δ -tocoferol, α -TT: α -tocotrienol.

Als teixits no fotosintètics, la presència d'aquesta família d'antioxidants lipofílics resulta més complexa degut a la interconversió i degradació de plastidis. Quan es

tracta de teixits que contenen cromoplasts, plastidis derivats de la transformació dels cloroplasts, la síntesi de vitamina E està fortament relacionada amb la degradació de la clorofil·la que té lloc durant el procés de maduració del fruit, que a través de la via de reciclatge del fitol, proporciona fitil difosfat a la via de síntesi de la vitamina E (Almeida et al., 2016). Un cop format el cromoplast, aquest manté intacte el genoma plastidial del cloroplast així com la capacitat de síntesi de vitamina E a les membranes, principalment d' α -tocoferol degut a la ressaltada presència de γ -tocoferol metil transferasa (Arango i Heise, 1998; Barsan et al., 2010; Egea et al., 2010).

La interconversió i degradació dels plastidis juga un paper clau en els processos de desenvolupament de les plantes i és clau per a entendre la distribució de la vitamina E. Aquests processos són tals com la maduració de fruits, de llavors, la germinació o la senescència. La presència i síntesi de la vitamina E en teixits que contenen plastidis no fotosintètics roman encara poc clarificada a excepció del cas dels cromoplasts. Tot i així, s'ha demostrat la presència i abundància majoritària d' α -tocoferol en teixits d'aquestes característiques com és el cas del maduixot al **Capítol 1**, a les arrels de *C. albidus* al **Capítol 4**, o en altres espècies en fruits, tubercles, nòduls, rizomes, flors i llavors (Spychalla i Desborough, 1990; Valentin et al., 2006; Luby et al., 2014; Soba et al., 2020; Munné-Bosch et al., 2022). En aquests teixits, la vitamina E es localitza possiblement en plastidis com amiloplasts o leucoplasts (Munné-Bosch i Alegre, 2002), tot i que la determinació exacta de vitamina E en aquests plastidis en concret encara resta pendent. La funció que aquesta vitamina E exerceix en aquestes localitzacions no cloroplàstiques tampoc ha pogut ser investigada en profunditat de moment.

Els aquenis són fruits que contenen una sola llavor envoltada pel pericarpi (Simpson, 2010). Els aquenis són una gran font d'antioxidants, que contribueixen en un 40% al contingut total d'antioxidants dels maduixots (Ariza et al., 2016). En el cas de fruits com el maduixot, la presència de vitamina E als aquenis (els veritables fruits) està probablement relacionada amb el fet de que aquests contenen les llavors, tot i que la vitamina E també es podria trobar al pericarpi. Normalment les llavors acumulen, en l'endosperma o sinó en l'embrió, grans concentracions de vitamina E, γ -tocoferol i tocotrienols, més que α -tocoferol (Falk i Munné-Bosch, 2010; Muñoz i

Munné-Bosch, 2019), tot i que hi ha espècies on l' α -tocoferol és la forma predominant, i altres que només acumulen tocotrienols (Siles et al., 2013). Al pericarpi d'altres fruits no climatèrics com el cas de l'oliva, s'ha determinat la presència majoritària d' α -tocoferol en estadis d'absència de cloroplast tot i que hi ha discordances sobre la presència de cromoplast (Muzzalupo et al., 2011; Roca i Mínguez-Mosquera 2001; Butowt et al., 2003). Al **Capítol 1** hem vist que als aquenis del maduixot, la forma majoritària és el γ -tocoferol (50 $\mu\text{g/g}$ de pes fresc), tot i que també presenta α -tocoferol i δ -tocotrienol (**Figura 6**).

La presència de vitamina E en maduixots es podria atribuir a plastidis derivats de la degradació del cloroplast. Durant la maduració del maduixot es duu a terme la degradació dels cloroplasts però no la conversió a cromoplasts (Perkins-Veazie, 1995). En el cas dels aquenis analitzats al **Capítol 1**, les llavors que atresoren podrien contenir eoplasts (plastidis no fotosintètics derivats de la desdiferenciació del cloroplast) tal i com contenen les llavors de plantes model (Allorent et al., 2013). Normalment els eoplasts contenen molècules procedents de l'estat metabòlicament actiu anterior, com podria ser el cas de la vitamina E. Aquests eoplasts, es diferenciarien a cloroplasts o amiloplasts durant la germinació i el desenvolupament primerenc (Demarsy et al., 2012), i tornarien a sintetitzar vitamina E *de novo* en aquestes noves situacions de sobreabundància de ROS (Siles et al., 2015, 2018). El tipus de plastidi present al pericarpi dels aquenis és més complicat de suggerir ja que la singularitat d'aquest fruit fa difícil la generalització en base a fruits similars però en tot cas serien leucoplasts (absència de pigments). En el cas del receptacle, que no conté cromoplasts, trobem únicament α -tocoferol (en concentracions al voltant de 5 $\mu\text{g/g}$ de pes fresc) en l'estadi totalment blanc, que és el que segueix a l'estadi verd. Així, podria tractar-se també d' α -tocoferol present en romanents de cloroplasts que va disminuint al llarg de la maduració com veiem al **Capítol 1** però que encara és present en l'últim estadi de maduració, el completament vermell (**Figura 6**).

Als teixits no fotosintètics la vitamina E juga un paper essencial en la limitació de la peroxidació lipídica. Aquesta funció pren rellevància en aquests teixits ja que en aquest escenari la formació de ROS no està acoblada a la fotosíntesi sinó a la peroxidació de les membranes lipídiques. La funció de la vitamina E en fruits que no

contenen cromoplasts com el maduixot, no ha pogut ser estudiada específicament encara, tot i que es podria suggerir que frena la peroxidació lipídica ja que és la funció que fa de la vitamina E un antioxidant singular. Tot i així, en el cas de les llavors dels aquenís analitzats la funció podria ser més clara. S'ha demostrat en plantes model que la vitamina E és vital per a la longevitat de les llavors. Al ser teixits d'emmagatzematge de lípids, que en el moment de la germinació es re-mobilitzaran ràpidament proporcionant una font de carboni, la vitamina E, especialment els tocoferols, són clau en la prevenció de la peroxidació lipídica no enzimàtica durant la germinació, i els estadis primerencs del desenvolupament de la llavor (Sattler et al., 2004; Mène-Saffrané et al., 2010).

En el cas de les arrels, la presència de vitamina E (principalment α -tocoferol) atribuïda als amiloplasts pot estar relacionada amb la limitació de la peroxidació lipídica en resposta a l'estrès. Per exemple, en arrels de soja i alfals, el contingut d' α -tocoferol, l'únic tococromanol present en aquests teixits, respon a l'estrès hídric (Soba et al. 2020). En altres teixits lleugerament semblants com podrien ser els rizomes, en aquest cas de *Cymodocea nodosa*, les conclusions són similars; la vitamina E, concretament l' α -tocoferol actua en la protecció de la peroxidació lipídica davant d'estressos ambientals (Munné-Bosch et al., 2022). En el cas de les arrels de *C. albidus* infectades per la planta holoparàsita *C. hypocistis* analitzades al **Capítol 4**, on l' α -tocoferol representa el 100% dels tococromanols (**Figura 6**), també sembla ser que l' α -tocoferol, trobat en concentracions que van de 5 a 95 $\mu\text{g/g}$ de pes sec, podria tenir un paper en la interacció entre la planta paràsita i l'hoste, en la limitació de la peroxidació lipídica que es donaria durant aquesta relació tal i com es dona en les situacions d'estrès biòtic.

La vitamina E però, no és exclusiva dels organismes fotosintètics. Més enllà de determinar la presència de vitamina E en teixits no fotosintètics, al **Capítol 4** se n'ha demostrat la presència en plantes no fotosintètiques. A més d'algunes espècies d'holoparàsits del gènere *Cuscuta* (van der Kooij et al., 2000, 2005), on s'ha determinat la presència de vitamina E (tocoferols), se n'ha determinat la presència i proposat la síntesi, concretament d' α -tocoferol, en el protist *Plasmodium falciparum*, el paràsit causant de la malària en humans, que la sintetitzaria en un plastidi no

fotosintètic homòleg al cloroplast anomenat apicoplast (Sussmann et al., 2011, 2017). Tot i així, els gens de síntesi de vitamina E no han estat identificats. L'apicoplast és un plastidi vestigial que presenten la majoria de paràsits del filum Apicomplexa, i es creu que va ser originat per endosimbiosi secundària, entre un eucariota (que havia adquirit ja un plastidi per endosimbiosi primària amb un procariota similar als cianobacteris) i una alga (Lim i McFadden, 2010). És essencial per a la vida del paràsit i les principals funcions que se li atribueixen són la biosíntesi d'àcids grassos i d'isoprenoides (McFadden, 2011).

En l'haustori de *C. hypocistis* es va determinar la presència de vitamina E, essent l' α -tocotrienol qui representava el 100% de la vitamina E determinada, amb concentracions entre 3 i 10 $\mu\text{g/g}$ de pes sec (**Figura 6**). Els resultats indiquen que aquesta planta no fotosintètica és capaç de sintetitzar vitamina E. Aquesta idea és suportada pel fet que les arrels de la planta hoste d'on *C. hypocistis* adquireix tots els recursos només presenten α -tocoferol i les fulles α i γ -tocoferol, que no són precursors de l' α -tocotrienol present en l'haustori de la planta holoparàsita. En diverses espècies del gènere de plantes holoparàsites *Cuscuta*, s'ha determinat la presència de vitamina E (tocoferols) en les tiges tant en les espècies fotosintètiques que disposen de cloroplast com en les no fotosintètiques amb plastidis ameboides amb estructures vesiculars (van der Kooij et al., 2000, 2005). Ni la quantitat ni el perfil de tococromanols guardava relació amb la capacitat fotosintètica i en general el γ -tocoferol era el més abundant. Els autors suggereixen que podria ser degut a la pèrdua de la tocoferol metil transferasa (que transforma el γ en α -tocoferol), potser deguda a la relaxada pressió de selecció en la funció antioxidant de l' α -tocoferol.

Els tocotrienols en les plantes es troben als teixits i òrgans no fotosintètics (Horvath et al., 2006). *Orobancha crenata* presenta tocotrienols a les llavors (Genovese et al., 2020) però la presència de tocotrienols en l'haustori d'una planta holoparàsita és la primera vegada que es demostra. *C. hypocistis* acumula α -tocotrienol i no acumula tocoferols, al contrari que altres espècies de plantes no fotosintètiques del gènere de plantes paràsites de tija *Cuscuta* (van der Kooij et al., 2000, 2005). En aquest sentit, la funció de l' α -tocotrienol trobat a l'haustori de *C. hypocistis* podria ser compatible amb la protecció de les membranes biològiques però potser també amb funcions

específiques i diferencials dels tocotrienols respecte els tocoferols, de moment desconegudes (Falk i Munné-Bosch, 2010), ja que l'haustori de *C. hypocistis* presenta nivells indetectables del producte de la peroxidació lipídica, el malondialdehid (**Figura 2I del Capítol 4**).

En quant a la localització subcel·lular de la vitamina E present en l'haustori de *C. hypocistis* es proposa que és plastidial. El tipus de plastidi en el que estaria no queda tant clar. El genoma plastidial de *C. hypocistis* presenta extremades reduccions degut a la pèrdua de la capacitat fotosintètica i es creu que aquest fet és el resultat de la relaxada pressió de selecció per a conservar el plastidi adquirit dels seus parents fotosintètics, degut al seu estil de vida holoparasitic (Roquet et al., 2016). Tenint en compte que *C. hypocistis* presenta amiloplasts (Mangenot i Mangenot, 1968; Severi et al., 1980), així com *Cuscuta europea* (Švubová et al., 2013, 2017), podríem suggerir que la vitamina E en l'haustori de *C. hypocistis* podria trobar-se dins de plastidis del tipus amiloplasts.

En resum, es demostra que la vitamina E es presenta de forma ubiqua en les plantes (tant en les que realitzen fotosíntesi com en plantes holoparàsites), i s'acumula tant en teixits fotosintètics com en teixits no fotosintètics. La localització subcel·lular de la vitamina E sembla ser plastidial ja que aquests teixits presenten plastidis com amiloplasts i les evidències de la localització extraplastidial de la vitamina E són molt escasses [en vacuoles de fulles de blat (Rautenkranz et al., 1994), en membranes microsomals de les arrels de soja (Caro i Puntarulo, 1996) i en cossos lipídics de les llavors de gira-sol (Fisk et al., 2006)]. Com a mecanisme de fotoprotecció, és clau als teixits fotosintètics com les fulles. A més, la protecció davant la peroxidació lipídica que exerceix aquesta vitamina E sembla ser també clau als teixits no fotosintètics com els fruits i les arrels. Tot i així, la seva funció en plantes no fotosintètiques requereix futures investigacions.

2. La relació bidireccional entre la vitamina E i els jasmonats en plantes

La importància de la relació entre la vitamina E i els jasmonats resideix principalment a les fulles, els teixits fotosintètics principals de les plantes. Al **Capítol 2** es demostra que aquesta relació resulta ser bidireccional, és a dir, tant la regulació dels nivells de vitamina E per part dels jasmonats com viceversa sembla coexistir en les fulles. Aquesta direcció varia en funció de l'espècie analitzada, les condicions a les quals es troben sotmeses les plantes o la dosi de les formes de vitamina E i de jasmonats analitzades (**Figura 7A, B**). Generalment la relació entre el JA i la vitamina E és positiva mentre que el precursor dels jasmonats, l'OPDA, presenta una relació negativa o antagònica amb la vitamina E. Al **Capítol 4**, on es va analitzar aquesta relació en teixits fotosintètics i no fotosintètics de diferents models vegetals, es posa en rellevància les limitacions que aquesta relació bidireccional podria suposar en les fulles. A l'analitzar tots els teixits alhora (fotosintètics i no fotosintètics), la relació positiva entre jasmonats i vitamina E es dibuixava fragmentada per teixits, exemplificant que les fulles presenten majors nivells de vitamina E i també de jasmonats en comparació als altres teixits analitzats (**Figures Supl.16 i 17 del Capítol 4**) i, tenint en compte també els resultats del **Capítol 2**, i que el cloroplast és essencial en la senyalització retrògrada enfront als estressos, és en aquests teixits fotosintètics on sorgeix la importància de la bidireccionalitat.

Les correlacions positives més robustes es donen principalment entre el JA i la vitamina E, tant α - com γ -tocoferol (el precursor de l' α), però no entre l'OPDA i la vitamina E (**Figura 7A, B**). Aquesta vessant positiva de la relació suggereix una regulació gènica dels nivells de vitamina E per part dels jasmonats. Els resultats concorden amb la idea d'una regulació gènica ja que el JA és la hormona multifuncional central en la via de senyalització dels jasmonats que regula la transcripció de gran nombre de gens en resposta a l'estrès, principal però no únicament biòtic (Xu et al., 2002; Thines et al., 2007). Cal tenir en compte que les anàlisis correlatives no són proves irrefutables d'aquesta relació però sí que són potents indicadors. A més, els resultats d'aquestes anàlisis presenten elevada

variabilitat degut a la implicació del JA en diversos processos vegetals i la seva interacció amb les altres fitohormones, però no per això hem d'obviar les pistes que ens donen les robustes correlacions com les que hem observat al llarg d'aquesta tesi, sobretot al **Capítol 2**.

Alguns gens implicats en la síntesi de vitamina E presenten elements de resposta als jasmonats. La inducció de la síntesi de vitamina E per part dels jasmonats demostrada al **Capítol 2** amb aplicacions de MeJA en discs foliars de *C. albidus* i la presència d'elements de resposta als jasmonats en la seqüència gènica de la tocoferol ciclase i la tocoferol metil transferasa en *A. thaliana*, estan d'acord amb altres estudis on s'ha demostrat que els jasmonats indueixen la transcripció de gens

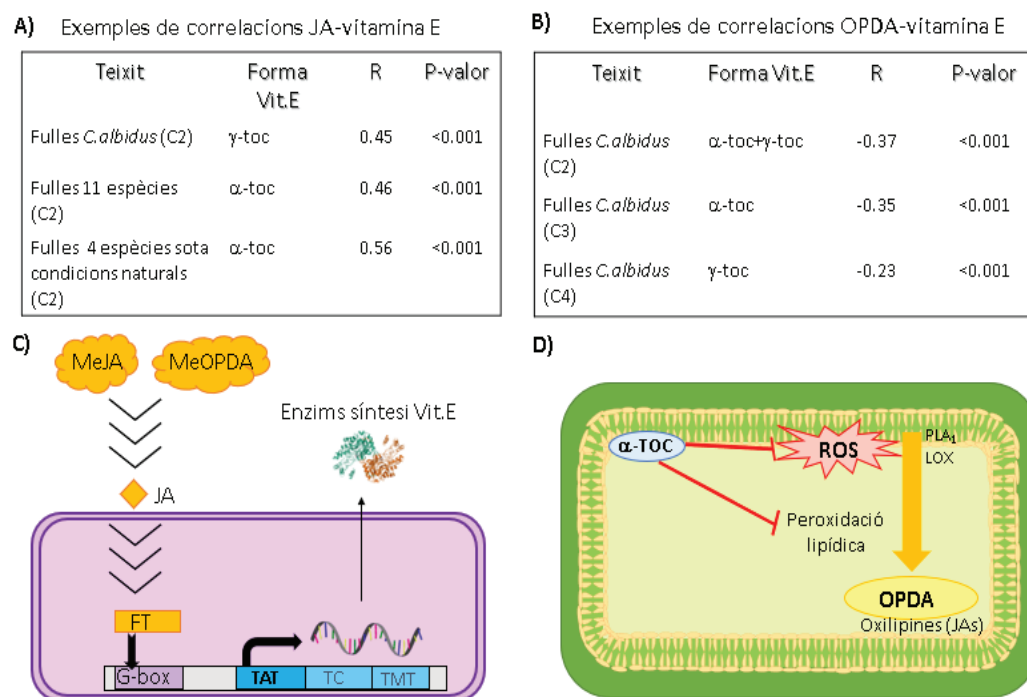


Figura 7. La relació bidireccional entre la vitamina E i els jasmonats en les plantes. A) Exemples de correlacions entre JA i diferents formes de vitamina E trobades en aquesta tesi. Vit.E: vitamina E. B) Exemples de correlacions entre OPDA i vitamina E trobades en aquesta tesi. C) Model d'interacció positiva entre els jasmonats i la vitamina E: la via de senyalització dels jasmonats, induïda per l'aplicació de MeJA o MeOPDA, i conduïda per JA, a partir de la unió de factors de transcripció (FT) a elements de resposta als jasmonats, indueix la transcripció de gens que codifiquen per enzims implicats en la síntesi de vitamina E com la tirosina aminotransferasa (TAT) i possiblement la tocoferol ciclase (TC) i la tocoferol metil transferasa (TMT). D) Model d'interacció negativa entre els jasmonats i la vitamina E: la vitamina E (principalment α -tocoferol) desactiva les ROS i frena la peroxidació lipídica de les membranes cloroplàstiques, procés que deriva en una menor formació d'oxilipines com és l'OPDA, el precursor dels altres jasmonats. LOX: lipoxigenasa, PLA₁: fosfolipasa 1.

que codifiquen per enzims involucrats en la síntesi de vitamina E com la tirosina aminotransferasa i la tocoferol metil transferasa (Lopukhina et al., 2001; Sandorf i Höllander-Czytko, 2002; Saini et al., 2014). L'activació de la via de senyalització dels jasmonats per part del MeJA (o el MeOPDA) que donaria lloc a tal resposta és deguda a l'actuació del JA i no de l'OPDA, que iniciaria la cascada de senyalització per a regular la transcripció gènica, probablement amb l'actuació de JA-Ile seguint la via clàssica de senyalització dels jasmonats (**Figura 7C**, Sandorf i Höllander-Czytko, 2002; Siles et al., 2018).

La relació antagònica entre la vitamina E i el precursor dels jasmonats, l'OPDA, reflecteix una relació fisicoquímica comprensible entre oxilipines i antioxidants cloroplàstics. En aquest cas s'han observat durant la tesi fortes correlacions negatives entre l'OPDA i la principal forma de vitamina E, α - tocoferol així com el seu precursor el γ -tocoferol (**Figura 7A, B**). De tots els teixits analitzats en els diferents capítols aquesta relació només es pot avaluar de forma robusta en les fulles de *C. albidus* dels diferents capítols ja que disposem en total de 850 mostres foliars en condicions naturals. A part de trobar aquesta correlació negativa en cadascun dels **Capítols 2, 3, i 4**, analitzant totes les mostres alhora es revela que en les fulles d'aquesta espècie sota condicions naturals, la relació antagònica entre l'OPDA i la vitamina E és la que pren més importància (**Taula 1**). No de forma tant clara com en el cas de la inducció de la síntesi de tocoferols per part del JA, però sí que s'ha demostrat en plantes model que deficiències en vitamina E comporten alteracions en els nivells de jasmonats (Munné-Bosch et al., 2007; Simancas i Munné-Bosch, 2015; Allu et al., 2017).

	OPDA	JA	JA-Ile
α -Toc	-0.34 (P<0.001)	NS	NS
γ -Toc	-0.38 (P<0.001)	0.11 (P<0.001)	0.11 (P<0.001)
Vitamina E total	-0.35 (P<0.001)	NS	NS

Taula 1. Anàlisis correlatives (test d'Spearman) entre la vitamina E i els jasmonats de totes les mostres foliars de *C. albidus* que formen part de la present tesi (N=850). Es mostra el coeficient de correlació lineal i entre parèntesis el P valor. NS: no significatiu.

L'OPDA com a precursor dels jasmonats és una oxilipina derivada de la peroxidació lipídica de les membranes del cloroplast, succés que la vitamina E limita (**Figura 7D**). Principalment és l' α -tocoferol el que participa d'aquesta manera en l'homeòstasi redox cloroplàstica (Munné-Bosch, 2007). Ancorat a la matriu lipídica de les membranes cloroplàstiques i tilacoidals, tot cedint l'hidrogen del seu grup hidroxil i mitjançant moviments de "flip-flop", l' α -tocoferol desactiva els radicals peroxils lipídics evitant així la propagació de la peroxidació lipídica (Munné-Bosch i Alegre, 2002; Boonoy et al., 2018). De forma directa, aquest és el model a través del qual la vitamina E redueix els nivells d'oxilipines, entre elles l'OPDA i, per tant, de jasmonats. D'aquesta manera modula la senyal redox que emergeix del cloroplast cap al nucli en la senyalització retrògrada involucrada en el procés d'aclimatació als estressos.

A banda d'aquesta relació estrictament fisicoquímica però, no podem descartar una possible regulació gènica per part de l' α -tocoferol sobre la producció d'oxilipines, i per tant de jasmonats. Aquesta regulació gènica es podria donar sobre la lipoxigenasa 13, l'enzim implicat en els primers passos de la biosíntesi d'OPDA. Les lipoxigenases són una superfamília d'enzims que catalitzen la oxidació dels àcids grassos, presents en plantes, fongs i animals. D'acord amb la regioespecificitat de la reacció d'oxidació lipídica que catalitzen, es classifiquen en les lipoxigenases 5, 8, 9, 10, 12, 13 i 15 (Viswanath et al., 2020). S'ha demostrat *in vitro* en la lipoxigenasa 5 aïllada de tubercles de patata, que la vitamina E, en concret l' α -tocoferol, inhibia la seva activitat (Lebold i Traber, 2014).

L'aspecte dosi-depenent d'aquesta relació bidireccional té implicacions conceptuals a nivell de funcionament hormonal i homeòstasi redox. Aquesta dosi-dependència s'ha observat al **Capítol 2** principalment, on tant les anàlisis correlatives com les aplicacions de MeJA reflectien que, per una banda, els jasmonats (especialment el JA) indueixen la síntesi de tocoferols de forma dosi-depenent i no sempre en una relació lineal, fet que és coherent amb el funcionament normal d'una hormona, que actua en baixes dosis i de forma dosi-depenent (Davies, 2010). De fet, les correlacions entre vitamina E i JA s'adapten millor a una funció logarítmica, indicant que l'augment de vitamina E degut a la senyalització dels jasmonats és molt

significatiu al principi de la corba d'augment de JA i a mesura que augmenta la dosi de JA l'augment de vitamina E que representa en proporció va disminuint. Per altra banda, la vitamina E (especialment l' α -tocoferol) frena la síntesi de jasmonats (OPDA) de forma més lineal, de manera que quan altes dosis d'OPDA són requerides per a la síntesi de jasmonats, es fa evident l'antagonisme des del prisma de la homeòstasi redox cloroplàstica.

En resum, s'ha demostrat que la relació entre vitamina E i jasmonats és dosi-depenent i bidireccional en *C. albidus*. Essent positiva o sinèrgica entre la vitamina E i el JA en diverses espècies, i negativa o antagònica amb l'OPDA en *C. albidus* sota condicions naturals, es suggereix que és igual en totes les plantes en general. Així doncs, la inducció de síntesi de tocoferols per part dels jasmonats en les plantes seria regulada genèticament i de forma dosi-depenent per a evitar danys oxidatius i mantenir un correcte estat redox cloroplàstic durant situacions d'estrès. D'altra banda, la regulació dels nivells de jasmonats per part de la vitamina E respon a la naturalesa antioxidant de la vitamina E, que modula els nivells d'oxilipines i jasmonats reaccionant amb els radicals lipídics. A més, la regulació gènica dels nivells d'oxilipines i jasmonats per part de la vitamina E no es pot descartar. Amb tot, els jasmonats com a hormones vegetals regulen un gran nombre de respostes en les plantes, entre elles la síntesi de tocoferols, i, la vitamina E, principalment l' α -tocoferol, com a antioxidant cloroplàstic participa en la regulació redox cloroplàstica modelant els nivells d'oxilipines i jasmonats i, per tant, modelant la senyal redox que emergirà del cloroplast per participar en la senyalització retrògrada per a l'acimatació a l'estrès.

3. Implicacions fisiològiques de la relació entre la vitamina E i els jasmonats en condicions naturals amb combinació d'estressos

Vivint en un ambient permanentment canviant, les plantes perceben, integren i responen als factors abiòtics i biòtics ajustant constantment la seva fisiologia i metabolisme per tal d'optimitzar el creixement, la reproducció i la defensa. Les principals molècules reguladores essencials d'aquesta orquestra de processos són les fitohormones (Davies, 2010). A grans trets, en el creixement i la reproducció hi participen més aviat les auxines, citocinines i gibberel·lines, mentre que la defensa als

estressos es coordina mitjançant l'àcid abscísic, l'etilè, l'àcid salicílic i els jasmonats. En el context de la defensa als stressos, les interaccions d'aquestes hormones amb altres reguladors essencials de les plantes com les ROS o amb els reguladors d'aquestes ROS, per exemple els antioxidants, són també crucials per a la resposta (Fujita et al., 2006; Atkinson et al., 2015).

Generalment la vitamina E respon a l'estrès abiòtic i els jasmonats al biòtic. Per tant, tenint en compte la bidireccionalitat de la seva relació, en condicions d'estrès abiòtic on augmentés la vitamina E, la capacitat de defensa contra stressos biòtics es veuria limitada (suggerit per Demmig-Adams et al., 2013), i en condicions d'estrès biòtic els jasmonats induirien un augment de vitamina E (es podria suggerir en base als resultats de Sandorf i Holländer-Czytko, 2002). Tot i així, de moment no s'ha pogut estudiar sota combinació d'estressos per poder avaluar les implicacions reals d'aquesta relació. Algunes de les principals condicions ambientals que solen causar augments de vitamina E en les plantes, especialment d' α -tocoferol, són l'excés de llum, la sequera, i les temperatures extremes (Hasanuzzaman et al., 2014). Se sap que l'herbivorisme, el parasitisme, i els microorganismes beneficiosos, com per exemple els fongs micorrízics, són factors biòtics que activen la resposta dels jasmonats (Choudhary et al., 2007; Pieterse et al., 2014), tot i que l'estudi en condicions naturals és complicat i de moment encara no s'ha pogut estudiar en profunditat. Així doncs, tenint en compte que la relació entre vitamina E i jasmonats és bidireccional de manera simultània, segons l'escenari en el que ens trobem prevaldrà una de les dues direccions, i el resultat de la relació antagònica o sinèrgica entre aquestes dues famílies moleculars, tindrà implicacions fisiològiques contràries (Figura 8).

Les conseqüències fisiològiques de la relació entre vitamina E i jasmonats dependran de la forma molecular afectada. En el cas de la vitamina E, ambdues formes (α i γ) presenten la mateixa relació amb cada forma de jasmonats (positiva amb el JA i negativa amb l'OPDA). A més, el γ -tocoferol és precursor de l' α i, si bé presenten algunes funcions diferencials (Abbasi et al., 2007), l' α -tocoferol és el principal antioxidant cloroplàstic i element de resposta a l'estrès abiòtic i les funcions d'ambdues formes són sinèrgiques en relació a l'estat redox i a la defensa a l'estrès

abiòtic. En el cas dels jasmonats, les implicacions de la relació amb la vitamina E difereixen més ja que el JA és una hormona multifuncional de resposta a diversos processos de desenvolupament, estrès biòtic però també abiòtic. En canvi, l'OPDA tot i ser el precursor dels jasmonats, té un paper de senyalització hormonal diferencial

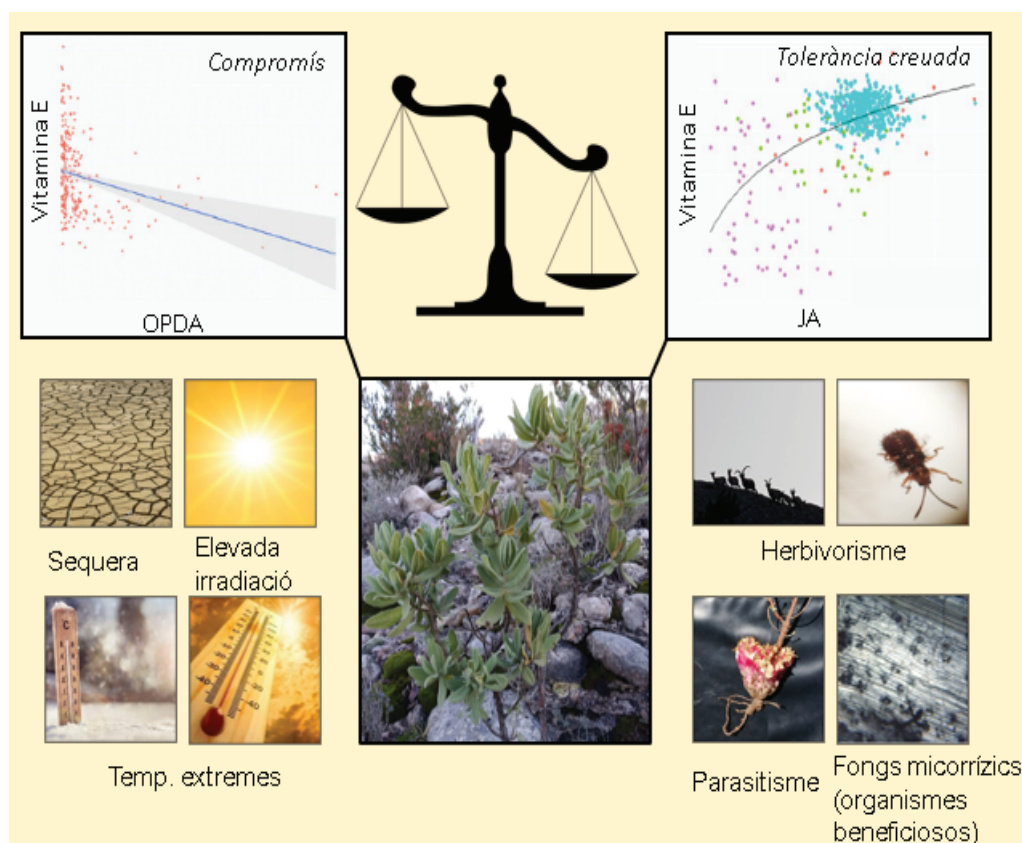


Figura 8. Esquema simplificat de les possibles implicacions fisiològiques de la relació entre la vitamina E i els jasmonats en condicions naturals amb combinació d'estressos. Alguns factors abiòtics promouen l'acumulació de vitamina E, i això podria portar un compromís entre l'acumulació de vitamina E i de jasmonats (OPDA). Alguns factors biòtics promouen l'acumulació de jasmonats, que podria resultar en tolerància creuada degut a la inducció de la síntesi de vitamina E per part dels jasmonats (JAs). JA: àcid jasmònic, OPDA: àcid *cis(+)*-12-oxo-fitodienoic, Temp: temperatures.

al JA i relacionat amb la senyalització retrògrada de les espècies reactives electròfiles davant de situacions d'estrès (Alméras et al., 2003; Taki et al., 2005; Heitz, 2016).

La relació sinèrgica entre el JA i la vitamina E podria contribuir a la tolerància creuada entre les defenses d'estrès abiòtic i biòtic. En nombroses ocasions s'ha observat el fenomen de tolerància creuada, de manera que l'activació del sistema de defensa a l'estrès biòtic involucra una xarxa de vies de resposta a l'estrès que resulta en major tolerància a l'estrès abiòtic o viceversa (Foyer et al., 2016), degut a la gran

matriu d'interaccions que es donen entre els elements dels diferents nivells que actuen en la resposta als estressos (**Figura 4**). Per exemple, més enllà de les interaccions pròpiament hormonals i les múltiples funcions de cada hormona, les quitinases endògenes (enzims hidrolítics de defensa a fongs i animals exoesquelètics) induïdes per elicitors biòtics com el MeJA o els fongs patògens, contribueixen a la tolerància a l'estrès biòtic però també a estressos abiòtics com la sequera. Així doncs, sota situacions d'estrès biòtic on la resposta de jasmonats s'activa, la inducció de la síntesi de vitamina E (que forma part del sistema de resposta i defensa a l'estrès abiòtic) per part del JA podria comportar tolerància creuada.

La via de senyalització dels jasmonats activada sota condicions d'estrès biòtic pot augmentar la síntesi de vitamina E, contribuint així a la tolerància a l'estrès abiòtic. Tot i que de moment no hi ha estudis en condicions naturals que exemplifiquin la relació positiva entre el JA i la vitamina E demostrada en plantes model i en *C. albidus* (**Capítol 2**) sí que s'ha demostrat que els jasmonats, que coordinen la resposta a l'estrès biòtic, són capaços d'induir la síntesi d'antioxidants, entre ells la vitamina E com s'ha vist al **Capítol 2** (Sandorf i Holländer-Czytko, 2002; Sasaki-Sekimoto et al., 2005; Wolucka et al., 2005; Farooq et al., 2016), que les condicions d'estrès biòtic promouen el sistema antioxidant (Reyes i Cisneros-Zevallos, 2003; Biswas et al., 2020), com la vitamina E (Sandorf i Holländer-Czytko, 2002), i que els antioxidants com la vitamina E són essencials per a la defensa a l'estrès abiòtic (Munné-Bosch, 2007). Amb tot, tot indica que en condicions d'estrès biòtic, l'activació de la via de senyalització dels jasmonats pot incloure com a resposta la síntesi d'antioxidants com la vitamina E, i que això podria resultar en una major tolerància a l'estrès abiòtic, com sembla ocórrer al **Capítol 4**, on els arbustos de *C. albidus* sota combinació de parasitisme i estrès abiòtic mostren majors nivells de jasmonats (JA-Ile) i de vitamina E que els individus no parasitats, i es mostren tolerants als dos tipus d'estrès (**Figures 3 i 4 del Capítol 4**).

La relació antagònica entre la vitamina E i l'OPDA es dona en condicions naturals. Especialment en les plantes dels ecosistemes mediterranis, l' α -tocoferol respon als estressos abiòtics de manera clara (Fernández-Marín et al., 2017) i contribueix a la tolerància a gran varietat d'estressos abiòtics (Munné-Bosch, 2005). Hi ha alguns

exemples d'aquesta relació antagònica entre la vitamina E i la capacitat de síntesi de jasmonats en condicions naturals. A part de la forta correlació negativa que s'ha observat als **Capítols 2, 3 (Annex I) i 4** entre la vitamina E (ambdós α i γ -tocoferol) i la capacitat de síntesi de jasmonats (OPDA), amb coeficients de correlació d'Spearman d'entre -0.22 i -0.37, també en el cas de la planta pirenaica *Saxifraga longifolia* es va observar aquesta relació entre l' α -tocoferol per unitat de clorofil·la i el JA amb una R de -0.45 (l'OPDA no va ser analitzat, Cotado i Munné-Bosch, 2020), i en la planta tropical *Vellozia gigantea* entre l'OPDA i l' α i γ -tocoferol (R= -0.31 i R= -0.23 respectivament, Morales et al., 2015).

La relació antagònica entre la vitamina E i la capacitat de síntesi de jasmonats (OPDA) podria contribuir a un possible compromís entre la defensa a l'estrès abiòtic i biòtic en les plantes. És sabut que l'augment de vitamina E forma part de la defensa de les plantes enfront l'estrès abiòtic i que els jasmonats són crucials en la defensa a l'estrès biòtic. És per això que s'ha proposat diverses vegades que la relació antagònica entre aquestes famílies moleculars pot resultar en un compromís entre els dos tipus de defensa. És a dir, un augment de vitamina E davant d'un estrès abiòtic podria resultar en major susceptibilitat davant d'un estrès biòtic degut a la limitació de síntesi de jasmonats causada per aquesta vitamina E (Demmig-Adams et al., 2013, Morales et al., 2015; Cotado i Munné-Bosch, 2020). Malauradament, de moment no hi ha estudis que ho demostrin de forma directa ja que aquesta relació només explica una part del possible compromís i forma part d'una extensa xarxa d'interaccions en el marc de la convergència d'estressos que encara resta poc clarificada.

En escenaris de convergència d'estressos, el resultat de la relació bidireccional entre la vitamina E i els jasmonats podria contribuir doncs al compromís o a la tolerància creuada entre les defenses a l'estrès abiòtic i biòtic. En la natura és molt comú que els stressos abiòtics i biòtics es donin simultàniament. En un escenari d'aquestes característiques, la prioritització o no de la defensa a un dels dos tipus d'estrès és determinant en la resposta. Per una banda, sabem que les plantes quan es veuen sotmeses a diversos tipus d'estrès simultàniament poden tolerar-los alhora. Aquesta tolerància és creuada en el sentit que la resposta a una situació d'estressos combinats no és la suma de les respostes a cada un dels stressos simples i per tant

és una resposta combinada, comuna, no dues respostes paral·leles (Kissoudis et al., 2014). D'altra banda també sabem que en determinats escenaris, les plantes han de prioritzar la defensa a un tipus d'estrès en detriment de l'altre degut als compromisos existents entre els elements de resposta (Ariga et al., 2017; Berens et al., 2019).

El resultat de la interacció entre la resposta a l'estrès abiòtic i biòtic dependrà de la naturalesa i el grau dels estressos, de l'edat, o de l'estat de desenvolupament de la planta (Saijo i Loo, 2019). Fins i tot en una mateixa espècie en condicions similars de combinació d'estressos es poden observar diferents respostes. Per exemple, al **Capítol 4**, on treballem amb *C. albidus*, espècie en la qual hem determinat la relació bidireccional entre la vitamina E i els jasmonats, podem observar tolerància creuada a l'estiu, on les plantes sotmeses a estrès abiòtic i biòtic mostren un augment de jasmonats (JA-Ile) i de vitamina E (γ -tocoferol) que resulta en tolerància a l'estrès abiòtic i també al biòtic, suggerint així que la relació sinèrgica entre vitamina E i jasmonats podria contribuir a la tolerància creuada (**Figures 3 i 4 del Capítol 4**).

Si ens fixem però en l'efecte geogràfic (microclimàtic i poblacional), podem observar en la població 3 (creixent a major altitud) una resposta diferent. Les plantes parasitades es mostren més estressades i amb nivells més elevats de vitamina E en comparació a les no parasitades. En aquesta població en concret, l'augment de jasmonats (JA-Ile) no es produeix en resposta a la combinació d'estressos, suggerint que en determinats escenaris la relació antagònica entre vitamina E i jasmonats podria contribuir al compromís entre la defensa a l'estrès abiòtic i biòtic, ja que el major augment de vitamina E en resposta a l'estrès abiòtic degut a l'altitud (comparat amb les altres dues poblacions) podria contribuir a la limitació en la síntesi de jasmonats resultant així en major susceptibilitat al parasitisme (**Figures 5, 6, i 8 del Capítol 4**).

Tot això doncs, s'ha d'entendre de manera integrativa, tenint en compte que la relació entre la vitamina E i els jasmonats es dona simultàniament de forma bidireccional. A més, aquesta relació forma part d'una gran xarxa d'interaccions que coordinen la resposta combinada a l'estrès abiòtic i biòtic, que depèn de diversos factors a més de les interaccions entre els elements que conformen aquesta xarxa.

Així doncs, el fet que el paràgraf anterior pugui semblar contradictori en primera instància, la relació entre la vitamina E i els jasmonats podria contribuir en la interacció entre la resposta a l'estrès abiòtic i biòtic en les plantes en diferents direccions donat que la relació és bidireccional i per tant, es pot donar una inducció en la síntesi de vitamina E per part dels jasmonats, i/o una limitació en l'acumulació de jasmonats per part de l'acció de la vitamina E, depenent de diversos factors com per exemple el grau d'estrès.

En resum, la relació que s'ha demostrat entre vitamina E i jasmonats podria tenir implicacions ecofisiològiques importants en la resposta de les plantes a estressos convergents ja que generalment la vitamina E respon a l'estrès abiòtic i els jasmonats al biòtic i s'ha vist que ambdós responen a la combinació d'estressos. Les conseqüències fisiològiques de la relació entre vitamina E i jasmonats dependran de la forma molecular afectada. D'una banda, la relació sinèrgica entre el JA i la vitamina E podria contribuir a la tolerància creuada entre les defenses d'estrès abiòtic i biòtic ja que la via de senyalització dels jasmonats, en general activada sota condicions d'estrès biòtic, pot augmentar la síntesi de vitamina E contribuint així a la tolerància a l'estrès abiòtic. D'altra banda, la relació antagònica entre la vitamina E i l'OPDA, que es dona en condicions naturals, podria contribuir al compromís entre la defensa a l'estrès abiòtic i biòtic en les plantes. En escenaris de convergència d'estressos el resultat de la relació bidireccional entre la vitamina E i els jasmonats podria contribuir doncs a compromís o tolerància creuada entre les defenses a l'estrès abiòtic i biòtic segons la naturalesa i el grau dels estressos, de l'edat, o de l'estat de desenvolupament.

4. Relació entre l'estrès abiòtic i l'herbivorisme en arbustos mediterranis

Els arbustos que habiten els ecosistemes mediterranis conviuen amb dures condicions ambientals i amb diversitat d'animals herbívors. Tot i que aquests arbustos, com és el cas de *C. albidus*, solen ser molt resistents als típics estressos abiòtics que pateixen en aquests hàbitats, com són la sequera, l'alta irradiació solar, o la pobresa de nutrients al sòl, aquests factors amenacen la seva supervivència

(Peñuelas et al., 2007; Sardans i Peñuelas, 2013). Els tipus d'herbivorisme més comuns en condicions naturals són causats per insectes, petits mamífers i per ungulats salvatges o de pastura, com les cabres (Hódar i Zamora, 2004; Focardi i Tinelli, 2005; Miranda et al., 2011). A més a més, els incendis causen un gran impacte en les comunitats mediterrànies i sobre els patrons d'herbivorisme (Torre i Díaz, 2004).

Tant els estressos abiòtics com l'herbivorisme causen grans modificacions en la comunitat arbustiva. En els ecosistemes mediterranis, les èpoques d'estrès, com l'estiu o l'hivern, modulen la diversitat de la comunitat arbustiva ja que tenen conseqüències sobre el creixement i productivitat vegetal (Peñuelas et al., 2007). L'herbivorisme també causa grans modificacions en aquestes comunitats dels ecosistemes mediterranis. Per exemple, les espècies dels ecosistemes mediterranis són més o menys tolerants a l'herbivorisme i aquesta diferència provoca canvis en l'estructura de l'ecosistema i fins i tot en la susceptibilitat de la comunitat a les plantes invasores (Prieur-Richard et al., 2002; Focardi i Tinelli, 2005). Tot i així, les plantes mediterrànies poden generar una compensació o sobre-compensació de la pèrdua de biomassa produïda per l'herbivorisme. Sobretot en el cas de la pastura en zones naturals ja que les plantes en aquests ecosistemes han evolucionat sota una gran pressió d'herbivorisme des del Pleistocè (Papanastasis, 1998; Bartolomé et al., 2019).

Tot i la malaurada escassetat d'estudis sobre l'herbivorisme als ecosistemes mediterranis, la selectivitat per part dels herbívors és un aspecte clau. Al **Capítol 3** veiem que l'herbivorisme es dona principalment a l'hivern, i que està relacionat amb la hidratació foliar ($P < 0.001$, $R = 0.32$). Els herbívors, com insectes i cabres, més enllà de seleccionar interespecíficament la seva dieta vegetal, seleccionen de forma intraespecífica i intraindividual segons l'estació de l'any (Papachristou, 2000; Miranda et al., 2011; Mancilla-Leytón et al., 2012, 2013; Chebli et al., 2020), l'estrès de les plantes de les quals s'alimenten (Meyer et al., 2006; Staley et al., 2006; Ribeiro-Neto et al., 2012), aspectes nutricionals (Mancilla-Leytón et al., 2014), segons l'acumulació de compostos secundaris (Massei et al., 2000) i la densitat de tricomes (Molina-Montenegro et al., 2006). Les espècies del gènere *Cistus* presenten diverses

característiques que poden afectar la susceptibilitat a patir herbivorisme a nivell individual. Per exemple, la presència de tricomes foliars (Gülz et al., 1996; Dalin et al., 2008), l'estratègia semi-caducifòlia (Karban, 2007, 2008), o el contingut de nitrogen foliar (Chebli et al., 2020), que varia estacionalment en *C. albidus*, incrementant a l'hivern (Correia et al., 1992).

La resposta fisiològica de les plantes als principals estressos abiòtics als ecosistemes mediterranis en condicions naturals es basa en la protecció del sistema fotosintètic. En general, les plantes mediterrànies es serveixen de diferents mecanismes de fotoprotecció, com la vitamina E i els carotenoides, principalment les xantofil·les (Fernández-Marín et al., 2017; Pérez-Llorca et al., 2019b). També la inclinació de l'angle foliar és important (Oliveira i Peñuelas, 2000, 2002; Pérez-Llorca et al., 2019a), o la modificació de l'àrea foliar (Munné-Bosch et al., 2003). L'acumulació d'antioxidants enzimàtics i de proteïnes de xoc tèrmic (Brossa et al., 2015), o l'increment del contingut de nitrogen foliar (Oliveira i Peñuelas, 2004), igual que tots els mecanismes esmentats, serveixen per reforçar i protegir la maquinària fotosintètica que pateix danys davant dels estressos abiòtics més comuns, com són la sequera o l'excés de radiació solar, i la principal hormona que participa en la coordinació de la resposta als estressos abiòtics en condicions naturals mediterrànies és l'àcid abscísic (Brossa et al., 2015; Pérez-Llorca et al., 2019b).

La resposta a l'herbivorisme es basa en la síntesi de substàncies tòxiques i en barreres mecàniques. Per fer front a l'herbivorisme, les plantes dels ecosistemes mediterranis solen produir metabòlits secundaris de forma constitutiva i induïda. Sobretot compostos fenòlics, com per exemple els tanins, que presenten efectes inhibidors sobre els enzims digestius dels herbívors, o efectes insecticides (Bartolomé et al., 2019; Singh et al., 2021; Rodríguez-Romero et al., 2022). També és important la densitat de tricomes foliars com a barreres mecàniques sobretot per als insectes (Ogran et al., 2019), o la densitat, mida i gruix de les fulles, i les característiques de la cutícula (Massei et al., 2000). La producció d'alcaloides pot jugar un paper de defensa enfront l'herbivorisme tot i que també pot generar major impacte degut a l'habitució dels herbívors i a la naturalesa addictiva d'alguns tipus d'alcaloides (Adler et al., 2001; Wink, 2018; De-la-Cruz et al., 2020; Zhou et al., 2022).

La resposta model a l'herbivorisme es basa en la via de senyalització de jasmonats. L'herbivorisme indueix la producció d'oxilipines, l'OPDA com a precursor a nivell local, el JA com a intermediari de la senyal i la JA-Ile com a executor, ambdós a nivell local i també sistèmic, amb una dinàmica i cinètica diferent per a cada forma (Koo et al., 2009; Heitz et al., 2016; Heyer et al., 2018; Vega-Muñoz et al., 2020), tot i que la resposta varia segons el tipus d'herbivorisme (Rodríguez-Romero et al., 2022). En condicions naturals s'ha pogut demostrar que les aplicacions de MeJA incrementen l'expressió de gens relacionats amb la defensa a l'herbivorisme en nabius (Fonseca et al., 2019), que la simulació d'herbivorisme augmenta els nivells de JA i JA-Ile en pollanques tant en les fulles afectades com en les adjacents (Boeckler et al., 2013), i que les plantes mutants de tabac deficientes en jasmonats cultivades en condicions naturals, patien major dany per herbivorisme comparades amb les control, així com presentaven menors nivells de l'alcaloide principal, la nicotina (Machado et al., 2016).

La resposta sistèmica a l'herbivorisme en *C. albidus* sota condicions naturals podria implicar l'acumulació d'OPDA (Figura 9A). Al Capítol 3, on vam estudiar l'estacionalitat de l'herbivorisme en una població natural de *C. albidus* creixent a

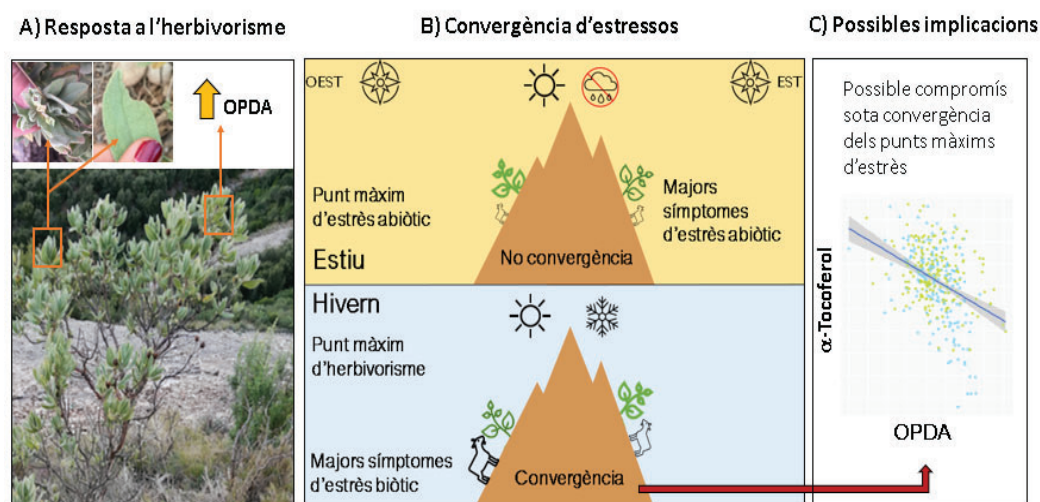


Figura 9. Relació entre l'estrès abiòtic i l'herbivorisme en arbustos mediterranis. A) La resposta a l'herbivorisme en *C. albidus* en condicions naturals sembla implicar l'acumulació d'OPDA. B) En condicions naturals hi pot haver convergència d'estressos però pot ser que els màxims punts d'estrès no coincideixin. C) La correlació negativa entre la vitamina E i l'OPDA suggereix que sota condicions de convergència d'estressos en els seus punts màxims hi podria haver un compromís entre la resposta a l'estrès abiòtic per part de l' α -tocoferol i la resposta a l'herbivorisme per part de l'OPDA.

elevada altitud, vam observar que, tot i estar afectats per l'orientació del microhàbitat de creixement (vessant est o oest de la muntanya), i per l'estacionalitat (**Figura 2 de l'Annex I**), els nivells d'OPDA augmentaven en resposta sistèmica a l'herbivorisme en les fulles no danyades ja que presentaven una correlació significativa amb l'herbivorisme, així com ho feien fortament les relacions OPDA/JA-Ile i JA/JA-Ile que indiquen major acumulació d'OPDA o JA en comparació amb JA-Ile (**Figura 3A i B de l'Annex I, Figura 9A**). Així doncs, aquests resultats podrien suggerir que l'acumulació del precursor dels jasmonats OPDA, i no de JA-Ile, podria formar part de la resposta sistèmica induïda per l'herbivorisme en les fulles no danyades de *C. albidus*, traduint-se en una reserva de precursors per a la ràpida formació de JA i JA-Ile (Glauser et al., 2009). Tot i així, aquest aspecte requereix futures investigacions.

La convergència d'estressos abiòtics amb l'herbivorisme en els arbustos mediterranis es dona però no en els màxims punts d'estrès (**Figura 9B**). Si bé és cert que en condicions naturals en els ecosistemes mediterranis és comú patir estressos abiòtics, i que la presència d'herbívoros és molt probable que es sumi a tal condició d'estrès, l'adaptació i coevolució de plantes i herbívors interaccionant amb l'escenari ambiental, pot permetre que no coincideixin en els punts màxims d'estrès com hem vist al **Capítol 3** a causa de l'estacionalitat i l'orientació solar del microhàbitat de creixement. Sigui d'acord amb la hipòtesi de l'estrès o la del vigor, que intenten explicar la selectivitat dels herbívors segons l'estrès o el vigor de les plantes de les quals s'alimenten (White, 1984; Price, 1991), els herbívors seleccionen les plantes que es mengen, i les plantes també presenten estratègies per a evitar ser constantment consumides, com per exemple la síntesi de substàncies tòxiques (Bartolomé et al., 2019; Singh et al., 2021; Rodríguez-Romero et al., 2022). Aquesta coevolució interacciona a més amb l'escenari ambiental, geogràfic i estacional on es dona, derivant així en la coincidència o no dels punts màxims d'estrès per a les plantes.

La relació antagònica entre la vitamina E i els jasmonats suggereix possibles implicacions fisiològiques en condicions de convergència dels punts màxims d'estrès abiòtic i herbivorisme (**Figura 9C**). Tot i no coincidir els punts màxims d'estrès al **Capítol 3**, les plantes pateixen d'estrès abiòtic a l'hivern, mentre estan essent

consumides pels herbívors. Així doncs, les plantes responen a la combinació d'estressos. En aquest context, la forta correlació negativa entre la vitamina E i els jasmonats (**Figura 1 de l'Annex I**), la possible implicació de l'acumulació d'OPDA com a part de la resposta sistèmica a l'herbivorisme, i la implicació de la vitamina E en la tolerància a estressos abiòtics, suggereixen que la relació antagònica entre elements del sistema de defensa a l'estrès abiòtic (α -tocoferol) i a l'herbivorisme (capacitat de síntesi de jasmonats: OPDA) podria contribuir a un possible compromís entre la defensa a l'estrès abiòtic i biòtic potser si els estressos fossin més extremats.

Adicionalment, l'edat no afecta a la susceptibilitat de patir herbivorisme en *C. albidus* sota condicions naturals. Al contrari de l'esperat, al **Capítol 3** es va observar que l'edat no exercia cap efecte sobre l'herbivorisme ni sobre gairebé cap dels paràmetres de resposta a l'estrès estudiats (**Taula 1 de l'Annex I, Figura 4 del Capítol 3**). En nombroses ocasions s'ha demostrat la influència de l'edat de la planta en la susceptibilitat i resposta a l'estrès tot i que els estudis en condicions naturals són escassos de moment. En *C. albidus* s'ha observat que l'edat influeix en termes reproductius a partir dels 8 anys (Müller et al., 2014). En concret, la reducció en la mida de les plantes és una estratègia per a evadir els efectes de l'envelliment en termes de viabilitat de les llavors. En *C. clusii*, en condicions semi-controlades, es va observar que la maduresa de les plantes afectava els nivells d'estrès oxidatiu i antioxidants de les fulles (Munné-Bosch i Lalueza, 2007). Al **Capítol 3**, on s'estudien plantes madures de diferents edats es suggereix que en *C. albidus* en condicions naturals, l'edat no afecta a la susceptibilitat a l'herbivorisme ni a la resposta a l'estrès a partir dels 5 anys d'edat.

En resum, l'estrès abiòtic i l'herbivorisme poden coincidir en els ecosistemes mediterranis però no sempre ho fan en el punt màxim d'estrès. En el cas d'estudi present, no coincideixen els màxims punts d'estrès degut a l'estacionalitat i a l'orientació solar del microhàbitat, i l'herbivorisme afecta només un 3% de les fulles en *C. albidus* en condicions naturals, un arbust que ja és molt tolerant als estressos abiòtics com la sequera. A més, es demostra que l'edat de la planta no comporta una major susceptibilitat de patir herbivorisme. La resposta de *C. albidus* a l'herbivorisme sota condicions naturals podria implicar una acumulació sistèmica de jasmonats

(OPDA) en les fulles no afectades per l'herbivorisme però aquest aspecte requereix futures investigacions. Amb tot, la relació antagònica entre la vitamina E i els jasmonats suggereix possibles implicacions fisiològiques en condicions de convergència dels punts màxims d'estrès abiòtic i herbivorisme si els estressos fossin més extremats però no en la situació estudiada.

5. Interaccions planta holoparàsita-hoste en ecosistemes mediterranis

Les plantes paràsites juguen un gran paper als ecosistemes mediterranis degut a la seva àmplia distribució. Són plantes que habiten en la majoria d'ecosistemes del planeta Terra, tant als naturals com als agronòmics (Westwood et al., 2010). El seu estil de vida parasitari ha evolucionat fins al punt de perdre la capacitat fotosintètica en al cas de les plantes holoparàsites (Nickrent, 2002). Als ecosistemes mediterranis, les espècies holoparàsites més abundants als camps de cultiu són dels gèneres *Orobanche* i *Phelipanche* mentre que als entorns naturals el gènere *Cytinus* és dels més coneguts i àmpliament distribuïts (**Figura 10**). Als ecosistemes agronòmics mediterranis les plantes holoparàsites causen pèrdues de fins al 90% de producció mentre que als ecosistemes naturals, a part de causar efectes negatius en termes de producció, també poden tenir un impacte positiu a llarg termini com es descriu en l'**Annex II**.

Les plantes holoparàsites causen efectes negatius sobre la comunitat vegetal als ecosistemes mediterranis naturals (es recullen en l'**Annex II**). La conseqüència directa més evident de l'estil de vida parasitari és la reducció de la supervivència de la planta hoste. En la majoria dels casos la reducció de la biomassa i l'impacte sobre la fisiologia de l'hoste en són els motius principals (Press i Phoenix, 2005). Els impactes negatius a nivell ecosistèmic depenen en gran part del rang d'hostes del paràsit i de la selecció d'aquests hostes. En el cas de *C. hypocistis*, es tracta d'una espècie generalista, perquè pot parasitar diferents espècies de la família Cistaceae, però és especialista a nivell local. Selecciona un petit conjunt d'espècies hoste d'entre un gran nombre d'espècies a les quals pot parasitar, independentment de l'abundància (Thorogood i Hiscock, 2007). De fet, coincidint amb aquesta especialització, s'han identificat cinc

races genètiques diferents en *C. hypocistis* segons l'espècie a la qual parasita (de Vega et al., 2008). A més, el dany causat per part de la planta paràsita pot variar en funció de l'espècie d'hoste i de les condicions ambientals i disponibilitat de recursos.

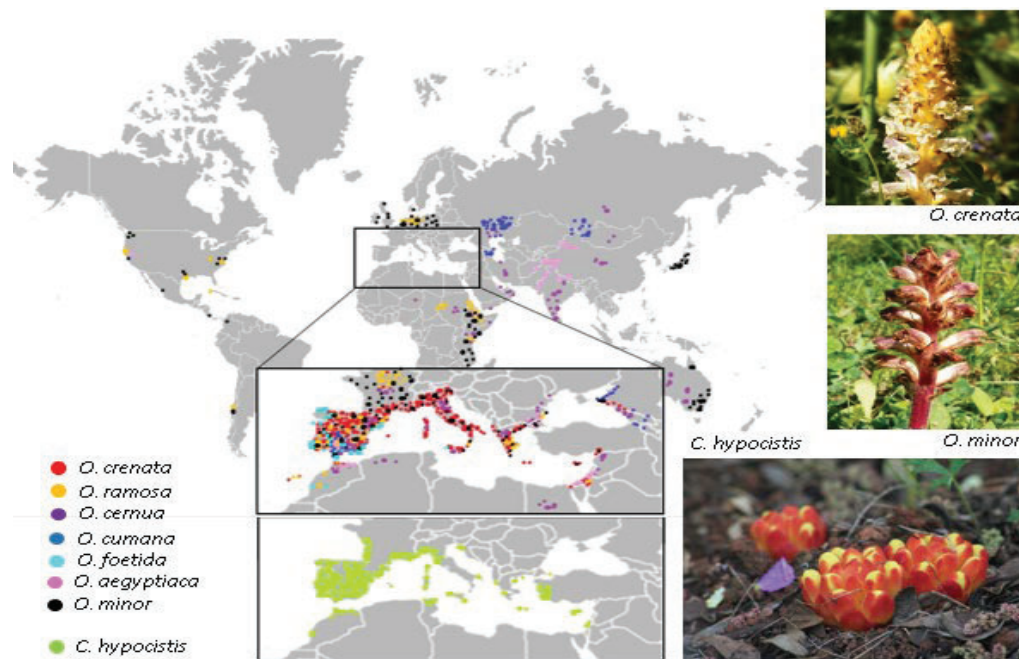


Figura 10. Distribució de les principals espècies de plantes holoparàsites en ecosistemes mediterranis.

Les plantes holoparàsites poden afectar positivament els ecosistemes naturals mediterranis (es recull en l'**Annex II**). Resulta comprensible que les plantes holoparàsites puguin incrementar la diversitat vegetal als ecosistemes mediterranis mitjançant el parasitisme sobre espècies competitivament dominants i promovent d'aquesta manera l'abundància de les espècies subordinades. De la mateixa manera, també podria reduir-la si es parasita a les espècies subordinades (Press i Phoenix, 2005; Těšitel et al., 2021). En aquest sentit, tal i com s'ha demostrat en plantes hemiparàsites en ecosistemes mediterranis, també podrien afectar la zonació vegetal (Bardgett et al., 2006; Griebel et al., 2017; Mellado i Zamora, 2017). Les plantes paràsites poden influir en la disponibilitat de nitrogen i el cicle de nutrients degut a l'alteració de la qualitat i quantitat de recursos del sòl, principalment en conseqüència a la notable riquesa de nutrients que presenten els teixits de les plantes paràsites que retornen al sòl. Tot i així, resten molts aspectes per a clarificar a nivell d'ecosistema (Quested, 2008; Těšitel et al., 2021).

Les plantes holoparàsites també interaccionen amb altres nivells tròfics influint així en l'ecosistema. Per exemple, *C. hypocistis* es troba associat amb el seu hoste i amb fongs micorrízics alhora (de Vega et al., 2010). A part de l'afectació del paràsit en les relacions biòtiques de l'hoste (herbívors, pol·linitzadors o fongs micorrízics), també la seva pròpia interacció amb els pol·linitzadors com insectes o mamífers (de Vega et al., 2009) pot afectar altres espècies de l'ecosistema. A més, recentment s'ha demostrat en *Cuscuta australis*, holoparàsita però de tija, que les plantes que parasiten diversos hostes alhora, poden transmetre senyals sistèmics d'un hoste a l'altre, incloent senyals sistèmics d'alarma enfront als herbívors o a l'estrès salí generant un efecte de *priming*, que en el cas de l'herbivorisme és dependent de la via de senyalització dels jasmonats (Hettenhausen et al., 2017; Li et al., 2020). També s'ha demostrat que les plantes paràsites tenen la capacitat de frenar la colonització de les plantes invasores debilitant la seva supervivència (Těšitel et al., 2021).

El flux de substàncies entre planta holoparàsita i hoste és la base de les seves interaccions. Les plantes paràsites poden adquirir els recursos tant del xilema (aigua i nutrients) com del floema (foto-assimilats) de l'hoste. En general, es produeix mitjançant un flux en massa (Těšitel et al., 2010; Okubamichael et al., 2011; Lo Gullo et al., 2012), tot i que no sempre és així. En *Cytinus* per exemple, no es produeix un flux massiu sinó que l'adquisició de substàncies és reduïda i es duu a terme a partir de les cèl·lules parenquimàtiques de la planta paràsita contigües als vasos de l'hoste (Thalouarn et al., 1986; de Vega et al., 2007). En el sistema *Cistus-Cytinus*, les substàncies majoritàriament transferides de l'hoste al paràsit són la sacarosa, el glutamat i l'aspartat (Thalouarn et al., 1986). Les proteïnes també són translocades de l'hoste a les plantes holoparàsites (Aly et al., 2011). A més, el flux d'altres substàncies com fitohormones, tals com l'auxina o les citocinines, resulta clau per al correcte desenvolupament de les plantes paràsites (Ishida et al., 2016; Goyet et al., 2017; Wakatake et al., 2020). Fins i tot s'ha demostrat la transferència de micro-ARNs que interfereixen amb l'ARNm de l'hoste per a silenciar gens relacionats amb la senyalització hormonal, el desenvolupament, el funcionament del floema o la defensa de l'hoste. Addicionalment, el flux d'ARNm s'ha evidenciat també en sentit contrari i

sembla derivar en la traducció de proteïnes en la planta paràsit (Clarke et al., 2019; Park et al., 2022).

Les interaccions planta holoparàsit-hoste poden ser compatibles o incompatibles. La compatibilitat implica l'èxit en l'establiment de la connexió vascular entre la planta paràsit i l'hoste i s'associa a una manca de resposta defensiva, mentre que la incompatibilitat s'entén com a resistència de la planta hoste, evitant la invasió del paràsit. Tot i així, el resultat de la interacció no sembla ser una qüestió dicotòmica sinó més aviat una suma de diversos factors, que potser depenen dels llindars entre els diferents mecanismes de defensa de la planta hoste (Kaiser et al., 2015; Saucet i Shirasu, 2016). De moment, s'ha descrit que la resposta de defensa de l'hoste a les plantes paràsits mostra similituds amb la resposta als herbívors i als patògens, principalment en quant a l'acumulació de JA i d'àcid salicílic (Dos Santos et al., 2003; Letousey et al., 2007; Torres-Vera et al., 2016), la resposta de tipus hipersensible (Runyon et al., 2010), l'alliberament de compostos volàtils o la densitat de tricomes (Gutjahr and Paszkowski, 2009). Tot i així encara resten molts aspectes per a determinar.

En resum, les plantes paràsits juguen un paper molt important als ecosistemes mediterranis degut a la seva àmplia distribució i són plantes que habiten en la majoria d'ecosistemes del planeta Terra, tant als naturals com als agronòmics. Les plantes holoparàsits causen efectes negatius però també poden afectar positivament la comunitat vegetal als ecosistemes mediterranis naturals. A més, també interaccionen amb altres nivells tròfics influint així en l'ecosistema. El flux de substàncies entre planta holoparàsit i hoste és la base de les seves interaccions i el diàleg planta holoparàsit-hoste pot resultar en una relació compatible o incompatible.

6. Establiment del parasitisme: efectes locals

Els sistemes paràsit-hoste són dinàmics i els resultats de la co-adaptació no sempre són contraris al mutualisme. Els paràsits viuen a expenses dels seus hostes i, per tant, les relacions duradores afavoreixen la longevitat del paràsit. En conseqüència, la selecció natural afavoriria a aquells paràsits que fossin menys agressius ja que la relació amb el seu hoste seria més longeva. Existeixen alguns

exemples on la relació entre paràsits i hostes s'assembla més al mutualisme que al parasitisme (Gómez 1994; Jarosz i Davelos, 1995; de Vega, 2007). En el cas de les plantes holoparàsites, les perennes, més que les anuals, són les que mantenen relacions duradores amb els seus hostes, com és el cas de *C. hypocistis*. A més, s'ha vist al **Capítol 4** que de forma general el parasitisme no només no causava efectes fisiològics negatius a curt termini sobre l'hoste, sinó que a la primavera s'observaven fins i tot mecanismes de compensació (augment en el contingut de clorofil·les). A més, és una planta que mostra una forta especialització segons l'espècie hoste i que manté poc flux de substàncies amb l'individu parasitat (Thalouarn et al., 1986; de Vega et al., 2008).

Les plantes paràsites estableixen diferents tipus de contacte amb els vasos conductors del seu hoste. En general les plantes paràsites formen connexions entre els seus vasos conductors i els de l'hoste (generalment les hemiparàsites només amb el xilema i les holoparàsites també amb el floema) a través de l'haustori per poder adquirir tots els recursos necessaris per a la seva supervivència (Irving i Cameron, 2009). Aquesta connexió permet el moviment de substàncies tant per la via apoplàstica com simplàstica (LeBlanc et al., 2012; Mitsumasu et al., 2015; Kurotani et al., 2020; Fischer et al., 2021). Els sistemes endofítics de les plantes holoparàsites es poden desenvolupar en diferents zones entre els vasos conductors i el càmbium vascular. En el cas de *C. hypocistis*, el sistema endofític és complex. Presenta xilema i floema completament diferenciats i la connexió amb els vasos de l'hoste no és directa sinó que es basa en cèl·lules parenquimàtiques especialitzades que podrien actuar com a cèl·lules de transferència formant un continu apoplàstic entre les cèl·lules del paràsit i les de l'hoste (de Vega et al., 2007).

El flux de molècules especialitzades és bàsic per a l'establiment de la relació entre la planta paràsit i l'hoste (**Figura 11**). Inicialment, les estrigolactones secretades per l'arrel del potencial hoste són clau per a la germinació de la majoria de plantes holoparàsites. Llavors, la inducció de la formació de l'haustori es basa normalment en la percepció de metabòlits secundaris coneguts com a factors inductors d'haustori com per exemple flavonoides i quinones (Saucet i Shirasu, 2016). En aquest moment la planta paràsit secreta molècules efectores per a l'establiment definitiu, que es

donarà si l'hoste no genera una resposta de defensa i rebuig. La producció i translocació d'auxines i citocinines és vital pel correcte creixement i desenvolupament de l'haustori (Wakatake et al., 2020). Les citocinines a més també estan relacionades amb l'agressivitat de la planta paràsita (Goyet et al., 2017). A més, també l'intercanvi de RNA sembla exercir un paper important en la (in)compatibilitat de la relació entre la planta paràsita i l'hoste (Clarke et al 2019). En el sistema *Cistus-Cytinus* però, de moment no hi ha informació sobre el flux de molècules especialitzades en les etapes inicials de l'establiment de la relació.

Les citocinines juguen un paper important en el funcionament del sistema planta paràsita-hoste. Són essencials per al desenvolupament i les relacions font-embornal de les plantes (Roitsch i Ehneß, 2000; Werner et al., 2001; Schaller et al., 2015). Existeixen dos tipus de citocinines, les de tipus iP, que contenen una cadena lateral isopentenil N^6 , i les de tipus *t*-Z, que contenen aquesta cadena lateral isopentenil

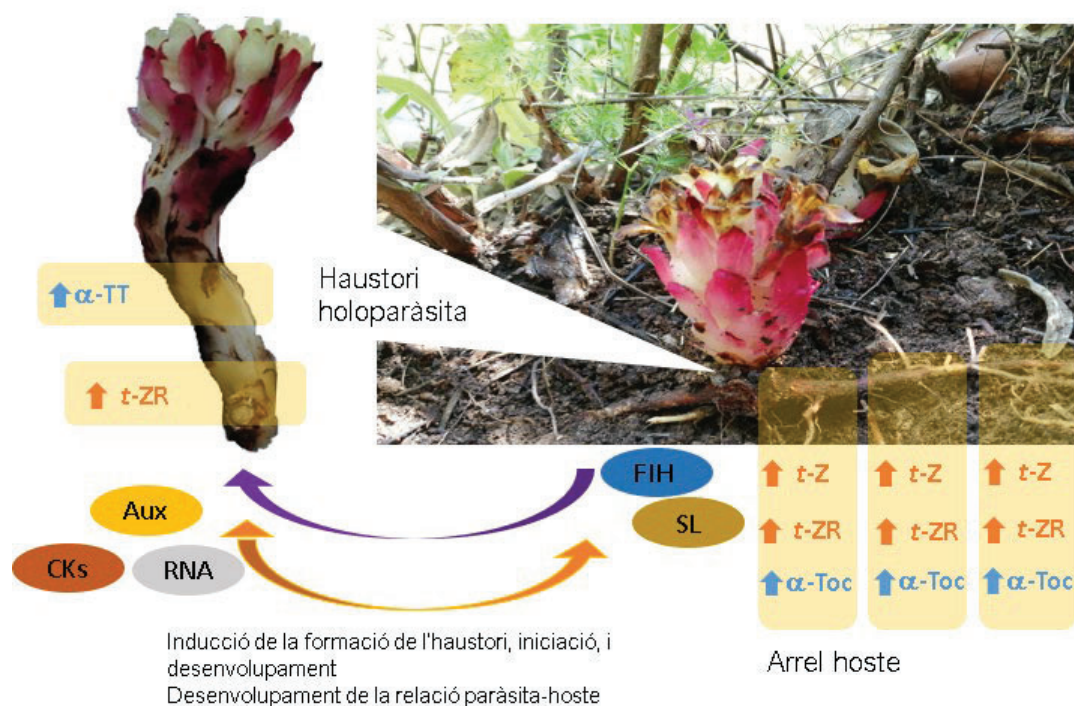


Figura 11. Establiment de mutualismes: efectes locals. Esquema del sistema planta holoparàsita-hoste i les seves interaccions a nivell local. En requadres grocs es mostren els resultats obtinguts al **Capítol 4** en analitzar les etapes tardanes de la relació *Cistus-Cytinus* i en canvi dins dels el·lipses es mostren interaccions en els estadis inicials que han estat descrites en altres estudis. α -Toc: α -tocoferol, α -TT: α -tocotrienol, Aux: auxines, CKs: citocinines, FIH: factors inductors d'haustori, RNA: ARN, SL: estrigolactones, *t*-Z: *trans*-zeatina, *t*-ZR: ribòsid de *trans*-zeatina.

hidroxilada. El transport de citocinines de tipus iP es dona pel floema, dels teixits fotosintètics cap a les arrels de les plantes, mentre que les del tipus *t-Z* es transporten en sentit contrari pel xilema (Kieber i Schaller, 2018). En les relacions planta holoparàsita-hoste, les citocinines del tipus *t-Z* causen la hipertròfia de l'arrel de l'hoste en el lloc d'unió amb l'haustori. A més, els efectes que causen en el creixement de l'hoste suggereixen la seva forta influència als balanços font-embornal de l'hoste durant el parasitisme (Furuhashi et al., 2014; Spallek et al., 2017, 2018). En aquests estudis l'increment de citocinines de tipus *t-Z* es produeix tant en l'hoste com en el paràsit a nivell local.

Al estudiar un sistema de parasitisme en etapes més tardanes, l'augment tant de *t*-zeatina com del seu ribòsid (el seu precursor) a l'arrel dels individus de *C. albidus* parasitats per *C. hypocistis* que es va demostrar al **Capítol 4**, així com l'augment diferencial del ribòsid en la part de basal de l'haustori de *C. hypocistis* (**Figura 11**), avalen la seva implicació en aspectes més enllà de l'establiment de la relació, possiblement en les relacions font-embornal del sistema sencer ja que les dues formes exerceixen funcions senyalitzadores (Keshishian et al., 2015; Osugi et al., 2017). A més, el gradient en l'acumulació de 2-isopentenil adenina, una citocinina activa del tipus iP, des d'elevats nivells en l'haustori de la planta paràsita fins a molt baixos nivells en la fulla de l'hoste, passant per nivells mitjans en l'arrel, juntament amb el gradient contrari per al seu precursor, l'isopentenil adenosina, suggereixen el clàssic transport de citocinines de tipus iP que es dona en les plantes des de les parts vegetatives fins a les arrels pel floema, i així reforcen la idea que les citocinines juguen un paper en les relacions font-embornal del sistema planta holoparàsita-hoste.

El paper de la vitamina E a nivell local en la interacció planta holoparàsita-hoste podria estar relacionat amb la seva característica funció antioxidant. D'una banda, la funció antioxidant enfront la peroxidació lipídica que la vitamina E exerceix en els teixits no fotosintètics que conformen la zona d'interacció entre la planta holoparàsita i l'hoste (haustori i arrel) observada al **Capítol 4**, sembla ésser raonable donat que en aquesta zona s'ha determinat en altres espècies, del gènere *Orobancha* i *Cuscuta*, que les ROS i la peroxidació lipídica juguen un paper important en el reconeixement de l'hoste per part del paràsit i l'establiment, i en la resistència al paràsit per part de

l'hoste (Keyes et al., 2007; Abbes et al., 2020; Shabbaj et al., 2021). D'aquesta manera, la vitamina E formaria part del sistema antioxidant que actua al voltant de la interacció planta holoparàsita-hoste.

En resum, els resultats indiquen que a nivell local les citocinines i la vitamina E juguen un paper important en el sistema *C. albidus*-*C. hypocistis* en condicions naturals. Els sistemes paràsit-hoste són dinàmics i els resultat de la co-adaptació no sempre són estrictament contraris al mutualisme. Les plantes paràsites estableixen diferents tipus de contacte amb els vasos conductors del seu hoste per tal de dur a terme l'adquisició de recursos i el flux de molècules especialitzades, que és bàsic per a l'establiment de la relació entre la planta paràsita i l'hoste. A nivell local, en el sistema *C. albidus*-*C. hypocistis* el paper de les citocinines podria estar relacionat amb les relacions font-embornal del sistema, i la vitamina E formaria part principalment del sistema antioxidant amb la seva acció de reduir la peroxidació lipídica.

7. Tolerància al parasitisme: efectes sistèmics

L'establiment i consolidació de la relació entre les plantes paràsites i els seus hostes va més enllà del focus de contacte. Aquesta relació, en el cas de les holoparàsites perennes que estableixen relacions duradores amb el seu hoste, és exitosa si la planta hoste és tolerant al parasitisme. La tolerància al parasitisme s'entén com la capacitat de la planta hoste per a conviure amb el paràsit reduint les conseqüències d'aquest sobre la seva supervivència (Strauss i Agrawal, 1999; Koskela et al., 2002). Aquesta convivència requereix la resposta de la planta hoste per tal de coordinar els mecanismes d'aclimatació que li permetran sobreviure a l'atac com per exemple la compensació de les afectacions en l'activitat fotosintètica, l'alteració del desenvolupament per a la inversió de recursos en la reproducció en comptes del creixement, i la resposta hormonal, especialment per part dels jasmonats tot i que encara resten molts aspectes a determinar d'aquesta resposta (Gutjahr i Paszkowski, 2009; Pagán i García-Arenal, 2018). A més, la tolerància a l'holoparasitisme presenta variació genètica i està sotmesa a la selecció natural i als compromisos amb el cost per a l'èxit reproductor de la planta (Koskela et al., 2002; Pagán i García-Arenal, 2018).

Els efectes sistèmics de la relació planta holoparàsita-hoste estan relacionats amb el procés bàsic de la vida vegetal, la fotosíntesi (**Figura 12**). Les plantes holoparàsites, al ser un embornal extra de foto-assimilats de l'hoste, generalment generen una estimulació de la fotosíntesi en l'hoste justificada per les interaccions font-embornal (Watling i Press, 2001) tal i com s'observa al **Capítol 4** a la primavera, quan els individus de *C. albidus* parasitats per *C. hypocistis* mostren major contingut de clorofil·les que els no parasitats. Tot i així, aquest mecanisme de compensació pot estar limitat pel nombre i mida de les plantes paràsites i pot variar amb l'espècie. De la mateixa manera, també poden estimular l'absorció d'aigua per part de les fulles i la tija de l'hoste (Clayson et al., 2014), fet que explicaria la major hidratació foliar observada al **Capítol 4** en els individus infectats durant la primavera. A més, l'associació tri-tròfica que s'estableix entre *Cistus*-fongs micorrízics-*Cytinus* (de Vega et al., 2010) podria influir en aquest balanç hídric del sistema. Tot i així, s'hauria d'estudiar en major profunditat.

El parasitisme també pot provocar efectes positius més enllà de l'hoste com a individu (**Figura 12**). A nivell de comunitat ecosistèmica les plantes paràsites contribueixen a les interaccions tròfiques amb altres elements biòtics de l'ecosistema com herbívors, pol·linitzadors, fongs micorrízics, o plantes invasores (de Vega et al., 2009, 2010; Těšitel et al., 2021), tal i com hem vist en l'apartat 5 d'aquesta discussió. A més, conformen una xarxa inter-específica de comunicació ja que quan parasiten més d'un hoste alhora són capaces de transmetre senyals sistèmiques d'alarma enfront a estressos entre els seus hostes, un aspecte que s'ha demostrat en holoparàsites de tija però no d'arrel (Hettenhausen et al., 2017; Li et al., 2020). També hem vist en l'apartat esmentat que poden influir en la qualitat del sòl (Quested, 2008; Těšitel et al., 2021). Amb tot, les plantes paràsites modelen l'estructura i diversitat de les comunitats vegetals dels ecosistemes mediterranis (Press i Phoenix, 2005; Bardgett et al., 2006; Griebel et al., 2017; Mellado i Zamora, 2017). Tenint en compte la vessant positiva dels efectes de les plantes paràsites, pren sentit l'avantatge que podria suposar per a les plantes hoste ésser tolerants al parasitisme en determinades situacions.

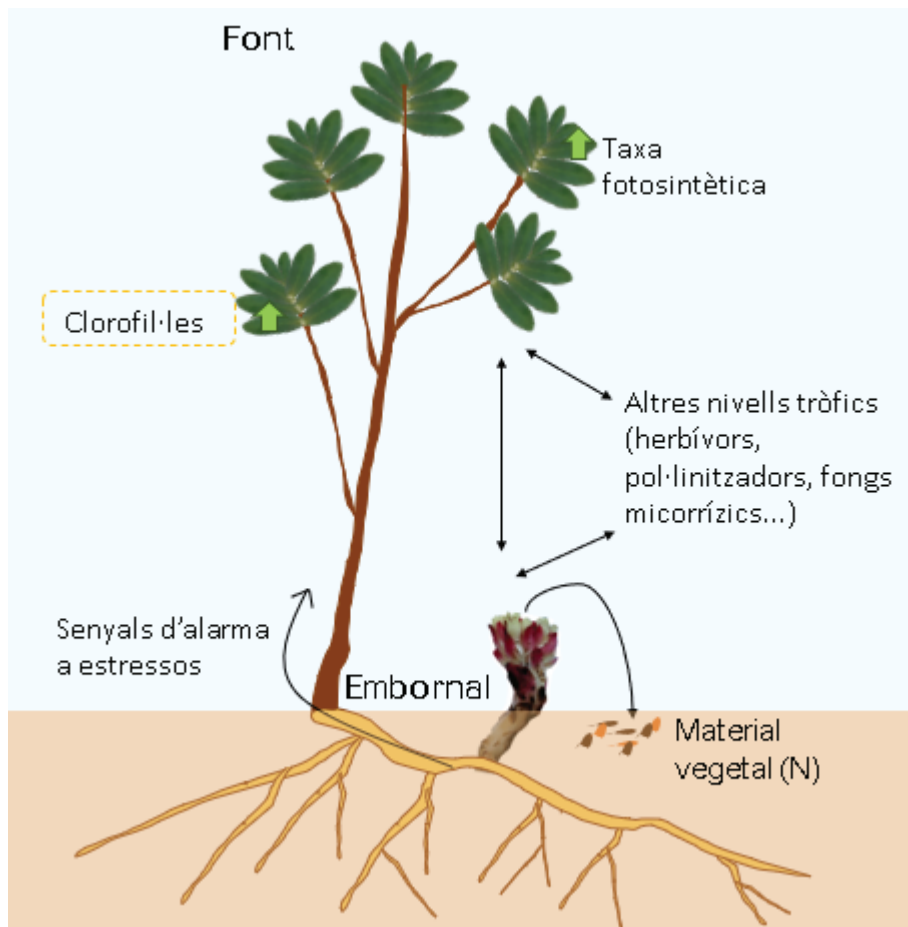


Figura 12. Tolerància al parasitisme: efectes sistèmics. Esquema simplificat del sistema *Cistus-Cytinus* per exemplificar els efectes sistèmics descrits en les interaccions entre les plantes paràsites i els seus hosts en general. El requadre taronja amb línia discontinua indica els efectes positius que s'han observat al **Capítol 4**.

La tolerància a les plantes paràsites s'ha estudiat de moment en un nombre reduït de sistemes. Els estudis existents inclouen els sistemes *Urtica dioica-Cuscuta europaea* (holoparàsita de tija, Koskela et al., 2002), *Echinopsis chilensis-Tristerix aphyllus* (holoparàsita de tija, Medel, 2001), i *Hordeum vulgare-Rhynanthus minor* i *R. angustifolius* (hemiparàsites d'arrel, Rowntree et al., 2011). En aquests estudis s'observa la tolerància al parasitisme a partir de compensacions en el nombre de ramificacions o en la inversió en la biomassa reproductiva i la producció de llavors. En estudis de tolerància als patògens es fan servir també altres marcadors com per exemple el contingut de clorofil·les o els símptomes de la infecció (Pagán i García-Arenal, 2018). En el sistema *C. albidus-C. hypocistis* (holoparàsita d'arrel), la tolerància al parasitisme s'ha observat al **Capítol 4**, on en condicions naturals sense

combinació d'estressos (primavera), en general les plantes no presenten afectacions fisiològiques degudes al parasitisme i fins i tot s'observen mecanismes de compensació. Tot i que encara no es coneix la resposta molecular d'aquesta tolerància, la implicació dels jasmonats en la resistència és clara. En aquest estudi, la tolerància podria estar coordinada pels jasmonats, en concret l'OPDA (**Figura 3 del Capítol 4**).

En resum, *C. albidus* és capaç de tolerar el parasitisme per part de *C. hypocistis* en condicions naturals durant la primavera (i l'estiu). L'establiment i consolidació de la relació entre les plantes paràsites i els seus hostes va més enllà del focus de contacte. A nivell sistèmic els arbustos parasitats no presenten símptomes d'afectació fisiològica a curt termini i fins i tot mostren mecanismes de compensació. Els efectes sistèmics del parasitisme estan relacionats amb l'estimulació de la fotosíntesi i el parasitisme també pot provocar efectes positius més enllà de l'hoste com a individu. A diferència de la resposta molecular de resistència a les plantes paràsites, que està essent caracteritzada i es basa en la resposta hormonal de l'àcid salicílic i el JA, en els casos on s'ha estudiat la tolerància encara no s'ha pogut determinar la resposta molecular i per tant no se sap com és aquesta resposta molecular i hormonal de tolerància en les relacions duradores entre plantes holoparàsites i els seus hostes. Tot i així, és possible que l'OPDA jugui un paper important en aquesta resposta de tolerància.

8. Efecte de la combinació d'estressos

Les plantes sotmeses a combinació d'estressos abiòtics i parasitisme en condicions naturals poden manifestar tolerància creuada o compromís entre les respostes de defensa (**Figura 13**). Tal i com s'ha esmentat en l'apartat 3, ens referim a tolerància creuada quan les plantes sotmeses a diversos tipus d'estressos simultanis poden tolerar-los alhora mitjançant una resposta combinada. Contràriament, ens referim a compromís quan la defensa a un tipus d'estrès és en detriment de l'altra. En aquest sentit, al **Capítol 4** on individus de *C. albidus* creixent en condicions naturals es veuen sotmesos a estrès abiòtic i parasitisme simultàniament a l'estiu, observem el fenomen de tolerància creuada de forma general. Tot i així, l'efecte del microclima i de la

població posa de manifest una tolerància creuada més accentuada en la població 2 (creixent entre 340-530 m.s.n.m), on el fet de patir parasitisme resulta en una major tolerància a l'estrès abiòtic (major hidratació foliar), resultats que estan d'acord amb altres exemples de tolerància creuada entre estressos biòtics, com el parasitisme, i estressos abiòtics com la sequera (Evans i Borowicz, 2015; Foyer et al., 2016). En la població 3, en canvi, observem el contrari.

La combinació d'estressos impulsa la resposta de tolerància creuada. La tolerància creuada al parasitisme i a l'estrès abiòtic en relacions planta holoparàsita-hoste ben establertes es fa evident sota condicions de convergència d'estressos. Com s'ha comentat en l'apartat anterior, la tolerància al parasitisme té sentit en les relacions planta paràsita-hoste ben establertes, duradores. Malauradament, no s'ha pogut estudiar la convergència d'estressos fins a dia d'avui. Al **Capítol 4** observem una sòlida resposta hormonal al parasitisme a l'estiu, sota convergència d'estressos. Això indica que a l'estiu, mentre el paràsit encara viu en la seva forma més extensa (sistema endofític + inflorescències) i fenològicament es troba en el moment de

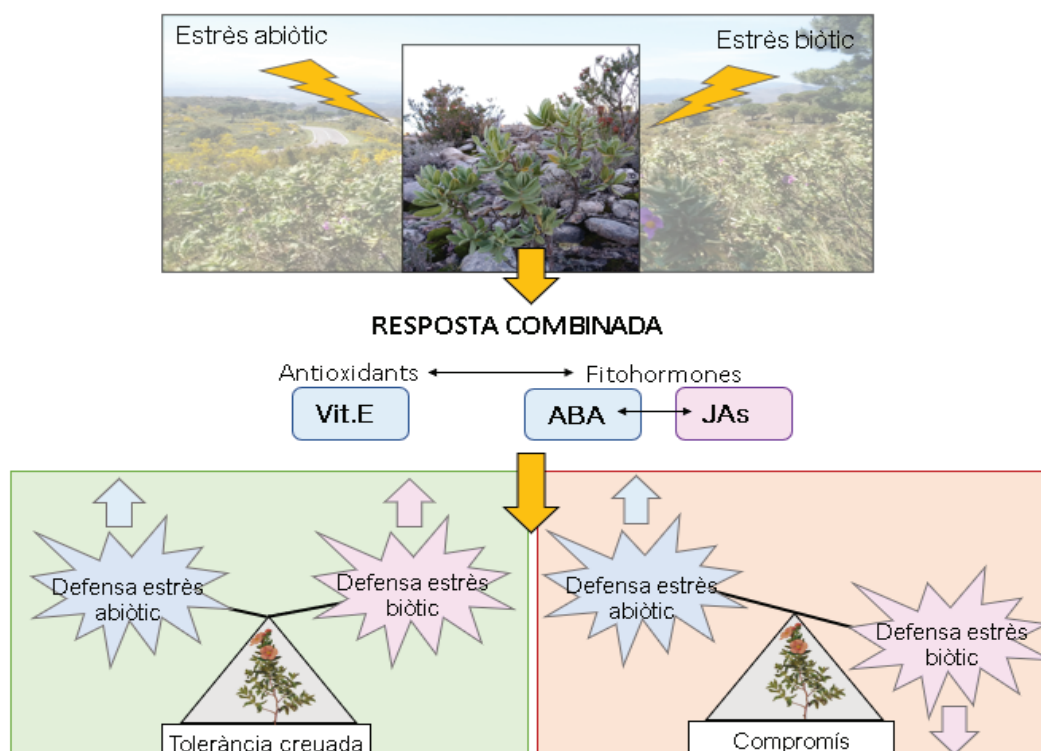


Figura 13. Efecte de la combinació d'estressos. Esquema del model proposat per a la resposta observada en la present tesi en *C. albidus* sota condicions naturals de convergència d'estressos (abiòtic i parasitisme). ABA: àcid abscísic, JAs: jasmonats, Vit.E: vitamina E.

fructificació i maduració de llavors, i els hostes estan patint estrès abiòtic causat per sequera, alta irradiació i temperatures elevades, el parasitisme suposa un estrès afegit per a l'hoste, que és capaç o no de tolerar i compensar els seus efectes.

La resposta a la combinació d'estrès abiòtic i parasitisme que dona lloc a la tolerància creuada implica l'acumulació de JA-Ile a nivell sistèmic. Ho veiem al **Capítol 4 (Figura 3)**. Tot i que fins ara es coneix la implicació del JA en la resposta a les plantes paràsites, no s'ha descrit el rol de la JA-Ile específicament. Tenint en compte les similituds entre la resposta al parasitisme i a l'herbivorisme esmentades en l'apartat 5, podríem suposar que l'augment de JA-Ile observat representa l'activació de la via clàssica de senyalització dels jasmonats enfront el parasitisme, que culminaria en la senyalització al nucli cel·lular per part de la JA-Ile per a una adequada aclimatació a l'estrès. Aquesta resposta per part dels jasmonats podria estar mitjançant accions de defensa a les infeccions per plantes paràsites com per exemple la producció de metabòlits secundaris (Smith et al., 2009) o l'acumulació de tilosa per a obstruir els vasos conductors de contacte (Calvin, 1997; de Vega et al., 2007; Leśniewska et al., 2017).

La tolerància creuada podria estar coordinada per la interacció entre l'àcid abscísic i els jasmonats. La implicació de la interacció entre aquestes hormones en el fenomen de tolerància creuada ja ha estat descrita anteriorment (Ramegowda i Senthil-Kumar, 2015; Nejat i Mantri, 2017; Zagorchev et al., 2021). En aquest context, l'àcid abscísic podria influir en els fluxos hídrics de tot el sistema planta holoparàsita-hoste (Jiang et al., 2004, 2010) i els jasmonats en la producció de defenses contra l'estrès biòtic. A més, els jasmonats també guarden relació amb la tolerància a l'estrès abiòtic, principalment la sequera, com en el cas de *C. albidus* (Brossa et al., 2015), i l'àcid abscísic també està relacionat amb la defensa al parasitisme (Torres-Vera et al., 2016). D'acord amb aquests estudis, al **Capítol 4**, on els individus parasitats manifesten tolerància creuada s'observa un augment significatiu d'àcid abscísic (**Figura 3 del Capítol 4**), a més de l'esmentat augment de JA-Ile a l'estiu. Amb tot, la interacció entre l'àcid abscísic i la JA-Ile podria estar coordinant la resposta combinada al parasitisme i a l'estrès abiòtic resultant en tolerància creuada.

La implicació de la interacció dels jasmonats i l'àcid abscísic en la tolerància creuada s'observa especialment sota condicions d'estrès hídric. Al **Capítol 4** es va estudiar com els efectes geogràfics (del microclima i de la població) modulaven la resposta hormonal i l'estat fisiològic de *C. albidus* en condicions naturals sota combinació d'estressos. La població 2, que es veu sotmesa a estrès abiòtic a l'estiu igual que les altres dues poblacions, creix en condicions especialment seques. És la població que pateix major grau d'estrès hídric a l'estiu, i és en la que s'observa l'augment d'àcid abscísic (**Figures 5 i 7 del Capítol 4**), en acord amb el seu paper central en resposta a aquest estrès (Takahashi et al., 2020), observat també a nivell general (**Figura 3 del Capítol 4**). També s'hi observa l'augment de JA-Ile. A més a més, en aquesta població, el fenomen de tolerància creuada s'expressa fins al punt que les plantes sotmeses al parasitisme es mostren lleugerament més tolerants a l'estrès hídric que les no parasitades. Així doncs, es reforça el paper modulador de l'àcid abscísic sobre els fluxos hídrics de tot el sistema planta holoparàsita-hoste (Jiang et al., 2004, 2010) en interacció amb els jasmonats per a coordinar la tolerància creuada sota situacions de combinació d'estrès hídric i parasitisme.

La vitamina E també participa en la resposta combinada a l'estrès abiòtic i biòtic. Al **Capítol 4** veiem que sota combinació d'estressos, els arbustos presenten un augment en els nivells de vitamina E a nivell sistèmic. Participant d'aquesta manera a la limitació de la peroxidació lipídica de les membranes, típica de les situacions d'estrès, funció primordial de la vitamina E (**Figura 4 del Capítol 4**). S'ha descrit que la via de senyalització de jasmonats pot activar la síntesi de vitamina E en situacions d'estrès biòtic simulat (Sandorf i Höllander-Czytko, 2002). La inducció per part de l'àcid abscísic també ha estat demostrada (Ghassemian et al., 2008). Així doncs, en el cas d'estudi que ens atén, la síntesi de vitamina E per a la reducció de la peroxidació lipídica en resposta a la combinació d'estrès abiòtic i biòtic podria estar coordinada per la interacció amb les fitohormones que participen de la resposta a la combinació d'estressos, l'àcid abscísic i els jasmonats.

En situacions concretes també es pot donar un compromís entre les defenses a l'estrès abiòtic i biòtic. En la població 3 del **Capítol 4**, que és la que es troba a major altitud (792-911 m.s.n.m), observem un possible compromís entre la tolerància a

l'estrès abiòtic i el parasitisme a l'estiu degut a l'altitud. Les plantes sotmeses a parasitisme i a estrès abiòtic simultàniament no expressen aquesta resposta de tolerància que s'observa en les altres dues poblacions que creixen a menor altitud, i presenten un estat fisiològic pitjor que les plantes no parasitades (afectacions en l'eficiència màxima del fotosistema II i augment dels nivells de vitamina E: **Figures 5 i 6 del Capítol 4**). Tal i com succeeix en altres casos en situacions de convergència d'estressos en condicions naturals (Ramegowda i Senthil-Kumar, 2015; Teshome et al., 2020), el fet de patir estrès abiòtic i generar tolerància a aquest, pot provocar un augment en la susceptibilitat de patir estrès biòtic ja que en limita la potencial tolerància. Aquest possible compromís podria ser degut a l'altitud ja que imposaria major grau d'estrès abiòtic a causa de, per exemple, l'excés de llum i la major amplitud tèrmica a l'estiu (13°C en comparació a 8-11°C en les altres dues poblacions).

L'absència en l'acumulació de JA-Ile resulta en una lleugera major susceptibilitat al parasitisme. A la població 3 del **Capítol 4** veiem que, a diferència de les altres dues poblacions que mostren tolerància, els individus parasitats no mostren un augment de JA-Ile i presenten pitjor estat fisiològic que els no parasitats a l'estiu. Hi ha alguns exemples on l'estrès abiòtic incrementa la susceptibilitat al parasitisme (Demirbas et al., 2013; Flake i Weisberg, 2019). Tot i que manca el mecanisme hormonal, hem vist en els paràgrafs anteriors que l'acumulació de JA-Ile està implicada en la tolerància creuada de *C. albidus* al parasitisme de *C. hypocistis* en combinació amb estrès abiòtic. Les causes d'aquesta absència en l'acumulació de JA-Ile en els individus parasitats no es fan evidents en aquest estudi exceptuant la relació negativa que existeix en aquesta espècie entre la vitamina E (que augmenta molt significativament en els individus esmentats) i la capacitat de síntesi dels jasmonats, l'OPDA (**Figura suplementaria 17 del Capítol 4**), que podria donar explicació a una part d'aquesta absència d'acumulació. Amb tot, s'enforteix la idea que la JA-Ile coordina la tolerància al parasitisme per part de plantes holoparàsites en condicions naturals de combinació d'estressos, almenys en el cas de *C. albidus*.

En resum, les plantes de *C. albidus* sotmeses a combinació d'estressos abiòtics i parasitisme en condicions naturals manifesten tolerància creuada però en certes situacions poden manifestar compromís entre les respostes de defensa. La

combinació d'estressos impulsa la resposta de tolerància creuada en relacions planta holoparàsita-hoste ben establertes com la de *C. albidus*-*C. hypocistis*. La resposta a la combinació d'estrès abiòtic i parasitisme que dona lloc a la tolerància creuada en *C. albidus* en condicions naturals implica l'acumulació de JA-Ile a nivell sistèmic i l'absència en la seva acumulació resulta en una lleugera major susceptibilitat al parasitisme. A més, la tolerància creuada podria estar coordinada per la interacció entre l'àcid abscísic i els jasmonats, i la vitamina E també participa en aquesta resposta limitant la peroxidació lipídica. Finalment, es suggereix que la relació entre la vitamina E i els jasmonats podria tenir implicacions en la resposta a la combinació d'estressos abiòtic i biòtic, tant per la vessant sinèrgica de la relació en el fenomen de tolerància creuada com per la vessant antagònica en el fenomen de compromís.

9. Límits del parasitisme a nivell d'ecosistema

Com és sabut les plantes paràsites causen danys als seus hostes i podrien suposar una amenaça en els ecosistemes naturals tal i com ho suposen en els agrícoles. Tot i així, hi ha diversos factors que limiten el parasitisme a nivell d'ecosistema i ajuden a mantenir un equilibri adequat i funcional entre els efectes positius i negatius que les plantes paràsites exerceixen sobre l'ecosistema que les acull (**Figura 14**).

L'especificitat interespecífica és un dels principals aspectes que modula la distribució de les plantes paràsites. Les plantes paràsites poden afectar un gran ventall d'espècies i es consideren generalistes tot i que un gran nombre d'espècies de plantes paràsites són més aviat especialistes ja que mostren un alt grau de preferència per a un nombre reduït d'hostes de totes les espècies que potencialment podrien ser-ho. En alguns casos resulta en subdivisions genètiques dins d'una mateixa espècie (Barkman et al., 2017), com és el cas de *C. hypocistis* (Thorogood i Hiscock, 2007; de Vega et al., 2008). Així, la distribució dels hostes preferits influeix la distribució de les plantes paràsites. També la densitat d'hostes té un gran efecte sobre el rang d'expansió de les plantes paràsites, fet que ha estat estudiat en la holoparàsita d'arrel *E. virginiana* en hostes arboris (Tsai i Manos, 2010). La biodiversitat en la comunitat hoste sembla afavorir l'establiment i/o influir en l'especificitat de les plantes hemiparàsites (Joshi et al., 2000; Kavanagh i Burns,

2012). A més, el desacoblament entre la fenologia de la planta holoparàsita *C. indecora* i els seus hostes així com la mida i la duració (perenne o anual) dels hostes també limita la distribució d'aquestes plantes holoparàsites (Marquardt i Pennings, 2010).

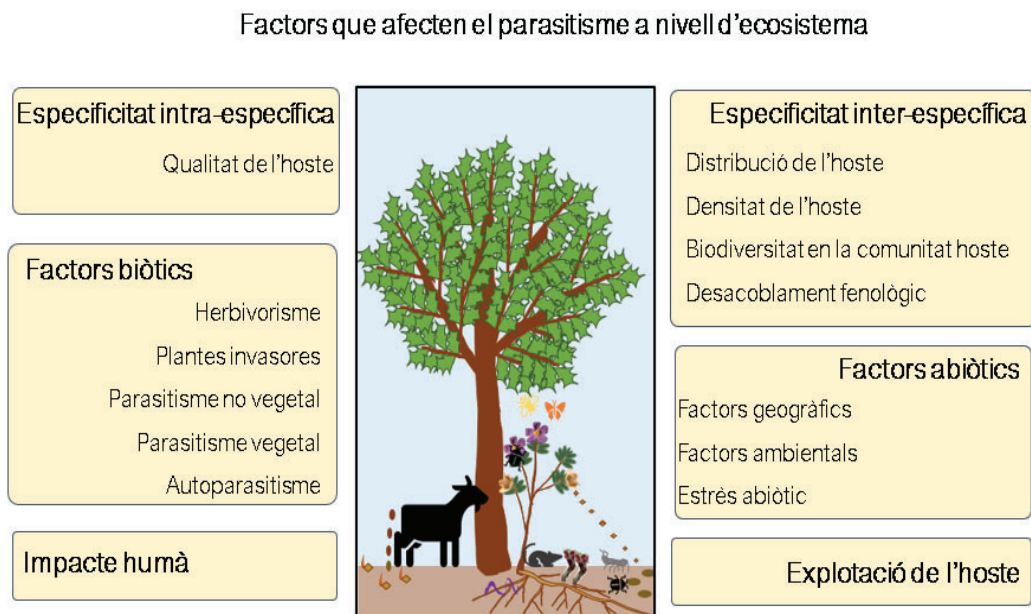


Figura 14. Límits del parasitisme a nivell d'ecosistema. Esquema representatiu dels factors que afecten el parasitisme a nivell d'ecosistema.

L'especificitat intraespecífica també afecta la distribució de les plantes paràsites. La hipòtesi de la qualitat de l'hoste prediu que les plantes paràsites es desenvolupen preferencialment en aquells hostes de major qualitat (Watson, 2009). La qualitat de l'hoste és entesa com a un major accés a recursos com l'aigua i els nutrients així com el vigor de la planta (Evans i Borovicz, 2015). Paral·lelament, l'estrès abiòtic *per se* també pot afectar i limitar el parasitisme així com factors geogràfics i ambientals com la temperatura i l'altitud que en determinen també el rang d'habitabilitat (Zamora i Mellado, 2019; Zagorchev et al., 2021). En general, les condicions ambientals adverses solen causar davallades en les poblacions de plantes paràsites degut a l'efecte d'aquestes condicions sobre els hostes o sobre la seva pròpia germinació, tot i que per contrapartida diverses espècies de plantes paràsites s'han adaptat a viure en ambients estressants, per exemple molt àrids o salins (Frost et al., 2003; Press i Phoenix, 2005; Demirbas et al., 2013; Teshome, 2020; Zagorchev et al., 2021).

Així doncs, la distribució i supervivència de les plantes holoparàsites dependrà de la interacció entre la selecció de l'hoste i les condicions ambientals, tal i com observem al **Capítol 4**, on l'altitud i les condicions ambientals, especialment el règim hídric, afecten tant la distribució de *C. hypocistis* com el grau de parasitisme que exerceix als seus hostes (en referència al nombre d'inflorescències de la planta paràsit per hoste, **Figura suplementària 11 del Capítol 4**).

Els factors biòtics també afecten la distribució de les plantes paràsites. L'herbivorisme, sobre l'hoste, sobre la pròpia planta paràsit, i la interacció tri-tròfica, afecta la distribució interconnectada dels tres nivells tròfics implicats segons el tipus d'herbívor i l'espècie hoste (Marvier, 1996; Rowntree et al., 2014), la mida i gènere de la planta paràsit (Goto et al., 2012), la resposta hormonal i química de la planta hoste (Cuevas-Reyes et al., 2017; Tjiurutue et al., 2017), la transferència de metabòlits secundaris (Haan et al., 2018), o l'efecte de *priming* (Zhuang et al., 2018), tot i que les generalitzacions són complicades. La invasió de l'ecosistema per plantes exòtiques redueix la presència de plantes paràsites mitjançant el desplaçament de les espècies hoste (Marvier i Smith, 1997) tot i que en alguns casos les plantes paràsites són capaces d'adoptar les noves plantes com a hostes (Těšitel et al., 2021). Al **Capítol 4** però, no es van observar espècies de plantes exòtiques en cap de les tres poblacions estudiades. A més, la infecció de l'hoste per part d'altres paràsits no vegetals sembla limitar l'èxit d'espècies hemiparàsites com *R. serotinus* (Puustinen et al., 2001) i fins i tot en alguns casos s'han observat limitacions degudes a l'autoparasitisme i al parasitisme vegetal sobre les plantes paràsites (Krasnylenko et al., 2012).

L'explotació de l'hoste per part de la planta paràsit modela la distribució d'ambdues espècies. És comú que mitjançant la sobreexplotació de l'hoste les plantes paràsites perjudiquin la supervivència de les plantes hoste (Mellado i Zamora, 2017). Les plantes holoparàsites perennes però, que extreuen tots els recursos necessaris per a la seva supervivència de la planta hoste, surten perjudicades si duen a terme una sobreexplotació de l'hoste ja que de la supervivència de l'hoste en depèn la seva. És per això que generalment no es donen exemples de sobreexplotació de l'hoste per part d'espècies de plantes holoparàsites en ecosistemes naturals, al

contrari que en el cas d'algunes plantes hemiparàsites (Spurrier i Smith, 2007; Mellado i Zamora, 2017). A més, s'ha suggerit que les plantes holoparàsites podrien haver desenvolupat estratègies per evitar la sobreexplotació de l'hoste. Per exemple en el cas de *C. hypocistis* s'ha suggerit que la seva pròpia associació amb fongs micorrízics podria contribuir a evitar la sobreexplotació de l'hoste (de Vega et al., 2010), tot i que és un aspecte que requereix futures investigacions.

L'ésser humà, com en la totalitat dels ecosistemes, també té un impacte sobre l'expansió de les plantes paràsites. La destrucció d'hàbitats i l'explotació d'algunes espècies per a interessos humans com l'alimentació o la medicina, perjudica les poblacions de plantes paràsites (Marvier i Smith, 1997; Těšitel et al., 2021). Tot i així, als Estats Units es va observar que algunes espècies de plantes hemiparàsites estaven adaptades i es veien afavorides per a les pertorbacions humanes, incrementant la mida de les seves poblacions en parcs urbans i àrees residencials (Nickrent, 2002). A més, tal i com s'explica en l'**Annex II**, hi ha diversos gèneres de plantes holoparàsites que habiten els ecosistemes agrícoles, com per exemple les espècies del gènere *Orobanche*, i la gestió de control de les plantes paràsites no sembla contrarestar rotundament la seva expansió. Així doncs, l'activitat humana promou en gran mesura l'expansió d'aquests gèneres cultivant els seus hostes.

Als ecosistemes mediterranis les pertorbacions com la presència humana, l'herbivorisme, i els incendis, podrien afavorir la presència de *C. hypocistis*. Al **Capítol 4**, la zona de la població 2, a Sant Pere de Rodes (Cap de Creus), la població de plantes paràsites era la més extensa i densa de l'estudi i les plantes hoste mostraven major nombre d'inflorescències de la planta paràsit de mitjana. En aquesta zona hi ha una carretera amb gran afluència de vehicles motoritzats, així com diversos camins amb accés pels vianants, i a més, els incendis hi són molt freqüents (Gencat 2022). En la zona de la població 1, a Santa Caterina (Montgrí), la població de paràsites era extensa però amb menor densitat que en la zona 1, així com també era menor el nombre d'inflorescències per hoste. En aquesta zona era destacable la presència de zones pertorbades per un incendi al 2004 (Gencat 2022), que estaven en procés de successió secundària. També hi havia camins per on circulaven vehicles motoritzats i caminants. A més a més, s'hi va observar pastura d'ungulats. La zona de la població

3 en canvi, era de difícil accés inclús per a caminants. Aquesta població, situada en la major altitud (792-911 m.s.n.m), era de mida reduïda i mostrava baix nombre d'inflorescències per a cada planta hoste (**Figura suplementària 11 del Capítol 4 i observacions personals**).

Amb tot, degut a l'especificitat inter i intraespecífica de les plantes paràsites, els factors que més limiten el parasitisme a nivell d'ecosistema són la distribució i densitat dels hostes així com les condicions ambientals, que a part d'afectar directament la supervivència de les plantes paràsites, afecten la qualitat i la supervivència dels hostes modulant així la de les plantes paràsites. Els factors biòtics com l'herbivorisme i altres paràsits, siguin sobre l'hoste o sobre la pròpia planta paràsit, també modelen la seva distribució. La sobreexplotació de l'hoste en canvi, no és un factor determinant en el cas de les plantes holoparàsites ja que manca de significat biològic i l'activitat humana, més que limitar el parasitisme sembla promoure'l. Als ecosistemes mediterranis les pertorbacions com la presència humana, l'herbivorisme i els incendis, podrien afavorir la presència de *C. hypocistis*.

CONCLUSIONS



CONCLUSIONS

- i. La vitamina E es presenta de forma ubiqua en les plantes (tant en les que realitzen fotosíntesi com en plantes holoparàsites), i s'acumula tant en teixits fotosintètics com en teixits no fotosintètics.
- ii. Els teixits fotosintètics (fulles) i no fotosintètics (fals fruit) de *Fragaria x ananassa* cv. Albion en condicions semi-controlades contenen vitamina E, concretament α - i γ -tocoferol a les fulles, α -, γ -, i δ -tocoferol als aquenis, i α -tocoferol al receptacle. La forma majoritària del fals fruit és l' α -tocoferol tot i que les proporcions canvien en funció del teixit, essent el γ -tocoferol la forma majoritària als aquenis i l' α -tocoferol la única forma present al receptacle.
- iii. La vitamina E respon a l'estrès hídric en el model d'estudi *Fragaria x ananassa* cv. Albion durant el període productiu. Concretament, l' α -tocoferol, respon als teixits fotosintètics (fulles), però no als teixits no fotosintètics (fals fruit).
- iv. Les arrels de *C. albidus* presenten vitamina E. En concret, α -tocoferol en un 100%. En canvi, l'haustori de la planta holoparàsita *C. hypocistis* presenta un 100% d' α -tocotrienol, la qual cosa suggereix que aquesta vitamina E és sintetitzada per la planta no fotosintètica.
- v. La relació entre vitamina E i jasmonats és bidireccional i dosi-depenent en les plantes, essent positiva o sinèrgica entre la vitamina E (ambdós α - i γ -tocoferol) i el JA en diverses espècies, i negativa o antagònica amb l'OPDA en *C. albidus* i altres espècies sota condicions naturals.
- vi. La relació entre la vitamina E i els jasmonats podria tenir implicacions en la resposta a la combinació d'estressos abiòtics i biòtics tant per la vessant sinèrgica de la relació en el fenomen de tolerància creuada com per la vessant antagònica en el fenomen de compromís.

- vii. L'estrès abiòtic i l'herbivorisme poden coincidir en els ecosistemes mediterranis però no sempre ho fan en el punt màxim d'estrès, com és el cas d'aquest estudi degut a l'estacionalitat i a l'orientació solar del microhàbitat. A més, l'edat de la planta no representa una major susceptibilitat de patir herbivorisme en *C. albidus* en condicions naturals.
- viii. A nivell local, en el sistema *C. albidus*-*C. hypocistis* en condicions naturals les citocinines presents en l'arrel de l'hoste i en l'haustori de la planta paràsit juguen un paper important en aquesta interacció, probablement relacionat amb les relacions font-embornal del sistema
- ix. A nivell local, en el sistema *C. albidus*-*C. hypocistis* en condicions naturals, la vitamina E present en l'arrel de l'hoste forma part del sistema antioxidant, reduint la peroxidació lipídica.
- x. *C. albidus* és capaç de tolerar el parasitisme per part de *C. hypocistis* en condicions naturals. A nivell sistèmic els arbustos parasitats no presenten símptomes d'afectació fisiològica a curt termini i fins i tot mostren alguns mecanismes de compensació.
- xi. Les plantes de *C. albidus* sotmeses a combinació d'estressos abiòtics i parasitisme en condicions naturals poden manifestar tolerància creuada o compromís entre les respostes de defensa en situacions concretes. La resposta a la combinació d'estressos que dona lloc a la tolerància en *C. albidus* en condicions naturals implica l'acumulació de JA-Ile, així com d'àcid abscísic i de vitamina E.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Abbasi AR., Hajirezaei M., Hofius D., Sonnewald U., Voll L. (2007). Specific roles of α - and γ -tocopherol in abiotic stress responses of transgenic tobacco. *Plant Physiol*, 143: 1720-1738.
- Abbes Z., Bouallegue A., Travelsi I., Trabelsi N., Taamalli A., et al. (2020). Investigation of some biochemical mechanisms involved in the resistance of faba bean (*Vicia faba* L.) varieties to *Orobanche* spp. *Plant Protect Sci*, 56: 317-328.
- Adler L., Karban R., Strauss S. (2001). Direct and indirect effects of alkaloids on plant fitness via herbivory and pollination. *Ecology*, 82: 2032-2044.
- Ali M., Baek KH. (2020). Jasmonic acid signaling pathway in response to abiotic stresses in plants. *Int J Mol Sci*, 21: 621.
- Allorent G., Courtois F., Chevalier F., Lerbs-Mache S. (2013). Plastid gene expression during chloroplast differentiation and dedifferentiation into non-photosynthetic plastids during seed formation. *Plant Mol Biol*, 82: 59-70.
- Allu A., Simancas B., Balazadeh S., Munné-Bosch S. (2017). Defense-related transcriptional reprogramming in vitamin E-deficient *Arabidopsis* mutants exposed to contrasting phosphate availability. *Front Plant Sci*, 8: 1396.
- Almeida J., Da Silva M., Spicher L., Glauser G., vom Dorp K., et al. (2016). Down-regulation of tomato *PHYTOL KINASE* strongly impairs tocopherol biosynthesis and affects prenyl lipid metabolism in an organ-specific manner. *J Exp Bot*, 67: 919-934.
- Alméras E., Stolzi S., Vollenweider S., Reymond P., Mène-Saffrané L., et al. (2003). Reactive electrophile species activate defense gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J*, 34: 205-216.

- Aly R., Hamamouch N., Abu-Nassar J., Wolf S., Joel D., et al. (2011). Movement of protein and macromolecules between host plants and the parasitic weed *Phelipanche aegyptiaca* Pers. *Plant Cell Rep*, 30: 2233-2241.
- Anderson J., Park Y., Chow W. (1997). Photoinactivation and photoprotection of photosystem II in nature. *Physiol Plant*, 100: 214-223.
- Arango Y., Heise KP. (1998). Tocopherol synthesis from homogentisate in *Capsicum annuum* L. (yellow pepper) chromoplast membranes: evidence for tocopherol cyclase. *Biochem J*, 336: 531-533.
- Ariga H., Katori T., Tsuchimatsu T., Hirase T., Tajima Y., et al. (2017). NLR locus-mediated trade-off between abiotic and biotic stress adaptation in *Arabidopsis*. *Nat Plants*, 3: 17072.
- Ariza M., Reboredo-Rodríguez P., Mazzoni L., Forbes-Hernández T., Giamperi F., et al. (2016). Strawberry achenes are an important source of bioactive compounds for human health. *Int J Mol Sci*, 17: 1103.
- Atkinson N., Jain R., Urwin P. (2015). The response of plants to simultaneous biotic and abiotic stress. In Mahalingam R. (Ed), *Combined stresses in plants*, Switzerland, Springer, pp 181-201.
- Bardgett R., Smith R., Shiel R., Peacock S., Simkin J., et al. (2006). Parasitic plants indirectly regulate below-ground properties in grassland ecosystems. *Nature*, 439: 969-972.
- Barkman T., Klooster M., Gaddis K., Franzone B., Calhoun S., et al. (2017). Reading between the vines: hosts as islands for extreme holoparasitic plants. *Am J Bot*, 104: 1382-1389.

- Barsan C., Sanchez-Bel P., Rombaldi C., Egea I., Rossignol M., et al. (2010). Characteristics of the tomato chromoplast revealed by proteomic analysis. *J Exp Bot*, 61: 2413-2431.
- Bartolomé J., Baraza E., Espunya C., Castells E., Rivera L., et al. (2019). Tolerance to severe browsing of three shrub species on Mediterranean islands. *Acta Oecologia*, 98: 30-35.
- Berens M., Wolinska K., Spaepen S., Ziegler J., Nobori T., et al. (2019). Balancing trade-offs between biotic and abiotic stress responses through leaf age-dependent variation in stress hormone cross-talk. *Proc Natl Acad Sci USA*, 116: 2364-2373.
- Biswas K., Adhikari S., Tarafdar A., Kumar R., Saha S., et al. (2020). Reactive oxygen species and antioxidant defence systems in plants: role and crosstalk under biotic stress. In Roychowdhury R., Choudhury S., Hasanuzzaman M., Srivastava S. (Ed), *Sustainable agriculture in the era of climate change*, Germany, Springer, pp 265-292.
- Boeckler G., Gershenzon J., Unsicker S. (2013). Gypsy moth caterpillar feeding has only a marginal impact on phenolic compounds in old-growth black poplar. *J Chem Ecol*, 39: 1301-1312.
- Boonnoy P., Karttunen M., Wong-ekkabut J. (2018). Does α -tocopherol flip-flop help to protect membranes against oxidation? *J Phys Chem*, 122: 10362-10370.
- Brash A., Baertschi S., Ingram C., Harris T. (1988). Isolation and characterization of natural allene oxides: unstable intermediates in the metabolism of lipid hydroperoxides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85: 3382-3386.
- Brossa R., López-Carbonell M., Jubany-Marí T., Alegre L. (2011). Interplay between abscisic acid and jasmonic acid and its role in water-oxidative stress in wild-type, ABA-deficient, JA-deficient, and ascorbate-deficient *Arabidopsis* plants. *J Plant Growth Regul*, 30: 322-333.

- Brossa R., Pintó-Marijuan M., Francisco R., López-Carbonell M., Chaves M., et al. (2015). Redox proteomics and physiological responses in *Cistus albidus* shrubs subjected to long-term summer drought followed by recovery. *Planta*, 241: 803-822.
- Butowt R., Granot D., Rodríguez-García I. (2003). A putative plastidic glucose translocator is expressed in heterotrophic tissues that do not contain starch, during olive (*Olea europea* L.) fruit ripening. *Plant Cell Physiol*, 44: 1152-1161.
- Cabal C., Ochoa-Hueso R., Pérez-Corona M., Manrique, E. (2017). Long-term simulated nitrogen deposition alters the plant cover dynamics of a Mediterranean rosemary shrubland in Central Spain through defoliation. *Environ Sci Pollut Res*, 24: 26227-26237.
- Calvin C. (1997). Host-formed tyloses in vessels of the mistletoe phoradendron (Viscaceae). *IAWA J*, 18: 117-126.
- Cao S., Zheng Y., Wang K., Jin P., Rui H. (2009). Methyl jasmonate reduces chilling injury and enhances antioxidant enzyme activity in postharvest loquat fruit. *Food Chem*, 115: 1458-1463.
- Caro A., Puntarulo S. (1996). Effect of in vivo iron supplementation on oxygen radical production by soybean roots. *Bioch Biophys Acta*, 1291: 245-251.
- Carvalho R., Carvalho S., O'Grady K., Folta K. (2016). Agroinfiltration of strawberry fruit- a powerful transient expression system for gene validation. *Curr Plant Biol*, 6: 19-37.
- Cela J., Tweed J., Sivakumaran A., Lee M., Mur L., et al. (2018). An altered tocopherol composition in chloroplasts reduces plant resistance to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol Biochem*, 127: 200-210.

- Chebli Y., El Otmani S., Chentouf M., Hornick JL., Bindelle J., Cabraux JF. (2020). Foraging behaviour of goats browsing in southern Mediterranean forest rangeland. *Animals*, 10: 196.
- Chen X., Jiang W., Tong T., Chen G., Zeng F., et al. (2021). Molecular interaction and evolution of jasmonate signaling with transport and detoxification of heavy metals and metalloids in plants. *Front Plant Sci*, 12: 665842.
- Choudhary D., Prakash A., Johri B. (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian J Microbiol*, 47: 289-297.
- Christenhusz M., Byng J. (2016). The number of known plant species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*, 261: 201-217.
- Clarke C., Timko M., Yoder J., Axtell M., Westwood J. (2019). Molecular dialog between parasitic plants and their hosts. *Annu Rev Phytopathol*, 57: 279-299.
- Clayson C., García-Ruiz I., Costea M. (2014). Diversity, evolution, and function of stomata bearing structures in *Cuscuta* (dodders, Convolvulaceae): from extrafloral nectar secretion to transpiration in arid conditions. *Perspect Plant Ecol Evol Syst*, 16: 310-321.
- Correia O., Ascensão L. (2017). Summer semi-deciduous species of the Mediterranean landscape: a winning strategy of *Cistus* species to face the predicted changes of the Mediterranean climate. In Ansari A., Gill S., Abbas Z., Naeem M. (Ed), *Plant biodiversity*, USA, CABI, pp 195-217.
- Correia O., Martin A., Catarino F. (1992). Comparative phenology and seasonal foliar nitrogen variation in Mediterranean species of Portugal. *Ecol Mediterr*, xviii: 7-18.
- Cotado A., Munné-Bosch S. (2020). Distribution, trade-offs and drought vulnerability of a high-mountain Pyrenean endemic plant species, *Saxifraga longifolia*. *Glob Ecol Conserv*, 22: e00916.

- Cowling R., Rundel P., Lamont B., Arroyo M., Arianoutsou M. (1995). Plant diversity in mediterranean-climate regions. *Trends Ecol Evol*, 11: 362-366.
- Crawford T., Lehotai N., Strand A. (2018). The role of retrograde signals during plant stress. *J Exp Bot*, 69: 2783-2795.
- Cruz-Castillo M., Martínez C., Buchala A., Métraux JP., León J. (2004). Gene-specific involvement of β -oxidation in wound-activated responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 135: 85-94.
- Cuevas-Reyes P., Pérez-López G., Maldonado-López Y., González-Rodríguez A. (2017). Effects of herbivory and mistletoe infection by *Psittacanthus calyculatus* on nutritional quality and chemical defense of *Quercus deserticola* along Mexican forest fragments. *Plant Ecol*, 218: 687-697.
- Dalin P., Ågren J., Björkman C., Huttunen P., Kärkkäinen K. (2008). Leaf trichome formation and plant resistance to herbivory. In Schaller A. (Ed), *Induced plant resistance to herbivory*, Germany, Springer, pp 89-105.
- Dathe W., Rönsch H., Preiss A., Schade W., Sembdner G. (1981). Endogenous plant hormones of the bread bean, *Vicia faba* L. (-)-jasmonic acid, a plant growth inhibitor in pericarp. *Planta*, 153: 530-535.
- Davies P. (2010). The plant hormones. In Davies P. (Ed), *Plant hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*. Netherlands, Springer, pp 1-15.
- De Vega C. (2007). *Biología de la reproducción de Cytinus hypocistis (L.) L.: interacciones parásito-huésped*. Univ Sevilla, Tesis doctoral.
- De Vega C., Arista M., Ortiz P., Herrera C., Talavera S. (2009). The ant-pollination system of *Cytinus hypocistis* (Cytinaceae), a Mediterranean root holoparasite. *Ann Bot*, 103: 1065-1075.

- De Vega C., Arista M., Ortiz P., Talavera S. (2010). Anatomical relations among endophytic holoparasitic angiosperms, autotrophic host plants and mycorrhizal fungi: a novel tripartite interaction. *Am J Bot*, 97: 730-737.
- De Vega C., Berjano R., Arista M., Ortiz P., Talavera S., et al. (2008). Genetic races associated with the genera and sections of host species in the holoparasitic plant *Cytinus* (Cytinaceae) in the Western Mediterranean basin. *New Phytol*, 178: 875-887.
- De Vega C., Ortiz P., Arista M., Talavera S. (2007). The endophytic system of Mediterranean *Cytinus* (Cytinaceae) developing on five hosts Cistaceae species. *Ann Bot*, 100: 1209-1217.
- De-la-Cruz I., Cruz L., Martínez-García L., Valverde P., Flores-Ortiz C., et al. (2020). Evolutionary response to herbivory: population differentiation in microsatellite loci, tropane alkaloids and leaf trichome density in *Datura stramonium*. *Artropod Plant Interact*, 14: 21-30.
- Demarsy E., Buhr, F., Lambert E., Lerbs-Mache S. (2012). Characterization of the plastid-specific germination and seedling establishment transcriptional programme. *J Exp Bot*, 63: 925-939.
- Demirbas S., Vlachonasios K., Acar O., Kaldis A. (2013). The effect of salt stress on *Arabidopsis thaliana* and *Phelipanche ramosa* interaction. *Eur Weed Res Soc*, 53: 452-460.
- Demmig-Adams B., Cohu C., Amiard V., Zadelhoff G., Veldink G., et al. (2013). Emerging trade-offs – impact of photoprotectants (PsbS, xanthophylls, and vitamin E) on oxylipins as regulators of development and defense. *New Phytol*, 197: 720-729.
- Demmig-Adams B., Stewart J., Adams II W. (2014). Chloroplast photoprotection and the trade-off between abiotic and biotic defense. In *Non-photochemical quenching*

- and energy dissipation in plants, algae and cyanobacteria. Demmig-Adams B., Garab G., Adams II W., Govindjee. (Ed), Netherlands, Springer, pp 631-643.
- Demmig-Adams B., Stewart J., Adams II W. (2019). Less photoprotection can be good in some genetic and environmental contexts. *Biochem J*, 476: 2017-2029.
- Dos Santos C., Letousey P., Delavault P., Thalouarn P. (2003). Defense gene expression analysis of *Arabidopsis thaliana* parasitized by *Orobancha ramosa*. *Phytopathology*, 93: 451-457.
- Egea I., Barsan C., Bian W., Purgatto E., Latché A., et al. (2010). Chromoplast differentiation: current status and perspective. *Plant Cell Physiol*, 51: 1601-1611.
- Esteban R., Olano J., Castresana J., Fernández-Marín B., Hernández A., et al. (2009). Distribution and evolutionary trends of photoprotective isoprenoids (xanthophylls and tocopherols) within the plant kingdom. *Physiol Plant*, 135: 379-389.
- Evans B., Borowicz V. (2015). The plant vigor hypothesis applies to a holoparasitic plant on a drought-stressed host. *Botany*, 93: 685-689.
- Falk J., Munné-Bosch S. (2010). Tocochromanol function in plants: antioxidant and beyond. *J Exp Bot*, 61: 1549-1566.
- Fang X., Zhao G., Zhang S., Li Y., Gu H., et al. (2019). Chloroplast-to-nucleus signaling regulates microRNA biogenesis in *Arabidopsis*. *Dev Cell*, 48: 371-382.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2022. Agriculture Database. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- Farmer E., Gao YQ., Lenzoni G., Wolfender JL., Wu Q. (2020). Wound- and mechanostimulated electrical signals control hormone responses. *New Phytol*, 227: 1037-1050.

- Farooq M., Gill R., Islam F., Ali B., Liu H., et al. (2016). Methyl jasmonate regulates antioxidant defense and suppresses arsenic uptake in *Brassica napus* L. *Front Plant Sci*, 7:468.
- Fedina I., Nedeva D., Georgieva K., Velitchkova M. (2009). Methyl jasmonate counteract UV-B stress in barley seedlings. *J Agron Crop Sci*, 195: 204-212.
- Fernández-Marín B., Hernández A., Garcia-Plazaola J., Esteban R., Miguez F., et al. (2017). Photoprotective strategies of Mediterranean plants in relation to morphological traits and natural environmental pressure: a meta-analytical approach. *Front Plant Sci*, 8: 1051.
- Fernández-Mazuecos M., Vargas P. (2010). Ecological rather than geographical isolation dominates quaternary formation of Mediterranean *Cistus* species. *Mol Ecol*, 19: 1381-1395.
- Fierascu R., Temocico G., Fierascu I., Ortan A., Babeanu N. (2020). *Fragaria* genus: chemical composition and biological activities. *Molecules*, 25: 498.
- Fischer K., Lachner L., Olsen S., Mulisch M., Krause K. (2021). The enigma of interspecific plasmodesmata: insight from parasitic plants. *Front Plant Sci*, 12: 641924.
- Fisk I., White D., Carvalho A., Gray D. (2006). Tocopherol- an intrinsic component of sunflower seed oil bodies. *J Am Oil Chem Soc*, 83: 4.
- Flake S., Weisberg P. (2019). Fine-scale stand structure mediates drought-induced tree mortality in pinyon-juniper woodlands. *Ecol Appl*, 29: e01831.
- Fleta-Soriano E., Pintó-Marijuan M., Munné-Bosch S. (2015). Evidence of drought stress memory in the facultative CAM, *Aptenia cordifolia*: possible role of phytohormones. *PLoS ONE* 10:8.

- Focardi S., Tinelli A. (2005). Herbivory in a Mediterranean forest: browsing impact and plant compensation. *Acta Oecol*, 28: 239-247.
- Fonseca R., Seldal T., Joar S., Rodriguez-Saona C., Kawash J., et al. (2019). Transcriptional profiling of methyl jasmonate-induced defense response in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). *BMC Plant Biol*, 19: 70.
- Foyer C., Rasool B., Davey J., Hancock R. (2016). Cross-tolerance to biotic and abiotic stresses in plants: a focus on resistance to aphid infestation. *J Exp Bot*, 67: 2025-2037.
- Frost A., López-Gutiérrez J., Purrington C. (2003). Fitness of *Cuscuta salina* (Convolvulaceae) parasitizing *Beta vulgaris* (Chenopodiaceae) grown under different salinity regimes. *Am J Bot*, 90: 1032-1037.
- Fryer M. (1992). The antioxidant effects of thylakoid vitamin E (α -tocopherol). *Plant Cell Environ*, 15: 381-392.
- Fujita M., Fujita Y., Noutoshi Y., Takahashi F., Narusaka Y., et al. (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr Opin Plant Biol*, 9: 436-442.
- Furuhashi T., Kojima M., Sakakibara H., Fukushima A., Yokota M., et al. (2014). Morphological and plant hormonal changes during parasitization by *Cuscuta japonica* on *Momordica charantia*. *J Plant Interact*, 9: 220-232.
- Gencat 2022. Departament d'Interior. Informes d'incendis forestals, https://interior.gencat.cat/ca/arees_dactuacio/bombers/foc-forestal/incendis_forestals/informes-dincendis-forestals/
- Genovese C., D'Angeli F., Attanasio F., Caserta G., Scarpaci K., Nicolosi D. (2020). Phytochemical composition and biological activities of *Oroanche crenata* Frossk.: a review. *Nat Prod Res*, 35: 4579-4595.

- Ghassemian M., Lutes J., Chang HS., Lange I., Chen W., et al. (2008). Absciscic acid-induced modulation of metabolic and redox control pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 69: 2899-2911.
- Giamperi F., Alvarez-Suarez JM., Battino M. (2014). Strawberry and human health: effects beyond antioxidant activity. *J Agric Food Chem*, 62: 3867-3876.
- Giamperi F., Tulipani S., Alvarez-Suarez JM., Quiles JL., Mezzetti B., et al. (2012). The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition*, 28: 9-19.
- Gill G., Bui H., Clark R., Ramirez R. (2020). Varying responses to combined water-stress and herbivory in maize for spider mite species that differ in host specialization. *Environ Exp Bot*, 177: 104131.
- Giovannetti G., Fontana A. (1982). Mycorrhizal synthesis between Cistaceae and Tuberaceae. *New Phytol*, 92: 533-537.
- Glauser G., Dubugnon L., Mousavi S., Rudaz S., Wolfender JL., et al. (2009). Velocity estimates for signal propagation leading to systemic jasmonic acid accumulation in wounded *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 284: 34506-34513.
- Gómez J. (1994). Importance of direct and indirect effects in the interaction between a parasitic angiosperm (*Cuscuta epithymum*) and its host plant (*Hormathophylla spinosa*). *Oikos*, 71: 97-106.
- Goto R., Yamakoshi G., Matsuzawa T. (2012). A novel brood-site pollination mutualism?: the root holoparasite *Thonningia sanguinea* (Balanophoraceae) and inflorescence-feeding fly in the tropical rainforests of West Africa. *Plant Species Biol*, 27: 164-169.

- Goyet V., Billard E., Pouvreau JB., Lechat MM., Pelleetier S., et al. (2017). Haustorium initiation in the obligate parasitic plant *Phelipanche ramosa* involves a host-exudated cytokinin signal. *J Exp Bot*, 68: 5539-5552.
- Gramegna G., Rosado D., Sánchez A., Bertinatto A., Simon-Moya M., et al. (2018). Phytochrome-interacting factor 3 mediates light-dependent induction of tocopherol biosynthesis during tomato fruit ripening. *Plant Cell Environ*, 42: 1328-1339.
- Grant O., Incoll L., McNeilly T. (2005). Variation in growth responses to availability of water in *Cistus albidus* populations from different habitats. *Funct Plant Biol*, 32: 817-829.
- Griebel A., Watson D., Pendall E. (2017). Mistletoe, friend and foe: synthesizing ecosystem implications of mistletoe infection. *Environ Res Lett*, 12: 115012.
- Grumbach K. (1983). Distribution of chlorophylls, carotenoids and quinones in chloroplasts of higher plants. *Naturforsch* 38, 996- 1002.
- Gülz PG., Herrmann T., Hangst K. (1996). Leaf trichomes in the genus *Cistus*. *Flora*, 191: 85-104.
- Guo H., Feng P., Chi W., Sun X., Xu X., et al. (2016). Plastid-nucleus communication involves calcium-modulated MAPK signalling. *Nat Commun*, 7: 12173.
- Gutjahr C., Paszkowski U. (2009). Weights in the balance: jasmonic acid and salicylic acid signaling in root-biotroph interactions. *Mol Plant Microbe Interact*, 22: 763-772.
- Guzmán B., Lledó M., Vargas P. (2009). Adaptive radiation in Mediterranean *Cistus* (Cistaceae). *PLoS ONE*, 4: e6362.

- Guzmán B., Vargas P. (2009). Historical biogeography and character evolution of Cistaceae (Malvales) based on analysis of plastid *rbcL* and *trnL-trnF* sequences. *Org Divers Evol*, 9: 83-99.
- Haan N., Bakker J., Bowers M. (2018). Hemiparasites can transmit indirect effects from their host plants to herbivores. *Ecology*, 99: 399-410.
- Hamberg M., Fahlstadius P. (1990). Allene oxide cyclase: a new enzyme in plant lipid metabolism. *Arch Biochem Biophys*, 276: 518-526.
- Hasanuzzaman M., Nahar K., Fujita M. (2014). Role of tocopherol (vitamin E) in plants: abiotic stress tolerance and beyond. In: Ahmad P., Rasool S. (Ed), *Emerging technologies and management of crop stress tolerance*, USA, Elsevier, pp 267-289.
- Hause B., Hause G., Kutter C., Miersch O., Wasternack C. (2003). Enzymes of jasmonate biosynthesis occur in tomato sieve elements. *Plant Cell Physiol*, 44: 643-348.
- Heitz T., Smirnova E., Wiedemann E., Aubert Y., Pinot F., et al. (2016). The rise and fall of jasmonate biological activities. In *Lipids in plant and algae development*, Nakamura, Y., Li-Beisson, Y. (Ed), Switzerland, Springer, pp-405-426.
- Henning S., Seeram N., Zhang Y., Li L., Gao K., et al. (2010). Strawberry consumption is associated with increased antioxidant capacity in serum. *J Med Food*, 13: 116-122.
- Hettenhausen C., Li J., Zhuang H., Sun H., Xu Y., et al. (2017). Stem parasitic plant *Cuscuta australis* (dodder) transfers herbivory-induced signals among plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 114: E6703-E6709.

- Heyer M., Reichelt M., Mithöfer A. (2018). A holistic approach to analyze systemic jasmonat accumulation in individual leaves of *Arabidopsis* rosettes upon wounding. *Front Plant Sci*, 9: 1569.
- Hódar J., Zamora R. (2004). Herbivory and climatic warming: a Mediterranean outbreaking caterpillar attacks a relict, boreal pine species. *Biodivers Conserv*, 13: 493-500.
- Horvath G., Wessjohann L., Bigirimana J., Jansen M., Guisez Y., et al. (2006). Differential Distribution of tocopherols and tocotrienols in photosynthetic and non-photosynthetic tissues. *Phytochemistry*, 67: 1185-1195.
- IPCC, 2022: Climate Change 2022: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, H.-O. Pörtner, D.C. Roberts, M. Tignor, E.S. Poloczanska, K. Mintenbeck, A. Alegría, M. Craig, S. Langsdorf, S. Löschke, V. Möller, A. Okem, B. Rama (Ed). Cambridge University Press. In Press.
- Irving L., Cameron D. (2009). You are what you eat: interactions between root parasitic plants and their hosts. *Adv Bot Res*, 50: 87-138.
- Ishida J., Wakatake T., Yoshida S., Takebayashi Y., Kasahara H., et al. (2016). Local auxin biosynthesis mediated by a YUCCA flavin monooxygenase regulates haustorium development in the parastic plant *Phtheirospermum japonicum*. *Plant Cell*, 28: 1795-1814.
- IUCN 2019. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2019-1.
- Jarosz A., Davelos A. (1995). Effects of disease in wild plant populations and the evolution of pathogen aggressiveness. *New Phytol*, 129: 971-387.
- Jarvis P., López-Juez E. (2013). Biogenesis and homeòstasis of chloroplasts and other plastids. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14: 787-802.

- Jiang F., Jeschke W., Hartung W. (2004). Absciscic acid (ABA) flows from *Hordeum vulgare* to the hemiparasite *Rhinanthus minor* and the influence of infection on host and parasite absciscic acid relations. *J Exp Bot*, 55: 2323-2329.
- Jiang F., Jeschke W., Hartung W., Cameron D. (2010). Interactions between *Rhinanthus minor* and its hosts: a review of water, mineral nutrient and hormone flows and exchanges in the hemiparasitic association. *Folia Geobot*, 45: 369-385.
- Jiang J., Dehesh K. (2021). Plastidial retrograde modulation of light and hormonal signaling: and odyssey. *New Phytol*, 230: 931-937.
- Joshi J., Matthies D., Schmid B. (2000). Root hemiparasites and plant diversity in experimental grassland communities. *J Ecol*, 88: 634-644.
- Kaiser B., Vogt G., Fürst U., Albert M. (2015). Parasitic plants of the genus *Cuscuta* and their interaction with susceptible and resistant host plants. *Front Plant Sci*, 6: 45.
- Karban R. (2007). Deciduous leaf drop reduces insect herbivory. *Oecologia*, 153: 81-88.
- Karban R. (2008). Leaf drop in evergreen *Ceanothus velutinus* as a means of reducing herbivory. *Ecology*, 89: 2446-2452.
- Kavanagh P., Burns K. (2012). Mistletoe macroecology: spatial patterns in species diversity and host use across Australia. *Biol J Linn Soc*, 106: 459-468.
- Keshishian E., Rashotte A. (2015). Plant cytokinin signalling. *Essays Biochem*, 58: 13-27.
- Keyes W., Palmer A., Erbil W., Taylor J., Apkarian R., et al. (2007). Semagenesis and the parasitic angiosperm *Striga asiatica*. *Plant J*, 51: 707-716.

- Kieber J., Schaller G. (2018). Cytokinin signaling in plant development. *Development*, 145: 149344.
- Kissoudis C., van de Wiel C., Visser R., van der Linden G. (2014). Enhancing crop resilience to combined abiotic and biotic stress through the dissection of physiological and molecular crosstalk. *Front Plant Sci*, 5: 207.
- Koo A., Chung HS., Kobayashi Y., Howe G. (2006). Identification of a peroxisomal acyl-activating enzyme involved in the biosynthesis of jasmonic acid in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 281: 33511-33520.
- Koo A., Gao X., Jones AD., Howe G. (2009). A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis*. *Plant J*, 59: 974-986.
- Koskela T., Puutinen S., Salonen V., Mutikainen P. (2002). Resistance and tolerance in a host plant-holoparasitic plant interaction: genetic variation and costs. *Evolution*, 56: 899-908.
- Krasylenko Y., Těšitel J., Ceccantini G., Oliveira-da-Silva M., Dvořák V., et al. (2021). Parasites on parasites: hyper-, epi-, and autoparasitism among flowering plants. *Am J Bot*, 108: 8-21.
- Kurotani KI., Wakatake T., Ichihashi Y., Okayasu K., Sawai Y. (2020). Host-parasite tissue adhesion by a secreted type of β -1,4-glucanase in the parasitic plant *Phtheirospermum japonicum*. *Commun Biol*, 3: 407.
- Larcher W. (1980). Plants under stress. In Larcher W. (Ed), *Physiological plant ecology*. Germany, Springer-Verlag, pp 321-324.
- LeBlanc M., Kim G., Westwood J. (2012). RNA trafficking in parasitic plant systems. *Front Plant Sci*, 3: 203.

- Lebold K., Traber M. (2014). Interactions between α -tocopherol, polyunsaturated fatty acids, and lipoxygenases during embryogenesis. *Free Radic Biol Med*, 66: 13-19.
- Leśniewska J., Öhman D., Krzeslowska M., Kushwah S., Barciszewska-Pacak M., et al. (2017). Defense responses in aspen with altered pectin methylesterase activity reveal the hormonal inducers of tyloses. *Plant Physiol*, 173: 1409-1419.
- Letousey P., De Zélicourt A., Dos Santos C., Thoiron S., Monteau F., et al. (2007). Molecular analysis of resistance mechanisms to *Orobanche cumana* in sunflower. *Plant Pathol*, 56: 536-546.
- Li S., Zhang J., Liu H., Liu N., Shen G., et al. (2020). Dodder-transmitted mobile signals prime host plants for enhanced salt tolerance. *J Exp Bot*, 71: 1171-1184.
- Lichtenthaler H. (1988). In vivo chlorophyll fluorescence as a tool for stress detection in plants. In Lichtenthaler H. (Ed), *Applications of chlorophyll fluorescence in photosynthesis research, stress physiology, hydrobiology and remote sensing*, Netherlands, Springer, pp 129-142.
- Lichtenthaler H., Prenzel U., Douce R., Joyard J. (1981). Localization on prenylquinones in the envelope of spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta*, 641: 99-105.
- Lim L., McFadden GI. (2010). The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. *Phil Trans R Soc B*. 365: 749-763.
- Liston A., Cronn R., Ashman TL. (2014). *Fragaria*: a genus with deep historical roots and ripe for evolutionary and ecological insights. *Am J Bot*, 101: 1686-1699.
- Liu W., Park SW. (2021). 12-oxo-phytodienoic acid: a fuse and/or switch of plant growth and defense responses? *Front Plant Sci*, 12: 724079.

- Lo Gullo M., Glatzel G., Devkota M., Raimondo F., Trifilò P., et al. (2012). Mistletoe and mutant albino shoots on woody plants as mineral nutrient traps. *Ann Bot*, 109: 1101-1109.
- Lopukhina A., Dettenberg M., Weiler E., Holländer-Czytko H. (2001). Cloning and characterization of a coronatine-regulated tyrosine aminotransferase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 126: 1678-1687.
- Luby C., Maeda H., Goldman I. (2014). Genetic and phenological variation of tocochromanol (vitamin E) content in wild (*Daucus carota* L. var. *carota*) and domesticated carrot (*D. carota* L. var. *sativa*). *Hortic Res*, 1: 15.
- Machado R., McClure M., Hervé M., Baldwin I., Erb M. (2016). Benefits of jasmonate-dependent defenses against vertebrate herbivores in nature. *eLife*, 5: e13720.
- Maffei M., Bossi S., Spiteller D., Mithöfer A., Boland W. (2004). Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. I. membrane potentials, intracellular calcium variations, oral secretions, and regurgitate components. *Plant Physiol*, 134: 1752-1762.
- Mancilla-Leytón JM., Joffre R., Martín A. (2014). Effect of grazing and season on the chemical composition of Mediterranean shrub species in Doñana Natural Park, Spain. *J Arid Environ*, 108: 10-18.
- Mancilla-Leytón JM., Mejías R., Martín A. (2013). Shrub vegetation consumption by goats in the southwestern Iberian Peninsula. *Livest Sci*, 153: 108-115.
- Mancilla-Leytón JM., Parejo C., Martín A. (2012). Selection of browse species and energy balance of goats grazing on forest understory vegetation in Doñana Natural Park (SW Spain). *Livest Sci*, 148: 237-242.

- Mangenot M., Mangenot MS. (1968). Cytologie vegetal. Sur la presence de leucoplastes chez les végétaux vasculaires mycotrophes ou parasites. C R Acad Sci Paris, 267D: 1193-1195.
- Marquardt E., Pennings S. (2010). Constraints on host use by a parasitic plant. Oecologia, 164: 177-184.
- Marvier M. (1996). Parasitic plant-host interactions: plant performance and indirect effects on parasite-feeding herbivores. Ecology, 77: 1398-1409.
- Marvier M., Smith D. (1997). Conservation implications of host use for rare parasitic plants. Conserv Biol, 11: 839-848.
- Massei G., Hartley S., Bacon P. (2000). Chemical and morphological variation of Mediterranean woody evergreen species: Do plants respond to ungulate browsing? J Veg Sci, 11: 1-8.
- McFadden GI. (2001). Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids. J Pycol, 37: 951-959.
- McFadden GI. (2011). The apicoplast. Protoplasma, 248: 641-650.
- Medel R. (2001). Assessment of correlational selection on tolerance and resistance traits in a host plant-parasitic plant interaction. Evol Ecol, 15: 37-52.
- Mellado A., Zamora R. (2017). Parasites structuring ecological communities: the mistletoe footprint in Mediterranean pine forests. Funct Ecol, 31: 2167-2176.
- Mène-Saffrané L., Jones A., DellaPenna D. (2010). Plastochromaol-8 and tocopherols are essential lipid-soluble antioxidants during seed desiccation and quiescence in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA, 107: 17815-17820.

- Meyer S., Roces F., Wirth R. (2006) Selecting the drought stressed: effects of plant stress on intraspecific and within-plant herbivory patterns of the leaf-cutting ant *Atta colombica*. *Funct Ecol*, 20: 973-981.
- Mielecki J., Gawroński P., Karpiński S. (2020). Retrograde signaling: understanding the communication between organelles. *Int J Mol Sci*, 21: 6173.
- Miranda M., Díaz L., Sicilia M., Cristóbal I., Cassinello J. (2011). Seasonality and edge effect determine herbivory risk according to different plant association models. *Plant Biol*, 13: 160-168.
- Miret J., Munné-Bosch S. (2015). Redox signaling and stress tolerance in plants: a focus on vitamin E. *Ann N Y Acad Sci*, 1340: 29-38.
- Mitsumasu K., Seto Y., Yoshida S. (2015). Apoplastic interactions between plants and plant root intruders. *Front Plant Sci*, 6: 617.
- Molina-Montenegro M., Ávila P., Hurtado R., Valdivia A., Gianoli E. (2006). Leaf trichome density may explain herbivory patterns of *Actinote* sp. (Lepidoptera: Acraeidae) on *Liabum mandonii* (Asteraceae) in a montane humid forest (Nor Yungas, Bolivia). *Acta Oecol*, 30: 147-150.
- Morales M., Garcia Q., Munné-Bosch S. (2015). Ecophysiological response to seasonal variations in water availability in the arborescent, endemic plant *Vellozia gigantea*. *Tree Physiol*, 35: 253-265.
- Morales M., Munné-Bosch S. (2015). Secret of long life lies underground. *New Phytol*, 205: 463-467.
- Mousavi S., Chauvin A., Pascaud F., Kellenberger S., Farmer E. (2013). GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature*, 500: 422.

- Müller L., Theile K., Böhm V. (2010). In vitro antioxidant activity of tocopherols and tocotrienols and comparison of vitamin E concentration and lipophilic antioxidant capacity in human plasma. *Mol Nutr Food Res*, 54: 731-742.
- Müller M., Siles L., Cela J., Munné-Bosch S. (2014). Perennially young: seed production and quality in controlled and natural populations of *Cistus albidus* reveal compensatory mechanisms that prevent senescence in terms of seed yield viability. *J Exp Bot*, 65: 287-297.
- Munné-Bosch S. (2005). The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *J Plant Physiol*, 162: 742-748.
- Munné-Bosch S. (2007). α -Tocopherol: a multifaceted molecule in plants. *Vitam Horm*, 76: 375-392.
- Munné-Bosch S. (2019). Vitamin E function in stress sensing and signaling in plants. *Dev Cell*, 48: 291-292.
- Munné-Bosch S., Alegre L. (2002). The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Crit Rev Plant Sci*, 21: 31-57.
- Munné-Bosch S., Jubany-Marí T., Alegre L. (2003). Enhanced photo- and antioxidative protection, and hydrogen peroxide accumulation in drought-stressed *Cistus clusii* and *Cistus albidus* plants. *Tree Physiol*, 23: 1-12.
- Munné-Bosch S., Lalueza P. (2007). Age-related changes in oxidative stress markers and abscisic acid levels in a drought-tolerant shrub, *Cistus clusii* grown under Mediterranean field conditions. *Planta*, 225: 1039-1049.
- Munné-Bosch S., Puig S., Fenollosa E., Casadesús A., Fernández E. (2022). Vitamin E protects from lipid peroxidation during winter stress in the seagrass *Cymodocea nodosa*. *Planta*, 255: 41.

- Munné-Bosch S., Weiler E., Alegre L., Müller M., Dücking P., Falk J. (2007). α -Tocopherol may influence cellular signaling by modulating jasmonic acid levels in plants. *Planta*, 225: 681-691.
- Muñoz P., Briones M., Munné-Bosch S. (2018). Photoinhibition and photoprotection during flower opening in lilies. *Plant Sci*, 272: 220-229.
- Muñoz P., Munné-Bosch S. (2019). Vitamin E in plants: biosynthesis, transport, and function. *Trends Plant Sci*, 24: 11.
- Muñoz P., Munné-Bosch S. (2020). Oxylipins in plastidial retrograde signaling. *Redox Biol*, 37: 101717.
- Muzzalupo I., Stefanizzi F., Perri E., Chiappetta A. (2011). Transcript levels of CHL *P* gene, antioxidants and chlorophylls contents in olive (*Olea europaea* L.) pericarps: a comparative study on eleven olive cultivars harvested in two ripening stages. *Plant Foods Hum Nutr*, 66: 1-10.
- Myers N., Mittermeier R., Mittermeier C., da Fonseca G., Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403: 853-858.
- Navazio L., Formentin E., Cendron L., Szabò I. (2020). Chloroplast calcium signaling in the spotlight. *Front Plant Sci*, 11: 186.
- Nejat N., Mantri N. (2017). Plant immune system: crosstalk between responses to biotic and abiotic stresses the missing link in understanding plant defence. *Curr Issues Mol Biol*, 23: 1-16.
- Nickrent D. (2002). Parasitic plants of the world. In López-Sáez J., Catalán P., Sáez L. (Ed), *Parasitic plants of the Iberian Peninsula and Balearic Islands, Spain*, Mundi-Presna Libros, pp 7-27.

- Ogran A., Conner J., Agrawal A., Barazani O. (2019). Evolution of phenotypic plasticity: genetic differentiation and additive genetic variation for induced plant defence in wild arugula *Eruca sativa*. J Evol Biol, 33: 237-246.
- Okubamichael D., Griffiths M., Ward D. (2011). Host specificity, nutrient and water dynamics of the mistletoe *Viscum rotundifolium* and its potential host species in the Kalahari of South Africa. J Arid Environ, 75: 898-902.
- Oliveira G., Peñuelas J. (2000). Comparative photochemical and phenomorphological responses to winter stress of an evergreen (*Quercus ilex* L.) and a semi-deciduous (*Cistus albidus* L.) Mediterranean woody species. Acta Oecol, 21: 97-107.
- Oliveira G., Peñuelas J. (2002). Comparative protective strategies of *Cistus albidus* and *Quercus ilex* facing photoinhibitory winter conditions. Environ Exp Bot, 47: 281-289.
- Oliveira G., Peñuelas J. (2004). Effects of winter cold stress on photosynthesis and photochemical efficiency of PSII of the Mediterranean *Cistus albidus* L. and *Quercus ilex* L. Plant Ecol, 175: 179-191.
- Osugi A., Kojima M., Takebayashi Y., Ueda N., Kiba T., et al. (2017). Systemic transport of *trans*-zeatin and its precursor have differing roles in *Arabidopsis* shoots. Nat Plants, 3: 17112.
- Pagán I., Garcia-Arenal F. (2018). Tolerance to plant pathogens: theory and experimental evidence. Int J Mol Sci, 19: 810.
- Papachristou T. (2000). Dietary selection by goats and sheep in kermes oak shrublands of northern Greece: Influence of shrub cover and grazing season. In: Ledin I, Morand-Fehr P (Ed), Sheep and goat nutrition: Intake, digestion, quality of products and rangelands, Spain, Chieam-iamz, pp 161-164.

- Papanastasis, V. (1998). Livestock grazing in Mediterranean ecosystems: an historical and policy perspective. In Papanastasis, V., Peter, D (Ed), Ecological basis of livestock grazing in Mediterranean ecosystems. Luxemburg, European Communities, pp 3-5.
- Park SY., Shimizu K., Brown J., Aoki K., Westwood J. (2022). Mobile host mRNAs are translated to protein in the associated parasitic plant *Cuscuta campestris*. *Plants*, 11: 93.
- Peñuelas J., Prieta P., Beier C., Cesaraccio C., de Angelis P., et al. (2007). Response of plant species richness and primary productivity in shrublands along a north-south gradient in Europe to seven years of experimental warming and drought: reductions in primary productivity in the heat and drought year of 2003. *Glob Change Biol*, 13: 2563-2581.
- Peñuelas J., Sardans J., Filella I., Estiarte M., Llusà J., et al. (2017). Impacts of global change on Mediterranean forests and their services. *Forests*, 8: 463.
- Per T. Khan M., Anjum N., Masood A., Hussain S., et al. (2018). Jasmonates in plants under abiotic stresses: crosstalk with other phytohormones matters. *Environ Exp Bot*, 145: 104-120.
- Pérez-Llorca M., Casadesús A., Müller M., Munné-Bosch S. (2019a). Leaf orientation as part of the leaf developmental program in the semi-deciduous shrub, *Cistus albidus* L.: diurnal, positional, and photoprotective effects during winter. *Front Plant Sci*, 10:767.
- Pérez-Llorca M., Casadesús A., Munné-Bosch S., Müller M. (2019b). Contrasting patterns of hormonal and photoprotective isoprenoids in response to stress in *Cistus albidus* during a Mediterranean winter. *Planta*, 250: 1409-1422.
- Perkins-Veazie P. (1995). Growth and ripening of strawberry fruit. In Janick J. (Ed), *Horticultural reviews*, John Wiley & Sons Inc, USA, pp 267-297.

- Pieterse C., Zamioudis C., Berendsen R., Weller D., van Wees S., et al. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu Rev Phytopathol*, 52: 347-375.
- Piotrowska A., Bajguz A., Godlewka-Żyłkiewicz B, Czerpak R., Kamińska M. (2009). Jasmonic acid as modulator of lead toxicity in aquatic plant *Wolffia arrhiza* (Lemnaceae). *Environ Exp Bot*, 66: 507-513.
- Pitzschke A., Forzani C., Hirt H. (2006). Reactive oxygen species signaling in plants. *Antiox Redox Signal*, 8: 1757-1764.
- Press M., Phoenix G. (2005). Impacts of parasitic plants on natural communities. *New Phytol*, 166: 737-751.
- Price D., Chan C., Yoon H., Yang E., Qui H., et al. (2012). *Cyanophora paradoxa* genome elucidates origin of photosynthesis in algae and plants. *Science*, 335: 843-847.
- Price P. (1991). The plant vigor hypothesis and herbivore attack. *Oikos*, 62: 244-251.
- Prieur-Richard AH., Lavorel S., Linchart Y., Dos Santos A. (2002). Plant diversity, herbivory and resistance of a plant community to invasion in Mediterranean annual communities. *Oecologia*, 130: 96-104.
- Puustinen S., Järvinen O., Tiilikkala K. (2001). Asymmetric competition between a hemiparasitic plant and a cyst nematode on a shared host plant. *Ecoscience*, 8: 51-57.
- Qiu Z., Guo J., Zhu A., Zhang L., Zhang M. (2014). Exogenous jasmonic acid can enhance tolerance of wheat seedlings to salt stress. *Ecotoxicol Environ Saf*, 104: 202-208.

- Quested H. (2008). Parasitic plants-impacts on nutrient cycling. *Plant Soil*, 311: 269-272.
- Ramegowda V., Senthil-Kumar M. (2015). The interactive effects of simultaneous biotic and abiotic stresses on plants: mechanistic understanding from drought and pathogen combination. *J Plant Physiol*, 176: 47-54.
- Rautenkranz A., Li L., Mächler F., Märtinoia E., Oertli J. (1994). Transport of ascorbic and dehydroascorbic acids across protoplast and vacuole membranes isolated from barley (*Hordeum vulgare* L. cv Gerbel) leaves. *Plant Physiol*, 106: 187-193.
- Rejeb I., Pastor V., Mauch-Mani B. (2014). Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: molecular mechanisms. *Plants*, 3: 458-475.
- Reyes L., Cisneros-Zevallos L. (2003). Wounding stress increases the phenolic content and antioxidant capacity of purple-flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *J Agric Food Chem*, 51: 5296-5300.
- Ribeiro-Neto J., Ximenes B., Meyer S., Wirth R., Leal I. (2012). Drought stress drives intraspecific choice of food plants by *Atta* leaf-cutting ants. *Entomol Exp Appl*, 144: 209-215.
- Roca M., Mínguez-Mosquera I. (2001). Changes in chloroplast pigments of olive varieties during fruit ripening. *J Agric Food Chem*, 49: 832-839.
- Rodríguez-Ramírez N., Santonja M., Blady V, Ballini C., Montès, N. (2017). Shrub species richness decreases negative impacts of drought in a Mediterranean ecosystem. *J Veg Sci*, 28: 985-966.
- Rodríguez-Romero M., Gallardo A., Pérez A., Pulido F. (2022). Interactive effects of biotic stressors and provenance on chemical defence induction by holm oak (*Quercus ilex*). *Trees*, 36: 227-240.

- Roitsch T., Ehneß R. (2000). Regulation of source/sink relations by cytokinins. *Plant Growth Regul*, 32: 359-367.
- Roquet C. Coissac É., Cruaud C., Boleda M., Boyer F., et al. (2016). Understanding the evolution of holoparasitic plants: the complete plastid genome of the holoparasite *Cytinus hypocistis* (Cytinaceae). *Ann Bot*, 188: 885-896.
- Rowntree J., Cameron D., Preziosi F. (2011). Genetic variation changes the interactions between the parasitic plant-ecosystem engineer *Rhinanthus* and its hosts. *Phil Trans R Soc B*, 36: 1380-1388.
- Rowntree J., Fisher D., Stewart A., Hartley S. (2014). The effect of multiple host species on a keystone parasitic plant and its aphid herbivores. *Funct Ecol*, 28: 829-836.
- Roy J, Sonié L. (1992). Germination and population dynamics of *Cistus* species in relation to fire. *J Appl Ecol*, 29:647–655.
- Runyon J., Mescher M., De Moraes C. (2010). Plant defenses against parasitic plants show similarities to those induced by herbivores and pathogens. *Plant Signal Behav*, 5: 929-931.
- Saijo Y., Loo E. (2019). Plant immunity in signal integration between biotic and abiotic stress responses. *New Phytol*, 225: 87-104.
- Saini E., Harish K., Shetty N., Giridhar P. (2014). Elicitors, SA and MJ enhance carotenoids and tocopherol biosynthesis and expression of antioxidant related genes in *Moringa oleifera* Lam. leaves. *Acta Physiol Plant*, 36: 2695-2704.
- 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.

- Sardans J., Peñuelas J. (2013). Plant-soil interactions in Mediterranean forest and shrublands: impacts of climatic change. *Plant Soil*, 365: 1-33.
- Sasaki-Sekimoto Y., Taki N., Obayashi T., Aono M., Matsumoto F., et al. (2005). Coordinated activation of metabolic pathways for antioxidants and defence compounds by jasmonates and their roles in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J*, 44: 653-668.
- Sattler S., Cahoon E., Coughlan S., DellaPenna D. (2003). Characterization of tocopherol cyclases from higher plants and cyanobacteria. Evolutionary implications for tocopherol synthesis and function. *Plant Physiol*, 132: 2184-2195.
- Sattler S., Gilliland L., Magallanes-Lundback M., Pollard M., et al. (2004). Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell*, 16: 1419-1432.
- Saucet S., Shirasu K. (2016). Molecular parasitic plant-host interactions. *PLoS Pathog* 12: e1005978.
- Savchenko T., Dehesh K. (2014). Drought stress modulates oxylipin signature by eliciting 12-OPDA as a potent regulator of stomatal aperture. *Plant Signal Behav*, 9:4.
- Savchenko T., Kolla V., Wang CQ., Nasafi Z., Hicks D., et al. (2014). Functional convergence of oxylipin and abscisic acid pathways controls stomatal closure in response to drought. *Plant Physiol*, 164: 1151-1160.
- Schaller G., Bishopp A., Kieber J. (2015). The yin-yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development. *Plant Cell*, 27: 44-63.
- Schulze A., Zimmer M., Mielke S., Stellmach H., Melnyk C., et al. (2019). Wound-induced shoot-to-root relocation of JA-Ile precursors coordinates *Arabidopsis* growth. *Mol Plant*, 12: 1383-1394.

- Serbinova E., Kagan V., Han D., Packer L. (1991). Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. *Free Radic Biol Med*, 10: 263-275.
- Severi A., Laudi G., Baroni R. (1980). Ultrastructural researches in the plastids of parasitic plants VI. Scales of *Cytinus hypocistis* L. *Caryologia*, 33: 307-313.
- Shabbaj I., Madany M., Tammar A., Balkhyour M., AbdElagawad H. (2021). Silicon dioxide nanoparticle orchestrate carbon and nitrogen metabolism in pea seedlings to cope with broomrape infection. *Environ Sci Nano*, 8: 1960-1977.
- Sharma M., Laxmi A. (2016). Jasmonates: emerging players in controlling temperature stress tolerance. *Front Plant Sci*, 6: 1129.
- Siles L., Alegre L., González-Solís A., Cahoon E., Munné-Bosch, S. (2018). Transcriptional regulation of vitamin E biosynthesis during germination of dwarf fan palm seeds. *Plant Cell Physiol*, 59: 2490-2501.
- Siles L., Alegre L., Tijero V., Munné-Bosch S. (2015). Enhanced tocopherol levels during early germination events in *Chamaerops humilis* var. *humilis* seeds. *Phytochemistry*, 118: 1-8.
- Siles L., Cela J., Munné-Bosch S. (2013). Vitamin E analyses in seeds reveal a dominant presence of tocotrienols over tocopherols in the Arecaceae family. *Phytochemistry*, 95: 207-214.
- Silva A., Fernandes Â., García P., Barros L., Ferreira I. (2019). *Cytinus hypocistis* (L.) L. subsp. *macranthus* Wettst.: nutritional characterization. *Molecules*, 24: 1111.
- Silva A., Pinela J., Dias M., Calhella R., Alves M., et al. (2020). Exploring the phytochemical profile of *Cytinus hypocistis* (L.) L. as a source of health-promoting biomolecules behind its *in vitro* bioactive and enzyme inhibitory properties. *Food Chem Toxicol*, 136: 111071.

- Simancas B., Munné-Bosch S. (2015). Interplay between vitamin E and phosphorus availability in the control of longevity in *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot*, 116: 511-518.
- Simpson M. (2010). Plant morphology. In Simpson M. (Ed), *Plant systematics*, Elsevier, USA, pp 489-492.
- Singh S., Kaur I., Kariyat R. (2021). The multifunctional roles of polyphenols in plant-herbivore interactions. *Int J Mol Sci*, 22: 1442.
- Smith J., De Moraes C., Mescher M. (2009). Jasmonate- and salicylate-mediated plant defense responses to insect herbivores, pathogens and parasitic plants. *Pest Manag Sci*, 65: 497-503.
- Soba D., Müller M., Aranjuelo I., Munné-Bosch S. (2020). Vitamin E in legume nodules: occurrence and antioxidant function. *Phytochemistry*, 172: 112261.
- Soll J., Schultz G., Joyard J., Douce R., Block M. (1985). Localization and synthesis of prenylquinones in isolated outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. *Arch Biochem Biophys*, 238, 290- 299.
- Song WC., Brash A. (1991). Purification of an allene oxide synthase and identification of the enzyme as a cytochrome P-450. *Science*, 253; 781-784.
- Spallek T., Gan P., Kadota Y., Shirasu K. (2018). Same tune, different song-cytokinins as virulence factors in plant-pathogen interactions? *Curr Opin Plant Biol*, 44: 82-87.
- Spallek T., Melnyk C., Wakatake T., Zhang J., Sakamoto Y., et al. (2017). Interspecies hormonal control of host root morphology by parasitic plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 114: 5283-5288.

- Spurrier S., Smith K. (2007). Desert mistletoe (*Phoradendron californicum*) infestation correlates with blue palo verde (*Cercidium floridum*) mortality during a severe drought in the Mojave desert. *J Arid Environ*, 69: 189-197.
- Spychalla J., Desborough S. (1990). Superoxide dismutase, catalase, and α -tocopherol content of stored potato tubers. *Plant Physiol*, 94: 1214-1218.
- Staley J., Mortimer S., Masters G., Morecroft M., Brown V., Taylor M. (2006). Drought stress differentially affects leaf-mining species. *Ecol Entomol*, 31: 460-469.
- Strauss S., Agrawal A. (1999). The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Tree*, 14: 179-185.
- Sussmann R., Angeli C., Peres V., Kimura E., Katzin A. (2011). Intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* biosynthesize vitamin E. *FEBS Lett*, 585: 3985-3991.
- Sussmann R., Fotoran W., Kimura E., Katzin A. (2017). *Plasmodium falciparum* uses vitamin E to avoid oxidative stress. *Parasites Vectors*, 10: 461.
- Suzuki N., Koussevitzky S., Mittler R., Miller G. (2012). ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environ*, 35: 259-270.
- Švubová R., Lukacova Z., Kastier P., Blehová A. (2017). New aspects of dodder-tobacco interactions during haustorium development. *Acta Physiol Plant*, 39: 66.
- Švubová R., Ovečka M., Pavlovič A., Slováková L., Blehová A. (2013). *Cuscuta europaea* plastid apparatus in various developmental stages. *Plant Signal Behav*, 8: 5.
- Takahashi F., Kuromori T., Urano K., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2020). Drought stress responses and resistance in plants: from cellular responses to long-distance intercellular communication. *Front Plant Sci*, 11: 556972.

- Taki N., Sasaki-Sekimoto Y., Obayashi T., Kikuta A., Kobayashi K., 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 Physiol*, 139: 1268-1283.
- Tardío J., Pardo-de-Santayana M., Morales R. (2006). Ethnobotanical review of wild edible plants in Spain. *Bot J Linn Soc*, 152: 27-71.
- Teshome D., Zharare G., Naidoo S. (2020). The threat of the combined effect of biotic and abiotic stress factors in forestry under a changing climate. *Front Plant Sci*, 11: 601009.
- Těšitel J., Li AR., Knotková K., McLellan R., Bandaranayake P., et al. (2021). The bright side of parasitic plants: what are they good for? *Plant Physiol*, 185: 1309-1324.
- Těšitel J., Plavcová L., Cameron D. (2010). Interactions between hemiparasitic plants and their hosts. *Plant Signal Behav*, 5: 1072-1076.
- Thalouarn P., Rey L., Renaudin S. (1986). Carbon nutrition in a Rafflesiaceae holoparasite *Cytinus hypocistis* L. fixed on, or experimentally isolated from the host *Cistus monspeliensis* L. *J Plant Physiol*, 123: 271-281.
- Thines B., Katsir L., Melotto M., Niu Y., Mandaokar A., et al. (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF^{COI1} complex during jasmonate signalling. *Nature*, 448: 661-665.
- Thorogood C., Hiscock S. (2007). Host specificity in the parasitic plant *Cytinus hypocistis*. *Res Lett Ecol*, 2007: 84234.
- Tjiurutue M., Sandler H., Kersch-Becker M., Theis N., Adler L. (2017). Gypsy moth herbivory induced volatiles and reduced parasite attachment to cranberry hosts. *Oecologia*, 185: 133-145.

- Torre I., Díaz M. (2004). Small mammal abundance in Mediterranean post-fire habitats: a role for predators? *Acta Oecol*, 25: 137-143.
- Torres-Vera R., García J., Pozo M., López-Ráez J. (2016). Expression of molecular markers associated to defense signaling pathways and strigolactone biosynthesis during the early interaction tomato-*Pelipanche ramosa*. *Physiol Mol Plant Pathol*, 94: 100-107.
- Triantaphylidès C., Krischke M., Hoeberichts A., Ksas B., Gresser G., et al. (2008). Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. *Plant Physiol*, 148: 960-968.
- Tsai YH., Manos P. (2010). Host density drives the postglacial migration of the tree parasite, *Epifagus virginiana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 17035-17040.
- Tuteja N. (2007). Absciscic acid and abiotic stress signaling. *Plant Signal Behav*, 2: 135-138.
- Twyford A. (2018). Parasitic plants. *Curr Biol*, 28: R847-R870.
- Ueda J., Kato J. (1980). Isolation and identification of a senescence-promoting substance from wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *Plant Physiol*, 66: 246-249.
- Valentin H., Lincoln K., Moshiri F., Jensen P., Qi Q., et al. (2006). The *Arabidopsis vitamin E pathway gene5-1* mutant reveals a critical role for phytol kinase in seed tocopherol biosynthesis. *Plant Cell*, 18: 212-224.
- Van der Kooij T., Krause K., Dörr I., Krupinska K. (2000). Molecular, functional and ultrastructural characterisation of plastids from six species of the parasitic flowering plant genus *Cuscuta*. *Planta*, 210: 701- 707.

- Van der Kooij T., Krupinska K., Krause K. (2005). Tocochromanol content and composition in different species of the parasitic flowering plant genus *Cuscuta*. *J Plant Physiol*, 162: 777-781.
- Van Wijk K., Kessler F. (2017). Plastoglobuli: plastid microcompartments with integrated functions in metabolism, plastid developmental transitions and environmental adaptation. *Annu Rev Plant Biol*, 68: 253-289.
- Vega-Muñoz I., Duran-Flores D., Fernández-Fernández A., Heyman J., Ritter A., et al. (2020). Breaking bad news: dynamic molecular mechanisms of wound response in plants. *Front Plant Sci*, 11: 610445.
- Verma S., Nizam S., Verma P. (2013). Biotic and abiotic stress signaling in plants. In Sarwat M., Ahmad A., Abdin MZ (Ed), *Stress signaling in plants: genomics and proteomics perspective*, Springer Science, USA, pp 25-49.
- Vidi PA., Kanwlscher M., Baglinsky S., Austin J., Csucs G., et al. (2006). Tocopherol cyclase (VTE1) localization and vitamin E accumulation in chloroplast plasoglobule lipoprotein particles. *J Biol Chem*, 281: 11225-11234.
- Visser J. (1981). *South African parasitic flowering plants*. Capetown, South Africa: Juta & Co.
- Viswanath K., Varakumar P., Pamuru R., Basha S., Mehta S., et al. (2020). Plant lipoxygenases and their role in plant physiology. *J Plant Biol*, 63: 83-95.
- Vom Dorp K., Hölzl G., Plohm C., Eisenhut M., Abraham M., et al. (2015). Remobilization of phytol from chlorophyll degradation is essential for tocopherol synthesis and growth of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 27: 2846-2859.
- Wakatake T., Ogawa S., Yoshida S., Shirasu K. (2020). An auxin transport network underlies xylem bridge formation between the hemi-parasitic plant

Phtheirospermum japonicum and host *Arabidopsis*. Development, 147: dev187781.

Wang KD., Borrego E., Kenerley C., Kolomiets M. (2020). Oxylipins other than jasmonic acid are xylem-resident signals regulating systemic resistance induced by *Trichoderma virens* in maize. Plant Cell, 32: 166-185.

Wasternack C. (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. Ann Bot, 100: 681-697.

Wasternack C., Hause B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. Ann Bot, 111: 1021-1058.

Wasternack C., Hause B. (2016). OPDA-Ile – a new JA-Ile-independent signal?. Plant Signal Behav, 11: e1253646.

Wasternack C., Strnad M. (2016). Jasmonate signaling in plant stress responses and development – active and inactive compounds. New Biotechnol, 33: 5.

Watling J., Press M. (2001). Impacts of infection by parasitic angiosperms on host photosynthesis. Plant Biol, 3: 244-250.

Watson D. (2009). Determinants of parasitic plant distribution: the role of host quality. Botany, 87: 16-21.

Webb DA. (1964). *Cytinus*. In Tutin TG., Heywood VH., Burges NA., Valentine DH., Walters SM., Webb DA. (Ed), Flora Europaea, UK, Cambridge University Press, pp 75.

- Weber H., Chételat A., Reymond P., Farmer E. (2004). Selective and powerful stress gene expression in *Arabidopsis* in response to malondialdehyde. *Plant J*, 37: 877-888.
- Werner T., Motyka V., Strnad M., Schmülling T. (2001). Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 10487-10492.
- Westfall C., Zubieta C., Herrmann J., Kapp U., Nanao M., et al. (2012). Structural basis for prereceptor modulation of plant hormones by GH3 proteins. *Science*, 336: 1708-1711.
- Westwood J., Yoder J., Timko M., de Pamphilis C. (2010). The evolution of parasitism in plants. *Trends Plant Sci*, 15: 227-235.
- White T. (1984). The abundance of invertebrate herbivores in relation to the availability of nitrogen in stressed food plants. *Oecologia*, 63: 90-105.
- Wicke S., Müller K., dePamphilis C., Quandt D., Bellot S., et al. (2016). Mechanistic model of evolutionary rate variation en route to a nonphotosynthetic lifestyle in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 113: 9045-9050.
- Wink M. (2018). Plant secondary metabolites modulate insect behavior-steps toward addiction? *Front Physiol*, 9:364.
- Wolinska K., Berens M. (2019). Optimal defense theory 2.0: tissue-specific stress defense prioritization as an extra layer of complexity. *Commun Integr Biol*, 12: 91-95.
- Wolucka B., Goossens A., Inzé D. (2005). Methyl jasmonate stimulates the *de novo* biosynthesis of vitamin C in plant cell suspensions. *J Exp Bot*, 56: 2527-2538.

- Xu L., Liu F., Lechner E., Genschik P., Crosby W., et al. (2002). The SCF^{COI1} ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 14: 1919-1935.
- Yang H., Shukla M., Mao X., Kang S., Du T. (2019). Interactive regimes of reduced irrigation and salt stress depressed tomato water use efficiency at leaf and plant scales by affecting leaf physiology and stem sap flow. *Front Plant Sci*, 10: 160.
- Yang W., Cahoon E., Hunter S., Zhang C., Han J., et al. (2011). Vitamin E biosynthesis: functional characterization of the monocot homogentisate geranylgeranyl transferase. *Plant J*, 65: 206-217.
- Yoshida S., Cui S., Ichihashi Y., Shirasu K. (2016). The haustorium, a specialized invasive organ in parasitic plants. *Annu Rev Plant Biol*, 67: 643-667.
- Zagorchev L., Stöggli W., Teofanova D., Li J., Kranner I. (2021). Parasites under pressure: effects of abiotic stress on the interactions between parasitic plants and their hosts. *Int J Mol Sci*, 22: 7418.
- Zamora E., Mellado A. (2019). Identifying the abiotic and biotic drivers behind the elevational distribution shift of a parasitic plant. *Plant Biol*, 21: 307-317.
- Zhang H., Zhao Y., Zhu JK. (2020). Thriving under stress: how plants balance growth and the stress response. *Dev Cell*, 55: 529-543.
- Zhao Y., Dong W., Zhang N., Ai X., Wang M., et al. (2014). A wheat allene oxide cyclase gene enhances salinity tolerance via jasmonate signaling. *Plant Physiol*, 164: 1068-1076.
- Zheng Z., Han N., Liu C., Buerte B., Zhou C., et al. (2020). Functional dissection of *HGGT* and *HPT* in barley vitamin E biosynthesis via CRISPR/Cas9-enabled genome editing. *Ann Bot*, 126: 929-942.

Zhou DS., Wang CZ., van Loon J. (2022). Habituation to a deterrent plant alkaloid develops faster in the specialist herbivore *Helicoverpa assulta* than in its generalist congener *Helicoverpa armigera* and coincides with taste neuron desensitization. *Insects*, 13: 21.

Zhuang H., Li J., Song J., Hettenhausen C., Schuman M., et al. (2018). Aphid (*Myzus persicae*) feeding on the parasitic plant dodder (*Cuscuta australis*) activates defense responses in both the parasite and soybean host. *New Phytol*, 218: 1586-1596.

Zimmermann M., Maischak H., Mithöfer A., Boland W., Felle H. (2009). System potentials, a novel electrical long-distance apoplastic signal in plants, induced by wounding. *Plant Physiol*, 149: 1593-1600.

ANNEXOS



ANNEX I



Resposta de *Cistus albidus* L. a l'herbivorisme en condicions naturals

Annex I, complementari al Capítol 3. Contrast estacional en la incidència de l'estrès abiòtic i l'herbivorisme en plantes de *Cistus albidus* L. creixent en el seu hàbitat natural en una muntanya mediterrània

En aquest annex s'han analitzat els continguts de vitamina E i de jasmonats de les mostres foliars de *C. albidus* en condicions naturals mediterrànies del **Capítol 3**. Les fulles analitzades de les plantes amb danys per herbivorisme no mostraven danys per herbivorisme i per tant són comparables a la resta de mostres analitzades al **Capítol 3**.

A partir d'extraccions metanòliques es van realitzar les diferents anàlisis bioquímiques. 100 mg de material vegetal congelat i completament triturat es van diluir en 500 µl de metanol pur 100%. Després de passar-ho pel vòrtex (TopMix FB15024 Fisher Scientific) per facilitar la disrupció cel·lular, es van aplicar ultrasons durant 30 minuts amb el sonicador (Branson 2510). Seguidament es va centrifugar l'extracte durant 10 minuts a 1300rpm (Jouan MR 1822) i es va recuperar el sobrenedant. Per tal de no alterar la composició de l'extracte, el sobrenadant es va guardar a 4°C en condicions de foscor. Aquest procés es va repetir dues vegades més (dues re-extraccions) i finalment, es van recol·lectar els tres sobrenadants recuperats durant el procés d'extracció i es van enrasar amb metanol fins a un volum de 1.5 ml. Amb aquests extractes es van realitzar les anàlisis de tococromanols i les anàlisis hormonals.

Les formes de α - i γ -tocoferols es van analitzar amb la tècnica de cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) tal i com descriuen Cela et al. (2011). Es van injectar 300 µl de cada extracte a l'equip d'HPLC (Waters 600 controller pump, Waters 714 plus auto-sampler i Jasco FP-1520 fluorescence detector). Es va utilitzar una mescla d'*n*-hexà i 1,4-dioxà (95.5: 4.5, v/v) com a solvent, a un flux de 0.7 ml/minut. Els diferents tococromanols es van separar en una columna de fase normal (Intersil 100A, 5 µm, 30 x 250mm, GL Sciences Inc, Japan). La detecció per fluorescència es va realitzar a una longitud d'ona d'excitació de 295 nm i d'emissió de 330 nm. Els estàndards d' α - i γ -tocoferol (Sigma-Aldrich) es van utilitzar pel calibratge.

El perfil de jasmonats, incloent el JA, el seu precursor (OPDA) i la forma amino-conjugada JA-Ile, a més de l'àcid abscísic, i l'àcid salicílic, es van quantificar mitjançant la cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses de

ionització per electroesprai en tàndem (UHPLC/ESI-MS/MS) com descriuen Müller i Munné-Bosch (2011). Totes les hormones analitzades es van analitzar mitjançant

el mode per a ions negatius. 100 µl de l'extracte amb els estàndards de les hormones deuterades (afegits des del principi del procés d'extracció) es van filtrar utilitzant filtres hidrofòbics de 0.22 µm PTFE (Waters, milford, MA, USA) i es van injectar a l'equip de UHPLC/ESI-MS/MS.

Les anàlisis estadístiques es van realitzar mitjançant l'ANOVA de tres factors per a determinar l'efecte de l'edat, l'orientació i de l'estacionalitat utilitzant un model GLS per a tractar amb la heterogeneïtat de les dades, l'ANOVA de dos factors per a determinar l'efecte de l'orientació i de l'estacionalitat utilitzant el mateix model, i l'ANOVA d'un factor es fa utilitzar per a avaluar l'efecte de la categoria d'herbivorisme sobre els nivells de jasmonats. Les comparacions múltiples van ser testades amb el test de Tukey HSD. Totes les diferències es van considerar significatives quant $P \leq 0.05$. La normalitat i homoscedasticitat dels residus es van revisar segons descriu Zuur et al. (2009). Les anàlisis correlatives es van realitzar mitjançant el test de correlacions de Spearman. Tots els tests estadístics es van realitzar utilitzant el software estadístic R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Referències

- 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 Cell Physiol*, 52: 1389-1400.
- 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.
- Zuur, A., Ieno, E., Elphick, C. (2009). A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods Ecol Evol*, 1: 3–14.

Taula 1. Resultats de l'ANOVA de tres factors analitzant l'efecte de l'edat sobre tots els paràmetres estudiats. Es mostren els p-valors. NS: no significatiu: P-valor >0.05.

Variable	Edat	Estacionalitat	Orientació	Edat x		Estacionalitat x Orientació	Edat x	
				Estacionalitat	Orientació		Estacionalitat	Orientació
Herb_total	NS	P<0,001	NS	NS	NS	P= 0,003	NS	NS
Fv/Fm	NS	P<0,001	NS	NS	NS	P<0,001	NS	NS
RWC	NS	P<0,001	NS	NS	NS	P<0,001	NS	NS
H	NS	P<0,001	NS	NS	NS	P= 0,007	NS	NS
Chl a/b	NS	P<0,001	NS	NS	NS	P<0,001	NS	NS
Chl a+b	NS	P<0,001	NS	NS	NS	NS	NS	NS
α -Toc	NS	P<0,001	P= 0,024	NS	NS	P<0,001	NS	NS
α -Toc/Chl	NS	P<0,001	NS	NS	P= 0,040	P<0,001	NS	NS
γ -Toc	NS	P<0,001	P<0,001	NS	NS	NS	NS	NS
γ -Toc/Chl	NS	P<0,001	P<0,001	NS	P=0,020	NS	NS	NS
vit.E	NS	P<0,001	P= 0,019	NS	NS	P<0,001	NS	NS
vit.E/Chl	NS	P<0,001	NS	NS	P= 0,040	P<0,001	NS	NS

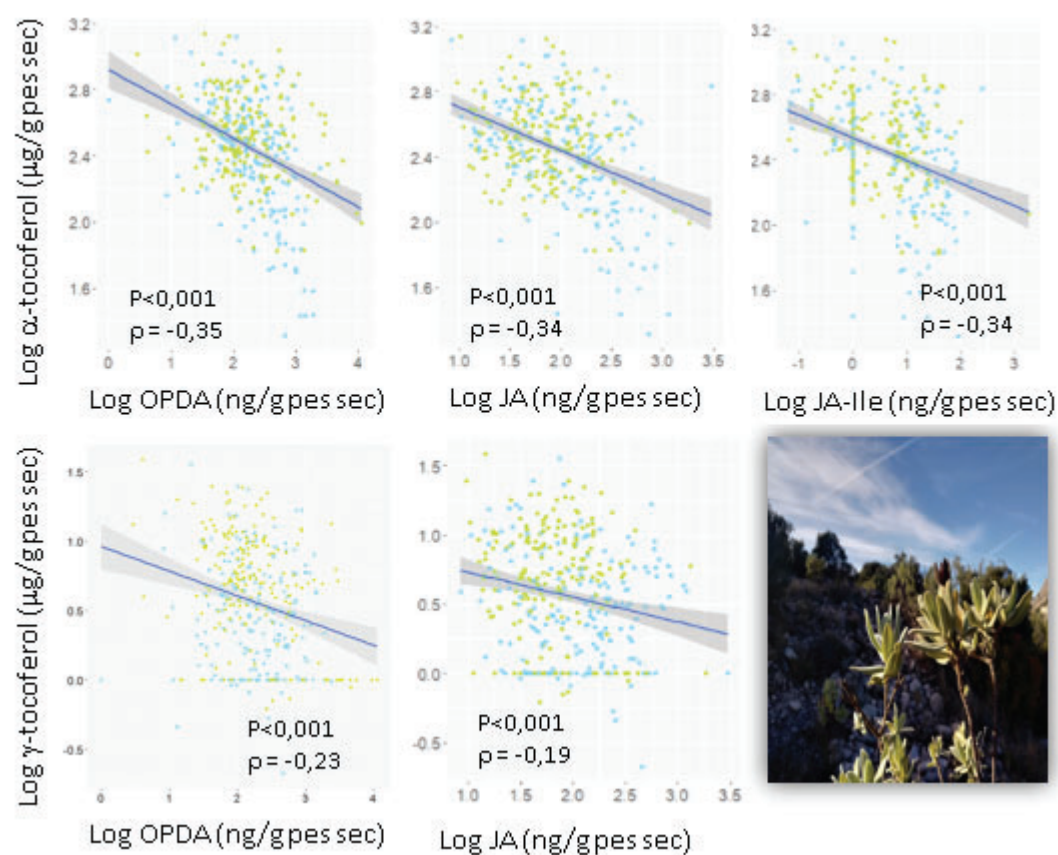


Figura 1. Correlacions entre els continguts de vitamina E i de jasmonats en les fulles de *C. albidus* en condicions naturals al llarg d'un any (n=400). Les dades han estat transformades a logaritme per tal d'aconseguir el millor ajust de la correlació.

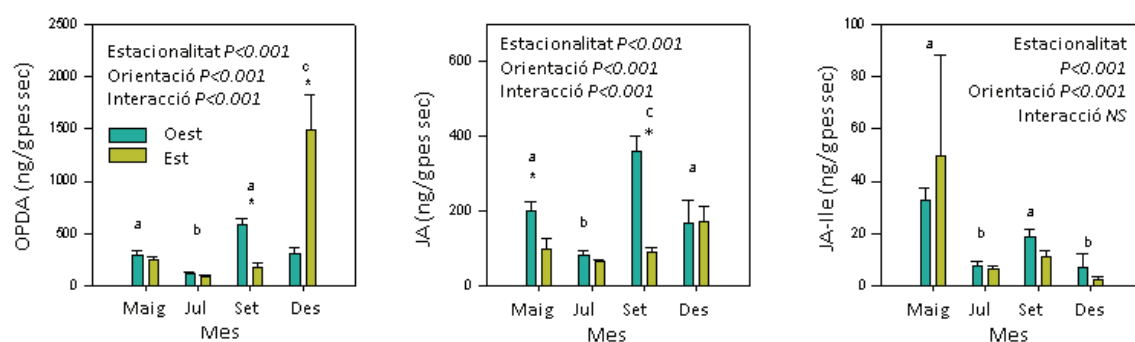


Figura 2. Nivells de jasmonats (OPDA, JA, JA-Ile) expressats en ng/g pes sec en les fulles de *C. albidus* en condicions naturals al llarg de les diferents estacions de l'any. La meitat de la població creixia en la vessant est ($n=50$) de la muntanya i l'altra meitat a l'oest ($n=50$). Els resultats són la mitjana de $n=50 \pm$ error estàndard. Els P valors de l'ANOVA de dos factors són a les cantonades i els P valors $> 0,05$ es consideren no significatius. Les diferents lletres representen diferències entre estacions i els asteriscs representen diferències entre els grups de cada vessant de la muntanya en cada estació.

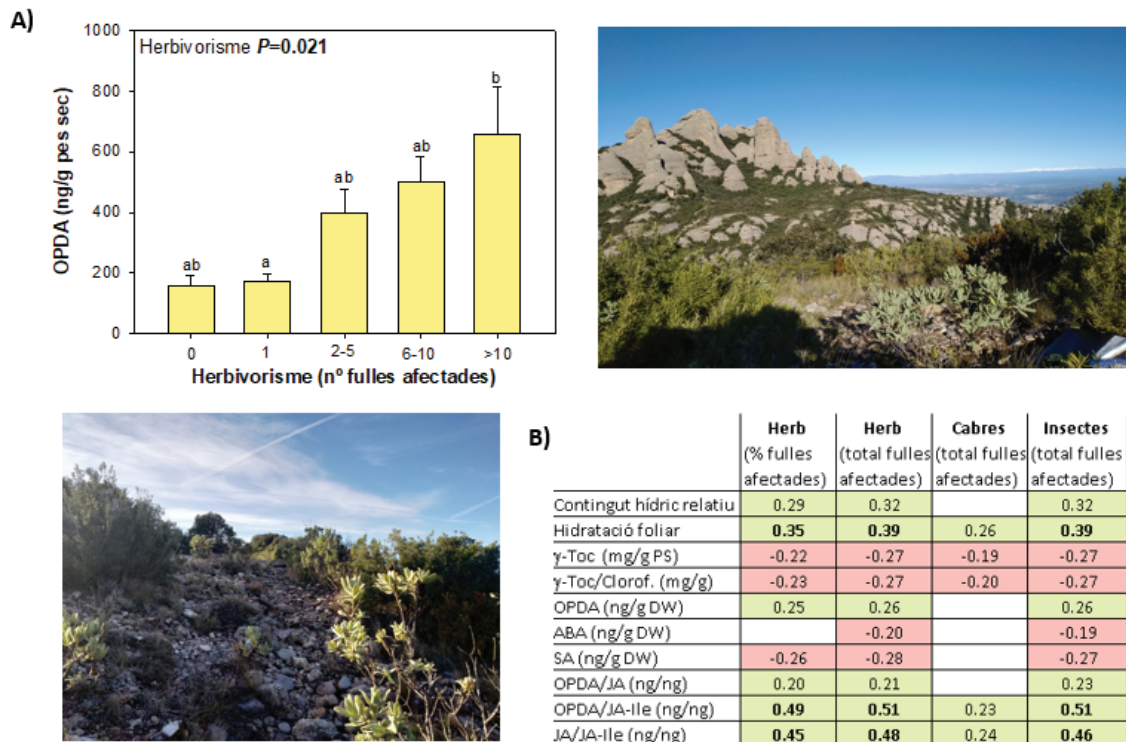


Figura 3. La resposta a l'herbivorisme en les fulles de *C. albidus* en condicions naturals al llarg d'un any. A) Nivells d'OPDA de les fulles no afectades segons les diferents categories d'herbivorisme a nivell de planta expressats en ng/g pes sec per tal d'exemplificar la resposta a l'herbivorisme. Les plantes estan classificades en grups segons el grau d'herbivorisme i sense tenir en compte en quina estació de l'any ni en quina vessant es trobaven. Els resultats són la mitjana de: 0 fulles afectades per herbivorisme $n=33 \pm \text{error estàndard}$, 1 fulla afectada $n=53 \pm \text{error estàndard}$, de 2 a 5 fulles afectades $n=149 \pm \text{error estàndard}$, de 6 a 10 fulles afectades $n=76 \pm \text{error estàndard}$, més de 10 fulles afectades $n=79 \pm \text{error estàndard}$. Es mostra el resultat de l'ANOVA d'un factor, considerant no significatiu $P > 0.05$. B) Taula de correlacions de l'herbivorisme amb tots els paràmetres mesurats al **Capítol 3**. Només es mostren les correlacions amb $P < 0.001$ en el test de correlacions d'Spearman. El coeficient de correlació es mostra escrit dins els quadrats, verds per a les correlacions positives i vermells per a les negatives.

ANNEX II



Interaccions planta holoparàsita-hoste i el seu impacte en els ecosistemes mediterranis

Annex II. Holoparasitic plant-host interactions and their impact on Mediterranean ecosystems.

Andrea Casadesús, Sergi Munné-Bosch

Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Research Institute in Biodiversity (IrBio), University of Barcelona, Barcelona, Spain

Research Institute of Nutrition and Food Safety (INSA), Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Publicat a Plant Physiology, 2021, 185: 1325-1338.

Tot i que la fotosíntesi és essencial per sustentar la vida a la Terra, no totes les plantes utilitzen la llum del Sol per sintetitzar nutrients a partir del diòxid de carboni i l'aigua. Les plantes holoparàsites, les quals són importants tant als ecosistemes agrícoles com als naturals, depenen d'altres plantes per aconseguir nutrients. Les fitohormones són crucials en les interaccions planta holoparàsita-hoste, des de la germinació de les llavors fins a la senescència, no només perquè actuen com a reguladores del creixement i el desenvolupament, sinó també pel seu rol central en la regulació de la fotosíntesi de l'hoste i les relacions font-embornal entre l'hoste i la planta holoparàsita. Es compila i discuteix aquí el coneixement actual sobre l'impacte i l'ecofisiologia de les plantes holoparàsites (com les espècies de frares, *Orobanche* sp. i *Phelipanche* sp.) que infecten cultius de dicotiledònies econòmicament importants als ecosistemes agrícoles mediterranis (llegums [Fabaceae], girasols [*Helianthus* sp.], o tomaqueres [*Solanum lycopersicum*]). També es ressalta el rol de les interaccions planta holoparàsita-hoste (tal com la que hi ha entre *C. hypocistis* i diversos arbustos del gènere *Cistus*) en la modulació dels ecosistemes mediterranis naturals. També es discuteix el rol de les fitohormones en el control de les interaccions planta-hoste, els factors abiòtics en el parasitisme, i la importància biològica dels bancs de llavors naturals i com es regulen la dormició i la germinació. Les plantes holoparàsites són organismes únics, i enriquir el nostre coneixement de la seva interacció amb els hostes com a models d'estudi ens ajudarà a gestionar millor les plantes paràsites, tant en ecosistemes agrícoles com naturals.

Holoparasitic plant–host interactions and their impact on Mediterranean ecosystems

Andrea Casadesús^{1,2} and Sergi Munné-Bosch ^{1,2,3,*†}

¹ Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain

² Research Institute in Biodiversity (IrBio), University of Barcelona, Barcelona, Spain

³ Research Institute of Nutrition and Food Safety (INSA), Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

*Author for Communication: smunne@ub.edu (S.M.-B.).

†Senior author.

S.M.-B. conceived the idea and prepared the outline. A.C. wrote the manuscript with the help of S.M.-B. A.C. prepared figures and boxes. S.M.-B. revised and edited the final manuscript.

The author responsible for the distribution of materials integral to the findings presented in this article, in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (<https://academic.oup.com/plphys/pages/general-instructions>) is: Sergi Munné-Bosch (smunne@ub.edu).

Abstract

Although photosynthesis is essential to sustain life on Earth, not all plants use sunlight to synthesize nutrients from carbon dioxide and water. Holoparasitic plants, which are important in agricultural and natural ecosystems, are dependent on other plants for nutrients. Phytohormones are crucial in holoparasitic plant–host interactions, from seed germination to senescence, not only because they act as growth and developmental regulators, but also because of their central role in the regulation of host photosynthesis and source–sink relations between the host and the holoparasitic plant. Here, we compile and discuss current knowledge on the impact and ecophysiology of holoparasitic plants (such as the broomrapes *Orobanch* sp. and *Phelipanche* sp.) that infest economically important dicotyledonous crops in Mediterranean agroecosystems (legumes [Fabaceae], sunflowers [*Helianthus* sp.], or tomato [*Solanum lycopersicum*] plants). We also highlight the role of holoparasitic plant–host interactions (such as those between *Cytinus hypocistis* and various shrubs of the genus *Cistus*) in shaping natural Mediterranean ecosystems. The roles of phytohormones in controlling plant–host interactions, abiotic factors in parasitism, and the biological significance of natural seed banks and how dormancy and germination are regulated, will all be discussed. Holoparasitic plants are unique organisms; improving our understanding of their interaction with hosts as study models will help us to better manage parasitic plants, both in agricultural and natural ecosystems.

Introduction

Mediterranean-type climate ecosystems, with generally warm, dry summers, and wet, mild winters, are characterized by a great diversity in vegetation and occupy large natural vegetation areas in different regions of the world (from the well-known chaparral and woodlands ecoregion of California to the sclerophyll forests in south Australia, including the Chilean matorral, the Western Cape of South Africa and the Mediterranean basin). Indeed, a comparison of Mediterranean-type climate ecosystems in different parts of the world not only allows a test for ecological convergence, but also helps in understanding key ecophysiological and

ADVANCES

- Mediterranean ecosystems represent unique environments to study holoparasitic plant–host interactions
- Holoparasitic plants cause severe reductions in productivity, but can also exert positive effects on diversity in natural ecosystems
- A bidirectional flux of phytohormones occurs in holoparasitic plant–host interactions
- The establishment of seed banks is essential for the success of both *Orobanch* and *Cytinus* infection in Mediterranean ecosystems

population processes (Kalin Arroyo et al., 1995; Rundel, 2019). Furthermore, the declining water balance due to global change has been documented for several Mediterranean natural and agricultural ecosystems in the last decades, to the extreme that in certain North African countries, where rainfed agriculture represents more than 90% of total agricultural land, climate change may result in surface water reductions of more than 35% (Skuras and Psaltopoulos, 2012). Both agricultural and natural Mediterranean ecosystems are subject to similar abiotic factors that shape holoparasitic plant–host interactions in these unique environments and improving our understanding of these interactions can undoubtedly help us manage parasitic plants better both in natural and agricultural ecosystems. About 1% of angiosperms are parasitic plants (Press et al., 1999; Twyford, 2018; Nickrent, 2020). Both agroecosystems and natural ecosystems are shaped by biotic and abiotic factors that modulate the growth and development of organisms that form them. The interaction between holoparasitic plants (see definitions in Glossary Box) and their hosts indirectly but strongly affects the interactions of the host with other elements of these ecosystems. These include other plant species which are important competitors with parasitic plants, pollinators, herbivores, mycorrhizae, nitrogen-fixing microorganisms, and other species that live in contact with the host plant such as insects, as well as other parasitic organisms (Bouwmeester et al., 2007; Bennett and Bever, 2007; Cahill et al., 2008; Zhuang et al., 2018). The study of holoparasites and the interactions with their hosts is therefore essential not only to understand better the delicate balance of Mediterranean ecosystems, a major source of global biodiversity, but also in the search for alternatives to improve crop management and reduce the yield losses due to holoparasitic plants that currently occur in Mediterranean agroecosystems (Runyon et al., 2009).

Parasitic plants have evolved independently at least 12 times in angiosperms (Twyford, 2018), and they can be found in almost every ecosystem (Westwood et al., 2010). Since they lack photosynthesis capability, holoparasitic plants obtain all their water, carbon, and nutrients from their hosts, through a basic connective structure: the haustorium. As parasitic plants evolved from autotrophic ancestors, they conserve most of the characteristic features of those plants at the cellular level, such as cell walls and plastids (Clarke et al., 2019); but, in contrast to hemiparasites, holoparasites show extensive reductions in their plastid genome and have lost the capacity to perform photosynthesis (Bungard, 2004; McNeal et al., 2007; Cusimano and Wicke, 2016; Roquet et al., 2016). It has been proposed that the plastid genome in holoparasites could have come from their host through kleptoplasty (Krause, 2015). Despite chloroplasts in holoparasitic plants have experienced genome downsizing and gene loss/pseudogenization, these organisms conserve several of the basic features of autotrophic plants at the genetic, biochemical, and physiological levels, and respond to chemical and tactile signals, volatile organic

compounds (VOCs), light, or hormone secretion from the host (Clarke et al., 2019). So holoparasitic plants, which are relatively easy to manipulate (at least compared to several animal parasites), provide a very interesting model through which to study interactions between organisms, which is essential to understand some aspects of basic biology better, as well as allowing us to understanding better their impact on natural and agroecosystems.

Although some aspects of the impact of holoparasitic plants on agriculture and natural ecosystems, including insights into their evolution, have been reviewed earlier (Bungard, 2004; de Vega et al., 2008, 2009, 2010; Runyon et al., 2009; Roquet et al., 2016), there has been no comparative analysis of parasitic plant–host interactions in Mediterranean ecosystems to date. Here, we aim to go beyond a descriptive analysis of holoparasitic plant–host interactions by discussing these plant–plant interactions at the physiological level (including both ecological and molecular aspects), as central shapers of productivity in both agricultural and natural Mediterranean ecosystems. We will not only discuss recent advances in our understanding of the holoparasitic plant–host interactions, but we will also focus on the role of phytohormones in controlling plant–host interactions and the biological significance of natural seed banks together with how dormancy and germination are regulated in these ecosystems. This knowledge has important applications, not only in agronomy and agri-food biotechnology for improving yields and the quality of produce, but also in environmental management.

Productivity loss in Mediterranean ecosystems

The presence of parasitic plants reduces the aboveground biomass of plant communities, changes the structure of the associated microbial communities, and enhances soil nutrient cycling (resulting, among other effects, in an increased rate of nitrogen mineralization) in both agricultural and natural Mediterranean ecosystems (Quested, 2008; Li et al., 2014). Indeed, the nitrogen content of the host strongly affects the performance of holoparasites in both natural settings and agroecosystems, so that nitrogen fertilization in agroecosystems has generally been shown to reduce the severity of parasitic infestation due to an improvement of host vigor (Jeschke and Hilpert, 1997; Shen et al., 2013). Far more nitrogen is usually available in Mediterranean agroecosystems than in natural ecosystems, due to the crop fertilization treatments (Velthof et al., 2011), and this may have a strong impact on holoparasitic infestations. This human activity that makes more nitrogen available in natural ecosystems can also affect the spread of holoparasites, thus influencing the composition of plant communities within the current framework of global change (Pennings and Simpson, 2008).

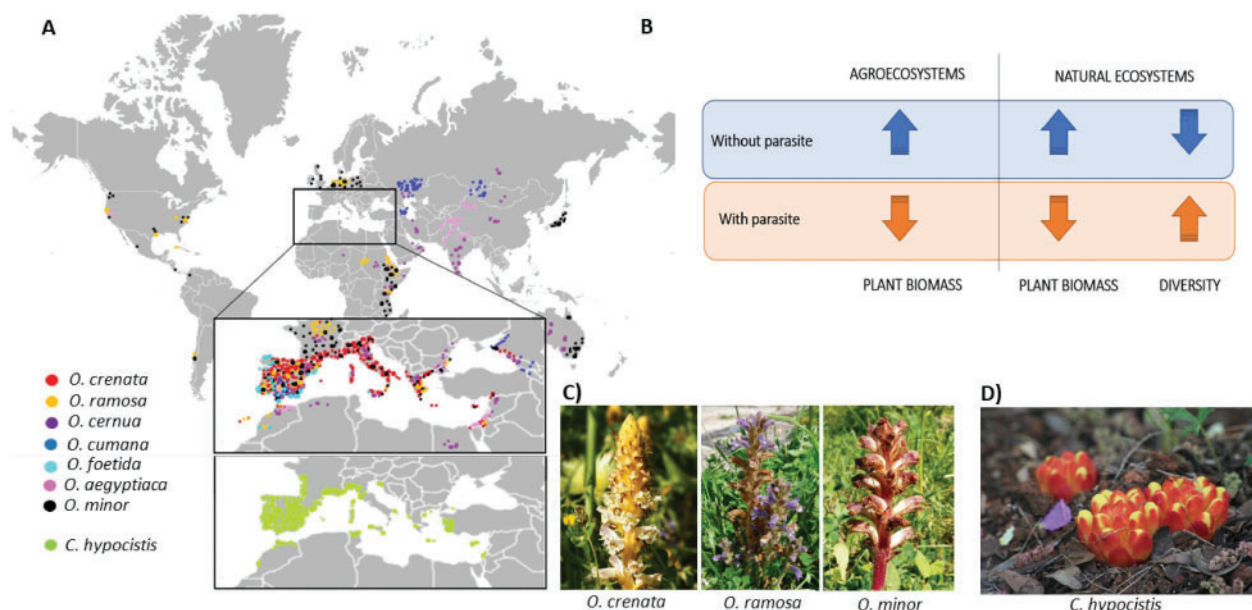


Figure 1 Occurrence of holoparasites in Mediterranean ecosystems. A, Global distribution of *Orobancha* species and *Cytinus hypocistis*. B, Graphical representation of the impact of holoparasitic plants on agricultural and natural Mediterranean ecosystems. C, Photographs showing three examples of broomrapes, including *O. crenata*, *O. ramosa* and *O. minor*, which are typical from Mediterranean agroecosystems. D, Photograph of *Cytinus hypocistis*, which occurs naturally in the Mediterranean basin.

Impact of holoparasitic plants on Mediterranean agroecosystems

Parasitic plants pose a serious problem for agronomy that affects many parts of the world, due to the limited management tools that are available to control them, and Mediterranean-type ecosystems are not an exception. The most important parasitic plants in agriculture all over the globe are witchweed (*Striga* spp.), dodder (*Cuscuta* spp.), and broomrapes (*Orobancha* spp. and *Phelipanche* spp.). *Striga* spp. are root hemiparasites, which cause major problems for cereal production in resource-limited agriculture, as occurs in several areas of Africa (Scholes and Press, 2008). In contrast, *Cuscuta* spp. are holoparasites that attach themselves to the shoots of host plants, such as sugar beet (*Beta vulgaris*), onion (*Allium cepa*), citrus (*Rutaceae*), or forage legumes, among other crops, causing severe losses, mainly in Asia (Albert et al., 2008; Runyon et al., 2009), although they are widely distributed around the world (Dawson et al., 1994; Holm et al., 1997; Martinčová et al., 2019). *Orobancha* spp. and *Phelipanche* spp. are holoparasites that infest the roots of their host, including legumes, tomato, potato (*Solanum tuberosum*), sunflowers, and other important crops around the world (Parker and Riches, 1993; Parker, 2009), including several agroecosystems with a Mediterranean climate (or Mediterranean-type ecosystems, not only in the Mediterranean basin, but also in California, Chile, and Australia; Figure 1).

Parasitic plants cause yield losses ranging from 7% to 90% in Mediterranean agroecosystems (Sauerborn, 1991; Ennami et al., 2017, 2020). In Mediterranean agriculture, it has been estimated that some holoparasitic plants such as *Orobancha* spp. infest 16 million hectares, with an impact on yields of

20%–100% (Parker, 2009). However, the current status of infestation is difficult to assess due to farmers deciding to abandon traditional varieties of crops when they suffer infestations (Westwood et al., 2010). Broomrapes are widely distributed across the Mediterranean region (Figure 1A) and affect important crops in different ways. The most negative influence of bean broomrape (*O. crenata*) is on faba bean (*Vicia faba*) cultivars; but pea (*Pisum* spp.), lentil (*Lens esculenta*), vetch (*Vicia sativa*), chickpea (*Cicer arietinum*), and carrot (*Daucus carota*), among others, may also be severely affected. It has been estimated that 4 million Ha of legumes could be at risk in the Mediterranean region (reviewed by Parker, 2009). *Orobancha foetida* also parasitizes faba beans, as well as vetch and chickpea, but with less effect than *O. crenata*; while *O. cumana* parasitizing sunflowers has been a serious problem for centuries. *O. cernua* infests most *Solanaceae* crops, including tomato, tobacco (*Nicotiana tabacum*), pepper (*Capsicum annuum*), and eggplant (*Solanum melongena*; Mohamed et al., 2006; Parker, 2009). Tomato, potato, and tobacco plants are also affected by *O. ramosa* (syn. *Phelipanche ramosa*), with reported losses to tomato production of up to 80% (Díaz et al., 2006). *Orobancha aegyptiaca* (syn. *P. aegyptiaca*) shares most hosts with *O. ramosa* (syn. *P. ramosa*) in addition of rapeseeds (*Brassica napus*) and cucurbits (*Cucurbitaceae*). Finally, *O. minor* is the *Orobancha* species that causes the least losses, affecting clovers (*Trifolium* spp.) and alfalfa (*Medicago sativa*; Parker and Riches, 1993; Parker, 2009).

Key physiological traits of the parasite–host connection make host damage inevitable. Once the haustoria (the vascular system connecting the parasitic plant and the host) is formed, parasitic plants start to receive nourishment from

host-derived nutrients. The phloem connection with the host allows broomrapes to take advantage of nutrients, water, carbon and reduced nitrogen, as holoparasites act as a powerful sink for the host (Joel et al., 2007; Pielach et al., 2014). In addition, key biological traits contribute to the success of the parasite. By producing a very large number of seeds, which are small and light, the parasite can achieve great dispersion. Furthermore, hard seeds with water-impermeable coatings (Bouman and Meyer, 1994; Delavault, 2015) helps them retain germination capability for several years, and the need for host root exudates before germination assists the formation of a reserve or “seed bank” in the soil. In addition, rapid fixation to host roots, the synchronization of the parasite life cycle with that of the host, and the notable independence from environmental factors of this interaction at initial stages also contribute to parasite success (Gibot-Leclerc et al., 2012). Eventually, after successful establishment of parasitization, the impact of holoparasitic plants on photosynthetic performance together with the hormonal imbalance produced in the host result in severe growth reductions in the crop (Watling and Press, 2001; Zhuang et al., 2018; Figure 1B). Despite not always being successful, several strategies have been developed to reduce the impact of holoparasitic plants on Mediterranean agroecosystems (Box 1).

Impact of holoparasitic plants on natural Mediterranean ecosystems

Parasitic plants are present in most natural plant communities and play an important role in Mediterranean ecosystems (Musselman and Press, 1995; Press and Phoenix, 2005; Groom and Lamont, 2015). In the Mediterranean basin, the root holoparasitic genus *Cytinus*, with a wide distribution in the Mediterranean basin (Figure 1A), parasitizes endemic Mediterranean shrubs belonging to the *Cistaceae* family, such as several species of the genus *Cistus*, *Halimium*, *Helianthemum*, and *Fumana*. In contrast to what occurs in agroecosystems, in natural systems not only do they have direct negative effects on productivity, reducing host growth, and reproduction output in the short term, but their effects on the ecosystem properties are also indirect and may be positive in the long term (Seel and Press, 1996; Davies and Graves, 2000; Neto et al., 2017). By taking water, carbon, and nutrients from their host, holoparasitic plants can alter the competitive balance between species, altering their composition and eventually increasing the diversity of the ecosystems (Figure 1B). Indeed, holoparasites reduce the growth of competitively dominant species thus allowing a wider pool of species to grow. It has been proposed that the impact of holoparasitic plants on ecosystems depends on the virulence of the parasitic plant, which in turn is influenced by both environmental conditions and the specificity of the holoparasitic plant–host interaction (Gibson and Watkinson, 1991, 1992; Pennings and Callaway 2002).

Holoparasitic plants have countless effects on Mediterranean ecosystems aside from reducing host

productivity and reproductive output (de Vega et al., 2010). In the Mediterranean region, *Cytinus* parasitizing endemic Mediterranean shrubs belonging to the *Cistaceae* family are abundant. The genetic differentiation of *Cytinus* has evolved as a result of selective pressure imposed by their host and, despite the classification of *Cytinus* species being quite controversial due to their morphological similarity, five different genetic groups have been described (de Vega et al., 2008). Following the classification *sensu* de Vega et al. (2008), *Cytinus* species with ivory-white and pink flowers parasitizing white-leaved rockrose (*Cistus albidus*) would correspond to *C. hypocitis* subsp. *clusii* or *C. ruber*, and *C. hypocitis* subsp. *hypocitis* would correspond to yellow flowered *Cytinus*, one group parasitizing gum rockrose (*C. ladanifer*), and the other Montpellier cistus (*C. monspeliensis*), *C. populifolius*, and sage-leaved rockrose (*C. salvifolius*). Yellow flowered *Cytinus* that parasitizes *Halimium* sect. *Chrysorhodium*, would correspond to *C. hypocitis* subsp. *macaranthus*, and those that parasitize *Halimium*, *Helianthemum* and *Fumana* would correspond to *C. hypocitis* subsp. *lutescens*. In general, holoparasitic plants may cause reductions in plant community biomass in the short term, but they can modulate diversity, heterogeneity, and productivity in both directions in the long term: increasing or reducing them, depending on whether the chosen host is competitively dominant or subordinate. *Cytinus hypocitis* modulates the ecophysiology of various shrubs of the genus *Cistus* in natural Mediterranean ecosystems, and these shrubs are competitively dominant and perform an essential role in post-fire succession (Roy and Sonié, 1992; Montès et al., 2004). Therefore, infestation by these holoparasitic plants leads to a decrease in productivity in the short-term during post-fire succession, but also to an increase in diversity in the long term by altering water and nutrient resources in the soil and making other plants more competitive with the dominant *Cistus* sp. shrubs. Additionally, they can affect vegetation zonation by altering the competitiveness of species: an aspect that has been studied in hemiparasitic plants from the Mediterranean region (Bardgett et al., 2006; Mellado and Zamora, 2017; Griebel et al., 2017), but not in *Cytinus*. By interacting with other trophic levels, holoparasitic plants can also have an impact on the biotic framework of the ecosystem. For instance, the associations among *Cytinus hypocitis*, their host plants (including *Cistus albidus*, *C. ladanifer*, *C. salvifolius*, *Halimium halimifolium*, and *H. ocymoides*) and mycorrhizal fungi can be very important in terms of maintaining biodiversity and ecosystem functioning (de Vega et al., 2010; Correia and Ascensao, 2017). Moreover, their interaction with pollinators such as ants, flies, or mammals (depending on their distribution) can contribute to seed dispersal from the host (seeds of *Cistus* shrubs are usually dispersed by mammals) or other species inhabiting the same ecosystem. Finally, the influence of holoparasitic plants on mycorrhiza can alter the activity of soil microbes and consequently the balance of fungi/bacteria via the input of their nutrient-rich litter to the soil, thus contributing to nutrient cycling: an aspect that deserves further study.

Box 1. Strategies to reduce the impact of holoparasitic plants on Mediterranean agroecosystems

Phytosanitary measures to preventing a lasting seed bank are necessary to deal with broomrapes. Suicidal germination (A) caused by adding synthetic strigolactones (SLs) is a potential control mechanism (Habimana et al., 2014; Zwanenburg et al., 2016). Adding SL deactivators (B) is also a means to deal with broomrapes at later stages. The effectiveness of these treatments is limited by the continuous germination of parasites throughout the season, and their direct host connection; but in some cases, they have been developed and applied with the desired selectivity and efficacy (Zwanenburg et al., 2016).

Rotation with nonhost crops is commonly advised, but not always possible. As an alternative, **intercropping** (C) with oat has been shown to reduce legume infestation by *O. crenata*; significant control is achieved in faba bean, pea, lentil, and chickling pea when intercropped with fenugreek; and faba bean and pea benefit from intercropping with berseem clover. Inhibition of host seed germination by allelochemicals released by roots of the second crop may be the mechanism for infection reduction (Fernández-Aparicio et al., 2016).

Soil solarization has shown usefulness in controlling seed banks, since broomrape seeds die at around 48–57°C when imbibed (Mauromicale et al., 2005). This technique is improved when **combined with biocontrol strategies** (D).

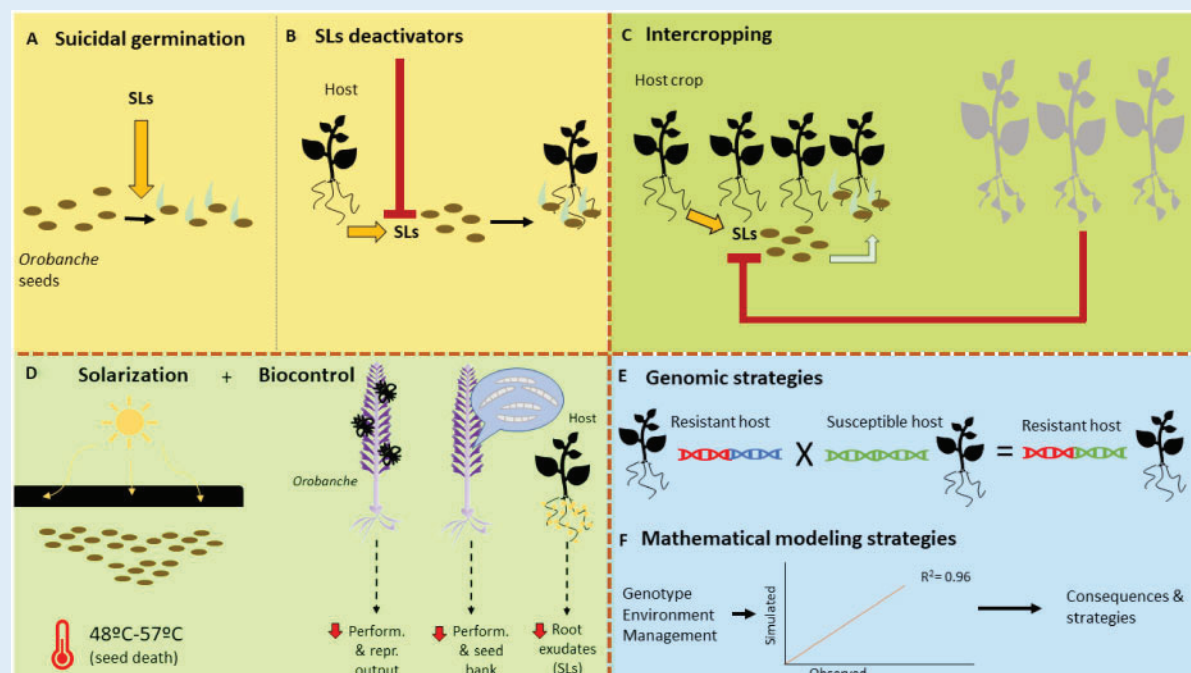
The fly *Phytomyza orobanchia* is reportedly host-specific for *Orobancha* spp., thus it helps to reduce reproductive output and seed dispersal (Abu-Shall and Ragheb, 2014; Bayram and Çikman, 2016).

Alternatively, fungi can be bioherbicides: one *Fusarium* species used alone or in combination with others can attack the parasite in any season and reduce their seed bank and physiological performance (Shabana et al., 2003; Aybeke, 2017).

Inoculation with compatible *Rhizobium* can reduce host exudates, preventing parasite attachment and growth in pea (Mabrouk et al., 2006).

Genomic strategies are arousing interest as tools for more sustainable agriculture. While genes resistant against specific varieties of *O. cumana* have been used in breeding programs (Molinero-Ruiz et al., 2009), the constant evolution of these holoparasitic plants highlights the need for more sustainable resistance (E). Conservation of crop wild relatives offering sources of resistance to support breeding programs will help to achieve this goal (Seiler, 2019).

Mathematical modeling of both seed bank dynamics and competition between parasites and hosts, including interaction studies between variables such as genotype, environment, and management (F), may be effective in developing strategies to control broomrape and assess consequences (Grenz et al., 2005, 2006).



Although the holoparasites *Orobanche* spp. are well known in agroecosystems, they also inhabit natural Mediterranean ecosystems (Schneeweiss, 2007). While *O. cernua* L. is most frequently observed parasitizing species of the genus *Artemisia* in natural ecosystems on the Iberian Peninsula, it has also been found infesting *Launaea lanifera* in ecological niches that are quite arid and degraded at altitudes between 0 and 1,500 m a.s.l. In contrast, *O. cumana*, which spread widely across the Iberian Peninsula with the introduction of sunflower cultivars, has not been observed in a natural context; thus, this species only seems to be adapted to cultivated land niches (Pujadas-Salvà and Velasco, 2000). Meanwhile, *O. lutea* has been reported to be able to grow in polluted soils and even reduces the content of toxic metals in the host, so that the latter increases its photosynthetic rate relative to noninfested plants. This suggests an attenuation role of the parasitic plant when the host is faced with soil metal toxicity (Turnau et al., 2018).

Holoparasitic plant–host interactions

Interactions between holoparasitic plants and their hosts in Mediterranean ecosystems (either natural or agroecosystems) in which the parasites benefit while the hosts are harmed occur at every stage of the relationship. The first interplay occurs in identification of the host, which in most cases leads to parasite germination. It has been demonstrated that holoparasitic plants respond to light and chemical signals when locating their host, and germinate in response to strigolactones (Runyon et al., 2006; Furuhasi et al., 2011). Communication continues through haustorium development, when haustorium-inducing factors (flavonoids, phenolic acids, quinones, cytokinins, and cyclohexene oxides) play a major role in haustorium initiation; while auxin production and cytokinin translocation allow for its correct growth and development (Ishida et al., 2016; Goyet et al., 2017; Clarke et al., 2019). The exchange of microRNAs between holoparasitic plants and their hosts appears to function as interference signals directed at mRNA, such as mRNA related with auxin receptors, development regulators, pathogen defense, and phloem function in the host, as a way to increase parasite fitness. This aspect has been shown to occur in broomrapes (Clarke et al., 2019) but still requires examination in *Cytinus*. Given that phytohormones regulate several processes in plant development and defense, in-depth understanding of their implication in holoparasitic plant–host interactions in both agricultural and natural Mediterranean ecosystems will help us manage holoparasitic plants better.

Impact of phytohormones on parasitic plant–host interactions

Strigolactones are the best-known phytohormones involved in holoparasitic plant–host interactions in Mediterranean ecosystems. Strigolactones are tricyclic lactones connected with a butyrolactone group by an enol ether bridge, in which their biological activity resides (Zwanenburg et al., 2016). In general, their physiological and ecological relevance

stems from their function as promoters of growth and hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi, as inhibitors of shoot branching, and as stimulators of parasitic plant germination (López-Ráez et al., 2008). Released from the host root into the soil at a very low concentration, strigolactones are thought to form a covalent bond with their receptors, which induces parasitic plant germination (Zwanenburg et al., 2008; Ruyter-Spira et al., 2013). Indeed, a unique combination of strigolactones has been shown to contribute to the host specificity of broomrape germination (Fernández-Aparicio et al., 2011).

Auxin and cytokinins play several roles in holoparasitic plant–host interactions. Not only do auxin and cytokinins play a major role in root architecture, cell division, differentiation, and elongation, as well as in the leaf, flower, vascular, and fruit development of the host (Ljung, 2013), but auxin has also been shown to be involved in broomrapes germination (Slavov et al., 2004). The flow of auxin from the parasitic plant to the host is involved in the formation of a continuous vessel connecting them (Aloni, 2015). Indeed, changes in auxin transport or disturbance of the auxin response has been shown to prevent infection by broomrapes, highlighting the fact that auxin plays a major role in parasite performance (Bar-Nun et al., 2008). Cytokinins not only regulate cell proliferation and differentiation in apical meristems, thereby promoting shoot growth and inhibiting root growth in the host (Werner et al., 2001; Schaller et al., 2015), but they also play a major role in source–sink relationships (Roitsch and Ehneß, 2000), which are essential in holoparasitic plant–host interactions. Cytokinins have been shown to be involved in haustorium induction in holoparasites, in some cases as a result of a signaling pathway initiated by the perception of light and contact signals received during recognition of the host, such as a low red:far red ratio, or mechanical stimulation (Furuhasi et al., 2011). For *O. ramosa* (syn. *P. ramosa*), it has been shown that cytokinins present in the common rape host root exudates induce the expression of cytokinin-responsive genes (*RESPONSE REGULATOR 5* [*PrRR5*], *CYTOKININ OXIDASE 2* [*PrCKX2*], *CYTOKININ OXIDASE 4* [*PrCKX4*], and *ZINC FINGER PROTEIN 6* [*PrZFP6*]) in the parasite and play a major role in both induction of haustorium formation and an increase of parasite aggressiveness (Goyet et al., 2017).

Other phytohormones involved in holoparasitic plant–host interactions are the typical stress-related hormones jasmonic acid, salicylic acid, and abscisic acid (ABA). The involvement of jasmonic acid and salicylic acid in host defense response against broomrapes at initial stages of the holoparasitic plant–host interaction has been reported in several studies (reviewed by Gutjahr and Paszkowski, 2009; see also Torres-Vera et al., 2016). In addition, given the observed enhanced expression of ABA biosynthetic (*LeNCED1*) and responsive genes (*Le4*) in the tomato host roots, it has been proposed that this phytohormone is involved in host defense response at early stages of the infection between *O. ramosa* and tomato plants (Torres-Vera et al., 2016).

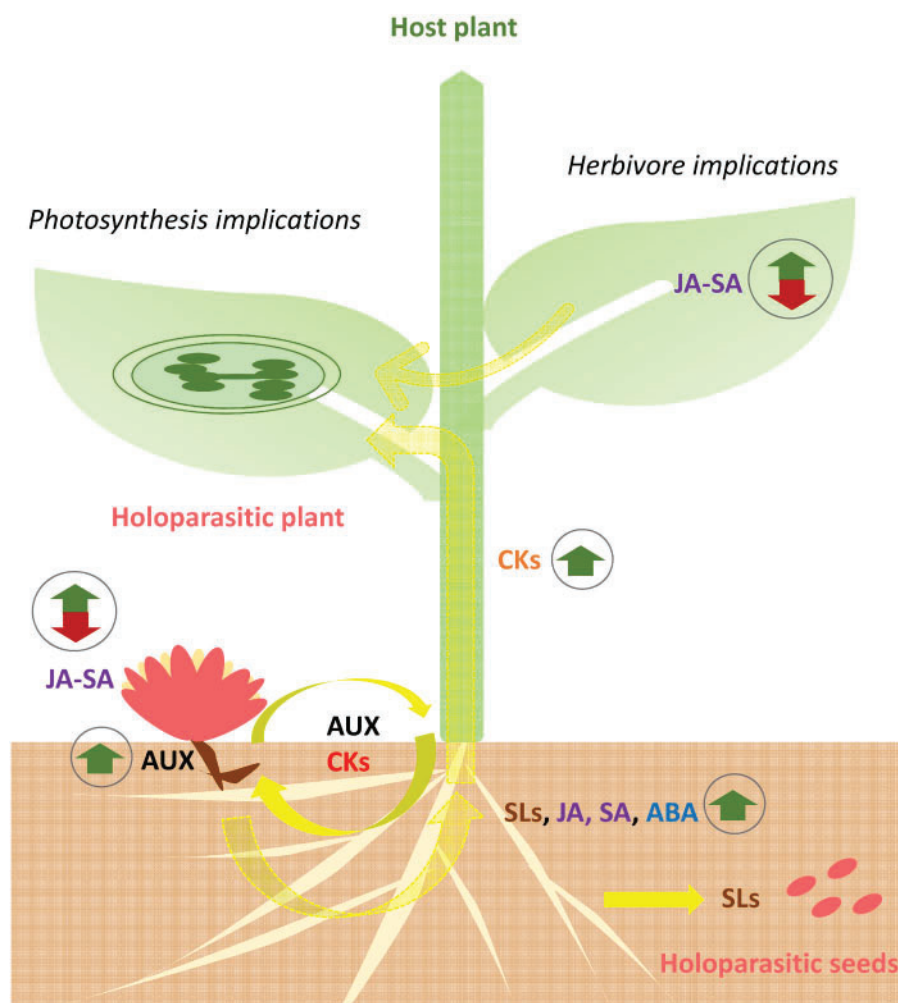


Figure 2 Schematic representation of holoparasitic plant–host interactions, placing special interest on phytohormone flux and its implications. Solid yellow arrows represent demonstrated fluxes of hormones, while translucent yellow arrows represent possible fluxes. Small arrows inside circles represent reported hormone increases/decreases. ABA: abscisic acid, AUX: auxin, CKs: cytokinins, JA: jasmonic acid, SA: salicylic acid, SLs: strigolactones

Since complex crosstalk occurs between phytohormones, and each phytohormone can mediate different responses depending on the plant species and the prevailing environmental conditions, it is necessary to study hormonal responses in the holoparasitic plant–host system through integrating what occurs in the whole ecosystem to understand better the role of phytohormones in both agricultural and natural Mediterranean ecosystems (Figure 2). This is not only important to understand better how these interactions occur at the physiological level in natural ecosystems, but also to arrive at better management of holoparasitic plants in Mediterranean agroecosystems. Specifically, important points of control in Mediterranean agroecosystems include strigolactones, to produce suicidal germination and thereby control seed banks (Habimana et al., 2014; Zwanenburg et al., 2016, see also Box 1). Other hormonal approaches with potential application also cover ABA and auxins, for preventing germination (Slavov et al., 2004); cytokinins, which prevent parasite and host connection once the parasitic plant has germinated (Furuhasi et al., 2014; Goyet et al.,

2017); and salicylic acid, and to a lesser extent jasmonic acid, involved in resistance against parasites (Buschmann et al., 2005; Yoder and Scholes, 2010).

Impact of phytohormones on photosynthesis in the host

Holoparasites represent an extra sink for photosynthates in the host. Although in most cases the holoparasites enhance the host photosynthesis rate, this compensation effect is limited and a constraint on the number and size of parasites infecting a host can emerge. Furthermore, in most cases, this source–sink relationship benefits the parasite rather than the host (Watling and Press, 2001). It has been reported that infection by *O. ramosa* causes upregulation of ABA biosynthesis and signaling in tomato roots (Torres-Vera et al., 2016). ABA is known to regulate guard cells, promoting stomatal closure (Acharya and Assmann, 2009), so we might expect that photosynthesis could be reduced as a stress response to the holoparasite, as it has been recently shown in red clover–*O. minor* host–parasite interaction

(Jokinen and Irving, 2019). However, it has been reported that holoparasitic plant–host systems can partly compensate for this, or even maintain productivity, by greater leaf area and by delaying leaf senescence in response to the extra demand for carbon by the holoparasite (Hibberd et al., 1998). So ABA increases in the host root in response to the *O. ramosa* do not entail negative effects of the parasite, but positive effects, most likely related to an improved root:shoot ratio in the host, which may improve vegetative growth and delay senescence in the long term.

It has been shown that auxin flows from parasitic plants to their hosts (Aloni, 2015). The link between auxins and photosynthesis has been reported to involve leaf venation, since altered auxin homeostasis affects leaf hydraulic conductance and leaf gas exchange (McAdam et al., 2017). Furthermore, it has also been shown that an auxin-responsive factor in tomato (AUXIN RESPONSE FACTOR 6A [SIARF6A]) regulates chlorophyll content and chloroplast development, which result in improved photosynthesis (Yuan et al., 2019). The significance of the auxin flow to the host has also been related to haustorial development and the formation of continuous vessels connecting parasite and host (Bar-Nun et al., 2008; Aloni, 2015; Ishida et al., 2016). It may also play a role in the improvement of host photosynthesis, given the benefit that this represents for the holoparasite. In addition, increased cytokinin contents have been reported in both holoparasitic plant and host during infection (Furuhashi et al., 2014); and translocation of cytokinins from the parasite to the host has been shown to cause changes in host architecture (Watling and Press, 2001). Moreover, cytokinins are involved in source–sink relationships, and so alterations in host cytokinin levels may have an impact on photosynthesis at the whole-plant level (Acharya and Assmann, 2009).

Altered salicylic acid and jasmonic acid contents have been reported in tomato during the initial stages of *O. ramosa* infection (Torres-Vera et al., 2016). Also, changes in superoxide dismutase activity have been reported in the host during enhanced reactive oxygen species (ROS) production due to broomrapes infection. ROS detoxification seemed to be related to host resistance to holoparasites (Demirbaş and Acar, 2008). Since both salicylic acid and jasmonic acid have been reported to improve antioxidant mechanisms under various plant stress conditions (Sirhindi et al., 2015; Bali et al., 2018), both phytohormones could also be involved, together with ABA, in alleviation of photo-inhibition and improvement of photosynthesis in the holoparasite–host system. This aspect requires further study in Mediterranean ecosystems, particularly in the *Cytinus-Cistus* system, which is still poorly understood in this respect. Another aspect that requires more research is the critical lack of information on the selection pressures that may be acting on the holoparasite. For example, is the use of each hormone (such as salicylic acid) selected for in the parasite, or are these passively being used? Further investigations are needed to shed light on this question, and more specifically

to identify putative genes that might be under selection pressure.

Natural seed banks: dormancy versus germination

The establishment of persistent seed banks and an efficient control of seed dormancy and germination are essential for the success of holoparasitic plants in Mediterranean natural and agroecosystems. Indeed, understanding the dynamics of the seed bank has been shown to be crucial to solving the problem of broomrapes infestations in these agroecosystems. Most *Orobanchae* seeds present physiological dormancy (Fernández-Aparicio et al., 2016); studies of *O. ramosa* seeds have revealed seasonal physiological dormancy. While the short-term seed mortality was about 4%–7% per year, seed dormancy was observed to be synchronized with the host cycle, since low seed dormancy was recorded in the period when their host seeds were set in the ground, but high dormancy in the period between the appearance of host seeds in the soil. This means that *O. ramosa* is able to infect its host early in its development (Pointurier et al., 2019; Figure 3A). However, intraspecific variability has been demonstrated. In another population of *O. ramosa*, opportunistic behavior has been suggested. The population showed a shorter dormancy cycle, with quicker and massive spontaneous germination, probably making them able to parasitize both winter and summer crops (Pointurier et al., 2019).

Germination of broomrapes is a two-step process involving a conditioning period that allows a proper response to germination stimulants, followed by biochemical stimulation of germination (Lechat et al., 2015; Figure 3B). The wake from seed dormancy in *O. ramosa* requires a minimum of 4 d conditioning at 21°C for water to enter and imbibition to occur (Mauromicale et al., 2005; Lechat et al., 2012). On the first day, ABA seed content decreases sharply (Lechat et al., 2015), protein synthesis occurs, and alternative oxidase activity increases as does respiration (Bar-Nun et al., 2003). The ABA decrease has been shown to be mediated by the activation of CYP707A1 (an ABA catabolic gene) by a strigolactone analog (GR 24), but it can only occur after the conditioning period, with a few exceptions (Plakhine et al., 2009; Lechat et al., 2012). However, the acquisition of strigolactone sensitivity during the conditioning period is not only mediated by the ABA content, but also by the DNA methylation status (Lechat et al., 2015; Figure 3B). Under typical Mediterranean conditions, such as a temperature of 20°C, responsiveness to strigolactones increases with the duration of the conditioning period, becoming optimal after 2–3 weeks. However, when conditioned at sub-optimal temperatures, a secondary dormancy may occur. Similar requirements for the conditioning period and for entrance to secondary dormancy have been shown for several species of the genus, including *O. crenata*, *O. cumana*, *O. aegyptiaca*, and *O. minor*; and it has been shown that the gibberellin effect of promoting seed germination is species specific

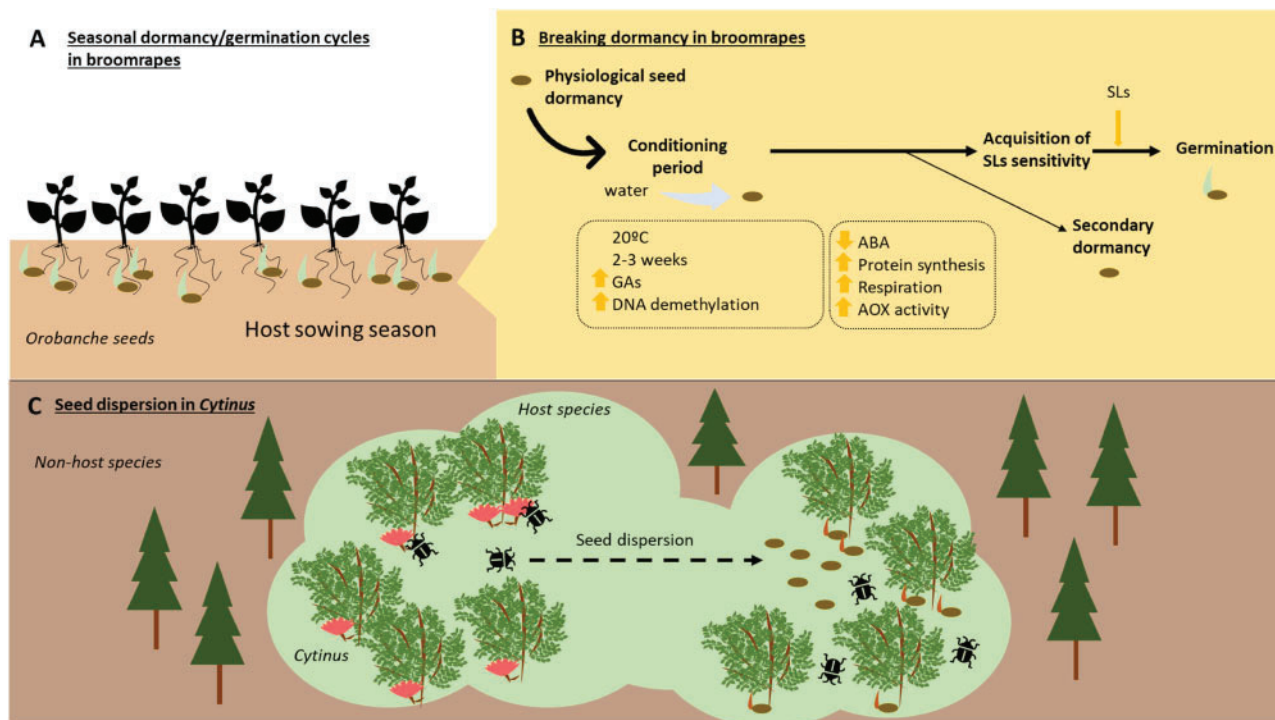


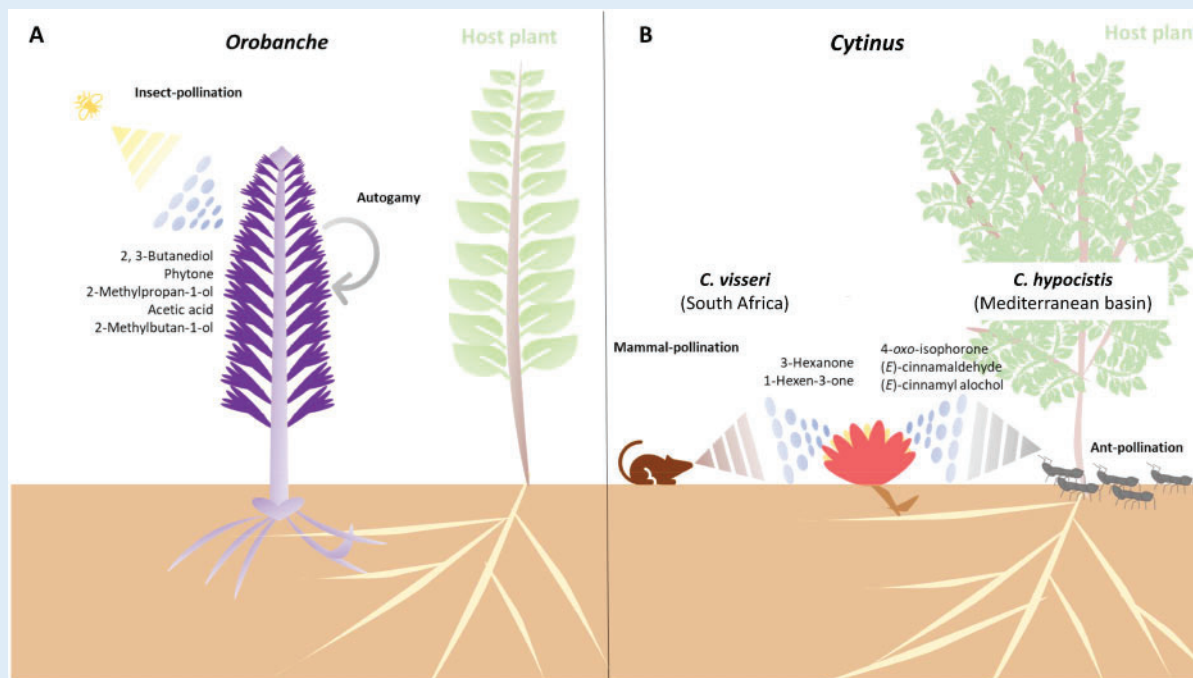
Figure 3 Seed dormancy and germination in holoparasitic plants. Schematic representation of (A) seasonal physiological seed dormancy: *Orobanch* germination during the season when host seeds were in the ground, B, process of breaking seed dormancy and germination demonstrated in *Orobanch*, C, seed dispersion in *Cytinus* by beetles. ABA: abscisic acid, AOX: alternative oxidase, GAs: gibberellins, SLs: strigolactones.

(Kebreab and Murdoch 1999; Matusova et al., 2004; Moral et al., 2015; Ye et al., 2017; Figure 3B). Oxygen tension and water potential also influence the seed germination of broomrapes, so their distribution across the globe is limited by factors governing soil conditions. These requirements make germination of this species possible in all Mediterranean climate areas (Gibot-Leclerc et al., 2004; Grenz et al., 2006). Taken together, the physiological mechanisms involved in the control of seed dormancy and germination in broomrapes have important agronomic implications in Mediterranean agroecosystems (Grenz et al., 2005, 2006). Good examples include the use of catch crops, species grown between the cultivation of main crops when seed dormancy of broomrapes is low (Pointurier et al., 2019); trap crops, which induce holoparasite germination without being parasitized (Rubiales et al., 2009); or gibberellins, which help retain high sensitivity in seeds for efficient suicidal germination strategies (Ye et al., 2017). Soil solarization (Mauromicale et al., 2005), biocontrol strategies (Mabrouk et al., 2006; Abu-Shall and Ragheb, 2014; Bayram and Çikman, 2016), and bioherbicides (Shabana et al., 2003; Aybeke, 2017) have also shown usefulness in controlling holoparasite seed banks. Finally, genomic strategies (Molinero-Ruiz et al., 2009; Seiler 2019) and mathematical modeling (Grenz et al., 2005, 2006) may also be very useful tools to achieve a more sustainable agriculture in seed bank management (Box 1).

Knowledge of the mechanisms of seed dispersal and germination adopted by species occurring in natural

Mediterranean ecosystems, such as *Cytinus*, is also useful for better management of holoparasitic plants in both agricultural and natural ecosystems. *Cytinus* produce fruit that give rise to a large amount of dust-like seeds with a rigid thick coat. These are consumed by beetle species, as well as rodents, ants and lagomorphs that defecate intact and viable seeds far away from the parent plant, although seed dispersal by *Cytinus hypocistis* in Mediterranean ecosystems has mainly been associated with endozoochory by beetles (de Vega et al., 2011). Beetles can be considered an efficient seed dispersal agent given that, contrary to other fruit-consuming species, they are likely to leave the seeds, once eaten, near to host roots, underground (Figure 3C). This mutualistic relationship between the holoparasitic plant and the beetle has been shown to be limited by the distribution and population size of beetles, which in turn is influenced by environmental and ecological factors such as soil type, or by the presence of other consumers of *Cytinus* fruits such as wood mice (de Vega et al., 2011). However, the seed dispersal area seems to be fairly small due to the reduced mobility of this insect, which on the one hand may be contributing to the small size populations of *C. hypocistis*, but on the other hand may ensure the placement of the seeds in areas where their host is present (de Vega et al., 2008, 2011; Figure 3C). Although the germination requirements of *C. hypocistis* seeds remain unknown, the knowledge acquired to date of the germination of other holoparasitic species may lead to the discovery of similar physiological mechanisms that allow the control

Box 2. Schematic representation of holoparasitic plant–pollinators interaction through the release of VOCs in Mediterranean ecosystems. VOCs play a key role both in insect pollination of *Orobanche* (A) and mammal- and ant-pollination of *Cytinus* (B)



Glossary Box

Haustorium: a slender projection from the root of a parasitic plant enabling the parasite to penetrate the tissues of its host and absorb nutrients from it.

Hemiparasitic plants: plants that possess chlorophylls and are capable of photosynthesis but that obtain part of nutrients and water from a host plant.

Holoparasitic plants: plants that are not capable of photosynthesis and obtain all nutrients and water from a host plant.

Hormonal crosstalk: interaction between phytohormones in the regulation of a physiological process.

Host range: collection of hosts that a parasite can use.

Phytohormone: signal organic molecules produced at very low amounts by plants that regulate a physiological process.

Seed bank: seeds stored either naturally in the soil (natural seed bank) or by human action (artificial seed bank) that allow population renewal for any given species.

Seed dormancy: the state in which a seed is alive but not actively growing (germination is arrested).

Source–sink relations: relationship between source organs (with export photoassimilates) and sink organs (which receive these assimilates either for growth or storage).

of *Cytinus* seed banks. Taken together with the information available on seed dispersal, this could allow us to better understand the physiological and ecological mechanisms underlying the spread of *Cytinus* in Mediterranean ecosystems.

Conclusions and future prospects

Major advances have taken place in our understanding of holoparasitic plant–host interactions, the role of phytohormones in these interactions, and how these influence host photosynthesis and control source–sink relations.

OUTSTANDING QUESTIONS

- How phytohormone crosstalk during the holoparasitic plant–host interaction determine host tolerance?
- What physiological mechanisms in the host may influence VOCs release by holoparasitic plants in holoparasitic plant–pollinator interactions?
- Do the mode and tempo of evolution of holoparasitic plant–host interactions differ in agricultural systems relative to natural environments?
- How ecophysiology is linked to its underpinning genetic basis in holoparasitic plant–host interactions?

Furthermore, the physiological mechanisms involved in seed dormancy and germination of holoparasitic seed banks have been reported in detail at the physiological and molecular levels. There are still, however, many gaps in our knowledge of the physiological processes and mechanisms underlying holoparasitic plant–host interactions in Mediterranean ecosystems, most particularly in *Cytinus* and to a lesser extent in broomrapes. These include aspects related to hormonal crosstalk in holoparasitic plant–host interactions, to what extent diversity increases in natural ecosystems due to holoparasitic plants both in the short and long term, and the role of VOCs in holoparasitic plant–pollinator interactions. Although several advances have recently been made in the latter question (see Box 2), some questions remain unsolved, including how the host influence VOCs release by holoparasites in plant–pollinator interactions in Mediterranean ecosystems. Furthermore, it will also be challenging to investigate in the near future how the mode and tempo of evolution of holoparasitic plant–host interactions differ in agricultural systems relative to natural environments; and finally, in order to gain a holistic understanding of ecosystem processes, how ecophysiology is linked to its underpinning genetic basis in holoparasitic plant–host interactions (see Outstanding questions). Better understanding of how the whole holoparasitic plant–host system is regulated, including as well its relation to the environment, pollinators, and microbial communities in a holistic view, is not only essential to expand our knowledge of basic biology, but it will also have important economic implications in the agricultural, horticultural and agri-food biotechnology sectors, as well as in environmental management.

Funding

Part of this work was supported by the Spanish Government (through the grant BFU2015-64001-P/MINECO/FEDER) and the Generalitat de Catalunya (ICREA Academia award to S.M.-B.).

Conflict of interest statement. Authors declare no conflicts of interest.

References

- Abu-Shall AMH, Ragheb EIM (2014) Management of *Orobancha crenata* using trap crops and *Phytomyza orobanchia* Kalt. in broad bean (*Vicia faba*) field in Egypt. *Egyptian J Biol Pest Control* **24**: 217–223
- Acharya BR, Assmann SM (2009) Hormone interactions in stomatal function. *Plant Mol Biol* **69**: 451–462
- Albert M, Belastegui-Macadam X, Bleischwitz M, Kaldenhoff R (2008) *Cuscuta* spp: parasitic plants in the spotlight of plant physiology, economy and ecology. *Prog Bot* **69**: 267–275
- Aloni R (2015) Eophysiological implications of vascular differentiation and plant evolution. *Trees* **29**: 1–16
- Aybeke M (2017) Fusarium infection causes phenolic accumulations and hormonal disorders in *Orobancha* spp. *Ind J Microbiol* **57**: 416–421
- Bali S, Kaur P, Sharma A, Ohri P, Bhardwaj R, Alyemeni MN, Wijaya L, Ahmad P (2018) Jasmonic acid-induced tolerance to root-knot nematodes in tomato plants through altered photosynthetic and antioxidative defense mechanisms. *Protoplasma* **255**: 471–484
- Bardgett RD, Smith RS, Shiel RS, Peacock S, Simkin JM, Quirk H, Hobbs PJ (2006) Parasitic plants indirectly regulate below-ground properties in grassland ecosystems. *Nature* **439**: 969–972
- Bar-Nun N, Plakhine D, Joel DM, Mayer AM (2003) Changes in the activity of the alternative oxidase in *Orobancha* seeds during conditioning and their possible physiological function. *Phytochemistry* **64**: 235–241
- Bar-Nun N, Sachs T, Mayer AM (2008) A role for IAA in the infection of *Arabidopsis thaliana* by *Orobancha aegyptiaca*. *Ann Bot* **101**: 261–265
- Bayram Y, Çikman E (2016) Efficiency of *Phytomyza orobanchia* Kaltenbach (Diptera: Agromyzidae) on *Orobancha crenata* Forsk. (Orobanchaceae) in lentil fields at Diyarbakır and Mardin Provinces, Turkey. *Egypt J Biol Pest Control* **26**: 365–371
- Bennett AE, Bever JD (2007) Mycorrhizal species differentially alter plant growth and response to herbivory. *Ecology* **88**: 210–218
- Bouman F, Meyer W (1994) Comparative structure of ovules and seeds in Rafflesiaceae. *Plant Syst Evol* **193**: 187–212
- Bouwmeester HJ, Roux C, López-Ráez JA, Bécard G (2007) Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *Trends Plant Sci* **12**: 224–230
- Bungard RA (2004) Photosynthetic evolution in parasitic plants: insight from the chloroplast genome. *BioEssays* **26**: 235–247
- Buschmann H, Fan SW, Sauerborn J (2005) Effect of resistance-inducing agents on sunflower (*Helianthus annuus* L.) and its infestation with the parasitic weed *Orobancha cumana* Wallr. *J Plant Dis Prot* **112**: 386–397
- Cahill JF, Elle E, Smith GR, Shore BH (2008) Disruption of a below-ground mutualism alters interactions between plants and their floral visitors. *Ecology* **89**: 1791–1801
- Clarke CR, Timko MP, Yoder JJ, Axtell MJ, Westwood JH (2019) Molecular dialog between parasitic plants and their hosts. *Annu Rev Phytopathol* **57**: 279–299
- Correia O, Ascensão L (2017) Summer semi-deciduous species of the Mediterranean landscape: a winning strategy of *Cistus* species to face the predicted changes of the Mediterranean climate. In AA Ansari, SS Gill, ZK Abbas, M Naeem, ed, *Plant Biodiversity: Monitoring, Assessment and Conservation*. CABI Publishing.
- Cusimano N, Wicke S (2016) Massive intracellular gene transfer during plastid genome reduction in nongreen Orobanchaceae. *New Phytol* **210**: 680–693
- Davies DM, Graves JD (2000) The impact of phosphorus on interactions of the hemiparasitic angiosperm *Rhianthus minor* and its host *Lolium perenne*. *Oecologia* **124**: 100–106
- Dawson JH, Musselman LI, Wolswinkel P, Dorr I (1994) Biology and control of *Cuscuta*. *Rev Weed Sci* **6**: 265–317

- Delavault P** (2015) Knowing the parasite: biology and genetics of *Orobanchae*. *Helia* **38**: 15–29
- Demirbaş S, Acar O** (2008) Superoxide dismutase and peroxidase activities from antioxidative enzymes in *Helianthus annuus* L. roots during *Orobanchae cuman* Wallr. Penetratin Fres Environ Bul **17**: 8a
- Díaz JS, Norambuena HM, López-Granados F** (2006) Characterization of the holoparasitism of *Orobanchae ramosa* on tomatoes under field conditions. *Agric Tec* **66**: 223–234
- Ennami M, Briache FZ, Gaboun F, Abdelwahd R, Ghaoui L, Belqadi L, Westwood J, Mentag R** (2017) Host differentiation and variability of *Orobanchae crenata* populations from legume species in Morocco as revealed by cross-infestation and molecular analysis. *Pest Manag Sci* **73**: 1753–1763
- Ennami M, Mbasani-mansi J, Briache FZ, Oussible N, Gaboun F, Ghaoui L, Belqadi L, Ghanem ME, Aberkani K, Westwood J, et al.** (2020) Growth-defense tradeoffs and source-sink relationship during both faba bean and lentil interactions with *Orobanchae crenata* Forsk. *Crop Prot* **127**: 104924
- Fernández-Aparicio M, Yoneyama K, Rubiales D** (2011) The role of strigolactones in host specificity of *Orobanchae* and *Phelipanche* seed germination. *Seed Sci Res* **21**: 55–61
- Fernández-Aparicio M, Flores F, Rubiales D** (2016) The effect of *Orobanchae crenata* infection severity in faba bean, field pea, and grass pea productivity. *Front Plant Sci* **7**: 1409
- Furuhashi T, Kojima M, Sakakibara H, Fukushima A, Hirai MY, Furuhashi K** (2014) Morphological and plant hormonal changes during parasitization by *Cuscuta japonica* on *Momordica charantia*. *J Plant Inter* **9**: 220–232
- Gibot-Leclerc S, Corbineau F, Sallé G, Côme D** (2004) Responsiveness of *Orobanchae ramosa* L. seeds to GR 24 as related to temperature, oxygen availability and water potential during pre-conditioning and subsequent germination. *Plant Growth Regul* **43**: 63–71
- Gibot-Leclerc S, Sallé G, Reboud X, Moreau D** (2012) What are the traits of *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel that contribute to the success of its biological cycle on its host *Brassica napus* L.? *Flora* **207**: 512–521
- Gibson CC, Watkinson AR** (1991) Host selectivity and the mediation of competition by the root hemiparasite *Rhianthus minor*. *Oecologia* **86**: 81–87
- Gibson CC, Watkinson AR** (1992) The role of the hemiparasitic annual *Rhianthus minor* in determining grassland community structure. *Oecologia* **89**: 62–68
- Goyet V, Billard E, Pouvreau JB, Lechat MM, Pelletier S** (2017) Haustorium initiation in the obligate parasitic plant *Phelipanche ramosa* involves a host-exudated cytokinin signal. *J Exp Bot* **68**: 5539–5552
- Grenz JH, Manschadi AM, De Voli P, Meinke H, Sauerborn J** (2005) Assessing strategies for *Orobanchae* sp. control using a combined seedbank and competition model. *Agron J* **97**: 1551–1559
- Grenz JH, Manschadi AM, De Voli P, Meinke H, Sauerborn J** (2006) Simulating crop-parasitic weed interactions using APSIM: model evaluation and application. *Eur J Agron* **24**: 257–267
- Griebel A, Watson D, Pendall E** (2017) Mistletoe, friend and foe: synthesizing ecosystem implications of mistletoe infection. *Environ Res Lett* **12**: 115012
- Groom PK, Lamont B** (2015) *Plant Life of Southwestern Australia: Adaptations for Survival*. De Gruyter, Berlin, Germany
- Gutjahr C, Paszkowski U** (2009) Weights in the balance: jasmonic acid and salicylic acid signaling in root-biotroph interactions. *Mol Plant Mol Interact* **22**: 763–772
- Habimana S, Nduwumuremyi A, Chinama R** (2014) Management of orobanchae in field crops - a review. *J Soil Sci Plant Nutr* **14**: 43–62
- Hibberd JM, Quick WP, Press MC, Scholes JD** (1998) Can source-sink relations explain responses of tobacco to infection by the root holoparasitic angiosperm *Orobanchae cernua*? *Plant Cell Environ* **21**: 333–340
- Holm LG, Phucknett DL, Pancho JV, Herberger JP** (1997) *The World's Worst Weeds: Distribution and Biology*. University Press of Hawaii, Honolulu, HI
- Ishida HK, Wakatake T, Yoshida S, Takebayashi Y, Kasahara H, Wafula E, dePamphilis CW, Namba S, Shirasu K** (2016) Local auxin biosynthesis mediated by YUCCA flavin monooxygenase regulates haustorium development in the parasitic plant *Phtheirospermum japonicum*. *Plant Cell* **28**: 1795–1814
- Jeschke WD, Hilpert A** (1997) Sink-stimulated photosynthesis and sink-dependent increase in nitrate uptake: nitrogen and carbon relations of the parasitic association *Cuscuta reflexa*-*Ricinus communis*. *Plant Cell Environ* **20**: 47–56
- Joel DM, Hershenthorn J, Eizenberg H, Aly R** (2007) Biology and management of weedy root parasites. *Hort Rev* **33**: 267–347
- Jokinen JJ, Irving LJ** (2019) Effects of light level and nitrogen supply on the red clover-*Orobanchae minor* host-parasite interaction. *Plants* **8**: 146
- Kalin Arroyo MT, Zedler PH, Fox MD** (1995) *Ecology and Biogeography of Mediterranean Ecosystems in Chile, California, and Australia*. Springer, Berlin, Germany
- Kebeab E, Murdock AJ** (1999) A quantitative model for loss of primary dormancy and induction of secondary dormancy in imbibed seeds of *Orobanchae* spp. *J Exp Bot* **50**: 211–219
- Krause, K** (2015) Grand-scale theft: Kleptoplasty in parasitic plants? *Trends Plant Sci* **20**: 4
- Lechat MM, Brun G, Montiel G, Véronési C, Simier P, Thoiron S, Pouvreau J-B, Delavault P** (2015) Seed response to strigolactone is controlled by abscisic acid-independent DNA methylation in the obligate root parasitic plant, *Phelipanche ramosa* L. Pomel. *J Exp Bot* **66**: 3129–3140
- Lechat MM, Pouvreau JB, Péron T, Gauthier M, Montiel G, Véronési C, Todoroki Y, Le Bizet B, Monteau F, Macherel F, et al.** (2012) PrCYP707A1, and ABA catabolic gene, is a key component of *Phelipanche ramosa* seed germination in response to the strigolactone analogue GR24. *J Exp Bot* **63**: 5311–5322
- Li J-M, Jin Z-X, Hagedorn F, Li M-H** (2014) Short-term parasite-infection alters already the biomass, activity and functional diversity of soil microbial communities. *Sci Rep* **4**: 6895
- López-Ráez JA, Matusova R, Cardoso C, Jamil M, Charnikhova T, Kohlen W, Ruyter-Spira C, Verstappen F, Bouwmeester H** (2008) Strigolactones: ecological significance and use as a target for parasitic plant control. *Pest Manag Sci* **64**: 471–477
- Ljung K** (2013) Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* **140**: 943–950
- Mabrouk Y, Zourgui L, Sifi B, Delavault P, Simier P, Belhadj O** (2006) Some compatible *Rhizobium leguminosarum* strains in peas decrease infections when parasitized by *Orobanchae crenata*. *Weed Res* **47**: 44–53
- Martinčová M, Kaštier P, Krasylenko YA, Gajadoš P, Čertík M, Matusikova I, Blehová A** (2019) Species-specific differences in architecture and chemical composition of dodder seeds. *Flora* **256**: 61–68
- Matusova R, van Mourik T, Bouwmeester HJ** (2004) Changes in the sensitivity of parasitic weed seeds to germination stimulants. *Seed Sci Res* **14**: 335–344
- Mauromicale G, Lo Monaco A, Longo AMG, Restuccia A** (2005) Soil solarization, a non-chemical method to control branched broomrape (*Orobanchae ramosa*) and improve the yield of greenhouse. *Weed Sci* **53**: 877–883
- McAdam SAM, Eléouët MP, Best M, Brodribb TJ, Murphy MC, Cook SD, Dalmais M, Dimitriou T, Gélinas-Marion A, Gill WM, et al.** (2017) Linking auxin with photosynthetic rate via leaf venation. *Plant Physiol* **175**: 351–360
- McNeal JR, Kuehl JV, Boore JL, de Pamphilis CW** (2007) Complete plastid genome sequences suggest strong selection for retention of

- photosynthetic genes in the parasitic plant genus *Cuscuta*. *BMC Plant Biol* **7**: 57
- Mellado A, Zamora R** (2017) Parasites structuring ecological communities: the mistletoe footprint in Mediterranean pine forests. *Funct Ecol* **31**: 2167–2176
- Mohamed KI, Papes M, Williams R, Benz BW, Peterson AT** (2006) Global invasive potential of 10 parasitic witchweeds and related Orobanchaceae. *Amibio* **35**: 281–288
- Molinero-Ruiz L, García-Ruiz R, Melero-Vara JM, Domínguez J** (2009) *Orobanche cumana* race F: performance of resistant sunflower hybrids and aggressiveness of populations of the parasitic weed. *Weed Res* **49**: 469–478
- Montès N, Ballini C, Bonin G, Faures J** (2004) A comparative study of aboveground biomass of three Mediterranean species in a post-fire succession. *Acta Oecol* **25**: 1–6
- Moral J, Lozano-Baena MD, Rubiales D** (2015) Temperature and water stress during conditioning and incubation phase affecting *Orobanche crenata* seed germination and radicle growth. *Front Plant Sci* **6**: 408
- Musselman LJ, Press MC** (1995) Introduction to parasitic plants. In MC Press, JD Graves, eds, *Parasitic Plants*. Chapman and Hall, London, pp 1–13
- Neto OC, Leal IR, Santos JC, Lopes AV** (2017) A holoparasitic plant severely reduces the vegetative and reproductive performance of its host plant in the Caatinga, a Brazilian seasonally dry forest. *Acta Bot Brasiliica* **31**: 147–152
- Nickrent DL** (2020) Parasitic plant genera and species. Parasitic Plant Connection. <http://www.parasiticplantssiu.edu/> (accessed April 27, 2020).
- Parker C** (2009) Observations on the current status of *Orobanche* and *Striga* problems worldwide. *Pest Manag Sci* **65**: 453–459
- Parker C, Riches CR** (1993) *Parasitic Weeds of the World: Biology and Control*. CAB International, Wallingford
- Pennings SC, Callaway RM** (2002) Parasitic plants: parallels and contrasts with herbivores. *Oecologia* **131**: 479–489
- Pennings SC, Simpson JC** (2008) Like herbivores, parasitic plants are limited by host nitrogen content. *Plant Ecol* **196**: 245–250
- Pielach A, Leroux O, Domozych DS, Knox P, Popper ZA** (2014) Arabinogalactan protein-rich cell walls, paramural deposits and ergastic globules define the hyaline bodies of rhinanthoid Orobanchaceae haustoria. *Ann Bot* **114**: 1–15
- Plakhine D, Ziadna H, Joel DM** (2009) Is seed conditioning essential for *Orobanche* germination? *Pest Manag Sci* **65**: 492–496
- Pointurier O, Gibot-Leclerc S, Le Corre V, Reibel C, Strbik F, Colbach N** (2019) Intraspecific seasonal variation of dormancy and mortality of *Phelipanche armosa* seeds. *Weed Res* **59**: 407–418
- Press MC, Phoenix GK** (2005) Impacts of parasitic plants on natural communities. *New Phytol* **166**: 737–751
- Press MC, Scholes JD, Qatling, JR** (1999) Parasitic plants: physiological and ecological interactions with their hosts. In MC Press, JD Scholes, MG Barker, eds. *Physiological Plant Ecology*. Blackwell Scientific Ltd, Oxford, pp 175–197
- Pujadas-Salvà A, Velasco L** (2000) Comparative studies on *Orobanche cernua* L. and *O. cumana* Wallr. (Orobanchaceae) in the Iberian Peninsula. *Bot J Linnean Soc* **134**: 513–527
- Quested H** (2008). Parasitic plants - impacts on nutrient cycling. *Plant Soil* **311**: 269–272
- Roitsch T, Ehneß R** (2000) Regulation of source/sink relations by cytokinins. *Plant Growth Regul* **32**: 359–367
- Roquet C, Coissac E, Cruaud C, Boleda M, Boyer F, Alberti A, Gielly L, Taberlet P, Thuiller W, Van Es J, et al.** (2016) Understanding the evolution of holoparasitic plants: the complete genome of the holoparasites *Cytinus hypocistis* (Cytinaceae). *Ann Bot* **118**: 885–896
- Roy J, Sonié L** (1992) Germination and population dynamics of *Cistus* species in relation to fire. *J Appl Ecol* **29**: 647–655
- Rubiales D, Fernández-Aparicio M, Wegmann K, Joel DM** (2009) Revisiting strategies for reducing the seedbank of *Orobanche* and *Phelipanche* spp. *Weed Res* **49**: 23–33
- Rundel PW** (2019) A neogene heritage: conifer distributions and endemism in Mediterranean-climate ecosystems. *Front Ecol Evol* **7**: 364
- Runyon JB, Mescher MC, De Moraes CM** (2006) Volatile chemical cues guide host location and host selection by parasitic plants. *Science* **313**: 1964–1967
- Runyon JB, Tooker JF, Mescher MC, De Moraes CM** (2009) Parasitic plants in agriculture: chemical ecology of germination and host-plant location as targets for sustainable control: a review. In E Lichtfouse, ed, *Organic Farming, Pest Control and Remediation of Soil Pollutants, Sustainable Agriculture Reviews*. Springer Science + Business Media B.V., Berlin, Germany, pp 123–136
- Ruyter-Spira C, Al-Babili A, van der Krol A, Bouwmeester H** (2013) The biology of strigolactones. *Trends Plant Sci* **18**: 24
- Sauerborn J** (1991) *Parasitic Flowering Plants: Ecology and Management*. Verlag Josef Margraf, Weikershiem, Germany
- Schaller GE, Bishop A, Kieber JJ** (2015) The yin-yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development. *Plant Cell* **27**: 44–63
- Scholes JD, Press MC** (2008) *Striga* infestation of cereal crops – an unsolved problem in resource limited agriculture. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 180–186
- Schneeweiss GM** (2007) Correlated evolution of life history and host range in the nonphotosynthetic parasitic flowering plants *Orobanche* and *Phelipanche* (Orobanchaceae). *J Evol Biol* **20**: 471–478
- Seel WE, Press MC** (1996) Effects of repeated parasitism by *Rhianthus minor* on the growth and photosynthesis of the perennial grass, *Poa alpina*. *New Phytol* **134**: 495–502
- Seiler GJ** (2019) Genetic resources of the sunflower crop wild relatives for resistance to sunflower broomrape. *Helia* **42**: 127–143
- Shabana YM, Müller-Stöver D, Sauerborn J** (2003) Granular Pesta formulation of *Fusarium oxysporum* f.sp. *orthoceras* for biological control of sunflower broomrape: efficacy and shelf-life. *Biol Control* **26**: 189–201
- Shen H, Xu SJ, Hong L, Wang ZM, Ye WH** (2013) Growth but not photosynthesis response of a host plant to infection by a holoparasitic plant depends on nitrogen supply. *PLoS One* **8**: e75555
- Sirhindi G, Mira MA, Sharma P, Gill SS, Kaur H, Mushtaq R** (2015) Modulatory role of jasmonic acid on photosynthetic pigments, antioxidants and stress markers of *Glycine max* L. under nickel stress. *Physiol Mol Biol Plants* **21**: 559–565
- Skuras D, Psaltopoulos D** (2012) A broad overview of the main problems derived from climate change that will affect agricultural production in the Mediterranean area. In *Building Resilience for Adaptation to Climate Change in the Agriculture Sector*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy
- Slavov S, van Onckelen H, Batchvarova R, Atanassov A, Prinsen E** (2004) IAA production during germination of *Orobanche* spp. seeds. *J Plant Physiol* **161**: 847–853
- Torres-Vera R, García JM, Pozo MJ, López-Ráez JA** (2016) Expression of molecular markers associated to defense signaling pathways and strigolactone biosynthesis during the early interaction tomato-*Phelipanche ramosa*. *Physiol Mol Plant Pathol* **94**: 100–107
- Turnau K, Jędrzejczyk R, Domka A, ANielska T, Piwowarczyk R** (2018) Expansion of a holoparasitic plant, *Orobanche lutea* (Orobanchaceae), in post-industrial areas – a possible Zn effect. *Sci Total Environ* **639**: 714–724
- Twyford AD** (2018) Parasitic plants. *Curr Biol* **28**: PR857–R859
- de Vega C, Arista M, Ortiz PL, Herrera CM, Talavera S** (2009) The ant-pollination system of *Cytinus hypocistis* (Cytinaceae), a Mediterranean root holoparasites. *Ann Bot* **103**: 1065–1075
- de Vega C, Arista M, Ortiz PL, Talavera S** (2010) Anatomical relations among endophytic holoparasitic angiosperms, autotrophic host plants and mycorrhizal fungi: a novel tripartite interaction. *Am J Bot* **97**: 730–737
- de Vega C, Arista M, Ortiz PL, Herrera CM, Talavera S** (2011) Endozoochory by beetles: a novel seed dispersal mechanism. *Ann Bot* **107**: 629–637

- de Vega C, Berjano E, Arista M, Ortiz PL, Talavera S, Stuessy TF (2008) Genetic races associated with the genera and sections of host species in the holoparasitic plant *Cytinus* (Cytinaceae) in the Western Mediterranean basin. *New Phytol* **178**: 875–887
- Velthof, G, Barot S, Bloem J, Butterbach-Bahi K, de Vries W, Kros H, Lavelle P, Olesen JE, Oenema O (2011) Nitrogen as a threat to European soil quality. In MA Sutton, CM Howard, J Willem, G Billen, A Bleeker, P Grennfelt, H van Grinsven, B Grizzetti, eds, *The European Nitrogen Assessment*. Cambridge University Press, Cambridge
- Watling JR, Press MC (2001) Impacts of infection by parasitic angiosperms on host photosynthesis. *Plant Biol* **3**: 244–250
- Werner T, Motyka V, Strnad M, Schmölling T (2001) Regulation of plant growth by cytokinins. *Proc Natl Acad Sci* **98**: 10487–10492
- Westwood JH, Yoder JL, Timko, MP, dePamphilis CW (2010) The evolution of parasitism in plants. *Trends Plant Sci* **15**: 4
- Ye X, Zhang M, Dong S, Ma Y (2017) Conditioning duration and agents involved in broomrape seeds responding to germination stimulants. *Plant Growth Regul* **81**: 221–230
- Yoder JL, Scholes JD (2010) Host plant resistance to parasitic weeds; recent progress and bottlenecks. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 478–484
- Yuan Y, Xu X, Gong Z, Tang Y, Wu M, Yan F, Zhang X, Zhang Q, Yang F, Hu X, et al. (2019) Auxin response factor 6A regulates photosynthesis, sugar accumulation, and fruit development in tomato. *Hort Res* **6**: 85
- Zhuang H, Li J, Song J, Hettenhausen C, Schuman MC, Sun G, Zhang C, Li J, Song D, Wu J (2018) Aphid (*Myzus persicae*) feeding on the parasitic plant dodder (*Cuscuta australis*) activates defense responses in both the parasite and soybean host. *New Phytol* **218**: 1586–1596
- Zwanenburg B, Mwakaboko AS, Reizelman A, Anilkumar G, Sethumadhavan D (2008) Structure and function of natural and synthetic signalling molecules in parasitic weed germination. *Plant Manag Sci* **65**: 478–491
- Zwanenburg B, Pospíšil T, Zeljković SC (2016) Strigolactones: new plant hormones in action. *Planta* **243**: 1311–1326

