



UNIVERSITAT DE BARCELONA


Envelliment en plantes perennes de gran longevitat: importància de l'estrès oxidatiu i la vitamina E

Melanie Morales Fernández

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

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

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



**Envelliment en plantes perennes de gran longevitat:
importància de l'estrès oxidatiu i la vitamina E**

Melanie Morales Fernández

Envelliment en plantes perennes de gran longevitat: importància de l'estrès oxidatiu i la vitamina E

Memòria presentada per Melanie Morales Fernández per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona.

Aquest treball s'emmarca dins el programa de doctorat de BIOLOGIA VEGETAL del Departament de Biologia Vegetal de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona.

El present treball ha estat realitzat al Departament de Biologia Vegetal de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona sota la direcció del Dr. Sergi Munné Bosch.

Doctoranda:

Director i Tutor de la Tesi:

Melanie Morales Fernández

Sergi Munné Bosch

A TODOS los que habéis formado parte de este camino,

a mi FAMILIA y AMIGOS,

por escribir a mi lado la otra tesis,

y en especial a TI,

por escribir la mejor parte de mí.

“Hay un libro abierto siempre para todos los ojos:

LA NATURALEZA”

Jean-Jacques Rousseau

**“Nothing in biology makes
sense except in the light of
evolution”**

Theodosius Dobzhansky

**“If we wish to understand life
we must study death”**

Jacob Levitt

**“Envejecer es aún el único medio
que se ha encontrado para vivir
mucho tiempo”**

Charles-Augustin Sainte-Beuve

**“Aquilo que você mais sabe ensinar,
é o que você mais precisa aprender”**

Richard Bach

ÍNDEX

AGRAÏMENTS	i
ABREVIATURES	vii
INTRODUCCIÓ GENERAL	1
1. Envelliment	3
1.1. Què és l'envelliment?	3
1.2. Teories sobre l'envelliment	7
1.3. L'envelliment en plantes perennes	14
1.4. Efecte del tamany, maduresa i sexe en els processos associats a l'envelliment	17
2. Estrès oxidatiu en plantes	25
2.1. Estrès oxidatiu	26
2.2. Espècies reactives de l'oxigen	28
2.3. Antioxidants	34
2.4. Marcadors d'estrès oxidatiu	38
3. Models d'estudi	39
3.1. <i>Borderea pyrenaica</i>	40
3.2. <i>Vellozia gigantea</i>	42
OBJECTIUS	45
INFORME DEL DIRECTOR DE TESI SOBRE L'IMPACTE DELS ARTICLES PUBLICATS I LA PARTICIPACIÓ DE LA DOCTORANDA	49
RESULTATS	55
Capítol 1: Absència de deteriorament fisiològic en els marcadors d'estrès oxidatiu en l'envelliment en <i>Borderea pyrenaica</i> , una planta herbàcia d'extraordinària longevitat	57
Capítol 2: El secret de la llarga vida s'amaga en l'òrgan subterrani	77
Capítol 3: Tocotrienols en fulles de <i>Vellozia gigantea</i> : ocurrència i modulació per efectes de tamany i estacionals	87
Capítol 4: Resposta ecofisiològica a les variacions estacionals en la disponibilitat hídrica en la planta arborescent i endèmica <i>Vellozia gigantea</i>	103

DISCUSSIÓ	121
1. Envel·liment en plantes perennes de gran longevitat	123
1.1. L'envelliment en la natura	127
1.2. Casos que desafien l'envelliment	130
A) Senescència negativa en <i>Borderea pyrenaica</i>	131
B) Senescència negligible en <i>Vellozia gigantea</i>	135
1.3. L'estrès oxidatiu no augmenta amb l'edat	137
2. Mecanismes de protecció a l'estrès oxidatiu	143
2.1. Mecanismes de protecció en <i>Borderea pyrenaica</i>	144
2.2. Mecanismes de protecció en <i>Vellozia gigantea</i>	149
3. La vitamina E com a marcador d'estrès oxidatiu i senescència	155
4. La vitamina E com a possible punt de control en la resposta a l'estrès abiòtic i biòtic	159
5. Dificultat dels estudis d'envelliment en plantes perennes	162
5.1. Aïllament del factor edat	162
5.2. Limitacions tècniques	163
5.3. Rang d'edats	166
CONCLUSIONS	169
BIBLIOGRAFIA	175

AGRAÏMENTS

Definitivament, no puc ajornar més aquest moment... i és que encara que em sembli estrany, ha arribat el moment d'escriure les últimes paraules de la tesi. Tot i que sigui l'oportunitat per poder agrair a totes aquelles persones que m'han acompanyat en aquest viatge, m'he anat resistint a escriure aquesta part, deixant-la quasi, quasi fins l'últim moment... i és que és un moment de molta nostàlgia (com el nen que no vol marxar del "país del nunca jamás" i és que tot s'ha de dir, fer un doctorat amb el Munni's team, és difícil de superar!). Nostàlgia enorgullida de recordar com em vaig embarcar en aquesta aventura, cada capítol d'aquesta història i que, de sobte, ja ha arribat al seu fi. Arribat aquest punt, només es pot estar agraïda a totes les persones que m'han envoltat, acompanyat i ajudat en qualsevol dels moments que al llarg dels últims tres anys són part inesborrable d'aquesta història. GRÀCIES A TOTS VOSALTRES.

Sense cap mena de dubte, si he de començar per agrair-li a algú que avui hagi arribat tant lluny, aquest és qui em va brindar la oportunitat i va dipositar la seva confiança en aquella alumna perduda de 2n curs en Biologia, primer per col·laborar en el seu grup de recerca i, després, en l'aventura de la tesi. Com sempre ens agrada recordar a mi "gemeli" de tesi i a mi, mai se'ns oblidarà el primer dia que et vam tenir com a professor, vas aparèixer per la porta de darrere de classe, amb una plantutxa enorme que feies patir mentre baixaves les escales i et miràvem al·lucinant mentre ens deïes... "si voleu estudiar i entendre les plantes, pregunteu-li..." i així ens reparties un full tot de preguntes rares... "Les plantes tenen memòria? Les plantes tenen jet-lag? Les plantes envelleixen...?" Doncs vet aquí que ja no em semblen tan estranyes aquestes preguntes, i és que segurament m'has contagiats de la teva bogeria per la ciència, a més de la teva motivació infinita per superar-se, del teu esperit filosòfic que patenta el nostre treball; i és que més enllà del que és "FER", m'has ensenyat a "OBSERVAR" i "PENSAR". Gràcies Sergi, per ser el nostre entrenador (Luis Enrique al teu gust) tant en l'àmbit de la ciència com en l'àmbit personal. Per estar sempre disponible per atendre els meus dubtes, els meus problemes... però sobretot, per confiar tant en mi i ser un exemple a seguir, demostrant dia rere dia que ets un crack en tot el que et proposes (escriure articles en un dia... corregir tesis en mig... veure errors en

Agraïments

un gràfic o excel abans d'obrir-lo!) "tu si que ets la canya!". Però que sobretot, es pot tenir la màxima passió i dedicació per la feina, sense deixar de ser millor persona. Gràcies per ser el millor director de tesi que es pot tenir, però gràcies encara més per ser sempre molt més que un director.

Y tu niñita de mis ojos, ¿que te voy a decir? Mi "gemeli" de tesis, Marteta de mi vida y do meu coração! Quan recordo el primer dia que ens vam conèixer, en el nostre primer seminari al grup, com a petits xipironets que començàvem a col·laborar... i fixa't fins on hem arribat, sempre "mano a mano" per superar qualsevol repte, dins i fora del laboratori. Des dels primers moments que ens vam haver d'espavilar entre protocols i formules xungues... passant per l'any caòtic de màster on ens vam recolzar una en l'altre per a poder entregar els interminables treballs, mentre no deixàvem de fer moltíssimes altres coses, a més a més de la tesi. Sempre juntes, en busca del re-re-enfoc de la tesi! Estic segura que sense tu, no tindria aquest wonderful record de tots aquests anys. Els teus ànims com amiga i companya han estat sempre la base del meu pilar per superar qualsevol repte des del primer dia fins a l'últim moment, en que m'has ajudat tant en la fase final... gràcies per ser el solete més gran, sempre amb energia, optimisme i il·lusió, no tinc cap dubte que seguirem lluitant juntes, encara que per una època haguem de seguir camins diferents. Tornarem a ser M&M's algun dia, encara queden moltes plantetes per investigar la dioècia i l'ageing !

I al llarg d'aquesta gran aventura, gràcies a tots els que han estat membres del MUNNI'S TEAM, res hagués estat el mateix sense aquest equipazo. És innegable que els temps han canviat molt, i que les persones que han anat marxant com les que han anat entrant han marcat etapes diferents, però sempre amb el bon rotllo i companyerisme que us fa a tots immillorables. En especial gràcies a qui em va apropar per primera vegada a una *Arabidopsis* i em va contagiar de la seva passió per la ciència, gràcies Amparo, per la teva paciència i ganes d'ensenyar-me, al final vas aconseguir que aquella noieta que començava la carrera i que res coneixia de les plantes (i encara menys s'havia plantejat mai de fer un doctorat) arribés tant lluny. Gràcies a la Martuki, la Laiuski i la Jana; les tres heu estat el meu referent i la meva font d'informació en tots els moments de desesperació des del

principi. Gracias Martuki, por en aquel momento en mi inocencia presentarme a la maravillosa Borderea, que además de que ya brilla por ella misma, todos tus truquitos en el lab para datarla y demás, reflexiones y charlas, y en resumen todo tu apoyo en el que fue mi primer estudio de predoc, han sido esenciales para recolectar un gran fruto. Gràcies Laia, ets d'aquelles persones que sempre es tenen en la ment i que mai es deixen de trobar a faltar. Perquè a solucionar problemes en el lab, a preocupar-te sempre per les "babies", a estar simplement sempre disposada a ajudar-me i escoltar-me, no et guanya ningú! I gràcies a la Jana, que a més a més de donar-nos el prestigi de presentar-nos al Jasco com les teves amigues perquè no ens agafés mania i no es declarés en vaga en absència de l'Esther o Isidre (gràcies infinites a tots dos, sou la nostra salvació i de veritat, que sense vosaltres crec que hauríem acabat a un psiquiatre imaginant-nos bombolles, columnes i filtres embussats per tot arreu!); més enllà d'una companya sempre has tingut un gest carinyós en els moments més necessitats. Gràcies Maren, per la teva ajuda i paciència des del primer dia i sobretot, per contagiar sempre tanta tranquil·litat, essencial per superar qualsevol moment de crisi. Gràcies al super Iker, per ser el nostre enllaç directe a "google it", ensenyar-me tot allò que no s'aprèn en els articles i facilitar-nos, moltíssim, la vida al laboratori. D'això últim has agafat el relevo Xavi, gràcies infinites per tenir paciència i desxifrar-me els teus valuosos protocols, i per ser d'aquelles persones que a mesura que vas coneixent et sorprenden, i fins i tot estan disponibles a compartir un bon pot de Nutella. Gracias mi Laurita, por devolverme el espíritu navideño y tener siempre esos bonitos detalles que uno a veces olvida, seguiré siendo tu "coach" siempre que lo necesites. Gràcies Cubri, la racionalitat del grup, sempre has demostrat que ets una tia 10 que sap el que vol, va ser un plaer compartir amb tu tantes bones estones. Gracias a la nuevas incorporaciones, Bárbarins por ser la alegría de la huerta, y lo sabes!, así que ánimo porque estoy segura que harás una super tesi. Gracias Eva por darle aún más tu toque de locura al grupo, Vero por endulzarnos la rutina, Dani por tu espíritu brasileiro. Gràcies Alba, per fer-me sempre riure i demostrar que ets molt més que una alumna de grau, ets una crack! Tenim Borderea (o lo que sea) pendent! Pensaves que m'oblidava de tu? Doncs no, mi mami de tesi! aiii Marta, espero algun dia poder tornar-te tot el que sempre has fet per mi, dins i fora de la

Agraïments

uni, per ser el meu ídol superwoman, l'amiga que sempre t'escolta i t'aconsella. Gràcies pel teu recolzament infinit i la teva preocupació per mi, saps que per a mi ets insubstituïble!

Então, também quero agradecer as minhas chicas, Leilane e Elisa, porque me acolheram em BH com sua luz, amizade e boa energia. Foi muito prazer conhecer vocês e ainda mais ter a oportunidade de trabalhar e reencontrarmos em Bcn. Vocês fizeram uma etapa inolvidável que não vou esquecer nunca. Obrigada mais uma vez, saudade infinita! Pra Queila também dizer, muito mais que minha orientadora na UFMG, obrigada sempre pela sua atenção e dedicação na minha formação... Nessa viagem tive a oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas, mais fui a mais afortunada de me encontrar com as mais valiosas que fazem parte de mim (gracias mi Laurinha y Diego, e Dene, aun separados por la distancia formáis parte de este gran camino).

Gràcies a tota la gent del The-Parta, des dels primers que em van acollir (Mireia, Sam, Luisinho, Jordins, Guillem, Isis, Marta R...) i en especial a la Ruth, m'encanten les nostres xerrades sempre que ens creuem.

Gràcies a tots el professor del Departament que han estat part de la meva formació i que en qualsevol moment m'han pogut ajudar a resoldre qualsevol problema. Sobretot gràcies a dues persones, que sempre estan disposades a ajudar-te, Carmen per salvar-me dels problemes tècnics i Esther per la teva infinita paciència administrativa en el nostre caos. Amb la vostra alegria el dia a dia és molt més fàcil.

Gràcies a les biòlogues més maques de l'univers! (Emma, Maria, Laureska i Laura, Sonia, Silvia F, Silvia S, Patri, Xini i Jansu) en las que encontré mi biolocura, sabeu que encara que cadascuna acabi en una punta del món, seguirem sent inseparables.

Dentro de esta aventura, a las personas más cercanas que aunque aún no entiendan muy bien si estudio, trabajo, y que si pa' tanto dan las plantas... Gracias Laura, Nuria, Patri y Sara, por estar siempre a mi lado y quererme tanto aun siendo una loca de las plantas.

Gracias a mi familia, por vuestro apoyo incondicional y sentirnos tan orgullosos siempre de mí... a la mama por ser tan pesada, que sería sino de mi... pero en especial a mi Manolita, que desde que soy pequeña siempre te he admirado en todo lo que haces y en querer parecerme a ti. Me contagiaste tu amor por la biología y, aun a veces a contracorriente, a usar siempre la razón. A los yayos, Jose y Juanín, esto se merece unas cuantas sidrinas. I a l'ignasi, no pensis que no agraeixo tot el teu recolzament en mi, gràcies pels teus consells, em sento molt afortunada de poder ser una alumna més teva.

Moltes persones, històries, records, moments... que podria seguir escrivint, però si hagués d'imaginar-me tot aquest camí sense una d'elles, possiblement no em sentiria tant enamorada de la persona que avui sóc, gràcies infinites a TU. Al meu Ramonet, que has il·luminat la meva vida d'una forma que els dies més foscos i desesperants desapareixen simplement al teu costat, que sempre m'escoltes i penses que sóc la millor en tot, compartir la vida amb algú que pensa això de tu és la millor vitamina de la màxima felicitat infinita... sóc conscient que a vegades te'n portes la pitjor part de mi, però encara així em segueixes estimant (i encara més, gràcies!!) perquè junts sabem que ja formem part d'una única peça, que plena de somnis i il·lusions seguirem construint un gran camí junts (T'estimo!). I gràcies per la família que m'has regalat, però sobretot al papixi i la mamixi, gràcies pel vostre carinyo incondicional en mi.

Gràcies i gràcies... perquè darrere d'aquestes pàgines tots formeu part d'una gran història que romandrà escrita en el més fons del meu interior, gràcies per sempre.

ABREVIATURES

$^1\text{O}_2$	Singlet d'oxigen	LOOH	Hidroperòxids lipídics
α-Toc	α -Tocoferol	LOX	Lipoxigenasa
ABA	Àcid abscísic	MDA	Àcid malondialdehid
APX	Ascorbat peroxidasa	MDHA	Monodehidroascorbat
Asc	Ascorbat	MDHAR	Monodehidroascorbat reductasa
ATP	Trifosfat d'adenosina	NADH	Nicotinamida adenina dinucleòtid
CAT	Catalasa	NADPH	Nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat
Car	Carotenoides	$\text{O}_2^{\cdot-}$	Radical superòxid
DHA	Dehidroascorbat	$\text{OH}^{\cdot-}$	Radical hidroxil
DHAR	Dehidroascorbat reductasa	OPDA	Àcid 12-oxofitodienoic
DPS	Estat de de-epoxidació del cicle de les xantofil·les	PC	Pastocianina
Fd	Ferredoxina	PQ	Plastoquinona
F_v/F_m	Eficiència màxima del fotosistema II	PSI	Fotosistema I
GR	Glutació reductasa	PSII	Fotosistema II
GSH	Glutació	PUFA	Àcid gras poliinsaturat
GSSG	Glutació oxidat	ROS	Espècies reactives de l'oxigen
H_2O_2	Peròxid d'hidrogen	RWC	Contingut hídric relatiu
JA	Àcid jasmònic	SA	Àcid salicílic
JA-Ile	Àcid jasmònic isoleucina	SOD	Superòxid dismutasa
LMA	Massa foliar per àrea	UQ	Ubiquinona
LOO^{\cdot}	Radicals lipídics peroxil	VZA	Suma dels components dels cicle de les xantofil·les



INTRODUCCIÓ GENERAL

INTRODUCCIÓ GENERAL

1. Envel·liment

Amb el pas del temps els organismes vius envellim (o no, segons què s'entengui per envelliment). En humans i en la majoria dels animals els canvis associats a l'edat són molt visibles. Darrere d'aquests símptomes obvis de vellesa s'amaguen tot un conjunt de processos fisiològics àmpliament estudiats en aquests organismes. Sorprenentment poc es coneix sobre aquest procés en plantes, en les que curiosament alguns dels estudis realitzats mostren resultats molt interessants.

Actualment, encara són moltes les preguntes que ens fem sobre aquest fenomen biològic. Per què envellim? Per què hi ha organismes que moren després d'una llarga vellesa (major longevitat) mentre que d'altres ho fan immediatament després de reproduir-se? Per què els organismes que es crien en captivitat envelleixen més lentament que els que viuen de manera salvatge? Per què no existeixen organismes – sense reproducció asexual – immortals? Podríem respondre totes aquestes qüestions si existís una teoria que expliqués “per què” i “com” es produeix l'envelliment.

1.1. Què és l'envelliment?

En el cicle vital dels organismes, la darrera etapa abans de la mort de l'individu es coneix amb el nom de senescència. En la literatura, sobretot del regne animal, apareixen amb freqüència els termes senescència i envelliment com a sinònims. Per exemple, l'Institut d'Estudis Catalans defineix el terme “senescència” com “l'acció d'envellir” o “envelliment”. En aquest context ambdós s'entenen com a una disminució de les funcions fisiològiques amb l'edat, reflectint-se en un increment de la taxa de mortalitat i una disminució de l'èxit reproductiu amb l'edat (Ricklefs & Finch, 1995). No obstant, en referència a organismes del regne vegetal (que veurem més detalladament en

l'apartat 1.3) s'ha descrit la senescència i l'envelliment com a processos diferents, tot i estar molt relacionats entre ells. Per tant, pot ser a vegades imprescindible considerar les diferències conceptuals d'aquests processos que en alguns organismes es poden donar, tal com alguns autors van observar en els seus estudis per aproximar-se a entendre l'envelliment (Medawar, 1952; Ricklefs & Finch, 1995). Medawar (1952) va definir l'envelliment com els canvis progressius que es donen i s'acumulen amb l'edat en els individus adults, però que no necessàriament redueixen la seva viabilitat, ja que aquests canvis podien tenir un efecte positiu, negatiu o indiferent en l'organisme. En canvi, va descriure la senescència com el procés que conduïa a una disminució de la viabilitat en els organismes, com a conseqüència, per exemple, de l'acumulació de mutacions en les cèl·lules que incrementen la probabilitat de patir càncer o qualsevol malaltia associada a l'edat.

Tot i que no sigui fàcil donar una definició única de senescència es pot caracteritzar aquest procés biològic com universal, progressiu, intrínsec, supressor, irreversible i específic (Strehler, 1962). És universal perquè afecta a tots els éssers vius multicel·lulars constituint l'etapa final del seu cicle vital. Filogenèticament es considera que, en general, les espècies més evolucionades són més longeves i, per tant, els processos de senescència són més accentuats i visibles. Encara que és difícil determinar el punt d'inici en que comença la senescència de l'organisme, quan aquest s'estableix transcorre de forma progressiva (seqüencial i gradualment) a una velocitat que depèn de cada espècie i individu (específic i heterogeni), observant en la natura espècies en que la senescència es dona de forma molt ràpida mentre que en altres forma part d'un rang ampli de la vida de l'organisme, per això també es considera que és específic de cada espècie. A més a més, els canvis que es van donant són intrínsecs a l'organisme, és a dir, tenen un origen intern de base genètica que determina la longevitat màxima de cada espècie, els quals són supressors o deleteris ja que disminueixen fins a reduir progressivament certes funcions

fisiològiques com, per exemple, la regeneració cel·lular d'alguns teixits. Un altre punt obvi de la senescència és la seva irreversibilitat, i és que quan el procés s'inicia és impossible tornar a fases prèvies. En aquest sentit els humans no han deixat d'investigar i aplicar tècniques o teràpies en la recerca de mètodes efectius "anti-envel·liment" (que s'haurien d'anomenar correctament anti-senescents) que aconseguixin alentir aquest procés i/o incrementar la longevitat, i fins i tot trobar l'elixir que pugui evitar la senescència de l'organisme. Entre les aplicacions que semblen ajudar a retardar els processos degeneratius associats a l'envel·liment (envel·liment saludable) trobem la restricció calòrica, l'exercici físic moderat i el consum adequat d'antioxidants que ajuden a eliminar els compostos tòxics generats pel metabolisme cel·lular; basades en algunes de les teories més acceptades que s'explicaran en el següent apartat.

L'observació de la natura ens mostra la seva pròpia història sobre l'envel·liment de les espècies, i és que s'hi troba un ampli rang de diversos patrons en quant al cicle vital (esperança de vida i longevitat) i com aquestes envelleixen (mecanismes). L'observació d'aquesta diversitat ha servit (serveix i servirà) per entendre i desenvolupar multitud de teories sobre l'envel·liment i la longevitat de les espècies. Aquestes teories (descrites en l'**apartat 1.2**) intenten explicar per què existeix l'envel·liment i per què han evolucionat diferents patrons d'envel·liment entre les espècies (Ricklefs & Finch, 1995). La majoria de teories més acceptades s'han desenvolupat en base a l'estudi en humans i en animals testats al laboratori, però el coneixement sobre els processos d'envel·liment en poblacions naturals encara és limitat. Només l'estudi dels processos associats a l'edat en el rang més ampli d'espècies possible podria aproximar-se a donar patrons que puguin explicar l'envel·liment (biològic), i suggerir alguns dels mecanismes que s'amaguen darrere dels processos de la senescència dels organismes.

Un dels mètodes que s'utilitza per estudiar i comparar les taxes de mortalitat entre poblacions és l'equació de Gompertz (coneguda com la llei de la mortalitat o corba de la supervivència, desenvolupada per Benjamin Gompertz al 1825). En la majoria d'espècies animals i vegetals, com en els humans, la taxa de mortalitat incrementa gradualment i progressivament amb l'edat. La diversitat de taxes d'envelliment, la varietat en la longevitat entre les espècies, com les observacions desconcertants dels cicles vitals d'algunes espècies va ser, possiblement, el que va despertar la crida per la comprensió de l'evolució biològica de l'envelliment.

Per exemple, les espècies vegetals del bambú (Bambuseae), pertanyents a la família de les Poaceae, presenten un cicle vital curiós i és que són plantes que es reproduïxen vegetativament (asexulament) fins a un període de 100 anys, en el qual creixen formant una àmplia densitat de plantes (clons entre elles). Després d'un període de temps, totes les plantes floreixen simultàniament, es reproduïxen per primera vegada sexualment després d'haver format multitud de clons, i aleshores moren. Al cap de 100 anys, depenent de l'espècie de bambú (l'espècie més longeva registrada és *Phyllostachys bambusoides*, que floreix als 130 anys) es torna a repetir el mateix procés (Keeley & Bond, 1999).

Aquest intrigant patró en el cicle vital, juntament amb altres observacions similars de cicles vitals "suïcides" d'altres espècies com el salmó (gènere *Salmo*, família Salmonidae) han promogut la idea que la reproducció sexual podria haver sorgit en l'evolució suposant un cost en la longevitat de les espècies. Moltes teories s'han desenvolupat en base a aquesta idea (teoria de l'esforç reproductiu, Rose, 1991), i postulen que la majoria de processos associats a l'envelliment (deteriorament fisiològic) es veuen clarament accelerats després de l'etapa reproductiva de l'espècie, influenciats per l'activitat d'hormones o altres processos fisiològics associats a la reproducció.

En resum, la compensació entre els diferents trets dels organismes, ja siguin genètics (com els processos de mutació i selecció) o reproductius (esforç reproductiu) podrien haver contribuït en l'evolució de la senescència i la longevitat de les espècies (Gavrilov & Gavrilova, 2002). Aquesta diversitat d'idees han donat lloc a la multitud de teories que veurem a continuació.

1.2. Teories sobre l'envel·liment

Al llarg de la història de la societat humana la preocupació inherent per entendre i trobar un remei contra la senescència ha donat lloc al plantejament d'una àmplia diversitat de teories. Entre l'abundant literatura científica que es troba en l'actualitat sobre aquest tema, és interessant conèixer els seus antecedents històrics i com aquestes idees s'han desenvolupat amb el temps. A continuació, es presenta una síntesi sobre algunes de les teories més destacades que han sorgit per entendre el complex procés de l'envel·liment.

Ja en la Grècia Clàssica trobem la primera teoria desenvolupada per Aristòtil – considerat el pare de la biologia – la qual va desenvolupar en els diferents tractats (*De juventute et senectute, De vita et morte, De respiratione*) recollits en la seva coneguda obra *Parva naturalia*. Va ser el primer en tractar el tema de l'envel·liment que descrivia com el procés de pèrdua de calor i humitat que es dona amb l'edat, en altres paraules, que cada individu naixia amb una quantitat d'energia que s'anava consumint al llarg de la seva vida. Aquesta teoria va inspirar als filòsofs durant l'Edat Mitjana els quals van dedicar els seus pensaments i estudis a trobar un remei contra la senescència. Però no va ser fins l'aparició de les teories evolucionistes (amb Darwin) i els avanços en la genètica i la teoria cel·lular durant el segle XIX i principis del XX que es van transformar profundament els coneixements sobre els processos dels éssers vius com l'envel·liment.

En el marc històric del pensament evolucionista, la idea de la selecció natural transmesa per Darwin (1859) semblava oposar-se a que les espècies

haguessin mantingut al llarg de la seva evolució un procés que tenia un efecte negatiu en l'organisme com la senescència, però tot i així, aquest s'havia mantingut i seleccionat a favor al llarg de l'evolució de les espècies. Això va donar lloc al conegut "dilema de Darwin sobre l'envelliment de les espècies", al qual no va trobar-hi explicació. Des d'aquesta perspectiva, era difícil entendre per què la selecció natural havia escollit trets estranyament perjudicials com la senescència i les malalties degeneratives associades a l'edat, en comptes de l'eterna joventut i la immortalitat dels organismes.

Posteriorment, diverses teories evolucionistes van ser proposades per tal de donar un significat evolutiu a la senescència, basades principalment en la interacció dels processos de selecció i mutació. Les més destacades varen ser la teoria de la mort programada per August Weismann (1882), l'acumulació de mutacions per Peter Medawar (1952), la pleiotropia antagònica per George Williams (1957) i el soma rebutjable per Tom Kirkwood i Robin Holliday (1979). El 1882, el biòleg alemany A. Weismann suggeria que la mort programada era un tret genètic, una adaptació, que havia evolucionat a través de la selecció natural per tal de beneficiar l'espècie, encara que fos negatiu per a l'individu. Weismann entenia la mort programada com un aspecte positiu a nivell poblacional, ja que la desaparició dels individus més vells proporcionava més recursos (menjar i hàbitat) als individus més joves, permetent d'aquesta forma l'evolució de l'espècie. La idea clau que va transmetre Weismann va ser la capacitat limitada de la divisió cel·lular (excepte en les cèl·lules germinals) i, per tant, la programació de les cèl·lules per morir. Aquesta concepció va impulsar posteriors teories basades en la replicació finita cel·lular, com la teoria de la mort cel·lular apoptòtica (Lockshin & Williams, 1965; Zhang *et al.*, 2004), la mort cel·lular programada mitjançant la restricció dels codons (Strehler *et al.*, 1971) i la teoria del límit de Hayflick (Hayflick, 1965) (veure **Figura 1**).

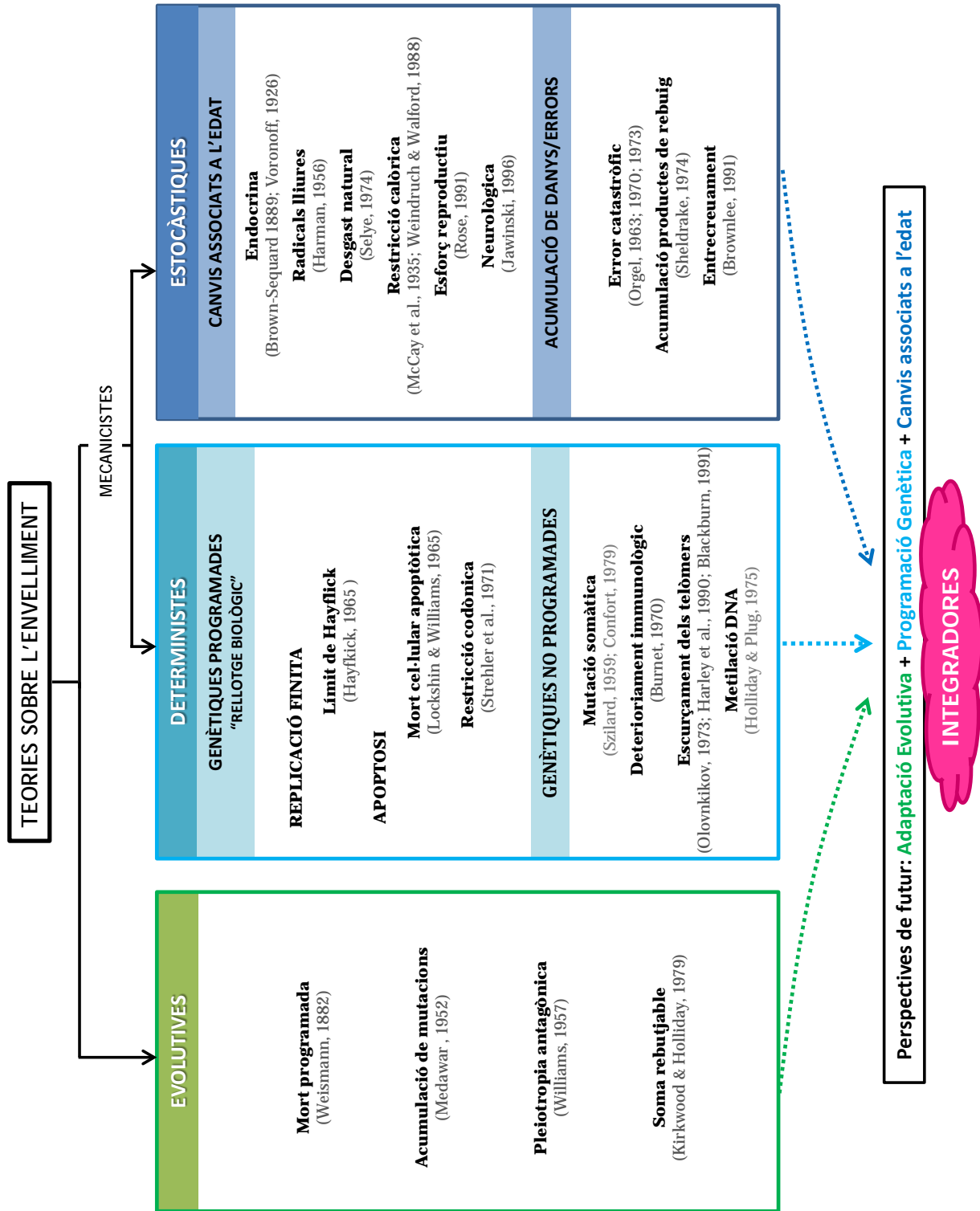


Figura 1. Classificació de les teories sobre l'envel·liment.

En la dècada del 1950 sorgeixen les primeres teories evolutives modernes sobre l'envelliment, presentades per P. Medawar i G. Williams, suggerint que l'evolució actuaria de forma neutral sobre la senescència, és a dir, la supervivència dels individus millor adaptats (lleis de la selecció natural) només s'exercia sobre els individus més joves deixant d'actuar en els d'edats avançades. Per definir l'edat de "vell", o en altres paraules, l'edat en què l'organisme entra en la fase senescent del seu cicle vital, consideraven que aquesta depenia de l'espècie com de l'edat de maduresa reproductiva d'aquesta, idees que van ajudar a entendre la variabilitat en la longevitat de les espècies en la natura.

La primera teoria moderna sobre l'envelliment en animals va ser formulada per Peter Medawar (1952) que descrivia el procés de l'envelliment com l'acumulació de mutacions al llarg de la vida de l'organisme. Les mutacions que s'expressen en edats avançades no poden ser eliminades per la selecció natural (ja que aquests ja han deixat descendència) i s'acumulen generant fenotips envellits i mantenint els processos associats a l'envelliment, com la pèrdua de mobilitat i l'augment de la susceptibilitat a malalties. Una proposta subsidiària d'aquesta és la realitzada per Richard Dawkins en el seu conegut llibre *The Selfish Gene* (1976), que estableix que els gens que són perjudicials per a la supervivència aconseguixen mantenir-se gràcies a que s'expressen tardanament, després de l'etapa reproductiva.

Posteriorment, George Williams va seguir desenvolupant aquesta idea amb la teoria de la pleiotropia antagònica (1957), afegint que els gens deleteris d'expressió tardana poden estar afavorits i seleccionats de manera activa en les poblacions si tenen efectes beneficiosos en les primeres etapes de la vida. Aquesta teoria va donar explicació al concepte del cost reproductiu que s'observava en algunes espècies (recordem l'exemple del bambú i del salmó), que donaria lloc a la teoria de l'esforç reproductiu anys més tard (Kirkwood & Rose, 1991; Rose, 1991; Kirkwood, 2001; Rose *et al.*, 2004).

L'any 1979, Kirkwood & Holliday van presentar la teoria del soma rebutjable postulant que la longevitat de les diferents espècies depenia de l'equilibri entre la seva capacitat reproductora i l'eficàcia dels seus mecanismes de manteniment i reparació de les cèl·lules diferenciades del soma, destinades a "rebutjar-se" una vegada que s'hagués assegurat la supervivència de l'espècie a través de la reproducció.

Actualment les teories evolutives més estudiades i acceptades són la teoria de l'acumulació de mutacions i la teoria de la pleiotropia antagònica; les quals no són mútuament excloents, i totes dos podrien arribar a formar part d'una futura teoria unificadora sobre l'envelliment (Gavrilov & Gavrilova, 2002; Kirkwood & Melov, 2011).

Com s'ha mencionat anteriorment, la teoria de Weismann va impulsar la manifestació d'un conjunt de teories modernes basades en la senescència programada, definint que la senescència era una manifestació d'un programa biològic o un mecanisme de suïcidi de l'organisme (Swim, 1959; Hayflick, 1965). Això va generar a principis dels anys 80 un gir d'ideologia en el qual varies teories suggerien que l'evolució, ni s'oposava ni era neutra, sinó que promovia mecanismes biològics com la senescència amb l'objectiu de limitar, intencionadament, la vida dels individus més vells. Si això fos així, existiria la possibilitat de trobar agents "anti-senescents" capaços d'interferir en aquest programa biològic i retardar (i fins i tot evitar) els processos associats a l'envelliment. Donat que molts estudis han obtingut resultats que suporten aquesta teoria com la més aproximada per entendre la senescència dels organismes, actualment existeix una important inversió en investigacions a la recerca d'agents que evitin la senescència.

En els últims anys els científics que investiguen aquest tema estant arribant poc a poc a un consens sobre els processos que determinen la senescència, ja que s'ha vist que moltes teories poden coexistir sense

excloure's entre elles. Algunes de les més conegudes són la teoria de l'escurçament dels telòmers, la teoria del dany en el material genètic hereditari (DNA), la teoria dels radicals lliures o estrès oxidatiu i, una de les més recents, la teoria de la restricció calòrica.

Paral·lelament al marc d'idees evolucionistes s'han originat infinitat de diverses teories, diferents entre elles conceptualment però amb el mateix objectiu de respondre "per què" i "com" es dona la senescència en els éssers vius. Considerant aquest aspecte es solen classificar les teories en evolucionistes, que són aquelles que tracten de respondre "per què" la senescència va aparèixer i no ha estat eliminada al llarg de l'evolució, tractant de respondre al "dilema de Darwin"; i per altra banda en mecanicistes, quan responen al "com" descrivint diferents mecanismes a nivell cel·lular, molecular i sistèmic que causen la senescència. La majoria de teories evolutives coincideixen en el fet que la senescència és un procés seleccionat per l'evolució, i per tant programat, amb una finalitat en la biologia de les espècies; mentre que actuals teòrics rebutgen aquesta concepció adaptativa de la senescència.

Adicionalment, es poden catalogar les teories en dos grups (aparentment oposats) i que es solapa amb l'enfoc anterior que són, en primer lloc, el grup de teories que descriuen la senescència com un procés programat (teories deterministes), depenent de rellotges biològics que regulen la cronologia de la longevitat mitjançant gens que s'activen i es desactiven seqüencialment. L'altre grup sosté que no hi ha cap programació de la senescència, si no que aquesta succeeix per un procés aleatori d'acumulació de danys i errors amb l'edat (teories estocàstiques) que provoquen un deteriorament de les funcions fisiològiques de l'organisme.

Com veiem, l'envelliment pot ser estudiat des de diferents punts de vista i, com a conseqüència, es poden classificar les teories sobre l'envelliment des

de diferents aproximacions, depenent de l'enfoc que es faci servir per definir l'envel·liment i descriure els factors implicats en el procés. L'any 1990, més de 300 teories van ser catalogades per Zhores A. Medvedev i publicades en "An attempt at a rational classification of theories of ageing", una àmplia recollida de les centenars de teories que en l'últim segle havien aparegut relacionades amb l'envel·liment. Davant d'aquesta complexitat i diversitat de teories, aquí es presenta una breu classificació basada en la proposada per Medvedev, juntament amb d'altres presentades més recentment (Gavrilov & Gavrilova, 2002; Guelman, 2004; Goldsmith, 2014), amb l'objectiu d'oferir una visió àmplia de les teories sobre l'envel·liment (**Figura 1**).

Aquesta inclou des de les teories més actuals a les primeres teories evolucionistes, considerant aquelles que es basen en l'envel·liment programat (deterministes) com les que es basen en factors aleatoris (estocàstiques) que s'acumulen com a conseqüència dels canvis associats a l'edat, proposant com a perspectiva de futur la necessitat d'unificar les diverses tendències i crear teories integradores que tractin d'estudiar els processos associats a l'edat a diferents nivells, tant fisiològics com moleculars i bioquímics, integrant el seu conjunt i que permeti entendre la senescència com un fenomen global multidimensional format per un conjunt d'interaccions complexes d'origen intrínsec (genètic), extrínsec (ambiental) i estocàstic (acumulació de danys/errors aleatori de molècules vitals), tal com alguns investigadors han realitzat i mostren en els seus estudis (Finch & Hayflick, 1977; Comfort, 1979; Miquel, 1997; Pardo & Hernández, 2003; Kirkwood, 2005; Tamparillas, 2005; Piper *et al.*, 2011). I no obstant, fins i tot una visió holística de l'envel·liment té els seus inconvenients, ja que hi ha teories que es compleixen en unes espècies i en altres no.

1.3. L'envelliment en plantes perennes

Gran part d'aquestes teories han estat de gran interès i àmpliament estudiades en animals i humans, mentre que pocs estudis s'han realitzat en plantes i més escassament en plantes perennes, espècies predominants en els ecosistemes naturals. Aquestes estan caracteritzades per la capacitat de reproduir-se més d'una vegada en el seu cicle vital i amb les longevitats més grans registrades en organismes no clonals com, per exemple, el cas del pi *Pinus longaeva* amb individus datats de més de 4.500 anys o algunes sequoies (*Sequoia sempervirens* i *Sequoiadendron giganteum*) de 3000-4000 anys; i una de les herbàcies extraordinàriament més longeva que s'estudia en aquest treball, *Borderea pyrenaica*, de 350 anys. Considerant aquest aspecte, sembla que les plantes perennes desafien l'envelliment en comparació als humans i la majoria d'animals mamífers, ja que alguns rèptils (exemples en tortugues; Congdon *et al.*, 2013), ocells i peixos (exemples en peixos; Finch, 1990) també mostren una absència de processos degeneratius associats a l'edat (exemples en ocells i mamífers; Nussey *et al.*, 2013).

Per tal de poder respondre si les plantes envelleixen hem de considerar, en primer lloc, què entenem per envelliment i/o senescència. Tal com s'ha vist en l'**apartat 1.1** d'aquesta introducció sobre l'envelliment, són conceptes que en alguns organismes com les plantes es poden aplicar a processos diferents. Encara que els biòlegs evolutius consideren sinònims els termes envelliment i senescència fent referència a la reducció de la supervivència i la fecunditat específica a l'edat que es reflexa en la disminució del rendiment d'algunes funcions fisiològiques en individus d'edats avançades (Charlesworth, 1994; Ricklefs & Finch, 1995), en plantes en general es defineix la senescència com un procés altament regulat a nivell bioquímic, molecular i fisiològic que condueix a la mort i, per tant, forma part de l'última etapa del desenvolupament de la planta, òrgan o cèl·lula (Noodén & Leopold, 1988; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003; Lim & Nam, 2005); mentre que l'envelliment

seria només l'acumulació de canvis progressius amb l'edat però que no necessàriament disminueixen la viabilitat de l'organisme (Noodén & Leopold, 1988; Dangl *et al.*, 2000).

Els estudis dels processos que regulen la senescència en plantes mostren essencials diferències basades en el patró de cicle vital que aquestes desenvolupen. Per una banda, les plantes monocàrpiques es caracteritzen per un únic estadi reproductiu que porta consecutivament a la mort de l'organisme, tractant-se de plantes amb un cicle vital curt d'un o dos anys (plantes anuals o biennals, respectivament); tot i que també es troben casos de monocàrpiques amb cicles vitals llargs (anomenades plurianuals) com el cas del bambú. D'altra banda, estan les plantes policàrpiques o perennes, les quals desenvolupen almenys dos episodis reproductius al llarg de la seva vida (generalment es reproduïxen cada any) i no s'indueix la seva mort després del procés.

A diferència de les plantes monocàrpiques (anuals, biennals o plurianuals), que diferencien tots els seus meristemes en òrgans reproductius i, posteriorment moren, les plantes policàrpiques o perennes es reproduïxen més d'una vegada al llarg de la seva vida, ja que mantenen sempre una proporció dels seus meristemes indeterminats. Aquesta característica, juntament amb el creixement modular que desenvolupen, inspira a alguns autors a parlar de la possible immortalitat que tenen les plantes perennes (Peñuelas & Munné-Bosch, 2010; Munné-Bosch, 2014).

La majoria d'estudis sobre el procés de la senescència es realitzen en plantes models com *Arabidopsis thaliana* o l'arròs, les quals són plantes anuals i no permeten entendre com és el procés en plantes perennes (Munné-Bosch, 2008). Per altra banda, la major part dels estudis es realitzen a nivell d'òrgan (fulles, flors, fruits o llavors) (Franzese & Ghermandi, 2011; Arrom & Munné-Bosch, 2012; Sun *et al.*, 2012; Wingler *et al.*, 2012) i, en conseqüència, els

coneixements sobre els processos que condueixen a la senescència de l'organisme és encara molt limitat (Munné-Bosch, 2007, 2008; Watson & Riha, 2010; Thomas, 2013).

Tot i que el concepte d'envelliment s'associa amb els processos degeneratius de la senescència, hi ha pocs estudis que demostrin l'impacte negatiu de l'edat en la fisiologia de les plantes perennes amb una llarga longevitat (Thomas, 2002, 2013; Mencuccini *et al.*, 2005; Munné-Bosch, 2007, 2008; Peñuelas & Munné-Bosch, 2010; Watson & Riha, 2010, 2011). Fins i tot, trobem alguns estudis que suggereixen que la senescència és nul·la o negligible (Finch, 1998, 2008), ja que no s'observen reduccions del rendiment fisiològic de l'organisme amb l'edat o, en casos oposats, és negativa, ja que augmenta el rendiment d'aquest (Vaupel *et al.*, 2004).

Principalment, els estudis que es troben estan basats en la teoria hormonal i les teories relacionades amb la pèrdua del *fitness* reproductiu i vegetatiu. En els últims anys han aparegut alguns estudis en relació al control genètic (telòmers, Watson i Riha, 2011) i teories evolutives (acumulació de mutacions), però aquestes aproximacions no són concloents en espècies de plantes perennes (Watson i Riha, 2010, 2011; Ally *et al.*, 2010). Altres teories interconnectades s'han proposat per explicar els canvis associats a l'edat en les relacions hídriques, l'intercanvi gasós i els canvis associats al metabolisme i al creixement, tot i així, els mecanismes que indueixen la senescència en les plantes és encara tema de debat i poc conegut.

1.4. Efecte del tamany, maduresa i sexe en els processos associats a l'envelliment

El cicle vital de les plantes es veu determinat per dos esdeveniments claus que marquen el desenvolupament de l'organisme: el creixement i la reproducció. En les primeres etapes les plantes inverteixen en el seu creixement i manteniment, adquirint i emmagatzemant l'energia necessària per tal d'assolir la competència per reproduir-se i en la que, generalment, el tamany de la planta serà un factor determinant. Quan aquesta assoleix la seva capacitat reproductora, la inversió en estructures reproductives (flors, fruits i llavors) serà el principal determinant en la fisiologia de l'organisme. En els següents apartats es tracten altres factors intrínsecs a l'organisme com el tamany, la maduresa i el sexe (o reproducció) que afecten els processos associats a l'envelliment.

A) Efecte del tamany i de la maduresa

Per entendre els canvis fisiològics associats a l'edat de les plantes cal considerar un dels principals canvis que es donen al llarg de les diferents etapes del cicle vital és l'assoliment de la maduresa, és a dir, l'establiment de la seva capacitat reproductora. Quan les plantes encara no tenen aquesta capacitat es consideren juvenils, sent l'aparició de la floració i la producció de llavors la fase de transició que les porta a ser plantes madures, quan són completament reproductores (Bond, 2000). En les etapes posteriors a la maduresa sexual de la planta continuen donant-se canvis en l'estructura i funcions, mentre que l'activitat reproductora sovint es manté elevada en edats avançades (**Figura 2**). Tant els canvis fisiològics com morfològics que es donen durant la fase de transició de plantes no reproductores (juvenils) a reproductores (madures) ha estat àmpliament estudiat en plantes llenyoses, especialment en coníferes (Poethig, 1990; Greenwood, 1995, 2010; Bond *et al.*, 2007; Wendling *et al.*, 2014).

Com s'observa en la **Figura 2**, a excepció de les últimes etapes del desenvolupament, les plantes van adquirint major tamany al llarg del seu creixement i augment de l'edat, particularment en plantes llenyoses (arbustos i arbres). En aquests sentit, s'ha vist que el tamany de la planta és un important factor que influencia les taxes de creixement foliar en les plantes madures i altres paràmetres ecofisiològics, no només en plantes perennes llenyoses (Koch *et al.*, 2004; Mencuccini *et al.*, 2005; Vanderklein *et al.*, 2007; Oñate & Munné Bosch, 2008), sinó que també en herbàcies com algunes bromèlies epífites (Zotz *et al.*, 2001, 2011) i en ortigues (Oñate & Munné-Bosch, 2009), així com en falgueres epífites (Testo & Watkins, 2012).

Com a conseqüència, donat que el tamany és un factor intrínsec a l'edat en plantes llenyoses i que, per tant, augmenta a mesura que incrementa l'edat de l'organisme, es troben dificultats en els estudis per separar els canvis fisiològics associats a l'edat o al tamany de la planta.

Amb l'objectiu de separar els canvis fisiològics associats a l'edat o el tamany es realitzen estudis mitjançant tècniques de propagació vegetativa (injerts) en els quals s'insereixen mòduls (brots o branques) provinents d'individus de major edat en individus més joves, també anomenades tècniques de rejuveniment. Aquests estudis en arbres indiquen que és l'increment del tamany i la complexitat de la planta, i no l'edat del meristema, el factor determinant en la reducció de les taxes fotosintètiques i del creixement (Mencuccini *et al.*, 2005, 2014; Bond *et al.*, 2007; Vanderklein *et al.*, 2007; Abdul-Hamid & Mencuccini, 2009; Greenwood *et al.*, 2010).

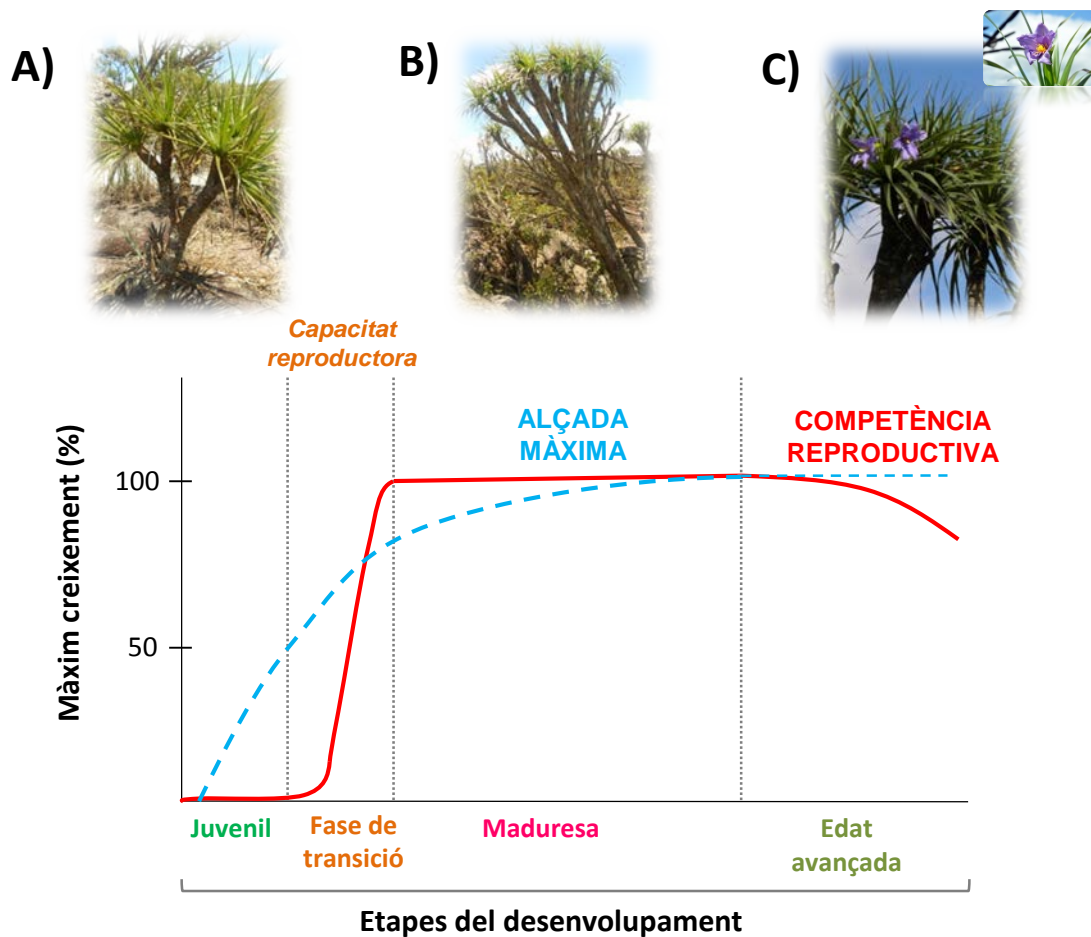


Figura 2. Patró general del creixement d'un arbre (línia discontinua blava) i la competència reproductiva (línia contínua vermella) en relació a l'estat de desenvolupament de la planta. La transició de la fase juvenil a madura per la capacitat reproductora, normalment, succeeix quan els individus assoleixen una determinada alçada (on la corba assoleix el màxim pendent). Abans d'assolir la màxima alçada el creixement és asimptòtic. La relació entre el creixement (alçada) i la maduració sexual és molt variable entre les espècies i les seves condicions de creixement (*Adaptació de Bond, 2000*). Les fotografies mostren un exemple en una espècie arborescent endèmica del Brasil (*Vellozia gigantea*): **A)** individus juvenils amb alçades de 1-1,5 m; **B)** individus madurs amb alçades de fins a 6 m i **C)** detall de plantes madures en estat de floració.

B) Efecte del sexe: esforç reproductiu i dioècia

L'esforç reproductiu

Quan les plantes assoleixen la seva capacitat reproductora i entren en la etapa de maduresa, les següents fases en el cicle vital de l'organisme estaran directament influenciades per l'esforç reproductiu. No hi ha cap dubte que la reproducció competeix amb altres funcions fisiològiques de l'organisme, en termes de recursos, afectant principalment les taxes de creixement o altres

estratègies com les defenses (Obeso, 2002). Així doncs, l'esforç reproductiu es defineix com la pèrdua de futur potencial en la reproducció al llarg dels diferents episodis reproductius (Jönsson, 2000).

L'esforç reproductiu està directament associat al model estratègic del cicle vital que desenvolupi la planta. Com hem vist anteriorment, en plantes monocàrpiques l'esforç reproductiu està clarament lligat als processos de senescència i consegüent mort de la planta, donada la desdiferenciació de tots els brots vegetatius en reproductius, i remobilització de nutrients i inversió de tots els seus recursos acumulats en la floració i fructificació. D'altra banda, les plantes perennes mantenen una part dels seus brots vegetatius per tal de poder seguir creixent després de cada episodi de reproducció. No obstant, també mostren canvis en la reproducció associats a l'edat, per exemple, en les primeres etapes del desenvolupament s'incrementa la producció floral amb el tamany de la planta i l'àrea foliar, mentre que a edats avançades la producció floral es manté constant (observat en l'herbàcia perenne *Corydalis intermedia*; Ehlers & Olesen, 2004). Resultats similars s'observen en l'arbust perenne mediterrani *Cistus albidus*, que mostra nivells de producció floral idèntics entre plantes de diferent edats (5 i 10 anys), però de tamany idèntics (Oñate & Munné-Bosch, 2010).

Així doncs, addicionalment al tamany, l'esforç reproductiu en plantes madures és un dels altres factors a investigar com a condicionant en les respostes als canvis fisiològics amb l'edat. Alguns estudis a nivell de planta sencera mostren que la reproducció afecta el vigor del meristema vegetatiu, ja que es redueix el creixement en les plantes madures i, particularment, dels brots que s'han reproduït, ja que les reduccions del creixement vegetatiu en les plantes madures són més evidents en els brots reproductors que en els no reproductors (observat en *U. dioica*, Oñate & Munné-Bosch, 2009). En l'estudi d' Obeso *et al.* (1998) també es va observar que l'augment de les taxes fotosintètiques en les fulles de les plantes femenines es donava només en les

branques no reproductores de la planta. Altres estudis també mostren diferències reproductives a nivell de mòdul (branca o brot) però no a nivell de planta sencera (Cipollini & Whigham, 1994; Bañuelos & Obeso, 2004; Matsuyama & Sakimoto, 2008; Juvany *et al.*, 2014). Les diferències observades entre brots reproductors i no reproductors suggereixen la importància d'estudiar l'esforç reproductiu de les plantes tant a nivell d'organisme sencer com de mòduls.

L'esforç reproductiu en plantes dioiques

Les plantes dioiques disposen els seus òrgans reproductors en flors d'un sol sexe en individus (peus) separats, desenvolupant estrictament peus masculins i femenins. El dimorfisme sexual genera diferències a nivell morfològic, com també a nivell fisiològic, i és que encara que ambdós sexes desenvolupen flors, les femelles han d'invertir més recursos durant la fecundació i posterior formació de llavors i fruits. A més, en algunes espècies les flors femenines solen invertir encara més energia en desenvolupar estructures per atraure la pol·linització (Hancock & Bringham, 1980; Gebber *et al.*, 1999; Zunzunegui *et al.*, 2006).

En aquest sentit, generalment ha estat acceptat que les femelles inverteixen més en reproducció que els mascles (Hancock & Bringham, 1980; García & Antor, 1995b; Zunzunegui *et al.*, 2006; Iszkulo *et al.*, 2009), afectant el creixement i presentant les femelles menor productivitat que els mascles (Ågren, 1988; Korpelainen, 1992; Cipollini & Whigham, 1994; Zluvova *et al.*, 2010). Tot i així, alguns estudis mostren que no hi ha diferències entre sexes, i és que hi ha molta ambigüitat de resultats en relació a l'esforç reproductiu entre sexes i espècies.

La hipòtesi d'un major esforç reproductiu en femelles ha estat observat en alguns arbusts perennes, però no ha estat gaire investigat en herbàcies perennes (Obeso, 2002; Ortiz *et al.*, 2002). Mentre alguns estudis en arbustos

mostren que les femelles presenten una productivitat més baixa que els mascles a causa del seu major esforç reproductiu, alguns estudis en herbàcies perennes mostren el contrari, observant en les femelles un major vigor vegetatiu (Andersson, 1994) o, fins i tot, patrons similars en l'esforç reproductiu entre ambdós sexes a nivell de planta sencera i a nivell de brot vegetatiu (meristema), com per exemple en *U. dioica* (Oñate & Munné, 2009). Aquestes diferències entre plantes llenyoses i herbàcies podrien estar relacionades amb diferències en la pressió de selecció (Obeso, 2002).

En els casos en que no s'observen diferències entre sexes (Harris & Pannel, 2008; Barret & Hough, 2013) s'han descrit diferents mecanismes de compensació que han desenvolupat les plantes per tal de reduir els costos en reproducció (Tuomi *et al.*, 1983; Obeso, 2002). Alguns exemples que s'han vist són:

- Majors taxes fotosintètiques en les fulles de les plantes femenines per ajudar en la major inversió energètica durant la reproducció (Obeso *et al.*, 1998)
- Capacitat fotosintètica de les estructures reproductives, com per exemple dels carpels (estructures reproductives femenines) (Galen *et al.*, 1993)
- Disponibilitat dels meristemes i tipus d'arquitectura de la planta (Duffy *et al.*, 1999)
- Regulació del temps invertit en creixement i en reproducció (García & Antor, 1995a, 1995b)
- Reabsorció de nutrients de les estructures senescentes (Goldman & Wilson, 1986; Ashman, 1994)

Resposta a l'estrès en plantes dioiques

Donat el dimorfisme sexual que presenten les espècies dioiques, caracteritzat generalment per una reducció de les funcions fisiològiques de les femelles respecte els mascles, en general es pensa que davant de condicions ambientals adverses (estressos ambientals) les femelles es vegin més desafavorides que

els mascles degut a la seva major inversió en la reproducció (Korpelainen, 1999).

Tot i que la majoria d'estudis corroboren que les femelles són menys resistents o més sensibles a l'estrès que els mascles, no hi ha conclusions que es puguin generalitzar; i és que els resultats varien depenent de l'espècie, dels factors ambientals estudiats (sequera, temperatures extremes, dèficit de nutrients, etc.) i, fins i tot, dels paràmetres analitzats.

En les respostes a l'estrès hídric s'han observat patrons més semblants tant en arbres com en arbusts, on les femelles resultaven més perjudicades que els mascles, els quals presentaven major creixement, capacitat fotosintètica i eficiència en l'ús de l'aigua (Li *et al.*, 2004; Rozas *et al.*, 2009). Altres estudis realitzats en condicions d'altres i baixes temperatures en la mateixa espècie (*Populus cathayana*) mostraven també que els mascles eren més tolerants (Xu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011).

Encara que la majoria d'estudis suggereixen que les femelles són més sensibles als estressos ambientals (Li *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2008; Rozas *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011; Montesinos *et al.*, 2012) trobem en la literatura alguns estudis en perennes herbàcies en que les femelles són igual o més resistents que els mascles (Oñate & Munné-Bosch, 2009).

L'envelliment en plantes dioiques

Fent referència als anteriors punts, on s'ha vist que l'esforç reproductiu té efectes en la fisiologia de les plantes perennes i, remarcant l'interès en espècies dioiques, les quals poden mostrar diferències entre sexes tant a nivell d'esforç reproductiu com de resposta a l'estrès; ens preguntem (dins del context d'aquesta tesi) com les plantes es veuen afectades per la reproducció amb l'edat i si hi ha diferències entre mascles i femelles.

Segons Ricklefs (2008) l'èxit reproductiu o *fitness* disminueix amb l'edat, mentre que l'esforç reproductiu tendeix a augmentar amb l'edat (Ricklefs, 2008). Com s'assumeix que l'envelliment té un efecte negatiu en el creixement relatiu i les taxes de fotosíntesi de les fulles (Bond, 2000; Koch *et al.*, 2004; Mencuccini *et al.*, 2005; Oñate & Munné-Bosch, 2008) també s'espera a tenir un efecte negatiu en la consegüent inversió de fotoassimilats en estructures reproductives (flors, fruits i llavors; Munné-Bosch, 2007), tot i les poques evidències que hi ha de la declinació reproductiva amb l'edat de l'organisme (Ehlers & Olesen, 2004; Oñate & Munné-Bosch, 2010).

En general, es planteja que els canvis fisiològics associats a l'edat (com l'augment d'estrès oxidatiu o les variacions en els continguts hormonal) poden conduir a una reducció en el nombre i mida de les estructures reproductives. En aquest sentit, com l'augment de l'esforç reproductiu promou un deteriorament fisiològic de les fulles a causa de la disponibilitat limitada de recursos (Wingler *et al.*, 2006; Oñate & Munné-Bosch, 2009; Juvany *et al.*, 2014), les espècies dioiques amb un esforç reproductiu diferencial entre gèneres són models d'estudi molt interessants en els quals poder estudiar les diferències entre sexes en els processos associats a l'envelliment.

Tot i així, no hi ha gaire informació disponible sobre com els mascles i les femelles difereixen en les respostes associades a l'envelliment en plantes perennes de gran longevitat. Un dels pocs estudis que es troben sobre l'estudi dels processos associats a l'envelliment en plantes dioiques han estat realitzats en l'espècie *B. pyrenaica*, la qual mostra diferències entre sexes en les taxes de mortalitat (García & Antor, 1995a; 1995b), i sorprenentment són les femelles les més longeves, tot i el seu major esforç reproductiu respecte els mascles. Desafortunadament, hi ha tan poca informació sobre l'envelliment en plantes dioiques que impedeix arribar a desenvolupar idees concloents.

2. Estrès oxidatiu en plantes

Dins de la complexitat que emmarca les diverses teories sobre l'envelliment, una de les més acceptades i provades és la teoria dels radicals lliures (Harman, 1956). La importància dels radicals lliures i els danys que provoquen sobre les cèl·lules dels organismes vius al llarg de la vida està àmpliament acceptada, així com la seva relació directa en els processos d'envelliment de l'organisme.

Així com s'ha demostrat en animals que els processos d'envelliment estan vinculats a l'augment de l'estrès oxidatiu (Ashok & Ali, 1999; Rustin *et al.*, 2000; Wickens, 2001; Bokov *et al.*, 2004), molts pocs estudis s'han dut a terme en plantes per testar la teoria dels radicals lliures. En plantes perennes únicament s'han desenvolupat alguns estudis en l'arbust mediterrani *Cistus clusii*, en els que s'ha conclòs que:

- 1) Comparant plantes d'1, 3 i 7 anys (en les que es va fer un seguiment anual i diari a nivell de planta sencera i cloroplasts) es va observar un augment de l'estrès oxidatiu en els cloroplasts de les plantes de 7 anys respecte els altres dos grups, concloent que l'edat de la planta augmenta l'estrès oxidatiu en els cloroplasts (Munné-Bosch & Alegre, 2002b).
- 2) El següent estudi va corroborar l'augment de l'estrès oxidatiu amb l'edat en individus sota condicions d'estrès ambiental (Munné-Bosch & Lalueza, 2007).
- 3) L'últim estudi en aquesta espècie mostra un augment de l'estrès foto-oxidatiu entre plantes d'1 i 6 anys sota condicions d'estrès per excés de llum. S'observen augments en els nivells de flavonoides en les plantes de 6 anys (Hernández *et al.*, 2011).

Tot i que en aquests estudis es va observar un augment de l'estrès oxidatiu en plantes de diferents edats, és possible que el tamany diferencial

entre les poblacions comparades estigués causant realment l'augment d'estrès oxidatiu (i no l'edat). Per tant, encara són necessaris molts més estudis per conèixer els canvis fisiològics en termes d'estrès oxidatiu associats a l'edat en plantes perennes, així com la importància d'altres factors intrínsecs a l'organisme com la maduresa i el tamany sobre l'estrès oxidatiu de la planta.

Un dels models d'estudi d'aquesta tesi sorgeix davant l'escassetat d'informació que es troba sobre l'envelliment en plantes perennes i, especialment, de plantes molt longeves. En aquest sentit, *B. pyrenaica* (herbàcia perenne de fins a 350 anys d'edat) va ser estudiada a nivell fisiològic per primera vegada per Oñate *et al.* (2011) on no es va observar cap símptoma de deteriorament fisiològic en els diversos marcadors d'estrès oxidatiu com dels nivells hormonals analitzats en plantes d'un rang d'edats d'1 a 300 anys. En aquesta tesi es varen continuar els estudis d'envelliment en aquesta peculiar espècie, centrant-nos en la teoria dels radicals lliures i l'estrès oxidatiu.

2.1. Estrès oxidatiu

S'entén el terme estrès com a qualsevol factor ambiental potencialment desfavorable pels organismes vius (en aquest cas de les plantes), tal com va definir Jacob Levitt (1980), pioner en l'estudi de la fisiologia de les plantes a l'estrès. L'estrès disminueix la capacitat biosintètica de la planta, altera les seves funcions biològiques, i causa un dany que pot conduir a la mort de l'organisme (Levitt, 1980; Lichtenthaler, 1998).

Tot i que sempre s'ha considerat l'estrès com un efecte perjudicial en les plantes, també s'ha estudiat el seu efecte beneficiós, i és que sota algunes circumstàncies aquest pot tenir un efecte constructiu per a l'organisme suposant una força adaptativa en l'evolució dels organismes (Levitt 1980; Lichtenthaler, 1996, 1998). Aquest aspecte provoca actualment discussions sobre l'ús adequat del terme estrès en l'estudi de la fisiologia en plantes,

considerant que aquest no s'ha de considerar únicament com un efecte desfavorable (Foyer & Noctor 2005, 2015). En aquest context, parlarem d'estrès oxidatiu en termes generals i només quan aquest sigui perjudicial parlarem de dany oxidatiu.

Es considera que hi ha un estat d'estrès oxidatiu en les plantes quan hi ha un desequilibri entre els nivells de molècules o mecanismes prooxidants i antioxidants. Només a elevades o perjudicials concentracions de prooxidants es produeix dany oxidatiu en l'organisme, ja que són molècules molt reactives que provoquen l'oxidació de components cel·lulars (proteïnes, lípids, àcids nucleics, etc.) alterant la seva funció biològica. Per altra banda, com hem parlat anteriorment, l'estrès oxidatiu també pot tenir un efecte beneficiós en l'organisme, ja que es coneix la implicació de les ROS com a molècules de senyalització cel·lular que regulen complexes vies de resposta a l'estrès. L'equilibri entre la producció/acumulació de prooxidants i la seva eliminació mitjançant els antioxidants determinarà l'estat redox de la planta i, per tant, serà indispensable la regulació dels nivells de prooxidants per tal d'evitar un possible dany oxidatiu i dur a terme una senyalització eficaç.

L'estrès oxidatiu en plantes pot donar-se per diverses causes ja siguin intrínseques a la planta (metabolisme propi) com extrínseques (estrès abiòtic i biòtic). En els següents apartats s'explica amb més detall les diferents fonts que contribueixen en la producció de les substàncies prooxidants, i quins mecanismes antioxidants desenvolupen les cèl·lules vegetals per evitar el dany oxidatiu dels seus components.

A més a més, la quantitat de dany oxidatiu, provocat per l'augment de ROS, pot augmentar amb l'edat de la planta, considerant-se la principal causa de la senescència (Harman, 1956; Sohal & Weindruch, 1996; Beckman & Ames, 1998; Finkel & Holbrook, 2000; Monaghan, 2008). Tal com mostren alguns estudis, durant la senescència foliar (edat de la fulla) augmenta l'estrès

oxidatiu provocant la disminució de l'estabilitat de membrana, l'augment de la peroxidació lipídica i la reducció en els nivells de determinats sistemes de protecció contra el dany oxidatiu (Dhindsa *et al.*, 1981). A més a més, en la majoria d'estressos coneguts (abiòtics i biòtics) pot donar-se estrès oxidatiu desequilibrant els nivells de prooxidants i antioxidants, a favor dels oxidants, amb la potencialitat de causar dany oxidatiu (Sies, 1997; Apel & Hirt, 2004).

2.2. Espècies reactives de l'oxigen

Les principals substàncies prooxidants que es generen en les cèl·lules vegetals són les espècies reactives de l'oxigen, generalment anomenades ROS (sigles de l'anglès *reactive oxygen species*). Les plantes, com a organismes aeròbics, utilitzen l'oxigen per diversos processos metabòlics com ara la fotosíntesi, la fotorespiració i la respiració en diferents orgànuls (cloroplasts, peroxisomes i mitocondris) provocant l'inevitable producció de ROS. Aquestes són potencialment nocives i poden reaccionar amb qualsevol tipus de biomolècules causant danys irreversibles (Mittler, 2002). A més a més, la seva producció pot incrementar-se durant processos d'estrès. Les reaccions d'oxidació que desencadenen les ROS poden produir altres radicals lliures (àtoms, molècules o ions amb un electró desaparellat de la capa més externa) que són a la vegada molt reactius i poden provocar reaccions en cadena que danyin les cèl·lules.

Les ROS es formen per la transferència d'energia o d'electrons a l'oxigen i són el radical anió superòxid ($O_2^{\bullet-}$), el peròxid d'hidrogen (H_2O_2) i el radical hidroxil (OH^{\bullet}) (corresponent a la reducció d'un, dos i tres electrons respectivament; Sies, 1997), les quals es produeixen en els cloroplasts, mitocondris, peroxisomes, i en els compartiments de l'apoplast i del citosol. Quan s'acumulen les formes $O_2^{\bullet-}$ i H_2O_2 en presència de metalls de transició, es poden generar radicals hidroxil (OH^{\bullet}) mitjançant les reaccions de Haber-Weiss i de Fenton, una de les ROS més reactives capaç d'atacar qualsevol tipus

de component cel·lular (Møller *et al.*, 2007) (**Figura 3**). D'altra banda, es produeix l'oxigen singlet ($^1\text{O}_2$), que és una espècie activada produïda constitutivament en els cloroplasts a partir dels estats excitats de la clorofil·la (Triantaphyllidès & Havaux, 2009) (**Figura 3**). Aquestes quatre ROS ($^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 i OH^-) són les formes més abundants en plantes produïdes constantment com a resultat de diverses vies metabòliques (Apel & Hirt, 2004).

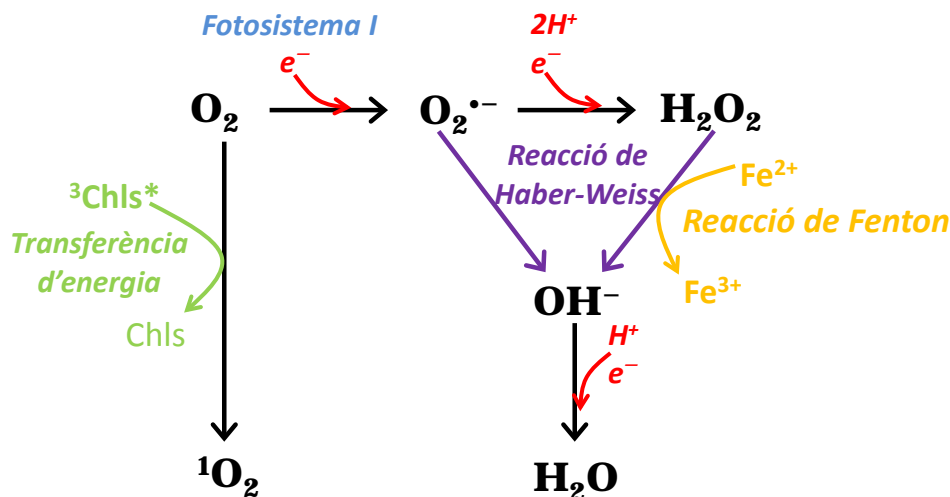


Figura 3. Principals ROS en plantes per transferència d'energia o electrons.

El principal procés metabòlic (qualitativament) que contribueix a la generació de ROS és la fotosíntesi que té lloc en els cloroplasts, on es troba la major concentració d'oxigen a causa de la fotòlisi de l'aigua. En condicions normals, la fotosíntesi es dona mitjançant dues fases: la primera (anomenada clàssicament fase lluminosa) utilitza l'energia de la llum absorbida en els fotosistemes per generar ATP i poder reductor NADPH, el qual és necessari en la segona fase (anomenada fase fosca) per fixar el CO_2 , mitjançant l'activitat carboxilasa de l'enzim RUBISCO, i transformar-lo a través del cicle de Calvin en carbohidrats, font d'energia per a les plantes. En la primera fase la constant transferència d'electrons entre donadors i acceptors provoca l'inevitable formació de ROS, en que les concentracions poden variar segons les condicions. Veiem els diferents passos en aquesta fase (**Figura 4**):

- 1) L'energia de la llum absorbida en el fotosistema II (PSII) provoca la fotòlisi de l'aigua, produint oxigen i iniciant-se el transport d'electrons.
- 2) La cadena de transport transfereix els electrons generats en el PSII a través de la reducció/oxidació de la plastoquinona (PQ), del citocrom *b₆f* i de la plastocianina (PC) fins al fotosistema I (PSI), on es capten els electrons per la ferredoxina (Fd).
- 3) La Fd cedeix els electrons al NADP⁺ per reduir-lo en NADPH, que serà necessari en el cicle de Calvin.
- 4) Paral·lelament a la cadena d'electrons, es produeix un bombeig de H⁺ des de l'espai tilacoïdal cap a l'estroma del cloroplast que genera ATP mitjançant l'activitat de l'ATP sintasa. Aquest ATP, juntament amb el NADPH, són essencials en el cicle de Calvin per a la fixació del CO₂ i completar d'aquesta manera el procés global de la fotosíntesi.

En condicions desfavorables en que la fotosíntesi es veu limitada, com per exemple, en condicions d'estrès hídric, salí o tèrmic en que es provoca el tancament dels estomes i es restringeix la disponibilitat de CO₂; així com qualsevol d'aquests estressos combinat amb un excés de llum que provoca una acumulació i excés d'energia en els fotosistemes, es produeix un augment de ROS intracel·lularment.

En el PSI, quan hi ha excés de llum, els electrons poden ser redistribuïts cap al PSII pel transport cíclic d'electrons directament de Fd a la PQ. Quan això no és suficient per dissipar l'excés d'electrons es produeix la reacció de Mehler, en la que la Fd cedeix els electrons a l'O₂ generant O₂^{•-}, el qual és eliminat en el cicle de l'aigua-aigua amb l'ajuda de la superòxid dismutasa (SOD) i l'ascorbat peroxidasa (APX) (Asada, 1999) (**Figura 4**). Si les quantitats de H₂O₂ formades per la SOD no són eliminades ràpidament es produeix el radical altament reactiu OH⁻ (Asada, 2006).

La fotoinhibició es desencadena per excés de llum provocant una reducció de l'eficiència del PSII (Takahashi & Badger, 2011). En situacions d'excés de llum i limitació de CO₂ s'activa el procés de la fotorespiració, en que l'activitat oxigenasa de l'enzim RUBISCO genera glicolat que es transporta als peroxisomes on es genera H₂O₂, mitjançant el cicle del glicolat (del Rio *et al.*, 2006; Foyer *et al.*, 2009). En condicions d'excés de llum un altra condició desfavorable que provoca la producció de ROS és la sobreexcitació de la clorofil·la del PSII, és a dir, quan en el PSII l'energia de la llum genera més electrons dels que són consumits es provoca la formació del triplet de clorofil·la (³P₆₈₀) que reacciona amb l'O₂ i genera ¹O₂ (Rinalducci *et al.*, 2004; Krieger-Liszkay *et al.*, 2008; Triantaphylidès & Havaux, 2009; Fischer *et al.*, 2013).

Tot i que les ROS són subproductes inevitables de l'activitat biològica i les reaccions redox pròpies del metabolisme aeròbic (Mittler, 2002), es pot arribar a un estat d'estrès oxidatiu quan la producció i/o acumulació de ROS augmenta degut a condicions desfavorables (estressos ambientals) fins arribar a concentracions perjudicials per a les cèl·lules. En aquestes condicions les ROS reaccionen amb biomolècules (proteïnes, lípids i DNA) i provoquen danys en els components cel·lulars, tant a nivell estructural com funcional, fins arribar a causar la mort cel·lular i, per últim, de l'organisme si els sistemes de reparació i d'eliminació de les ROS no són suficients.

Un dels principals processos desencadenats per les ROS és la peroxidació lipídica que es dona dels àcids grassos poliinsaturats, també anomenats PUFAs (sigles de l'anglès *polyunsaturated fatty acids*), de les membranes per acció del ¹O₂ (Triantaphylidès *et al.*, 2008) en el que es formen hidroperòxids lipídics i, en conseqüència, diverses oxilipines com l'àcid malondialdehid (MDA) (veure més detalladament en l'**apartat 2.3; Figura 5**) que poden reaccionar amb material genètic (DNA) i proteïnes provocant la pèrdua de la seva funcionalitat (Farmer & Mueller, 2013). Així mateix, la peroxidació

lipídica provoca la disminució de la fluïdesa de la membrana, augmentant la seva permeabilitat i causant danys secundaris en les proteïnes de membrana (Møller *et al.*, 2007).

Després de la fotosíntesi, el principal procés metabòlic que contribueix a la generació de ROS és la fotorespiració en els peroxisomes, associada a la fotoinhibició que es dona en els cloroplasts (**Figura 4**). La respiració en els mitocondris també contribueix a la formació de ROS en forma d'O₂^{•-}, com a conseqüència d'una sobrecàrrega de la cadena de transport d'electrons (Møller, 2001; Blockina & Fagerstedt, 2010) (**Figura 4**). En les respostes de les plantes a l'atac per patògens també es dona un increment de ROS degut a l'activitat de NAD(P)H oxidases lligades a la membrana, peroxidases ancorades a les parets cel·lulars o aminoxidases que es troben en l'apoplast (Dangl & Jones, 2001; Apel & Hirt, 2004; Torres & Dangl, 2005). El citosol conté el mateix conjunt d'enzims que es troben en l'estroma del cloroplast, de manera que es produeix H₂O₂ mitjançant l'activitat de la SOD i conté la presència de quelants de ferro per evitar la formació de OH⁻ (Mittler *et al.*, 2004) (**Figura 4**).

Tot i l'efecte perjudicial que poden tenir les ROS sobre l'organisme quan hi ha un desequilibri de l'estat redox, també actuen com a molècules de senyalització, ja sigui com a segons missatgers en cascades de senyalització com induint canvis en l'expressió gènica. També poden regular processos del desenvolupament i creixement, del cicle cel·lular, de la mort cel·lular programada i de la senyalització hormonal; com respostes de defensa a estressos biòtics i abiòtics (Mittler, 2002; Foyer & Noctor, 2005; Ahmad *et al.*, 2010). Com per exemple ha estat descrit el H₂O₂ com a segon missatger que indueix l'expressió de gens implicats en la resposta a ferides (Neill *et al.*, 2002).

Cal remarcar, addicionalment, el diferent paper de les ROS depenent del tipus d'estrès. Mentre en condicions d'estrès abiòtic s'activen tot un seguit de mecanismes per detoxificar les ROS, en condicions d'estrès biòtic s'augmenta l'activitat enzimàtica de NADPH oxidases i peroxidases per produir més H_2O_2 , ja que aquesta és la ROS més difusible a través de les aquaporines de les membranes, i es segrega en resposta a l'atac per patògens ja que resulta tòxic per aquests. Depenent de la intensitat de l'estrès, i per tant de la concentració de ROS, es poden induir diferents respostes en les plantes, des d'activar mecanismes antioxidants fins a la mort cel·lular programada (apoptosi) o la necrosi (Mittler, 2002; Apel & Hirt, 2004).

2.3. Antioxidants

Les propietats citotòxiques de les ROS explicarien l'evolució de l'aparició en les plantes de complexos mecanismes antioxidants (enzimàtics i no enzimàtics) per a la seva detoxificació, a la vegada que també han desenvolupat sistemes per evitar i prevenir la formació de radicals lliures, amb l'objectiu de mantenir l'equilibri redox (reducció/oxidació) cel·lular i afavorir el correcte funcionament dels processos biològics. Donat que les ROS es produeixen contínuament com a subproductes de diferents vies metabòliques en diferents compartiments cel·lulars, els diferents components de defensa antioxidant s'associen sovint a determinats compartiments.

Els mecanismes d'antioxidants enzimàtics són aquells que mitjançant reaccions químiques catalitzades per enzims eliminen les ROS en els compartiments cel·lulars hidròfils (citosol, matriu del mitocondri, estroma del cloroplast i apoplast) com la SOD, la CAT, l'APX i la glutatió reductasa (GR). La SOD és la primera línia de defensa contra les ROS, transformant $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 . L'APX, GPX (glutatió peroxidasa) i CAT s'encarreguen seqüencialment de detoxificar les quantitats de H_2O_2 generades en diversos compartiments cel·lulars (**Taula 1**). En els cloroplasts hi ha la isoforma CuZn-SOD, tot i que en

algunes espècies també s'ha trobat la Fe-SOD, i es troba ancorada a la membrana tilacoidal a prop del PSI, fet essencial per a una ràpida eficàcia de detoxificació del $O_2^{\bullet-}$ i evitar que provoqui peroxidació lipídica en la membrana (Asada, 1999).

Taula 1. Antioxidants enzimàtics

SOD	Superòxid Dismutasa	$O_2^{\bullet-} \longrightarrow H_2O_2$
CAT	Catalasa	$H_2O_2 \longrightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$
CICLE ASCORBAT - GLUTATIÓ		
APX	Ascorbat Peroxidasa	$H_2O_2 + \text{Ascorbat} \longrightarrow H_2O + \text{Monodehidroascorbat (MDA)}$
MDAR	MDA Reductasa	$MDA + NAD(P)H \longrightarrow \text{Ascorbat} + NAD(P)^+$
DHAR	DHA Reductasa	$\text{Dehidroascorbat} + GSH \longrightarrow \text{Ascorbat} + GSSG$
GR	Glutatió Reductasa	$GSSG + NAD(P)H \longrightarrow GSH + NAD(P)^+$
CICLE GLUTATIÓ PEROXIDASA		
GPX	Glutatió Peroxidasa	$H_2O_2 + GSH \longrightarrow H_2O + GSSG$
GR	Glutatió Reductasa	$GSSG + NAD(P)H \longrightarrow GSH + NAD(P)^+$

D'altra banda els antioxidants no enzimàtics són aquelles molècules que s'encarreguen d'eliminar les ROS modificant la seva estructura pròpia i/o mitjançant la transferència d'energia. Aquest tipus d'antioxidants es classifiquen segons el compartiment cel·lular on es localitzen, tenint l'ascorbat i el glutatió que són hidròfils i es troben en el citosol, cloroplasts, mitocondris, peroxisomes i apoplast; i d'altra banda els carotenoides (pro-vitamina A) i els tocoferols (vitamina E) que són lipòfils i es troben en els cloroplasts. Dins d'aquets últim grup trobem els principals mecanismes de fotoprotecció que tenen les plantes per evitar l'estrès foto-oxidatiu (processos d'oxidació de les biomolècules desencadenats per les ROS). Els carotenoides i els tocoferols es troben espacialment a prop de l'aparell fotosintètic per ajudar a dissipar la formació dels $^3\text{chls}^*$ a més a més de prevenir i/o eliminar eficientment la producció del 1O_2 en condicions d'excés de llum (**Figura 5**). La seva ubicació

permet controlar la peroxidació lipídica de les membranes tilacoidals en condicions d'estrès.

Els carotenoides són coneguts com els pigments captadors de llum constituïts pels carotens (principalment el β -carotè) localitzats en els centres de reacció del PSII, i les xantofil·les (neoxantina, luteïna, i violaxantina), que es troben en les antenes de captació de llum o LHC (sigles de l'anglès *Light-Harvesting Complex*) (Liu *et al.*, 2004; Dall'Osto *et al.*, 2006). Aquests compostos poden prevenir la formació de ROS tant física- com químicament.

Quan l'excés d'electrons en el PSII condueix a la formació de $^3\text{chl}_s^*$ aquest s'elimina per un procés físic de dissipació tèrmica mitjançant el cicle de les xantofil·les. Aquest cicle es basa en la conversió de la violaxantina en anteraxantina i, aquesta, en zeaxantina, gràcies a l'activitat de la violaxantina de-epoxidasa que s'activa en condicions d'estrés per excés de llum (Demmig-Adams & Adams, 1992, 1996). Quan l'estrès persisteix i succeeix la inevitable formació del $^1\text{O}_2$ aquest es pot eliminar per l'acció d'altres carotenoides, com el β -carotè, o l'acció dels tocoferols (**Figura 5**). El β -carotè elimina el $^1\text{O}_2$ a través de la transferència d'energia o químicament mitjançant la seva oxidació generant productes d'oxidació com el β -carotè endoperòxid (Ramel *et al.*, 2012).

Els tocoferols, juntament amb els tocotrienols, són terpens que formen la família de compostos coneguts com a vitamina E. Ambdós grups, tocoferols i tocotrienols, estan representats per 4 formes (α , β , γ , i δ). L' α -tocoferol és la forma biològicament més activa i predominant en els òrgans fotosintètics de les planta com les fulles, on es troba ancorada en les membranes tilacoidals dels cloroplasts i s'encarrega de detoxificar l' $^1\text{O}_2$ i prevenir la propagació de la peroxidació lipídica (Halliwell & Gutteridge, 1999; Munné-Bosch, 2005). El mecanisme pel qual es detoxifica l' $^1\text{O}_2$ és mitjançant l'oxidació de l' α -tocoferol, en que es modifica l'anell cromanol de la molècula (cedint l'hidrogen i electrons) i es genera l' α -tocoferol quinona (Yamauchi & Matsushita, 1979;

Munné-Bosch & Alegre, 2002a; Trebst, 2003) (**Figura 5**). D'altra banda, l' α -tocoferol també té la funció de protegir les membranes tilacoidals controlant la propagació de la peroxidació lipídica mitjançant la donació d'un àtom d'hidrogen de l'anell cromanol heterocíclic de la seva estructura als radicals lipídics peroxil, produint el radical α -tocoferoxil (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996), el qual es reciclarà de nou en α -tocoferol mitjançant el cicle de l'ascorbat-glutatió (Munné-Bosch & Alegre, 2002a; Falk & Munné-Bosch, 2010) (**Figura 5**)

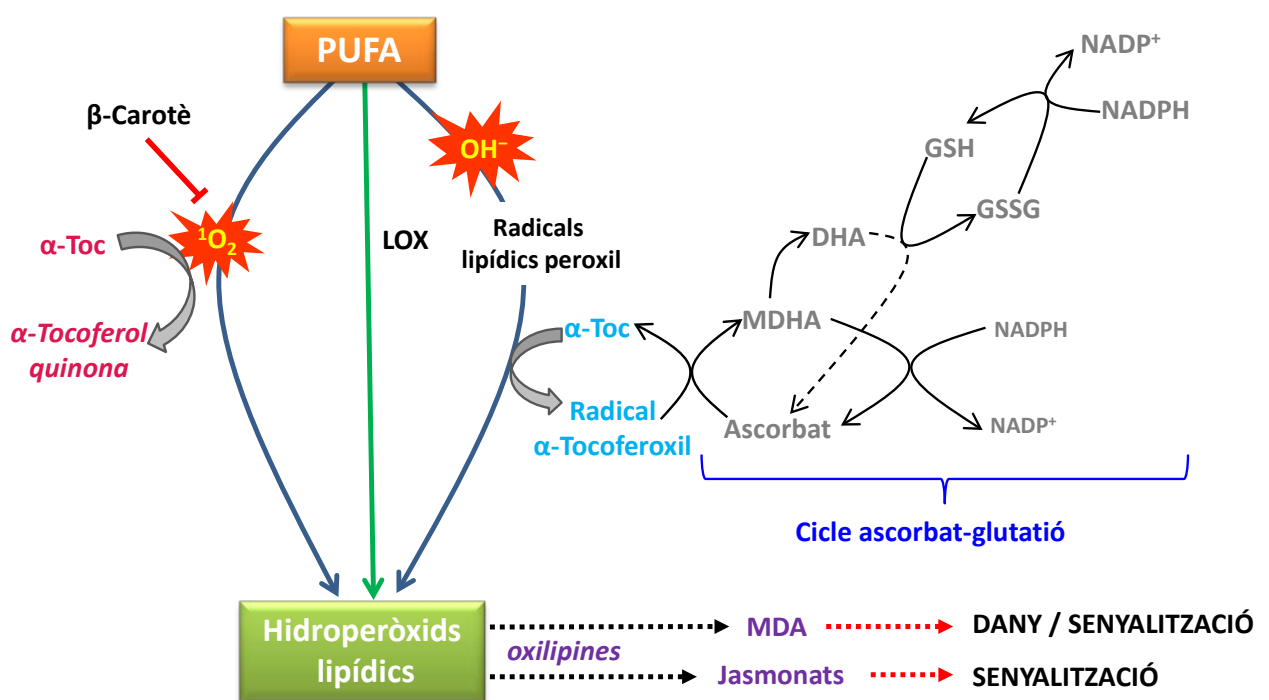


Figura 5. Principal funcions de protecció dels carotenoides i els tocoferols en l'eliminació de ROS, així com en el control de la peroxidació lipídica de les membranes tilacoidals en condicions d'estrès. Reciclatge de l' α -tocoferol mitjançant el cicle de l'ascorbat-glutatió. 1O_2 , singlet d'oxigen; $OH\cdot$, radical hidroxil; α -Toc, α -Tocoferol; DHA, dehidroascorbat; GSH, glutatió; GSSG, glutatió oxidat; LOX, enzim lipoxigenasa; MDA, àcid malondialdehid; MDHA, monodehidroascorbat.

Encara que els carotenoides i els tocoferols siguin principalment coneguts per la seva important funció protectora antioxidant en condicions d'estrès foto-oxidatiu, també s'ha de considerar la seva importància com agents en l'estabilització de l'estructura de la membrana tilacoidal (Havaux, 1999; Wang & Quinn, 2000).

Alguns compostos sintetitzats en el metabolisme secundari de les plantes contribueixen en la protecció en condicions d'estressos ambientals, com per exemple, els flavonoides, on trobem les antocianines que s'acumulen en les fulles donant una coloració vermella-blava amb la funció de protegir contra la llum UV i evitar la formació de radicals lliures (Zhang *et al.*, 2012; Bandurska *et al.*, 2013). A més dels diversos mecanismes d'antioxidants que desenvolupen les plantes sota condicions d'estrès, aquestes desenvolupen també importants estratègies per evitar la formació de ROS sota condicions d'excés de llum, com el moviment de les fulles o dels cloroplasts (Takahashi & Badger, 2011).

2.4. Marcadors d'estrès oxidatiu

Per tal de profunditzar en la teoria dels radicals lliures en plantes perennes, en aquesta tesi es va avaluar l'estrès oxidatiu associat a l'edat de la planta, mitjançant l'anàlisi de diversos marcadors d'estrès oxidatiu (Pintó-Marijuan & Munné-Bosch, 2014). Les principals mesures realitzades han estat l'eficiència màxima del PSII (F_v/F_m), els nivells de pigments fotosintètics (clorofil·les i carotenoides), la capacitat per fotoprotegir-se (cicle de les xantofil·les), els nivells d'alguns antioxidants (vitamina E i C), la determinació del grau de peroxidació lipídica (àcid malondialdehid i hidroperòxids lipídics).

Un indicador de l'estat de l'aparell fotosintètic és la mesura de la F_v/F_m . S'utilitza com un indicador de fotoinhibició quan, dins del rang normal 0–0.85; es detecten valors per sota de 0,75 (Maxwell & Johnson, 2000). D'altra banda, també s'ha descrit la disminució d'aquest índex en processos de fotoprotecció (Osmond *et al.*, 1997).

Com a marcadors d'estrès oxidatiu es poden utilitzar diversos paràmetres que es classifiquen, majoritàriament, en mètodes de mesures "directes" de ROS o mesures "indirectes". Un exemple en les mesures "indirectes" és quantificar els productes de peroxidació lipídica (Hodges *et al.*,

1999), els quals indiquen (aproximadament) la quantitat de radicals lliures que estan oxidant els lípids de membrana. Com a mesures "directes", a més de la quantificació de ROS, es poden utilitzar l'activitat d'enzims que detoxifiquen i/o generen ROS, així com l'abundància de molècules no enzimàtiques (per exemple l'ascorbat) amb capacitat antioxidant. El conjunt d'aquestes mesures s'utilitzen com a marcadors de l'estat redox de la cèl·lula. Per exemple, els nivells d'antioxidants indiquen el seu potencial grau de protecció, així com l'equilibri entre la seva síntesi, oxidació i regeneració. A més a més, l'estat redox dels antioxidants indica el grau d'oxidació que presenten i permet tenir una idea aproximada de l'estrès oxidatiu en les cèl·lules, com per exemple, l'estat redox de l'ascorbat i del tocoferol.

A part dels marcadors d'estrès oxidatiu, es poden utilitzar altres marcadors, com per exemple els continguts en clorofil·les (Lichtenthaler & Welburn, 1983), ja que s'ha descrit que els continguts de clorofil·les es degraden en condicions d'estrès oxidatiu. A més, en aquestes condicions, els continguts en antioxidants, com els carotenoides i els tocoferols, i altres mecanismes de fotoprotecció, com les xantofil·les, es poden fer servir de marcadors (Munné-Bosch & Alegre, 2000).

3. Models d'estudi

Per tal d'estudiar els conceptes introduïts es va escollir *B. pyrenaica* com a model de planta per estudiar l'envelliment en plantes perennes i *Vellozia gigantea* com a model de planta per estudiar l'efecte del tamany associat a l'edat i, a més a més, profunditzar en l'estrès oxidatiu induït per les variacions estacionals sota condicions climàtiques naturals. Cal remarcar que ambdós espècies escollides per a la realització d'aquesta tesi són de gran interès ecològic i, per tant, aporten un valor important a aquests estudis.

3.1. *Borderea pyrenaica*

B. pyrenaica Miégevillè és una planta herbàcia perenne endèmica del Pirineu Central, pertanyent a la família de les Dioscoreaceae. Juntament amb el seu congènere, *Borderea chouardii*, és la planta herbàcia no clonal més longeva registrada fins a l'actualitat, arribant a superar els 300 anys d'edat (García & Antor, 1995a). Donat que la distribució de la família és majoritàriament tropical, ambdós espècies es consideren relíquies del Terciari, on predominava el clima tropical a la península i després d'un llarg procés de canvis climàtics –incloent eres de glaciacions– ha quedat restringida a la distribució actual.

B. pyrenaica es localitza en les tarteres alpines del Pirineu Central on constitueix una població dinàmica estable (Dahlgren *et al.*, 2011), principalment en el *Parque Nacional de Ordesa y el Monte Perdido*, encara que també s'han observat altres poblacions a Espanya i França. *B. pyrenaica* està catalogada pel govern d'Aragó com a espècie amenaçada de gran interès ecològic (Sánchez & Alcántara, 2007), raó per la qual va ser necessari la sol·licitud de permisos per a la seva recol·lecció i realització del seu estudi. La població escollida es troba a la Vall de Pineta (42°41' N, 0°06' E, a 2000 metres per sobre del nivell del mar).

Es tracta d'un petit geòfit dioic, una espècie que s'estructura per una part aèria composta per fulles, flors i tiges; i una part subterrània composta per arrels i tubercle, òrgan que deriva de l'engruiximent de l'arrel. Durant l'època desfavorable per al creixement les plantes perden la part aèria i roman el tubercle sota terra.

El tubercle és l'òrgan perenne de la planta que disposa de cinc punts meristemàtics on cada any s'activa, seqüencialment, tan sols un meristema per desenvolupar la part aèria en el moment favorable, generalment al començament de l'estiu durant el mes de juny. Tant els mascles com les

femelles floreixen al juliol, i posteriorment es produeixen els fruits. A finals d'agost es comencen a veure signes de senescència foliar (clorosi), i durant el mes de setembre desapareix tota la part aèria de la planta (depenent de les condicions climàtiques de cada any, el procés s'avança o es retarda). Tot i que el curt cicle vegetatiu i reproductiu estigui definit per un final procés de senescència d'òrgans (fulles, flors i fruits), el procés d'envelliment a nivell de planta sencera està escassament descrit en una de les herbàcies no clonals amb un dels cicles vitals més llargs registrats.

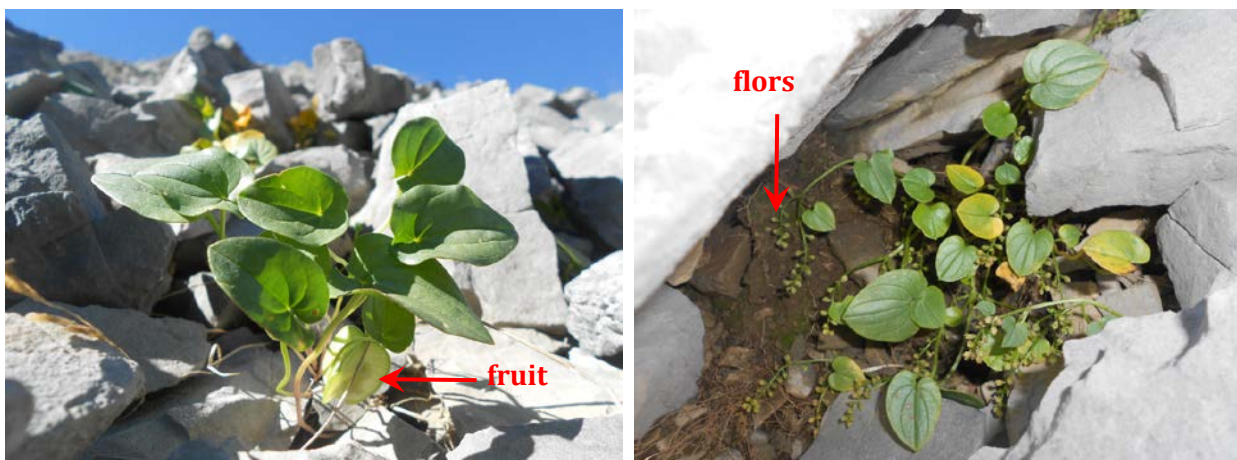


Figura 6. Plantes de *B. pyrenaica* en estat reproductiu. A l'esquerra detall d'una planta de sexe femení en fructificació i, a la dreta, detall d'una planta masculina en floració.

Cada any el desenvolupament del brot vegetatiu deixa una cicatriu en el tubercle, el qual permet l'estimació de l'edat de cada individu mitjançant el comptatge total del número de cicatrius en el tubercle. La fàcil datació dels individus de *B. pyrenaica* és indispensable per a la realització d'aquest treball, considerant-se un model únic en l'estudi de l'envelliment en plantes perennes, donada la importància com a espècie de gran longevitat i d'un alt valor ecològic.

A més a més, al ser una espècie dioica també és utilitzada com a model de planta per estudiar l'efecte del sexe en els processos d'envelliment i la resposta a condicions ambientals adverses (**Figura 6**).

3.2. *Vellozia gigantea*

L'espècie vegetal *V. gigantea* N. L. Menezes i Mello-Silva és una planta monocotiledònia endèmica del Brasil que creix en els *campos rupestres*, un tipus de vegetació que es troba en el *Parque Nacional da Serra do Cipó* (Minas Gerais, Brasil). Les plantes es desenvolupen sobre els afloraments rocosos de la regió on formen petites poblacions aïllades. La família Velloziaceae es distribueix a l'Àfrica (incloent Madagascar) i al centre de Sudamèrica (Ayensu, 1973), amb una presència significativa en el *Parque Nacional da Serra do Cipó*, a l'estat de Minas Gerais del sud-est del Brasil (Joly, 1998), on la conservació d'aquest Parc està especialment dirigida a la supervivència de la seva flora autòctona, com les espècies pertanyents a la família Velloziaceae (Ayensu, 1973).

V. gigantea s'inclou, dins del gènere *Vellozia*, en el grup d'espècies arborescents amb hàbitats dracenoids i, tal com indica el nom de la planta, assoleix grans alçades de fins a 6 metres, sent l'espècie de la família Velloziaceae de major tamany. Les tiges estan ramificades des de la base on poden estar engruixades fins a 180 cm i es van aprimant fins a l'àpex de la planta (3-5 cm). L'espècie és monoica i té un període de floració curt que s'inicia amb el començament de l'estació plujosa, generalment a partir de l'octubre.

Per una banda, *V. gigantea* es va escollir com un bon model per estudiar l'efecte del tamany associat a l'edat de la planta, per tal de profunditzar en els coneixements sobre l'envelliment de plantes perennes i, a més a més, també va ser un bon model per estudiar la resposta de les plantes al llarg de les variacions climàtiques que es donen per la marcada estacionalitat de l'època seca i plujosa (**Figura 7**).



Figura 7. Població de *V. gigantea* als camps rupestres del Brasil. A l'esquerra plantes de menor tamany i a la dreta plantes de major tamany.



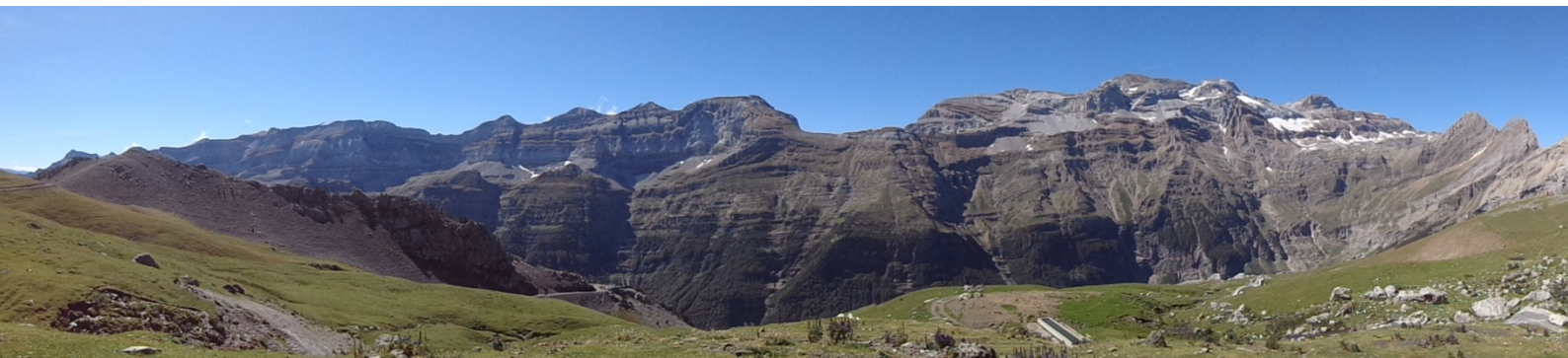
OBJECTIUS

OBJECTIUS

Aquesta tesi s'ha desenvolupat amb l'objectiu principal de profunditzar en els coneixements actuals dins de l'àmbit de la biologia vegetal sobre els processos d'envelliment en plantes perennes (especialment en plantes considerades de gran longevitat) i estudiar la importància de l'estrès oxidatiu, juntament amb els mecanismes de protecció com la vitamina E, en processos d'envelliment de les plantes en condicions climàtiques naturals.

Per tal de dur a terme l'objectiu principal es van plantejar els següents objectius específics:

- Avaluar l'efecte de l'edat i el sexe en els mecanismes de fotoprotecció i marcadors d'estrès oxidatiu en fulles utilitzant com a model l'herbàcia perenne *B. pyrenaica*.
- Estudiar l'estrès oxidatiu associat a l'edat de la planta utilitzant com a model d'estudi l'òrgan perenne – els tubercles – de *B. pyrenaica*.
- Avaluar l'efecte del tamany associat a l'edat de la planta i les variacions estacionals en la composició de vitamina E en fulles utilitzant com a model *V. gigantea*.
- Profunditzar en la resposta a la sequera analitzant diversos marcadors d'estrès oxidatiu de l'espècie *V. gigantea*.



INFORME DEL DIRECTOR DE TESI



Barcelona, 7 d'abril de 2015

El Dr. Sergi Munné Bosch, com a director de la Tesi Doctoral titulada **“Envelliment en plantes perennes de gran longevitat: importància de l'estrès oxidatiu i la vitamina E”** presentada per la doctoranda Melanie Morales Fernández,

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 **“Photo-oxidative stress markers reveal absence of physiological deterioration with ageing in *Borderea pyrenaica*, an extraordinarily long-lived herb”**, publicat a la revista *Journal of Ecology*, índex d'impacte (2013) de 5.694. En aquest treball es descriu l'absència d'estrès foto-oxidatiu amb l'envelliment a *Borderea pyrenaica*, una planta herbàcia perenne de gran longevitat, amb un èmfasi especial en l'estudi de diversos marcadors d'estrès foto-oxidatiu, fotoprotecció i protecció antioxidant en cloroplasts. Cal destacar l'aproximació experimental original en que s'analitzen els diversos marcadors d'estrès i components fotoprotectors en condicions naturals. Es descriu de forma original que no només les fulles de plantes més velles no pateixen estrès oxidatiu, sinó que a més responen millor que les fulles de plantes joves, suggerint per primera vegada senescència negativa a nivell fisiològic en aquesta espècie. La doctoranda ha realitzat 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, així com un excel·lent maneig en els mostrejos i una excel·lent predisposició en la introducció a l'ús de la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) per a les anàlisis de pigments fotosintètics i vitamina E. La doctoranda demostra també una gran capacitat d'anàlisi i interpretació dels resultats i s'introdueix, així mateix, en la redacció d'articles científics.

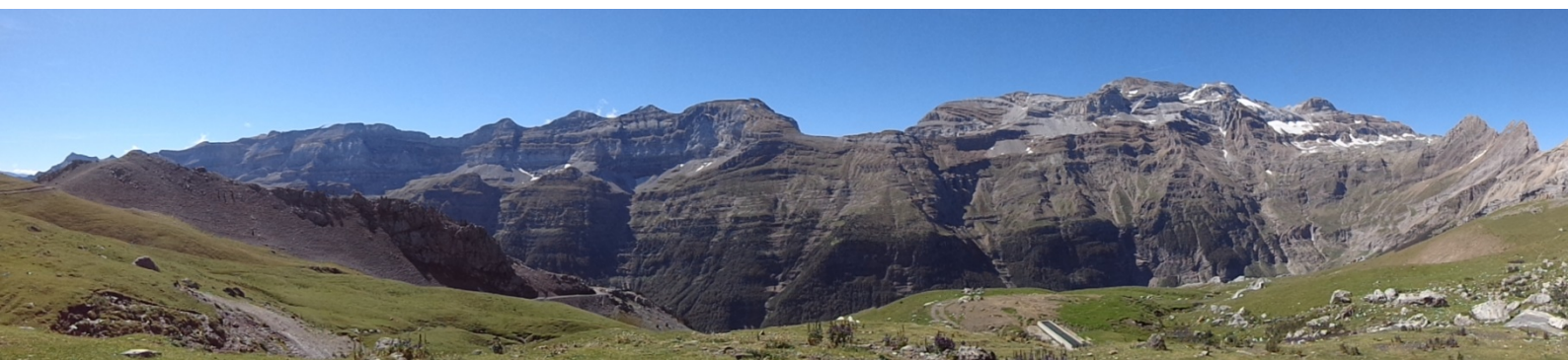
Capítol 2. Article “**Secret of long life lies underground**”, publicat a la revista *New Phytologist*, índex d'impacte (2013) de 6.545. En aquest treball es descriu l'absència d'estrès oxidatiu amb l'envelliment a *Borderea pyrenaica*, una planta herbàcia perenne de gran longevitat, en aquest cas amb un èmfasi especial en l'estudi de diversos marcadors d'estrès oxidatiu i protecció antioxidant en l'òrgan subterrani i perenne, els tubercles. Cal destacar l'aproximació experimental original en que s'analitzen els diversos marcadors d'estrès i components protectors en condicions naturals en aquest cas l'òrgan perenne de la planta, el que fa que l'estudi tingui encara més transcendència que l'anterior. Es descriu de forma original que els tubercles de plantes més velles pateixen menys estrès oxidatiu que els de plantes joves, confirmant, però ara en l'òrgan perenne, que aquesta espècie mostra senescència negativa a nivell fisiològic. La doctoranda ha realitzat 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, així com un excel·lent maneig en els mostrejors i la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) per a les anàlisis de vitamina E, i s'ha introduït en l'ús de la cromatografia líquida d'alta resolució acoblada a espectrometria de masses en tàndem (LC-MS/MS) per a les anàlisis de jasmonats. La doctoranda demostra també una gran capacitat d'anàlisi i interpretació dels resultats i participa activament en la redacció de l'article.

Capítol 3. Article “**Tocotrienols in *Vellozia gigantea* leaves: occurrence and modulation by seasonal and plant size effects**”, publicat a la revista *Planta*, índex d'impacte (2013) de 3.376. En aquest treball s'avalua la importància de les condicions climàtiques i el tamany de la planta en l'acumulació de vitamina E en fulles de *Vellozia gigantea*, una espècie endèmica del Brasil, amb un èmfasi especial en l'estudi de tocotrienols en fulles. Es descriu en aquest estudi per primera vegada la presència de tocotrienols en fulles de plantes vasculars, i se n'estudia les seves variacions amb les condicions climàtiques i el tamany de la planta en condicions naturals de camp. Es descriu aquí per primera vegada que algunes plantes vasculars, com ara l'espècie estudiada, acumulen tocotrienols en fulles, a més de tocoferols. La doctoranda ha realitzat tot el 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 una excel·lent predisposició a la millora dels experiments. La doctoranda participa també activament en la redacció de l'article, mostrant ja una destacada maduresa científica.

Capítol 4. Article “**Ecophysiological response to seasonal variations in water availability in the arborescent, endemic plant *Vellozia gigantea***”, publicat a la revista *Tree Physiology*, índex d’impacte (2013) de 3.405. En aquest darrer treball es descriu la importància de les condicions climàtiques, i més concretament de la sequera estacional, com a determinant de la resposta ecofisiològica, i en particular de l’estrès oxidatiu, en plantes de *Vellozia gigantea*, una espècie endèmica del Brasil. Es descriu per primera vegada la importància de la resposta ecofisiològica d’aquesta espècie a la marcada estacionalitat en la disponibilitat hídrica en els *campos rupestres* del Brasil, una regió de gran interès per a la biodiversitat, essent *Vellozia gigantea* un cas exemplar. Aquest és el primer estudi en que es profunditza sobre l’ecofisiologia d’aquesta espècie, i més concretament s’analitzen els efectes de la disponibilitat hídrica estacional i del tamany de la planta en l’estat redox cel·lular, nivells d’antioxidants, com ara la vitamina E, i nivell d’hormones relacionades amb l’estrès biòtic i abiòtic. Cal destacar les correlacions que es realitzen en diversos paràmetres, les quals permeten testar alguns mecanismes bioquímics en condicions de camp, com ara el paper de les hormones en la biosíntesi de vitamina E o bé el paper d’aquesta en l’acumulació de jasmonats. La doctoranda ha realitzat tot el 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 i ha participat també molt activament en la redacció de l’article. La doctoranda demostra un excel·lent grau de maduresa científica.

I, per que així consti als efectes oportuns,

Dr. Sergi Munné Bosch



RESULTATS

CAPÍTOL 1

Absència de deteriorament fisiològic en els marcadors d'estrés oxidatiu amb l'envelliment en *Borderea pyrenaica*, una herbàcia d'extraordinària longevitat



CHAPTER 1

Photo-oxidative stress markers reveal absence of physiological deterioration with ageing in *Borderea pyrenaica*, an extraordinarily long-lived herb

Melanie Morales¹, Marta Oñate¹, María B. García², Sergi Munné-Bosch¹

¹Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain

²Instituto Pirenaico de Ecología (CSIC), Apdo. 13034, Zaragoza, 50080, Spain

Publicat a **Journal of Ecology** (2013) 101: 555 – 565

RESUM DEL CAPÍTOL 1

1. En els animals, es creu que els trastorns associats amb l'edat estan connectats als canvis en l'equilibri antioxidants/prooxidants a favor de l'estrès oxidatiu. No obstant això, la contribució de l'estrès oxidatiu en l'envelliment en plantes perennes de llarga vida no ha estat investigat fins a l'actualitat.

2. Aquí es van investigar els canvis relacionats amb l'edat i el sexe en diversos marcadors d'estrès foto-oxidatiu en *B. pyrenaica*, un petit geòfit dioic relict del Terciari amb un dels cicles vitals més llargs mai registrats en una herbàcia no-clonal (més de 300 anys). Donat que la supervivència augmenta amb l'edat en *B. pyrenaica*, es va hipotetitzar que l'estrès oxidatiu no augmentaria amb l'envelliment ja que les espècies desenvoluparien una millor defensa antioxidant.

3. En tres mostrejos de camp realitzats durant el 2008, 2010 i 2011 en els Pirineus Centrals (nord-est d'Espanya), es van examinar els efectes de l'edat i el sexe sobre els nivells de pigments fotosintètics, la integritat del PSII (relació F_v/F_m), la peroxidació lipídica, i l'extensió de la fotoprotecció i la protecció antioxidant dels cloroplasts. A més a més, es va explorar si l'edat i el sexe afecten la resposta de la planta a la dessecació pronunciada.

4. Tant els mascles com les femelles van mantenir els nivells de clorofil·la intactes, així com la relació F_v/F_m i els nivells de peroxidació lipídica constant, independentment de l'edat. Aquest descobriment suggereix l'absència d'estrès oxidatiu associat a l'edat a nivell d'organisme. A més a més, es va trobar que els mecanismes de fotoprotecció eren igualment eficaços en els individus més vells com en els juvenils, en termes de de-epoxidació del cicle de les xantofil·les i acumulació d'antioxidants de baix pes molecular (carotenoides i tocoferols). De fet, les femelles majors de 100 anys van ser les més resistents a la dessecació severa, mantenint els nivells d'hidratació foliar elevats, menys degradació de clorofil·les i millor

integritat del PSII sota estrès que les femelles menors de 100 anys, els mascles per sota i per sobre de 100 anys, i els juvenils.

5. Síntesi. Ni els mascles ni les femelles de l'extraordinàriament longeva *B. pyrenaica* mostren signes d'estrès oxidatiu dependents de l'edat. Aquesta observació suggereix que l'estrès oxidatiu induït per l'edat no és una característica universal de l'envelliment en plantes perennes. De fet, les femelles majors de 100 anys van mostrar signes de senescència negativa, en les que es va registrar un millor rendiment fisiològic amb l'augment de l'edat.

SPECIAL FEATURE

NEW PERSPECTIVES IN WHOLE-PLANT SENESCENCE

Photo-oxidative stress markers reveal absence of physiological deterioration with ageing in *Borderea pyrenaica*, an extraordinarily long-lived herb

Melanie Morales¹, Marta Oñate¹, María B. García² and Sergi Munné-Bosch^{1*}

¹Departament de Biologia Vegetal Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 643, Barcelona, 08028, Spain; and ²Instituto Pirenaico de Ecología (CSIC), Apdo. 13034, Zaragoza, 50080, Spain

Summary

1. In animals, age-associated disorders are believed to be connected to shifts in the antioxidant/pro-oxidant balance in favour of oxidative stress. However, the contribution of oxidative stress to ageing in long-lived perennials has not been explored to date.

2. Here, we tested age- and sex-related changes in several photo-oxidative stress markers in *Borderea pyrenaica*, a small dioecious geophyte relict of the Tertiary with one of the longest life spans ever recorded for a non-clonal herb (more than 300 years). Given that survival increases with age in *B. pyrenaica*, we hypothesized that oxidative stress does not increase with ageing because the species develops improved anti-oxidant defence.

3. In three field samplings performed during 2008, 2010 and 2011 in the Central Pyrenees (NE Spain), we examined the effects of ageing and sex on photosynthetic pigment levels, PSII integrity (F_v/F_m ratio), lipid peroxidation, and the extent of photo and anti-oxidant protection in chloroplasts. Furthermore, we explored whether age and sex affect plant response to severe natural desiccation.

4. Both male and female plants maintained chlorophyll levels intact, as well as the F_v/F_m ratio and the levels of lipid peroxidation, irrespective of age. This finding suggests the absence of age-associated oxidative stress at the organismal level. Furthermore, photoprotection mechanisms were found to be similarly efficient in the oldest individuals as in juvenile plants, in terms of xanthophyll cycle de-epoxidation and accumulation of low-molecular-weight antioxidants (carotenoids and tocopherols). Indeed, females over 100 years of age were the most resistant to severe desiccation, maintaining higher leaf hydration levels, less chlorophyll degradation and better PSII integrity under stress than females below 100 years, males below or above 100 years, and juveniles.

5. *Synthesis*. Neither males nor females of the extraordinarily long-lived *B. pyrenaica* show age-dependent signs of oxidative stress. This observation suggests that age-induced oxidative stress is not a universal feature of ageing in perennial plants. Indeed, females older than 100 years showed signs of negative senescence, in that they registered improved physiological performance with increasing age.

Key-words: ageing, anti-oxidants, dioecy, ecophysiology, geophyte, maturity, negative senescence, oxidative stress, perennial herb, photoprotection

Introduction

The ageing of an organism is usually associated with a decline in physiological functions. At advanced stages, this

deterioration is reflected by decreased fecundity and increased mortality risk (Ricklefs 2008). Studies on ageing at the organismal level are common in model plants like the annual *Arabidopsis* and rice (Noodén & Leopold 1988; Buchanan-Wollaston *et al.* 2003; Lim & Nam 2005). However, little attention has been devoted to ageing in perennials, thus limit-

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

ing our understanding of the process and its extent and severity in the tree of life. In addition, most studies on ageing in perennials have focused on cells or organs (leaves, flowers, fruits or seeds, Franzese & Ghermandi 2011; Arrom & Munné-Bosch 2012; Sun *et al.* 2012; Wingler *et al.* 2012). Consequently, our knowledge of senescence at the organismal level in perennials is still very limited (Munné-Bosch 2007, 2008; Watson & Riha 2010; Thomas 2013). The concept of ageing is widely assumed to be associated with degenerative processes (senescence). However, there is little evidence demonstrating a negative impact of age on the physiology of long-lived perennials (Thomas 2002, 2013; Mencuccini *et al.* 2005; Munné-Bosch 2007, 2008; Peñuelas & Munné-Bosch 2010; Watson & Riha 2010, 2011). Indeed, some studies suggest that the decrease in age-related performance in perennial plants is negligible (Finch 1998) or even negative (Vaupel *et al.* 2004).

Several theories have been proposed to explain the senescence phenomenon in animals. These include the free radical theory [accumulation of reactive oxygen species (ROS), Harman 1956], the hormonal theory (focused on the loss of the reproductive component of fitness, Bowen & Atwood 2004), the genetic control of senescence (related to telomere shortening caused by a loss of telomerase activity with age, Olovnikov 1973) and evolutionary theories (accumulation of somatic mutations as the organism ages, Medawar 1952), among others. However, none of these theories have provided a universal explanation of senescence, and all of them have been at least partially inconclusive in perennial plants (Ally, Ritland & Otto 2010; Watson & Riha 2010, 2011). Recent studies suggest that, contrary to animals, perennial plants defy senescence mainly because of differences in development, such as the modular growth and the totipotency of plant meristems, which can remain viable after long periods of dormancy (Thomas 2002; Munné-Bosch 2008; Peñuelas & Munné-Bosch 2010).

At the organ level (e.g. leaves, flowers), ageing has been demonstrated to be related to an increase in ROS production (Dhindsa, Plumb-Dhindsa & Thorpe 1981; Sohal & Weindruch 1996; Procházková & Wilhelmová 2007). This oxidative stress is linked to a defence response underlying cellular redox processes. These play an essential role in plant stress tolerance, but at high concentrations, they can also eventually lead to a decrease in membrane stability, an increased rate of lipid peroxidation and reductions in the levels of certain anti-oxidant enzymes and molecules that confer protection against oxidative damage (Dhindsa, Plumb-Dhindsa & Thorpe 1981; Zimmermann & Zentgraf 2005; Munné-Bosch, Queval & Foyer 2013). However, information in the literature on age-related oxidative stress (considering ageing at the organismal level) in perennials is restricted to one species, namely *Cistus clusii* (Cistaceae), a Mediterranean shrub with a life span of about 15 years (Munné-Bosch & Alegre 2002; Munné-Bosch & Lalueza 2007). Results from studies of this perennial plant show that ageing increases the susceptibility of this shrub to oxidative stress, but only in individuals exposed to environmental stress (summer drought). Ageing therefore seems to increase the sen-

sitivity of organisms to oxidative stress, as occurs in humans (Harman 1956).

Another important point to be considered in the ageing process is the role of reproduction as a fitness component, which is expected to decrease with age, and the biological reproductive effort, which consequently is predicted to increase with age (Ricklefs 2008). In plants, the latter is generally understood as the relative investment of resources in reproductive structures. Thus, ageing is assumed to have a negative effect not only on relative growth and the photosynthetic rates of leaves, but also on the consequent investment of photoassimilates in reproductive structures (flowers, fruits and seeds, Munné-Bosch 2007). Therefore, an increased sensitivity of plants to a potential age-induced increase in oxidative stress in leaves can lead to a reduction in the number and size of reproductive structures. Furthermore, as increased reproductive effort promotes a physiological deterioration of leaves due to limited resource availability (Wingler *et al.* 2006; Oñate & Munné-Bosch 2009), dioecious organisms with a differential reproductive effort between genders are highly suitable systems in which to test the expected sex-related differences in ageing. However, in this regard, there is no information available on how male and female plants respond to stress caused by ageing in long-lived perennials.

In this study, we tested the free radical theory of ageing in the extremely long-lived dioecious herb *Borderea pyrenaica*, with the aim to unravel whether individual plants become more sensitive to oxidative stress with age. *Borderea pyrenaica* is a small, non-clonal, dioecious geophyte found in the Central Pyrenees. The female plants of this species have a much higher reproductive effort than males (García & Antor 1995b). Recent studies have demonstrated that vital rates do not decrease with age in males or females; on the contrary, they show signs of negative senescence (García, Dahlgren & Ehrlén 2011). Here, we explored the physiological mechanisms behind this unexpected pattern and provide insight into the widely accepted assumption that long-lived organisms are subjected to senescence. Given that survival increases with age in *B. pyrenaica* (García, Dahlgren & Ehrlén 2011), we hypothesized that oxidative stress does not increase with ageing because the species develops improved anti-oxidant defence. More specifically, we examined whether oxidative stress decreases while anti-oxidant defence (mainly carotenoids and tocopherols) increases with age. In addition, as reproductive effort differs between genders in this species, we also explored whether plants show sex-related differences in oxidative stress and anti-oxidant defence during ageing. Studies in the field did not reveal any physiological deterioration of this plant with ageing, but rather an improved performance in females older than 100 years. To further support, a possible gender-specific case of negative senescence in terms of improved physiological response with increasing age, we performed laboratory experiments in which individuals were subjected to severe natural desiccation, so that the potential gender- and age-related differences in the response of plants to a severe stress were evaluated.

Materials and methods

SPECIES STUDIED

The species used was *Borderea pyrenaica* Miégeville (Dioscoreaceae), a small dioecious geophyte endemic to alpine scree of the Central Pyrenees. Although a Tertiary relict with stable population dynamics (Dahlgren, García & Ehrlén 2011), this plant is classified as endangered by the regional government (Sánchez & Alcántara 2007). The aerial part of the plant (stems, leaves and flowers) is preformed the previous year and overwinters in a bud, developing quickly in June (Fig. S1 in Supporting Information). Female plants rapidly produce mature fruits during July. The first signs of leaf senescence (chlorosis) appear late in August, and all aerial parts are dead by mid-September. The aerial stem leaves a scar on the bulb, allowing estimation of the age of an individual by counting the number of scars (García & Antor 1995a). *Borderea pyrenaica* is a strictly sexually reproducing herb, and it has one of the longest life spans ever reported for non-clonal plants (> 300 years old; García & Antor 1995a).

SAMPLING DESIGN

The population of *B. pyrenaica* studied is located in the Pineta valley (42°41'N, 0°06'E, 2000 m a.s.l.; Spanish Pyrenees), where several thousand individuals grow in high densities on a north-facing rocky hillside (Fig. S1). The experimental design involved descriptive field-work and experimental manipulation in the laboratory.

Studies in the field with male and female plants of different ages were performed to evaluate possible age- and sex-related increases in oxidative stress. These experiments were carried out during three campaigns in July of 2008, 2010 and 2011, when plants were flowering and males and females could be easily identified. Leaf samples were taken on clear sunny days. Several indicators of leaf physiological status (water content, oxidative stress and photoprotection mechanisms) were measured in samples collected at midday [at maximum incident photosynthetically active photon flux density (PPFD)]. For biochemical analyses, samples were frozen *in situ* in liquid nitrogen and transported to the laboratory, where they were stored at -80 °C until analyses.

Climatological conditions were monitored throughout the 3-year study to evaluate whether possible age- or gender-related effects were associated with climatic differences between years. The climate conditions during the study were typical of high altitudes (2000 m a.s.l.) in the Central Pyrenees, with a yearly rainfall above 800 mm, mostly falling during the spring and autumn, and low mean monthly temperatures during winter (November–February, Fig. S2 in Supporting Information). The driest year was 2011, particularly during the spring and summer. A similar overall amount of rain was received by plants during 2008 and 2010; however, precipitation patterns differed along the years, being more uniformly distributed in 2008 and more irregularly in 2010 (Fig. S2).

Laboratory experiments were also conducted on plants from the same population to examine their response to severe desiccation. For this purpose, we collected a total of 15 juveniles, 22 and 19 males, and 24 and 21 females under and over 100 years old, respectively, during July 2011. The plants were then brought to the laboratory and immediately subjected to severe water stress conditions by keeping them on the bench without a water supply. Plants were desiccated for 2 weeks at constant PPFD values below 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and a rela-

tive humidity of 50–60%. Chlorophyll fluorescence was measured every second day up to day 9 after the onset of experimental drought. After that (day 9), a sample of leaves was used to estimate water content while another sample was frozen in liquid nitrogen and later stored at -80 °C until biochemical analyses of oxidative stress and photoprotection mechanisms.

AGE ESTIMATION

At the end of the experiment, bulbs were inspected carefully under magnifying glasses to estimate plant age, following García & Antor (1995a; see Fig. S1 for details). Age ranged between 1 and 245 years for individuals studied in the field and between 1 and 280 years for those used in the laboratory experiment. Plants were grouped into three classes for subsequent analysis: juveniles (non-reproductive plants under 50 years), males and females. Juveniles were considered to be plants under 50 years of age and without any reproductive structures (García & Antor 1995a). As all plants were flowering during samplings (all performed during July), these two parameters allowed us to identify juvenile plants as such. It should not be discarded that some juveniles could be confounded with young females that did not bloom the year of sampling; however, this is very unlikely due to size differences. For some analyses, flowering plants were grouped under and over 100 years of age.

LEAF WATER STATUS

Leaf water status was measured in the field studies and laboratory experiments to evaluate possible age- and gender-related differences in the physiological status of leaves. Leaf water content was expected to decrease as a result of a physiological deterioration with age and to be dramatically affected in desiccation experiments. Leaf water status was estimated by the following two indexes: the relative water content (RWC) of leaves as $\text{RWC} (\%) = (\text{fresh weight} - \text{dry weight}) / (\text{turgid weight} - \text{dry weight}) \times 100$ and the leaf hydration (H) as $H = (\text{fresh weight} - \text{dry weight}) / (\text{dry weight})$.

PHOTO-OXIDATIVE STRESS MARKERS

Measurements of the maximum efficiency of photosystem II photochemistry (F_v/F_m ratio), levels of photosynthetic pigments, chloroplastic anti-oxidants (carotenoids and tocopherols) and the extent of lipid peroxidation in leaves were used to examine the extent of foliar physiological deterioration with age. The F_v/F_m ratio and the levels of photosynthetic pigments and tocopherols were expected to decrease with photo-oxidative stress in chloroplasts. The extent of lipid peroxidation, as determined by measuring bulk malondialdehyde (MDA) levels, was expected to increase with an overall oxidative stress at the cellular level. The F_v/F_m ratio was calculated following Van Kooten & Snel (1990). For this purpose, we used chlorophyll fluorescence data obtained with a portable fluorimeter (Mini-PAM; Walz, Effeltrich, Germany) in leaves maintained for at least 1 h in darkness. The levels of photosynthetic pigments (chlorophylls and carotenoids) and tocopherols were measured by HPLC, as described by Munné-Bosch & Alegre (2000) and Cela, Chang & Munné-Bosch (2011), respectively. The extent of lipid peroxidation was estimated from the amount of MDA in leaves, following the method described by Hodges *et al.* (1999), which takes into account the possible influence of interfering compounds in the thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) assay.

STATISTICAL ANALYSES

The relationships between measurements of the response variables obtained in the field (RWC, H, F_v/F_m ratio, photosynthetic pigments, tocopherols and lipid peroxidation) and age were tested by linear regression using Spearman's rank correlation, separately considering the three reproductive effort groups: juveniles, males and females. In addition, age, group (males, females and juveniles) and year (2008, 2010 and 2011) effects were tested using an analysis of covariance (ANCOVA, Bonferroni adjusted), with sex as a fixed, year as a random factor and age as a covariate. In the laboratory experiment, differences between groups (juveniles, males, females and between age groups) were tested by two-way factorial analysis of variance (ANOVA), using sex and age as factors. All statistical tests were performed using the SPSS package (Chicago, IL).

Results

LEAF WATER CONTENT UNDER NATURAL CONDITIONS

Age-related effects on leaf water status were examined separately for juveniles, males and females (the oldest sampled male and female individuals were 245 and 220 years old, respectively), and considering the climatic variability during the 3 years of the study (2008, 2010 and 2011). The RWC was around 80% at all ages, but variability between individuals and gender increased during 2010 and 2011 (Fig. 1). This increase may have been associated with drier conditions during the growing period (May and June) in those years compared with 2008 (Fig. S2). An age-related decrease in RWC was observed only for juvenile and male plants in 2010 (Fig. 1, Table 2). None of the groups showed age-related differences in leaf hydration. A comparative analysis of average

RWC values between groups during the study revealed that while RWC values averaged around 80% in males and females, water contents were more variable in juveniles, with RWC values ranging between 70.7% and 89% (Table S1 in Supporting Information). However, analyses of covariance indicated that neither RWC nor H was significantly affected by age or reproductive status (Table 1).

PHOTO-OXIDATIVE STRESS MARKERS UNDER NATURAL CONDITIONS

The effects of age, maturity and sex on photo-oxidative stress at the organismal level were evaluated on the basis of chlorophyll content (Chl *a* + *b*), the Chl *a/b* ratio and the maximum efficiency of PSII photochemistry (F_v/F_m ratio), together with the levels of MDA, an indicator of the extent of lipid peroxidation in leaves. Chlorophyll levels were not negatively affected by age in males or in females in any of the 3 years of study, and only decreased significantly with age in juveniles in 2008 (Fig. 2). Indeed, males showed a significant increase in chlorophyll levels with increasing age during 2011. Nonetheless, this pattern was not observed during 2008 or 2010 (Fig. 2 and Table 2), nor did age influence the Chl *a/b* or F_v/F_m ratios in juveniles and females in any of the sampling years, but the F_v/F_m ratio increased with age in males during 2008 and 2011. This pattern was not confirmed in samples collected during 2010, the year with the smallest variability in this parameter (Fig. 2, Table 2). Similarly, MDA levels did not show any relationship with age for any year sampled, thus indicating constant lipid peroxidation levels within groups and across years (Fig. 2). Analyses of covariance revealed that neither Chl,

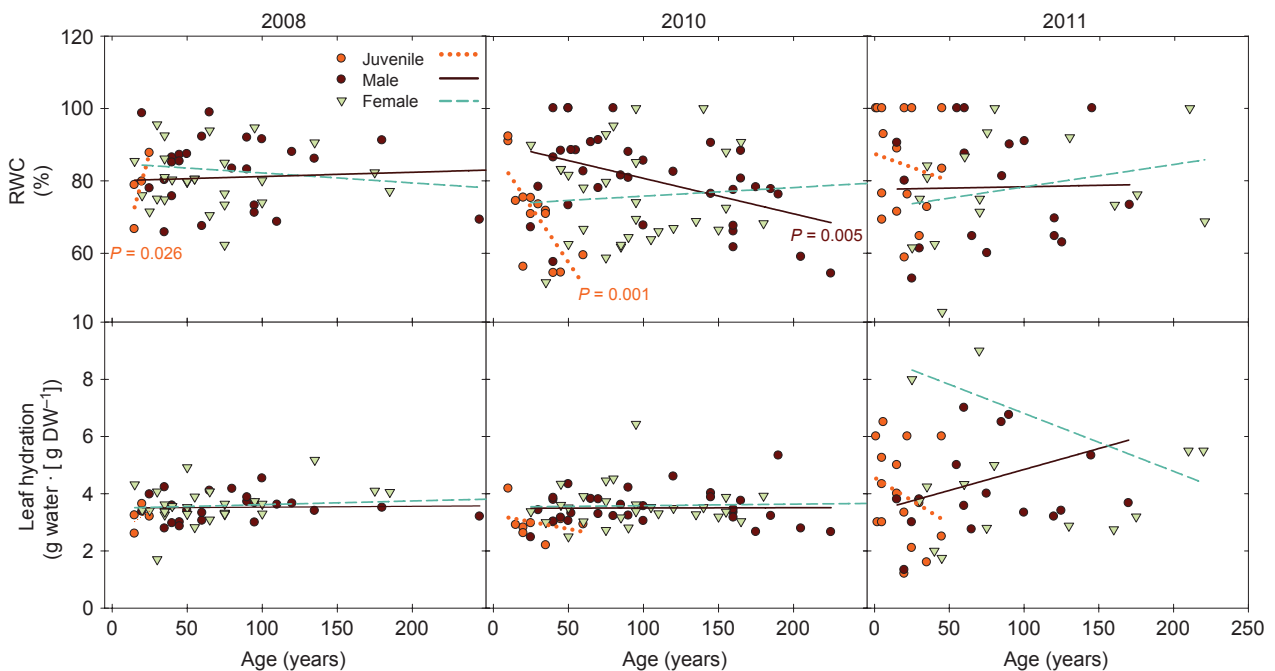


Fig. 1. Relative water content (RWC) and hydration (H) of leaves of individual juvenile (orange circles), male (brown circles) and female (blue triangles) plants in samplings performed during July 2008, July 2010 and July 2011. The parameters were correlated with plant age by Spearman's rank correlation. $P < 0.05$ are considered significant and are given in the insets.

MDA levels nor the F_v/F_m ratio were significantly affected by age or reproductive status (Table 1).

Table 1. *P*-values of the analysis of covariance (ancova) to test for the effects of year (2008, 2010 and 2011), reproductive status (group: juveniles, males, females), age (as covariate), and group \times age interaction, on several indexes of leaf water status, photo-oxidative stress and photoprotection in *Borderea pyrenaica* under field conditions

Parameter	Age	Group	Year	Group \times Age
RWC	0.291	0.623	0.092	0.014
H	0.728	0.281	< 0.001	0.339
Chl <i>a</i> + <i>b</i>	0.902	0.534	< 0.001	0.102
Chl <i>a/b</i>	0.811	0.805	0.192	0.583
F_v/F_m	0.494	0.195	< 0.001	0.295
MDA	0.531	0.518	< 0.001	0.398
VZA	0.412	0.949	0.001	0.854
Zeaxanthin	0.622	0.922	0.021	0.977
DPS	0.663	0.958	< 0.001	0.989
Lutein	0.743	0.783	< 0.001	0.545
β -Car	0.820	0.857	< 0.001	0.845
γ -Toc	0.980	0.129	0.001	0.050
α -Toc	0.362	0.084	0.001	0.034

P < 0.0038 (Bonferroni adjusted) shown in bold.

PHOTOPROTECTION MECHANISMS UNDER NATURAL CONDITIONS

Given that the xanthophyll cycle is involved in one of the main photoprotection mechanisms of plants, we examined the levels of the xanthophyll cycle pool (VZA, the sum of violaxanthin, antheraxanthin and zeaxanthin), together with the de-epoxidation state of xanthophyll cycle (DPS) in samples collected during 2010 and 2011 (no material was available in 2008). Neither the VZA pool nor any of these xanthophylls alone showed any significant variation in age or reproductive status (Fig. S3 in Supporting Information, Table 1), except that zeaxanthin levels and the DPS increased significantly with age in females during 2010 ($P = 0.013$ and 0.018, respectively). However, the same pattern was not repeated during 2011 (Fig. S3, Table 3).

In addition, we evaluated the extent of anti-oxidant defence in chloroplasts by measuring the accumulation of lipophilic anti-oxidants, such as the carotenoids lutein and β -carotene and α - and γ -tocopherols, in samples collected during 2010 and 2011 (Fig. S4 in Supporting Information). None of these compounds changed significantly with age in any of the plant groups during these 2 years. β -Carotene levels increased in

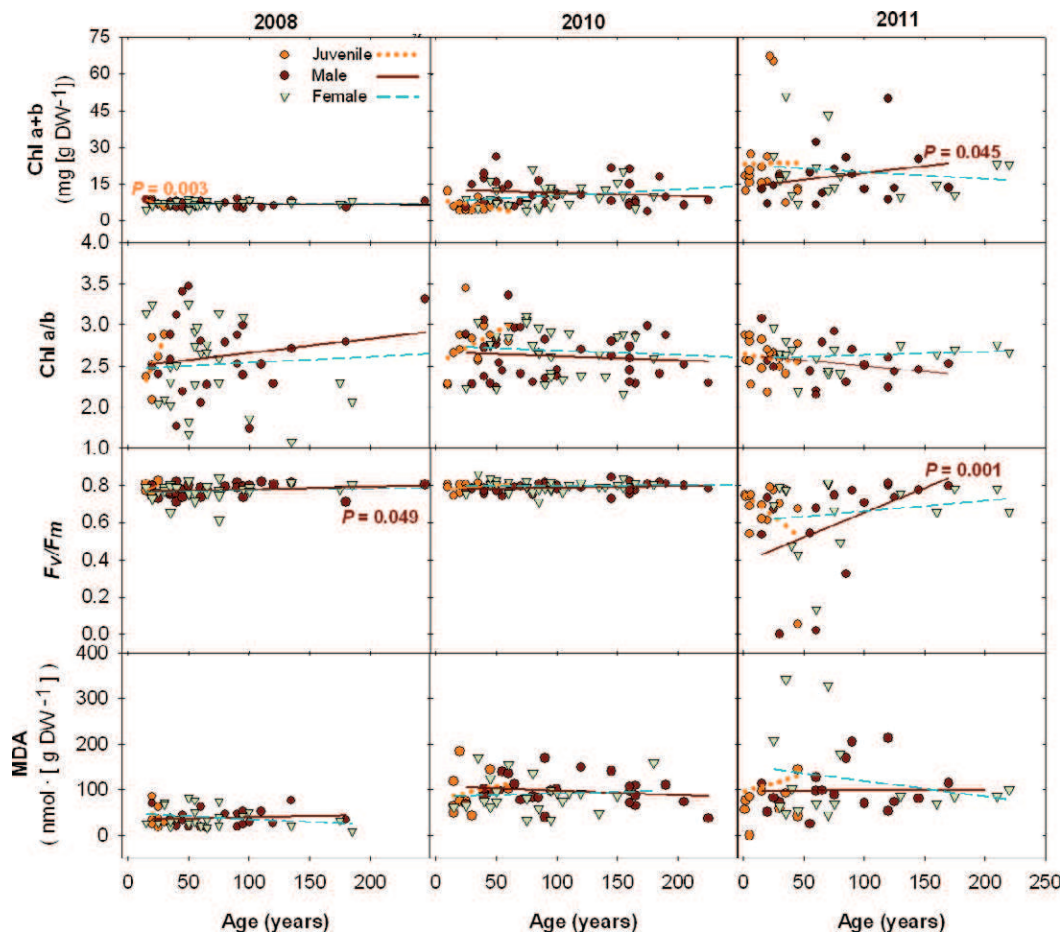


Fig. 2. Chlorophyll (Chl) *a* + *b* levels, Chl *a/b* ratio, maximum efficiency of PSII photochemistry (F_v/F_m ratio) and levels of malondialdehyde (MDA), an indicator of lipid peroxidation, in leaves of juvenile (orange circles), male (brown circles) and female (blue triangles) plants in three independent samplings performed during July 2008, July 2010 and July 2011. The parameters were correlated with plant age by Spearman's rank correlation. $P < 0.05$ are considered significant and are given in the insets.

Table 2. Correlation coefficient (r^2) and P -values (shown in parentheses) of Spearman rank correlation analysis to correlate the parameters of leaf water status (RWC and H) and photo-oxidative stress markers [chlorophyll (Chl) contents, PSII integrity (F_v/F_m ratio) and extent of lipid peroxidation (MDA)] with plant age

Parameter	2008						2010						2011					
	Juvenile		Male		Female		Juvenile		Male		Female		Juvenile		Male		Female	
	r^2	P	r^2	P	r^2	P	r^2	P	r^2	P	r^2	P	r^2	P	r^2	P	r^2	P
RWC	0.949	(0.026)	0.016	(0.470)	0.034	(0.431)	-0.760	(0.001)	-0.424	(0.005)	0.114	(0.270)	-0.211	(0.217)	-0.103	(0.342)	0.333	(0.104)
H	0.211	(0.395)	0.149	(0.243)	0.077	(0.349)	0.059	(0.441)	-0.020	(0.459)	-0.019	(0.461)	-0.044	(0.436)	0.217	(0.201)	-0.074	(0.393)
Chl $a + b$	0.941	(0.003)	0.090	(0.342)	0.086	(0.335)	0.301	(0.159)	-0.142	(0.207)	0.277	(0.085)	-0.134	(0.339)	0.489	(0.045)	-0.182	(0.286)
Chl a/b	0.698	(0.061)	0.031	(0.444)	-0.008	(0.484)	0.431	(0.071)	-0.039	(0.412)	0.237	(0.103)	-0.328	(0.108)	-0.190	(0.232)	-0.016	(0.476)
F_v/F_m	0.316	(0.342)	0.346	(0.049)	0.111	(0.287)	0.325	(0.139)	0.254	(0.070)	-0.009	(0.482)	-0.067	(0.403)	0.710	(0.001)	-0.016	(0.476)
MDA	-0.278	(0.297)	0.035	(0.439)	-0.071	(0.366)	0.187	(0.315)	-0.090	(0.325)	0.062	(0.392)	0.180	(0.253)	0.196	(0.225)	0.044	(0.435)

$P < 0.05$ shown in bold.

juveniles with ageing during 2010, but not during 2011. γ -tocopherol levels increased with ageing in juveniles during 2011, but not during 2010. In contrast, α -tocopherol levels decreased with ageing in females during 2011, but not during 2010 (Fig. S3 and Table 3). However, analyses of covariance revealed that neither of these anti-oxidants was significantly affected by age or reproductive status (Table 1).

PLANT RESPONSE TO SIMULATED SEVERE DESICCATION

Plant performance after severe desiccation in the laboratory was evaluated by measuring leaf water status, photo-oxidative stress markers and the amount of photoprotective molecules. We tested for differences between juveniles, males and females, grouping individuals above and below 100 years of age. The RWC decreased from around 89% in juveniles and 77% in both males and females under natural conditions (Fig. 1 and Table S1) to around 50% in experimental drought conditions (Fig. 3), and there were no significant differences between the aforementioned groups under water stress (Fig. 3). However, leaf hydration (H) values were higher among the oldest desiccated females (over 100 years of age), than in the remaining groups under similar experimental conditions. Likewise, the Chl $a + b$ levels were higher in centenarian females compared with the other groups. No differences were observed in the Chl a/b ratio between plant groups (Fig. 3). The F_v/F_m ratio decreased with length of desiccation, and differences between groups were particularly evident after 7 and 9 days of water stress, centenarian females showing the highest F_v/F_m ratios, followed by females under 100 years of age (Fig. 4). Males were equally as sensitive to severe desiccation as juveniles, irrespective of age (Fig. 4).

Finally, the levels of anti-oxidant molecules (carotenoids and tocopherols), together with MDA, confirmed that centenarian females were the group with the highest photo-protection capacity, as indicated by greater levels of VZA, and most particularly violaxanthin (Fig. 5). No differences between plant groups were observed in the amount of lutein, β -carotene, tocopherols or MDA (Fig. 5).

Discussion

Borderea pyrenaica was used to evaluate the effects of individual age and reproductive status on leaf water content, photo-oxidative stress markers and the accumulation of photoprotective molecules. To date, very few studies have considered age as an intrinsic factor triggering physiological degenerative processes at the organismal level in perennial plants (for a complete list to our knowledge, see Munné-Bosch & Alegre 2002; Mencuccini *et al.* 2005; Munné-Bosch & Lalueza 2007; Oñate & Munné-Bosch 2009; Ally, Ritland & Otto 2010; Hernández, Alegre & Munné-Bosch 2011). The present study is the first specifically designed to test for age-related changes in oxidative stress markers in a very long-lived perennial. The oldest plant used for field studies was 245 years old and while for laboratory experiments, it was 280, although the maximum

Table 3. Correlation coefficient (r^2) and P -values (in parentheses) of Spearman's rank correlation analysis to correlate the photoprotection parameters [xanthophyll cycle pool (VZA), zeaxanthin, de-epoxidation state of the xanthophyll cycle (DPS), levels of lutein, β -carotene, and γ - and α -tocopherols] with plant age

Parameter	2010			2011		
	Juvenile	Male	Female	Juvenile	Male	Female
VZA	0.282 (0.175)	-0.159 (0.181)	-0.004 (0.491)	-0.401 (0.062)	-0.212 (0.207)	-0.090 (0.370)
Zeaxanthin	-0.110 (0.360)	-0.283 (0.050)	0.406 (0.013)	-0.062 (0.410)	-0.347 (0.086)	-0.028 (0.459)
DPS	-0.097 (0.377)	-0.176 (0.156)	0.383 (0.018)	-0.064 (0.408)	-0.372 (0.071)	-0.177 (0.256)
Lutein	0.475 (0.050)	-0.167 (0.168)	0.175 (0.178)	-0.365 (0.082)	0.103 (0.347)	-0.289 (0.139)
β -Carotene	0.506 (0.039)	-0.148 (0.198)	0.234 (0.107)	0.016 (0.476)	0.142 (0.293)	-0.293 (0.135)
γ -Tocopherol	0.213 (0.243)	0.261 (0.065)	-0.073 (0.356)	0.464 (0.035)	0.002 (0.497)	-0.258 (0.168)
α -Tocopherol	0.177 (0.282)	0.128 (0.232)	-0.032 (0.436)	-0.028 (0.459)	0.114 (0.327)	-0.439 (0.026)

$P < 0.05$ shown in bold.

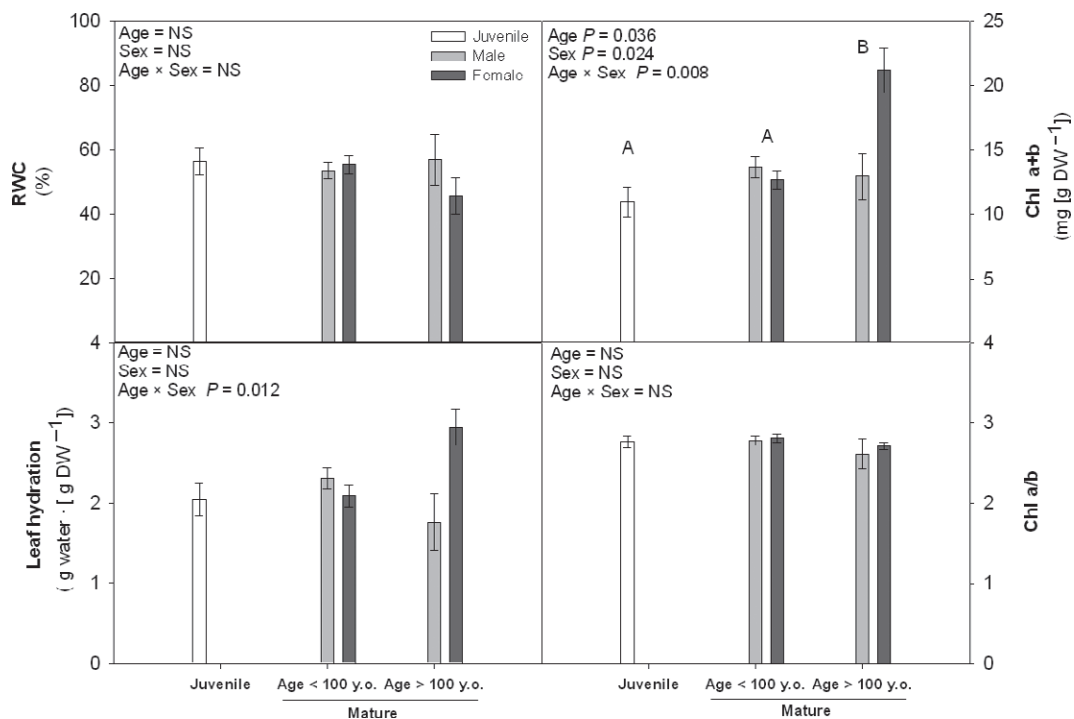


Fig 3. Relative water content (RWC), hydration (H), chlorophyll (Chl) $a + b$ levels and the Chl a/b ratio of leaves of juvenile and mature plants, considering 2 age groups in the latter group (below and above 100 years), desiccated in the laboratory for 9 days. Significant differences between groups were tested by two-way factorial analyses of variance (ANOVA) with plant age and sex as factors. Different letters indicate differences between age groups using Tukey's post hoc analyses (Tukey's test, $P < 0.05$). Data represent the mean \pm SE of $n = 15$ for juveniles, and 22 and 19 males and 24 and 21 females below and above 100 years, respectively. NS, not significant.

life span is estimated to be *ca.* 350 years (M. Oñate, unpubl. data). We evaluated whether demographic, negligible or negative senescence in this long-lived perennial geophyte (García *et al.* 2011) correlated with improved physiology, and the extent to which photo-oxidative stress markers are indicative of degenerative processes with ageing in this long-lived herb, as occurs in short-lived annual plants, such as *Arabidopsis thaliana* (Wingler *et al.* 2006; Abreu & Munné-Bosch 2009).

Individuals of *B. pyrenaica* did not show any sign of physiological deterioration with age in terms of photo-oxidative stress. Oxidative stress resistance may be behind the absence

of age-related degenerative processes in the extremely long-lived herb *B. pyrenaica*. Not only were no signs of physiological deterioration, in terms of photo-oxidative stress markers, observed at advanced ages in field studies, but females older than 100 years showed improved performance in response to severe desiccation in laboratory experiments, as indicated by enhanced leaf water status and decreased degradation of photosynthetic pigments. Changes in photosynthetic pigments not only included a higher retention of chlorophylls under stress but also higher levels of xanthophyll cycle pigments, which play an essential role in plant protection

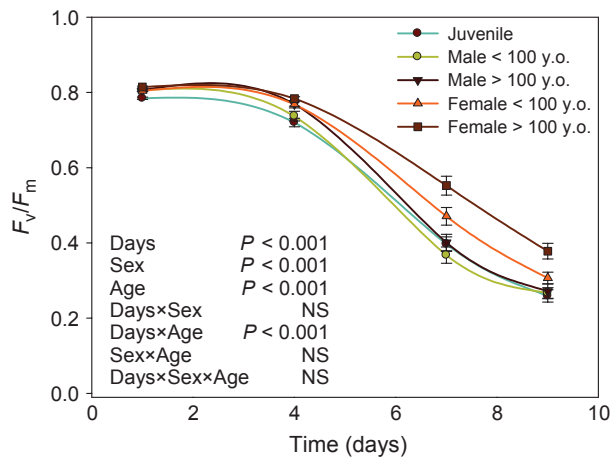


Fig 4. Dynamics of the maximum efficiency of PSII photochemistry (F_v/F_m ratio) during desiccation of leaves of juvenile and mature plants, considering 2 age groups in the latter (above and below 100 years), in the laboratory for 9 days. Significant differences between groups were tested by three-way factorial analyses of variance (ANOVA) with plant age, sex and time (days) as factors. NS, not significant. Data represent the mean \pm SE of $n = 15$ for juveniles, and 22 and 19 males and 24 and 21 females below and above 100 years, respectively.

against oxidative stress (Dall’Osto *et al.* 2012). These results could therefore explain the higher PSII integrity in females over 100 years of age in the laboratory experiments.

Extrinsic factors play a critical role in physiological ageing. A study of the shrub *C. clusii*, with a life span of about 15 years, demonstrated that photo-oxidative stress in leaves increased with age only during summer droughts, a typical Mediterranean combination of water deficit and high solar radiation (Munné-Bosch & Lalueza 2007). In the present study, no signs of photo-oxidative stress were observed within the unusually long life span of *B. pyrenaica*, despite the fact that field samplings were performed on clear sunny days and therefore at high solar light intensities of around $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, and temperature may exceed 35°C on scree surfaces. Furthermore, the pattern observed was consistent across years despite substantial differences in natural conditions (2010 and 2011 were drier than 2008), which may increase ROS production in chloroplasts. Indeed, juvenile plants and males showed a decrease in RWC with age during 2010. This reduction could be associated with decreased water availability during May, June and July, a common pattern described in other species (Bray 1997; Larcher 2003). These adverse conditions did not lead to increased photo-oxidative stress in the oldest individuals, thus supporting the notion that this species is not subjected to senescence. For instance, the oldest males did not show increased photo-oxidative stress compared with their younger counterparts, and the oldest females did not show any sign of water stress despite their higher reproductive effort and the possible sink effect exerted by large developing fruits. Indeed, females showed increased zeaxanthin and DPS values with age during 2010, which suggests increased photoprotection as ageing progresses. These observations therefore indicate that females

were not only more efficient than males at maintaining water homeostasis under changing climatic conditions, but also displayed greater photoprotection capacity. It is also noteworthy that the F_v/F_m ratio rose with increasing age in males during 2008 and 2011 ($P = 0.049$ and 0.001 , respectively). This increase was due to decreased PSII integrity (smaller F_v/F_m ratios) in younger individuals compared with the oldest ones, thus suggesting that the oldest males responded similarly (2010) or even better (2008 and particularly 2011) than their younger counterparts in periods of photo-oxidative stress.

Plant performance after severe experimental desiccation in the laboratory supported the pattern found in the field. Although the biological significance of results obtained in this way is limited by the fact that de-rooted bulbs do not necessarily reflect what would happen in nature, these results give us an idea of the potential of this particular species to respond to extreme desiccation. The oldest females (aged above 100 years) showed the greatest resistance to desiccation, as indicated by the time course evolution of F_v/F_m ratios, followed by females younger than 100 years, while males and juveniles showed a similar response. Females also displayed a greater capacity to withstand extreme desiccation, as indicated by higher RWC values, F_v/F_m ratios and an increased retention of xanthophylls under severe stress. Given that similar results were obtained in de-rooted plants and in aerial parts without bulbs (data not shown), we propose that the resistance to simulated severe stress, like that performed in laboratory conditions, lies partly in the somatic (leaf) tissues, rather than in an increased accumulation of water and/or nutrient in bulbs in females. The bulb and the root system also play a major role in controlling water homeostasis in this species. Males and females with larger bulbs and roots showed less variation in RWC values between years compared with juveniles, which may be more susceptible to variable climatic conditions.

Apart from the capacity of plants to respond to variable climatic conditions, several factors may additionally contribute to the extraordinary life span of *B. pyrenaica* and other small perennial geophytes. Several studies propose that size is a key determinant in age-related decline in growth vigour of mature trees, such as the Scots pine (*Pinus sylvestris*, Mencuccini *et al.* 2005). Therefore, it is likely that limited size protects small geophytes from some size-related physiological deterioration that occurs with ageing in several other larger perennials, such as shrubs and particularly trees. In *Urtica dioica*, size was not found to be responsible for the maturity-related declines in growth vigour (Oñate & Munné-Bosch 2009), and reproduction was proposed as the main cause for such a decline and the shift to perenniality of non-reproductive shoots. In *B. pyrenaica*, the alternative use of 5 meristems (only one is activated each year) may allow a 5-fold reduction in the potential physiological deterioration with age, implying that a 200-year-old plant has a ‘physiological’ age of 40 years in terms of meristem ageing (Oñate, García & Munné-Bosch 2012). This could explain the absence of photo-oxidative stress in this species and the several-fold reduction in ‘physio-

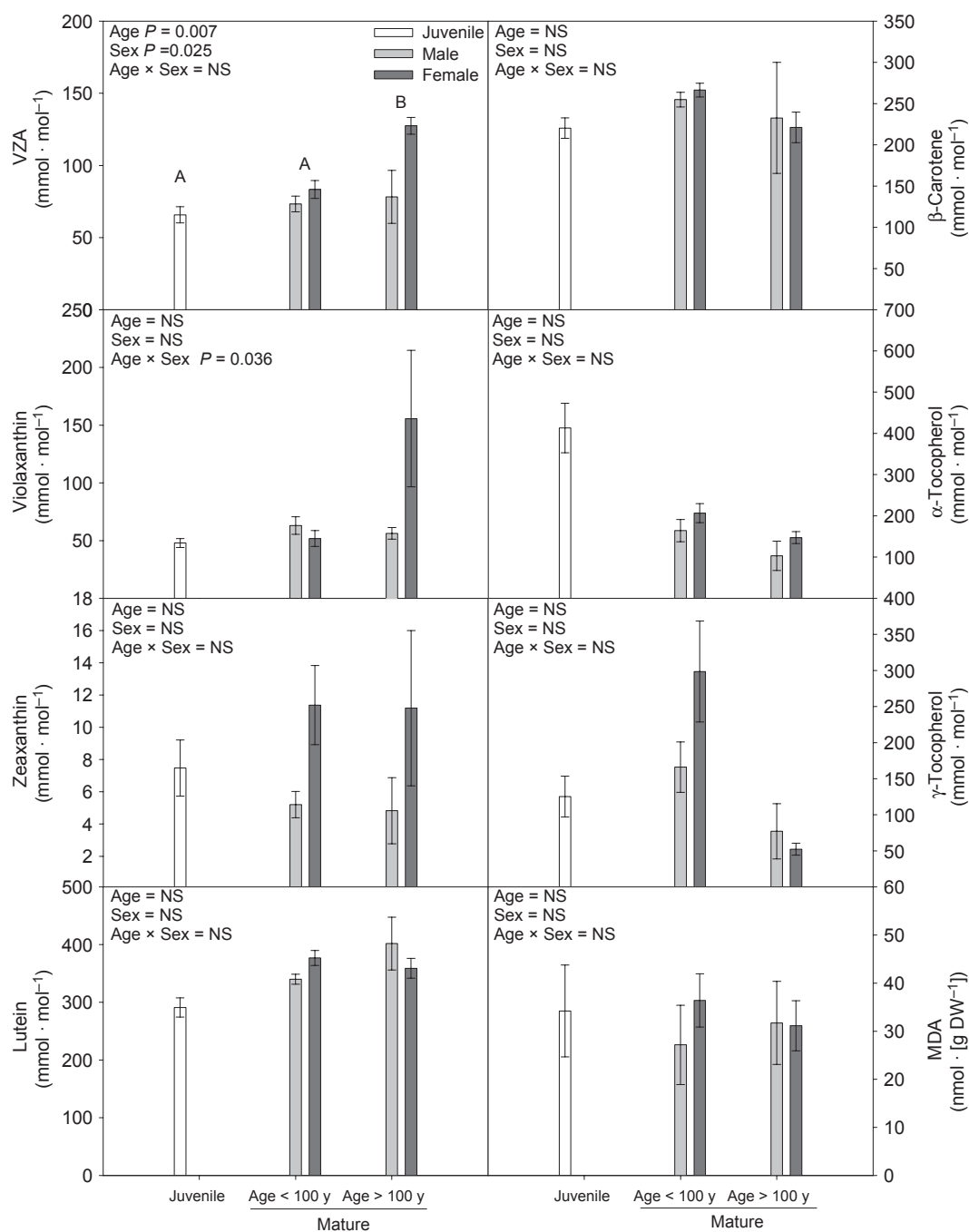


Fig 5. Levels of xanthophyll cycle pool (VZA), violaxanthin (V), zeaxanthin (Z), lutein, β -carotene, α -tocopherol and γ -tocopherol per unit of chlorophyll, and malondialdehyde (MDA) of leaves of juvenile and mature plants, considering two age groups in the latter (above and below 100 years), after 9 days of desiccation in the laboratory. Significant differences between groups were tested by two-way factorial analyses of variance (ANOVA) with plant age and sex as factors. Different letters indicate differences between age groups using Tukey's post hoc analyses (Tukey's test, $P < 0.05$). Data represent the mean \pm SE of $n = 15$ for juveniles, and 22 and 19 males and 24 and 21 females below and above 100 years, respectively. NS, not significant.

logical' ageing, which has been considered of capital importance in decreasing mortality rates in both plants and animals, including human populations in the change from hunter-gatherers to today's populations with the lowest ever mortality (Burger, Baudisch & Vaupel 2012). The alternate use of meristems may decrease the potential harmful effects of deleterious mutations and seasonal shoot development (with leaves,

flowers and fruits appearing during spring and summer only, and being absent during most of the year, except the bulb), thus preventing potential physiological deterioration above-ground during most of the year. Furthermore, *B. pyrenaica* is one of the slowest growing plants ever reported, because bulbs of centenarian individuals weigh less than 5 g (García & Antor 1995a). Therefore, the amount of biomass accumu-

lated over centuries is very small, and consequently, the need to maintain permanent viable structures is limited to the bulb only. Furthermore, this bulb is protected inside rock crevices and thus is protected from predation. All these factors can explain the extraordinary longevity of this small geophyte.

Another point to be considered in the present study is the age range studied and the maximum life span of a given species. The maximum age of the plants in this study was 280 years of 350 years noted as the maximum life span (i.e. 80% of the maximum age). Therefore, it cannot be excluded that senescence occurs in plants only after 80% of the maximum life span is reached, that is, beyond the limits of our study. In any case, if senescence does not occur, what causes these plants to die? Indeed, only very few studies have shown increased mortality rates associated with physiological deterioration at the organismal level in perennial plants (Picó & Retana 2008; Herrera & Jovani 2010). It cannot be excluded that the ageing effect in these studies was masked, at least partly, by changing climatic conditions and/or plant size throughout the years of study. In this regard, it has been shown that regional warming and pathogen attack rather than ageing are the most likely contributors to tree mortality rates (Silvertown, Franco & Pérez-Ishiwara 2001; Allen *et al.* 2009). Therefore, it appears that up to the age addressed here, mortality in *B. pyrenaica* is due to factors extrinsic to the plant, that is, biotic or abiotic stressors that can lead to the death of these individuals in the Central Pyrenees, such as pathogens, regional warming during the summer or more stochastic events of freezing during the winter.

Conclusions

Borderea pyrenaica does not show age-related signs of oxidative stress. In contrast to plants with shorter life spans, this species has a great capacity to deal with the potential degenerative effects of ageing. This finding therefore demonstrates that age-induced oxidative stress is not a universal feature of ageing in plants. Given the much higher reproductive effort of females of this dioecious plant, their performance is of particular interest, because not only did they show no signs of physiological deterioration with age, but even demonstrate improved performance, as indicated by activation of photoprotection mechanisms. Individual response to severe experimental desiccation also suggests that the prevention of physiological deterioration with age may be related partly to the particular ecophysiology of the leaves of this species. The alternate use of meristems, a high degree of stress resistance, meristem dormancy and seasonality of growth may explain the extraordinary longevity of this small perennial geophyte.

Acknowledgements

We are very grateful to Toffa Evans for English corrections and Miquel Salicrú for his help in statistical analyses. The research conducted by S.M.-B's laboratory was supported through grants BFU2012-32057, BFU2009-07294 and BFU2009-06045, awarded by the Spanish Government, and an ICREA Academia award, funded by the *Generalitat de Catalunya*. M.B.G. was also supported by the Spanish National project CGL2010-21642 and the National Parks

Project 430/211. The Regional Government of Aragón allowed this study and granted the required permissions. We thank Miguel A. Saz for supplying the climatic data recorded at the closest meteorological station to the plant population in the Ordesa and Monte Perdido National Park. We are indebted to Laia Arrom and Jana Cela for their invaluable help during sampling.

References

- Abreu, M.E. & Munné-Bosch, S. (2009) Salicylic acid deficiency in *NahG* transgenic lines and *sid2* mutants increases seed yield in the annual plant *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, **60**, 1261–1271.
- Allen, C.D., Macalady, A.K., Chenchouni, H., Bachelet, D., McDowell, N., Vennetier, M. *et al.* (2009) Climate-induced forest mortality: a global overview of emerging risks. *Forest Ecology and Management*, **259**, 660–684.
- Ally, D., Ritland, K. & Otto, S.P. (2010) Aging in a long-lived clonal tree. *PLoS Biology*, **8**, e1000454.
- Arrom, L. & Munné-Bosch, S. (2012) Hormonal changes during flower development in floral tissues of *Lilium*. *Planta*, **236**, 343–354.
- Bowen, R.L. & Atwood, C.S. (2004) Living and dying for sex. A theory of ageing based on the modulation of cell cycle signaling by reproductive hormones. *Gerontology*, **50**, 265–290.
- Bray, E.A. (1997) Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*, **2**, 48–54.
- Buchanan-Wollaston, V., Earl, S., Harrison, E., Mathas, E., Navabpour, S., Page, T. & Pink, D. (2003) The molecular analysis of leaf senescence: a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal*, **1**, 3–22.
- Burger, O., Baudisch, A. & Vaupel, J.W. (2012) Human mortality improvement in evolutionary context. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, **109**, 18210–18214.
- Cela, J., Chang, C. & Munné-Bosch, S. (2011) Accumulation of γ - rather than α -tocopherol alters ethylene signaling gene expression in the *vtc4* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, **52**, 1389–1400.
- Dahlgren, J.P., García, M.B. & Ehrlén, J. (2011) Nonlinear relationships between vital rates and state variables in demographic models. *Ecology*, **92**, 1181–1187.
- Dall'Osto, L., Holt, N.E., Kaligotla, S., Fuciman, M., Cazzaniga, S., Carbonera, D., Frank, H.A., Alric, J. & Bassi, R. (2012) Zeaxanthin protects plant photosynthesis by modulating chlorophyll triplet yield in specific light-harvesting antenna subunits. *Journal of Biological Chemistry*, **287**, 41820–41834.
- Dhindsa, R., Plumb-Dhindsa, P. & Thorpe, T. (1981) Leaf senescence: Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*, **32**, 93–101.
- Finch, C. (1998) Variations in senescence and longevity include the possibility of negligible senescence. *Journal of Gerontology Biological Sciences*, **53A**, B235–B239.
- Franzese, J. & Ghermandi, L. (2011) Seed longevity and fire: germination responses of an exotic perennial herb in NW Patagonian grasslands (Argentina). *Plant Biology*, **13**, 865–871.
- García, M.B. & Antor, R.J. (1995a) Age and size structure in populations of a long-lived dioecious geophyte: *Borderea pyrenaica* (Dioscoreaceae). *International Journal of Plant Sciences*, **156**, 236–243.
- García, M.B. & Antor, R.J. (1995b) Sex ratio and sexual dimorphism in the dioecious *Borderea pyrenaica* (Dioscoreaceae). *Oecologia*, **101**, 59–67.
- García, M.B., Dahlgren, J.P. & Ehrlén, J. (2011) No evidence of senescence in a 300-year-old mountain herb. *Journal of Ecology*, **99**, 1424–1430.
- Harman, D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, **11**, 298–300.
- Hernández, I., Alegre, L. & Munné-Bosch, S. (2011) Plant aging and excess light enhance flava-3-ol content in *Cistus clusii*. *Journal of Plant Physiology*, **168**, 96–102.
- Herrera, C.M. & Jovani, R. (2010) Log-normal distribution of individual lifetime fecundity: insights from a 23-yr study. *Ecology*, **91**, 422–430.
- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F. & Prange, R.K. (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, **207**, 604–611.
- Larcher, W. (2003) *Physiological Plant Ecology*. Springer, Berlin.
- Lim, P.O. & Nam, H.G. (2005) The molecular and genetic control of leaf senescence and longevity in *Arabidopsis*. *Current Topics in Developmental Biology*, **67**, 49–83.
- Medawar, P.B. (1952) *An Unsolved Problem of Biology*. H.K. Lewis, London.

- Mencuccini, M., Martínez-Vilalta, J., Vanderklein, D., Hamid, H.A., Korakaki, E., Lee, S. & Michiels, B. (2005) Size mediated ageing reduces vigour in trees. *Ecology Letters*, **8**, 1183–1190.
- Munné-Bosch, S. (2007) Aging in perennials. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **26**, 123–138.
- Munné-Bosch, S. (2008) Do perennials really senesce? *Trends in Plant Science*, **13**, 216–220.
- Munné-Bosch, S. & Alegre, L. (2000) Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta*, **210**, 925–931.
- Munné-Bosch, S. & Alegre, L. (2002) Plant aging increases oxidative stress in chloroplasts. *Planta*, **214**, 608–615.
- Munné-Bosch, S. & Laluzza, 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., Queval, G. & Foyer, C.H. (2013) The impact of global change factors on redox signaling underpinning stress tolerance. *Plant Physiology*, **161**, 9–15.
- Noodén, L.D. & Leopold, A.C. (1988) *Senescence and Aging in Plants*. Academic Press, San Diego, CA.
- Olovnikov, A.M. (1973) A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *Journal of Theoretical Biology*, **41**, 181–190.
- Oñate, M., García, M.B. & Munné-Bosch, S. (2012) Age and sex-related changes in cytokinins, auxins and abscisic acid in a centenarian relict herbaceous perennial. *Planta*, **235**, 349–358.
- Oñate, M. & Munné-Bosch, S. (2009) Influence of plant maturity, shoot reproduction and sex on vegetative growth in the dioecious plant *Urtica dioica*. *Annals of Botany*, **104**, 945–956.
- Peñuelas, J. & Munné-Bosch, S. (2010) Potentially immortal? *New Phytologist*, **187**, 564–567.
- Picó, F.X. & Retana, J. (2008) Age-specific, density-dependent and environmental-based mortality of a short-lived perennial herb. *Plant Biology*, **10**, 374–381.
- Procházková, D. & Wilhelmová, N. (2007) Leaf senescence and activities of the antioxidant enzymes. *Biologia Plantarum*, **51**, 104–106.
- Ricklefs, R. (2008) The evolution of senescence from a comparative perspective. *Functional Ecology*, **22**, 379–392.
- Sánchez, E. & Alcántara, M. (2007) *Catálogo de Especies Amenazadas en Aragón. Flora. Letras Aragonesas*, Zaragoza.
- Silvertown, J., Franco, M. & Pérez-Ishiwara, R. (2001) Evolution of senescence in iteroparous perennial plants. *Evolutionary Ecology Research*, **3**, 393–412.
- Sohal, R. & Weindruch, R. (1996) Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*, **273**, 59–63.
- Sun, J., Shen, J., Cheng, Q., Jiang, W. & Liu, Q. (2012) Identification of senescence related protease in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit. *Nongye Gongcheng Xuebao/Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, **28**, 282–286.
- Thomas, H. (2002) Ageing in plants. *Mechanisms of Aging and Development*, **123**, 747–753.
- Thomas, H. (2013) Senescence, ageing and death of the whole plant. *New Phytologist*, **197**, 696–711.
- Van Kooten, O. & Snel, J.F.H. (1990) The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research*, **25**, 147–150.
- Vaupel, J.W., Baudisch, A., Dölling, M., Roach, D.A. & Gampe, J. (2004) The case for negative senescence. *Theoretical Population Biology*, **65**, 339–351.
- Watson, J.M. & Riha, K. (2010) Comparative biology of telomeres: where plants stand. *FEBS Letters*, **584**, 3752–3759.
- Watson, J.M. & Riha, K. (2011) Telomeres, aging, and plants: from weeds to Methuselah – a minireview. *Gerontology*, **57**, 129–136.
- Wingler, A., Purdy, S., MacLean, J.A. & Pourtau, N. (2006) The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 391–399.
- Wingler, A., Stangberg, E.J., Saxena, T. & Mistry, R. (2012) Interactions between temperature and sugars in the regulation of leaf senescence in the perennial herb *Arabidopsis thaliana* L. *Journal of Integrative Plant Biology*, **54**, 595–605.
- Zimmerman, P. & Zentgraf, U. (2005) The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cellular and Molecular Biology Letters*, **10**, 515–534.

Received 11 October 2012; accepted 6 February 2013

Handling Editor: Rob Salguero-Gómez

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. *Borderea pyrenaica* plants in the lab bench (A), with a detail of the scars used to age individuals (B), the size of a bulb (C), and plants growing in the Central Pyrenees (D).

Figure S2. Climatological conditions during the 3 years of samplings (2008, 2010 and 2011) at Pineta valley, including monthly precipitation and monthly mean air temperature.

Figure S3. Levels of the xanthophyll cycle pool (VZA) and zeaxanthin (Z), and de-epoxidation state of the xanthophyll cycle (DPS) in leaves of juvenile plants (*orange circles*), males (*brown circles*) and females (*blue triangles*) in three independent samplings performed during July 2008, July 2010 and July 2011.

Figure S4. Levels of lutein, β -carotene, γ -tocopherol and α -tocopherol per unit of chlorophyll in leaves of juvenile plants (*orange circles*), males (*brown circles*) and females (*blue triangles*) in three independent samplings performed during July 2008, July 2010 and July 2011.

Table S1. Relative water content (RWC) of leaves of juvenile plants, males and females during the 3 years of samplings (2008, 2010 and 2011) at Pineta valley. Data represent the mean \pm SE and the number of individuals analyzed (*n*).

Supporting Information

Photo-oxidative stress markers reveal absence of physiological deterioration with ageing in *Borderea pyrenaica*: an extraordinarily long-lived herb

Melanie Morales, Marta Oñate, María Begoña García, Sergi Munné Bosch

Table S1. Relative water content (RWC) of leaves of juvenile plants, males and females during the three years of samplings (2008, 2010 and 2011) at Pineta valley. Data represent the mean \pm SE and the number of individuals analyzed (n).

Group	2008	2010	2011
Juveniles	78.3 \pm 4.3 n=4	70.7 \pm 3.4 n=13	89.0 \pm 5.8 n=16
Males	82.5 \pm 1.9 n=24	80.1 \pm 2.1 n=36	77.2 \pm 3.7 n=18
Females	80.9 \pm 1.5 n=28	76.0 \pm 2.3 n=31	77.8 \pm 3.6 n=16

Figure S1. *Borderea pyrenaica* plants in the lab bench (A), with a detail of the scars used to age individuals (B), the size of a tuber (C), and plants growing in the Central Pyrenees (D).

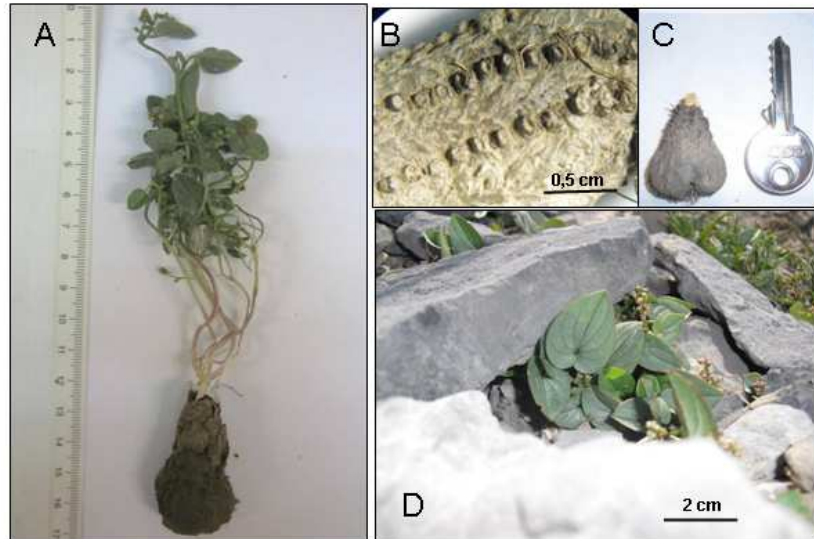


Figure S2. Climatological conditions during the three years of samplings (2008, 2010 and 2011) at Pineta valley, including monthly precipitation and monthly mean air temperature.

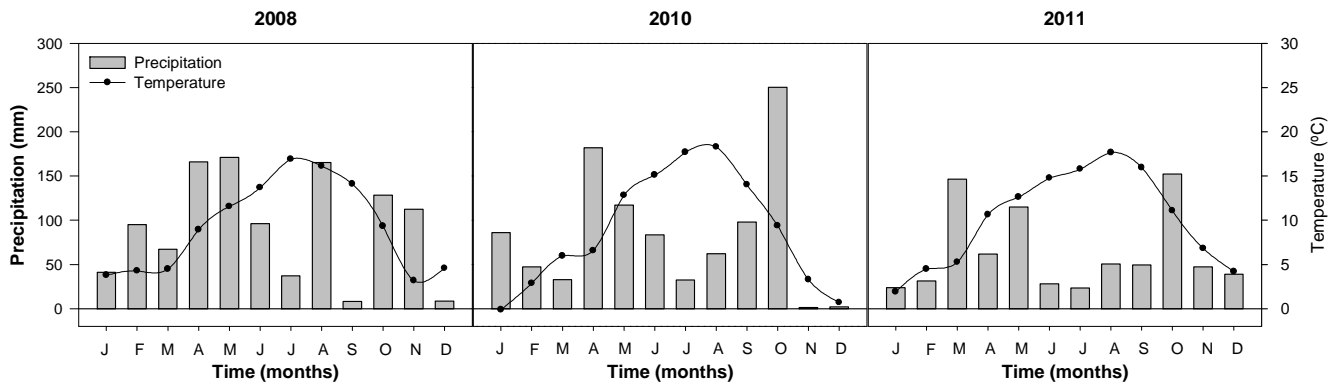


Figure S3. Levels of the xanthophyll cycle pool (VZA) and zeaxanthin (Z), and de-epoxidation state of the xanthophyll cycle (DPS) in leaves of juvenile plants (*orange circles*), males (*brown circles*) and females (*blue triangles*) in three independent samplings performed during July 2010 and July 2011. The different parameters were correlated with plant age by Spearman's rank correlation. $P < 0.05$ are considered significant and are given in the insets. A, antheraxanthin; V, violaxanthin; Z, zeaxanthin; $DPS = ([Z+A]/[V+Z+A])$.

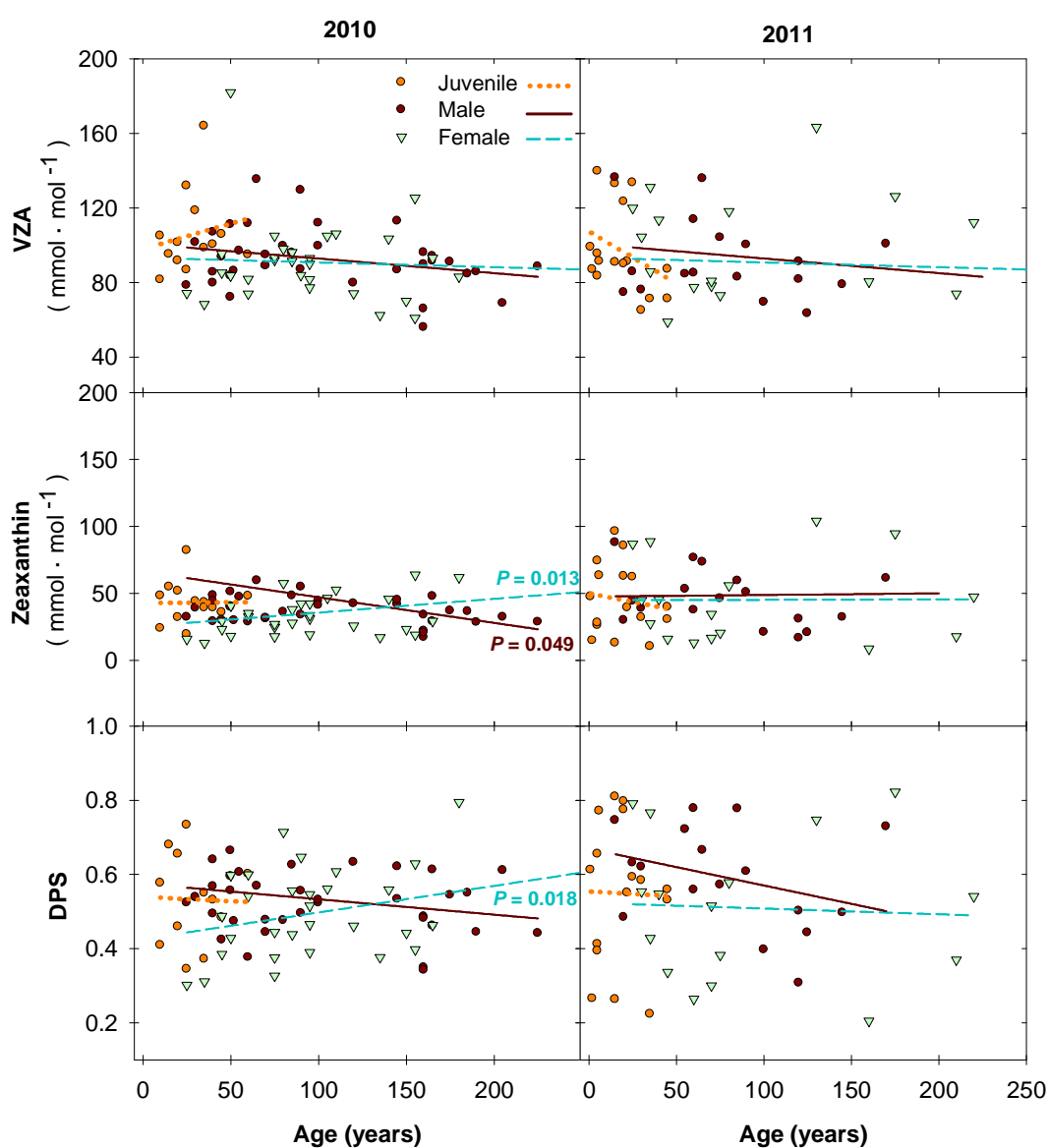
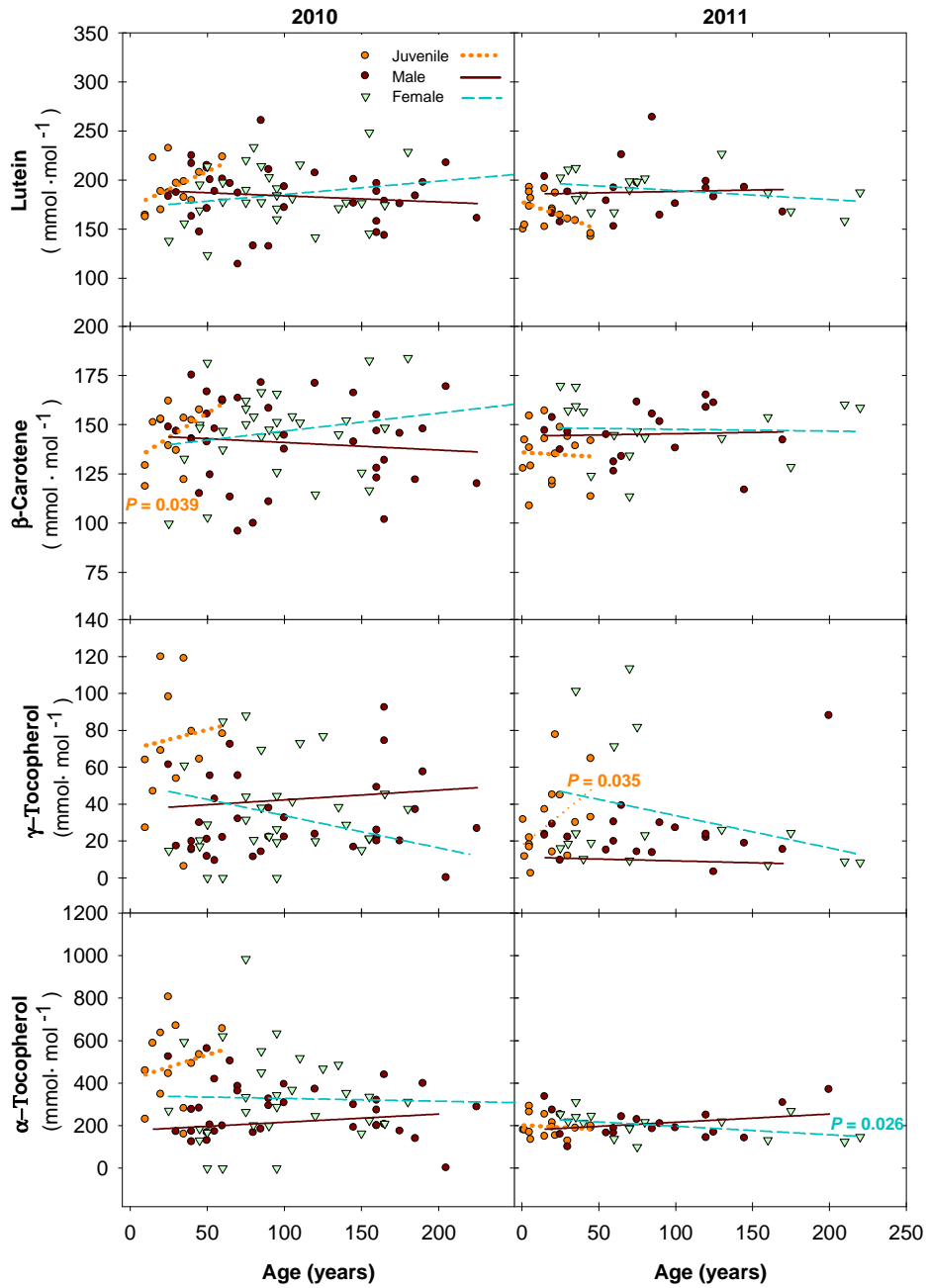


Figure S4. Levels of lutein, β -carotene, γ -tocopherol and α -tocopherol per unit of chlorophyll in leaves of juvenile plants (*orange circles*), males (*brown circles*) and females (*blue triangles*) in three independent samplings performed during July 2010 and July 2011. The different parameters were correlated with plant age by Spearman's rank correlation but none were significant.



CAPÍTOL 2

El secret de la llarga vida es troba en l'òrgan subterrani



CHAPTER 2

Secret of long life lies underground

Melanie Morales, Sergi Munné-Bosch

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

Publicat a **New Phytologist** 2015, 205: 463–467

RESUM DEL CAPÍTOL 2

En aquest treball vam escollir com a model d'estudi *Borderea pyrenaica*, una planta perenne de gran longevitat per tal d'investigar sobre la teoria dels radicals lliures associada a l'envelliment. Considerant els estudis previs realitzats amb aquesta espècie, en els quals no es van trobar signes d'estrès oxidatiu en fulles amb l'increment de l'edat de l'individu, i fins i tot, es va observar que les plantes centenàries, particularment les femelles, presentaven una millora del rendiment fisiològic amb l'edat, fenomen conegut com a senescència negativa, es van continuar els estudis focalitzant-nos en l'òrgan perenne subterrani de l'organisme, el tubercle. En primer lloc, es va observar que els paràmetres mesurats sobre la biomassa i la hidratació del tubercle augmentaven amb l'edat de l'individu, a més del contingut en carboni, suggerint que les plantes creixen contínuament a taxes molt lentes com a estratègia per prevenir la senescència. Respecte els marcadors d'estrès oxidatiu analitzats, tant l'àcid malondialdehid com l'àcid jasmònic isoleucina disminuïen amb l'edat de l'organisme, a la vegada que es correlacionaren negativament amb els nivells de vitamina E representats per l' α -tocoferol, el qual incrementava significativament amb l'edat. L'augment de l' α -tocoferol podria explicar l'absència de signes d'estrès oxidatiu amb l'edat de l'organisme, demostrant una vegada més en aquesta espècie que la teoria dels radicals lliures associada a l'envelliment en plantes perennes no es compleix. Aquest estudi dóna suport a la idea que aquesta espècie mostra senescència negativa i suggereix que la mortalitat dels individus poden explicar-se per altres factors diferents a l'envelliment.

Letter

Secret of long life lies underground

Introduction

Nowadays, it is generally accepted that a daily dietary intake of antioxidants (AOXs) is beneficial to combat the potential damaging effects of an age-related increased production of reactive-oxygen species (ROS), such as superoxide anion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radicals (OH^-) and singlet oxygen (1O_2). AOXs consumed at adequate doses with fruits and vegetables represent an important weapon against oxidative stress-related degenerative processes associated with ageing (Pallauf *et al.*, 2013). This has mainly resulted from almost six decades of progress since Harman (1956) proposed the free-radical theory of ageing. This theory postulated that senescence (i.e. the physiological deterioration with ageing) in humans is the result of the accumulation of alterations induced by free radicals within the cell. The theory also explained the age-related increased sensitivity to diseases associated with oxidative stress, such as cardiovascular disease, cancer, chronic inflammation and neurological disorders. In mammals, age-associated cell disorders are believed to be connected to the time-dependent shift in the pro-oxidant/antioxidant balance in favour of oxidative stress, caused either by an increase in the production of free radicals or a depletion of AOX defences. Furthermore, it seems that age-associated changes in the pro-oxidant/antioxidant balance are small early in life but rapidly increase with age because of the exponential nature of the process (Harman, 1981). More recently, as an extension of this theory, the role of ROS in metabolic programming of the human genome and epigenome has been demonstrated; there has been a dramatic paradigm shift in the medical literature that has replaced the concept of 'oxidative damage' with the recognition (driven by the field of nutrigenomics) of metabolic programming via redox-signalling networks that are strongly modulated by dietary AOXs (Poljsak & Milisav, 2012). But, what happens in plants? Can the free-radical theory of ageing be applied to explain senescence in plants? Are AOXs playing a key role in ageing processes at the whole-plant (organism) level?

The role of metabolic programming via redox-signalling networks in the senescence of annual plants, such as the model plant *Arabidopsis thaliana*, has been extensively documented and can now be explained in detail at the physiological, biochemical and molecular levels (Dangl *et al.*, 2000; Juvany *et al.*, 2013). Beyond this model plant, the role of redox programming during senescence in other monocarpic plants such as rice, barley or wheat is also well understood, and it has generally been found that oxidative stress increases as senescence progresses at the organ level. Since

senescence in leaves occurs concomitantly with senescence at the organism level when reproduction occurs, oxidative stress is linked to whole-plant senescence in monocarpic plants. But, what happens in polycarpic (iteroparous) plants, in which reproduction occurs more than once during the plant's life cycle? In this respect, Munné-Bosch & Alegre (2002) showed that photoinhibitory inactivation occurred concomitantly with a shift in the cellular redox balance towards the oxidative side as plants aged in a Mediterranean shrub (*Cistus clusii*), as indicated by enhanced lipid peroxidation and reduced tocopherol (vitamin E) levels. The authors argued that, in addition to the age-induced stomatal limitation of photosynthesis, age-related oxidative stress in chloroplasts may result in a down-regulation of photosystem II photochemistry. It is interesting to note, however, that age-induced differences in these oxidative stress markers particularly occurred during spring and summer, when plants were simultaneously exposed to high light stress and drought under Mediterranean climate, which might lead to excess excitation energy in chloroplasts, and therefore to the formation of ROS (Munné-Bosch & Lalueza, 2007). What happens, however, in long-lived perennials? Can the free radical theory of ageing also be applied to centenarian plants?

Recent studies in *Borderea pyrenaica*, a geophyte relict from the Tertiary living in the Central Pyrenees (Spain), have shown that this species does not show symptoms of a shifted cellular redox balance towards the oxidative side in leaves with increasing age. To the contrary, centenarian individuals, particularly female plants, can even show improved physiological performance with ageing (a phenomenon known as 'negative senescence', Morales *et al.*, 2013). More particularly, the study showed no changes in photosystem II efficiency and lipid peroxidation levels in leaves with increasing age, but centenarian females exhibited improved photosystem II efficiency and pigment levels compared with males of the same age and juveniles when challenged with a simulated severe desiccation. Since this plant species develops new leaves every spring, these results indicate that meristems maintain the capacity to make 'healthy' leaves with ageing and that time does not inflict any damage on centenarian plants. But, what happens with the tuber, the unique plant's perennial organ? *Borderea pyrenaica* keeps the tuber intact over the years, while all aboveground tissues are regenerated every year. Here, we report on new data about the AOX capacity of tubers, and most particularly the extent to which lipid peroxidation can change with ageing in a long-lived perennial.

Continuous growth at very low rates can help prevent senescence

Plants grow continuously until they reach a maximum size, after which senescence at the whole-plant level can occur (Thomas,

2013). This senescence is manifested by reductions in relative leaf growth and photosynthetic rates, reductions in reproductive fitness and increased mortality with ageing. In a series of grafting experiments aimed at separating the effects of plant size from those of ageing *per se*, Mencuccini *et al.* (2005, 2014) have however found that plant size, rather than meristem ageing, is a major factor triggering reduced growth and photosynthetic rates as trees age. Similarly, other studies have shown that increased plant size can trigger a physiological deterioration (in terms of increased photo-oxidative stress or reduced seed viability) with ageing in shrubs (Oñate & Munné-Bosch, 2008; Müller *et al.*, 2014). Therefore, reduced size appears to prevent senescence (physiological deterioration with ageing) in natural conditions (Müller *et al.*, 2014).

Borderea pyrenaica plants of different ages (ranging between 1 and 170 yr; age was estimated by counting yearly scars left in the tuber) were sampled during spring (June) and summer (September) 2013 in a natural population from the Central Pyrenees. The population studied was located in the Pineta valley (42°41'N, 0°06'E, 2000 m above sea level), where several thousand individuals grow in high densities on a north-facing rocky hillside (for details, see Morales *et al.*, 2013). During spring (June), shoots emerge from the tuber to produce new leaves, so plants are under active vegetative growth. During summer (particularly during late August and early September) mature plants develop flowers and

females additionally produce fruits and seeds. Since this species is dioecious, males and females can be differentiated once they reach the mature stage (20–30 yr-old plants). Age-related effects on the physiological performance of tubers were examined separately in individuals sampled in spring and summer, considering tuber biomass (FW), hydration (fresh weight – dry weight)/dry weight) and carbon (C) and nitrogen (N) concentrations (% on a dry matter basis) using an elemental analyser (Thermo EA 1108; Thermo Scientific, Milan, Italy).

Tuber biomass and hydration increased with plant age, which was evident in individuals sampled either during spring or summer (Fig. 1). Therefore, results indicate that tubers are getting larger and more hydrated up to the plant's maximal age (170 yr) investigated in the present study. Carbon concentrations also increased with plant age, but this was seen only in individuals sampled in spring, while N concentrations decreased with plant age both during spring and summer, leading to increases in the C:N ratio in tubers with ageing (Fig. 1). Therefore, plants grew continuously up to 170 yr, accumulating more water in their tubers. By contrast, N concentrations decreased, which might be associated, at least in part, with an increased reproductive effort in mature compared with juvenile plants. It is interesting to note that plants did not stop growing underground, which is why senescence is not expected to occur. While tubers do not stop growing up to 170 yr, maximal aboveground biomass is attained at *c.* 100 yr in this plant species

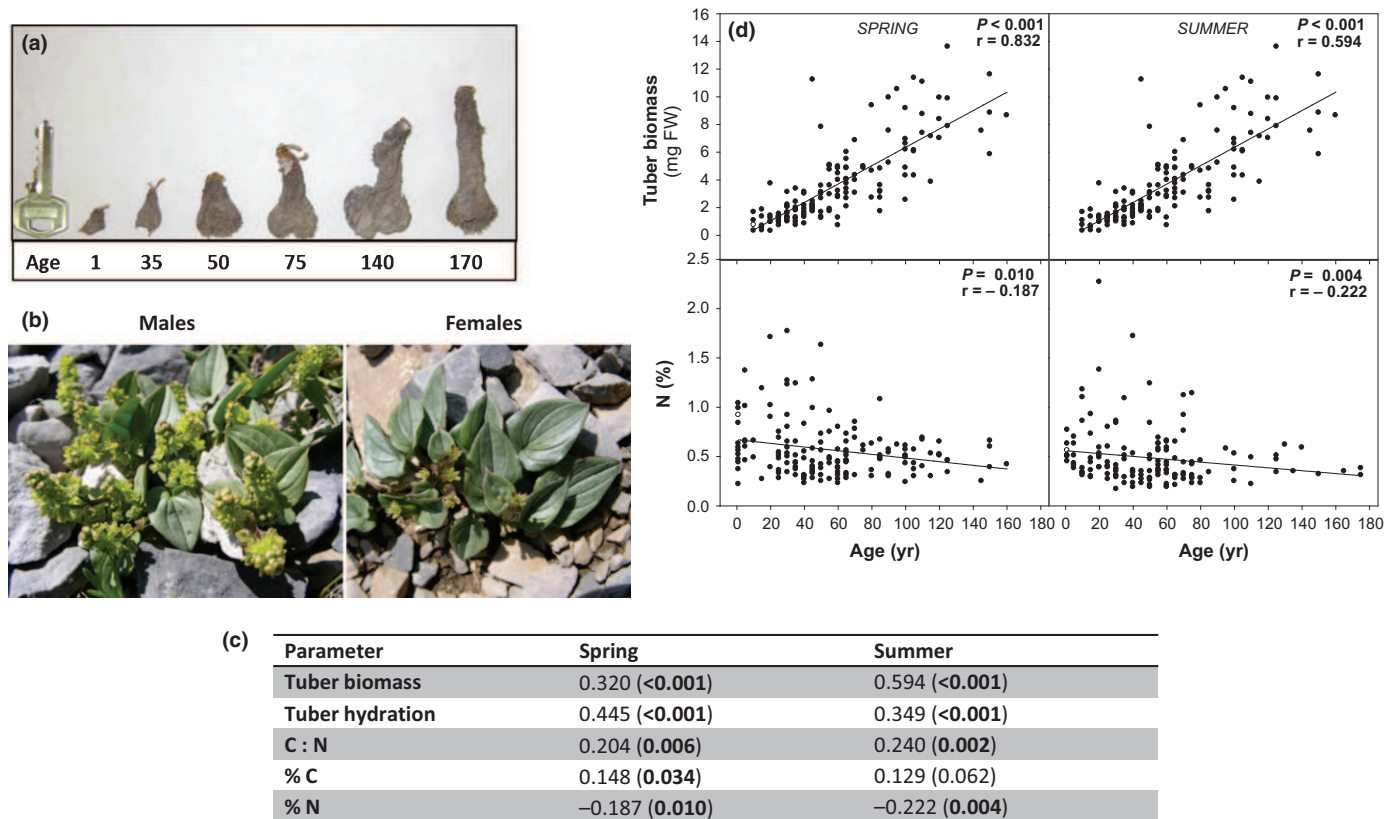


Fig. 1 *Borderea pyrenaica* grows at low rates but continuously with ageing, increasing tuber biomass, water and carbon (C) concentrations, while nitrogen (N) concentrations are reduced. (a) Tuber development with age. (b) Detail of male and female plants. (c) Correlation coefficients and *P*-values of the Spearman correlations between plant age, tuber biomass, hydration, C:N ratios, and C and N concentrations in plants collected during spring and summer in the Central Pyrenees (northeast Spain). The *P*-values below 0.05 are bold. (d) Detail of the correlation between plant age, tuber biomass and N concentrations.

(García *et al.*, 2011). These results demonstrate the importance of assessing the physiological attributes of perennial organs, such as tubers, in studies of senescence in long-lived perennials. In conclusion, very slow but continuous growth – possibly together with an overall small size – may be responsible for this extraordinary species' longevity.

Redox balance in tubers with ageing

It has previously been shown that leaves from the oldest *Cistus clusii* plants can show a shifted redox balance toward the oxidative side during periods of excess excitation energy, such as a combination of high light and drought conditions (Munné-Bosch & Lalueza, 2007). However, plants from different age groups investigated in that study were very different in size, making it difficult to distinguish between age and size effects. In *Borderea pyrenaica*, in which the effects of size are reduced, no correlation between leaf photo-oxidative stress markers and plant age was observed in a field study performed during 2008, 2010 and 2011 (Morales *et al.*, 2013). Therefore, we hypothesized that tubers of *B. pyrenaica* may not experience an altered cellular redox balance with ageing, either.

To test this idea, we punched sections (1 cm diameter) from the central parts of the tubers of plants aged between 1 and 170 yr collected during spring and summer 2013, and measured the extent of lipid peroxidation and vitamin E levels. Lipid peroxidation was estimated by measuring malondialdehyde (MDA) levels by the TBARS assay (Hodges *et al.*, 1999) and jasmonate levels, including levels of octophytodieneic acid (OPDA), jasmonic acid (JA) and jasmonic acid isoleucine (JA-Ile) by ultra high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) (Balcke *et al.*, 2012). Vitamin E levels were measured by HPLC (Cela *et al.*, 2011). Among the tocopherol and tocotrienol (vitamin E forms) tested, only α -tocopherol was found in tubers. However, the latter was present at high amounts and its levels in tubers increased with ageing (Fig. 2). α -Tocopherol is considered to be the most active vitamin E form in plants and, in addition to (physically) quenching and (chemically) scavenging singlet oxygen and other ROS in plastids, it is unique in its role in inhibiting the propagation of lipid peroxidation from membranes (Halliwell & Gutteridge, 1999; Maeda *et al.*, 2005; Fig. 2). Interestingly, MDA levels decreased as a function of age in tubers (Fig. 2), showing a negative correlation with vitamin E levels ($r = -0.165$, $P = 0.036$).

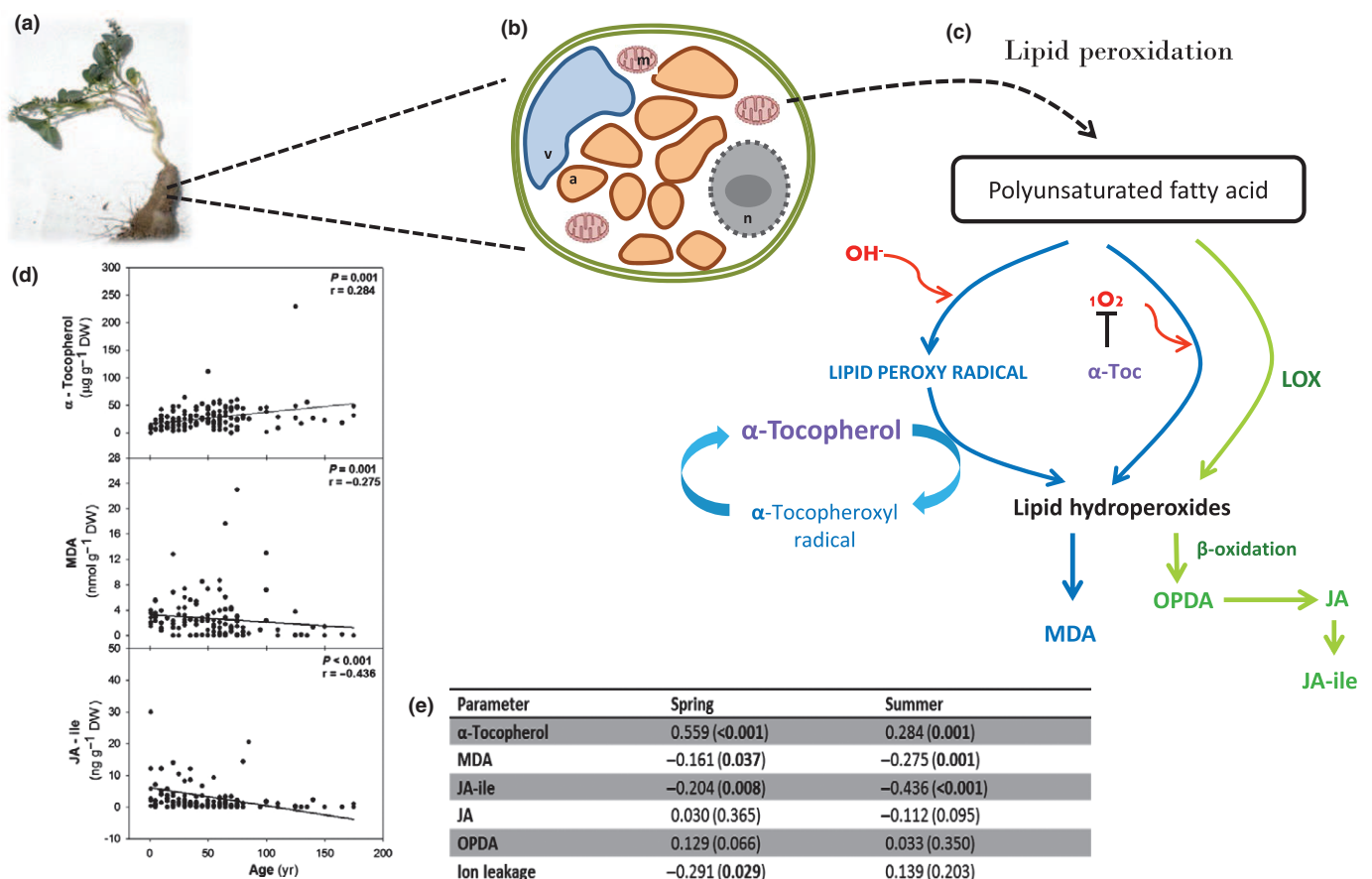


Fig. 2 Correlative evidence suggests increased antioxidant protection in tubers with ageing. (a) Detail of *Borderea pyrenaica*. (b) Diagram of a tuber cell (a, amyloplast; m, mitochondrion; n, nucleus; v, vacuole). (c) Lipid peroxidation and scavenging of lipid peroxy radicals by α -tocopherol in tuber amyloplasts, preventing the propagation of lipid peroxidation. Malondialdehyde (MDA) and jasmonates (OPDA, octophytodieneic acid; JA, jasmonic acid and JA-Ile, jasmonic acid isoleucine) are produced as a result of lipid peroxidation. (d) Detail of the correlation between α -tocopherol, MDA and JA-Ile with plant age during the summer. (e) Correlation coefficients and P -values of the Spearman correlations between α -tocopherol, MDA, OPDA, JA, JA-Ile and ion leakage with plant age in *B. pyrenaica* plants collected during spring and summer in the Central Pyrenees (northeast Spain). The P -values below 0.05 are bold. LOX, lipoxygenase.

Furthermore, JA-Ile levels also decreased with age (Fig. 2), thus also exhibiting a negative correlation with vitamin E levels ($r = -0.153$, $P = 0.040$). It is interesting to note that neither JA nor OPDA, JA's immediate precursor, changed with ageing, thereby indicating that the enzyme converting JA to JA-Ile, putatively a JAR1 ortholog (Staswick & Tiryaki, 2004), may be specifically up-regulated in tubers of juvenile and young mature plants, but not in the older mature ones. JA-Ile has been shown to be the most active jasmonate in the model plant *A. thaliana*, being synthesized when tissues are challenged by insect attack or by herbivores (Fonseca *et al.*, 2009; Davies, 2010). It is therefore tempting to speculate that *B. pyrenaica* plants will be less sensitive to biotic stresses with ageing.

Living underground through evolutionary times

Borderea pyrenaica is a paleoendemic plant species, a tropical relict from the Tertiary (García *et al.*, 1995). A subterranean tuber with a strong root system allows the plant to remain anchored to the soil below lime stones of screes of the Central Pyrenees. As shown in the present study this tuber contains high amounts of vitamin E, which may protect lipids from free radical attack and lower the levels of lipid peroxidation. This, together with the capacity to grow slowly, but continuously, presumably helps to prevent senescence at the organism level. Reduced growth and high longevity (compared with other herbs) make this geophyte unique within the tree of life, and at least partially explain the evolutionary success of *B. pyrenaica* from the Tertiary to date. This success involves surviving changes in climatic conditions, presumably by being somewhat protected underground. The present study further supports the notion that this plant species shows negative senescence and that its mortality may be explained by factors different from ageing. Indeed, compared with other plants, *B. pyrenaica* is unique in its patterns of ageing and mortality (Jones *et al.*, 2014). Here, we provide evidence that this plant species has unique physiological features that underlie its distinctive demographic traits, and that the secret to its long life may lie underground.

Acknowledgements

The authors are very grateful to Andreas M. Fischer (Montana State University, Bozeman, MT, USA) for a critical reading of the manuscript. The authors are also indebted to Maren Müller and Serveis Científic-tècnics from the University of Barcelona for their help with jasmonate analyses. The authors are very thankful to the Aragon Government for granting permissions and María B. García (Instituto Pirenaico de Ecología) for her invaluable help in studying this species during the last years. This work was financed by the Spanish Government (project no. BFU2012-32057).

Melanie Morales and Sergi Munné-Bosch*

Department of Plant Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Avinguda Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain
(*Author for correspondence: tel +34 934021463; email smunne@ub.edu)

References

- Balcke GR, Handrick V, Bergau N, Fichtner M, Henning A, Stellmach H, Tissier A, Hause B, Frolov A. 2012. An UPLC-MS/MS method for highly sensitive high-throughput analysis of phytohormones in plant tissues. *Plant Methods* 8: 47.
- 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.
- Dangl JL, Dietrich RA, Thomas H. 2000. Senescence and programmed cell death. In: Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL, eds. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, MD, USA: ASPP, 1044–1100.
- Davies PJ. 2010. *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!* Dordrecht, the Netherlands: Springer.
- Fonseca S, Chini A, Hamberg M, Adie B, Porzel A, Kramell R, Miersch O, Wasternack C, Solano R. 2009. (*)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology* 5: 344–350.
- García MB, Antor RJ, Espadaler X. 1995. Ant pollination of the palaeoendemic dioecious *Borderea pyrenaica* (Dioscoreaceae). *Plant Systematics and Evolution* 198: 17–27.
- García MB, Dahlgren JP, Ehrlén J. 2011. No evidence of senescence in a 300-year-old mountain herb. *Journal of Ecology* 99: 1424–1430.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Harman D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology* 11: 298–300.
- Harman D. 1981. The aging process. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 78: 7123–7128.
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, 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.
- Jones OR, Scheuerlein A, Salguero-Gómez R, Camarda CG, Schaible R, Casper BB, Dahlgren JP, Ehrlén J, García MB, Menges E *et al.* 2014. Diversity of aging across the tree of life. *Nature* 505: 169–173.
- Juvany M, Müller M, Munné-Bosch S. 2013. Photo-oxidative stress in emerging and senescing leaves: a mirror image? *Journal of Experimental Botany* 64: 3087–3098.
- Maeda H, Sakuragi Y, Bryant DA, DellaPenna D. 2005. Tocopherols protect *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 from lipid peroxidation. *Plant Physiology* 138: 1422–1435.
- Mencuccini M, Martínez-Vilalta J, Vanderklein D, Hamid HA, Korakaki E, Lee S, Michiels B. 2005. Size-mediated ageing reduces vigour in trees. *Ecology Letters* 8: 1183–1190.
- Mencuccini M, Oñate M, Rico L, Peñuelas J, Munné-Bosch S. 2014. No signs of meristem senescence in old Scots pine. *Journal of Ecology* 102: 555–565.
- Morales M, García MB, Munné-Bosch S. 2013. Photo-oxidative stress markers reveal absence of physiological deterioration with ageing in *Borderea pyrenaica*, an extraordinarily long-lived herb. *Journal of Ecology* 101: 555–565.
- 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 and viability. *Journal of Experimental Botany* 65: 287–297.
- Munné-Bosch S, Alegre L. 2002. Plant aging increases oxidative stress in chloroplasts. *Planta* 214: 608–615.
- 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.
- Oñate M, Munné-Bosch S. 2008. Meristem aging is not responsible for age-related changes in growth and abscisic acid levels in the Mediterranean shrub, *Cistus clusii*. *Plant Biology* 10: 148–155.

Pallauf K, Giller K, Huebbe P, Rimbach G. 2013. Nutrition and healthy ageing: calorie restriction or polyphenol-rich "MediterrAsian" diet? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013: 707421.

Poljsak B, Milisav I. 2012. The neglected significance of "antioxidative stress". *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012: 480895.

Staswick PE, Tiryaki I. 2004. Theoxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 2117–2127.

Thomas H. 2013. Senescence, ageing and death of the whole plant. *New Phytologist* 197: 696–711.

Key words: antioxidants, jasmonates, longevity, long-lived perennials, perennial organs, senescence.

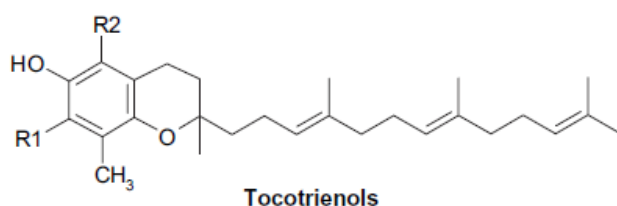


About New Phytologist

- *New Phytologist* is an electronic (online-only) journal owned by the New Phytologist Trust, a **not-for-profit organization** dedicated to the promotion of plant science, facilitating projects from symposia to free access for our Tansley reviews.
- Regular papers, Letters, Research reviews, Rapid reports and both Modelling/Theory and Methods papers are encouraged. We are committed to rapid processing, from online submission through to publication 'as ready' via *Early View* – our average time to decision is <25 days. There are **no page or colour charges** and a PDF version will be provided for each article.
- The journal is available online at Wiley Online Library. Visit www.newphytologist.com to search the articles and register for table of contents email alerts.
- If you have any questions, do get in touch with Central Office (np-centraloffice@lancaster.ac.uk) or, if it is more convenient, our USA Office (np-usaoffice@lancaster.ac.uk)
- For submission instructions, subscription and all the latest information visit www.newphytologist.com

CAPÍTOL 3

Tocotrienols en fulles de *Vellozia gigantea*: ocurrència i modulació per efectes estacionals i el tamany de la planta



CHAPTER 3

Tocotrienols in *Vellozia gigantea* leaves: occurrence and modulation by seasonal and plant size effects

Melanie Morales¹, Queila S. García², Advanio I. Siqueira-Silva²,

Mayara C. Silva², Sergi Munné-Bosch¹

¹Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain

²Laboratório de Fisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), CP 486, Belo Horizonte CEP 31270-970, MG, Brazil

Publicat a **Planta** (2014) 240: 437–446

RESUM DEL CAPÍTOL 3

La vitamina E es produeix en tots els organismes fotosintètics examinats fins a l'actualitat. Els tocoferols predominen en els teixits fotosintètics (sent l' α -tocoferol la forma principal), mentre tant els tocoferols com els tocotrienols estan presents en les llavors. Els tocotrienols no han estat descrits en teixits fotosintètics fins al moment. En aquest treball es presenta la presència de tocotrienols en fulles de plantes superiors. Ambdós tocoferols i tocotrienols s'acumulen en les fulles de *Vellozia gigantea*, una planta endèmica que es troba en els *campos rupestres* de la *Serra do Cipó*, Brasil. L'augment del tamany de la planta va tenir un efecte notable sobre la composició de vitamina E de les fulles, sent els nivells d' α -tocoferol i de β -tocotrienol més alts en els individus més grans, però només durant l'estació seca. Els nivells de vitamina E van ser positivament correlacionats amb els nivells d'hidroperòxids lipídics, els quals també augmenten en els individus més grans durant l'estació seca. No obstant això, la màxima eficiència fotoquímica del PSII (relació F_v/F_m) es manté per sobre de 0.75 durant tot l'experiment, el que indica absència de dany fotoinhibitori de l'aparell fotosintètic. Es conclou que les plantes superiors, com ara *V. gigantea*, poden acumular tocotrienols en les fulles, a part de tocoferols, i que els nivells d'ambdós tocoferols i tocotrienols en les fulles d'aquesta espècie estan fortament modulats per efectes estacionals i el tamany de la planta.

Tocotrienols in *Vellozia gigantea* leaves: occurrence and modulation by seasonal and plant size effects

Melanie Morales · Queila S. Garcia ·
Advanio I. Siqueira-Silva · Mayara C. Silva ·
Sergi Munné-Bosch

Received: 17 February 2014 / Accepted: 21 May 2014 / Published online: 15 June 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Vitamin E occurs in all photosynthetic organisms examined to date. Tocopherols predominate in photosynthetic tissues (α -tocopherol being the major form), while either tocopherols or tocotrienols (or both) are present in seeds. Tocotrienols have not been described in photosynthetic tissues thus far. Here, we report on the presence of tocotrienols in leaves of higher plants. Both tocopherols and tocotrienols accumulated in leaves of *Vellozia gigantea*, an endemic plant found in the rupestrian fields of Serra do Cipó, Brazil. Increased plant size had a remarkable effect on the vitamin E composition of leaves, α -tocopherol and β -tocotrienol levels being highest in the largest individuals, but only during the dry season. Vitamin E levels positively correlated with lipid hydroperoxide levels, which also increased in the largest individuals during the dry season. However, the maximum efficiency of PSII photochemistry (F_v/F_m ratio) kept above 0.75 throughout the experiment, thus indicating absence of photoinhibitory damage to the photosynthetic apparatus. It is concluded that higher plants, such as *V. gigantea*, can accumulate tocotrienols in leaves, aside from tocopherols, and that the levels of both

tocopherols and tocotrienols in the leaves of this species are strongly modulated by seasonal and plant size effects.

Keywords Endemic plants · Plant size · Stress resistance · Tocopherols · Tocotrienols · Vitamin E · Water deficit

Abbreviations

F_v/F_m ratio	Maximum efficiency of photosystem II photochemistry
HPLC	High performance liquid chromatography
LC	Liquid chromatography
LMA	Leaf mass per area ratio
MS	Mass spectrometry
PSII	Photosystem II
ROS	Reactive oxygen species
RWC	Relative water content

Introduction

Tocopherols and tocotrienols are lipid-soluble molecules represented by four different forms (α , β , γ and δ) that belong to the vitamin E group of compounds. Tocopherols play an essential role as antioxidants in humans, animals and photosynthetic organisms, and are also believed to play a role in the modulation of signal transduction and gene expression [reviewed by Galli and Azzi (2010), Husain et al. (2013)]. However, very little is comparatively known about the function of tocotrienols [reviewed by Falk and Munné-Bosch (2010), Tan et al. (2012)]. Tocopherols and tocotrienols are synthesized only by plants and other photosynthetic organisms in plastids (Yang et al. 2011; Lu et al. 2013). While tocopherols (particularly α -tocopherol) are the major vitamin E form found in green parts of plants,

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00425-014-2104-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. Morales · S. Munné-Bosch (✉)
Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia,
Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 643,
08028 Barcelona, Spain
e-mail: smunne@ub.edu

Q. S. Garcia · A. I. Siqueira-Silva · M. C. Silva
Laboratório de Fisiologia Vegetal, Departamento de Botânica,
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), CP 486, Belo
Horizonte CEP 31270-970, MG, Brazil

tocotrienols are only present in seeds. However, tocotrienols are the primary form of vitamin E in seeds of most monocot plants, including cereals such as rice and wheat, and a limited number of dicots [reviewed by Falk and Munné-Bosch (2010)]. Tocotrienols can account for >50 % of the total vitamin E in the seed endosperm of several monocots (Padley et al. 1994) and even completely substitute tocopherols in seeds of several species of the palm family (Siles et al. 2013). Although tocotrienols have been found in coleoptiles of *Triticum aestivum* (Horvath et al. 2006), they have still not been found to occur naturally in leaves of any species. This is why the function of tocotrienols in leaves have only been investigated to date through the use of transgenic plants over-expressing homogentisate geranylgeranyltransferase, which catalyzes a key step in tocotrienol biosynthesis (Matringe et al. 2008). This study showed that tocotrienols can substitute the antioxidant function of tocopherols in leaves of tobacco transgenic lines.

The aim of the present study was to get new insights into the vitamin E composition, including both tocopherols and tocotrienols, in leaves of *Vellozia gigantea* (Velloziaceae), an endemic and perennial arborescent species of the rupestrian fields of Brazil. Since both tocopherols and tocotrienols were found to be present in leaves, we further evaluated the influence of seasonal and plant size effects on the accumulation of these antioxidants in the leaves of this species.

Materials and methods

Species studied and sampling site

The study was conducted using leaves of *Vellozia gigantea* N. L. Menezes and Mello-Silva (Velloziaceae), an endemic monocot of the rupestrian fields of Brazil. *V. gigantea* can be included in the group of *Vellozia* species with dracenoïd habits being an arborescent species. The population of *V. gigantea* studied was located in the rupestrian fields of National Park of Serra do Cipó, in southeastern Brazil (19°12'–19°20'S, 43°30'–43°40'W). The region is characterized by quartzitic mountains with altitudes varying between 1,000 and 1,400 m, reaching 1,800 m in certain areas (Menezes and Giulietti 1986). This region has a mesothermic climate with well-defined dry (autumn–winter) and rainy (spring–summer) seasons. The annual medium temperatures oscillate between 17 and 18.5 °C; the maximum precipitation between 1,450 and 1,800 mm, with an annual potential evapotranspiration from 700 to 850 mm. Environmental conditions were monitored during the study with a weather station situated on the same elevation at 24.7 km from the experimental plot (Estação Meteorológica de Conceição do Mato Dentro, Minas Gerais, Brazil, Fig. 1).

Sampling design

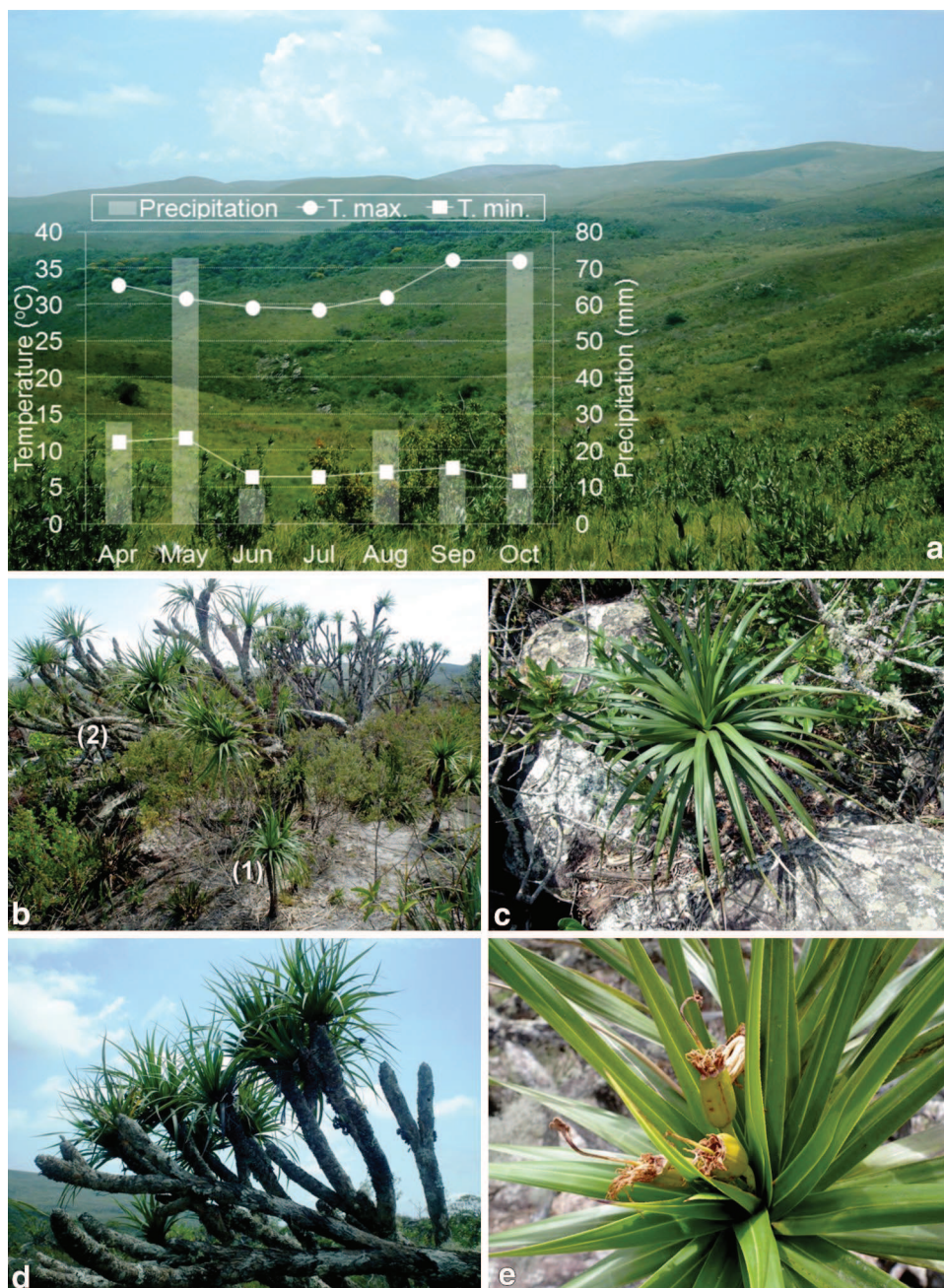
The ecophysiological response of two groups of plants of different size growing in the same location was evaluated. The vitamin E composition together with a number of physiological stress markers (leaf water contents, stomatal conductance, chlorophyll fluorescence, and pigment and lipid peroxidation levels) was measured once a month from April to October 2012. Fully expanded young leaves, which were randomly selected within individuals, of two cohorts were used for experiments. Plants of both cohorts were growing under exactly the same climatic conditions, with individuals of each cohort mixed and randomly distributed among the population. Cohort I was represented by mature individuals with a height of 1–1.5 m, while cohort II was represented by mature individuals with a height between 3 and 4 m (Fig. 1).

In all cases, leaf samples were separately taken from at least six individuals for each plant size group following a randomization technique. Individuals used for measurements were randomly selected at each sampling time point. Within each individual, an attached leaf was used for measurements of stomatal conductance and chlorophyll fluorescence in situ, and then the same leaf was collected for leaf water content estimation. At least three additional leaves of the same shoot and characteristics (visually undamaged, fully expanded leaves) were collected at the same time of the day, pooled, frozen in situ in liquid nitrogen and immediately transported to the laboratory, where they were stored at –80 °C and later used for biochemical analyses (including vitamin E composition, lipid peroxidation and photosynthetic pigments). All samples were always collected on clear sunny days at midday (at maximum incident diurnal photosynthetically active photon flux density), so that plants were subjected to high light intensity during the day. Solar radiation levels during sampling days were registered with a quantum sensor (model LI-189, LICOR, Lincoln, NE, USA).

Vitamin E composition

The vitamin E composition of leaves, including both tocopherols and tocotrienols, was measured on methanolic extracts by high-performance liquid chromatography (HPLC) as described by Cela et al. (2011). In short, leaf samples were ground in liquid nitrogen and extracted with ice-cold methanol using a Branson 2510 ultrasonic cleaner (Bransonic) for 45 min. The samples were then centrifuged for 15 min at 4 °C and transferred to vials for immediate HPLC analysis. The HPLC equipment consisted of an integrated system with a Waters 600 controller pump, a Waters 714 plus auto-sampler and an FP-1520 fluorescence detector (Jasco). Tocochromanols were separated

Fig. 1 Climatological conditions during the sampling at Serra do Cipó, including monthly precipitation and monthly mean maximum and minimum air temperatures (a). Two plant size groups (b, marked 1 and 2) were studied with individuals 1–1.5 m high (c), represented as cohort I, and plants with a height of 3–4 m (d), represented as cohort II. Detail of the fruit is also shown (e)

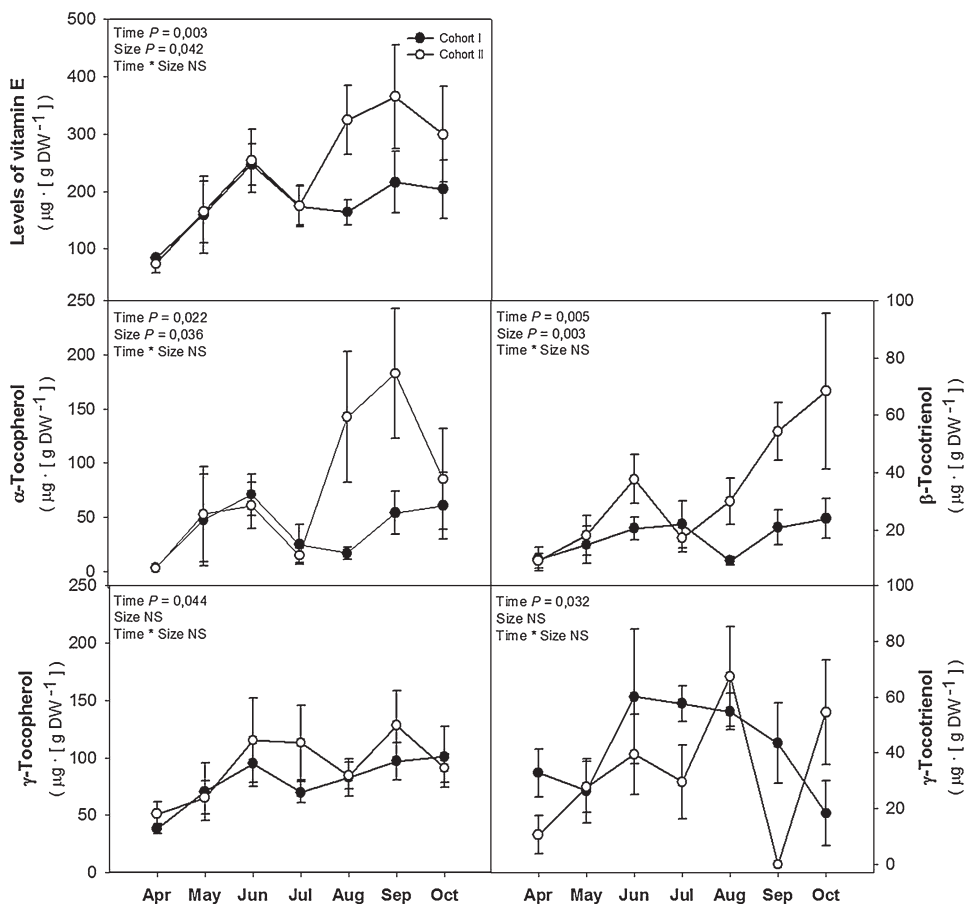


on an Inertsil 100A (5 mm, 30 × 250 mm, GL Sciences Inc.) normal-phase column operating at room temperature. The mobile phase used was a mixture of *n*-hexane and 1,4-dioxane (95.5:4.5, v/v) at a flow rate of 0.7 ml min⁻¹, and the injection volume was 10 µl. Detection was carried out for excitation at 295 nm and emission at 330 nm. Quantification was based on the fluorescence signal response compared with authentic standards of each compound (Sigma-Aldrich).

Furthermore, the identification of tocotrienols detected by HPLC (β- and γ-tocotrienol) was confirmed using a modification of the LC–MS/MS method described by

Lanina et al. (2007). The liquid chromatography (LC) system consisted of an Aquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA) quaternary pump equipped with an autosampler, and a Kromasil Eternity C18 (Eka Chemicals AB, Bohus, Sweden) column (2.1 × 50 mm, 2.5 µm) was used. Gradient solution was done with water and 0.05 % glacial acetic acid (solvent A) and methanol with 0.05 % glacial acetic acid (solvent B) at a constant flow rate of 0.5 ml about 15 min and an injection volume of 2 µl. The diode array detector was set at 292 nm. Tandem mass spectrometry (MS/MS) experiments were performed on an API 3000 triple quadrupole mass spectrometer (PE Sciex, Concord, Ont, Canada).

Fig. 2 Seasonal variations in vitamin E levels in leaves of *V. gigantea* plants, considering two plant groups (cohort I and II). Significant differences between groups were tested by two-way factorial analyses of variance (ANOVA) with seasonal variations (time), and plant size as factors. Data represent the mean \pm SE of $n = 6$. Significant *P* values (below 0.05) are **bold**



Temperature was 400 °C, nebulizer gas (N₂) 10 (arbitrary units), curtain gas (N₂) 12 (arbitrary units), collision gas (N₂) 6 (arbitrary units) and the capillary voltage was 3.5 kV. To optimize MS/MS parameters a standard solution for each compound was infused at a constant flow rate of 15 $\mu\text{l}/\text{min}$ into the mass spectrometer using a Model 11 syringe pump (Harvard Apparatus, Holiston, MA, USA). Precursor and product ion *m/z* (M^+H^+) used for identification was *m/z* 411/151 for both β - and γ -tocotrienol, showing, however, different retention times. Instrumental parameters were the following: declustering potential, 45 V for both β - and γ -tocotrienol; collision energy, 39 eV for β -tocotrienol and 35 eV for γ -tocotrienol; collision cell exit potential, 25 V for β -tocotrienol and 15 V for γ -tocotrienol.

Leaf water contents and stomatal conductance

Leaf water status was estimated by measuring the relative water content (RWC) of leaves as $\text{RWC} (\%) = (\text{fresh weight} - \text{dry weight}) / (\text{turgid weight} - \text{dry weight}) \times 100$. The fresh, turgid and dry weights were obtained by weighing the samples after transporting them to the laboratory in a bag with condensed atmosphere, re-hydration by immersion in distilled water at 4 °C for 24 h, and subsequent

drying at 80 °C for 24 h. The stomatal conductance was estimated by measuring leaf gas exchange in attached leaves with a portable diffusion porometer (model AP4, Delta-T Devices Ltd., Cambridge, UK) following the instructions described by the manufacturer.

Photosynthetic pigments and chlorophyll fluorescence

The levels of photosynthetic pigments (chlorophylls and carotenoids) were estimated spectrophotometrically on 80 % (v/v) acetone extracts as described by Lichtenthaler and Wellburn (1983). The maximum efficiency of PSII photochemistry (F_v/F_m), an indicator of photoinhibition to the photosynthetic apparatus, was calculated following Van Kooten and Snel (1990) from chlorophyll fluorescence data obtained in attached leaves with a portable fluorometer (Mini-PAM; Walz, Effeltrich, Germany), in leaves maintained for at least 1 h in darkness.

Lipid peroxidation

The extent of lipid peroxidation was estimated as levels of lipid hydroxyperoxides and malondialdehyde equivalents. Lipid hydroxyperoxide levels were measured

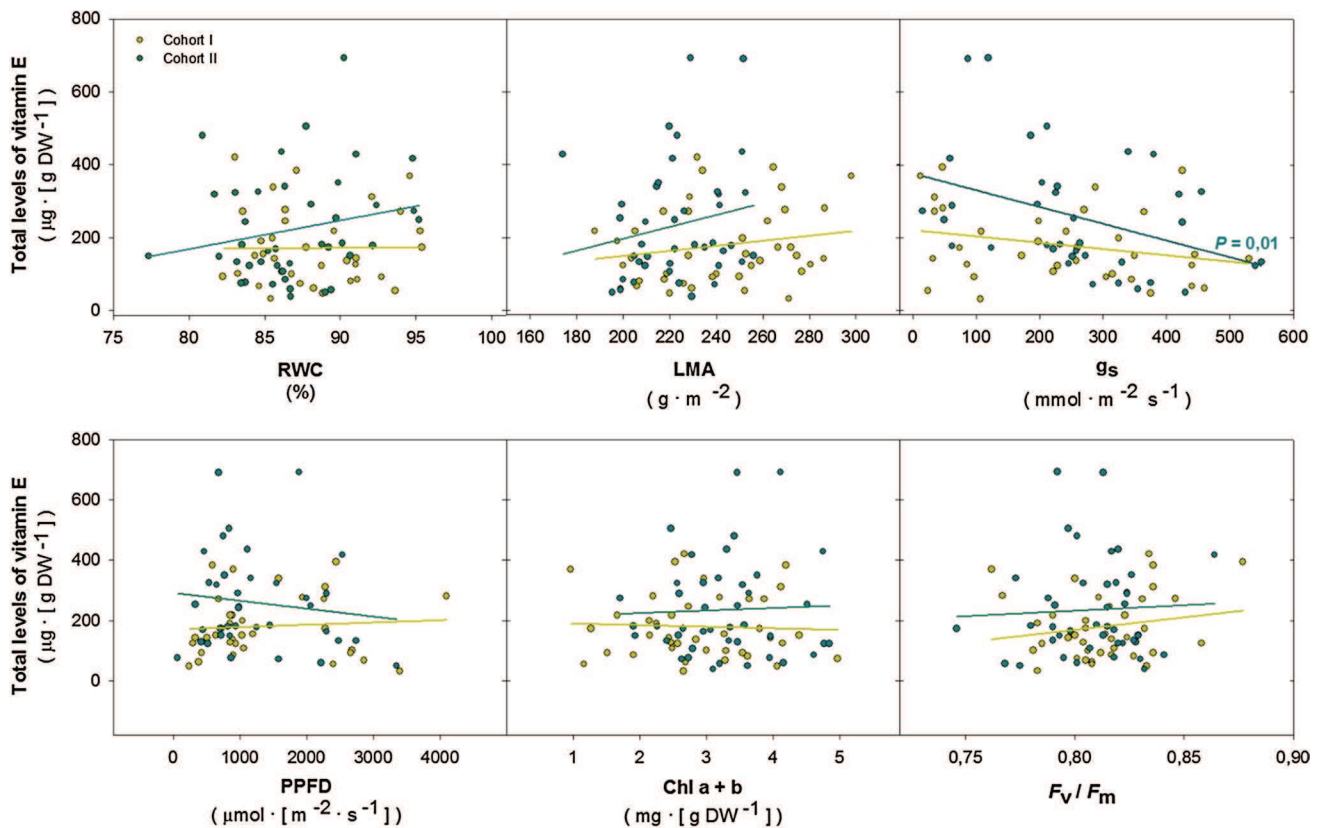


Fig. 3 Spearman's rank correlation between stress indicators (relative water content [RWC], leaf mass area [LMA], stomatal conductance [g_s], photosynthetically active photon flux density [PPFD], chlorophyll $a + b$ levels and maximum efficiency of PSII photochemistry

[F_v/F_m ratio]) and vitamin E levels in leaves of *V. gigantea*, considering two size groups (cohort I and II). $P < 0.05$ are considered significant and are given in the insets

spectrophotometrically following the ferrous oxidation-xylene orange assay as described (DeLong et al. 2002). Malondialdehyde levels were measured spectrophotometrically following the method described by Hodges et al. (1999), which takes into account the possible influence of interfering compounds in the thiobarbituric acid-reactive substances assay.

Statistical analyses

The response variables obtained in the field (parameters measured) under seasonal variations in the two cohorts were tested by two-way factorial analyses of variance (ANOVA), with seasonal variations (time) and plant size as factors. Values of $P \leq 0.05$ indicate significant differences between groups. Furthermore, the relationship between the response variables obtained in the field (parameters measured) and levels of vitamin E was correlated by Spearman's rank correlation, considering separately the two groups of different size: cohort I and cohort II. All statistical tests were performed using the SPSS package (Chicago, IL, USA).

Results

Vellozia gigantea leaves contain tocotrienols

The vitamin E composition of leaves revealed the presence of both tocopherols and tocotrienols. Tocopherols included α - and γ -tocopherol, which generally predominated over tocotrienols throughout the study, the latter including β - and γ -tocotrienol (Fig. 2). The presence of tocotrienols was confirmed in independent samplings using LC-MS/MS (Suppl. Fig. S1).

Seasonal and plant size effects on the vitamin E composition of leaves

Two cohorts of different size were compared between May and October. During the experiment, environmental conditions were typical of this region, precipitation progressively decreasing during the winter, coincident with low mean monthly temperatures (June–September, Fig. 1).

Vitamin E levels increased during the dry season, but these increases were particularly evident in the largest

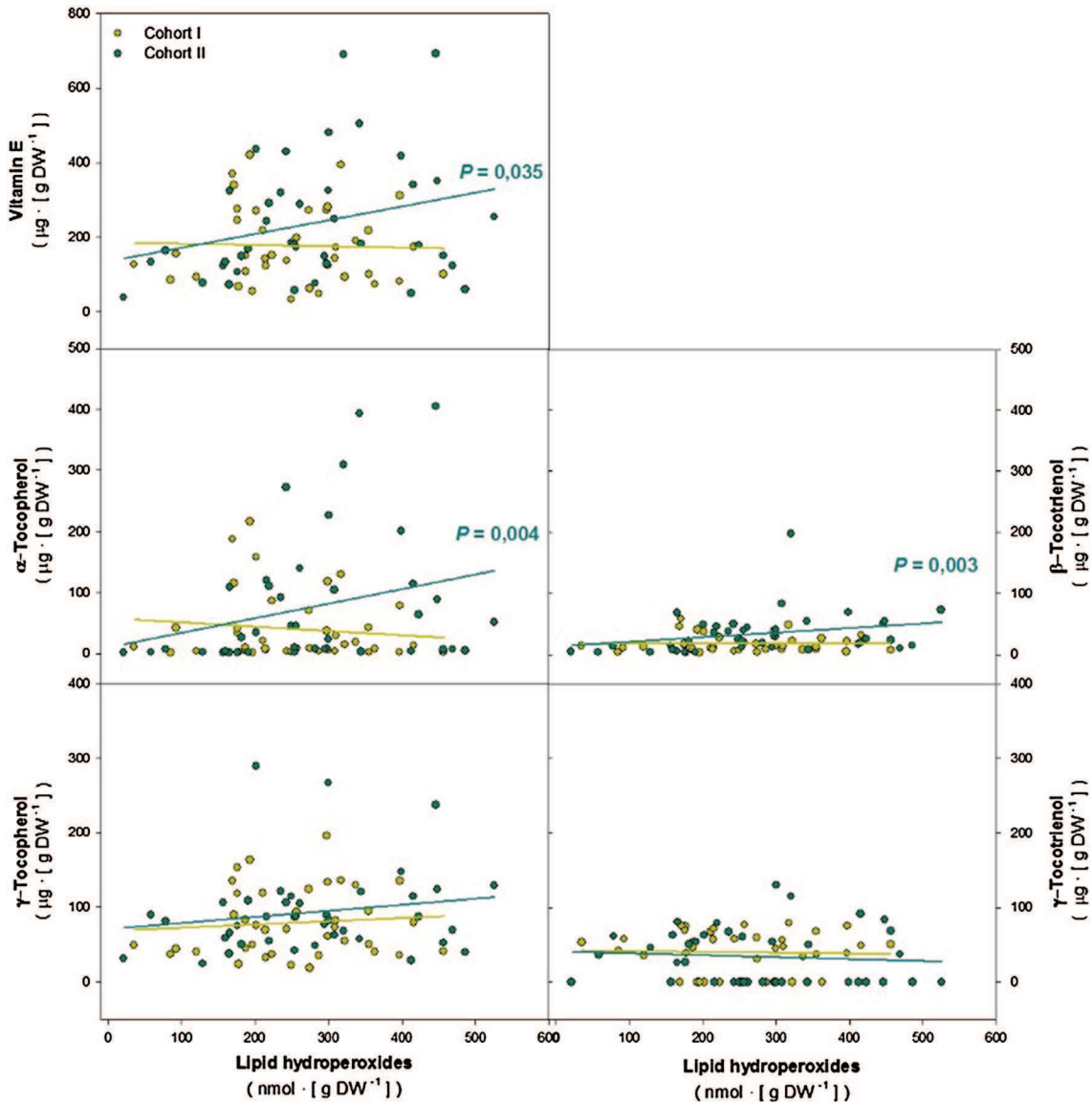


Fig. 4 Spearman's rank correlation between lipid hydroxyperoxide equivalents and vitamin E levels in leaves of *V. gigantea*, considering two size groups (cohort I and II). $P < 0.05$ are considered significant and are given in the insets

individuals (here arbitrarily called cohort II, Fig. 2). Maximum total vitamin E levels reached $380 \mu\text{g g dry matter}^{-1}$ during September in cohort II, with 45 % lower levels during the same period in the smallest individuals (cohort I, Fig. 2). Among different vitamin E forms, size-related differences were observed in α -tocopherol and β -tocotrienol levels only.

A correlation study between vitamin E levels and several stress indicators (relative water content, leaf mass area and stomatal conductance, as well as photosynthetically active photon flux density, total chlorophylls levels and the F_v/F_m ratio) revealed that vitamin E accumulation was negatively correlated with stomatal conductance, but in cohort II only (Fig. 3). Furthermore, vitamin E levels (including both

α -tocopherol and β -tocotrienol) positively correlated with lipid hydroxyperoxides in cohort II only (Fig. 4).

Seasonal and plant size effects on other physiological markers

We examined the effect of plant size on leaf physiological status (Table 1). Aside from the differences in α -tocopherol and β -tocotrienol levels, there were size-related differences in the extent of lipid peroxidation (estimated as lipid hydroxyperoxide equivalents, but not malondialdehyde levels), RWC, leaf mass per area ratio (LMA), and carotenoid levels. In addition, an interaction between plant size and seasonal variations in the F_v/F_m ratio was observed (Table 1).

Table 1 *P* values of the analysis of variance (ANOVA) to test for the effect of size (cohort I and cohort II), sampling time (months) and size × time interaction, on different indexes of leaf water status, levels of photosynthetic pigments and vitamin E in *Vellozia gigantea* under field conditions

Parameter	Size	Time	Size × time
RWC	0.081	< 0.001	0.110
LMA	< 0.001	< 0.001	0.063
Gs	0.118	< 0.001	0.176
Chl <i>a</i> + <i>b</i>	0.085	< 0.001	0.083
Chl <i>alb</i>	0.443	< 0.001	0.396
Car/Chl	0.323	< 0.001	0.397
Carotenoids	0.038	0.739	0.474
F_v/F_m	0.308	< 0.001	0.045
MDA	0.172	0.016	0.798
Lipid hydroperoxides	0.263	0.037	0.037
α-Tocopherol	0.036	0.022	0.115
γ-Tocopherol	0.241	0.044	0.862
γ-Tocotrienol	0.207	0.032	0.068
β-Tocotrienol	0.003	0.005	0.120
α-Tocopherol (%)	0.110	0.001	0.057
γ-Tocopherol (%)	0.877	0.164	0.004
γ-Tocotrienol (%)	0.009	0.047	0.220
β-Tocotrienol (%)	0.018	0.065	0.763

Significant *P* values (below 0.05) are bold

RWC relative water content, LMA leaf mass per area ratio, Gs stomatal conductance, Chl chlorophyll *a* + *b*, Car total carotenoids, F_v/F_m maximum efficiency of PSII photochemistry, MDA malondialdehyde

Increased plant size was associated with (1) enhanced levels of lipid hydroxyperoxide equivalents during the dry season, and (2) reduced RWC and LMA as well as increased carotenoid levels throughout the experiment. No clear trend was observed for the F_v/F_m ratio, although it remained above 0.75 throughout the experiment in both cohorts (Fig. 5). Furthermore, chlorophylls levels and stomatal conductance did not differ between cohorts (Table 1). Size-related differences were, however, observed for carotenoid levels. Since this could be associated with size-related changes in LMA, results are also given on a chlorophyll and leaf area basis (Table 2). Size-related differences in carotenoid levels disappear when these are expressed both on a chlorophyll and leaf area basis, while size-related differences in β-tocotrienol are still significant both on a chlorophyll and leaf area basis (Table 2).

Discussion

Seasonal variations in climatic factors such as periods of low precipitation, especially when combined with high light and high temperatures, as those experienced by *V.*

gigantea plants during the dry season, can lead to excess excitation energy in thylakoid membranes and increase the production of reactive oxygen species (ROS) in chloroplasts (Munné-Bosch and Alegre 2000; Asada 2006; Munné-Bosch et al. 2013). Antioxidants are essential to protect plants against photo-oxidative stress, and vitamin E is one of the most important lipophilic antioxidants, together with carotenoids, in protecting chloroplast membranes against ROS (Havaux et al. 2000, 2005). Although γ-tocopherol can accumulate to some extent in leaves (Szymanska and Kruk 2008), α-tocopherol is always the major vitamin E form and has consequently been thought to be the major vitamin E form that protects chloroplasts from photo-oxidative stress [reviewed by Munné-Bosch (2005), Falk and Munné-Bosch (2010)]. Studies by Matringe et al. (2008) showed using transgenic tobacco plants accumulating tocotrienols instead of tocopherols that the former can also potentially protect the photosynthetic apparatus from oxidative stress similarly to tocopherols. In the present study, we report on (1) the presence of tocotrienols in leaves of a higher plant species and (2) seasonal and plant size effects on tocopherol and tocotrienol accumulation in leaves of a monocot, endemic species from Brazil.

The pathway for vitamin E biosynthesis, which is shown in Fig. 6, shows that aside from using different substrates (phytyl diphosphate and geranylgeranyl diphosphate, respectively) for tocopherol and tocotrienol biosynthesis, the final products of both pathways are the α- or β-tocopherols or tocotrienols (Cahoon et al. 2003). It is noteworthy then that β-tocotrienol was the major tocotrienol that accumulated in *V. gigantea* leaves and that additionally responded to seasonal and plant size effects. The vitamin E pathway in this species is therefore diverted to form not only α-tocopherol but also β-tocotrienol in leaves challenged by photo-oxidative stress. The accumulation of γ- instead of δ-tocotrienol (the presumed immediate β-tocotrienol precursor) opens, however, several intriguing questions on the synthesis of vitamin E in this species. Furthermore, it is still to be characterized whether tocotrienol biosynthesis in this species results from an upregulation of a putative homogentisate geranylgeranyltransferase or an upregulation of an unspecific homogentisate phytyltransferase that indistinguishably uses phytyldiphosphate and geranylgeranyl diphosphate as substrates.

It is shown here that plant size exerts a role on the response of plants to seasonal variations in climatic conditions. The largest individuals not only showed increased vitamin E levels but also increased lipid peroxidation (estimated as lipid hydroxyperoxide equivalents) during the dry season, and slightly lower RWC and LMA throughout the experiment. Higher vitamin E levels during periods of low precipitation can be associated with a higher ROS production in leaves [Munné-Bosch and

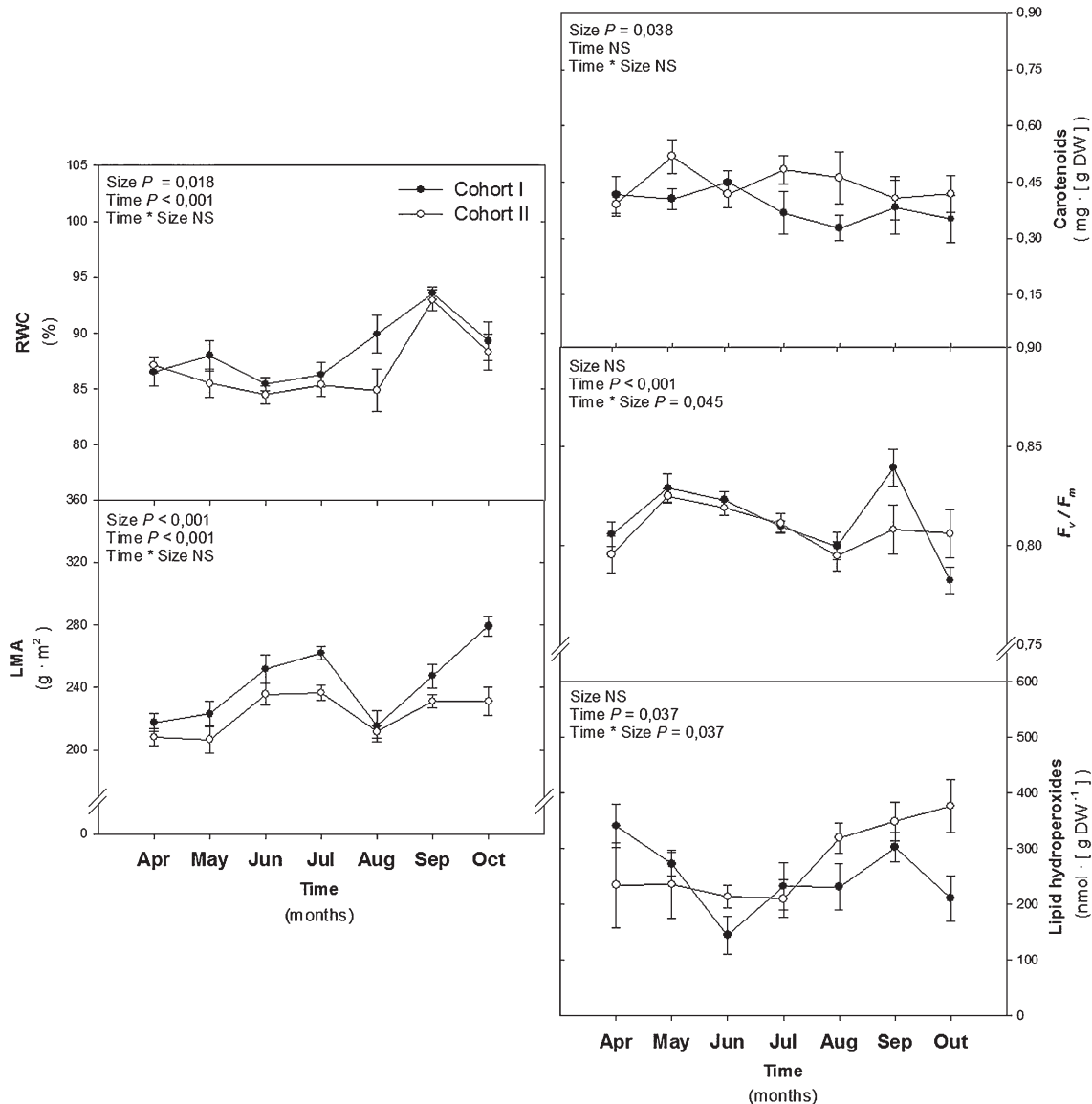


Fig. 5 Seasonal variations in the relative leaf water content (*RWC*), leaf mass per area ratio (*LMA*), levels of carotenoids and maximum efficiency of PSII photochemistry (F_v/F_m ratio) in leaves of Cohort I (plant height <1 m) and Cohort II (plant height of 3–4 m). Significant

differences between groups were tested by two-way factorial analyses of variance (ANOVA) with seasonal variations (time), and plant size as factors. Data represent the mean \pm SE of $n = 6$. Significant *P* values (below 0.05) are *bold*

Alegre (2000), see also Asada (2006) and Munné-Bosch et al. (2013)]. α -Tocopherol is known to specifically protect chloroplasts from singlet oxygen production and prevent the propagation of lipid peroxidation in thylakoid membranes [Trebst et al. (2002), Maeda et al. (2005), see also Munné-Bosch and Alegre (2002)]. Indeed, previous studies have shown that photo-oxidative stress increases during periods of low precipitation combined with high light in *Cistus clusii* as a function of plant size, therefore suggesting an increased vulnerability to photo-oxidative stress in the largest individuals (Munné-Bosch and Lalueza 2007). In trees, increased plant size leads to

increased hydraulic resistance causing reductions in relative leaf growth rates (Mencuccini and Grace 1996). In *V. gigantea*, increased plant size resulted in slightly lower *RWC*, thus suggesting a plant size effect on hydraulic resistance in this arborescent species. It appears, in turn, that this was associated with an increased photoprotective demand in leaves, thus indicating that plant size exerts a major role on the physiology of leaves of this arborescent species. Most interestingly, this increased photoprotective demand and increased sensitivity to photo-oxidative stress with increased size in *V. gigantea* occurred concomitantly with an increased lipid peroxidation in

Table 2 *P* values of the analysis of variance (ANOVA) to test for the effect of size (cohort I and cohort II), sampling time (months) and size \times time interaction, on carotenoids, α -tocopherol and β -tocotrienol expressed both per unit of total chlorophyll and per leaf area in *Vellozia gigantea* under field conditions

Parameter	Size	Time	Size \times time
Car/Chl	0.323	<0.001	0.397
Car (mg/m ²)	0.332	0.373	0.599
α -Tocopherol/Chl	0.071	0.017	0.122
α -Tocopherol (mg/m ²)	0.065	0.017	0.111
β -Tocotrienol/Chl	0.008	0.001	0.163
β -Tocotrienol (mg/m ²)	0.012	0.003	0.200

Significant *P* values (below 0.05) are bold

Car total carotenoids, *Chl* chlorophyll *a* + *b*

leaves (as indicated by increased lipid hydroperoxide equivalents), but did not result in photo-oxidative damage, as indicated by F_v/F_m values above 0.75 throughout the study. Increased vitamin E accumulation during the dry season in the largest individuals may therefore result from increased lipid peroxidation, but at the same time protect the photosynthetic apparatus from photo-oxidative damage.

It is concluded that *V. gigantea* plants not only accumulate tocopherols, but also tocotrienols in leaves. Considering that both tocopherols and tocotrienols can protect the photosynthetic apparatus from photo-oxidative stress and both compounds accumulate in leaves of this species during the dry season in the largest individuals, it is suggested that

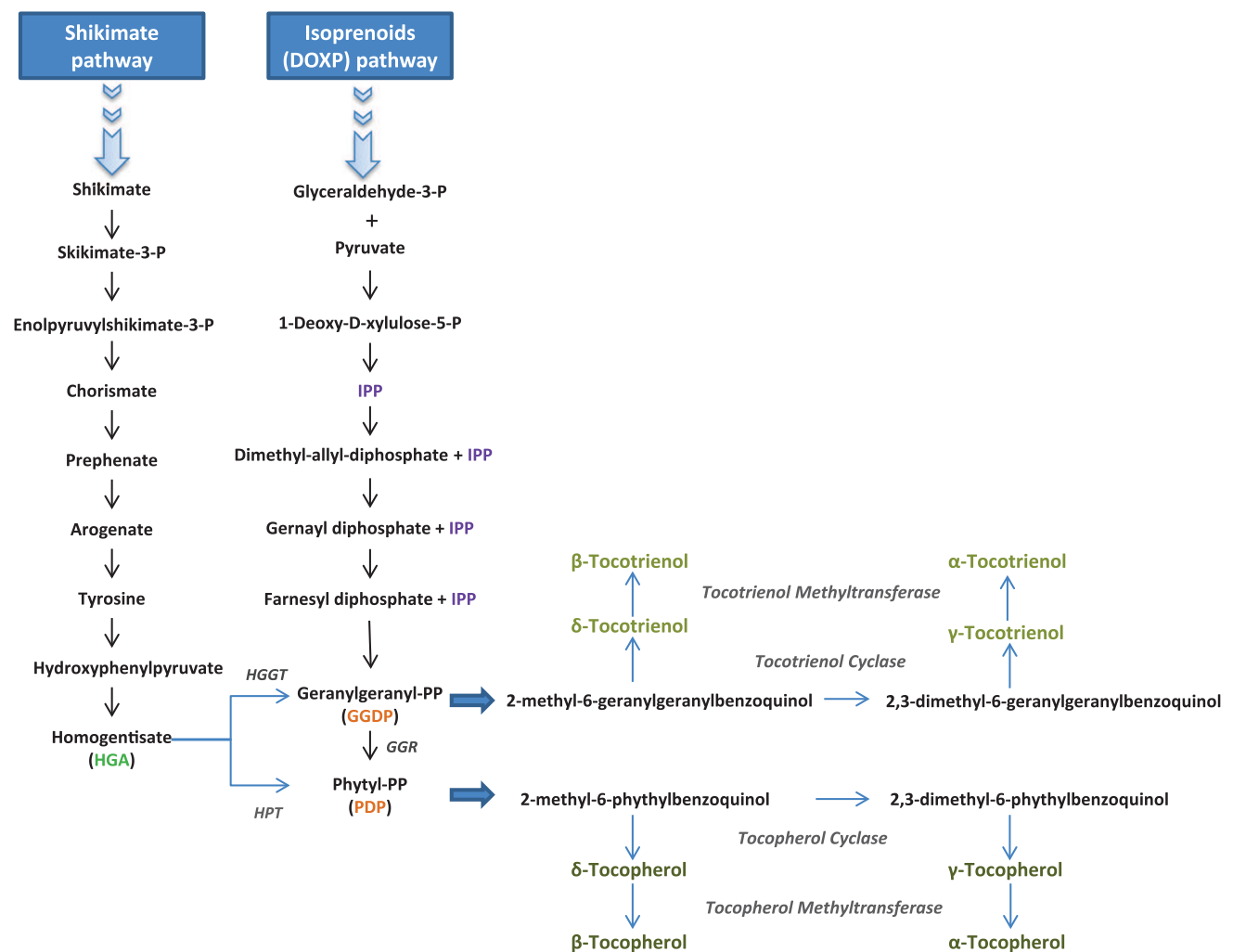


Fig. 6 Vitamin E biosynthetic pathway in plants. *T3* tocotrienol, *Toc* tocopherol, *HGA* homogentisate, *HGGT* homogentisate geranylgeranyltransferase, *HPT* homogentisate phytyltransferase, *TMT* tocoph-

erol/tocotrienol methyltransferase, *TC* tocopherol/tocotrienol cyclase, *IPP* isopentenyl diphosphate

tocotrienols can represent an additional adaptive advantage on providing tolerance to photo-oxidative stress in higher plants. Further studies are, however, still required to better understand the biosynthesis and function of different vitamin E forms in this and related species, and why tocotrienols accumulate in addition to tocopherols in photosynthetic tissues of some higher plant species only.

Acknowledgments Support for the research was received through grants BFU2012-32057, BFU2009-07294, BFU2009-06045 and CSD2008-00040 from the Spanish Government, and the ICREA Academia prize to S.M.-B., which is funded by the Catalan Government. We thank Fábio Vieira for help in preparing Figure 1, and Leilane Barreto, Ana Laura Lamounier Magalhães and Daniela Moreira Duarte for help in samplings. We are also very grateful to Maren Müller for her help with LC–MS/MS analyses.

References

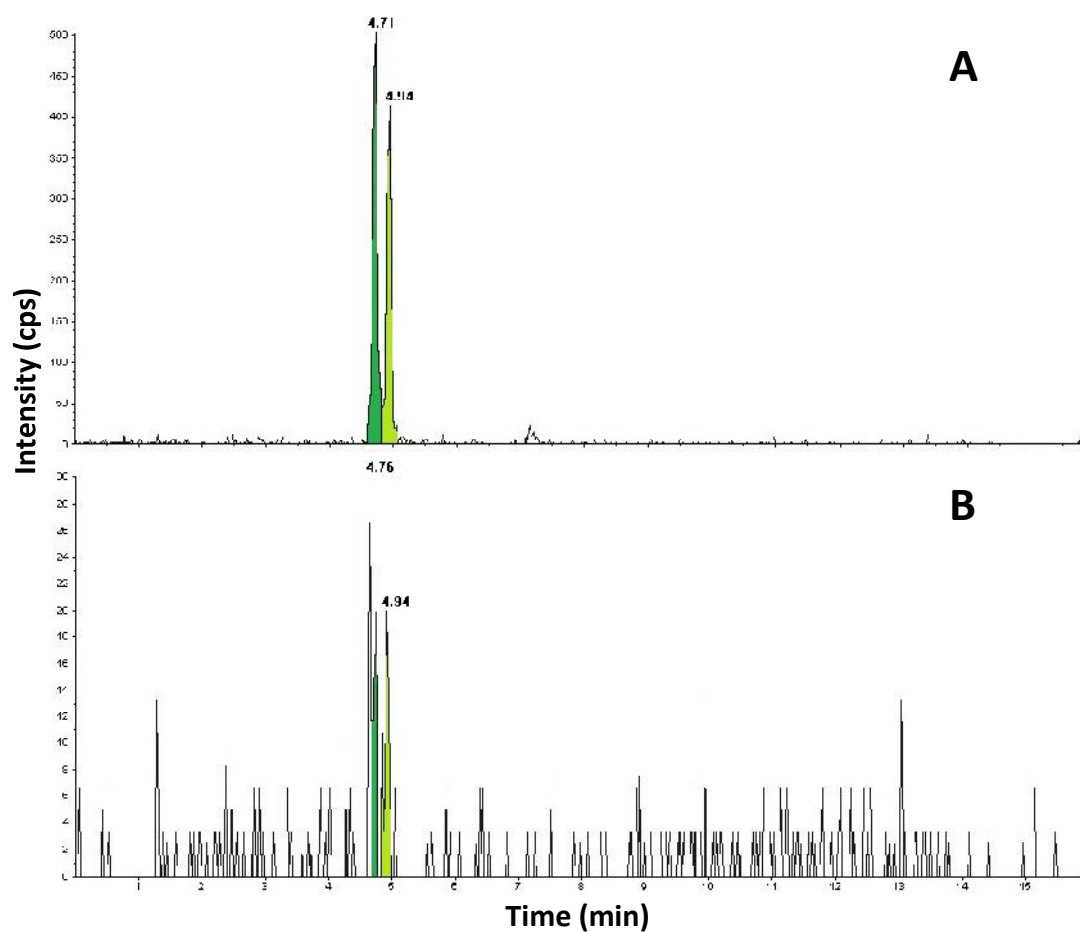
- Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* 141:391–396
- Cahoon EB, Hall SE, Ripp KG, Ganzke TS, Hitz WD, Coughlan SJ (2003) Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. *Nat Biotechnol* 21:1082–1087
- 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
- DeLong JM, Prange RK, Hodges DM, Forney CF, Bishop MC, Quilliam M (2002) Using a modified ferrous oxidation-xylenol orange (FOX) assay for detection of lipid hydroperoxides in plant tissue. *J Agric Food Chem* 50:248–254
- Falk J, Munné-Bosch S (2010) Tocochromanol functions in plants: antioxidant and beyond. *J Exp Bot* 61:1549–1566
- Galli F, Azzi A (2010) Present trends in vitamin E research. *BioFactors* 36:33–42
- Havaux M, Bonfils J-P, Lütz C, Niyogi KK (2000) Photodamage of the photosynthetic apparatus and its dependence on the leaf developmental stage in the *npq1* *Arabidopsis* mutant deficient in the xanthophyll cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase. *Plant Physiol* 124:273–284
- 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
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, 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
- Horvath G, Wessjohann L, Bigirimana J, Jansen M, Guisez Y, Caubergs R, Horemans N (2006) Differential distribution of tocopherols and tocotrienols in photosynthetic and non-photosynthetic tissues. *Phytochemistry* 67:1185–1195
- Hussain N, Irshad F, Jabeen Z, Shamsi IH, Li Z, Jiang L (2013) Biosynthesis, structural, and functional attributes of tocopherols in planta: past, present, and future perspectives. *J Agric Food Chem* 61:6137–6149
- Lanina AS, Toledo P, Sampels S, Kamal-Eldin A, Jastrebova JA (2007) Comparison of reversed-phase liquid chromatography–mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure chemical ionization for analysis of dietary tocopherols. *J Chromatogr* 1157:159–170
- Lichtenthaler HK, Wellburn AR (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochem Soc Trans* 11:591–592
- Lu Y, Rijzaani H, Karcher D, Ruf S, Bock R (2013) Efficient metabolic pathway engineering in transgenic tobacco and tomato plastids with synthetic multigene operons. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:E623–E632
- Maeda H, Sakuragi Y, Bryant DA, DellaPenna D (2005) Tocopherols protect *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 from lipid peroxidation. *Plant Physiol* 138:1422–1435
- Matringe M, Ksas B, Rey P, Havaux M (2008) Tocotrienols, the unsaturated forms of vitamin E, can function as antioxidants and lipid protectors in tobacco leaves. *Plant Physiol* 147:764–778
- Mencuccini M, Grace J (1996) Developmental patterns of above-ground hydraulic conductance in a Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) age sequence. *Plant Cell Environ* 19:939–948
- Menezes NL, Giuliatti AM (1986) Serra do Cipó—Paraíso dos Botânicos. *Ciência Hoje* 25:38–44
- Munné-Bosch S (2005) The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *J Plant Physiol* 162:743–748
- Munné-Bosch S, Alegre L (2000) Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta* 210:925–931
- Munné-Bosch S, Alegre L (2002) The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Crit Rev Plant Sci* 21:31–57
- 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, Queval G, Foyer CH (2013) The impact of global change factors on redox signaling underpinning stress tolerance. *Plant Physiol* 161:5–19
- Padley FB, Gunstone FD, Harwood J (1994) The lipid handbook, 2nd edn. Chapman & Hall, London
- 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
- Szymanska R, Kruk J (2008) γ -Tocopherol dominates in young leaves of runner bean (*Phaseolus coccineus*) under a variety of growing conditions: the possible functions of γ -tocopherol. *Phytochemistry* 69:2142–2148
- Tan B, Watson RR, Preedy VR (2012) Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols, 2nd edn. CRC Press, USA, pp 1–16
- Trebst A, Depka B, Holländer-Czytko H (2002) A specific role for tocopherol and of chemical singlet oxygen quenchers in the maintenance of photosystem II structure and function in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett* 43:2157–2162
- Van Kooten O, Snel JFH (1990) The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth Res* 25:147–150
- Yang W, Cahoon RE, Hunter SC, Zhang C, Han J, Borgschulte T, Cahoon EB (2011) Vitamin E biosynthesis: functional characterization of the monocot homogentisate geranylgeranyltransferase. *Plant J* 65:206–217

Supporting Information

Tocotrienols in *Vellozia gigantea* leaves: occurrence and modulation by seasonal and plant size effects

Melanie Morales, Queila S. Garcia, Advanio I. Siqueira-Silva, Mayara C. Silva, Sergi Munné-Bosch

Supplementary Figure 1. LC-MS/MS of β - and γ -tocotrienol in authentic standards (A) and *V. gigantea* leaves (B). Precursor and product ion m/z used for identification was 411/151 for both β - and γ -tocotrienol, which differed however in retention time.



CAPÍTOL 4

Resposta ecofisiològica a les variacions estacionals en la disponibilitat hídrica en la planta arborescent i endèmica

Vellozia gigantea



CHAPTER 4

Ecophysiological response to seasonal variations in water availability in the arborescent, endemic plant *Vellozia gigantea*

Melanie Morales¹, Queila S. García², Sergi Munné-Bosch¹

¹Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain

²Laboratório de Fisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), CP 486, Belo Horizonte CEP 31270-970, MG, Brazil

Publicat a **Tree Physiology** (2015) *doi:10.1093/treephys/tpv012*

RESUM CAPÍTOL 4

La resposta fisiològica de les plantes que creixen en el seu hàbitat natural està fortament determinada per les variacions estacionals de les condicions climàtiques així com per les interaccions entre estressos abiòtics i biòtics. En aquest estudi es va avaluar la resposta ecofisiològica, en termes d'hidratació foliar i contingut de nutrients, i els canvis en l'estat redox cel·lular i els nivells endògens de fitohormones relacionades amb l'estrès, incloent l'àcid abscísic (ABA), àcid salicílic (SA) i jasmonats; durant l'estació plujosa i seca en les plantes de *V. gigantea*, espècie endèmica que creix en les zones més altes dels *campos rupestres* en la regió muntanyenca de l'*Espinhaço* al Brasil. Es va observar un tancament dels estomes pronunciat a causa de l'augment dels nivells d'ABA durant l'estació seca, el qual probablement condueix a un control eficient dels continguts d'aigua de la fulla. D'altra banda, es va observar una reducció en els nivells d'àcid 12-oxofytodienoic (OPDA) durant l'estació seca, mentre que els nivells d'altres jasmonats com ara l'àcid jasmònic (JA) o l'àcid jasmònic isoleucina (JA-Ile) no es van veure afectats. Els canvis en els nivells d'ABA i OPDA es van correlacionar amb les concentracions endògenes de ferro (Fe) i Si (silici), peròxid d'hidrogen (H_2O_2) i vitamina E, tot indicant una complexa interacció entre el contingut d'aigua i nutrients, els canvis en el estat redox cel·lular i les concentracions endògenes hormonals. Els resultats també suggereixen una sincronització entre l'activació dels mecanismes de tolerància a la sequera (regulada per ABA) i la resistència a l'estrès biòtic (regulada pels jasmonats), en que els nivells de vitamina E podrien actuar com a punt de control. Es conclou que, a més d'una complexa regulació del tancament estomàtic regulada per l'ABA durant l'estació seca, la sincronització entre l'activació de defenses abiòtiques i biòtiques, i l'acumulació de nutrients en les fulles són importants moduladors de les respostes de l'estrès en plantes que creixen en el seu hàbitat natural, on múltiples estressos interactuen per determinar la resposta fisiològica més adequada sota canvis constants de les condicions climàtiques.



Tree Physiology 00, 1–13
doi:10.1093/treephys/tpv012



Research paper

Ecophysiological response to seasonal variations in water availability in the arborescent, endemic plant *Vellozia gigantea*

Melanie Morales¹, Queila S. Garcia² and Sergi Munné-Bosch^{1,3}

¹Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain; ²Laboratório de Fisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), CP 486, CEP 31270-970, Belo Horizonte, MG, Brazil; ³Corresponding author (smunne@ub.edu)

Received December 16, 2014; accepted January 26, 2015; handling Editor João Pereira

The physiological response of plants growing in their natural habitat is strongly determined by seasonal variations in environmental conditions and the interaction of abiotic and biotic stresses. Here, leaf water and nutrient contents, changes in cellular redox state and endogenous levels of stress-related phytohormones (abscisic acid (ABA), salicylic acid and jasmonates) were examined during the rainy and dry season in *Vellozia gigantea*, an endemic species growing at high elevations in the rupestrian fields of the Espinhaço Range in Brazil. Enhanced stomatal closure and increased ABA levels during the dry season were associated with an efficient control of leaf water content. Moreover, reductions in 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA) levels during the dry season were observed, while levels of other jasmonates, such as jasmonic acid and jasmonoyl-isoleucine, were not affected. Changes in ABA and OPDA levels correlated with endogenous concentrations of iron and silicon, hydrogen peroxide, and vitamin E, thus indicating complex interactions between water and nutrient contents, changes in cellular redox state and endogenous hormone concentrations. Results also suggested crosstalk between activation of mechanisms for drought stress tolerance (as mediated by ABA) and biotic stress resistance (mediated by jasmonates), in which vitamin E levels may serve as a control point. It is concluded that, aside from a tight ABA-associated regulation of stomatal closure during the dry season, crosstalk between activation of abiotic and biotic defences, and nutrient accumulation in leaves may be important modulators of plant stress responses in plants growing in their natural habitat.

Keywords: antioxidants, environmental conditions, nutrient availability, redox status, stress-related phytohormones.

Introduction

In addition to rainforests as sites of high diversity of neotropical plants, open vegetation on mountain tops represents another important diversity hotspot. The Espinhaço Range in eastern Brazil has a peculiar landscape that has influenced the vegetation pattern of the region because of its valleys, canyons, ranges and disjunct rock outcrops found at high elevations. In this region, a vegetation type known as *campos rupestres* (rupestrian fields) that occurs in disjunct outcrops exhibits high levels of species richness and endemism (Lousada et al. 2011). Although great efforts have thus far been made to better understand the systematics, phytogeography and genetic structure of endemic

plants in this region (Lousada et al. 2011, Bitencourt and Rapini 2014), still little is known about their ecophysiology.

The rupestrian field vegetation is exposed to marked seasonal variation, with dry winters and more humid, rainy summers. A complex, diverse set of physical (abiotic) and biological (biotic) environmental stress factors, acting individually or in conjunction, have presumably forced these plants to develop a plethora of physiological processes for adaptation. Scarcity of water in the soil during the dry season triggers a variety of plant stress responses, and this soil-water deficit can occur simultaneously with other stresses, such as changes in temperature, relative humidity and the availability of energy (light) and mineral

nutrients. Furthermore, biotic factors, such as pathogens or herbivores, can also challenge, and potentially damage, plants, thus threatening biodiversity (Medina and Fernandes 2007, Carvalho et al. 2012, 2014).

When plants are subjected to stressful conditions, such as drought, high light intensity, temperature extremes, salinity or mineral deficiencies, increased production of reactive oxygen species (ROS) is generally observed (Mittler 2002). The main ROS include singlet oxygen, superoxide anion radicals, hydroxyl radicals and hydrogen peroxide (H_2O_2), which are produced in chloroplasts, peroxisomes, mitochondria, the plasma membrane and/or the apoplast depending on the type, timing and severity of the stress (Smirnoff 1998, Bartels 2001, Apel and Hirt 2004, Bartels and Sunkar 2005, Suzuki et al. 2012). Hydrogen peroxide is generated predominantly in peroxisomes, chloroplasts and mitochondria, as a consequence of physiological processes such as photorespiration, photosynthesis and respiration (Neill et al. 2002, Yousuf et al. 2012). Environmental stress conditions, such as soil-water scarcity, that slow photosynthesis without proportionally changing light absorption generate an excess of excitation energy (imbalance between light absorption and light utilization), which can lead to an increased production of singlet oxygen, superoxide anion radicals and H_2O_2 (Munné-Bosch et al. 2013, Noctor et al. 2014). Reactive oxygen species transiently formed in specific cell compartments can serve in essential signalling roles and modulate gene expression leading to acclimation responses; however, when formed at high concentrations, ROS may be toxic and damaging for the organism (Munné-Bosch et al. 2013, Noctor et al. 2014). Plants possess efficient antioxidant defence mechanisms to prevent oxidative damage, control ROS production and provide resistance to environmental stress via activation of enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems (Mittler 2002, Apel and Hirt 2004, Mittler et al. 2004).

Whereas a number of studies have addressed plant responses to soil-water deficit by focusing on water relations, stomatal closure and antioxidant protection in plants growing in temperate climates (Munné-Bosch and Alegre 2003, Peñuelas et al. 2004, Zang et al. 2014), little is known about the effects of concomitant mineral nutrition deficiency as a stress factor affecting antioxidant mechanisms in plants. Whereas micronutrients have a functional role, macronutrients have both structural and functional roles, and together form a complex integrated system that regulates plant function. Low nutrient availability results in decreased photosynthesis rates (Mooney et al. 1991) and, via over-reduction of components of the photosynthetic electron transport chain, enhanced ROS production. Macronutrient deficiency can therefore induce oxidative stress, but the nature and extent of such perturbations and the resulting antioxidative responses vary largely (Tewari et al. 2004, 2006).

Aside from plant response to biotic and abiotic stresses, ROS exert a major role in the control of cell-cycle regulation,

programmed cell death, hormone signalling and other key processes of plant development. Several studies extend our understanding of ROS and suggest a dual role for ROS in plant biology as both toxic by-products of aerobic metabolism and key regulators of growth, development and defence pathways (Foyer and Noctor 2005, 2015, Yousuf et al. 2012). Among ROS, H_2O_2 is considered to play a central role in plant signalling, regulating plant development and adaptation to biotic and abiotic stresses. Abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA) and jasmonates are required for growth and development of plants and defence responses during environmental stresses (Davies 2010). Abscisic acid-mediated adaptive responses are critical to plant survival during drought, salt and cold stress. Under drought conditions, ABA-induced stomatal closure is an important mechanism by which higher plants regulate water balance and survive under soil-water deficits (Zhang et al. 1987, Steuer et al. 1988, Zhu 2002). While abiotic stress in plants is studied extensively, its interaction with biotic stress is still poorly understood.

Endemic plants from the Espinhaço Range include a variety of plants of the Velloziaceae, and essentially tropical plant family, with 85% of the world's Velloziaceae species occurring in Brazil (Giulietti et al. 2005). Velloziaceae are particularly abundant in the rupestrian fields vegetation of the Espinhaço Range, in National Park of Serra do Cipó (Minas Gerais, Brazil), where ~90% of their species are endemic (Giulietti et al. 2005). The Espinhaço Range is a chain of mountains with altitudes between 800 and 1900 m, a region declared a Biosphere Reserve by UNESCO in recognition of its high diversity and large numbers of endemic species, and with outstanding interest for conservation (Giulietti et al. 2005). *Vellozia gigantea* (Velloziaceae), in particular, is an endemic and perennial arborescent species of the rupestrian fields of Brazil that is classified as threatened to extinction in the vulnerable category due to small population sizes and a very restricted distribution (Mello-Silva and de Menezes 1999). *Vellozia gigantea* can attain a height of up to 6 m, making it the largest species of *Vellozia* so far described. This species is particularly interesting, both in terms of morphology and geographical distribution, and constitutes an example of the uniqueness of the flora of the Brazilian rupestrian fields (Lousada et al. 2011). Furthermore, its ecophysiology is emerging as being of particular interest. A previous study reported the presence in leaves of this species of tocotrienols that, together with tocopherols, constitute the vitamin E group of compounds (Morales et al. 2014). While tocopherols typically accumulate in photosynthetic tissues, tocotrienols had only been reported to accumulate in seeds and only in particular plant groups (mainly in monocots, Siles et al. 2013). Remarkably, *V. gigantea* contains both tocopherols and tocotrienols in its leaves. Furthermore, this species has been shown to be highly resistant to photo-oxidative stress (Morales et al. 2014). Here, we extended this work and performed a more detailed ecophysiological study on this endemic species, with a particular focus on evaluating the

influence of seasonal variations in soil-water deficit, to better understand the relationships between water and nutrient contents, cellular redox status and phytohormones in modulating the stress response during the dry season.

Materials and methods

Studied species and field site

We studied *V. gigantea* (N. L. Menezes and Mello-Silva, Velloziaceae), an endemic monocot species growing in the Brazilian rupestrian fields. As arborescent species are up to 6 m high, these plants exhibit a dracenoïd habit. Stems are highly branched, thickened at the base (up to 180 cm diameter) and thinned at the apex (3–5 cm diameter). Leaves of *V. gigantea* are lanceolate with serrate margins, apically concentrated and deciduous, leaving persistent leaf sheaths. The flowering period is short and associated with the beginning of the rainy season. Arborescent plants of *V. gigantea* grow exclusively on rock outcrops, as distinct, isolated landscape features.

The present study took place in the rupestrian fields of Serra do Cipó at south-eastern Brazil (19°12'–19°20'S, 43°30'–43°40'W), where a natural population of *V. gigantea* is located, within the municipal districts of Jaboticatubas, Santana do Riacho, Morro do Pilar and Itambé do Mato Dentro. Its total area is 33,800 ha with a perimeter of ~154 km (for map, see Calisto et al. 2000). Rupestrian fields are characterized by the occurrence of rock outcrops and arenarous fields characterized by quartzitic mountains that originated from nutrient-poor parent rocks (Benites et al. 2007, Oliveira et al. 2015), with altitudes varying between 1000 and 1400 m above sea level (a.s.l.), reaching 1800 m a.s.l. in certain areas (Menezes and Giulietti 1986). Serra do Cipó corresponds to the meridional portion of the mountainous system of Espinhaço that extends from the north of the Ferrous Quadrilateral, in the longitudinal direction, going by the north of Minas Gerais and crossing Bahia State. According to the climate classification of Köppen–Geiger (Köppen and Geiger 1954, Köppen 1990, Kottek et al. 2006), Serra do Cipó's climate is considered to be altitude-tropical or moderate humid sub-tropical, with well-defined dry (autumn–winter) and rainy (spring–summer) seasons. Average annual temperatures and rainfall range between 17 and 18.5 °C and between 1450 and 1800 mm, respectively, causing an annual potential evapotranspiration of 700–850 mm.

Sampling design

To study seasonal effects on the physiology of plants, 36 randomly selected *V. gigantea* individuals were sampled during May (rainy season) and September (dry season). Fully expanded, mature leaves with no visual damage were selected for measurements. All samples were taken around midday (between 11:00 and 13:00 solar time) from sun-exposed leaves. Sampled individuals differed in size, with a stem perimeter ranging between

20 and 180 cm. Therefore, plant size was also considered in data analyses as a second variable.

Water status parameters (relative water content, leaf hydration and stomatal conductance), nutrient contents (including both macro- and micronutrients, and other elements), cellular redox status markers (including H₂O₂, ascorbate levels, ascorbate redox state and vitamin E levels) and leaf concentrations of the stress-related phytohormones (ABA, SA and jasmonates) were analysed. For each individual plant, stomatal conductance was measured in situ from an attached leaf and the same leaf was subsequently collected for leaf-water-status measurements. Then, three additional leaves of the same shoot and characteristics were collected, immediately frozen in liquid nitrogen and transported to the laboratory, where samples were stored at –80 °C until analyses.

Table 1. *P* values of the analysis of covariance (ANCOVA) to test for the plant size and seasonal effects on leaf water, nutrient and redox status and stress-related phytohormones in *V. gigantea* under field conditions. Significant differences are shown in bold (*P* < 0.0019, Bonferroni adjusted).

Parameters	Plant size	Seasonal effect
Leaf water status		
Relative water content	0.014	< 0.001
Hydration	0.016	0.024
Stomatal conductance	0.518	< 0.001
Nutrients contents		
C	0.016	0.486
N	0.157	0.149
C/N	0.236	0.127
P	0.046	0.929
K	0.398	0.372
Ca	0.003	0.795
Mg	0.001	0.716
S	0.340	0.033
Fe	0.061	0.107
Zn	0.031	0.544
Mn	0.036	0.381
Ba	0.937	0.415
Si	0.056	0.222
Sr	0.127	0.133
Redox state		
H ₂ O ₂	0.183	0.134
Ascorbate	0.187	0.025
Dehydroascorbate	0.058	0.006
Oxidation state	0.004	0.105
Total vitamin E	0.320	0.001
α-Tocopherol	0.217	0.023
β-Tocotrienol	0.061	0.005
γ-Tocopherol	0.577	0.028
γ-Tocotrienol	0.204	0.020
Phytohormones		
ABA	0.637	< 0.001
OPDA	0.142	< 0.001
JA-Ile	0.314	0.049
JA	0.978	0.124
SA	0.742	0.032

Leaf water status

Stomatal conductance was assessed via gas exchange from attached leaves with a portable diffusion porometer (model AP4, Delta-T Devices Ltd, Cambridge, UK). Then, leaves were collected, transported to the laboratory in thermal bags at ~4 °C in darkness and weighed to estimate fresh weight (FW). Next, leaves were immersed in distilled water for 24 h at 4 °C and weighed for turgid weight (TW). Thereafter, leaves were dried at 80 °C for 24 h and weighed for dry weight (DW). Relative leaf water content (RWC) was calculated as $100 \times (FW - DW) / (TW - DW)$ and leaf hydration as $(FW - DW) / DW$.

Nutrient contents

Foliar concentrations of mineral nutrients were measured after acid digestion of oven-dried material by atomic-emission

spectrophotometry. Samples dried at 80 °C for 24 h were ground and digested using Teflon reactors in which ~100 mg of sample were dissolved in nitric acid (HNO₃) and purified water. After digestion overnight at 90 °C, the extract was re-dissolved in purified water and transferred to specific glass tubes for ICP-OES analysis (model Optima 3200RL, ICP-OES, PerkinElmer, Norwalk, CT, USA) of phosphorus (P), potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg), sulphur (S), iron (Fe), manganese (Mn), zinc (Zn), barium (Ba), silicon (Si) and strontium (Sr). Carbon (C) and nitrogen (N) were separately quantified using an elemental analyser (Thermo EA 1108; Thermo Scientific, Milan, Italy).

Cellular redox state

Hydrogen peroxide contents were determined using the ferrous oxidation xylenol orange (eFOX) method as described by

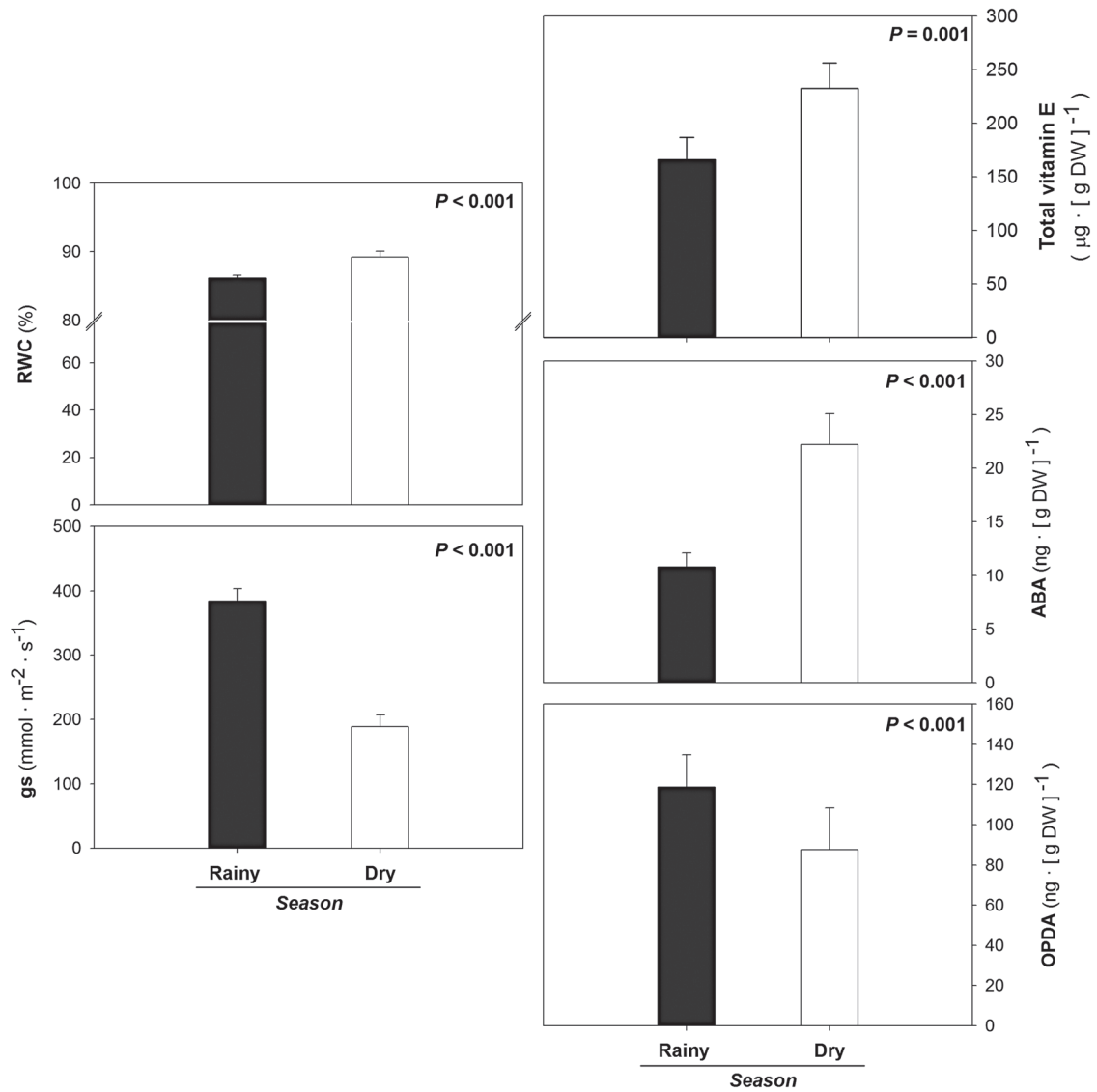


Figure 1. Changes in the relative water content (RWC), stomatal conductance (g_s), vitamin E levels and endogenous concentrations of abscisic acid (ABA) and 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA) during the dry season in *V. gigantea* leaves. Data represent the mean \pm SE of $n=36$. Significant differences between seasons are shown ($P < 0.0019$, Bonferroni adjusted).

Cheeseman (2006) and Queval et al. (2008). Samples were ground in liquid nitrogen and extracted with 5% trichloroacetic acid using a Branson 2510 ultrasonic cleaner (Branson, Danbury, CT, USA) for 30 min. The mixture was centrifuged at 13,000 rpm for 10 min at 4 °C and the pellet re-extracted following the same procedure. One hundred microlitres of the pooled supernatants were neutralized with 0.2 M Na₂CO₃. The neutralized extract was divided into two aliquots of 50 µl, and 4 units ml⁻¹ of ascorbate oxidase were added to each aliquot. To one aliquot, 50 units ml⁻¹ catalase was added and then all aliquots were kept at room temperature for 10 min in darkness. From both aliquots, those with and without catalase, 10 µl samples were incubated with 190 µl of eFOX reagent. The reaction solution was incubated for 45 min at room temperature in darkness. Hydrogen peroxide levels were measured spectrophotometrically at 550 nm following the eFOX assay as described by Cheeseman (2006).

Ascorbate was assayed spectrophotometrically after Foyer et al. (1983). Extraction was performed by grinding samples in liquid nitrogen, followed by addition of extraction buffer (6% metaphosphoric acid) using a Branson 2510 ultrasonic cleaner (Branson) for 30 min. The extract was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 4 °C and the pellet re-extracted following the same procedure. Then, the two supernatants were pooled and the amount of reduced ascorbate estimated spectrophotometrically as described by Foyer et al. (1983). The amount of total ascorbate was estimated by incubating the samples with dithiothreitol, and the amounts of dehydroascorbate was calculated as total ascorbate–reduced ascorbate. The oxidation state of ascorbate was calculated as DHA/(AA+DHA), where DHA is dehydroascorbate (oxidized ascorbate) and AA is reduced ascorbate.

The vitamin E composition of leaves, including both tocopherols and tocotrienols, was measured using methanolic extracts by high-performance liquid chromatography (HPLC) as described by Morales et al. (2014). Chlorophyll was assayed spectrophotometrically in the same extracts after Lichtenthaler and Wellburn (1983).

Stress-related phytohormones

Extraction and analyses of stress-related phytohormones, including ABA, SA and jasmonates, were performed using ultra-HPLC coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry (UHPLC/ESI-MS/MS) as described by Müller and Munné-Bosch (2011). Jasmonic acid (JA) profiling included the measurement of 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA), JA and jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile). Deuterium-labelled compounds for all phytohormones were used as internal standards to estimate recovery rates for each sample.

Statistical analysis

Effects of plant size and season on the response variables obtained in the field were tested using an analysis of covariance (ANCOVA, Bonferroni adjusted), with seasonal effect as a random

factor and plant size as a covariable. In addition, the response variables obtained in the field (parameters measured) were correlated by Spearman's rank correlation. All statistical tests were performed using the SPSS package (Chicago, IL, USA).

Results

Seasonal and plant size effects on water content, nutrient and phytohormone levels, and cellular redox state

ANCOVA (Bonferroni adjusted) revealed significant seasonal and plant size effects for the parameters measured in this study (Table 1). While plant size exerted a significant effect on foliar Mg accumulation, RWC, stomatal conductance, total vitamin E levels and ABA and OPDA concentrations were significantly influenced by season. A 51% reduction in stomatal conductance was observed during the dry season, associated with a slight increase (3.6%) in RWC (Figure 1). Low soil-water availability during the dry season was associated with 40% higher

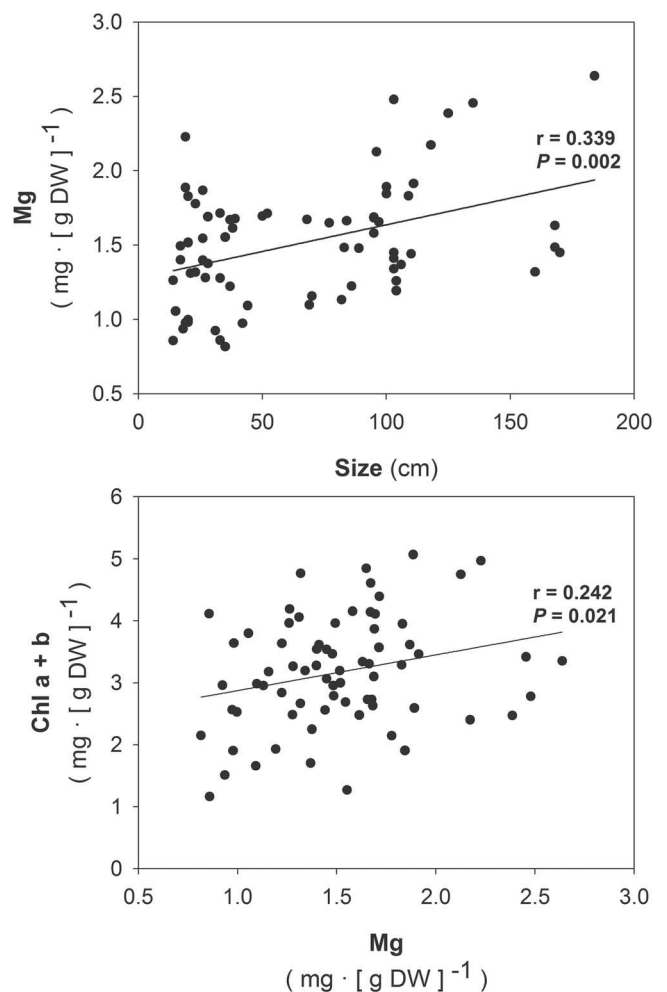


Figure 2. Spearman's rank correlation analyses between magnesium (Mg) contents and plant size and chlorophyll levels (Chl a + b). Significant *P* values (<0.05) and corresponding regression coefficients (*r*) are shown.

total vitamin E levels, 51% higher foliar ABA concentrations and 26% lower foliar OPDA concentrations (Figure 1). Foliar Mg content of *V. gigantea* increased as a function of plant size (increased stem perimeter of the plant, Figure 2). Magnesium is required for photosynthesis as a key constituent of chlorophyll molecules (Marschner 1995), and several studies have shown a positive relationship between Mg and chlorophyll levels (Candan and Tarhan 2003, Tewari et al. 2006). Therefore, we examined the levels of chlorophylls and confirmed this positive correlation in *V. gigantea* leaves (Figure 2). It is noteworthy, however, that chlorophyll levels in and of themselves were not significantly affected by plant size in the present study (data not shown).

Water, nutrient and redox status are associated with the levels of stress-related phytohormones

Since dry season significantly increased ABA levels and significantly decreased OPDA levels (Table 1), it was evaluated here whether or not water, nutrient and cellular redox also varied with the levels of the latter hormones (Table 2). Stomatal conductance negatively correlated with ABA, which positively correlated with the RWC (Table 2) that increased slightly during the dry season (Figure 1). Both Fe and Si contents correlated with both ABA and OPDA levels, showing positive and negative correlations with the former and latter, respectively (Table 2, Figure 3). Manganese contents positively correlated with ABA levels, whereas Ba and Sr correlated negatively with OPDA

Table 2. Coefficient (*r*) and *P*-values (shown in parentheses) of Spearman's rank correlation analyses between the leaf water, nutrient and redox state with endogenous concentrations of stress-related phytohormones in *V. gigantea* under field conditions. Significant *P* values (<0.05) are shown in bold.

Parameters	Jasmonates				
	ABA	OPDA	JA	JA-Ile	SA
Leaf water status					
Relative water content	0.314 (0.004)	-0.338 (0.002)	-0.073 (0.272)	-0.007 (0.477)	0.195 (0.052)
Leaf hydration	0.059 (0.313)	0.288 (0.007)	0.140 (0.121)	0.114 (0.171)	0.161 (0.090)
Stomatal conductance	-0.431 (< 0.001)	0.482 (< 0.001)	0.203 (0.058)	0.093 (0.237)	0.048 (0.357)
Nutrient contents					
C	0.154 (0.101)	0.021 (0.432)	-0.085 (0.240)	-0.071 (0.279)	-0.079 (0.258)
N	-0.081 (0.250)	0.375 (0.001)	0.110 (0.181)	-0.088 (0.233)	0.036 (0.384)
C/N	0.113 (0.174)	-0.381 (0.001)	-0.121 (0.158)	0.065 (0.296)	-0.048 (0.347)
P	0.037 (0.380)	0.118 (0.163)	0.059 (0.311)	-0.242 (0.021)	0.008 (0.475)
K	-0.096 (0.214)	0.089 (0.231)	-0.013 (0.457)	0.036 (0.382)	0.045 (0.355)
Ca	-0.017 (0.445)	-0.099 (0.206)	0.006 (0.481)	-0.018 (0.441)	-0.022 (0.429)
Mg	-0.092 (0.223)	-0.085 (0.241)	0.053 (0.330)	-0.080 (0.254)	0.052 (0.335)
S	0.005 (0.483)	0.119 (0.161)	0.005 (0.485)	0.182 (0.065)	0.096 (0.213)
Fe	0.227 (0.028)	-0.303 (0.005)	0.149 (0.108)	0.035 (0.387)	0.059 (0.313)
Zn	-0.181 (0.066)	-0.092 (0.222)	-0.053 (0.329)	-0.029 (0.406)	0.130 (0.139)
Mn	0.304 (0.005)	-0.005 (0.485)	0.076 (0.263)	0.028 (0.408)	0.016 (0.447)
Ba	0.109 (0.182)	-0.339 (0.002)	-0.076 (0.265)	-0.049 (0.344)	-0.050 (0.340)
Si	0.256 (0.015)	-0.315 (0.004)	0.118 (0.164)	-0.043 (0.362)	0.014 (0.454)
Sr	-0.040 (0.371)	-0.199 (0.048)	0.033 (0.393)	-0.061 (0.307)	-0.022 (0.428)
Redox state					
H ₂ O ₂	0.213 (0.037)	-0.219 (0.033)	-0.062 (0.303)	0.004 (0.487)	0.131 (0.138)
Ascorbate	0.176 (0.073)	-0.054 (0.330)	0.108 (0.186)	-0.070 (0.282)	0.073 (0.274)
Dehydroascorbate	0.051 (0.337)	-0.158 (0.096)	-0.085 (0.243)	-0.078 (0.260)	-0.219 (0.034)
Oxidation state	-0.135 (0.133)	-0.005 (0.485)	-0.188 (0.165)	0.043 (0.362)	-0.156 (0.099)
Vitamin E					
Total levels	0.342 (0.002)	-0.321 (0.004)	-0.121 (0.162)	-0.145 (0.118)	-0.072 (0.278)
α-Tocopherol	0.503 (< 0.001)	-0.316 (0.004)	-0.145 (0.117)	-0.126 (0.151)	0.006 (0.480)
β-Tocotrienol	0.427 (< 0.001)	-0.341 (0.002)	-0.091 (0.228)	-0.076 (0.268)	0.040 (0.373)
γ-Tocopherol	0.282 (0.009)	-0.234 (0.026)	0.057 (0.322)	-0.163 (0.091)	-0.065 (0.297)
γ-Tocotrienol	-0.048 (0.348)	-0.059 (0.314)	-0.175 (0.075)	-0.049 (0.343)	-0.175 (0.075)
Phytohormones					
ABA	1	-0.348 (0.001)	0.145 (0.113)	0.085 (0.240)	0.054 (0.326)
OPDA	-	1	0.110 (0.181)	0.047 (0.348)	-0.059 (0.311)
JA	-	-	1	0.392 (< 0.001)	0.137 (0.127)
JA-Ile	-	-	-	1	0.193 (0.054)
SA	-	-	-	-	1

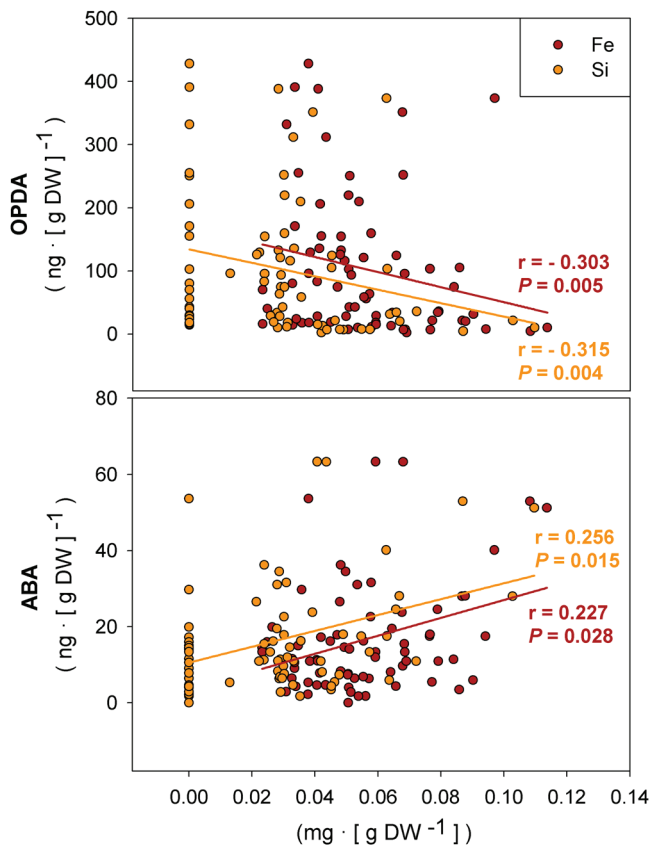


Figure 3. Spearman's rank correlation analyses between iron (Fe) and silicon (Si) contents and the endogenous concentrations of abscisic acid (ABA) and 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA) in *V. gigantea* leaves. Significant P values (<0.05) and corresponding regression coefficients (r) are shown.

levels (Table 2). Moreover, OPDA positively correlated with N and negatively correlated with the C:N ratio (Table 2). Phosphorus contents negatively correlated with JA-IIe, thus suggesting high JA-IIe levels at low P concentration (Table 2).

Hydrogen peroxide levels correlated positively with ABA and negatively with OPDA concentrations (Table 2, Figure 4). If the outlier showing the highest H_2O_2 levels is excluded from these correlations, both correlations are even more significant ($r=0.235$ and $P=0.025$ for H_2O_2 vs ABA; $r=-0.250$ and $P=0.018$ for H_2O_2 vs OPDA). Dehydroascorbate levels negatively correlated with SA concentrations (Table 2). Abscisic acid levels negatively correlated with OPDA concentrations, and JA with JA-IIe levels, but neither of these latter correlated with OPDA (Table 2).

Furthermore, vitamin E levels positively correlated with H_2O_2 and ABA levels (Figures 5 and 6), and negatively correlated with OPDA concentrations (Figure 7).

In summary, ABA and OPDA concentrations that are negatively correlated with each other exhibit an association with soil-water availability (as assessed by stomatal conductance), as well as with foliar Fe, Si and H_2O_2 levels.

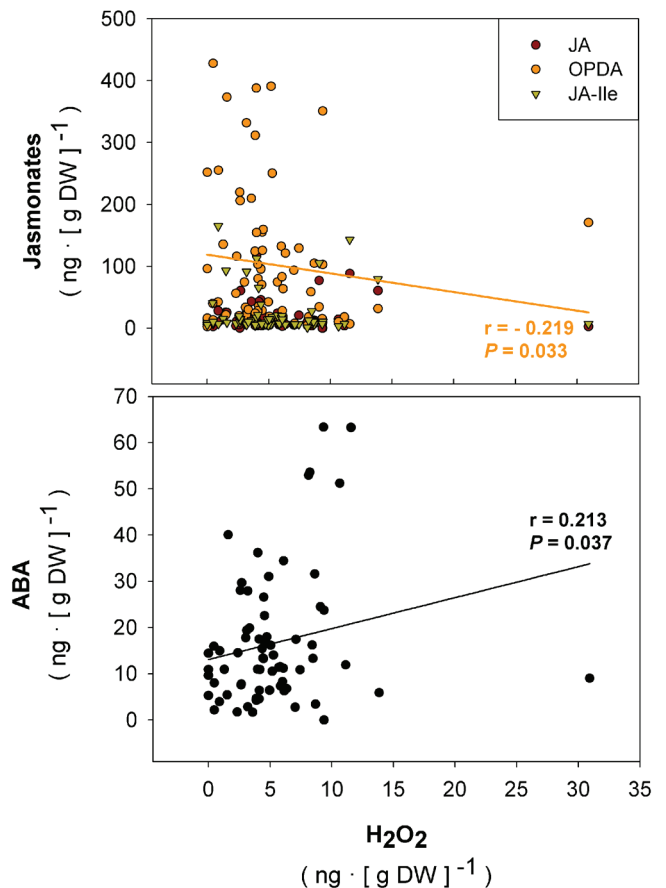


Figure 4. Spearman's rank correlation analyses between H_2O_2 and hormone concentrations in *V. gigantea* leaves. Significant P values (<0.05) and corresponding regression coefficients (r) are shown.

Discussion

Vellozia gigantea plants are adapted to grow under marked seasonal variations throughout the year. It is therefore expected that this species possesses efficient mechanisms to cope with environmental stresses. Previous studies conducted on this species demonstrate foliar vitamin E accumulation during the dry season which apparently acts to protect the photosynthetic apparatus from photo-oxidative stress (Morales et al. 2014). Here, we extended our study of the ecophysiological responses of this species by investigating the possible role of vitamin E as a compound integrating responses at the hormonal level.

The present study demonstrates both the usefulness and the limitations of studies using plants growing in their natural habitat. Although such studies are limited to correlative evidence, such studies are needed to evaluate the relevance of the nature of evidence obtained with model plants under laboratory conditions. During the dry season, *V. gigantea* plants are exposed to reductions in soil-water availability typical of the winter in the rupestrian fields of Brazil (see Morales et al. 2014 for environmental conditions during the rainy and dry seasons). Soil-water deficit was accompanied by increases in foliar ABA

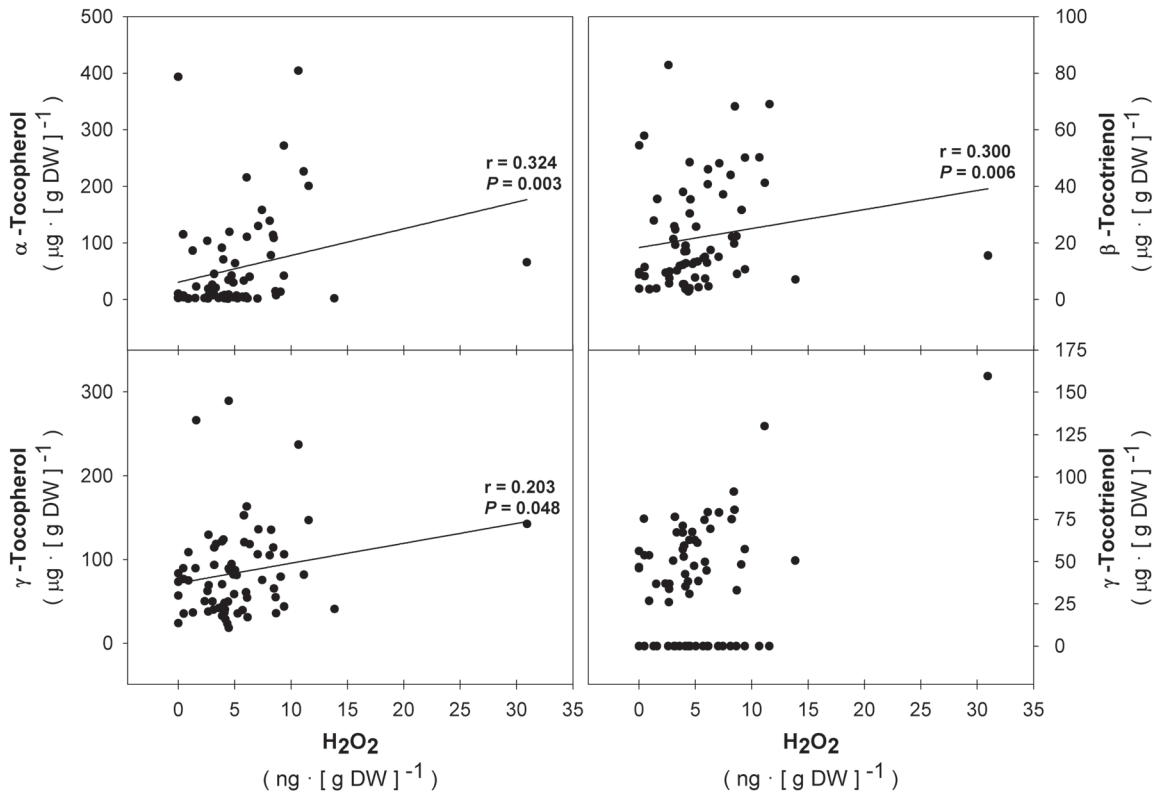


Figure 5. Spearman's rank correlation analyses between H_2O_2 and vitamin E levels in *V. gigantea* leaves. Significant P values (<0.05) and corresponding regression coefficients (r) are shown.

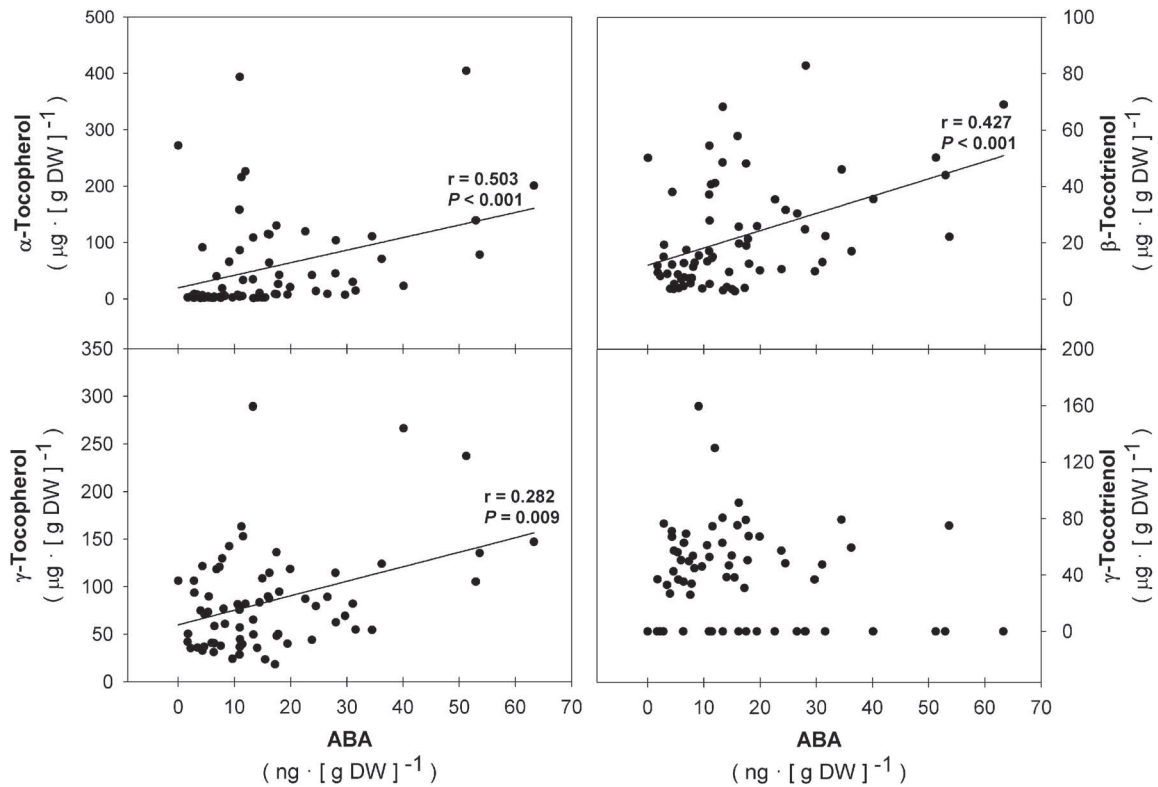


Figure 6. Spearman's rank correlation analyses between ABA and vitamin E levels in *V. gigantea* leaves. Significant P values (<0.05) and corresponding regression coefficients (r) are shown.

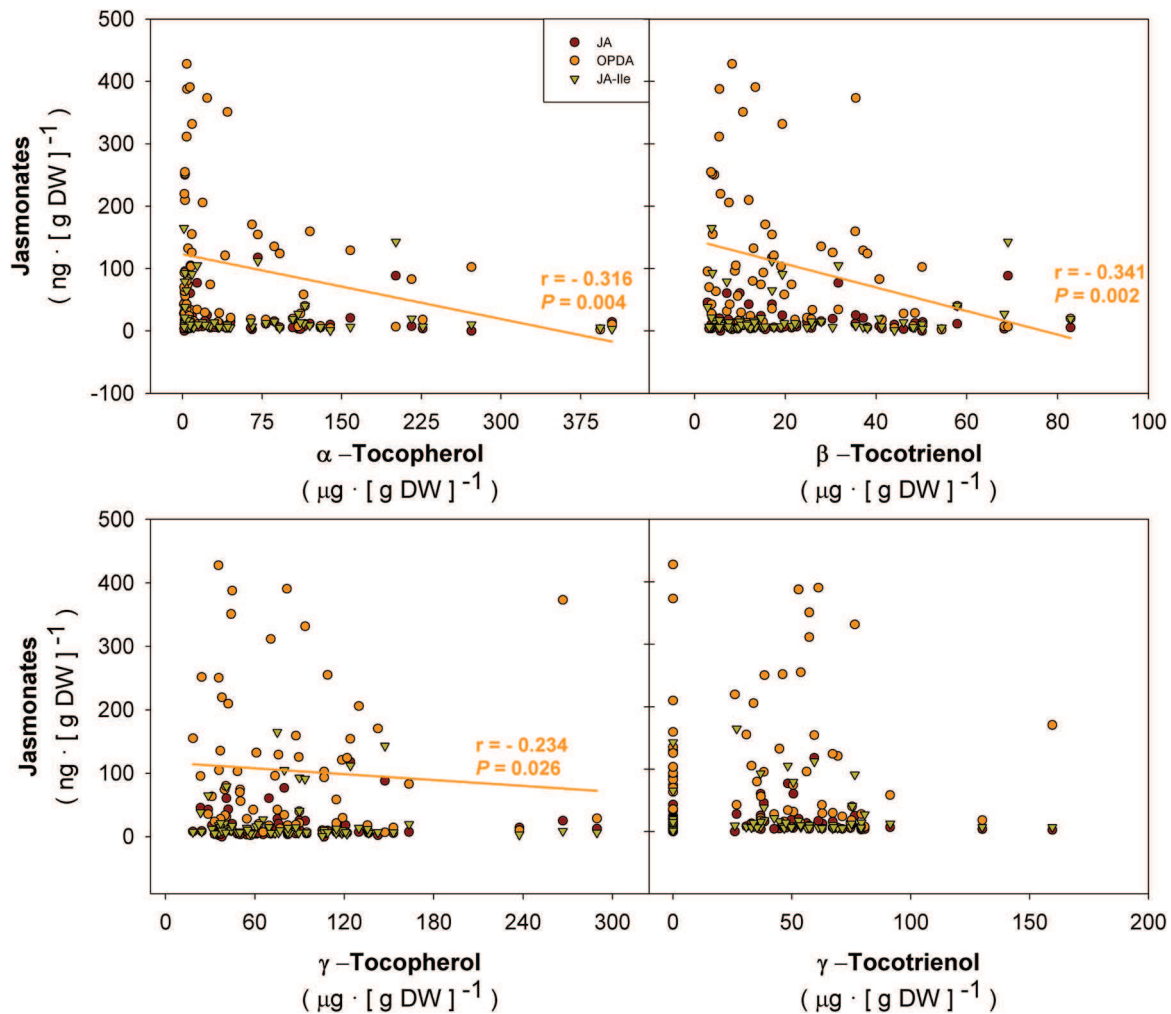


Figure 7. Spearman's rank correlation analyses between vitamin E and jasmonates, including 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA), jasmonic acid (JA) and jasmonic acid-isoleucine (JA-Ile) concentrations in *V. gigantea* leaves. Significant P values (<0.05) and corresponding regression coefficients (r) are shown.

concentrations and reductions in foliar OPDA levels. Interestingly, enhanced ABA levels during the dry season was not only associated with stomatal closure, but even with a slight improvement in leaf water status, as indicated by increases in RWC, thus indicating an efficient drought-avoiding strategy, as has been described for other species (Nardini et al. 1999). Stomatal closure during the dry season was presumably induced by ABA leading to increased resistance to water stress (Zeevaart and Creelman 1988). In addition, H_2O_2 is a signal molecule required for stomatal closure in response to ABA, via activation of Ca^{2+} channels (Pei et al. 2000, Desikan et al. 2004). Furthermore, ABA has also been shown to be involved in the activation of the antioxidant enzyme system through modulation of enzymatic activity and gene expression (Bright et al. 2006, Lu et al. 2009). Hydrogen peroxide has a role as a stress signal in plants, mediating a range of responses to environmental stresses (Neill et al. 2002). In the present study, however, enhanced ABA levels in *V. gigantea* were not

accompanied by increased H_2O_2 levels during the dry season (Table 1), although H_2O_2 and ABA levels were positively correlated (Figure 4). It has been previously suggested that ABA not only induces stomatal closure to transpirational water loss but may also, additionally, trigger activation of antioxidant defences. For example, vitamin E biosynthesis has been shown to be modulated by ABA (El Kayal et al. 2006, Munné-Bosch et al. 2009). Since both H_2O_2 and ABA levels correlated with vitamin E levels in the present study, but only ABA exhibited a net increase during the dry season, it is possible that vitamin E levels during the dry season (see Morales et al. 2014) are modulated by ABA increases, rather than by H_2O_2 . It should be noted that correlation coefficients were higher and P values smaller for the ABA–vitamin E correlation (Figure 6) than for the H_2O_2 –vitamin E correlation (Figure 5). A relationship between ABA and vitamin E biosynthesis is supported by studies on model plants, including the monocot rice, showing that tocopherol-biosynthesis genes have ABA-response

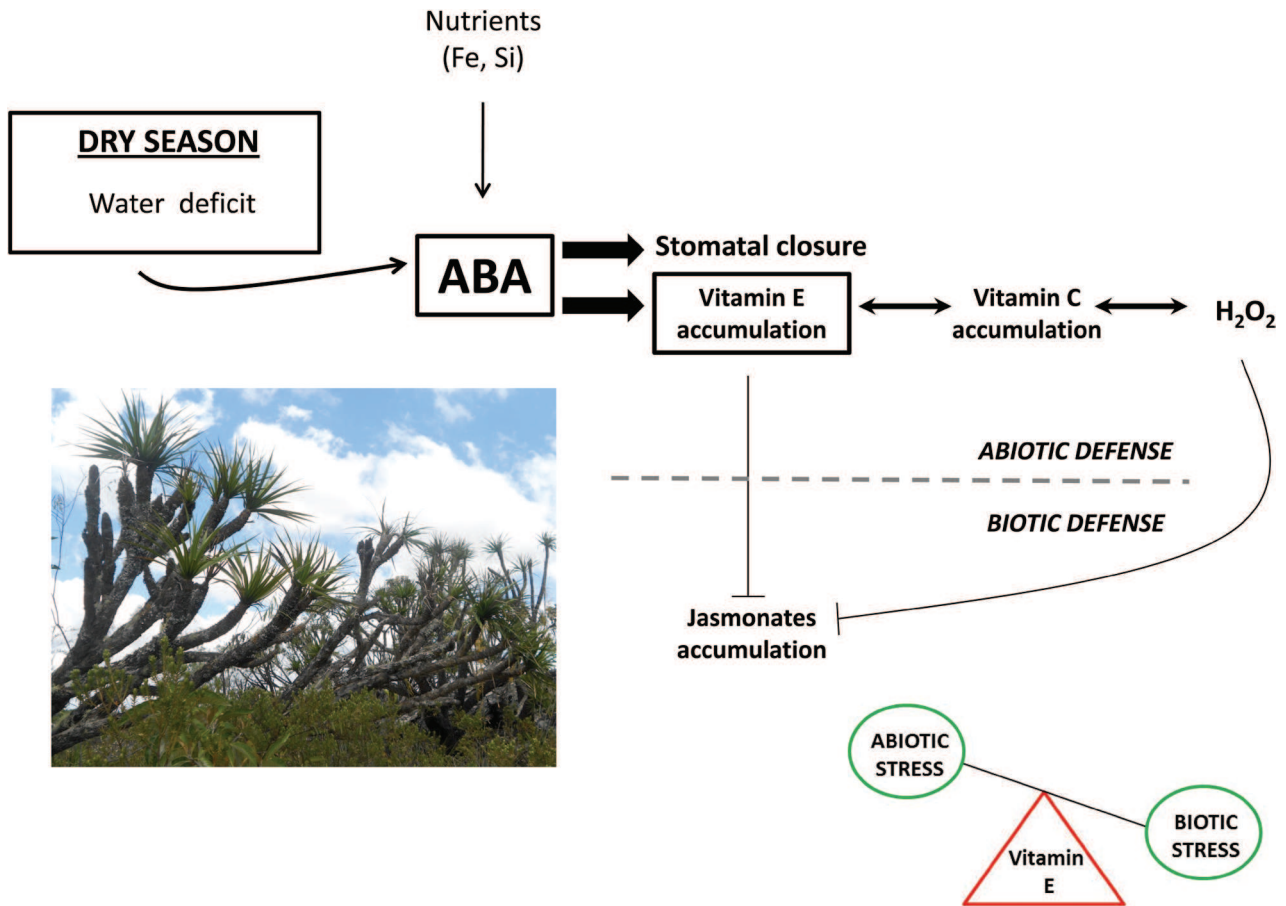


Figure 8. Proposed model showing the interaction between environmental stress factors, the cellular redox state and role of stress-related phytohormones during the dry season in *V. gigantea* leaves.

elements in their promoter region (Chaudhary and Khurana 2009).

Foliar Fe and Si contents, similar to all other nutrients measured here, did not change during the dry season, thus indicating efficient nutrient homeostasis during periods of low water availability. Nevertheless, foliar Fe and Si levels were both correlated positively with ABA levels and negatively with OPDA levels. Foliar Fe and Si levels are both associated with root activity that enhances nutrient uptake and improves nutrient balance (Liang et al. 2007). These nutrients are presumably required for ABA biosynthesis during the dry season since the limiting step in ABA biosynthesis, 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, requires a non-heme iron in its active site (Messing et al. 2010). Rupestrian field soils are acidic, nutrient-poor soils with low P concentrations (Benites et al. 2007, Lambers et al. 2010). Plants possess strategies to enhance the acquisition of soil nutrients, such as exudation of carboxylates that aid in the release and mobilization of P and micronutrients such as Mn from the soil, thus causing high foliar Mn contents (Oliveira et al. 2015) consistent with the high foliar Mn levels in *V. gigantea* plants shown in the present study and, furthermore, consistent with the positive correlation

between Mn levels and ABA levels shown here. A complex interaction among various nutrients (Fe, Si, Mn and P) may thus control hormonal levels of *V. gigantea* leaves. Mechanisms underlying nutrient homeostasis during the dry season and the link between nutrient and hormonal contents in this species warrant further investigation.

Jasmonates play a key role in plant responses to biotic stresses, including attack by herbivores, necrotrophic pathogens and wounding (Davies 2010). The most important jasmonates include JA-Ile and JA, as well as the JA precursor OPDA. Jasmonoyl-isoleucine is an important plant messenger that regulates, for example, expression of genes involved in plant defence (Berger 2002, Halitschke and Baldwin 2003, Devoto and Turner 2005). In addition to JA, OPDA also up-regulates defence in response to pathogen and insect attack and can act as a messenger independently of JA and JA-Ile (Danon et al. 2005, Taki et al. 2005). In the present study, OPDA levels decreased during the dry season, while JA and JA-Ile levels remained unaltered. JA, but not OPDA, has been shown to induce tyrosine aminotransferase activity, thereby increasing biosynthesis of tocopherols (Sandorf and Holländer-Czytko 2002). Our results provide correlative evidence that ABA, rather than jasmonates, induces vitamin

E biosynthesis during the dry season. Furthermore, the fact that vitamin E and OPDA levels correlated negatively is consistent with vitamin E playing a role in controlling jasmonates as it has been shown in model plants (Cela et al. 2011). Our results thus support a role for vitamin E, as appears to be the case for other chloroplast photoprotective molecules (see below), in the regulation of abiotic and biotic defenses. Evidence obtained thus far with mutants defective in thermal energy dissipation of excess energy in the chloroplast and in antioxidant protection suggest a link between increased ROS levels, increased oxylipin levels and increased defenses against certain pests or pathogens, such that a defect in photoprotective capacity can lead to altered plant responses to biotic stress (for reviews, see Demmig-Adams et al. 2013, 2014). This conclusion is unambiguously supported by our present study, where reduced accumulation of jasmonates was observed during the dry season in *V. gigantea* plants. In other words, ABA stimulates not only stomatal closure but, apparently, also tocopherol biosynthesis during the dry season as a protective response, but this response apparently turns down other defensive responses, such as OPDA accumulation, which may possibly compromise resistance to biotic stress during the dry season. Direct assays assessing biotic stress resistance during the dry season are needed to further evaluate this possibility.

A model is proposed to explain plant response to soil-water availability in *V. gigantea* considering some of the key variables measured in the present study (Figure 8). It is proposed that ABA plays a pivotal role in the ecophysiological response of *V. gigantea* to environmental stresses. Abscisic acid increases presumably induce stomatal closure and favour vitamin E accumulation. Enhanced vitamin E levels during the dry season may serve a photoprotective role, but at the same time presumably reduce OPDA levels, thus possibly compromising biotic stress resistance. It will be essential in future studies to examine the effects of vitamin E accumulation in biotic stress resistance, in particular considering its relationship with ABA and jasmonates effects.

Conclusions

Soil-water scarcity during the dry season triggers not only stomatal closure induced by ABA but also vitamin E synthesis and presumably increased antioxidant defences. The possibility is raised that vitamin E increases may, in turn, result in reduced accumulation of jasmonates, thus possibly compromising resistance to biotic stresses. It is proposed here that ABA plays a pivotal role in the ecophysiological response of *V. gigantea* to environmental stresses.

Acknowledgments

The authors thank Mayara C. Silva and Advanio I. Siqueira-Silva for their help with samplings. They are also very grateful to Maren Müller for her help with LC-MS/MS analyses. They are

very grateful to the Serveis Científico-tècnics (University of Barcelona) for technical assistance.

Conflict of interest

None declared.

Funding

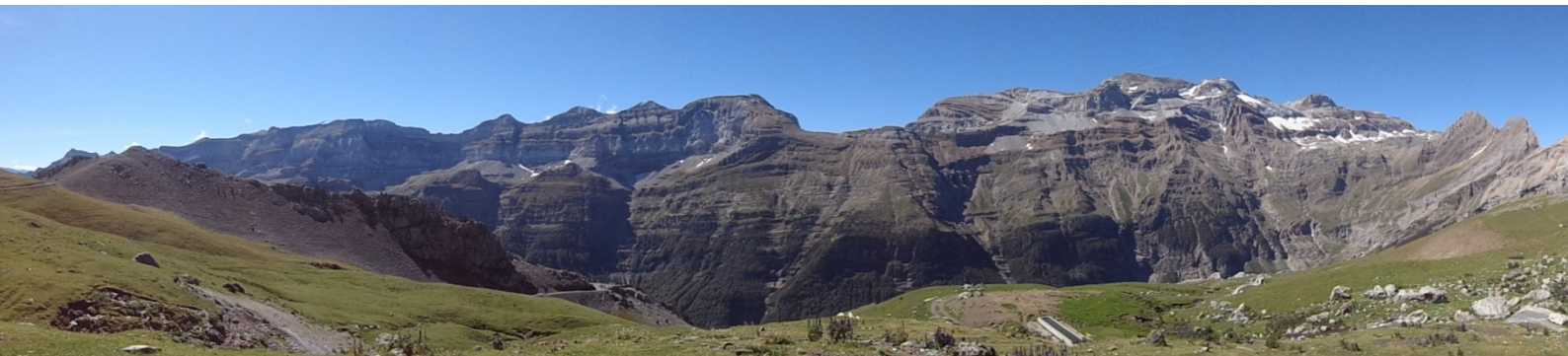
Support for the research was received through grant BFU2012-32057 from the Ministry of Science and Innovation of the Spanish Government, the ICREA Academia prize to S.M.-B., funded by the Catalan Government. Q.S.G. held a scholarship from CNPq (Brazil).

References

- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55:373–399.
- Bartels D (2001) Targeting detoxification pathways: an efficient approach to obtain plants with multiple stress tolerance? *Trends Plant Sci* 6:284–286.
- Bartels D, Sunkar R (2005) Drought and salt tolerance in plants. *Crit Rev Plant Sci* 24:23–58.
- Benites VM, Schaefer CEGR, Simas FNB, Santos HG (2007) Soils associated with rock outcrops in the Brazilian mountain ranges Mantiqueira and Espinhaço. *Rev Bras Bot* 30:569–577.
- Berger S (2002) Jasmonate-related mutants of *Arabidopsis* as tools for studying stress signaling. *Planta* 214:497–504.
- Bitencourt C, Rapini A (2014) Centres of endemism in the Espinhaço Range: identifying cradles and museums of Asclepiadoideae (Apocynaceae). *Syst Biodivers* 11:525–536.
- Bright J, Desikan R, Hancock JT, Weir IS, Neill SJ (2006) ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant J* 45:113–122.
- Calisto M, Moreno P, Barbosa FAR (2000) Habitat diversity and benthic functional trophic groups at Serra do Cipó, Southeast Brazil. *Rev Brasil Biol* 61:259–266.
- Candan N, Tarhan L (2003) Relationship among chlorophyll-carotenoid content, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels by Mg²⁺ deficiency in the *Mentha pulegium* leaves. *Plant Physiol Biochem* 41:35–40.
- Carvalho F, de Souza FA, Carrenho R, Moreira FMDS, Jesus EDC, Fernandes GW (2012) The mosaic of habitats in the high-altitude Brazilian rupestral fields is a hotspot for arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl Soil Ecol* 52:9–19.
- Carvalho F, Godoy EL, Lisboa FJG, Moreira FMDS, de Souza FA, Barbara RLL, Fernandes GW (2014) Relationship between physical and chemical soil attributes and plant species diversity in tropical mountain ecosystems from Brazil. *J Mt Sci* 11:875–883.
- 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.
- Chaudhary N, Khurana P (2009) Vitamin E biosynthesis genes in rice: molecular characterization, expression profiling and comparative phylogenetic analysis. *Plant Sci* 177:479–491.
- Cheeseman JM (2006) Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. *J Exp Bot* 57:2435–2444.
- Danon A, Miersch O, Felix G, Camp RG, Apel K (2005) Concurrent activation of cell death-regulating signaling pathways by singlet oxygen in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 41:68–80.

- Davies PJ (2010) The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: Davies PJ (ed) *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!* Springer, Dordrecht, pp 1–15.
- Demmig-Adams B, Cohu CM, Amiard V, van Zadelhoff G, Veldink GA, Muller O, Adams WW III (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 et al. (eds) *Non-photochemical quenching and energy dissipation in plants, algae and cyanobacteria, advances in photosynthesis and respiration* Vol. 40. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Desikan R, Cheung M-K, Clarke A, Goulding S, Sagi M, Fluhr R, Rock C, Hancock J, Neill S (2004) Hydrogen peroxide is a common signal for darkness- and ABA-induced stomatal closure in *Pisum sativum*. *Funct Plant Biol* 31:913–920.
- Devoto A, Turner JG (2005) Jasmonate-regulated *Arabidopsis* stress signalling network. *Physiol Plant* 123:161–172.
- El Kayal W, Keller G, Debayles C, Kumar R, Weier D, Teulieres C, Marque C (2006) Regulation of tocopherol biosynthesis through transcriptional control of tocopherol cyclase during cold hardening in *Eucalyptus gunnii*. *Physiol Plant* 126:212–223.
- Foyer CH, Noctor G (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17:1866–1875.
- Foyer CH, Noctor G (2015) Defining robust redox signalling within the context of the plant cell. *Plant Cell Environ* 38:239.
- Foyer C, Rowell J, Walker D (1983) Measurement of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. *Planta* 157:239–244.
- Giulietti AM, Harley RM, de Queiroz LP, Wanderley MGL, Van den Berg C (2005) Biodiversity and conservation of plants in Brazil. *Conserv Biol* 19:632–639.
- Halitschke R, Baldwin IT (2003) Antisense LOX expression increases herbivore performance by decreasing defense responses and inhibiting growth-related transcriptional reorganization in *Nicotiana attenuata*. *Plant J* 36:794–807.
- Köppen W (1990) Versuch einer Klassifikation der Klimate, vorzugsweise nach ihren Beziehungen zur Pflanzenwelt. *Geogr Z* 6:593–611.
- Köppen W, Geiger R (1954) *Klima der Erde*. Wall Map 1:16 Mill. Klett-Perthes, Gotha.
- Kottek M, Grieser J, Beck C, Rudolf B, Rubel F (2006) World map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorol Z* 15:259–263.
- Lambers H, Brundrett MC, Raven JA, Hopper SD (2010) Plant mineral nutrition in ancient landscapes: high plant species diversity on infertile soils is linked to functional diversity for nutritional strategies. *Plant Soil* 334:11–31.
- Liang Y, Sun W, Zhu Y-G, Christie P (2007) Mechanisms of silicon-mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: a review. *Environ Pollut* 147:422–428.
- Lichtenthaler HK, Wellburn AR (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochem Soc Trans* 11:591–592.
- Lousada JM, Borba EL, Ribeiro KT, Ribeiro LC, Lovato MB (2011) Genetic structure and variability of the endemic and vulnerable *Vellozia gigantea* (Velloziaceae) associated with the landscape in the Espinhaço Range, in southeastern Brazil: implications for conservation. *Genetica* 139:431–440.
- Lu S, Su W, Li H, Guo Z (2009) Abscisic acid improves drought tolerance of triploid bermudagrass and involves H₂O₂- and NO-induced antioxidant enzyme activities. *Plant Physiol Biochem* 47:132–138.
- Marschner H (1995) *Mineral nutrition of higher plants*, 2nd edn. Academic Press Inc., London.
- Medina BMO, Fernandes GW (2007) The potential of natural regeneration of rocky outcrop vegetation on rupestrian field soils in “Serra do Cipó”, Brazil. *Rev Bras Bot* 30:665–678.
- Mello-Silva R, de Menezes NL (1999) Two new Brazilian Velloziaceae, *Vellozia auriculata* and *Vellozia gigantea*, and a key to the related dracenoide species of *Vellozia*. *Novon* 9:536–541.
- Menezes NL, Giulietti AM (1986) Campos rupestres Paraíso botânico na Serra do Cipó. *Ciência Hoje* 5:38–44.
- Messing SAJ, Gabelli SB, Echeverria I, Vogel JT, Guan JC, Tan BC, Klee HJ, McCarty DR, Amzel LM (2010) Structural insights into maize *Viviparous14*, a key enzyme in the biosynthesis of the phytohormone abscisic acid. *Plant Cell* 22:2970–2980.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7:405–410.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9:1360–1385.
- Mooney HA, Winner WE, Pell EJ (1991) Response of plants to multiple stresses, 2nd edn. Academic Press, San Diego.
- Morales M, Garcia QS, Siqueira-Silva AI, Silva MC, Munné-Bosch S (2014) Tocotrienols in *Vellozia gigantea* leaves: occurrence and modulation by seasonal and plant size effects. *Planta* 240:437–446.
- 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. doi:10.1186/1746-4811-7-37.
- Munné-Bosch S, Alegre L (2003) Drought-induced changes in the redox state of alpha-tocopherol, ascorbate, and the diterpene carnosic acid in chloroplasts of Labiatae species differing in carnosic acid contents. *Plant Physiol* 131:1816–1825.
- Munné-Bosch S, Falará V, Pateraki I, López-Carbonell M, Cela J, Kanellis AK (2009) Physiological and molecular responses of the isoprenoid biosynthetic pathway in a drought-resistant Mediterranean shrub, *Cistus creticus* exposed to water deficit. *J Plant Physiol* 166:136–145.
- Munné-Bosch S, Queval G, Foyer CH (2013) The impact of global change factors on redox signaling underpinning stress tolerance. *Plant Physiol* 169:5–19.
- Nardini A, Lo Gullo MA, Salleo S (1999) Competitive strategies for water availability in two Mediterranean *Quercus* species. *Plant Cell Environ* 22:109–116.
- Neill SJ, Desikan R, Hancock JT (2002) Hydrogen peroxide signalling. *Plant Biol* 5:388–395.
- Noctor G, Mhamdi A, Foyer CH (2014) The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. *Plant Physiol* 164:1636–1648.
- Oliveira RS, Galvão HC, de Campos MCR, Eller CB, Pearse SJ, Lambers H (2015) Mineral nutrition of campos rupestres plant species on contrasting nutrient-impoverted soil types. *New Phytol* 205:1183–1194.
- Pei ZM, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klüsener B, Allen GJ, Grill E, Schroeder JI (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406:731–734.
- Peñuelas J, Munné-Bosch S, Llusià J, Filella I (2004) Leaf reflectance and photo- and antioxidant protection in field-grown summer-stressed *Phillyrea angustifolia*. Optical signals of oxidative stress? *New Phytol* 162:115–124.
- Queval G, Hager J, Gakière B, Noctor G (2008) Why are literature data for H₂O₂ contents so variable? A discussion of potential difficulties in the quantitative assay of leaf extracts. *J Exp Bot* 59:135–146.
- 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.
- Siles L, Cela J, Munné-Bosch S (2013) Vitamin E analyses in seeds reveal a dominant presence of tocotrienols over tocopherols in the Arecaeae family. *Phytochemistry* 95:207–214.
- Smirnoff N (1998) Plant resistance to environmental stress. *Curr Opin Plant Biol* 9:214–219.

- Steuer B, Stuhlfauth T, Fock HP (1988) The efficiency of water use in water stressed plants is increased due to ABA-induced stomatal closure. *Photosynth Res* 18:327–336.
- 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.
- Taki N, Sasaki-Sekimoto Y, Obayashi T et al. (2005) 12-oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 139:1268–1283.
- Tewari RK, Kumar P, Tewari N, Srivastava S, Sharma PN (2004) Macronutrient deficiencies and differential antioxidant responses—influence on the activity and expression of superoxide dismutase in maize. *Plant Sci* 166:687–694.
- Tewari RK, Kumar P, Sharma PN (2006) Magnesium deficiency induced oxidative stress and antioxidant responses in mulberry plants. *Sci Hortic* 108:7–14.
- Yousuf PY, Hakeem KUR, Chandna R, Ahmad P (2012) Role of glutathione reductase in plant abiotic stress. In: Ahmad P, Prasad MNV (eds) *Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability*. Springer, New York.
- Zang C, Hartl-Meier C, Dittmar C, Rothe A, Menzel A (2014) Patterns of drought tolerance in major European temperate forest trees: climatic drivers and levels of variability. *Glob Change Biol* 20:3767–3779.
- Zeevaart JAD, Creelman R (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39:439–473.
- Zhang J, Schurr U, Davies WJ (1987) Control of stomatal behaviour by abscisic acid which apparently originates in the roots. *J Exp Bot* 38:1174–1181.
- Zhu J-K (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* 53:247–273.



DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

1. Envel·liment en plantes perennes de gran longevitat

En la recerca per entendre els processos associats a l'envel·liment en els organismes, generalment les plantes perennes són donades com a exemple d'organismes que potencialment poden escapar als processos evolutius de la senescència, i és que, tal com es suggereix en estudis recents, les plantes semblen estar desafiant a l'envel·liment degut a les diferències bàsiques en els patrons de desenvolupament (Thomas, 2002; Munné-Bosch, 2008; Peñuelas & Munné-Bosch, 2010).

Per entendre aquestes diferències en els patrons de desenvolupament només cal observar la fase embrionària, a trets generals, d'animals i plantes. Mentre que el resultat de l'embriogènesi animal és una mini-rèplica d'un animal adult, amb tots els òrgans almenys ja iniciats; en l'embriogènesi de les plantes s'obté una estructura simple que consisteix en un meristema radicular, una arrel embrionària, l'hipocòtil, un o varis cotiledons i el meristema apical del brot. En les plantes, durant el desenvolupament postembrionari és quan tots els òrgans es formen a partir de les cèl·lules meristemàtiques que es troben en els meristemes (Bäurle i Laux, 2003) (**Figura 8**). Així doncs, és imprescindible considerar l'activitat dels meristemes en les plantes per entendre les diferències respecte altres organismes en els processos associats a l'edat en les plantes.

La llarga durada del desenvolupament en plantes perennes rau, principalment, en el paper clau dels meristemes. El meristema apical roman, almenys en un dels brots, indeterminat més enllà de la seva primera fase de creixement. Així doncs, s'ha descrit en algunes plantes perennes que poden viure durant segles mantenint els meristemes actius al llarg del temps i és que la organització del seu creixement està basada en la divisió i diferenciació dels meristemes (Thomas, 2002). L'activitat dels meristemes determina en bona

part la longevitat de les plantes perennes i fa que les plantes siguin tan diferents dels animals, sobretot a nivell de desenvolupament. La importància dels meristemes també rau en el seu perfecte manteniment al llarg del temps, i és que tal com s'ha descrit en algunes espècies, un augment de l'edat dels meristemes no comporta deteriorament fisiològic (Oñate & Munné-Bosch, 2008; Mencuccini *et al.*, 2014). A més a més, la totipotència dels meristemes pot romandre viable després de llargs períodes gràcies als períodes de dormició, que per exemple, s'activa en períodes d'estrès ambiental i permet a la planta reiniciar el seu creixement quan les condicions favorables retornen (Rohde & Bhalerao, 2007).

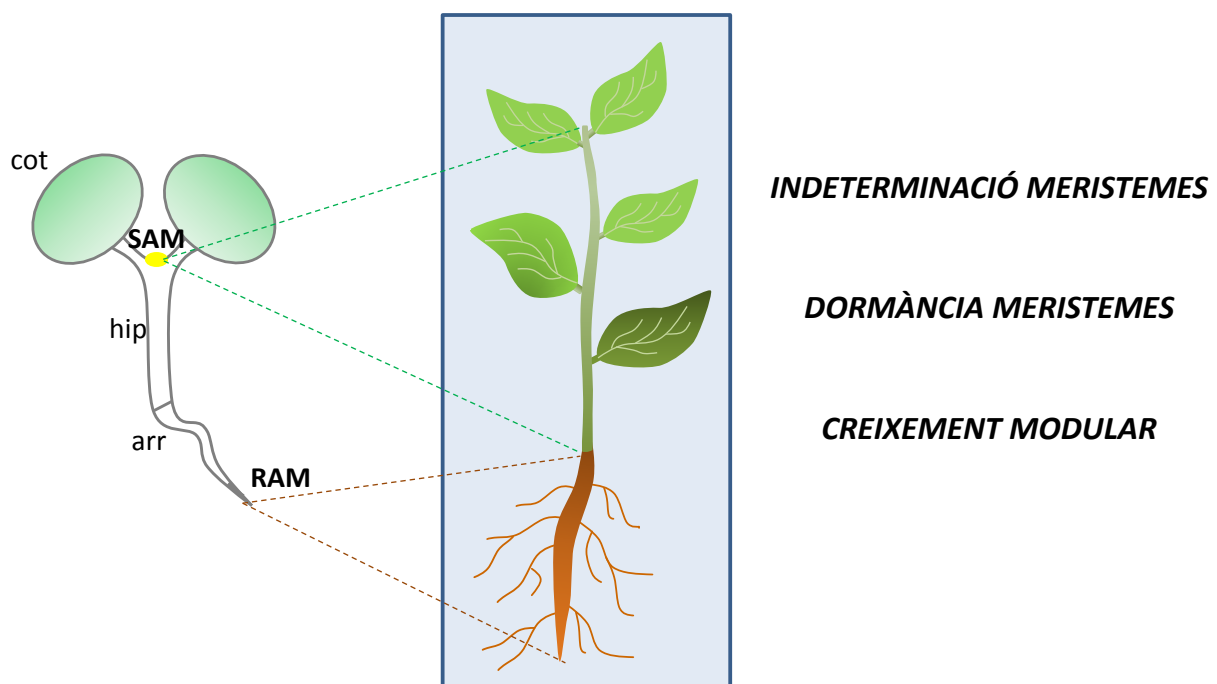


Figura 8. Desenvolupament postembrionari simplificat d'una planta. La plàntula que deriva de l'embrió (esquerra) es compon de dos cotiledons (cot), el SAM (sigles de l'anglès shoot apical meristem), l'hipocòtil (hip), l'arrel (arr) i el RAM (sigles de l'anglès root apical meristem). En plantes perennes sempre es manté una proporció de meristemes indeterminats que permeten el creixement continu al llarg del seu cicle vital.

D'altra banda, la indeterminació dels meristemes al llarg del temps en les plantes perennes permet el desenvolupament d'un creixement modular, punt clau per entendre la longevitat d'aquestes. Tal com s'ha descrit en algunes espècies, hi ha una relació entre les plantes de major tamany i l'augment de la seva capacitat reproductora amb l'edat (Finch, 1990; Vaupel *et al.*, 2004; Munné-Bosch, 2008) que podria ser deguda al creixement modular. La modularitat és al mateix temps un sistema de reparació en plantes ja que permet restaurar danys i reprendre el creixement de nous mòduls (per exemple noves branques).

La combinació d'aquests dos trets que caracteritza les plantes perennes (indeterminació dels meristemes i creixement modular) augmenta la plasticitat d'aquestes i redueix fortament el potencial dany causat pel propi metabolisme, fins a l'extrem que la probabilitat de morir per l'envelliment sigui insignificant. En definitiva, els estudis per entendre l'envelliment en plantes i els diversos mecanismes que regulen els processos de senescència a nivell de planta sencera són complexes i, poc a poc, els nous estudis ajuden a entendre aquest rol de processos interconnectats.

Considerant aquests trets essencials de les plantes perennes fan plantejar-nos, si més no, si aquestes realment pateixen un deteriorament fisiològic amb l'edat. Per aquesta raó, són necessàries més investigacions per estudiar l'efecte que té l'edat en l'organisme. Hem vist que hi ha un ampli rang de teories mecanicistes per explicar les causes de la senescència en els organismes (deterministes i estocàstiques) que al llarg de la història s'han estat contínuament polaritzant entre elles. Però, com molts autors han suggerit, només si tenim una visió holística i considerem l'envelliment com un procés multifactorial en el que participen tant factors ambientals (extrínsecs) com genètics (intrínsecs) podrem arribar-lo a entendre. A més, la importància de molts d'aquests factors són variables entre espècies i, fins i tot, en individus de la mateixa espècie. El desafiament pel futur és identificar quins factors són

els més rellevants i com s'interrelacionen en els processos associats a l'envelliment (Balcombe & Sinclair, 2001).

Per tant, una visió integradora actual de l'envelliment (Sas *et al.*, 2012) seria considerar aquesta com una extensió de la teoria del soma rebutjable la qual es centra en la idea que el manteniment cel·lular (per exemple, reparació DNA, recanvi de proteïnes, etc.) és costós i la capacitat per mantenir l'homeòstasi és redueix durant l'envelliment (Kirkwood, 2005). En conseqüència, les disfuncions i l'acumulació de mutacions genètiques (proposada per la teoria de l'acumulació de mutacions) farien que la senescència fos principalment causada per l'impacte acumulatiu de danys cel·lulars i moleculars (Kirkwood, 2005, 2008). A més a més, diversos mecanismes moleculars poden estar implicats, com l'acumulació de dany en les proteïnes (o també dels àcids nucleics, per les ROS) o la metilació del DNA. Tots aquests factors estarien implicats en augmentar el risc de mortalitat durant l'envelliment.

En aquesta tesi s'han utilitzat dos models de plantes perennes de gran longevitat, en les que hem estudiat l'envelliment en termes d'estrès oxidatiu, fent referència a la teoria dels radicals lliures. D'una banda, s'ha estudiat si l'estrès oxidatiu augmenta amb l'edat, el tamany o el sexe (factors interns de l'organisme); i d'altra banda, si els estressos ambientals (factors externs) als quals les plantes estudiades es troben sotmeses en les condicions naturals dels seus hàbitats respectius poden estar implicades en la resposta a l'envelliment de la planta, en relació a l'estrès oxidatiu.

1.1. L'envelliment en la natura

En el camp de la biologia, el mètode de recerca típic és observar un procés natural i, després, tractar d'entendre i explicar el procés realitzant investigacions en condicions controlades, sovint al laboratori. Referent a això, la investigació sobre els processos de senescència en els organismes segueix un camí inusual ja que, en molts taxons d'animals i els principals estudis en plantes, és primer estudiada (i en la majoria de vegades, únicament) en condicions de captivitat o de laboratori (Monaghan *et al.*, 2008).

El principal consens al que arriben els científics que investiguen el procés de la senescència és la necessitat de dur a terme més estudis en condicions naturals que incloguin el rang taxonòmic d'organismes més ampli possible. En aquest sentit, s'espera que la realització de més comparacions interespecífiques generi, probablement, nous coneixements sobre l'evolució i els mecanismes relacionats amb l'envelliment. Com ha remarcat recentment Partridge & Gems (2007), l'extrapolació dels resultats en condicions controlades de laboratori té els seus límits, especialment per als processos que afecten als trets en la història del cicle vital altament influenciats per les condicions ambientals, com en aquest cas estaria sent l'envelliment de les plantes, en les que diversos autors ja han alertat de la possibilitat que l'efecte de l'edat es trobi emmascarat pels estressos ambientals (Kirkpatrick, 1984; Hansen *et al.*, 1992; Vaupel *et al.*, 2004, Oñate & Munné-Bosch, 2010; Roach & Carey, 2014). Un altre aspecte a favor dels estudis realitzats en la naturalesa és que també ofereixen l'oportunitat d'estudiar els organismes que són difícils de mantenir en el laboratori.

En termes generals, diversos autors han arribat a la conclusió que l'envelliment difícilment pot donar-se en les poblacions naturals, ja que pocs individus sobreviuen i són capaços d'assolir edats elevades a causa de les condicions ambientals adverses a les quals s'enfronten (Comfort, 1979;

Hayflick, 2000; Medawar, 1952). Aquesta expectativa, de que l'envelliment no es pot trobar en la naturalesa, ha estat discutit durant els últims 50 anys (Kirkwood & Austad, 2000), ja que empíricament hi havia pocs estudis demogràfics d'individus amb edats conegudes per contradir aquesta afirmació. Recentment, alguns autors plantegen models teòrics que desafien algunes d'aquestes expectatives clàssiques (Baudisch, 2005, Williams *et al.*, 2006), a la vegada que alguns estudis longitudinals a llarg termini – amb individus marcats–sugereixen que la senescència és una fase important de la història del cicle vital en els organismes estudiats en poblacions naturals (Roach & Carey, 2014).

Referent a aquests experiments, estudis demogràfics realitzats en herbàcies perennes han demostrat que hi ha un efecte de l'edat sobre la mortalitat (Laurenroth & Adler, 2008; Roach, 2012), però això no ha estat observat en l'herbàcia perenne – no clonal – més longeva registrada fins a l'actualitat, *B. pyrenaica* (García *et al.*, 2011). Estudis comparatius realitzats en la planta herbàcia *Plantago lanceolata*, en condicions controlades i en condicions naturals, mostren que la longevitat màxima de l'espècie es redueix significativament en condicions naturals i que, a més a més, en condicions controlades els estressos ambientals provoquen un augment de la mortalitat en els individus més vells (Roach *et al.*, 2009; Roach, 2012). En condicions naturals els patrons d'envelliment depenen de les condicions de l'individu, és a dir, qualsevol factor de mortalitat interactua amb l'estat fisiològic de l'individu el qual pot incrementar la seva mortalitat. Molts autors fan referència a aquesta mortalitat diferencial determinada per les condicions ambientals, ja sigui per factors abiòtics com per les pressions biòtiques de depredació, malalties i competició (Abrams, 1993; Williams & Day, 2003; Williams *et al.*, 2006). Tot i així, en l'actualitat encara existeix controvèrsia sobre la senescència en les poblacions naturals.

En aquesta tesi, els estudis realitzats en poblacions naturals de dues espècies de plantes perennes de gran longevitat – *B. pyrenaica* i *V. gigantea*– suggereixen l'absència de deteriorament fisiològic associat a l'edat de l'organisme, almenys fins a les edats estudiades i en els paràmetres mesurats. Alguns dels diferents marcadors analitzats, com per exemple el creixement en *B. pyrenaica*, van augmentar amb l'edat de l'organisme. D'altra banda, els marcadors de deteriorament fisiològic no varen canviar ni amb l'edat ni amb el tamany de la planta. En aquestes espècies és difícil la realització d'estudis longitudinals, donada la peculiar localització de *B. pyrenaica* que es troba en tarteres alpines i que, a més, anualment perd la part aèria dificultant el seu marcatge i seguiment dels individus per realitzar estudis demogràfics. En el cas de *V. gigantea*, el baix nombre d'individus que representen una mateixa població impedeix una fiable modelització demogràfica. Ambdós espècies són de creixement lent i, probablement, és aquí on rau part de l'essència per entendre perquè aquestes plantes de gran longevitat no mostren signes de senescència.

D'altra banda, els estudis sobre envelliment també presenten algunes limitacions. Una de les principals controvèrsies sobre aquests estudis es plantegen per alguns autors, els quals es qüestionen parlar d'envelliment en poblacions naturals, considerant que l'envelliment és un efecte de la civilització, conseqüència dels avanços en higiene i medicina. Dins d'aquesta visió, el terme d'envelliment només s'aplicaria en humans i animals en captivitat (Hayflick, 2000; Monaghan *et al.*, 2008). A més a més, buscant en les arrels llatines del lèxic, la paraula senescència prové del llatí "senex", que significa home gran o envellit, indicatiu que remarca l'ús generalitzat del terme en referència al món animal o humà.

1.2. Casos que desafien l'envelliment

En la natura s'observen organismes amb una àmplia diversitat de formes de viure, envellir i morir. Segons la classificació de Klarsfeld & Revah (2002), els organismes es poden agrupar en tres categories atenent la intensitat i rapidesa del seu envelliment, que és la següent:

- Primera categoria: organismes en els que la mort sembla estar programada. En general només es reproduïxen una vegada en la seva vida, fins i tot reduïda a una única estació (per exemple les plantes anuals), sobreposant-se la mort a continuació.
- Segona categoria: majoria d'espècies en les que la mortalitat augmenta amb l'edat de forma progressiva i quasi sempre seguint la corba de Gompertz (augmenta la taxa de mortalitat amb l'edat). S'inclouen organismes amb esperances de vida que oscil·len des de dies (llevats), diversos mesos (peixos) o anys (majoria de mamífers i aus, i humans). En aquest grup es troba la noció general d'envelliment.
- Tercera categoria: és la més fascinant des del punt de vista humà i científic. Són les espècies amb envelliment menyspreable o negligible, on es troben englobades algunes de les espècies de plantes perennes.

Aquest últim grup sembla estar obrint les portes al concepte de la immortalitat potencial en els organismes, tot i que en l'actualitat no es disposen de proves definitives per confirmar-ho. Els estudis en plantes perennes es troben limitats per les dificultats que implica treballar amb organismes de gran longevitat, però aquests estudis són essencials per millorar el coneixement sobre la qüestió biològica clàssica de l'envelliment.

En aquesta tesi es varen escollir dos models de plantes perennes de gran longevitat per estudiar l'envelliment, en els quals es van obtenir interessants resultats i han permès aportar nous coneixements en aquest camp

tan poc investigat. Cal remarcar que l'envel·liment ha estat estudiat a nivell fisiològic, sent el nostre focus l'estrès oxidatiu.

Tot i que el plantejament d'aquests conceptes sembli imprudent i exaltant per la falta de documentació, fins i tot inadmissible per als qui creuen que "res escapa a l'envel·liment"; és innegable que s'ha de discutir per què alguns organismes semblen no mostrar signes d'envel·liment.

A) Senescència negativa en *Borderea pyrenaica*

Tal com va descriure Vaupel *et al.* (2004), si la mortalitat disminueix quan augmenta el tamany de l'organisme, i si el tamany augmenta amb l'edat, llavors, la mortalitat disminueix amb l'edat i succeeix el fenomen conegut com a senescència negativa. En altres paraules, el concepte de senescència negativa fa referència al procés contrari de la senescència (recordant la definició d'aquesta com un empitjorament de les funcions fisiològiques amb l'edat), donant-se llavors una millora de les funcions fisiològiques amb l'edat, observant fins i tot, una millora en el rendiment dels individus més vells. En el cas de la senescència negativa la fertilitat i la funcionalitat de l'individu millora amb l'edat (associat a una reducció de la mortalitat), succeint el contrari al procés de senescència àmpliament acceptat (Finch, 1990).

Tot i que aquest fenomen no és comú entre la diversitat d'espècies que es coneixen, si s'ha observat dins del regne vegetal en algunes herbàcies perennes com *B. pyrenaica* (García *et al.*, 2011), en que augmenten les taxes de supervivència i reproducció amb l'edat en individus de fins a 260 anys, i eventualment en *P. lanceolata* (Roach & Gampe, 2004), la qual mostra un augment del tamany després d'assolir la maduresa reproductiva com a resposta per escapar de la senescència demogràfica. A més a més, també s'ha observat en altres espècies de l'arbre filogenètic (Vaupel *et al.*, 2004; Congdon *et al.*, 2013; Jones *et al.*, 2014).

En els estudis realitzats amb *B. pyrenaica* en aquesta tesi s'ha pogut observar aquest fenomen, tal com s'observa en els resultats obtinguts del **capítol 1 i 2**, en els quals es varen analitzar marcadors d'estrès oxidatiu per tal d'avaluar l'efecte de l'edat de l'organisme, tant en les fulles com en l'òrgan perenne de l'espècie (els tubercles).

Fins a l'actualitat molt pocs estudis s'han realitzat considerant l'edat com un factor intrínsec que desencadena deteriorament fisiològic a nivell d'organisme en plantes perennes (Munné-Bosch & Alegre, 2002; Mencuccini *et al.*, 2005; Munné-Bosch & Lalueza, 2007; Oñate & Munné-Bosch, 2009; Ally *et al.*, 2010; Hernández *et al.*, 2011). L'estudi presentat en el **capítol 1** suposa el primer estudi dissenyat per tal d'investigar els canvis associats a l'edat en marcadors d'estrès oxidatiu en una planta perenne de gran longevitat. Estudis que, posteriorment, es van complementar amb el desenvolupament d'un segon estudi focalitzat en l'òrgan perenne de l'organisme (**capítol 2**).

Així doncs, es va avaluar si la senescència demogràfica, negligible o negativa en *B. pyrenaica* descrita en estudis anteriors per García *et al.* (2011) es correlacionava amb una millora del rendiment fisiològic. En el primer estudi, presentat en el **capítol 1**, no es varen observar signes de deteriorament fisiològic amb l'edat, ni en els paràmetres per caracteritzar l'estat hídric de les fulles ni en els marcadors d'estrès foto-oxidatiu mesurats. Ni la maduresa ni la dioècia de la planta tampoc van tenir efecte en cap d'aquests paràmetres. Cal remarcar que l'absència de signes de senescència (en termes d'estrès oxidatiu) es va corroborar en plantes mostrejades en anys independents (2008, 2010 i 2011). Aquests resultats estan en contraposició als estudis realitzats en plantes anuals que s'utilitzen com a model d'estudi en plantes, com *A. thaliana*, en les que els marcadors d'estrès oxidatiu analitzats estan associats amb processos de deteriorament fisiològic i, generalment, associats amb l'envelliment (Wingler *et al.*, 2006; Abreu & Munné-Bosch, 2009). Aquests estudis reforcen la importància d'impulsar estudis

d'envelliment en espècies perennes, i no únicament en plantes anuals o plantes models, ja que davant la gran diversitat d'espècies també es poden trobar patrons d'envelliment molt diferents.

No obstant, els resultats més sorprenents d'aquest estudi s'obtingueren en l'experiment realitzat al laboratori en el qual individus d'un ampli rang d'edats (d'1 a 280 anys) mostrejats a l'estiu del 2011 es varen sotmetre a una dessecació severa per estudiar la seva potencial tolerància en condicions d'estrès hídric. Per analitzar els resultats es van considerar diversos grups d'edat i sexe tenint el grup de plantes juvenils (no reproductives) respecte les plantes mascles i femelles [reproductives i diferenciant aquestes últimes en menors i majors de 100 anys (no centenàries i centenàries, respectivament)]. Les plantes femelles centenàries mostraren un millor rendiment fisiològic en resposta a la dessecació, tenint una major retenció d'aigua i menor degradació de clorofil·les, així com una major capacitat de fotoprotecció donada per l'augment dels nivells dels components del cicle de les xantofil·les (VZA), concretament de la violaxantina, que possiblement estarien implicats en mantenir els nivells de la integritat del fotosistema II (F_v/F_m) més elevats respecte els altres grups de plantes. Aquests resultats van confirmar l'absència de senescència i, fins i tot, suggereixen senescència negativa en femelles de *B. pyrenaica*.

En el **capítol 2**, els estudis duts a terme amb el tubercle donen suport, encara més, a la noció de que aquesta herbàcia perenne mostra senescència negativa i que la seva mortalitat ha de ser explicada per altres factors adversos independents a l'edat. De fet, en comparació amb altres plantes, *B. pyrenaica* és única en els seus patrons de fertilitat i mortalitat amb l'envelliment (Jones *et al.*, 2014). En aquest estudi es varen aportar proves de que aquesta espècie vegetal té característiques fisiològiques úniques subjacents als seus trets demogràfics distintius, i que el secret de la seva llarga vida pot amagar-se sota terra, en l'òrgan perenne.

Per últim, cal destacar un dels trets més peculiars de *B. pyrenaica*. Tal com s'ha comentat anteriorment, nombrosos autors han descrit que l'activitat dels meristemes determina la longevitat de les plantes perennes (Thomas, 2002; Weigel & Jürgens, 2002; Bäurle & Laux, 2003; Peñuelas & Munné-Bosch, 2010, 2014) i en aquest sentit, *B. pyrenaica* presenta una interessant estratègia que podria ser responsable de la seva gran longevitat. En el tubercle es troben cinc punts meristemàtics, dels quals cada any només s'activa un d'ells per desenvolupar la part aèria (tiges i fulles) i posteriorment les estructures reproductives (flors i fruits, aquests últims en el cas de les femelles). A més, els meristemes es van activant seqüencialment de forma alterna, això vol dir que després d'activar-se un any concret, no es torna a activar durant els 4 anys següents, mantenint-se en estat de dormició o latència. Per exemple, una planta de 100 anys només haurà activat el mateix punt meristemàtic 20 vegades i, per tant, l'edat fisiològica dels meristemes és un 80 % més jove que l'edat cronològica que ens indica la planta sencera. En relació a la teoria sobre l'envelliment de l'acumulació de les mutacions en la divisió cel·lular, aquest estratègia podria ser un eficient mecanisme per reduir el dany i, per tant, desafiar l'envelliment.

Per tant, l'estratègia en l'alternança de l'activació-dormició dels meristemes podria relacionar-se amb l'extraordinària longevitat d'aquesta peculiar espècie, i a la vegada explicar la seva extraordinària resistència a les variacions ambientals des de l'època del Terciari, essent actualment una espècie relict i endèmica dels Pirineus Centrals.

B) Senescència negligible en *Vellozia gigantea*

Davant l'observació en la natura del fet que hi ha d'una àmplia diversitat en la longevitat de les espècies i les seves corresponents taxes de mortalitat, es va proposar la classificació d'una nova categoria que es distingia pels propis trets de la seva història vital, caracteritzats per canvis inapreciables (negligibles) en les taxes de mortalitat dels adults durant períodes prolongats de temps en edats adultes avançades (Finch, 1990). Altres criteris addicionals a aquest concepte inclouen el manteniment de la reproducció inalterable en edats avançades. En resum, el concepte de senescència negligible fa referència a aquelles espècies que no mostren, aparentment, una disminució funcional ni un augment en la mortalitat amb l'edat de l'organisme.

Al llarg de la identificació i l'anàlisi d'una sèrie d'espècies candidates en aquest inusual (fins a la data) fenomen de senescència negligible s'han inclòs – en organismes no clonals – des dels peixos de roca i tortugues, fins espècies del regne vegetal com els pins longeus. Tot i que el plantejament d'aquest concepte (com l'anterior de senescència negativa) sembli inapropiat per alguns autors, sembla inevitable donada la descripció d'espècies taxonòmicament distants amb signes de senescència negligible, a més de les evidències teòriques que han estat donades sobre aquest fenomen en les plantes i algunes classes d'animals (Vaupel *et al.*, 2004).

En aquest àmbit cal esmentar la importància de les investigacions realitzades per Finch i els seus col·legues (Finch, 1990; Finch & Austad, 2001; Ottinger *et al.*, 2003) en les que s'han suggerit una gran diversitat d'espècies que podrien estar caracteritzades per unes taxes de mortalitat que romandrien estables o com a molt, incrementarien molt lentament, amb l'edat.

La planta perenne estudiada en aquesta tesi pertany a la família *Velloziaceae*, la qual inclou diverses espècies en les que s'ha descrit que poden assolir fins els 500 anys d'edat (Alves, 1994). Representatives de la peculiar

vegetació que conforma el *Cerrado*, en els *campos rupestres* de la regió muntanyosa de la *Serra do Cipó* al Brasil, són un exemple del poc coneixement actual que es disposa sobre la vegetació, així com succeeix amb la fauna, d'alguns dels punts de biodiversitat més grans del món. L'impuls en els últims anys per investigar aquestes espècies aporta contínuament nous descobriments, com la descripció recent de noves espècies pertanyents a la família de les *Velloziaceae* (Alves *et al.*, 2014; Mello-Silva & Menezes, 2014).

En aquest marc, els nostres estudis són pioners en l'espècie *V. gigantea*, tant a nivell d'estudiar la ecofisiologia de les fulles com profunditzar en l'efecte del tamany d'aquesta espècie arborescent al llarg de les variacions climàtiques estacionals. Els dos estudis realitzats van mostrar que tant a nivell d'estat hídric com nutricional, així com de l'estat redox cel·lular i hormonal, no hi havia diferències entre els diferents tamanyos de plantes que significués un declivi de l'estat fisiològic de la planta amb el tamany, considerant aquest com un factor intrínsec a l'edat.

V. gigantea va mostrar una eficient adaptació al dèficit hídric durant l'estació seca i no es va observar un efecte del tamany, tot i que en altres espècies s'ha descrit que l'edat influeix en la resposta fisiològica de les plantes en condicions d'estrès (Munné-Bosch & Lalueza, 2007; Hernández *et al.*, 2011). No només les plantes de major tamany van mostrar una eficient homeòstasi hídrica i nutricional, almenys igual d'eficient que les de menor tamany; sinó que a més els nivells de la vitamina E, important mecanisme de protecció contra l'estrès oxidatiu, van ser significativament més alts en les plantes de major tamany.

Per tant, en l'espècie endèmica *V. gigantea* no es varen observar signes de deteriorament fisiològic en termes d'estrès oxidatiu associats al tamany de la planta sota les condicions climàtiques naturals on creix, en plantes de major tamany i, probablement centenàries. Cal tenir present que tot i que aquesta

espècie arborescent no es pot datar, el seu creixement és molt lent, fet que, associat al seu enorme tamany, fa pensar als habitants de la regió que és una espècie que pot viure fàcilment més de 500 anys.

1.3. L'estrès oxidatiu no augmenta amb l'edat o el tamany

Al llarg de l'evolució, els éssers vius han adquirit diverses estratègies les quals es poden interpretar com a mecanismes de compensació que, segons la llei de la selecció natural, han desenvolupat per adaptar-se i sobreviure (Monaghan *et al.*, 2009). En general, es considera que aquestes compensacions tenen una base fisiològica (Zera & Harshman, 2001), tot i així, hi ha poc coneixement sobre aquests mecanismes i com evolucionen.

Recentment, els ecòlegs evolutius estan prenent un gran interès en un d'aquests mecanismes de compensació, que és l'estrès oxidatiu (Monaghan *et al.*, 2009; Selman *et al.*, 2012). Evolutivament, els organismes aeròbics han tingut la necessitat d'equilibrar l'eficiència energètica amb els productes potencialment tòxics (com les ROS) que causa l'ús de l'oxigen en el seu metabolisme, sent aquesta la base per entendre l'estrès oxidatiu com un mecanisme de compensació al llarg de l'evolució dels organismes. Tot i que els organismes han desenvolupat mecanismes antioxidants per contrarestar i evitar el dany oxidatiu, a vegades, aquest es produeix inevitablement. L'acumulació d'aquest dany amb l'edat és la base de la teoria tan coneguda com és la dels radicals lliures sobre l'envelliment, àmpliament estudiada i acceptada en humans (Harman, 1956; Beckman & Ames, 1998; Finkel & Holbrook, 2000).

En l'àmbit de la biologia vegetal s'ha investigat aquesta teoria, majoritàriament en plantes monocàrpiques, com la planta model *A. thaliana* i altres monocotiledònies com l'arròs, l'ordi i el blat; en les quals ha estat ben estudiat el paper de la programació redox durant la senescència observant, generalment, que l'estrès oxidatiu augmenta a mesura que progressa la

senescència a nivell d'òrgans i, consegüentment, de l'organisme. Desafortunadament, pocs estudis s'han dut a terme en plantes perennes, on la reproducció succeeix més d'una vegada al llarg del cicle vital de la planta. En aquest sentit, estudis realitzats en l'arbust mediterrani *C. clusii* han demostrat que l'envelliment incrementa la susceptibilitat de la planta a patir estrès oxidatiu, però només en condicions d'estrès ambiental (Munné-Bosch & Lalueza, 2007; Hernández *et al.*, 2011). Per tal d'investigar aquesta teoria en plantes perennes de gran longevitat, en aquesta tesi es van fer mesures de marcadors d'estrès oxidatiu com a indicadors d'envelliment.

Així doncs, tal com suggereix Monaghan *et al.* (2009), cal tenir un previ i consolidat coneixement sobre que s'entén per estrès oxidatiu, els mecanismes antioxidants i el dany oxidatiu, que en aquesta tesi hem introduït en **l'apartat 2.1**. A més, altres autors també discuteixen sobre la importància alhora de triar un mètode apropiat per mesurar cadascun d'aquests components associats a l'estrès oxidatiu (en animals veure per exemple Monaghan *et al.*, 2009; en plantes Pintó-Marijuan & Munné-Bosch, 2014).

Per tal d'avaluar l'estrès oxidatiu en els diversos estudis realitzats en aquesta tesi es varen mesurar diversos marcadors (descrits anteriorment en **l'apartat 2.4**) per tal d'avaluar si l'estrès oxidatiu augmentava amb l'edat, en el cas de *B. pyrenaica*, o amb el tamany de la planta, en el cas de *V. gigantea*, tal com suggereix la teoria dels radicals lliures. D'altra banda, també es varen utilitzar les mesures d'estrès oxidatiu com a marcadors de l'estat fisiològic de les plantes en condicions ambientals adverses, els quals es discutiran en **l'apartat 2** sobre els mecanismes de protecció.

En el primer estudi realitzat en *B. pyrenaica* (**capítol 1**), els marcadors analitzats en fulles no van mostrar un major estrès oxidatiu amb la major edat de la planta. En primer lloc, les mesures del rendiment quàntic màxim del PSII (relació F_v/F_m) es varen mantenir en nivells al voltant de 0.8, i no va haver una

disminució dels nivells amb l'edat, el qual indica que no hi ha dany amb l'envel·liment de la planta (Maxwell & Johnson, 2000). Fins i tot, en el mostreig realitzat el 2011, els mascles van presentar valors de F_v/F_m més elevats en els individus de major edat (centenaris). Únicament es va observar una disminució d'aquest paràmetre en condicions d'estrès sever, sent, però, les plantes juvenils més susceptibles a l'estrès que les plantes centenàries. D'altra banda, referent als nivells de peroxidació lipídica, representat en aquest estudi per l'anàlisi de l'àcid malondialdehid (MDA), no van mostrar diferències entre els grups d'edat, confirmant juntament amb els nivells de F_v/F_m , que l'herbàcia perenne centenària *B. pyrenaica* no mostra un augment d'estrès oxidatiu amb l'edat, al menys fins a l'edat estudiada.

Per tal de corroborar aquests resultats es va realitzar un segon estudi amb la mateixa espècie però centrant-nos en l'òrgan perenne de la planta: el tubercle (**capítol 2**). A més de mesurar els nivells de MDA com a marcador de peroxidació lipídica en els tubercles, es va mesurar la pèrdua d'electròlits de membrana com a indicador del possible dany oxidatiu. Contràriament al postulat en la teoria dels radicals lliures (augment de l'estrès oxidatiu amb l'edat) els dos paràmetres van disminuir significativament amb l'edat, tot i que els coeficients de correlació van ser petits. En els dos mostreigs realitzats (primavera i estiu) els nivells de MDA van reduir-se amb l'edat (primavera $r = -0.161$, $P = 0.037$; estiu $r = -0.275$, $P = 0.001$), mentre la pèrdua d'electròlits es va reduir significativament amb l'edat a la primavera, possiblement associat a una major sensibilitat dels individus més joves, i no dels vells com es podria esperar, en la reactivació del metabolisme després del llarg període de dormició ($r = -0.291$, $P = 0.029$). A més de no haver-hi dany oxidatiu amb l'edat, van augmentar els nivells de vitamina E, suggerint una major inversió en la síntesi d'antioxidants amb l'edat i, per tant, una major protecció contra l'estrès oxidatiu en els individus més vells. Aquests resultats ens condueix a

afirmar que l'estrès oxidatiu no augmenta amb l'edat en l'òrgan perenne de *B. pyrenaica*, almenys en individus de fins a 170 anys.

En l'altra espècie estudiada en aquesta tesi, *V. gigantea*, la regió on creix (*campos rupestres*) està marcada per una estació seca caracteritzada per escasses precipitacions, juntament amb elevades radiacions, condicions adverses per a la fotosíntesi i que, per tant, poden induir un excés d'energia i augmentar la producció de ROS en els cloroplasts (Asada, 2006; Munné-Bosch *et al.*, 2013). Per això, ens vam plantejar si aquesta espècie patia estrès foto-oxidatiu durant l'estació seca i si, d'acord amb la teoria dels radicals lliures, aquest augmentaria amb l'edat o en aquest cas, el tamany de la planta.

El primer aspecte important d'aquesta espècie en resposta al possible estrès foto-oxidatiu durant l'estació seca va ser l'acumulació de vitamina E, concretament de les formes α -tocoferol i β -tocotrienol, amb nivells sorprenentment més elevats en les plantes de major tamany (**capítol 3**). En aquest sentit, va haver-hi un efecte del tamany de la planta en la regulació de la resposta a les variacions climàtiques, a més de la importància de l'estudi per ser la primera vegada que es detectaren nivells de tocotrienols en fulles.

Durant l'estació seca l'augment dels nivells de vitamina E es va correlacionar amb un augment dels nivells d'hidroperòxids lipídics, però no ho van fer amb els nivells de MDA. A més, els valors de F_v/F_m no van estar per sota de 0.75 en tot l'experiment, indicant que *V. gigantea* no pateix estrès oxidatiu ni durant les condicions adverses de l'estació seca, ni tampoc per efecte del tamany de la planta.

En el segon estudi desenvolupat en *V. gigantea* (**capítol 4**), per tal de profunditzar en la seva resposta ecofisiològica a les variacions climàtiques, es varen analitzar altres mesures d'estrès oxidatiu per caracteritzar l'estat redox cel·lular. Els paràmetres mesurats varen ser els nivells de H_2O_2 i els nivells d'ascorbat (vitamina C) incloent el seu estat d'oxidació, com a mesures

“directes” de l’estrès oxidatiu. Cap marcador d’estrès oxidatiu analitzat va ser afectat pel tamany, únicament es varen detectar diferències associades al tamany a nivell nutricional en el macronutrient magnesi (Mg), el qual es va correlacionar amb els nivells de clorofil·les, ja que el Mg es requereix durant la fotosíntesi com un constituent clau de les molècules de clorofil·les (Candan & Tarhan, 2003; Tewari *et al.*, 2006). Tot i així, el tamany no va tenir efecte sobre els nivells de clorofil·les.

Alguns dels canvis associats a l’edat que indueixen la senescència foliar estan relacionats amb la remobilització de nutrients i l’acumulació de dany oxidatiu degut a l’augment de ROS, com a conseqüència dels canvis en el metabolisme al llarg del desenvolupament (Jibrán *et al.*, 2013). Aquests processos han estat àmpliament estudiats en plantes monocàrpiques com *A. thaliana*, en la qual està àmpliament descrit que l’augment de l’estrès oxidatiu indueix la senescència foliar conduint a la mort de l’organisme (Woo *et al.*, 2004; Zimmermann & Zentgraf, 2005; Zentgraf, 2007; Davies & Gan, 2012), mentre que, com s’ha comentat anteriorment, poc es coneix sobre el procés de la senescència a nivell d’organisme en plantes perennes. En aquest estudi, l’homeòstasi nutricional i l’absència de dany oxidatiu en fulles de *V. gigantea* demostra l’absència d’estrès oxidatiu associat al tamany de la planta, és a dir, l’absència de signes de senescència en els individus de major tamany, i per tant, de major edat. Cal tenir present que els dos grups d’edat analitzats corresponien a plantes reproductives i, així doncs, d’edats molt diferenciades, tot i que com s’ha comentat anteriorment, no es varen poder datar.

Els nivells d’estrès oxidatiu produïts per l’organisme no són constants, sinó que varien amb l’estat del desenvolupament de la planta, les condicions del medi ambient i els nivells d’activitat cel·lular. Per això cal destacar la importància de realitzar estudis considerant l’estat de desenvolupament de la planta ja que té un paper principal, determinat en els nostres estudis per l’edat o sexe en *B. pyrenaica* i pel tamany de la planta en *V. gigantea*. La

influència de l'estat de desenvolupament en els nivells d'estrès oxidatiu és rellevant per dos motius, el primer és que el dany oxidatiu pot estar relacionat amb la taxa de creixement, és a dir, l'augment en la taxa de producció de ROS pot estar provocada per l'augment de l'activitat cel·lular durant el creixement. El segon punt és que els mecanismes antioxidants no han de ser necessàriament igual de funcionals al llarg de l'ontogènia (Fontagne *et al.*, 2008). Aquests aspectes van conduir a postular la hipòtesi presentada per Pearl (1928), posteriorment desenvolupada per Gershman *et al.* (1954) i, per últim, Harman (1956) en la teoria dels radicals lliures sobre l'envelliment. Tal com s'ha comentat, aquesta teoria ha estat àmpliament acceptada en animals, però en el camp del regne vegetal els estudis es centren en plantes anuals. Per això, les dues espècies de plantes perennes aquí estudiades es presenten com casos atípics d'envelliment en termes d'estrès oxidatiu, demostrant que la teoria dels radicals lliures no és una característica universal en els organismes de l'arbre filogenètic i, a més a més, remarcant la importància d'ampliar els coneixements sobre l'envelliment en models d'organismes de gran longevitat com algunes plantes perennes.

Així doncs, les plantes desenvolupen diferents mecanismes de compensació al llarg de la seva vida en la resposta a l'estrès oxidatiu, els quals s'interpreten com a mecanismes de protecció contra el dany oxidatiu. Quan augmenten els nivells de ROS, les plantes poden respondre augmentant la seva inversió en defenses antioxidants per protegir-se, el qual pot tenir una contrapartida i suposar un cost en l'organisme que es veurà reflectit en una pèrdua d'inversió en altres processos fisiològics com poden ser el creixement, la reproducció o els sistemes de defensa. En el següent apartat es tracten els diferents mecanismes de protecció en resposta a l'estrès oxidatiu, ja sigui donat per causes intrínseques a la planta com extrínseques (factors abiòtics i biòtics) que s'han discutit al llarg dels diferents estudis en les espècies investigades en aquesta tesi.

2. Mecanismes de protecció

Les plantes són capaces d'adaptar-se a una infinitat de condicions adverses al llarg de la seva vida. Els canvis que observem en les plantes estan lligats a nombrosos mecanismes que desenvolupen per adaptar-se, tant als estressos ambientals com als propis canvis interns, com per exemple els que succeeixen amb l'edat de l'organisme. Aquesta extraordinària plasticitat adaptativa al llarg de la vida és una de les raons que explica, juntament amb les peculiaritats dels patrons de desenvolupament (desenvolupament postembrionari basat en l'activitat de meristemes, creixement modular, dormició), la gran longevitat de les plantes perennes. A més de conferir una gran habilitat per ocupar un ampli rang d'ecosistemes i condicions ambientals, les seves peculiaritats en els patrons de desenvolupament haurien de ser investigades amb major profunditat per entendre com fan front les plantes perennes a l'envelliment.

Alguns autors consideren que la característica més significativa dels processos associats a l'envelliment és, probablement, la disminució de la capacitat de l'organisme per a adaptar-se a l'estrès, o en altres paraules, la pèrdua de la capacitat per a recuperar-se de les condicions adverses (Ricklefs, 2008), ja sigui pels danys causats per factors externs (estressos ambientals) com per causes internes com l'augment de l'edat o tamany de la planta. En condicions d'estrès, els canvis moleculars condueixen a subtils alteracions en les cèl·lules i teixits que fan possible mantenir l'homeòstasi. Però amb el pas del temps, hi ha una gran quantitat de canvis funcionals progressius que poden acabar provocant un deteriorament general de l'organisme (senescència). Realment, l'envelliment pot causar una pèrdua de la capacitat per mantenir els valors fisiològics estables, és a dir, que la planta perdi la capacitat d'homeòstasi.

L'estudi dels sistemes de compensació en els organismes al llarg del seu cicle vital suggereix que els mecanismes que milloren la resistència a l'estrès, com per exemple els mecanismes antioxidants, podrien tenir efectes per allargar la vida (Ogburn *et al.* 2001; Kapahi *et al.*, 1999; Zera & Harshman 2001; Lithgow & Walker 2002; Gems & Partridge 2008). Els mecanismes de resistència a l'estrès juntament amb les peculiaritats dels patrons de desenvolupament són determinants en la gran longevitat de les plantes perennes.

A continuació, es presenten els diferents mecanismes de protecció observats en les espècies estudiades per a mantenir les seves funcions fisiològiques durant l'envelliment i evitar així la senescència, fins almenys edats molt avançades.

2.1. Mecanismes de protecció en *Borderea pyrenaica*

L'absència de deteriorament fisiològic amb l'edat en la planta herbàcia perenne *B. pyrenaica*, espècie d'extraordinària longevitat (recordem que és l'espècie de planta perenne herbàcia no clonal de major longevitat mai descrita), podria explicar-se, almenys en part, per la gran capacitat de resistència a l'estrès oxidatiu que aquesta desenvolupa. Quins són, concretament, els mecanismes que confereixen aquesta extraordinària resistència a aquest petit geòfit?

En el **capítol 1**, l'anàlisi de marcadors en termes d'estrès foto-oxidatiu en fulles d'individus recol·lectats en tres anys independents (2008, 2010 i 2011) no van mostrar estrès oxidatiu amb l'edat, tot i que les fulles es van recol·lectar en dies clars i assolellats i, per tant, sota condicions ambientals d'elevades intensitats de llum solar (del voltant de $2000 \mu\text{mol quants} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), i temperatures superiors als $35 \text{ }^\circ\text{C}$ en la superfície pedregosa on creix *B. pyrenaica*. A més, aquest patró va ser consistent en els diferents anys, tot i les diferències substancials en les condicions naturals, ja que els anys 2010 i

2011 van ser més secs que el 2008, el qual podria haver provocat un augment en la producció de ROS en els cloroplasts.

Durant el 2010 (l'any amb menys precipitacions registrades) les plantes juvenils i els mascles van mostrar una reducció del RWC, com a conseqüència de la disminució en la disponibilitat d'aigua durant els mesos del seu creixement (maig, juny i juliol). Curiosament, les femelles no van mostrar signes d'estrès hídric, per exemple, no es va reduir el RWC com en el grup de juvenils i els mascles, tot i el seu elevat esforç reproductiu exercit pel desenvolupament dels fruits. Per tant, les femelles no semblen tenir un major efecte negatiu sota estressos ambientals a causa d'un major esforç reproductiu, tal com està àmpliament acceptat. Sinó que, a més a més, durant el 2010 (l'any més sec) les femelles van augmentar els nivells de zeaxantina i DPS amb l'edat, el qual suggereix una millora en els mecanismes de fotoprotecció amb l'edat en les femelles. Aquests resultats mostren no només que les femelles són més eficients que els mascles (i que els juvenils) en mantenir l'homeòstasi hídrica sota variacions climàtiques, sinó que també mostren una major capacitat de fotoprotecció. Addicionalment, en condicions d'estrès sever al laboratori, les femelles van mostrar una major retenció de clorofil·les i majors nivells dels pigments del cicle de les xantofil·les, els quals juguen un paper clau en la protecció contra l'estrès oxidatiu (Dall'Osto *et al.*, 2012). També es va observar una major integritat del PSII (nivells més alts de F_v/F_m) en les femelles centenàries en condicions d'estrès, respecte els altres grups de plantes. Tots aquests resultats donen suport a la idea que aquesta espècie no pateix senescència a nivell d'organisme, almenys considerant el rang d'edat estudiat (1-280 anys).

La part subterrània d'aquesta espècie, constituïda pel tubercle i el sistema radicular, té un paper essencial en el control de l'homeòstasi hídrica. Els individus de major edat, amb tubercles de major tamany, mostren menys variació en els paràmetres hídrics (com el RWC) en comparació amb els

juvenils, els quals es presenten com els més susceptibles a les variacions de les condicions climàtiques. La importància dels tubercles en aquesta espècie i el paper que juguen en l'estrès oxidatiu va ser estudiat en un segon experiment (**capítol 2**).

Tant la biomassa com la hidratació del tubercle van augmentar amb l'edat de la planta, en ambdós mostres realitzats a la primavera (abans de desenvolupar la part aèria) i l'estiu (després del desenvolupament vegetatiu i reproductiu). Aquests resultats indiquen que els tubercles creixen de forma continuada acumulant més aigua en els tubercles, almenys fins a la màxima edat estudiada de 170 anys. Únicament es va observar una disminució en el contingut de nitrogen en els tubercles de major edat, la qual s'associa amb l'esforç reproductiu, tal i com suggereix el fet que la disminució va ser lleugerament més marcada a l'estiu després de reproduir-se ($r = -0.222$; $P = 0.004$) en comparació amb la primavera, quan encara no s'havien reproduït ($r = -0.187$; $P = 0.010$).

L'estratègia d'un creixement lent, i continu, dels tubercles de *B. pyrenaica* és un clar indicatiu de que aquesta espècie no està sotmesa a processos de senescència, almenys fins als 170 anys. Aquests resultats estan d'acord amb el descrit en l'arbust perenne *C. albidus*, en que la reducció del tamany ajuda a prevenir la senescència de l'organisme en condicions naturals (Müller *et al.*, 2014). *B. pyrenaica* és la planta perenne herbàcia de creixement més lent registrada en l'actualitat, en que els tubercles de major edat tenen un pes inferior a 5 grams (García & Antor, 1995a; García *et al.*, 2011). Per tant, l'acumulació de biomassa amb el pas dels segles és molt petita i la necessitat per mantenir les estructures viables es limita únicament al tubercle. D'altra banda, al créixer en les tarteres alpines, el tubercle es troba protegit dins de les esquerdes de les roques i, per tant, està protegit de la depredació per herbívors com d'altres agents externs. Tots aquests factors poden explicar, en part, l'extraordinària longevitat d'aquest petit i peculiar geòfit (**Figura 9**).

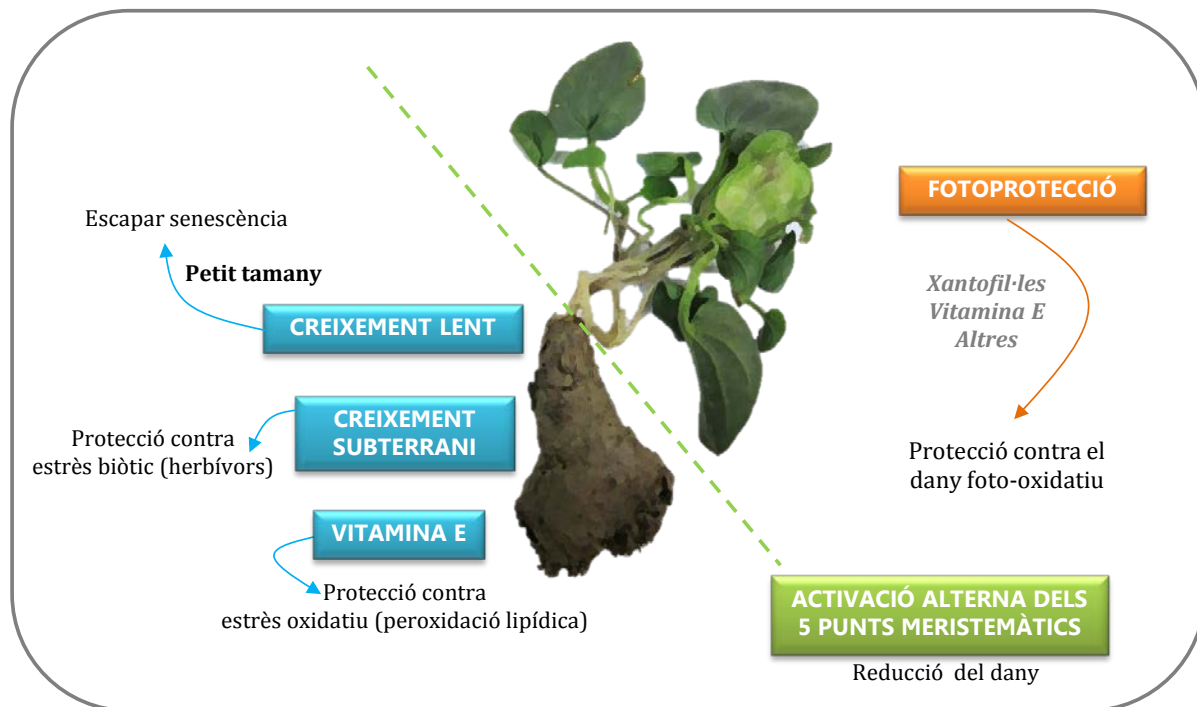


Figura 9. Mecanismes de protecció en un petit geòfit de gran longevitat, *B. pyrenaica*.

La vitamina E, concretament la forma α -tocoferol, descrita àmpliament per la seva capacitat d'eliminar 1O_2 i altres ROS en els plastidis, a més del seu potencial en la inhibició de la propagació en la peroxidació lipídica de les membranes cel·lulars (Halliwell & Gutteridge, 1999; Maeda *et al.*, 2005), es va detectar en els tubercles, augmentant els seus nivells amb l'edat de la planta, a la vegada que els nivells de MDA (indicador de peroxidació lipídica) disminueixen. La correlació negativa entre els nivells de vitamina E i MDA ($r = -0.165$, $P = 0.036$) donen suport a un efecte protector per part de l' α -tocoferol com a antioxidant en els tubercles amb l'envelliment (**Figura 9**). A més, també varen disminuir amb l'edat els nivells de l'àcid jasmònic isoleucina (JA-Ile), la forma activa dels jasmonats descrita en *A. thaliana* i que es sintetitza en resposta a atac per patògens o herbívors (Fonseca *et al.*, 2009; Davies, 2010). Aquests resultats suggereixen que *B. pyrenaica* és menys sensible a l'estrès biòtic amb l'edat, el qual recolza la idea que la mortalitat en

B. pyrenaica esdevé probablement més per factors externs (com l'atac per patògens) que no pas per processos de senescència intrínsecs a l'organisme.

Així doncs, *B. pyrenaica* és en termes evolutius una relíquia del Terciari caracteritzada per un tubercle subterrani amb una sistema radicular fort que li ha permès mantenir-se ancorat sota terra dels pedregars dels Pirineus Centrals i protegit de les variacions climàtiques al llarg del temps. Tal com es mostra en el present estudi, el tubercle conté alts nivells de vitamina E que protegeixen els lípids contra els radicals lliures reduint els nivells de peroxidació lipídica. Aquest tret, juntament amb la capacitat de créixer lentament, però contínuament, podria entendre's com la clau de l'espècie per prevenir la senescència a nivell de l'organisme sencer.

En aquest petit geòfit, sembla que l'òrgan subterrani podria amagar el secret de la llarga longevitat. D'acord amb les evidències obtingudes fins a l'actualitat, les plantes perennes són generalment més resistents a l'estrès que les plantes anuals (Boot *et al.*, 1986; Moriuchi & Winn, 2005). El creixement modular de les arrels formen la base per a l'adaptació de les plantes perennes als estressos abiòtics i biòtics. S'ha demostrat que les plantes perennes sotmeses a estrès produeixen més biomassa d'arrels i rizomes mentre que les fulles són més petites i estretes, però més longeves, que en condicions òptimes de creixement (Moriuchi & Winn, 2005). Aquesta estratègia de les plantes perennes d'acumular més recursos (nutrients, fotoassimilats, etc.) en les arrels (i en particular, en els tubercles i els rizomes com a òrgans d'emmagatzematge en plantes perennes) que en fulles, és una característica de resistència a l'estrès, ja que proporciona la seguretat per reprendre el creixement quan les limitacions ambientals, com la falta d'aigua o la disponibilitat de nutrients, hagin passat (Munné-Bosch, 2014). Per tant, el sistema radicular juga un paper essencial en determinar la longevitat en plantes perennes, tal com es mostra en aquesta tesi en els tubercles de *B. pyrenaica*.

2.2. Mecanismes de protecció en *Vellozia gigantea*

L'espècie endèmica *V. gigantea* està adaptada a créixer sota pronunciades variacions climàtiques estacionals al llarg de l'any i, per tant, aquesta espècie posseeix mecanismes eficients per enfrontar-se als estressos ambientals, els quals han estat investigats en aquesta tesi.

Durant l'estació seca, les plantes d'aquesta espècie estan exposades a reduccions en la disponibilitat hídrica en el sòl, típic d'aquesta època que caracteritza els hiverns en la regió muntanyosa de la *Serra do Cipó* al sud-est del Brasil. El dèficit hídric va conduir a un fort tancament estomàtic (més del 50%), sense diferències entre els diversos tamanys de les plantes, essent aquest fet acompanyat per augments en els continguts d'àcid abscísic (ABA).

El tancament estomàtic es va associar, sorprenentment, amb una lleugera millora de l'estat hídric de les fulles (indicat pel paràmetre RWC) el qual va suggerir una eficient estratègia de *V. gigantea* per evitar el dèficit d'aigua (sequera), tal com s'ha estat descrit en altres espècies (Nardini *et al.*, 1999). A més el tancament estomàtic induït per ABA és un important mecanisme descrit en les plantes superiors per regular el balanç hídric i la supervivència en condicions de dèficit hídric (Zhang *et al.*, 1987; Steuer *et al.*, 1988; Zhu, 2002).

No obstant, el tancament estomàtic no només intervé en la conservació d'aigua en la planta sota condicions de dèficit hídric, sinó que també serveix com a mecanisme de defensa en la prevenció d'atac per patògens (Melotto *et al.*, 2006; Lee & Luan, 2012) ja que, en general, els patògens bacterians fan servir les obertures naturals de les plantes per entrar en els teixits vegetals, com ara els estomes (Melotto *et al.*, 2008). Per tant, a la vegada que el tancament estomàtic induït per ABA és un mecanisme de protecció contra estressos abiòtics com la sequera, l'ABA també té un efecte positiu en la resistència a malalties mitjançant la inducció del tancament estomàtic. Donat

que les plantes disposen de barreres físiques i químiques (jasmonats) per protegir-se d'una àmplia diversitat de patògens, el tancament estomàtic en *V. gigantea* podria ser un efectiu mecanisme actuant de barrera contra la invasió de patògens i, per tant, protegir-se de l'estrès biòtic; a la vegada que li serveix per conservar l'aigua en resposta a l'estrès abiòtic (**Figura 10**). Aquest doble efecte del tancament estomàtic ha estat descrit en altres espècies (Lee & Luan, 2011), i s'ha demostrat el paper del ABA en l'activació d'un complex sistema de senyalització en resposta als diferents estressos, on el tancament estomàtic serveix com a centre de l'escenari per tal d'interferir entre els senyals d'estrès biòtics i abiòtics.

Com s'ha citat anteriorment, en condicions de dèficit hídric es pot induir en la planta la formació de ROS i, per tant, es poden donar condicions d'estrès oxidatiu en les plantes de *V. gigantea* durant l'estació seca. Els nivells de vitamina E detectats en fulles, compostats per tocoferols i tocotrienols (**capítol 3**), van caracteritzar sorprenentment el primer estudi de *V. gigantea*, donada la importància d'haver detectat nivells de tocotrienols en fulles, fins a la data detectats únicament en llavors.

Mentre els tocoferols són la principal forma de vitamina E en els teixits fotosintètics de les plantes (majoritàriament fulles), els tocotrienols són la principal forma en les llavors de la majoria de plantes monocotiledònies, incloent cereals com ara l'arròs i el blat, i un nombre limitat de dicotiledònies (revisat per Falk & Munné-Bosch, 2010). Els tocotrienols poden representar més del 50% de la vitamina E total en l'endosperma de la llavor de diverses monocotiledònies (Padley *et al.*, 1994) i, fins i tot, substituir completament els tocoferols en les llavors de diverses espècies de la família de les Arecaceae (monocotiledònies) (Siles *et al.*, 2013). Encara que els tocotrienols s'han trobat en coleòptils de *Triticum aestivum* (Horvath *et al.*, 2006), *V. gigantea* és la primera espècie en al que es detecten tocotrienols en les fulles. Aquesta és la raó per la qual la funció dels tocotrienols en les fulles només s'ha investigat

mitjançant l'ús de plantes transgèniques que sobreexpressen l'enzim homogentisat geranilgeraniltransferasa (HGGT), el qual catalitza un pas clau en la biosíntesi de tocotrienols (Matringe *et al.*, 2008). Aquest estudi va mostrar que els tocotrienols poden substituir la funció antioxidant dels tocoferols en les fulles de les línies transgèniques de tabac. Per tant, en *V. gigantea* es confirmaria en una planta monocotiledònia que creix en les condicions naturals del seu hàbitat que l'acumulació de tocotrienols en fulles podria tenir una funció protectora, tal com s'ha vist en plantes model, ja que aquests augmenten durant l'estació seca i amb el tamany de la planta per protegir de l'estrès oxidatiu.

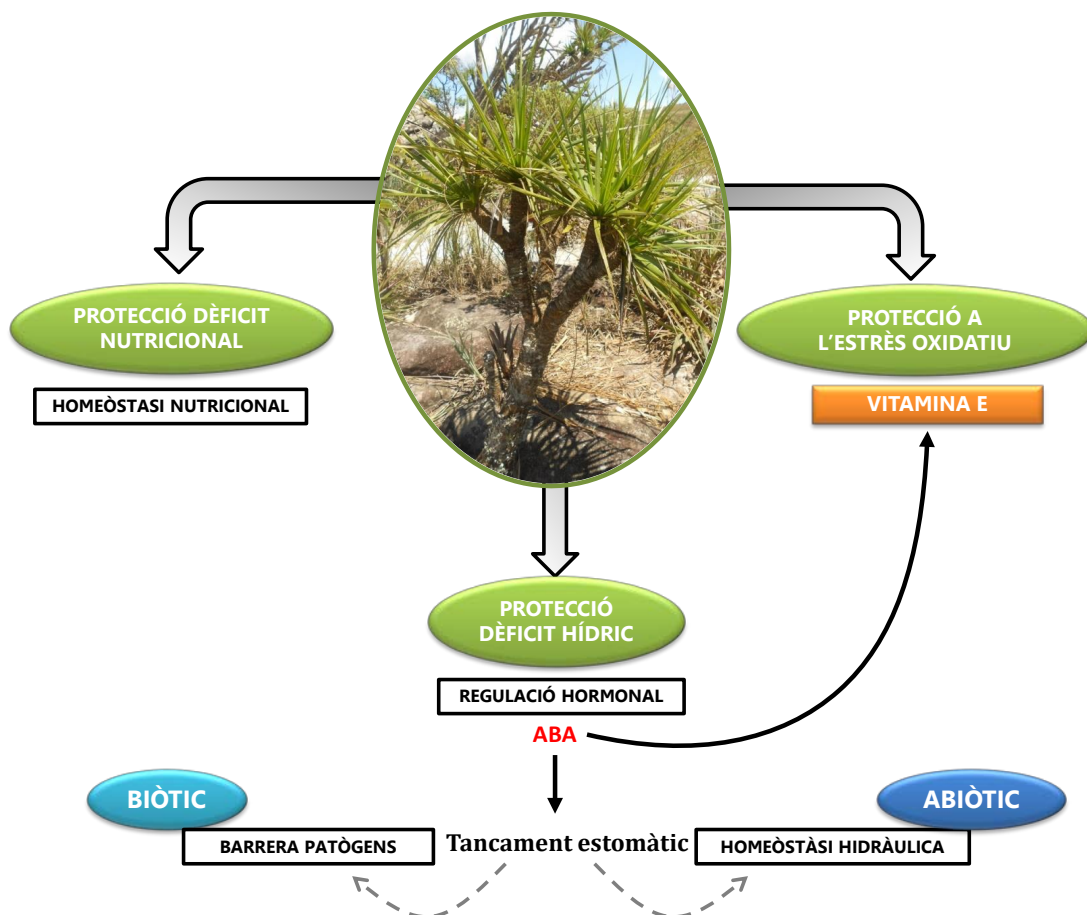


Figura 10. Mecanismes de protecció en *V. gigantea*, en resposta al dèficit nutricional típic dels sòls àcids on habita, al dèficit hídric durant l'estació seca i a l'estrès oxidatiu.

Així doncs, tenint en compte que tant els tocoferols com els tocotrienols poden protegir l'aparell fotosintètic de l'estrès foto-oxidatiu i els dos compostos s'acumulen en les fulles de la monocotiledònia *V. gigantea* en resposta al dèficit hídric, es conclou que els tocotrienols podrien conferir un avantatge adaptatiu en la protecció contra l'estrès foto-oxidatiu ja que a més, d'entre les 4 formes de vitamina E detectades (α -tocoferol, γ -tocoferol, β -tocotrienol i γ -tocotrienol), la forma β -tocotrienol va ser en la única forma de vitamina E que expressada tant per unitat de clorofil·les com per àrea foliar es va mantenir l'efecte del tamany i estacional en els seus nivells (**capítol 3**). Tot i que són necessaris més estudis per comprendre millor la biosíntesi i la funció de les diferents formes de vitamina E en aquesta i altres espècies, sembla que les plantes monocotiledònies podrien ser particularment interessants en termes d'acumulació de tocotrienols en fulles i que això podria tenir un significat evolutiu. Donat que la major composició de tocotrienols es troba en llavors de monocotiledònies, aquestes podrien haver desenvolupat la capacitat de sintetitzar tocotrienols en fulles i, per tant, seria un punt interessant a investigar sobre la presència de tocotrienols en les monocotiledònies.

Així com els nivells de vitamina E, concretament de les formes α -tocoferol i β -tocotrienol, van augmentar significativament durant l'estació seca, el qual està associat al seu paper de protecció contra el dany oxidatiu (**Figura 10**), simultàniament l'augment dels nivells de vitamina E es varen correlacionar negativament amb els nivells d'hidroperòxids lipídics, indicant la seva funció inhibidora de la peroxidació lipídica. En *V. gigantea* l'augment en l'acumulació dels nivells de vitamina E durant l'estació seca va ser major en els individus de major tamany, el qual s'associa a una major demanda de fotoprotecció en els individus més grans, ja que serien més sensibles a l'estrès foto-oxidatiu i, a més de la funció protectora de l' α -tocoferol de les membranes dels cloroplasts contra les ROS, eliminant-les i evitant la

peroxidació lipídica (Havaux *et al.*, 2005), també tindria una funció antioxidant el β -tocotrienol.

En plantes model d'estudi, incloent plantes monocotiledònies com l'arròs, s'ha descrit com la biosíntesi de la vitamina E està modulada per ABA (El Kayal *et al.*, 2006; Munné-Bosch *et al.*, 2009). Per exemple, la regió del promotor de gens de biosíntesi de tocoferols té elements de resposta a l'ABA (Chaudhary & Khurana, 2009). Els estudis en plantes models es confirmarien doncs en una espècie d'interès ecològic estudiada en condicions naturals, ja que *V. gigantea* va mostrar un augment d'ABA durant l'estació seca que es va correlacionar positivament amb els nivells de vitamina E, el qual indica que possiblement durant l'estació seca els nivells de vitamina E varen estar modulats per l'augment d'ABA i van tenir un paper important en la defensa contra l'estrès oxidatiu (**Figura 10**).

L'ABA està descrit com una de les hormones inductores de la senescència, juntament amb l'etilè, els brassinoesteroides, les estrigolactones, els jasmonats i l'àcid salicílic (SA). A més, l'ABA, els jasmonats i el SA són les hormones típiques associades a l'estrès, ja que a més de ser necessàries per al creixement i desenvolupament de les plantes, són requerides en les respostes de defensa a estressos ambientals (Davies, 2010). El SA està involucrat en la resposta a atac per patògens, tal com s'ha vist amb el fet que la seva activitat augmenta a la vegada que ho fan els nivells de ROS com a defensa contra els patògens (Kawano *et al.*, 1998; Klessig *et al.*, 2000), mentre que l'ABA desencadena la producció de H_2O_2 en les cèl·lules de guarda dels estomes induint el tancament estomàtic en condicions d'estrès abiòtic (Pitzschke *et al.*, 2006) i els jasmonats estan implicats en les respostes a l'atac per herbívors (Davies, 2010). En l'estudi de *V. gigantea*, els nivells d'ABA es varen correlacionar negativament amb l'àcid 12-oxofitodienoic (OPDA), precursor de la via dels jasmonats, de la mateixa forma que els nivells d'OPDA també es varen correlacionar negativament amb els nivells de vitamina E, mostrant de

forma consistent com la vitamina E controla els nivells de jasmonats tal com s'ha demostrat en plantes model (Cela *et al.*, 2011; Simancas & Munné-Bosch, 2015). Per tant, aquest estudi recolza la idea que la vitamina E pot tenir una funció important en la regulació de defenses abiòtiques i biòtiques. Aquest aspecte es discuteix més àmpliament en l'**apartat 3**.

Per altra banda, múltiples estudis es porten a terme sobre la resposta de les plantes al dèficit hídric, centrant-se en les relacions hídriques, el tancament estomàtic i els mecanismes antioxidants; però poc es coneix sobre com afecta la deficiència de nutrients minerals en els sòls en els mecanismes antioxidants en plantes. L'ecosistema dels *campos rupestres* on creix *V. gigantea* es caracteritza per tenir sòls àcids, pobres en nutrients i baixos en disponibilitat del macronutrient fòsfor (P). Un estudi recent (Oliveira *et al.*, 2015) descriu àmpliament les diferents estratègies que les plantes dels *campos rupestres* desenvolupen per afrontar l'escassetat nutricional dels sòls on creixen. Un d'aquests mecanismes descrits per incrementar l'adquisició de nutrients del sòl és l'exudació de carboxilats de les arrels per alliberar i mobilitzar P i altres micronutrients com manganès (Mn) del sòl, i que en conseqüència, es genera un augment de les concentracions foliars en Mn.

En el **capítol 4** es va realitzar l'anàlisi del perfil nutricional en les fulles de *V. gigantea*, sense detectar variacions en les concentracions dels nutrients al llarg de les variacions climàtiques estacionals. Això va indicar un eficient mecanisme d'homeòstasi nutricional, fins i tot en períodes de baixa disponibilitat d'aigua durant l'estació seca. En aquest estudi es varen corroborar elevats continguts en Mn en les fulles de *V. gigantea*, que es correlacionaren amb els nivells d'ABA. Els nivells de ferro (Fe) i silici (Si) també es van correlacionar amb els nivells d'ABA, suggerint una complexa interacció entre diversos nutrients que poden controlar el nivells hormonals en les fulles. D'una banda, els nivells de Fe i Si en les fulles estan associats amb una millora de l'activitat de les arrels en l'absorció de nutrients i una millora

del balanç nutricional (Liang *et al.*, 2007). A més, aquests nutrients són presumiblement requerits per a la síntesi d'ABA durant l'estació seca ja que el pas limitant en la biosíntesi d'ABA (enzim 9-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenasa) requereix Fe en el seu centre actiu (Messing *et al.*, 2010).

En resum, l'homeòstasi nutricional que mostra *V. gigantea* suposa un eficient mecanisme en condicions d'escassetat d'aigua i nutrients del sòl (**Figura 10**). A més, la relació entre diversos nutrients i els continguts hormonal es proposa com a interès de futures investigacions.

3. La vitamina E com a marcador d'estrès oxidatiu i senescència

Hem vist com la vitamina E és un important antioxidant que té la funció de detoxificar algunes ROS i controlar la propagació de la peroxidació lipídica en les membranes tilacoidals. Així doncs, la vitamina E està implicada en la regulació del grau d'estrès oxidatiu que pot desenvolupar la planta, ja sigui associat a processos fisiològics de la planta, com la senescència (factors intrínsecs), com en la resposta a l'estrès (factors externs). Com a conseqüència de canvis en la via de síntesi, degradació i reciclatge dels components de la vitamina E, els seus nivells varien al llarg del desenvolupament i del creixement de la planta, com també en la resposta a l'estrès.

En la societat actual, no hi ha dubte del protagonisme que té la vitamina E en els productes cosmètics i farmacèutics per als humans. Les seves propietats beneficioses per a la salut, com a potencials antioxidants, juntament amb el seu efecte "anti-envelliment" en una àmplia gama de tractaments per a la pell, són de gran interès davant la preocupació, cada vegada més, per mantenir una vida saludable, així com de prevenir i evitar els símptomes de senescència. Però, què passa en les plantes? Està implicada la vitamina E en retardar, o fins i tot en evitar, els processos associats a l'envelliment en plantes? I, sobretot, en plantes perennes de gran longevitat?

De nou, la recerca realitzada en l'àmbit de les plantes perennes és molt limitada, i poc es coneix sobre el paper que juga la vitamina E en els processos associats a l'edat de la planta, com la senescència, un procés degeneratiu que pot donar-se a nivell cel·lular, de teixit, d'òrgan o d'organisme sencer. En el cas de les plantes anuals la senescència implica la mort i l'etapa final del desenvolupament de la planta, ja que la senescència foliar procedeix de forma simultània amb la del organisme sencer, tal com podem observar, per exemple, en els cultius d'arròs o blat. En canvi, això no succeeix en plantes perennes, en les que la senescència foliar sol estar associada amb les variacions estacionals, i no implica la senescència de la planta sencera. Per exemple, en el clima mediterrani trobem arbres perennes caducifolis que perden les fulles a l'inici de la tardor, com el cas del faig (*Fagus sylvatica*). O, un altre exemple, en aquest cas d'alta muntanya, l'herbàcia perenne estudiada en aquesta tesi, *B. pyrenaica*, que presenta senescència foliar al final de l'estiu.

Donada la importància que es dóna a la vitamina E en l'envelliment dels humans, en la nostra recerca per entendre l'envelliment en plantes perennes ens vàrem preguntar: quin és el paper de la vitamina E en els processos de senescència en aquestes plantes? D'una banda trobem estudis de com la vitamina E està implicada en la senescència d'òrgans i, per una altra banda, en la senescència de la planta sencera. Veiem alguns exemples.

Alguns estudis realitzats a nivell d'òrgan i cel·lular (fulles i cloroplasts, respectivament) permeten aproximar-se a conèixer la funció de la vitamina E al llarg de les diferents etapes del desenvolupament, encara que no sigui a nivell d'organisme. En aquests estudis s'ha observat que la síntesi de vitamina E augmenta, principalment en forma d' α -tocoferol, en les primeres etapes de la senescència foliar, el qual s'atén a la fotoprotecció de l'aparell fotosintètic i limitació de la peroxidació lipídica mentre esdevé la remobilització de nutrients a les fulles més joves (Kunert & Ederer, 2006; García-Plazaola *et al.*, 2003). Per contra, els nivells disminueixen en les etapes finals de la

senescència foliar (Peisker *et al.*, 1989; Chrost *et al.*, 1999; Munné-Bosch & Peñuelas, 2003). La senescència foliar és un procés altament regulat en el que la vitamina E juga, doncs, un paper essencial durant la remobilització de nutrients, encarregant-se de protegir l'aparell fotosintètic de l'estrès oxidatiu.

L'ús de plantes mutants o transgèniques és una de les eines més emprades per estudiar la funció de la vitamina E en les plantes. Encara que les plantes anuals, com *A. thaliana* o l'arròs, siguin els models principals d'estudi en plantes; trobem en algunes perennes com *Nicotiana tabacum* en que les plantes transgèniques deficientes en tocoferols acceleren el procés de la senescència (Abbasi *et al.*, 2009). Altres estudis mostren la importància de la vitamina E en nombrosos processos fisiològics de les plantes, tal com s'ha observat en plantes deficientes en tocoferols que mostren una alteració en la germinació, exportació de fotoassimilats, creixement, senescència foliar i resposta a l'estrès abiòtic (Sattler *et al.*, 2004).

Per tant, com molts estudis demostren, els tocoferols estant implicats en importants processos fisiològics associats al desenvolupament de la planta, com la senescència foliar, la germinació o el creixement; més enllà de la seva funció antioxidant en els membranes tilacoidals i el seu paper en la resposta a estressos ambientals (Falk & Munné-Bosch, 2010). Estudis més recents descriuen l'important paper de la vitamina E en els processos de senescència, com l'augment de la longevitat en *A. thaliana*, excepte en condicions molt severes de deficiència de fòsfor (Simancas & Munné-Bosch, 2015). A més, s'ha demostrat que la deficiència de vitamina E pot accelerar la senescència en condicions òptimes de creixement en plantes de tabac (Abbasi *et al.*, 2007) però paradoxalment la retarda en condicions d'estrès salí regulant gens clau del metabolisme de sucres (Asensi-Fabado *et al.*, 2015). En resum, aquests estudis suggereixen que la vitamina E influeix en processos extra-plastidials (com l'exportació de sucres) més enllà de la seva funció antioxidant, el qual

recolza el paper de la vitamina E en la senyalització intracel·lular (Munné-Bosch & Falk, 2004)

Els estudis desenvolupats en aquesta tesi van mostrar un augment de vitamina E tant en processos associats a l'edat o tamany de la planta, com en respostes a estressos ambientals; en els que es va concloure que la vitamina E juga un paper important en la protecció de la planta tant en processos associats a l'edat, evitant el deteriorament fisiològic, com en respostes a estressos ambientals, evitant l'estrès oxidatiu. Per tant, la vitamina E pot ésser utilitzat com a marcador, juntament amb altres marcadors d'estrès oxidatiu com la peroxidació lipídica, en la mesura de l'estrès oxidatiu i/o senescència en plantes (**Figura 11**).

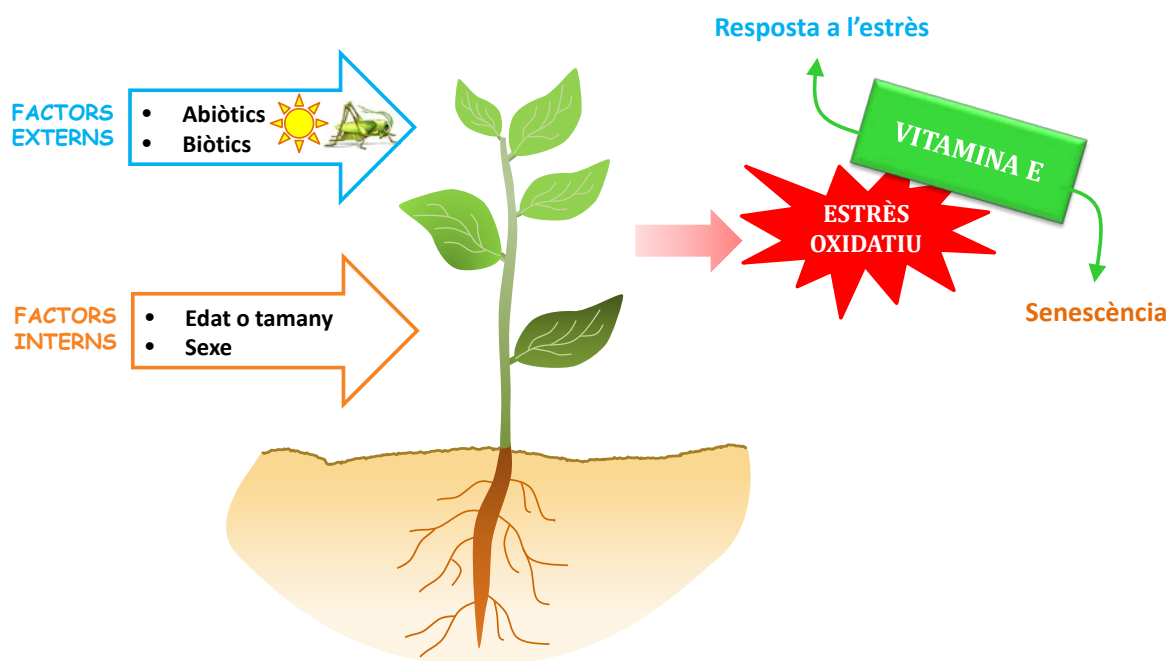


Figura 11. Esquema representatiu dels factors interns i externs implicats en l'estrès oxidatiu de les plantes i com la vitamina E pot estar implicada en la regulació dels processos de senescència, així com en la resposta a l'estrès

4. La vitamina E com a possible punt de control en la resposta a estrès abiòtic i biòtic

A més de la importància que juga la vitamina E en protegir de l'estrès oxidatiu, els resultats presentats en el **capítol 4** d'aquesta tesi recolzen el possible paper de la vitamina E en la regulació de les defenses a estressos abiòtics i biòtics, almenys, en els resultats obtinguts en aquest estudi a nivell hormonal.

Les proves obtingudes fins al moment en mutants de la planta model *A. thaliana* deficients en defenses antioxidants implicats en la fotoprotecció mostren nivells més elevats en les defenses a herbívors o patògens respecte les plantes no mutants (Demmig-Adams *et al.*, 2013, 2014). Aquests estudis suggereixen un vincle entre l'augment dels nivells de ROS, l'augment dels nivells d'oxilipines (jasmonats) i l'augment de les defenses contra certes plagues o patògens, de forma que un defecte en la capacitat fotoprotectora de les plantes pot conduir a una alteració en la resposta a estressos biòtics. En altres paraules, les plantes amb majors defenses contra estressos abiòtics tenen menys defenses en estressos biòtics (Demmig-Adams *et al.*, 2013, 2014).

Aquesta idea es recolza amb l'estudi presentat en el **capítol 4**, on es va observar una reducció en l'acumulació de jasmonats durant l'estació seca en les plantes de *V. gigantea*, mentre augmentaven els nivells d'ABA en resposta al dèficit hídric. En aquest estudi es va concloure que l'ABA estimula, a més del tancament estomàtic per evitar la pèrdua d'aigua, la biosíntesi de vitamina E durant l'estació seca com a resposta protectora. No obstant, aquesta resposta es contraposa a altres respostes defensives, com ara l'acumulació d'OPDA, reduint probablement la resistència a l'estrès biòtic durant l'estació seca. La correlació negativa entre els nivells de vitamina E i OPDA és consistent amb el paper de la vitamina E en controlar els nivells de jasmonats, com s'ha

demostrat en plantes models (Cela *et al.*, 2011; Simancas & Munné-Bosch, 2015).

En els estudis amb *B. pyrenaica* (**capítol 2**) també es va observar una correlació negativa entre els nivells de vitamina E i els nivells de jasmonats, en aquest cas, de la forma activa JA-Ile. Donada l'absència d'un major estrès oxidatiu amb l'augment d'edat en aquest petit geòfit de gran longevitat, es conclou que la vitamina E té un important paper en la protecció contra el dany oxidatiu.

Tant en *B. pyrenaica* com en *V. gigantea* la vitamina E augmenta per protegir-se de l'estrès oxidatiu que poden induir tant les situacions d'estrès hídric, en el cas de *V. gigantea*, com l'edat en *B. pyrenaica*, repercutint en una pèrdua en la capacitat per defensar-se d'estressos biòtics mitjançant la síntesi de jasmonats (**Figura 12**).

D'altra banda, la relació entre les defenses a estressos abiòtics i biòtics sembla ser complexa. Inicialment, l'exposició a l'estrès abiòtic (per exemple, dèficit hídric) augmenta de forma transitòria la producció d'hidroperòxids lipídics i, en conseqüència, d'oxilipines, probablement pel fet que les concentracions d'antioxidants existents a l'inici són insuficients per detoxificar les ROS. La pròpia producció d'oxilipines desencadena, posteriorment, una regulació a l'alça de la producció d'antioxidants a través d'un circuit de retroalimentació, com per exemple la vitamina E, en que ha estat descrita la inducció de la seva biosíntesi pels jasmonats (Sandorf & Holländer-Czytko, 2002). Finalment, l'augment de les concentracions d'antioxidants, en aquest cas de vitamina E suprimeix la producció d'oxilipines, mitjançant l'eliminació de ROS i detoxificació del radicals lipídics peroxil.

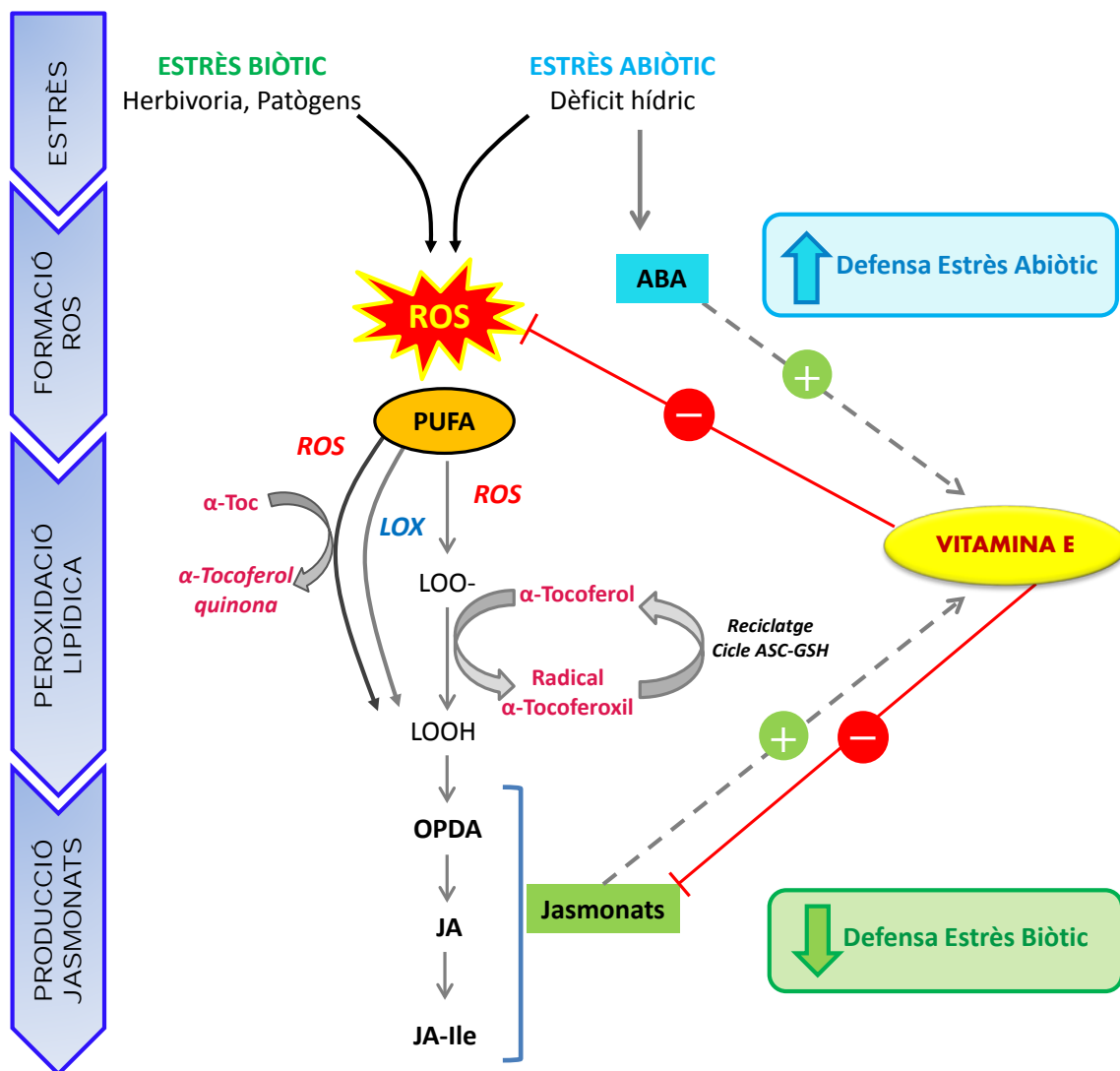


Figura 12. Paper de la vitamina E com a punt de control en la resposta a estressos abiòtics i biòtics. *α-Toc*, *α*-tocoferol; *ABA*, àcid abscísic; *cicle Asc-GSH*, cicle ascorbat-glutatió; *LOO·*, radicals lipídics peroxil; *LOOH*, hidroperòxids lipídics; *LOX*, lipoxigenasa; *ROS*, espècies reactives de l'oxigen; *OPDA*, àcid 12-oxofitodienoic; *JA*, àcid jasmònic; *JA-Ile*, àcid jasmònic isoleucina.

En resum, sembla que la vitamina E juga un paper essencial en interconnectar les respostes a estressos abiòtics i biòtics, plantejant la necessitat d'investigar en futurs estudis aquest aspecte, per exemple, creuant línies de plantes mutants en vitamina E amb plantes mutants en la biosíntesi d'oxilipines.

5. Dificultat dels estudis d'envelliment en plantes perennes

Dins del regne vegetal, l'interès per entendre la complexitat dels processos d'envelliment ens porta a la necessitat d'estudiar les plantes perennes. Tot i que les plantes anuals són el principal model d'estudi en el camp de la biologia vegetal, com *A. thaliana*, aquestes han estat i són de gran utilitat per estudiar i conèixer aspectes importants a nivell genètic i molecular, com la presència de gens associats a la senescència i la possibilitat de generar mutants per estudiar infinitat de processos fisiològics associats a l'edat. Tot i així, només l'estudi en plantes perennes ens condueix a un ampli coneixement de l'envelliment.

No obstant, portar a terme estudis amb plantes perennes, espècies moltes elles de gran longevitat, presenta diversos reptes i també limitacions, des de qüestions del tipus metodològiques (tècniques), com l'escala temporal en que es plantegen els experiments i/o, d'altra banda, les limitacions que aporta la pròpia espècie (biològiques), com conèixer l'edat dels individus (datació) o la problemàtica de les longevitats màximes i rangs d'edat que s'obtenen al realitzar el mostreig.

5.1. Aïllament del factor edat

Una de les principals dificultats que es troben els estudis d'envelliment en plantes perennes és l'aïllament del factor de l'edat, és a dir, obtenir la certesa de que els canvis observats i investigats en les plantes d'estudi són conseqüència del factor que estem analitzant, en aquest cas de l'edat, i no de qualsevol altre factor intrínsec i/o extrínsec associat al cicle vital de la planta.

Anteriorment alguns autors s'han trobat amb aquesta dificultat alhora d'estudiar els canvis associats a l'edat, observant que altres factors com el tamany, la limitació hidràulica o els factors ambientals són els responsables de la disminució en les taxes de creixement o fotosíntesi associats a l'edat

(Bond, 2000, 2007; Mencuccini *et al.*, 2005, 2014; Vanderklein *et al.*, 2007; van Mantgem *et al.*, 2009). Tal com plantegen aquests estudis, almenys en arbres, l'edat no sembla ser el factor limitant en el creixement ni la causa principal de la mortalitat, sent en aquest sentit els estressos ambientals un dels factors que sembla influir més en la mortalitat i, per tant, ser la principal causa que indueix la senescència de l'organisme sencer. La majoria d'aquests estudis que es realitzen per aprofundir sobre els processos d'envelliment en arbres o arbustos es basen en tècniques de propagació vegetativa, que permet aïllar el factor edat (del meristema) del factor tamany, així com mitjançant estudis comparatius dels individus parentals amb els individus amb injert (tots amb el mateix tamany i mateixes condicions) es pot estudiar la contribució de cada un dels factors a les reduccions observades en el creixement d'aquestes espècies amb l'edat.

Considerant que el factor tamany és conseqüència directa del factor edat, i que per tant estant intrínsecament lligats, caldria fer la reflexió i preguntar-se fins a quin punt és necessari separar el factor tamany de l'edat per estudiar els efectes de l'envelliment. Només en els casos que interessa estudiar la totipotencialitat dels meristemes i la seva capacitat infinita per replicar-se és necessari aïllar el factor de l'edat de tots els altres factors que inclou el complex sistema d'una planta sencera. D'aquesta manera es pot estudiar el factor responsable de les reduccions observades en les plantes i poder plantejar-se si les plantes envelleixen com a organismes modulars.

5.2. Limitacions tècniques

Altres dificultats que atenen l'estudi de l'envelliment són les limitacions tècniques que es troben alhora de realitzar estudis en poblacions naturals, com per exemple, la dificultat per conèixer la longevitat de l'espècie o l'edat dels individus.

Les elevades taxes de mortalitat característiques de les poblacions naturals condueixen a predir que no hi ha senescència i, també, a dificultar els resultats experimentals que se'n poden obtenir, ja que inevitablement, el nombre de mostres disminueix amb l'edat a mesura que els individus moren. Estudis actuals inclouen un major nombre de mostres totals i múltiples grups d'edats per minimitzar aquests problemes. El més important a considerar és que gairebé tots els estudis demogràfics recents que demostren la senescència han estat el resultat d'estudis longitudinals d'individus marcats de molt llarga durada, com en plantes (Roach *et al.*, 2009) i inclosos alguns estudis en animals realitzats durant 40 anys en aus (Pardo *et al.*, 2013) i tortugues (Congdon *et al.*, 2013).

Els estudis longitudinals es basen en models demogràfics per entendre la història del cicle vital dels individus i conèixer les dinàmiques poblacionals, com els trets que disminueixen amb l'edat basats en el *fitness* i la supervivència de les poblacions (Roach & Carey, 2014). En el regne vegetal trobem un ampli rang d'espècies amb diverses longevitats màximes, des de setmanes, en plantes anuals, fins a milers d'anys en algunes espècies perennes (**Figura 13**). Diversos factors influeixen en la longevitat d'una espècie, d'entre els quals hi ha una part basada en mecanismes genètics que es poden estimular pels estressos ambientals o patologies que la planta acumuli al llarg del seu cicle vital. No obstant, les plantes perennes disposen d'una gran plasticitat adaptativa deguda al creixement modular i la indeterminació dels meristemes que els hi permet evitar la senescència de l'organisme i, en conseqüència, tenir una major longevitat (Peñuelas & Munné-Bosch, 2010; Munné-Bosch, 2010, 2014).

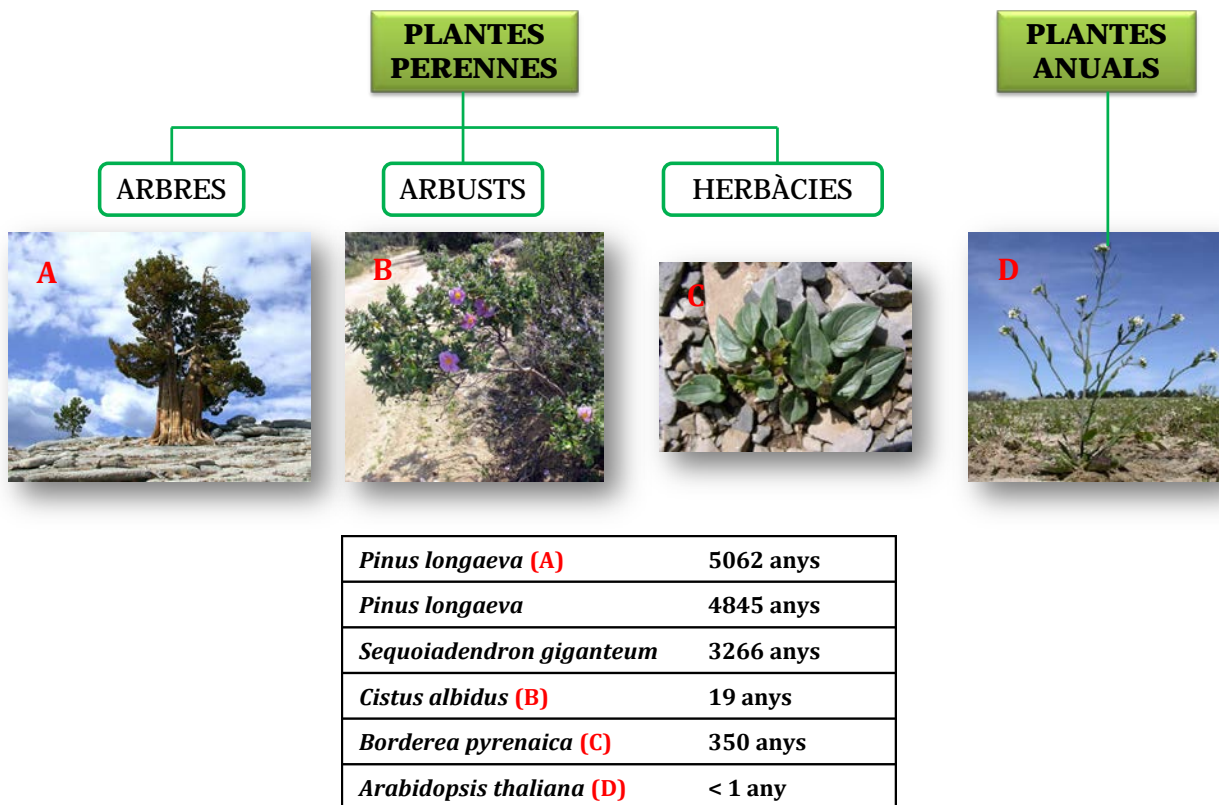


Figura 13. Exemples de diferents espècies del regne vegetal amb diferents longevitats, des de setmanes (*A. thaliana*) a milers d'anys en *P. longaeva*. Es pot visitar la pàgina web "Rocky Mountain Tree-Ring Research" (<http://www.rmtrr.org/oldlist.htm>) per consultar el registre dels arbres més longeus fins a la data registrats.

Tot i així, els estudis longitudinals també presenten algunes limitacions i és que són estudis difícils de realitzar en organismes que són centenaris i, fins i tot, mil·lenaris, com és el cas d'algunes plantes perennes. A més, en els estudis longitudinals és imprescindible conèixer l'edat dels individus estudiats i la majoria de mètodes són destructius o simplement inviables per algunes espècies. Un dels mètodes més emprats és la dendrocronologia, que es basa en la datació mitjançant el comptatge dels anells de creixement anuals en plantes arbòries i arbusts llenyoses, però que en el cas de les herbàcies no es pot aplicar aquest mètode ja que es limita a una escassa probabilitat d'espècies que formin anells. Actualment, es coneixen molt poques herbàcies que formin anells, per exemple, *Helleborus foetidus* i *Silene cilata* (Olano *et al.*, 2013). En aquest aspecte *B. pyrenaica* resulta un model de planta herbàcia

clau per investigar els processos associats a l'edat gràcies a la seva fàcil datació mitjançant les cicatrius que anualment es formen en el seu tubercle.

5.3. Rang d'edats

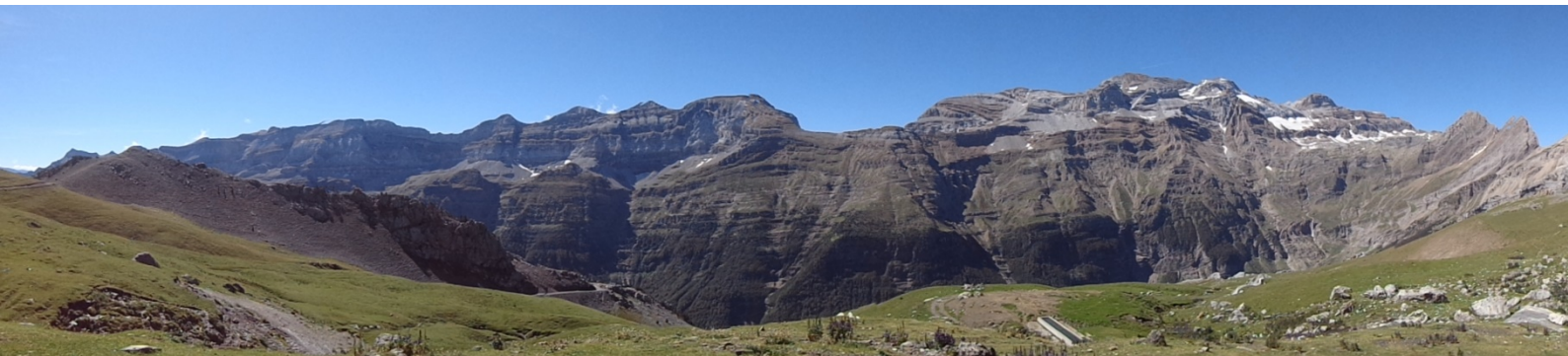
Tot i les limitacions tècniques comentades, no són aquestes les úniques dificultats que apareixen en l'estudi de poblacions naturals. Una de les principals dificultats que emmarca l'estudi de l'envelliment és trobar poblacions naturals amb un ampli rang d'edats que permetin caracteritzar l'espècie des del punt de vista de l'envelliment.

Molts dels estudis duts a terme sobre l'envelliment es veuen limitats en l'estudi de rangs d'edats fins a l'etapa madura de l'espècie, al voltant de la seva esperança de vida, el qual fa plantejar-se si els efectes que s'associen a l'envelliment són realment deguts a la maduresa, i no a l'edat. Seria necessari incloure individus realment vells, però com hem comentat, és una complicada tasca donada la baixa probabilitat que hi ha de trobar individus molt vells en la natura. Això fa que ens replantegem el citat per Hayflick (2000) sobre el fet que l'envelliment és un artefacte de la societat que no es dona en les poblacions que viuen en condicions naturals, ja que els individus moren com a conseqüència de factors externs abans d'assolir el procés de senescència.

En el cas especial de *B. pyrenaica*, l'objectiu d'aconseguir un ampli rang d'edats es complica donat que es tracta d'una espècie protegida dels Pirineus Centrals amb un alt valor ecològic, factors que limiten el mostreig de molts individus i que, per tant, dificulta la probabilitat de trobar individus majors de 300 anys (García & Antor, 1995a), els quals de per si ja són escassos en la població. A més a més, ens podem plantejar altres limitacions des d'un punt de vista ètic, ja que destruir un elevat nombre d'aquests individus centenaris podria suposar, si més no, un considerable impacte en aquestes poblacions relictas.

Tot i les dificultats que presenten els estudis d'envelliment en plantes perennes, solventar aquestes limitacions és un gran repte per enriquir els coneixements científics d'aquest àmbit. Aquests estudis tenen sense dubte un alt valor ecològic propi en el sentit que permet conèixer l'ecologia de la pròpia espècie, a més del valor afegit de poder aprofundir en un dels temes que ha preocupat a la humanitat al llarg de la seva història – l'envelliment – i conèixer més enllà de la nostra pròpia espècie humana com és el procés de l'envelliment en organismes tan longeus que habiten el nostre planeta des de fa milers d'anys, sent capaços d'afrontar extremes variacions climàtiques, tot i ser organismes sèssils.

Des del meu punt de vista, voldria per últim remarcar la importància i la necessitat de profunditzar en el coneixement de les plantes perennes, ja que ens mostren que són organismes altament resistents a l'estrès i a l'envelliment. Tal com s'ha demostrat en aquesta tesi, l'envelliment, o dit d'un altre manera, el pas del temps, en les plantes perennes no sembla ser la causa principal del declivi funcional de l'organisme sencer.



CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

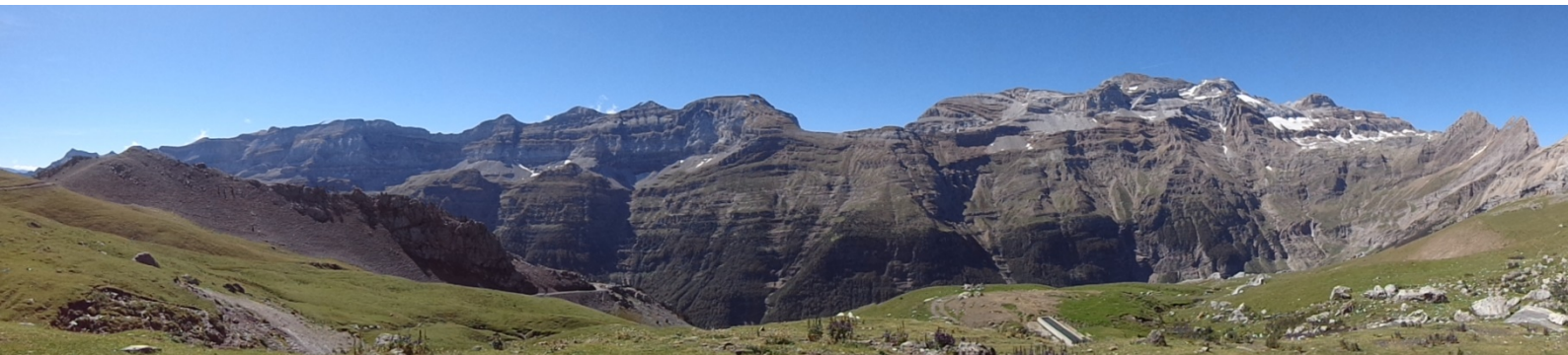
- L'herbàcia perenne no clonal – *B. pyrenaica* – més longeva registrada fins a la data, no presenta signes de deteriorament fisiològic a nivell de planta sencera amb l'edat, en termes d'estrès oxidatiu, almenys fins a l'edat estudiada (280 anys).
- Les femelles centenàries de *B. pyrenaica* presenten una major capacitat de fotoprotecció que els mascles de la mateixa edat i les plantes de menor edat (senescència negativa).
- L'òrgan perenne subterrani de *B. pyrenaica* – els tubercles – sembla ser el secret de la seva extraordinària longevitat, considerant la seva peculiar estratègia de creixement basada en l'activació seqüencial (anualment) dels cinc punts meristemàtics, el creixement lent i continu del tubercle subterrani i el seu eficient mecanisme de protecció antioxidant en vitamina E que augmenta amb l'edat (senescència negativa).
- L'augment de vitamina E amb l'edat en els tubercles de *B. pyrenaica* i en fulles de *V. gigantea* protegeix de l'estrès oxidatiu, tal com es mostra en la disminució de la peroxidació lipídica.
- La mortalitat en *B. pyrenaica* dependria de factors externs, com patògens, alteracions físiques o condicions climàtiques extremes, més que per factors interns com l'edat.
- En *V. gigantea* no només les plantes de major tamany van mostrar una eficient homeòstasi hídrica i nutricional, almenys igual d'eficient que les de menor tamany; sinó que a més els nivells de vitamina E, important mecanisme de protecció contra l'estrès oxidatiu, van ser significativament més alts en les plantes de major tamany. L'absència de

deteriorament fisiològic amb el tamany i, en conseqüència amb un augment de l'edat, revela senescència negligible en *V. gigantea*.

- La teoria dels radicals lliures no es compleix en les plantes perennes de gran longevitat estudiades en aquesta tesi, *B. pyrenaica* i *V. gigantea*, tal com s'observa en l'anàlisi dels marcadors d'estrès oxidatiu que no augmenten amb l'edat de la planta.
- La vitamina E augmenta durant condicions ambientals adverses per protegir de l'estrès oxidatiu a la vegada que també augmenta amb l'edat de la planta per evitar el deteriorament fisiològic (senescència). Per tant, la vitamina E es pot utilitzar com a marcador d'estrès oxidatiu com a mecanisme de protecció contra aquest.
- Durant les condicions de dèficit hídric de l'estació seca on creix *V. gigantea* aquesta desenvolupa un eficient mecanisme de protecció, on l'ABA té un paper essencial en la inducció del tancament estomàtic en fulles per conservar l'aigua en la planta, però a més, indueix presumiblement la síntesi de vitamina E per protegir de l'estrès oxidatiu.
- Tant els tocotrienols com els tocoferols (vitamina E) en les fulles de *V. gigantea* tenen un paper important de protecció contra l'estrès foto-oxidatiu.
- La vitamina E actua presumiblement com a punt de control en la resposta a estressos abiòtics i biòtics, en el que l'augment de vitamina E com a protecció contra l'estrès oxidatiu es veu contrarestada per la disminució dels jasmonats, implicats en les defenses biòtiques.
- Les plantes perennes són organismes altament resistents a l'estrès i l'envelliment, tal com es mostra en els mecanismes de protecció que desenvolupen per a mantenir les seves funcions fisiològiques fins edats

molt avançades, observant que ni l'edat ni el tamany de la planta és la causa principal del declivi funcional de l'organisme.

- Els patrons de desenvolupament en plantes perennes (indeterminació dels meristemes i creixement modular) juntament amb un creixement lent, els períodes de dormició i l'elevada plasticitat adaptativa permet desenvolupar cicles vitals de gran longevitat en algunes espècies, com seria el cas de les espècies estudiades en aquesta tesi.



BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Abbasi A, Saur A, Hennig P, Tschiersch H, Hajirezaei M, Hofius D, Sonnewald U, Voll LM** (2009) Tocopherol deficiency in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants leads to accelerated senescence. *Plant, Cell and Environment* 32: 144–157.
- Abdul-Hamid H, Mencuccini M** (2009) Age- and size-related changes in physiological characteristics and chemical composition of *Acer pseudo-platanus* and *Fraxinus excelsior* trees. *Tree Physiology* 29: 27–38.
- Abrams PA** (1993) Does increased mortality favor the evolution of more rapid senescence? *Evolution* 47: 877–87.
- 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*. *Journal of Experimental Botany* 60: 1261–1271.
- Ågren J** (1988) Sexual differences in biomass and nutrient allocation in the dioecious *Rubus chamaemorus*. *Ecology* 69: 962–973.
- Ahmad P, Jaleel CA, Salem MA, Nabi G, Sharma S** (2010) Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology* 30: 161–175.
- Ally D, Ritland K & Otto SP** (2010) Aging in a long-lived clonal tree. *PLOS Biology* 8: e1000454.
- Alves RJV** (1994) Morphological age determination and longevity in some *Vellozia* populations in Brazil. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica* 29: 55–59.
- Alves RJV, Guimarães AR, Rezende CM, Braga LS, da Silva NG** (2014) A new giant *Vellozia* (Velloziaceae) from Minas Gerais, Brazil with comments on the *Vellozia compacta* complex and conservation. *Phytotaxa* 172: 13–21.
- Andersson M** (1994) Sexual selection. Princeton, New Jersey, United States: Princeton University Press.
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Reviews of Plant Biology* 55: 373–399.

- Aristòtil** De juventute et senectute, De vita et morte, De respiration. Parva Naturalia, 467b.
- Arrom L, Munné-Bosch S** (2012) Hormonal changes during flower development in floral tissues of *Lilium*. *Planta* 236: 343–354.
- Asada K** (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen species and dissipation of excess photons. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 601–639.
- Asada K** (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* 141: 391–396.
- Asensi-Fabado MA, Ammon A, Sonnewald U, Munné-Bosch S, Voll LM** (2015) Tocopherol deficiency reduces sucrose export from salt-stressed potato leaves independently of oxidative stress and symplastic obstruction by callose. *Journal of Experimental Botany* 66: 957–971.
- Ashman TL** (1994) A dynamic perspective on the physiological cost of reproduction in plants. *American Naturalist* 144: 300–316.
- Ashok B, Ali R** (1999) The aging paradox: free radical theory of aging. *Experimental of Gerontology* 34: 293–303.
- Ayensu ES** (1973) Biological and morphological aspects of Velloziaceae. *Biotropica* 5: 135–149.
- Balcombe NR, Sinclair A** (2001) Ageing: definitions, mechanisms and the magnitude of the problem. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology* 15: 835–849.
- Bandurska H, Niedziela J, Chadzinikolau T** (2013) Separate and combined responses to water deficit and UV-B radiation. *Plant Science* 213: 98–105.
- Bañuelos MJ, Obeso** (2004) Resource allocation in the dioecious shrub *Rhamnus alpinus*: the hidden costs of reproduction. *Evolutionary Ecology Research* 6: 397–413.
- Barrett SCH, Hough J** (2013) Sexual dimorphism in flowering plants. *Journal of Experimental Botany* 64: 67–82.

- Baudisch A** (2005) Hamilton's indicators of the force of selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 8263–8268.
- Bäurle I, Laux T** (2003) Apical meristems: the plant's fountain of youth. *BioEssays* 25: 961–970.
- Beckman KB, Ames BN** (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews* 78: 547–581.
- Blackburn EH** (1991) Structure and function of telomeres. *Nature* 350: 569–573.
- Blockina O, Fagerstedt KV** (2010) Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Physiologia Plantarum* 138: 447–462.
- Bokov A, Chaudhuri A, Richardson A** (2004) The role of oxidative damage and stress in aging. *Mechanisms of Ageing and Development* 125: 811–826.
- Bond BJ** (2000) Age-related changes in photosynthesis of woody plants. *Trends in Plant Science* 5: 349–353.
- Bond BJ, Czarnomski NM, Cooper C, Day ME, Greenwood MS** (2007) Developmental decline in height growth in Douglas-fir. *Tree Physiology* 27: 441–453.
- Boot R, Raynal DJ, Grime JP** (1986) A comparative study of the influence of drought stress on flowering in *Urtica dioica* and *U. urens*. *Journal of Ecology* 74: 485–495.
- Brown-Sequard CE** (1889) The effects produced on man by subcutaneous injections of liquid obtained from the testicles of animals. *Lancet* 2: 105.
- Buchanan-Wollaston V, Earl S, Harrison E, Mathas E, Navabpour S, Page T, Pink D** (2003) The molecular analysis of leaf senescence: a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal* 1: 3–22.
- Burnet FM** (1960) Immunologic recognition of self. *The Nobel Lectures in Immunology. The Nobel Prize for Physiology or Medicine.*
- Brownlee M** (1991) Glycosylation products as toxic mediators of diabetic complications. *Annual Review of Medicine* 42: 159–166.

- Candan N, Tarhan L** (2003) Relationship among chlorophyll-carotenoid content, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels by Mg²⁺ deficiency in the *Mentha pulegium* leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 35–40.
- 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.
- Charlesworth B** (1994) Evolution in age-structured populations. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press.
- Chaudhary N, Khurana P** (2009) Vitamin E biosynthesis genes in rice: molecular characterization, expression profiling and comparative phylogenetic analysis. *Plant Science* 177: 479–491.
- Chrost B, Falk J, Kernebeck B, Mölleken H, Krupinska K** (1999) Tocopherol biosynthesis in senescing chloroplasts—a mechanism to protect envelope membranes against oxidative stress and a prerequisite for lipid remobilization? In: Argyroudi-Akoyunoglou JH, Senger H (eds). *The chloroplast: from molecular biology to biotechnology*. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Cipollini ML, Whigham DF** (1994) Sexual dimorphism and cost of reproduction in the dioecious shrub *Lindera benzoin* (Lauraceae). *American Journal of Botany* 81: 65–75.
- Comfort A** (1979) *The biology of senescence*. Edinburgh, Scotland: Churchill Livingstone.
- Congdon JD, Gibbons JW, Brooks RJ, Rollinson N, Tsaliagos RN** (2013) Indeterminate growth in long-lived freshwater turtles as a component of individual fitness. *Evolutionary Ecology* 27: 445–59.
- Dahlgren JP, García MB, Ehrlen J** (2011) Nonlinear relationships between vital rates and state variables in demographic models. *Ecology* 92: 1181–1187.
- Dall'Osto L, Lico C, Alric J, Giuliano G, Havaux M, Bassi R** (2006) Lutein is needed for efficient chlorophyll triplet quenching in the major LHCII antenna complex of higher plants and effective photoprotection in vivo under strong light. *BMC Plant Biology* 6: 32.

- Dangl JL, Jones JDG** (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826–833.
- Dangl JL, Dietrich RA, Thomas H** (2000) Senescence and programmed cell death. In: Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL, (eds). *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, Maryland, United States, ASPP.
- Darwin C** (1859) *On the origin of species*. London, United Kingdom: John Murray.
- Davies PJ** (2010) The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: Davies PJ (ed). *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!* Dordrecht, Netherlands: Springer.
- Davies PJ, Gan S** (2012) Towards an integrated view of monocarpic plant senescence. *Russian Journal of Plant Physiology* 59: 467–478.
- Dawkins R** (1976) *The Selfish Gene*. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press.
- Demmig-Adams B, Adams WW III** (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 599–626.
- Demmig-Adams B, Adams WW III** (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science* 1: 21–26.
- Demmig-Adams B, Cohu CM, Amiard V, van Zadelhoff G, Veldink GA, Muller O, Adams WW III** (2013) Emerging trade-offs—impact of photoprotectants (PsbS, xanthophylls, and vitamin E) on oxylipins as regulators of development and defense. *New Phytologist* 197: 720–729.
- Demmig-Adams B, Stewart JJ, Adams WW III** (2014) Chloroplast photoprotection and the trade-off between abiotic and biotic defense. In: Demmig-Adams B *et al.* (eds). *Non-photochemical quenching and energy dissipation in plants, algae and cyanobacteria, advances in photosynthesis and respiration*. Dordrecht, Netherlands: Springer.
- Dhindsa R, Plumb-Dhindsa P, Thorpe T** (1981) Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany* 32: 93–101.

- Duffy NM, Bonser SP, Aarssen LW** (1999) Patterns of variation in meristem allocation across genotypes and species in monocarpic Brassicaceae. *Oikos* 84: 284–292.
- Ehlers BK, Olesen JM** (2004) Flower production in relation to individual plant age and leaf production among different patches of *Corydalis intermedia*. *Plant Ecology* 174: 71–78.
- El Kayal W, Keller G, Debayles C, Kumar R, Weier D, Teulieres C, Marque C** (2006) Regulation of tocopherol biosynthesis through transcriptional control of tocopherol cyclase during cold hardening in *Eucalyptus gunnii*. *Physiologia Plantarum* 126: 212–223.
- Falk J, Munné-Bosch S** (2010) Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. *Journal of Experimental Botany* 61: 1549–1566.
- Farmer EE, Mueller MJ** (2013) ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signalling. *Annual Review of Plant Biology* 64: 429–450.
- Finch CE** (1990) Longevity, senescence, and the genome. Chicago, United States: University of Chicago Press.
- Finch CE** (1998) Variations in senescence and longevity include the possibility of negligible senescence. *Journal of Gerontology Biological Sciences* 53A: B235–B239.
- Finch CE** (2008) Update on slow aging and negligible senescence—a mini-review. *Gerontology* 55: 307–313.
- Finch CE, Hayflick L** (1977) Handbook of the biology of aging. New York, United States: Van Nostrand Reinhold Company.
- Finch CE, Austad SN** (2001) History and prospects: symposium on organisms with slow aging. *Experimental Gerontology* 36: 593–597.
- Finkel T, Holbrook NJ** (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239–247.
- Fischer BB, Hideg É, Krieger-Liszakay A** (2013) Production, detection, and signaling of singlet oxygen in photosynthetic organisms. *Antioxidant and Redox Signaling* 18: 2145–2162.

- Fontagne S, Lataillade E, Breque J, Kaushik S** (2008) Lipid peroxidative stress and antioxidant defence status during ontogeny of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *British Journal of Nutrition* 100: 102–111.
- Fonseca S, Chini A, Hamberg M, Adie B, Porzel A, Kramell R, Miersch O, Wasternack C, Solano R** (2009) (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology* 5: 344–350.
- Foyer CH, Noctor G** (2005) Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment* 28: 1056–1071.
- Foyer CH, Noctor G** (2015) Defining robust redox signaling within the context of the plant cell. *Plant, Cell and Environment* 38: 239.
- Foyer CH, Bloom AJ, Queval G, Noctor G** (2009) Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signalling. *Annual Review of Plant Biology* 60: 455–484.
- Franzese J, Ghermandi L** (2011) Seed longevity and fire: germination responses of an exotic perennial herb in NW Patagonian grasslands (Argentina). *Plant Biology* 13: 865–871.
- Galen C, Dawson TE, Stanton ML** (1993) Carpels as leaves: meeting the carbon cost of reproduction in an alpine buttercup. *Oecologia* 95: 187–193.
- García MB, Antor RJ** (1995a) Age and size structure in populations of a long-lived dioecious geophyte: *Borderea pyrenaica* (Dioscoreaceae). *International Journal of Plant Sciences* 156: 236–243.
- García MB, Antor RJ** (1995b) Sex ratio and sexual dimorphism in the dioecious *Borderea pyrenaica* (Dioscoreaceae). *Oecologia* 101: 59–67.
- García MB, Dahlgren JP, Ehrlén J** (2011) No evidence of senescence in a 300-year-old mountain herb. *Journal of Ecology* 99: 1424–30.
- García Plazaola JI, Hernández A, Becerril JM** (2003) Antioxidant and pigment composition during autumnal leaf senescence in woody deciduous species differing in their ecological traits. *Plant Biology* 5: 557–566.
- Gavrilov LA, Gavrilova NS** (2002) Evolutionary theories of aging and longevity. *The Scientific World Journal* 2: 339–356.

Gebber MA, Dawson TE, Delph LF (1999) Gender and sexual dimorphism in flowering plants. Heidelberg, Germany: Springer.

Gems D, Partridge L (2008) Stress–response hormesis and aging: ‘That which Does Not Kill Us Makes Us Stronger’. Cell Metabolism 7: 200–203.

Gershman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO (1954) Oxygen poisoning and X-irradiation – a mechanism in common. Science 119: 623–626.

Goldman DA, Willson MF (1986) Sex allocation in functionally hermaphroditic plants: a review and a critique. Botanical Review 52: 157–194.

Goldsmith TC (2014) The evolution of aging. Crownsville, Maryland, United States: Azinet Press.

Gompertz B (1825) Life contingencies new mode of determining the value of of the law of human mortality, and on a on the nature of the function expressive. Philosophical Transactions B of the Royal Society of London 115: 513–583.

Greenwood MS (1995) Juvenility and maturation in conifers: current concepts. Tree Physiology 15: 433–438.

Greenwood MS, Day ME, Schatz J (2010) Separating the effects of tree size and meristem maturation on shoot development of grafted scions of red spruce (*Picea rubens*). Tree Physiology 30: 459–468.

Guelman LR (2004) Teorías del envejecimiento. Perspectiva evolutiva. Psicofarmacología, 28.

Halliwell B, Gutteridge JM (1999) Free radicals in biology and medicine. Oxford, United Kingdom: Oxford Science Publications.

Hancock JF, Bringham RS (1980) Sexual dimorphism in the strawberry *Fragaria chiloensis*. Evolution 34: 762–768.

Hansen A, Pate JS, Hansen AP (1992) Growth, reproductive performance and resource allocation of the herbaceous obligate seeder *Gompholobium marginatum* R.Br. (Fabaceae). Oecologia 90: 158–166.

Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. Nature 345: 458–460.

- Harris MS, Pannel JR** (2008) Roots, shoots and reproduction: sexual dimorphism in size and costs of reproductive allocation in an annual herb. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 275: 2595–2602.
- Harman D** (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology* 2: 298–300.
- Havaux M** (1998) Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends in Plant Science* 3: 147–151.
- Havaux M, Eymery F, Porfirova S, Rey P, Dörmann P** (2005) Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 17: 3451–3469.
- Hayflick L** (1965) The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* 37: 614–636.
- Hernández I, Alegre L, Munné-Bosch S** (2011) Plant aging and excess light enhance flavan-3-ol content in *Cistus clusii*. *Journal of Plant Physiology* 168: 96–102.
- Hodges, DM, DeLong JM, Forney CF, 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.
- Holliday R, Plug JE** (1975) DNA modification mechanism and gene activity during development. *Science* 187: 226–232.
- Horvath G, Wessjohann L, Bigirimana J, Jansen M, Guisez Y, Caubergs R, Horemans N** (2006) Differential distribution of tocopherols and tocotrienols in photosynthetic and non-photosynthetic tissues. *Phytochemistry* 67: 1185–1195.
- Jazwinski SM** (1996) Longevity, genes and aging. *Science* 273: 54–58.
- Jibrán R, Hunter DA, Dijkwel PP** (2013) Hormonal regulation of leaf senescence through integration of developmental and stress signals. *Plant Molecular Biology* 82: 547–561.
- Joly AB** (1998) *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. São Paulo, Brasil: Companhia Editora Nacional.

- Jones OR, Scheuerlein A, Salguero-Gómez R, Camarda CG, Schaible R, Casper BB, Dahlgren JP, Ehrlén J, García MB, Menges ES, Quintana-Ascencio PF, Caswell H, Baudisch A, Vaupel JW** (2014) Diversity of ageing across the tree of life. *Nature* 505: 169–73.
- Jönsson KI** (2000) Life history consequences of fixed costs of reproduction. *Ecoscience* 7: 423–427.
- Juvany M, Müller M, Pintó-Marijuan M, Munné-Bosch S** (2014) Sex-related differences in lipid peroxidation and photoprotection in *Pistacia lentiscus*. *Journal of Experimental Botany* 65: 1039–1049.
- Kamal-Eldin A, Appelqvist L** (1996) The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31: 671–701.
- Kapahi P, Boulton ME, Kirkwood TBL** (1999) Positive correlation between mammalian life span and cellular resistance to stress. *Free Radical Biology and Medicine* 26: 495–500.
- Kawano T, Sahashi N, Takahashi K, Uozumi N, Muto S** (1998) Salicylic acid induces extracellular superoxide generation followed by an increase in cytosolic calcium ion in tobacco suspension culture: the earliest events in salicylic acid signal transduction. *Plant and Cell Physiology* 39: 721–730.
- Keeley JE, Bond WJ** (1999) Mast flowering and semelparity in bamboos: the bamboo fire cycle hypothesis. *The American Naturalist* 154: 383–391.
- Kirkpatrick M** (1984) Demographic models based on size, not age, for organisms with indeterminate growth. *Ecology* 65: 1874–1884.
- Kirkwood TBL** (2001) Sex and ageing. *Experimental Gerontology* 36: 413–418.
- Kirkwood TBL** (2005) Understanding the odd science of aging. *Cell* 120: 437–447.
- Kirkwood TBL** (2008) A systematic look at an old problem. *Nature* 451: 644–7.
- Kirkwood TBL, Holliday R** (1979) The evolution of ageing and longevity. *Proceedings Royal Society London B Biological Science* 205: 531–546.

- Kirkwood TBL, Rose MR** (1991) Evolution of senescence: late survival sacrificed for reproduction. *Philosophical Transactions B of the Royal Society of London* 332: 15–24.
- Kirkwood TBL, Austad SN** (2000) Why do we age? *Nature* 408: 233–238.
- Kirkwood TBL, Melov S** (2011) On the programmed/non-programmed nature of ageing within the life history. *Current Biology* 21: 701–707.
- Klarsfeld A, Revah F** (2002) *Biología de la muerte*. Madrid, España: Editorial Complutense La Mirada de la ciencia.
- Klessig DF, Durner J, Noad R, Navarre DA, Wendehenne D, Kumar D, Zhou JM, Shah J, Zhang S, Kachroo P, Trifa Y, Pontier D, Lam E, Silva H** (2000) Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 8849–8855.
- Koch GW, Sillet SC, Jennings GM, Davis SD** (2004) The limits to tree height. *Nature* 428: 851–854.
- Korpelainen H** (1992) Patterns of resource allocation in male and female plants of *Rumex acetosa* and *R. acetosella*. *Oecologia* 89: 133–139.
- Korpelainen H** (1999) Labile sex expression in plants. *Biological Reviews* 73: 157–180.
- Krieger-Liszkay A, Christian Fufezan, Achim Trebst** (2008) Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanisms. *Photosynthesis Research* 98: 551–564.
- Kunert KJ, Ederer M** (2006) Leaf aging and lipid peroxidation: The role of the antioxidants vitamin C and E. *Physiologia Plantarum* 65: 85–88.
- Laurenroth WK, Adler PB** (2008) Demography of perennial grassland plants: survival, life expectancy and life span. *Journal of Ecology* 96: 1023–1032.
- Lim PO, Nam H** (2005) The molecular and genetic control of leaf senescence and longevity in *Arabidopsis*. *Current Topics in Developmental Biology* 67: 49–83.
- Lee SC, Luan S** (2012) ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. *Plant, Cell and Environment* 35: 53–60.
- Levitt J** (1980) *Responses of plants to environmental stresses*. New York, United States: Academic Press Inc.

- Liang Y, Sun W, Zhu Y-G, Christie P** (2007) Mechanisms of silicon-mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: a review. *Environmental Pollution* 147: 422–428.
- Li C, Ren J, Luo J, Lu R** (2004) Sex-specific physiological and growth responses to water stress in *Hippophae rhamnoides* L. populations. *Acta Physiologiae Plantarum* 26: 123–129.
- Lichtenthaler HK** (1996) Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *Journal of Plant Physiology* 148: 4–14.
- Lichtenthaler HK** (1998) The stress concept in plants: an introduction. *Annals New York Academy of Sciences* 851: 187–98.
- Lichtenthaler HK, Wellburn AR** (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 11: 591–592.
- Lithgow GJ, Walker GA** (2002) Stress resistance as a determinate of *C. elegans* lifespan. *Mechanisms of Ageing and Development* 123: 765–771.
- Liu Z, Yan H, Wang K, Kuang T, Zhang J, Gui L, An X, Chang W** (2004) Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature* 428: 287–292.
- Lockshin RA, Williams CM** (1965) Programmed cell death—I. cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silkworm. *Journal of Insect Physiology* 11: 123–33.
- Iszkulo G, Jasińska AK, Giertych MJ, Boratyński A** (2009) Do secondary sexual dimorphism and female intolerance to drought influence the sex ratio and extinction risk of *Taxus baccata*? *Plant Ecology* 200: 229–240.
- Maeda H, Sakuragi Y, Bryant DA, DellaPenna D** (2005) Tocopherols protect *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 from lipid peroxidation. *Plant Physiology* 138: 1422–1435.
- Matringe M, Ksas B, Rey P, Havaux M** (2008) Tocotrienols, the unsaturated forms of vitamin E, can function as antioxidants and lipid protectors in tobacco leaves. *Plant Physiology* 147: 764–778.
- Matsuyama S, Sakimoto M** (2008) Allocation to reproduction and relative reproductive costs in two species of dioecious Anacardiaceae with contrast phenology. *Annals of Botany* 101: 1391–1400.
- Maxwell K, Johnson GN** (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659–668.

- McCay CM, Crowell MP, Maynard LA** (1935) The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. *The Journal of Nutrition* 10: 63–79.
- Medawar PB** (1952) *An unsolved problem of biology*. London, United Kingdom: H. K. Lewis and Company.
- Medvedev ZA** (1990) An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 65: 375–398.
- Mencuccini M, Martínez-Vilalta J, Vanderklein D, Hamid HA, Korakaki E, Lee S, Michiels B** (2005) Size-mediated ageing reduces vigour in trees. *Ecology Letters* 8: 1183–1190.
- Mencuccini M, Oñate M, Rico L, Peñuelas J, Munné-Bosch S** (2014) No signs of meristem senescence in old Scots pine. *Journal of Ecology* 102: 555–565.
- Mello-Silva R, de Menezes NL** (2014) Velloziaceae in *Honorem appellatae*. *Phytotaxa* 175: 85–96.
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY** (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126: 969–980.
- Melotto M, Underwood W, He SY** (2008) Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology* 46: 101–122.
- Messing SAJ, Gabelli SB, Echeverria I, Vogel JT, Guan JC, Tan BC, Klee HJ, McCarty DR, Amzel LM** (2010) Structural insights into maize *Viviparous14*, a key enzyme in the biosynthesis of the phytohormone abscisic acid. *Plant Cell* 22: 2970–2980.
- Miquel J** (1997) An integrated theory of aging as the result of mitochondrial-DNA mutation in differentiated cells. *Archives of Gerontology and Geriatrics* 12: 99–117.
- Mittler R** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405–410.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F** (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9: 490–498.

- Møller IM** (2001) Plant mitochondria and oxidative stress. Electron transport, NADPH turnover and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 561–591.
- Møller IM, Jensen PE, Hansson A** (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 58: 459–481.
- Monaghan P** (2008) Early growth conditions, phenotypic development and environmental change. *Philosophical Transactions B of the Royal Society of London* 363: 1635–1645.
- Monaghan P, Charmantier A, Nussey DH, Ricklefs E** (2008) The evolutionary ecology of senescence. *Functional Ecology* 22: 371–378.
- Monaghan P, Metcalfe NB, Torres R** (2009) Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology Letters* 12: 75–92.
- Montesinos D, Villar-Salvador P, García-Fayos P, Verdu M** (2012) Genders in *Juniperus thurifera* have different functional responses to variations in nutrient availability. *New Phytologist* 193: 705–712.
- Moriuchi KS, Winn AA** (2005) Relationships among growth, development and plastic response to environment quality in a perennial plant. *New Phytologist* 166: 149–158
- 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 and viability. *Journal of Experimental Botany* 65: 287–297.
- Munné-Bosch S** (2005) The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *Journal of Plant Physiology* 162: 743–748.
- Munné-Bosch S** (2007) Aging in perennials. *Critical Reviews in Plant Sciences* 26: 123–138.
- Munné-Bosch S** (2008) Do perennials really senesce? *Trends in Plant Science* 13: 216–220.
- Munné-Bosch S** (2010) Potentially immortal? *New Phytologist* 187: 564–567.

- Munné-Bosch S** (2014) Perennial roots to immortality. *Plant Physiology* 166: 720–725.
- Munné-Bosch S, Alegre L** (2000) Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta* 210: 925–931.
- Munné-Bosch S, Alegre L** (2002a) The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21: 31–57.
- Munné-Bosch S, Alegre L** (2002b) Plant aging increases oxidative stress in chloroplasts. *Planta* 214: 608–615.
- Munné-Bosch S, Peñuelas J** (2003) Photo- and antioxidative protection during summer leaf senescence in *Pistacia lentiscus* L. grown under Mediterranean field conditions. *Annals of Botany* 92: 385–391.
- Munné-Bosch S, Falk J** (2004) New insights into the function of tocopherols in plants. *Planta* 218: 323–326.
- 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, Falara V, Pateraki I, López-Carbonell M, Cela J, Kanellis AK** (2009) Physiological and molecular responses of the isoprenoid biosynthetic pathway in a drought-resistant Mediterranean shrub, *Cistus creticus* exposed to water deficit. *Journal of Plant Physiology* 166: 136–145.
- Munné-Bosch S, Queval G, Foyer CH** (2013) The impact of global change factors on redox signaling underpinning stress tolerance. *Plant Physiology* 161: 9–15.
- Nardini A, Lo Gullo MA, Salleo S** (1999) Competitive strategies for water availability in two Mediterranean *Quercus* species. *Plant, Cell and Environment* 22: 109–116.
- Neill S, Desikan R, Hancock J** (2002) Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 388–395.
- Noodén LD & Leopold AC** (1988) Senescence and aging in plants. San Diego, California, United states: Academic Press Inc.

- Nussey DH, Froy H, Lemaitre J-F, Gaillard JM, Austad SN** (2013) Senescence in natural populations of animals: widespread evidence and its implications for biogerontology. *Ageing Research Reviews* 112: 214–225.
- Obeso JR, Álvarez-Santullano M, Retuerto R** (1998) Sex-ratios, size distributions, and sexual dimorphism in the dioecious tree *Ilex aquifolium* (Aquifoliaceae). *American Journal of Botany* 85: 1602–1608.
- Obeso JR** (2002) The costs of reproduction in plants. *New Phytologist* 155: 321–348.
- Ogburn CE, Carlberg K, Ottinger MA, Holmes DJ, Martin GM, Austad SN** (2001) Exceptional cellular resistance to oxidative damage in long-lived birds requires active gene expression. *Journals of Gerontology Series A – Biological Sciences and Medical Sciences* 56: B468–B474.
- Oliveira RS, Galvão HC, de Campos MCR, Eller CB, Pearse SJ, Lambers H** (2015) Mineral nutrition of campos rupestres plant species on contrasting nutrient-impooverished soil types. *New Phytologist* 205: 1183–1194.
- Olovnikov AM** (1973) A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *Journal of Theoretical Biology* 41: 181–90.
- Oñate M, Munné-Bosch S** (2008) Meristem aging is not responsible for age-related changes in growth and abscisic acid levels in the Mediterranean shrub, *Cistus clussi*. *Plant Biology* 10: 148–155.
- Oñate M, Munné-Bosch S** (2009) Influence of plant maturity, shoot reproduction and sex on vegetative growth in the dioecious plant *Urtica dioica*. *Annals of Botany* 104: 945–956.
- 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: 475–83.
- Oñate M, García MB, Munné-Bosch S** (2011) Age and sex-related changes in cytokinins, auxins and abscisic acid in a centenarian relict herbaceous perennial. *Planta* 235: 349–358.

- Orgel LE** (1963) The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to aging. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 49: 517–21.
- Orgel LE** (1970) The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to aging: a correction. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 67: 1476.
- Orgel LE** (1973) Ageing of clones of mammalian cells. *Nature* 243: 441–445
- Ortiz PL, Arista M, Talavera S** (2002) Sex ratio and reproductive effort in the dioecious *Juniperus communis* subsp. *alpine* (Suter) Celak. (Cupressaceae) along an altitudinal gradient. *Annals of Botany* 89: 205–211.
- Osmond B, Badger M, Maxwell K, Bjorkman O, Leegood R** (1997) Too many photos: photorespiration, photoinhibition and photooxidation. *Trends in Plant Science* 2: 119–121.
- Ottinger MA, Ricklefs RE, Finch CE** (2003) Proceedings of the 2nd Symposium on Organisms with Slow Aging (SOSA-2). *Experimental Gerontology* 38: 721–722.
- Padley FB, Gunstone FD, Harwood J** (1994) *The lipid handbook*. London, United Kingdom: Chapman & Hall.
- Pardo AG, Hernández DR** (2003) Senescencia celular y envejecimiento. *Revista Cubana Investigación Biomédica* 22: 204–12.
- Pardo D, Barbraud C, Authier M, Weimerskirch H** (2013) Evidence for an age-dependent influence of environmental variations on a long-lived seabird's life-history traits. *Ecology* 94: 208–20.
- Partridge L, Gems D** (2007) Benchmarks for ageing studies. *Nature* 450: 165–167.
- Pearl P** (1928). *The rate of living*. London, United Kingdom: University of London Press LTD.
- Peisker C, Diiggelin T, Rentsch D, Matile P** (1989) Phytol and the breakdown of chlorophyll in senescent leaves. *Journal of Plant Physiology* 135: 428–432.
- Peñuelas J, Munné-Bosch S** (2010) Potentially immortal? *New Phytologist* 187: 564–567.

- Pintó-Marijuan M & Munné-Bosch S (2014)** Photo-oxidative stress markers as a measure of abiotic stress-induced leaf senescence: advantages and limitations. *Journal of Experimental Botany* 65: 3845–3857.
- Pitzschke A, Forzani C, Hirt H (2006)** Reactive oxygen species signaling in plants. *Antioxidants and Redox Signaling* 8: 1757–1764.
- Piper MDW, Partridge L, Raubenheimer D, Simpson SJ (2011)** Dietary restriction and aging: a unifying perspective. *Cell Metabolism* 14: 154–160.
- Poethig RS (1990)** Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. *Science* 250: 923–930.
- Ramel F, Birtic S, Cuiné S, Triantaphylidès C, Ravanat JL, Havaux M (2012)** Chemical quenching of singlet oxygen by carotenoids in plants. *Plant Physiology* 158: 1267–1278.
- Ricklefs (2008)** The evolution of senescence from a comparative perspective. *Functional Ecology* 22: 379–392.
- Ricklefs RE, Finch CE (1995)** Ageing: A natural history. New York, United States: Scientific American Library.
- Rinalducci S, Pedersen JZ, Zolla L (2004)** Formation of radicals from singlet oxygen produced during photoinhibition of isolated light harvesting proteins of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* 1608: 63–73.
- del Rio LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB (2006)** Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology* 141: 330–335.
- Roach DA (2012)** Age, growth and size interact with stress to determine life span and mortality. *Experimental Gerontology* 47: 782–786.
- Roach DA, Gampe J (2004)** Age-specific demography in *Plantago*: uncovering age-dependent mortality in a natural population. *The American Naturalist* 164: 60–69.
- Roach DA, Ridley CE, Dudycha JL (2009)** Longitudinal analysis of *Plantago*: Age-by-environment interactions reveal aging. *Ecology* 90: 1427–33.

- Roach DA, Carey JR** (2014) Population biology of aging in the wild. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 45: 421–443.
- Rohde A, Bhalerao RP** (2007) Plant dormancy in the perennial context. *Trends in Plant Science* 12: 217–223.
- Rose MR** (1991) *Evolutionary Biology of Aging*. New York, United States: Oxford University Press.
- Rose MR, Vu LN, Park SU, Graves JL Jr.** (2004) Selection on stress resistance increases longevity in *Drosophila melanogaster*. *Experimental Gerontology* 27: 241–250.
- Rozas V, DeSoto L, Olano JM** (2009) Sex-specific, age-dependent sensitivity of tree-ring growth to climate in the dioecious tree *Juniperus thurifera*. *New Phytologist* 182: 687–697.
- Rustin P, Kleist-Retzow J, Vajo Z, Rotig A, Munnich A** (2000) For debate: defective mitochondria, free radicals, cell death, aging-reality or mythochondria? *Mechanisms of Ageing and Development* 114: 201–206.
- Sánchez E, Alcántara M** (2007) *Catalogo de Especies Amenazadas en Aragón*. Flora. Letras Aragonesas, Zaragoza, España.
- 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.
- Sas AA, Snieder H, Korf J** (2012) Gompertz' survivorship law as an intrinsic principle of aging. *Medical Hypotheses* 78: 659–663.
- Sattler SE, Gilliland LU, Magallanes-Lundback M, Pollard M, DellaPenna D** (2004) Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *The Plant Cell* 16: 1419–1432.
- Selman C, Blount JD, Nussey DH, Speakman JR** (2012) Oxidative damage, ageing, and life-history evolution: where now? *Trends in Ecology and Evolution* 27: 570–77.
- Selye H** (1974) *Stress without distress*. Philadelphia, United states: J.B. Lippincott Co.

- Sies H** (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* 82: 291–295.
- Siles L, Cela J, Munné-Bosch S** (2013) Vitamin E analyses in seeds reveal a dominant presence of tocotrienols over tocopherols in the *Areaceae* family. *Phytochemistry* 95: 207–214.
- Simancas B, Munné-Bosch S** (2015) Interplay between vitamin E and phosphorus availability in the control of longevity in *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany* (doi:10.1093/aob/mcv033).
- Sheldrake AR** (1974) The ageing, growth and death of cells. *Nature* 250: 381–385.
- Sohal R, Weindruch R** (1996) Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273: 59–63.
- Steuer B, Stuhlfauth T, Fock HP** (1988) The efficiency of water use in water stressed plants is increased due to ABA-induced stomatal closure. *Photosynthesis Research* 18: 327–336.
- Strehler BL** (1962) Time, cell and aging. New York United states: Academic Press.
- Strehler BL, Hirsch G, Gusseck D, Johnson R, Bick M** (1971) Codon-restriction theory of aging and development. *Journal of Theoretical Biology* 33: 429–74.
- Sun J, Shen J, Cheng Q, Jiang W, Liu Q** (2012) Identification of senescence related protease in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit. *Nongye Gongcheng Xuebao/Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering* 28: 282–286.
- Swim HE** (1959) Microbiological aspects of tissue culture. *Annual Review of Microbiology* 13: 141–176.
- Szilard L** (1959) On the nature of the aging process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 45: 30–45.
- Takahashi S, Badger MR** (2011) Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends in Plant Science* 16: 53–60.
- Tamparillas SM** (2005) Progresos en genética humana del y envejecimiento y longevidad. Discurso en la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas, Químicas y Naturales de Zaragoza, España.

- Testo WL, Watkins Jr. JR** (2012) Influence of plant size on the ecophysiology of the epiphytic fern *Asplenium auritum* (Aspleniaceae) from Costa Rica. *American Journal of Botany* 99: 1840–1846.
- Tewari RK, Kumar P, Sharma PN** (2006) Magnesium deficiency induced oxidative stress and antioxidant responses in mulberry plants. *Scientia Horticulturae* 108: 7–14.
- Thomas H** (2002) Ageing in plants. *Mechanisms of Aging and Development* 123: 747–753.
- Thomas H** (2013) Senescence, ageing and death of the whole plant. *New Phytologist* 197: 696–711.
- Torres MA, Dangl JL** (2005) Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 397–403.
- Trebst A** (2003) Function of beta-carotene and tocopherol in photosystem II 58: 609-20.
- Triantaphylidès C, Havaux M** (2009) Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends in Plant Science* 14: 219–228.
- Triantaphylidès C, Krischke M, Hoerberichts FA, Ksas B, Gresser G, Havaux M, Van Breusegem F, Mueller MJ** (2008) Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. *Plant Physiology* 148: 960–968.
- Tuomi J, Hakala T, Haukioja E** (1983) Alternative concepts of reproductive effort, cost of reproduction, and selection in life-history evolution. *American Zoologist* 23: 25–34.
- Vanderklein D, Martínez-Vilalta J, Lee S, Mencuccini M** (2007) Plant size, not age, regulates growth and gas exchange in grafted Scots pine trees. *Tree Physiology* 27: 71–79.
- van Mantgem PJ, Stephenson NL, Byrne JC, Daniels LD, Franklin JF, Fulé PZ, Harmon ME, Larson AJ, Smith JM, Taylor AH, et al.** (2009) Widespread increase of tree mortality rates in the western United States. *Science* 323: 521–524
- Vaupel JW, Baudisch A, Dolling M, Roach DA, Gampe J** (2004) The case for negative senescence. *Theoretical Population Biology* 65: 339–51.

- Voronoff S** (1926) *The Study of Old Age and My Method of Rejuvenation*. London, United Kingdom: The Gill Publishing Co.
- Wang X, Quinn PJ** (2000) The location and function of vitamin E in membranes. *Molecular Membrane Biology* 17: 143–156.
- Watson JM, Riha K** (2010) Comparative biology of telomeres: where plants stand. *FEBS Letters* 584: 3752–3759.
- Watson JM, Riha K** (2011) Telomeres, aging, and plants: from weeds to Methuselah – a minireview. *Gerontology* 57: 129–136.
- Weigel D, Jurgens G** (2002) Stem cells that make stems. *Nature* 415: 751–754.
- Weindruch R, Walford RL** (1988) *The retardation of aging and disease by dietary restriction*. Springfield, Illinois, United States: Charles.C. Thomas.
- Weismann A** (1882) *Über die Dauer des Lebens*. Jena, Germany: Verlag von Gustav Fisher.
- Wendling I, Trueman SJ, Xavier A** (2014) Maturation and related aspects in clonal forestry—Part I: concepts, regulation and consequences of phase change. *New Forests* 45: 449–471.
- Wickens AP** (2001) Ageing and the free radical theory. *Respiration Physiology* 128: 379–391
- Williams GC** (1957) Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence. *Evolution* 11: 398–411.
- Williams PD, Day T** (2003) Antagonistic pleiotropy, mortality source interactions, and the evolutionary theory of senescence. *Evolution* 57: 1478–88.
- Williams PD, Day T, Fletcher Q, Rowe L** (2006) The shaping of senescence in the wild. *Trends in Ecology and Evolution* 21: 458–463.
- Wingler A, Purdy S, MacLean JA, Pourtau N** (2006) The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* 57: 391–399.

- Wingler A, Stangberg EJ, Saxena T, Mistry R** (2012) Interactions between temperature and sugars in the regulation of leaf senescence in the perennial herb *Arabidopsis* L. *Journal of Integrative Plant Biology* 54: 595–605.
- Woo HR, Kim JH, Nam HG, Lim PO** (2004) The delayed leaf senescence mutants of *Arabidopsis*, *ore1*, *ore3*, and *ore9* are tolerant to oxidative stress. *Plant and Cell Physiology* 45: 923–932.
- Xu X, Yang F, Xiangwen Xiao X, Sheng Zhang S, Korpelainen H, Li C** (2008) Sex-specific responses of *Populus cathayana* to drought and elevated temperatures. *Plant, Cell and Environment* 31: 850–860.
- Yamauchi R, and Matsushita S** (1979) Light-induced lipid peroxidation in isolated chloroplasts and the role of α -tocopherol. *Agricultural Biological Chemistry* 43: 2157–2162.
- Zentgraf U** (2007) Oxidative stress and leaf senescence. In: Gan S (ed) *Annual plant reviews: senescence processes in plants*. Oxford, United Kingdom: Blackwell Publishing Ltd.
- Zera AJ, Harshman LG** (2001) The physiology of life history trade-offs in animals. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 32: 95–126.
- Zhang HK, Zhang X, Mao BZ, Li Q, He ZH** (2004) Alpha-picolinic acid, a fungal toxin and mammal apoptosis-inducing agent, elicits hypersensitive-like response and enhances disease resistance in rice. *Cell Research* 14: 27–33.
- Zhang J, Schurr U, Davies WJ** (1987) Control of stomatal behaviour by abscisic acid which apparently originates in the roots. *Journal of Experimental Botany* 38: 1174–1181.
- Zhang Q, Su LJ, Chen JW, Zeng XQ, Sun BY, Peng CL** (2012) The antioxidative role of anthocyanins in *Arabidopsis* under high-irradiance. *Biologia Plantarum* 56: 97–104.
- Zhang S, Jiang H, Peng S, Korpelainen H, Li C** (2011) Sex-related differences in morphological, physiological, and ultrastructural responses of *Populus cathayana* to chilling. *Journal of Experimental Botany* 62: 675–686.
- Zhu JK** (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53: 247–273.

- Zimmermann P, Zentgraf U** (2005) The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cellular and Molecular Biology Letters* 10: 515–534.
- Zluvova J, Zak J, Janousek B, Vyskot B** (2010) Dioecious *Silene latifolia* plants show sexual dimorphism in the vegetative stage. *BMC Plant Biology* 10: 208.
- Zotz G, Hietz P, Schmidt G** (2001) Small plants, large plants: the importance of plant size for the physiological ecology of vascular epiphytes. *Journal of Experimental Botany* 52: 2051–2056.
- Zotz G, Schmidt G, Mikona C** (2011) What is the proximate cause for size-dependent ecophysiological differences in vascular epiphytes? *Plant Biology* 3: 902-8.
- Zunzunegui M, Díaz Barradas MC, Clavijo A, Álvarez Cansino L, AinLhout F, García Novo F** (2006) Ecophysiology, growth timing and reproductive effort of three sexual forms of *Corema album* (Empetraceae). *Plant Ecology* 183: 34–46.

