

UNIVERSITAT JAUME I

Escuela Superior de Tecnología y Ciencias Experimentales



**UNIVERSITAT
JAUME·I**

**GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y
DEL MEDIO RURAL**

**Papel del ácido abscísico en las respuestas fisiológicas y
metabólicas de plantas de tomate sometidas a
inundación del sustrato.**

Estudiante: Zara Pitarch Sánchez

Tutor: Vicent Arbona i Mengual

Convocatoria: OCTUBRE 2018

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a todas las personas que me han ayudado y han hecho todo lo posible para que este proyecto se realizara de la mejor manera posible, como han sido mi tutor Vicent Arbona i Mengual y mi supervisor Carlos de Ollas Valverde, ya que, gracias a su trabajo y esfuerzo en la dirección y supervisión del trabajo, todo ha salido para adelante sin ningún inconveniente. Además, tengo que agradecer todo el apoyo, los ánimos y la ayuda prestada por todos mis compañeros de laboratorio o personal del departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural de la universidad (Marta, Jorge Collado, Tico, Damián y Jorge Renau) ya que sin ellos esta experiencia no hubiera sido tan emocionante.

Asimismo, me gustaría dedicarles este trabajo a mis padres, Ángel y Pilar, a mi hermano Abraham, a mis fieles amigos y alguno de mis compañeros de carrera., por el apoyo incondicional que he recibido de ellos durante esta etapa. Por último, agradecer en especial a Fran, por estar siempre ahí, animándome y dándome apoyo en cada momento.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	15
1.1. Estrés ambiental: concepto e importancia en agricultura	15
1.2. Estrés por inundación o encharcamiento del sustrato	16
1.3. Respuestas hormonales	19
1.3.1. ABA	19
1.3.2. JASMONATOS	19
1.3.3. SA	20
1.3.4. OPDA	20
1.3.5. Poliaminas	20
1.4. El cultivo del tomate	20
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	24
3. MATERIAL Y MÉTODOS	28
3.1. Material vegetal, diseño experimental y tratamiento	29
3.1.1. Estrés por inundación del sustrato	29
3.2. Parámetros fisiológicos	32
3.2.1. Parámetros de intercambio gaseoso	32
3.2.2. Potencial hídrico foliar	33
3.2.3. Contenido relativo de agua	33
3.3. Parámetros bioquímicos	34
3.3.1. Determinación de la concentración de prolina	34
3.3.2. Determinación de la concentración de MDA	34
3.4. Análisis hormonal	35
3.4.1. Procedimiento de extracción y purificación	35
3.4.2. Procedimientos cromatográficos y espectrometría de masas ..	36
3.5. Análisis metabólico: cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS)	37
3.5.1. Proceso de extracción y derivatización GC/MS	37

3.5.2. Condiciones instrumentales para el análisis GC/MS.....	38
3.5.3. Procesado de los datos GC/MS	38
3.6. Tratamiento estadístico	39
4. RESULTADOS	42
4.1. Efectos del estrés por inundación del sustrato	43
4.1.1. Parámetros físico-químicos	43
4.1.1.1. pH	43
4.1.1.2. Concentración de O ₂	44
4.1.2. Parámetros de intercambio gaseoso	44
4.1.2.1. Tasa fotosintética (A _n)	44
4.1.2.2. Tasa de transpiración (E).....	45
4.1.2.3. Conductancia estomática (Gs)	46
4.1.2.4. Potencial hídrico foliar	47
4.1.3. Parámetros bioquímicos	48
4.1.3.1. Concentración de Prolina.....	48
4.1.3.2. Concentración de MDA.....	49
4.1.4. Contenido hormonal	51
4.1.4.1. Concentración de ABA	51
4.1.4.2. Concentración de SA	52
4.1.4.3. Concentración de JA	53
4.1.4.4. Concentración de JA-ile	54
4.1.4.5. Concentración de OPDA	56
4.1.5. Análisis metabolómicos	57
5. DISCUSIÓN	74
6. CONCLUSIONES	87
7. BIBLIOGRAFÍA	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Compuestos cuyos niveles se vieron reducidos e inducidos en respuesta al estrés por inundación en parte aérea de plantas de tomate var. Ailsa Craig.....	58
Tabla 2. Compuestos cuyos niveles se vieron reducidos e inducidos en respuesta al estrés por inundación en raíces de plantas de tomate var. Ailsa Craig.....	59
Tabla 3. Compuestos cuyos niveles se vieron reducidos e inducidos en respuesta al estrés por inundación en parte aérea de plantas del mutante <i>flacca</i> (var. Ailsa Craig).	61
Tabla 4. Compuestos cuyos niveles se vieron alterados en respuesta al estrés por inundación en raíces de plantas de tomate del mutante <i>flacca</i> (var. Ailsa Craig).....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución de la germinación de la semilla de tomate.....	29
Figura 2. Plantas del genotipo silvestre Ailsa Craig sometidas a encharcamiento del sustrato (izquierda) en condiciones control (derecha).....	30
Figura 3. Plantas del genotipo <i>flacca</i> (var. Ailsa Craig) sometidas a encharcamiento del sustrato (izquierda) en condiciones control (derecha).....	30
Figura 4. Distribución de plantas en el invernadero durante el desarrollo de los experimentos.....	31
Figura 5. Procesado de las muestras liofilizadas.....	32
Figura 6. Analizador de gases Lcpro+.....	32
Figura 7. Cámara de presión Scholander.....	33
Figura 8. Muestras para el análisis de MDA.....	35
Figura 9. Proceso de extracción hormonal.....	36
Figura 10. Variación del pH. La gráfica representa la variación en el tiempo del pH de cada genotipo (<i>flacca</i> y Ailsa Craig) sometidos al estrés por inundación.....	43
Figura 11. Variación de la concentración de oxígeno. En la gráfica se observa la variación en el tiempo de la concentración de oxígeno de cada genotipo tratado (<i>flacca</i> y Ailsa Craig), expresada en mg/L.....	44
Figura 12. Tasa Fotosintética Neta (A_n). La figura muestra los valores promedios de la tasa fotosintética junto con su error, expresada en %, de los genotipos estudiados, tanto de las plantas control como de las plantas sometidas al estrés por inundación (<i>flacca</i> y Ailsa Craig).....	45
Figura 13. Tasa de Transpiración (E). La figura muestra los valores promedios de la tasa de transpiración, junto con su error, expresada en $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, de los genotipos estudiados, tanto de las plantas control como de las plantas sometidas al estrés por inundación (<i>flacca</i> y Ailsa Craig).....	46
Figura 14. Conductancia estomática (Gs). La figura muestra los valores promedios de la conductancia estomática, junto con su error, expresada en $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, de los genotipos estudiados, tanto de las plantas control como de las plantas sometidas al estrés por inundación (<i>flacca</i> y Ailsa Craig).....	47
Figura 15. Potencial hídrico ($\Psi_{\text{hídrico}}$). La figura muestra los valores promedios del potencial hídrico, junto con su error, expresada en MPa de los genotipos estudiados, tanto	

de las plantas control como de las plantas sometidas al estrés por inundación (<i>flacca</i> y Ailsa Craig)	48
Figura 16. Concentración de Prolina Foliar (PA) y Radicular (PR) La figura muestra los valores promedios de la concentración de prolina presente en hojas y raíces, junto con su error estándar, expresada en μmol Prolina/g material vegetal	49
Figura 17. Concentración de MDA Foliar (PA) y Radicular (PR). La figura muestra los valores promedios de la concentración de MDA presente en hojas y raíces, junto con su error, expresada en nmol MDA/g muestra	50
Figura 18. Concentración de ABA Foliar (a), Radicular (b) y Xilemático (c). La figura muestra los valores promedios de la concentración de ABA presente en hojas, raíces y savia xilemática, junto con su error, expresados en ng/g muestra.....	52
Figura 19. Concentración de SA Foliar (a), Radicular (b) y Xilemático (c). La figura muestra los valores promedios de la concentración de SA presente en hojas, raíces y savia xilemática, junto con su error, expresados en ng/g muestra.....	53
Figura 20. Concentración de JA Foliar (a), Radicular (b) y Xilemático (c). La figura muestra los valores promedios de la concentración de SA presente en hojas, raíces y savia xilemática, junto con su error, expresados en ng/g muestra.....	54
Figura 21. Concentración de JA-Ile Foliar (a), Radicular (b) y Xilemático (c). La figura muestra los valores promedios de la concentración de JA-Ile presente en hojas, raíces y savia xilemática, junto con su error, expresados en ng/g muestra.....	55
Figura 22. Concentración de OPDA Foliar (a), Radicular (b) y Xilemático (c). La figura muestra los valores promedios de la concentración de OPDA presente en hojas, raíces y savia xilemática, junto con su error, expresados en ng/g muestra.....	56
Figura 23. Diagramas de Venn que representan las señales diferenciales analizadas exclusivas y compartidas por ambos genotipos en parte aérea (a) y raíces (b).	57
Figura 24. Señales diferenciales en respuesta al estrés por inundación en parte aérea de plantas de tomate var. Ailsa Craig.....	58
Figura 25. Señales diferenciales en respuesta al estrés por inundación en raíces de plantas de tomate var. Ailsa Craig.....	59
Figura 26. Señales diferenciales en respuesta al estrés por inundación en parte aérea de plantas de tomate del mutante <i>flacca</i> (var. Ailsa Craig).	61
Figura 27. Señales diferenciales en respuesta al estrés por inundación en raíces de plantas del mutante <i>flacca</i> (var. Ailsa Craig).	65

Figura 28. Plantas del genotipo *flacca* (var. Ailsa Craig) sometidas a encharcamiento del sustrato en las que se observa claramente la formación de raíces adventicias..... 77

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS UTILIZADOS

AC	Ailsa Craig	MS	Espectrometría de masas
CT	Plantas control		
ST	Plantas inundadas	RI	Índice de retención
WT	Genotipo silvestre	Ψ hídrico	Potencial hídrico
A _n	Tasa fotosintética	PA	Parte aérea
E	Tasa de transpiración	PR	Parte radicular
G _s	Conductancia estomática	ATP	Adenosin Trifosfato
MDA	Malondialdehído	ADP	Adenosin Difosfato
ABA	Ácido abscísico	ACC	Ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico
SA	Ácido salicílico		
JA	Ácido jasmónico	Var	Variedad
JA-ile	Ácido jasmónico isoleucina	AO	Aldehído oxidasa
OPDA	Ácido 12-oxofitodienoico	XDH	Xantina deshidrogenasa
TBA	Ácido tiobarbitúrico	Mo-Co	Cofactor de Molibdeno
TCA	Ácido tricloroacético	NR	Nitrato reductasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno	CH	Carbohidratos
Poliaminas	PAs	MAPAMA	Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente
Putrescina	Put		
Espermidina	Spd		
Espermina	Spm	KEGG	Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes
rpm	Revoluciones por minuto		
GC	Cromatografía de gases	Min	Minutos

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Estrés ambiental: concepto e importancia en agricultura

A lo largo de los años, el clima terrestre ha sufrido alteraciones en los factores ambientales como la temperatura, la pluviosidad (sequías, inundaciones), nubosidad, etc, provocadas por causas naturales, normalmente de origen geológico o meteorológico, pero desde hace unos 100 años, la acción del hombre sobre el planeta, generalmente el aumento de emisiones de gases contaminantes generados en distintas actividades económicas como la industria, agricultura, etc, han acelerado las alteraciones en las condiciones climáticas, modificando los procesos naturales, transformando la atmósfera, hidrosfera y biosfera. Estos cambios observados en las condiciones climáticas generales del planeta, en diversas escalas de tiempo, es lo que conocemos como “cambio climático global” (Walther, 2010).

Actualmente, dichas alteraciones climáticas son evidencia del calentamiento global, ya que, en los últimos años, como afirman diferentes estudios, se han incrementado las temperaturas promedio, ha habido un retroceso en los glaciares y una reducción de las capas de hielo, que han provocado un aumento del nivel del mar. Estos cambios han despertado un creciente interés por parte de investigadores, edafólogos, climatólogos, agricultores, entre otros, debido a sus implicaciones sobre la mayoría de las actividades desarrolladas por el hombre, en especial, en la agricultura (Chmielewski *et al.*, 2004). Por ello, en el sector agrícola existe un elevado interés en la determinación de las estrategias que utilizan algunas especies para disminuir o mitigar los efectos adversos del cambio climático (Hunt y Elliott, 2002), ya que cualquier condición de estrés modifica los estados fenológicos de las plantas y altera los equilibrios hormonales de éstas (Maestri *et al.*, 2002), afectando negativamente al desarrollo y rendimiento de los cultivos.

Las plantas, ya sea en su ambiente natural o en cultivo, están expuestas constantemente a condiciones de estrés, que en función del agente causal se clasifican como bióticos o abióticos (Azcón-Bieto y Talón, 2008). El término estrés proviene de la física, ya que se trata de una fuerza que actúa sobre un cuerpo y éste responde con una reacción proporcional a la fuerza (tensión) con la que se ha actuado sobre él. En el ámbito de la fisiología vegetal, el concepto de estrés se define como cualquier factor ambiental biótico o abiótico que reduce la tasa de algún proceso fisiológico (crecimiento o fotosíntesis) por debajo de la tasa máxima que podría alcanzar (Lambers *et al.*, 1998). En muchos casos, la tolerancia al estrés se mide con relación a la supervivencia de la planta,

el rendimiento del cultivo, el crecimiento (acumulación de biomasa) o los procesos de asimilación primaria (incorporación de CO₂ y minerales) relacionados con el crecimiento (Taiz y Zeiger, 2006) y las respuestas más comunes son las alteraciones de la actividad hormonal, muerte celular y abscisión de tejidos dañados, modificaciones en el desarrollo, síntesis y acumulación de compuestos osmoprotectores, de proteínas y metabolitos secundarios (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

La sequía, la salinización del suelo y/o del agua de riego, las temperaturas extremas, el viento fuerte, el encharcamiento del suelo, etc, son factores abióticos causantes de los estreses de origen ambiental que actualmente están estrechamente relacionados con el cambio climático, ya que las alteraciones que éste está propiciando provocan una mayor incidencia de estos factores adversos en los cultivos. A continuación, se hace una descripción del estrés que ha sido objeto de investigación en el presente trabajo.

1.2. Estrés por inundación o encharcamiento del sustrato

El encharcamiento del sustrato normalmente se produce debido a una mala capacidad de drenaje del suelo combinado con un exceso de lluvias o riego. Constituye un factor de estrés estacional, cuya incidencia en los cultivos es difícil de predecir.

En la región mediterránea, el clima que predomina es mediterráneo, caracterizado por inviernos suaves y veranos cálidos acompañados de largos períodos de sequía. Como consecuencia de las altas temperaturas, hay una gran evaporación de agua y ésta se condensa a finales de verano provocando lluvias torrenciales que inundan poblaciones y zonas de cultivo. Tanto periodos de sequía como de inundación son perjudiciales para el desarrollo de los cultivos, pero este trabajo se ha centrado en estudiar el efecto del estrés por inundación, por ello, únicamente se tendrán en cuenta aquellos efectos físico-químicos y biológicos que se producen en los cultivos tras las inundaciones.

Las inundaciones modifican una serie de parámetros fisicoquímicos y biológicos que pueden llegar a alterar la capacidad del suelo para mantener el crecimiento vegetal (Kozłowski, 1997). Los efectos negativos asociados a la inundación pueden verse agravados si el agua pasa de forma caudalosa por la superficie del terreno y si permanece la inundación durante un largo periodo de tiempo (de días a semanas), ya que, si es así, se altera el estado redox del suelo debido la deficiencia de O₂ en el sustrato, provocando la aparición de especies químicas reducidas que pueden resultar tóxicas para las plantas, como las formas solubles de Fe y Mn, y sulfuros. El déficit de oxígeno inhibe la

respiración mitocondrial, la oxidación y los procesos de oxigenación (Koppitz, 2004), viéndose notablemente afectado el metabolismo de la planta (Sairam *et al.*, 2008). Por ello, la asfixia radicular genera una serie de disfunciones fisiológicas que alteran el crecimiento de plantas, como desequilibrios hormonales, alteración de la distribución de carbohidratos o deficiencias en la absorción de nutrientes (Bailey- Serres y Voesenek, 2008). Hsu *et al.*, 1999, afirmaron que la inundación del sustrato provocaba en la parte aérea de árboles frutales desequilibrios en la capacidad de acumulación y transporte de compuestos glucídicos, como los azúcares y almidones, y esta acumulación podría estar relacionada como una respuesta de tolerancia frente a la inundación del sustrato. Además, el encharcamiento provoca desequilibrios entre la capacidad de absorción radicular y transporte de nutrientes minerales, tanto por vía floemática como por la xilemática.

Como consecuencia de las disfunciones fisiológicas producidas, se generan ciertas alteraciones que pueden ser irreversibles, como la disminución de la permeabilidad de las membranas, peroxidación de lípidos, degradación de clorofilas, disminución de la expansión foliar y cierre estomático. El cierre estomático es una respuesta o estrategia adoptada por las plantas para evitar la pérdida de agua y mantener la turgencia celular, que causa disminución del CO₂ en los espacios intercelulares y disminución en la fotosíntesis y transpiración (Lin *et al.*, 2006). El potencial hídrico de las hojas, y en particular la componente de presión celular (turgencia), juega un importante papel en los mecanismos de apertura y cierre estomático. Sin embargo, se ha observado en alguna ocasión que, dependiendo de las especies o las condiciones ambientales, los estomas se cierran en respuesta al encharcamiento del suelo antes de que cambien sustancialmente el potencial hídrico foliar o el contenido hídrico relativo (Schulze, 1988), lo cual ha sugerido la existencia de otras señales no hídricas que provoquen el cierre. Algunas evidencias experimentales recientes indican el ABA y otros reguladores como los brasinoesteroides, el SA, JA y el óxido nítrico, tienen un efecto similar para provocar el cierre estomático *in vivo* (Peleg y Blumwald, 2011).

Además, la disminución de CO₂ en los espacios intercelulares y de la tasa fotosintética inducen la formación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Mittler, 2002). La sobreproducción de ROS bajo estrés por inundación está directamente relacionada con la disminución en la tasa fotosintética bajo esta condición de estrés (Hossain *et al.*, 2009), ya que menor asimilación de CO₂ causa un desacople entre las reacciones del tilacoide y el ciclo de Calvin (Lin *et al.*, 2008). Las ROS son formas parcialmente reducidas del oxígeno atmosférico (O₂) involucradas en las respuestas a

determinadas condición de estrés (Mittler, 2002; Cheeseman, 2007; Lin *et al.*, 2008) y en la muerte celular bajo estrés abiótico (Evans, 2003).

En cuanto a los osmolitos, en general, cuando la planta está sometida a algún tipo de estrés abiótico, se inducen una serie de mecanismos que originan respuestas de resistencia, como el aumento en la concentración de los solutos o iones Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-} dentro de la célula, y la biosíntesis de osmolitos orgánicos, tales como glucosa, sacarosa, prolina y/o ácidos orgánicos, que promueven el ajuste osmótico celular, considerado uno de los principales procesos asociados al estrés por inundación. La función de los osmolitos es reducir el potencial hídrico sin que lo haga la presión de turgencia, lo que permite la elongación de las células y facilita conductancias estomáticas más altas a potenciales hídricos más bajos (Turner y Jones, 1980; Morgan, 1992). Además, protegen macromoléculas como proteínas y lípidos frente al estrés hídrico, salino, térmico, etc., facilitando su estabilización, por ello, comúnmente son llamados compuestos osmoprotectores (Timasheff y Arakawa, 1989). En este sentido, se ha demostrado que hay un fuerte vínculo entre la capacidad de ajuste osmótico y una mayor supervivencia bajo condiciones de estrés por inundación (Bray, 2007; Nahar y Gretzmacher, 2011).

Por otro lado, algunos autores defienden que el aminoácido prolina, no solo es capaz de inducir ajuste osmótico, sino que incluso puede estabilizar el ADN, membranas y proteger a las proteínas contra efectos adversos, como el aumento en la concentración de iones inorgánicos y/o el aumento de la temperatura, y actuar como un detoxificador de radicales libres. Se ha descrito en algunas especies que, en respuesta a diferentes estreses ambientales y en respuesta a la inundación, tiene lugar un incremento en la concentración de este aminoácido (Arbona *et al.*, 2003; Krasensky y Jonak, 2012). Por el contrario, algunos autores indican que su acumulación es un síntoma claro de respuesta al deterioro por el déficit hídrico y no a una característica adaptativa del valor de supervivencia (Balaguera *et al.*, 2008).

Para sobrevivir al encharcamiento las plantas han desarrollado mecanismos morfológicos, anatómicos y fisiológicos con el objetivo de incrementar el aporte de O_2 a la raíz, siendo adaptaciones específicas de algunas especies. Entre ellas se destacan las más comunes: desarrollo de lenticelas hipertrofiadas o engrosamientos que se producen en el tallo y en las raíces en algunas especies para facilitar la absorción de O_2 atmosférico por los tejidos aéreos y transportarlo hasta la raíz; formación de aerénquima, que son espacios intercelulares formados en el tallo y la raíz que aparecen como respuesta a la inundación; desarrollo de raíces adventicias formadas en el cuello de la raíz con el

objetivo de mejorar la difusión de O₂ a las raíces. En este trabajo, únicamente se ha observado la formación de raíces adventicias en plantas de *flacca*. Además, la inundación, debilita la planta provocando una mayor proliferación de patógenos como *Phytophthora spp.*, que pueden causar la muerte de los árboles (Kozlowski, 1997).

El grado de daño por encharcamiento del sustrato depende de una combinación de factores, incluyendo la especie vegetal, la composición del suelo y temperatura atmosférica, el estado de desarrollo y la prolongación del encharcamiento como se ha destacado con anterioridad (Phung y Knipling, 1976).

1.3. Respuestas hormonales

Las plantas, debido a su naturaleza sésil, han desarrollado distintos mecanismos de respuesta frente a condiciones adversas externas, como cambios en la expresión génica, en la regulación proteica y alteraciones en los niveles de iones y metabolitos.

Las hormonas vegetales son compuestos reguladores del crecimiento e involucrados en la inducción de las respuestas de la planta frente a estreses bióticos y abióticos mediante acciones sinérgicas y antagónicas. A continuación, se describen brevemente las fitohormonas estudiadas en el presente trabajo.

1.3.1. ABA

El ácido abscísico o ABA químicamente es un compuesto terpénico y en plantas es una hormona implicada en la regulación de las respuestas frente a condiciones de estrés interviniendo en el cierre de los estomas, además de estar vinculada en procesos de dormancia y senescencia.

1.3.2. JASMONATOS

El JA y sus metabolitos (JA-ile), conocidos como jasmonatos, son moléculas derivadas de los ácidos grasos a través de la ruta octadecanólica que presentan un papel importante en la señalización de respuestas frente a estrés ambiental (de Ollas *et al.*, 2013). Sin embargo, el papel que desempeña durante la respuesta a estreses abióticos es todavía poco conocido, aunque hay que destacar su biosíntesis de JA depende directamente de la disponibilidad de O₂ (Schaller *et al.*, 2005) y como consecuencia de la inundación, los órganos en contacto con el sustrato encharcado tienen limitada la síntesis de esta fitohormona.

1.3.3. SA

El SA es una fitohormona clave en la cascada de traducción de señales que regula los mecanismos de defensa de las plantas frente a estrés, pero ha sido en los últimos años cuando el papel del SA frente al estrés abiótico se ha atribuido a la regulación del estado redox en las células vegetales y la protección de la estructura celular. Sin embargo, se desconoce en parte cómo podría acumularse esta hormona en respuesta al estrés abiótico.

1.3.4. OPDA

El ácido 12-oxo fitodienoico (OPDA) químicamente es una oxilipina que deriva de ácido grasos poliinsaturados. Tras su síntesis, se utiliza como sustrato para la biosíntesis de jasmónico (Schaller *et al.*, 2005). Por ello, al ser un sustrato precursor del JA tiene características similares a éste, ya que se ha relacionado a ésta fitohormona con la respuesta de las plantas a heridas o a estrés osmótico (Stintzi *et al.*, 2001, Taki *et al.*, 2005).

1.3.5. Poliaminas

Las poliaminas (PAs) son moléculas alifáticas nitrogenadas, de bajo peso molecular, cargadas positivamente y están presentes en la mayoría de los organismos vivos. Estos pequeños analitos relacionados con el metabolismo de aminoácidos están implicados en muchos procesos fisiológicos, como la organogénesis, embriogénesis, inducción floral, senescencia, etc, (Tang y Newton, 2005) y tienen asociadas varias funciones de regulación, protección y de eliminación de ROS. Las PAs más comunes en plantas superiores son la putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm). El incremento de la concentración de la primera de ellas bajo el encharcamiento del sustrato puede estar asociada con la capacidad de tolerar dicho estrés (Bouchereau *et al.*, 1999).

1.4. El cultivo del tomate

Desde el punto de vista botánico, es una especie que pertenece a la familia *Solanaceae*, dentro de la división *Magnoliophyta*, subdivisión *Angiospermae*, clase *Magnoliopsidae*, subclase *Dicotyledonae*, orden *Solanales*.

Hoy día es la hortaliza que ocupa el segundo lugar en cuanto a producción, por detrás de la patata. Aun así, es la hortaliza más difundida en todo el mundo, de mayor valor económico y la que genera mayores beneficios, por ello su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. Es cultivado en muchas

1. INTRODUCCIÓN

zonas, con amplia variedad de condiciones de clima y suelos, aunque se cultiva principalmente en climas secos (FAO, 2002; FAOSTAT, <http://faostat.fao.org>).

En el trabajo realizado se ha utilizado el tomate por varias razones. Una de ellas es por ser un cultivo de gran importancia económica a nivel mundial y en la zona donde nos ubicamos, otra sería por la influencia de factores abióticos adversos relacionados con el cambio climático, cada vez más frecuentes y con mayor importancia, y la última razón es porque en los últimos años se ha convertido en una planta modelo para la investigación debido al conocimiento de la formación, el desarrollo y la composición del fruto, y debido a que en 2012 fue secuenciado completamente su genoma, permitiendo así un avance en el conocimiento de aquellos genes más importantes que permiten la adaptación de los cultivos dichas condiciones adversas.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El principal objetivo de este trabajo es la caracterización del papel de la hormona vegetal ácido abscísico (ABA) en las respuestas de las plantas al encharcamiento del sustrato. Los objetivos parciales que se perseguirán:

1. *Estudiar el efecto del estrés por inundación del sustrato sobre los parámetros fisiológicos de plántulas de tomate silvestres y deficientes en ABA*

En el estudio se utilizarán plantas de tomate del cultivar Ailsa Craig y de un mutante con el mismo fondo genético conocido como *flacca*, deficiente en la producción de ABA. Parte de las plantas se someterán a encharcamiento del sustrato de forma continuada durante 24 h y el resto se mantendrán en condiciones control. Durante este tiempo, se tomarán medidas fisicoquímicas (pH, concentración de O₂) en las plantas sometidas a la inundación para comparar su efecto en ambos genotipos. Además, se medirán tanto en plantas sometidas a la inundación como en plantas control los parámetros de intercambio gaseoso como la A_n, E y G_s, así como el potencial hídrico foliar.

2. *Evaluar el impacto de la inundación del sustrato sobre distintos parámetros bioquímicos en plantas silvestres y deficientes en ABA: niveles hormonales (ABA, SA, JA, JA-Ile, OPDA), acumulación de compuestos osmorreguladores (prolina) y evaluación del daño oxidativo.*

Se tomarán muestras de hojas, savia xilemática y raíces de plantas control y estresadas de ambos genotipos y se analizará la evolución de los niveles hormonales, la concentración de prolina y de malondialdehído (MDA).

3. *Analizar las variaciones del metaboloma en plantas silvestres y deficientes en ABA en respuesta al encharcamiento del sustrato.*

Con las muestras recolectadas en el punto anterior, se realizará un perfil metabolómico para comparar el efecto de la inundación sobre el metabolismo primario en presencia o ausencia de ABA.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal, diseño experimental y tratamiento

Para la realización del experimento se sembraron semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) del cultivar Ailsa Craig y del mutante *flacca*, deficiente en un cofactor de molibdeno implicado en la producción de ABA, empleando como sustrato una mezcla de perlita y turba (20:80) sobre bandejas de poliestireno con alveolos de medidas: 28x54x4,6 cm (ancho x fondo x alto) como se observa en la figura 1. Para evitar la desecación del sustrato, se cubrió con vermiculita la superficie del sustrato. A los 20 días de la siembra, se realizó el trasplante de plantas individuales a macetas de 2 L de capacidad empleando una mezcla de turba, perlita y vermiculita en proporción 80:10:10 y se empezó con el tratamiento un mes más tarde.



Figura 1. Evolución de la germinación de la semilla de tomate.

Tanto la geminación, como el trasplante y experimentos se llevaron a cabo entre los meses de octubre a diciembre en invernadero. En ese período, las condiciones ambientales fueron: temperatura diurna de $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$, temperatura nocturna de $15 \pm 4^{\circ}\text{C}$, humedad relativa entre el 55 y 70% y un fotoperiodo aproximado de 10 a 12 h.

3.1.1. Estrés por inundación del sustrato

Para llevar a cabo el experimento, se eligieron 20 plantas de cada genotipo, 10 de ellas se establecieron como plantas control y las restantes se sometieron a inundación continua.

El tratamiento de inundación se realizó introduciendo las macetas conteniendo las plantas en recipientes de mayor tamaño impermeabilizados con una bolsa de plástico oscuro. A continuación, se llenó el recipiente exterior con agua del grifo hasta que la parte radicular de la planta quedara totalmente sumergida. Para mantener sumergidas las macetas conteniendo las plantas, se aplicó un peso extra y, para evitar la evaporación del

3. MATERIAL Y MÉTODOS

exceso de agua, se cerró la bolsa de plástico herméticamente. En las figuras 2 y 3 se muestran las plantas de ambos genotipos utilizadas durante el experimento.



Figura 2. Plantas del genotipo silvestre Ailsa Craig sometidas a encharcamiento del sustrato (izquierda) en condiciones control (derecha). Se observó claramente la epinastia foliar.



Figura 3. Plantas del genotipo *flacca* (var. Ailsa Craig) sometidas a encharcamiento del sustrato (izquierda) en condiciones control (derecha). Se pudo constatar claramente la marchitez foliar pero no se observaron síntomas de epinastia.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

En el invernadero, las plantas se ubicaron de forma aleatoria con el objetivo de eliminar cualquier efecto posicional que pudiera condicionar el resultado de los experimentos, tal y como se observa en la figura 4.



Figura 4. Distribución de plantas en el invernadero durante el desarrollo de los experimentos.

Con el objetivo de evaluar la evolución del tratamiento de inundación, la duración del experimento se prolongó hasta 3 días, aunque para los análisis posteriores solo se consideraron las muestras de las primeras 24 h. Los muestreos se llevaron a cabo entre las 9:00-13:00 h y antes de sacrificar cada una de las plantas se tomaban medidas de diferentes parámetros físico-químicos como la temperatura, pH y concentración de O_2 del agua de inundación, así como medidas de parámetros fisiológicos como la transpiración (E) y conductancia estomática (Gs) (ver sección 3.2.).

Para procesar las muestras, tanto hojas como raíces, se lavaron con abundante agua destilada para eliminar cualquier tipo de residuo e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido. A continuación, se liofilizaron para así preservar todas las propiedades y características del tejido vegetal. Tras la liofilización, se trituraron todas las muestras

con un molinillo eléctrico, reduciendo el tejido a polvo fino como se muestra en la figura 5. A continuación, se guardaron en un sitio fresco y seco en tubos de plástico de 50 mL para su posterior análisis.



Figura 5. Procesado de las muestras liofilizadas.

3.2. Parámetros fisiológicos

3.2.1. *Parámetros de intercambio gaseoso*

Como anteriormente se ha explicado, tras la implantación de la inundación se siguió la evolución del tratamiento mediante la medida de los diferentes parámetros de intercambio gaseoso.

Para realizar las medidas, se empleó un analizador de gases con detector infrarrojos (IRGA) portátil Lcpro+ (ADC bioscientific Ltd., Hoddesdon, RU), que es el equipo que se muestra en la figura 6. Se empleó una radiación artificial de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y el flujo molar de aire se fijó en $200 \mu\text{mol s}^{-1}$. Todas las medidas se realizaron a concentraciones de CO_2 y vapor de agua atmosféricas.



Figura 6. Analizador de gases Lcpro+.

Tras la estabilización del instrumento de medida, se seleccionaron de cada planta una hoja de tamaño medio (de posición intermedia en el tallo), sobre las cuales se tomaron tres medidas. En total, cada día de muestreo, se realizaron 45 medidas, 15 de cada genotipo inundado y 15 de cada genotipo control.

3.2.2. *Potencial hídrico foliar*

La medida del potencial hídrico foliar se realizó con una cámara de presión tipo Scholander como se muestra en la figura 7 (Scholander *et al.*, 1965). Las medidas se realizaron entre las 10:00 h y las 12:00 h. Para ello, se cortó una hoja situada en posición intermedia en el tallo de la planta y se insertó en una cámara sellada, introduciendo a continuación agua a presión. A medida que la presión aumenta, llega un determinado momento en el cual se iguala la presión externa con la que ejerce la hoja para retener el agua, entonces se observa una minúscula gota en el extremo del peciolo. En ese momento se toma nota de la presión ejercida que, con signo negativo, será igual al potencial hídrico de la planta.



Figura 7. Cámara de presión Scholander.

3.2.3. *Contenido relativo de agua*

El contenido relativo de agua se calculó tras la obtención de medidas de peso fresco (PF) de hojas recién cosechadas, peso turgente (PT, peso de la hoja tras 24h sumergidas en agua) y peso seco de las hojas (PS, peso de la hoja tras secarla con estufa a 90-100 °C). Las hojas fueron seleccionadas durante los muestreos destacados anteriormente. Para realizar el cálculo se utilizó la siguiente expresión matemática:

$$RWC = \left(\frac{PF - PS}{PT - PS} \right) * 100$$

3.3. Parámetros bioquímicos

3.3.1. Determinación de la concentración de prolina

Para realizar la determinación de la concentración de prolina se siguió el protocolo descrito por Arbona et al. (2003) con algunas modificaciones. En él se homogeneizaron utilizando el baño de ultrasonidos 5 mg de tejido vegetal liofilizado (raíz y hoja) en 2 mL de ácido sulfosalicílico al 3% (Panreac). Tras el baño, se centrifugó el homogeneizado a 4000 rpm durante 45 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante, que se combinó con una mezcla de ácido acético glacial (Panreac) y reactivo de ninhidrina en proporción 1:1 (v/v). En este caso, se combinaron 400 µL de sobrenadante, con 400 µL de ninhidrina y 400 µL de ácido acético glacial. Seguidamente, la mezcla se incubó a 100°C en el baño de agua termostatado durante 1 h. Transcurrido este tiempo, se dejó enfriar en hielo durante 5 minutos aproximadamente y, a continuación, se determinó la absorbancia a 520 nm en el espectrofotómetro. El valor obtenido se interpoló en una curva de calibración estándar realizada con prolina comercial (Sigma-Aldrich; Madrid, España) siguiendo el mismo método.

3.3.2. Determinación de la concentración de MDA

Para determinar el daño oxidativo provocado por el estrés oxidativo de los tratamientos por inundación se siguió el método descrito por Arbona et al. (2008) pero modificando la extracción. Se extrajeron 50 mg de tejido en 2 mL de etanol al 80% (Panreac S.A., Barcelona, España) mediante incubación en baño de ultrasonidos durante 10 min (figura 8). El extracto resultante se centrifugó durante 20 minutos a 4000 rpm y 4°C tras los cuales se recuperó el sobrenadante. Dicho sobrenadante se dividió en dos alícuotas de 1 mL, una que se combinó con una solución de ácido tricloroacético (TCA, Panreac) al 20% (p/v) y la otra con una mezcla de ácido tiobarbitúrico (TBA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) al 0.5% (p/v) y TCA al 20% (p/v). A continuación, ambas mezclas se incubaron en el baño termostatado a 90°C durante 1 h. Transcurrido este tiempo, se enfriaron en baño de hielo durante 15 minutos y se eliminaron interferentes mediante centrifugación a 2000 rpm durante 10 minutos y a 4°C. Finalmente, se midió la absorbancia con el espectrofotómetro a 440, 532 y 600 nm en la reacción del extracto vegetal con la mezcla de TCA y TBA y a 532 y 600 nm en la reacción solo con TCA. Con los valores de absorbancia, se calculó la concentración de MDA mediante las siguientes expresiones matemáticas:

$$1) [(Abs_{532+TBA}) - (Abs_{600+TBA}) - (Abs_{532-TBA} - Abs_{600-TBA})] = A$$

$$2) [(Abs_{440+TBA} - Abs_{600+TBA}) \cdot 0.0571] = B$$

$$3) \text{Equivalentes de MDA (nmol mL}^{-1}\text{)} = (A - B/157000) \cdot 10^6$$

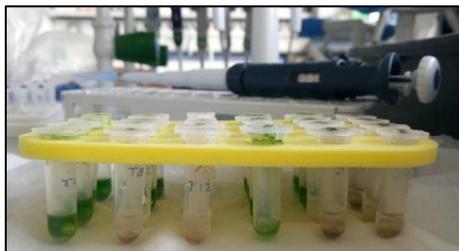


Figura 8. Muestras para el análisis de MDA.

3.4. Análisis hormonal

3.4.1. Procedimiento de extracción y purificación

El material vegetal utilizado fueron muestras liofilizadas y pulverizadas de hojas y raíces, y de savia xilemática de ambos genotipos. Para el proceso de extracción se utilizó el protocolo publicado por Durgbanshi et al. (2005) con algunas modificaciones. Para llevar a cabo el proceso, se pesaron 20 mg de tejido liofilizado y se añadieron 25 μ L de estándar mix de deuterados, preparado antes de realizar la extracción. Posteriormente se adicionaron 1 ml de agua Mili-Q y 3-4 bolas de vidrio y la mezcla se homogeneizó con el molinillo de bolas a 24 rpm durante 5 minutos. Pasados los 5 minutos, se centrifugaron las muestras a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y se recuperó el sobrenadante en tubos Eppendorf. A continuación, se ajustó el pH a 2.8-3.2 con una solución de ácido acético al 30% y se añadió 1 mL de dietil éter (Panreac, Barcelona, España), mezclando bien ambas fases. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 2100 rpm y 4 °C durante 4 minutos y se recuperó la fase orgánica superior en tubos Eppendorf de 2 mL. Este proceso se repitió al menos dos veces combinando todas las fases orgánicas procedentes de la misma muestra en el mismo tubo. Después, los extractos orgánicos se llevaron a sequedad en el Speed-Vac (Jouan, Sant Herblain Cedex, Francia). Los residuos secos se guardaron a -20 °C hasta su posterior análisis. En la figura 9 se muestran los materiales utilizados durante el procedimiento de extracción.



Figura 9. Proceso de extracción hormonal.

Antes de su análisis, los residuos secos procedentes de extractos vegetales y de savia xilemática se resuspendieron en una disolución de metanol al 10% en agua, éstos últimos añadiendo un volumen adecuado de estándar mix. Las soluciones resultantes se filtraron a través de filtros de PTFE de 0.22 μm de tamaño de poro (Scharlab, Barcelona, España). Los filtrados se transfirieron a viales cromatográficos para su análisis instrumental.

3.4.2. Procedimientos cromatográficos y espectrometría de masas

Los contenidos hormonales se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución utilizando un UPLCTM Acquity (Waters, Milford, MA, EEUU) acoplado a un analizador de triple cuadruplo MS/MS en tándem mediante una interfaz ortogonal Z-spray-electrospray (TQD, Micromass Ltd., RU). La separación de las muestras se llevó a cabo en fase reversa utilizando una columna Nucleodur C18 (50 x 2 mm i.d., 1.8 μm ; Macherey-Nagel, Düren, Alemania) y empleando un gradiente de metanol y agua (ambos de grado LC/MS) suplementados con ácido acético a una concentración a 0.1% a un flujo constante de 0.3 mL/min, tal y como se describe en Durgbanshi et al. (2005). El gradiente empleado partió de una proporción metanol:agua 10:90 que se incrementó linealmente hasta 80:20 en seis minutos. Tras 2-4 minutos, se recuperaron las condiciones iniciales, hasta completar un análisis de 10 min para cada muestra.

Los eluatos procedentes de la columna cromatográfica fueron introducidos en un espectrómetro de masas de triple cuádruplo, como se ha destacado con anterioridad. Se empleó nitrógeno como gas de nebulización y de desolvatación ajustando los flujos a 60 y 800 L/h. Durante los análisis, la temperatura del gas de solvatación y del bloque de inyección se mantuvo a 350 °C y 120 °C, respectivamente. El voltaje del capilar se fijó en 3 kV. Para detectar e identificar las distintas hormonas se diseñó un análisis multirresidual (MRM) en modo de ionización negativo que detecta cada uno de los analitos según su transición específica de ión precursor a ión producto. Para la

cuantificación de los niveles hormonales se utilizó una curva de calibración externa elaborada con estándares puros de concentración conocida. El procesado de los cromatogramas se llevó a cabo empleando el paquete de MassLynx v4.1 (Micromass Ltd, Manchester, RU).

3.5. Análisis metabolómico: cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS)

3.5.1. Proceso de extracción y derivatización GC/MS

El perfilado de metabolitos primarios se llevó a cabo mediante cromatografía de gases (GC) acoplada a espectrometría de masas (MS). Para ello, tras el proceso de extracción es necesario realizar una posterior derivatización que incremente la volatilidad de los compuestos.

Para la extracción, se emplearon 5 mg de tejido liofilizado (hojas o raíces) a los que se añadieron 50 μL de una solución de ribitol en metanol a 1100 mg/L, a modo de estándar interno, y 300 μL de metanol puro (grado LC-MS, Panreac, Barcelona, España). La mezcla se agitó vigorosamente y se incubó a temperatura ambiente en baño de ultrasonidos durante 10 minutos. A continuación, se centrifugaron las muestras a 10000 rpm durante 10 minutos, tras los cuales se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo. Al extracto metanólico, se añadieron 200 μL de cloroformo y 400 μL de agua ultrapura y la mezcla se agitó vigorosamente. Seguidamente, se realizó una breve centrifuga a velocidad máxima tras la que se formaron dos fases, una inferior orgánica y una superior acuosa que se recuperó en un tubo nuevo. La fase acuosa se evaporó a temperatura ambiente en el Speed-Vac (Jouan, Saint Herblain Cedex, Francia) hasta sequedad.

Para la derivatización, se añadieron a cada muestra 50 μL de una solución de metoxamina a una concentración de 1000 mg/L, disuelta en piridina. Las muestras se agitaron vigorosamente hasta conseguir la completa disolución del residuo seco tras lo cual se incubaron a 30 °C durante 90 minutos en bloque seco termostatado. Transcurrido dicho tiempo, se añadieron 70 μL de metilsililtrifluoroacetamida (Macherey-Nagel, Alemania), directo del preparado comercial, se volvieron a agitar bien las muestras y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. Finalmente, se agregaron 20 μL de una solución de ésteres metílicos de ácidos grasos (mezcla FAME C8-C24, Sigma-Aldrich, Madrid, España) disueltos en piridina a una concentración de 2200 mg/L como marcadores del índice de retención (RI), mezclando bien de nuevo. Las muestras se pasaron a viales de

cromatografía para inyectarlas en el equipo GC-MS (GCT, Micromass Ltd. Manchester, Reino Unido).

3.5.2. Condiciones instrumentales para el análisis GC/MS

Los extractos derivatizados se inyectaron independientemente en un sistema GC-MS compuesto por un cromatógrafo de gases equipado con un analizador de muestras y un analizador de masas de tipo tiempo de vuelo (GCT, Micromass Ltd.) equipado con una fuente de ionización de tipo impacto electrónico (EI). La separación de GC se realizó usando columna capilar BPX5 compuesta de un 5% de fenil polimetilsiloxano y con una longitud de 30 m x 0.25 mm de diámetro interno y un espesor de película de 0.25 μm (SGE Analytical Science, Victoria, Australia). El gradiente de temperatura se estableció de la siguiente manera: empezó con 80 °C durante 2 min tras los cuales se incrementó la temperatura 10 °C min^{-1} hasta llegar a 325 °C para un tiempo de adquisición total de 30 min. Las inyecciones de 1 μL de extractos de muestra se realizaron en modo split (1: 25) a una temperatura de 250 °C. Como gas portador se usó helio (99,999%; Praxair, Valencia, España) a un caudal constante de 2 ml min^{-1} . La interfaz y las temperaturas de la fuente se ajustaron a 325 °C y 250 °C, respectivamente. La velocidad de escaneo se estableció en 5 escaneos s^{-1} dentro de un rango de masa de 50 a 850 amu. Después de la adquisición, los archivos cromatográficos se convirtieron a NetCDF para su posterior procesamiento.

3.5.3. Procesado de los datos GC/MS

Tras la conversión a NetCDF, los cromatogramas se extrajeron con el software xcms (Smith *et al.*, 2006) y posteriormente se procesaron con TargetSearch (Cuadros-Inostroza *et al.*, 2009) usando la base de datos de metabolitos del Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology de Golm (disponible en <http://www.mpimp-golm.mpg.de/>).

Este software calcula el índice de retención (RI) para todos los compuestos en los cromatogramas basados en los valores tabulados de RI para los componentes de la mezcla de FAME y posteriormente, compara los RIs y los espectros de masas de cada compuesto con aquellos existentes en las bases de datos. Las áreas de los picos cromatográficos de los metabolitos identificados se normalizaron respecto del área del pico correspondiente al estándar interno (ribitol) y del peso de muestra empleado antes del análisis estadístico.

3.6. Tratamiento estadístico

Para evaluar la significatividad de los resultados obtenidos se utilizaron diferentes métodos estadísticos como la comparación de medias utilizando el test de t-Student para la comparación de dos muestras estableciendo como significativos a nivel bajo valores de $p \leq 0.05$ y valores de $p \leq 0.01$ con significatividad elevada. Para la evaluación más de dos muestras se realizaron análisis de la varianza (Anova seguido del test de Duncan para la separación de medias). El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el paquete informático InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2012).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Efectos del estrés por inundación del sustrato

4.1.1. Parámetros físico-químicos

4.1.1.1. pH

En la figura 10 se muestran los valores medios, junto con su error, del valor de pH del agua en la que estaban sumergidas las raíces de plantas de Ailsa Craig y un mutante de éste cultivar, *flacca*, sometidas al estrés por inundación. En ella, observamos los valores de pH tomados tras el inicio de la inundación y a las 24 horas, coincidiendo dicha medida con la realización de muestreos determinantes para realizar los análisis bioquímicos y hormonales.

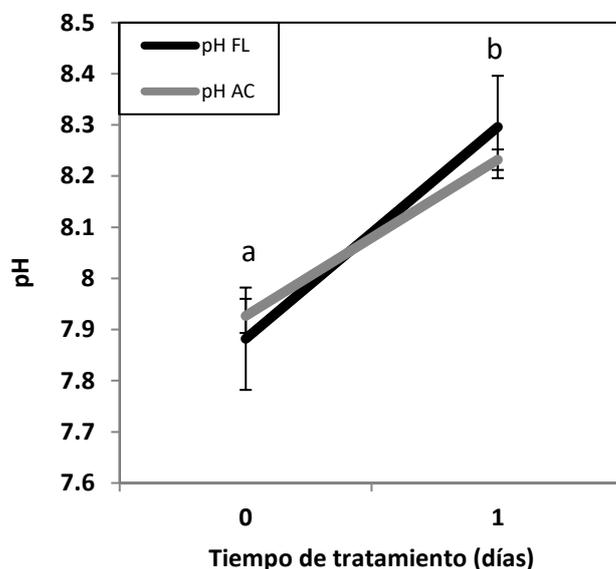


Figura 10. Variación del pH. La gráfica representa la variación en el tiempo del pH de cada genotipo (*flacca* y Ailsa Craig) sometidos al estrés por inundación. Los valores representan el valor promedio, junto con el error, de las diferentes medidas tomadas de las muestras sometidas al tratamiento de cada genotipo.

Tras observar la gráfica se puede ver como los dos genotipos se comportaron de forma similar, ya que tras las 24 horas de inundación se observó que el pH del agua aumentó ligeramente, pero de forma significativa. En *flacca* el aumento fue del 5% (8.30 frente a 7.88), mientras que en AC fue de un 4% (8.23 frente a 7.93).

4.1.1.2. Concentración de O_2

En la figura 11 se representa la variación de la concentración de oxígeno durante los días de tratamiento por inundación. De igual forma que en la figura 10, la gráfica muestra los valores medios de concentración junto con su error. Estos parámetros se midieron al inicio y a las 24 horas tras la inundación. Los valores del día inicial, medidos tras la inundación, fueron significativamente mayores a los medidos tras las 24 horas. En AC esta reducción fue de un 25% (6.43 frente a 4.84 mg/L), mientras que en el genotipo mutante *flacca* fue un 30% (6.62 frente a 4.71 mg/L).

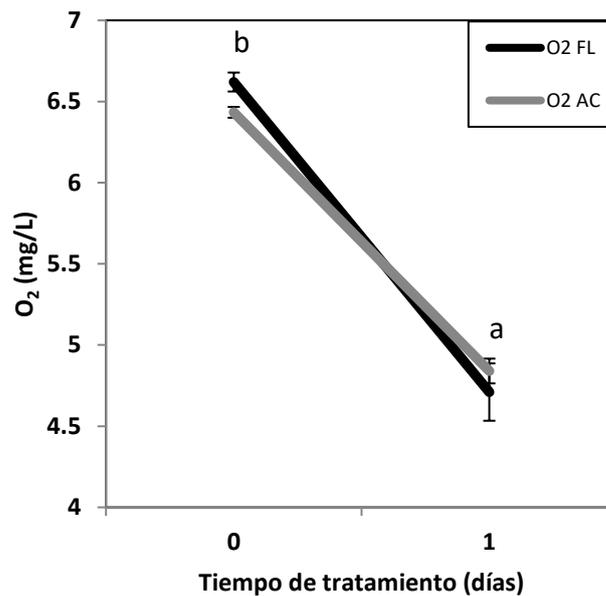


Figura 11. Variación de la concentración de oxígeno. En la gráfica se observa la variación en el tiempo de la concentración de oxígeno de cada genotipo tratado (*flacca* y Ailsa Craig), expresada en mg/L y en ella se representan los valores promedio de concentración de cada genotipo.

4.1.2. Parámetros de intercambio gaseoso

4.1.2.1. Tasa fotosintética neta (A_n)

En la figura 12 se muestran los resultados correspondientes a la tasa neta fotosintética (A_n) de plantas de tomate utilizadas como control y sometidas al estrés por inundación. En el genotipo *flacca*, la inundación del sustrato provocó un descenso del 20% de la tasa fotosintética neta en relación a las plantas control (116.44 frente a 93.18%) aunque los valores no difirieron de aquellos presentados por las plantas del

genotipo silvestre cultivadas en las mismas condiciones. Por el contrario, no se observaron diferencias significativas entre plantas inundadas y control del genotipo silvestre Ailsa Craig, siendo los valores control inferiores a los observados en el mutante *flacca*.

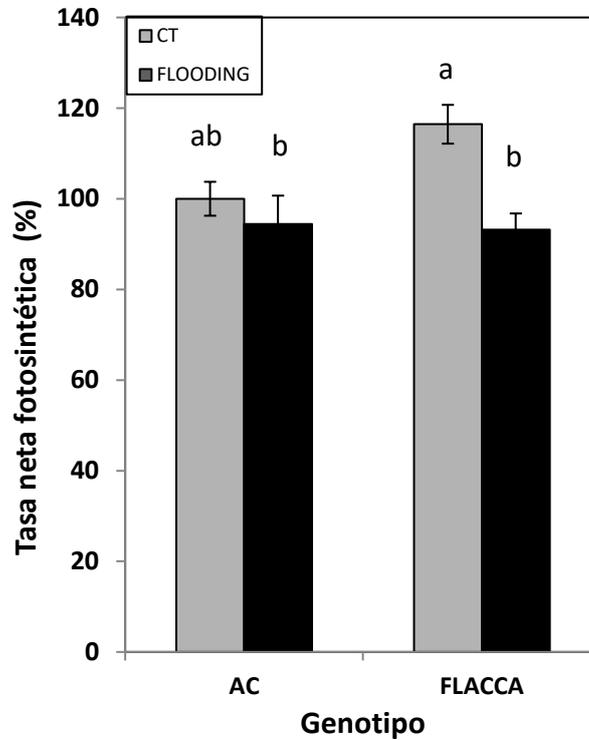


Figura 12. Tasa Fotosintética Neta (A_n). La figura muestra los valores promedios de la tasa fotosintética junto con su error, expresada en %, de los genotipos estudiados, tanto de las plantas control como de las plantas sometidas al estrés por inundación (*flacca* y Ailsa Craig). Además, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

4.1.2.2. Tasa de transpiración (E)

En la figura 13 se representa la tasa de transpiración (E) durante el período experimental. La inundación del sustrato, provocó en AC un descenso de la tasa de transpiración (E) del 57% respecto a los valores control (3.46 frente a 1.62 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Por el contrario, en *flacca* no se observaron diferencias significativas entre plantas tratadas y control, siendo los valores control inferiores a los observados en el mutante sometido a la inundación.

En general, las plantas inundadas de AC presentaron una disminución de los valores de E respecto del control y las plantas del mutante *flacca*, no. Además, se observó que los valores de E de *flacca* fueron superiores en relación a AC.

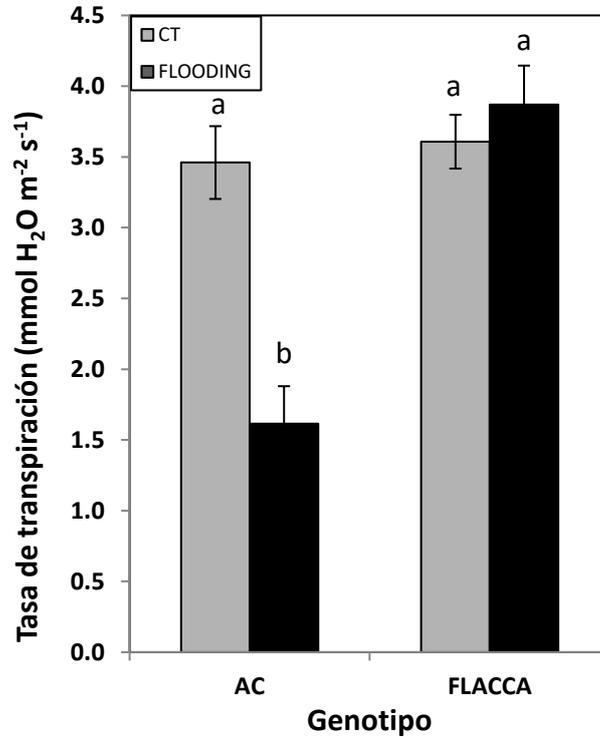


Figura 13. Tasa de Transpiración (E). La figura muestra los valores promedio de la tasa de transpiración, junto con su error, expresada en $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$, de los genotipos estudiados, tanto de las plantas control como de las plantas sometidas al estrés por inundación (*flacca* y Ailsa Craig). Además, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Duncan ($p \leq 0.05$).

4.1.2.3. Conductancia estomática (Gs)

En la figura 14 se representa la conductancia estomática (Gs) durante el período experimental. En general, la conductancia estomática siguió un comportamiento similar a la E.

La inundación del sustrato, provocó una reducción de Gs del 69% respecto a los valores del control en el genotipo silvestre AC (0.09 frente $0.32 \text{ mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Por el contrario, en *flacca* no se observaron diferencias significativas entre plantas inundadas y control, siendo los valores control inferiores a los observados en el mutante sometido a inundación, presentando, en conjunto, valores superiores al genotipo AC.

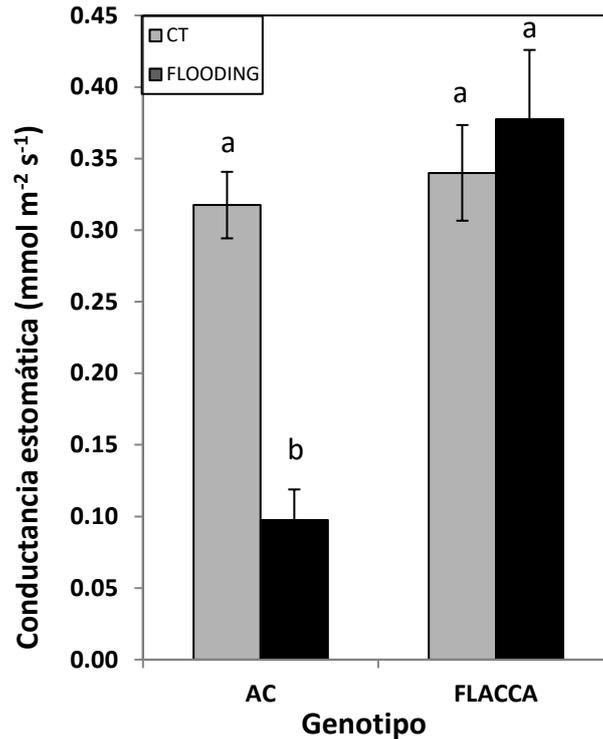


Figura 14. Conductancia estomática (Gs). La figura muestra los valores promedios de la conductancia estomática, junto con su error, expresada en $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, de los genotipos estudiados, tanto de las plantas control como de las plantas sometidas al estrés por inundación (*flacca* y Ailsa Craig). Además, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Duncan ($p \leq 0.05$).

4.1.2.4. Potencial hídrico foliar

En la figura 15 se presentan los resultados obtenidos para el potencial hídrico ($\Psi_{\text{hídrico}}$) en hojas de tomate durante el período experimental.

La inundación del sustrato provocó, tanto en AC como en *flacca*, una ligera reducción del $\Psi_{\text{hídrico}}$ con respecto a los valores control. También, se observó que existen variaciones significativas entre ambos genotipos sometidos al tratamiento, ya que tras la inundación, los valores de $\Psi_{\text{hídrico}}$ de *flacca* fueron un 30% menores que los de AC. Aunque, en general, los valores que presentó *flacca* en ambos casos fueron menores que en AC.

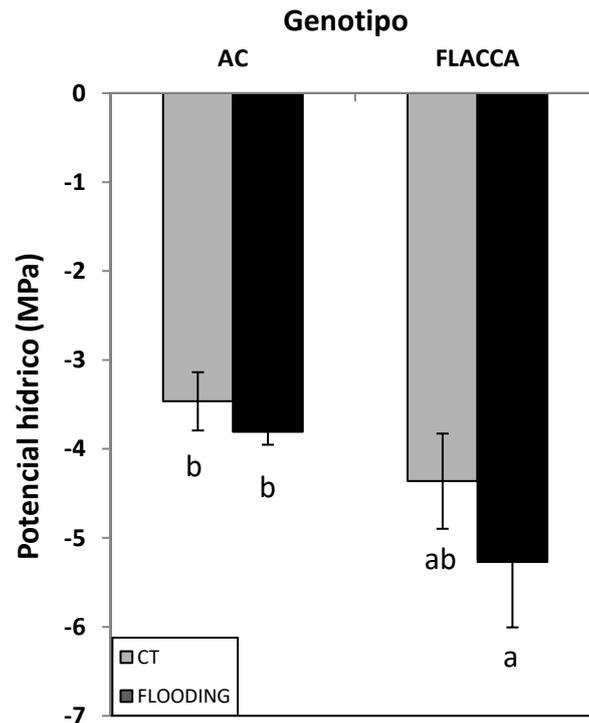


Figura 15. Potencial hídrico ($\Psi_{\text{hídrico}}$). La figura muestra los valores promedios del potencial hídrico, junto con su error, expresada en MPa de los genotipos estudiados, tanto de las plantas control como de las plantas sometidas al estrés por inundación (*flacca* y Ailsa Craig). Además, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Duncan ($p \leq 0.05$).

4.1.3. Parámetros bioquímicos

4.1.3.1. Concentración de Prolina

En la figura 16 se muestra en el contenido de prolina en hojas y raíces tras 24 horas de inundación continua. El encharcamiento del sustrato no provocó ninguna variación significativa en la concentración de prolina foliar y radicular.

En general, los valores de concentración de prolina radicular fueron sutilmente mayores que en hojas. Además, los valores de concentración de prolina radicular de *flacca* fueron ligeramente mayores a los de AC, aunque no de forma significativa.

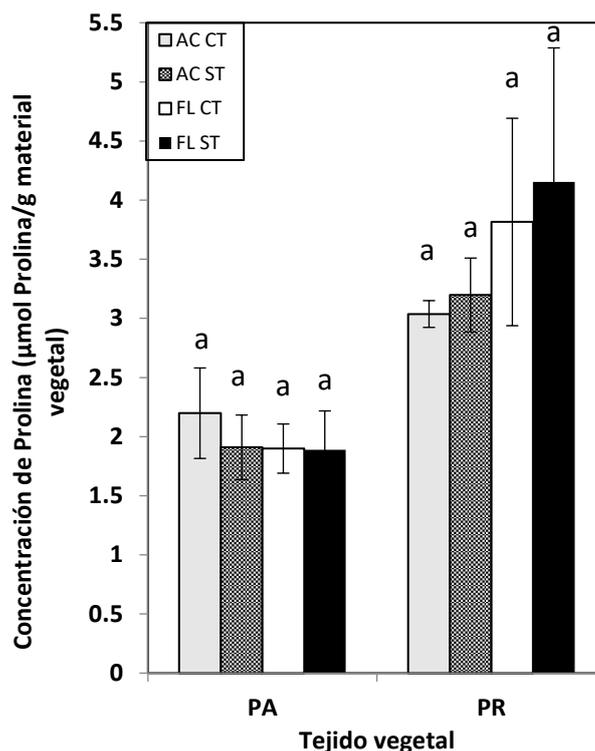


Figura 16. Concentración de Prolina Foliar (PA) y Radicular (PR) La figura muestra los valores promedios de la concentración de prolina presente en hojas y raíces, junto con su error estándar, expresada en μmol Prolina/g material vegetal. En la gráfica AC CT indica plantas control del genotipo silvestre (Ailsa Craig) y AC ST indica las plantas tratadas de dicho genotipo, FL CT indica plantas control del genotipo mutante (*flacca*) y FL ST indica las plantas tratadas de *flacca*. Además, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Duncan ($p \leq 0.05$).

4.1.3.2. Concentración de MDA

El grado de daño oxidativo generado por el tratamiento de inundación se evaluó mediante la determinación de la concentración de MDA en el tejido foliar y radicular (figura 17).

La inundación del sustrato provocó un descenso de la concentración foliar de MDA en AC, siendo los niveles control un 21.5% mayores (192.42 frente a 151.13 nmol MDA/g muestra). Por lo que respecta a *flacca*, no se observaron diferencias significativas en cuanto a la concentración de MDA, aunque en este caso la concentración del genotipo sometido a la inundación fue ligeramente superior a los valores control.

El encharcamiento del sustrato no alteró de forma significativa el contenido de MDA en raíces relación a los valores control. En AC, los valores de concentración fueron

muy similares, mientras que en *flacca*, el genotipo sometido a la inundación presentó valores de concentración de MDA ligeramente superiores al control.

Para concluir, se destaca que el genotipo silvestre presentó, tanto en tejido foliar como en radicular, valores de concentración de MDA significativamente mayores que *flacca*. En el tejido foliar, los valores control de MDA en *flacca* fueron un 40% menores (192.42 frente a 118.93 nmol MDA/g muestra), mientras que en raíz este descenso fue más acusado y osciló alrededor del 70% (191.38 frente a 52.38 nmol MDA/g muestra).

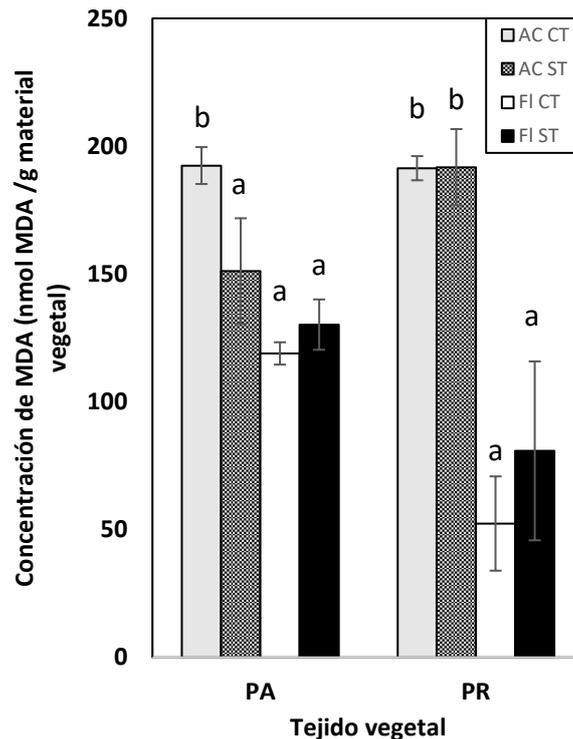


Figura 17. Concentración de MDA Foliar (PA) y Radicular (PR). La figura muestra los valores promedios de la concentración de MDA presente en hojas y raíces, junto con su error, expresada en nmol MDA/g muestra. En la gráfica AC CT indica plantas control del genotipo silvestre (Ailsa Craig) y AC ST indica las plantas tratadas de dicho genotipo, FL CT indica plantas control del genotipo mutante (*flacca*) y FL ST indica las plantas tratadas de *flacca*. Además, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Duncan ($p \leq 0.05$).

4.1.4. Contenido hormonal

4.1.4.1. Concentración de ABA

La evolución del contenido de ABA foliar, radicular y de la savia xilemática se muestra en la figura 18. Como respuesta al encharcamiento del sustrato, la concentración de ABA endógena foliar se incrementó de forma ligera en el genotipo silvestre, mientras que en *flacca* los valores no se modificaron. En general, los valores de concentración en AC fueron significativamente superiores a los de *flacca*, como cabía esperar.

En raíces, la inundación del sustrato provocó un descenso de la concentración de ABA alrededor del 80% respecto de los valores control en AC (394.50 frente 69.30 ng/g muestra). También en *flacca* disminuyeron los valores, pero las variaciones no fueron significativas (figura 18b). Además, los valores control de concentración de ABA en AC fueron un 81% superiores a los de *flacca* (394.50 frente a 74.68 ng/g muestra). En cambio, entre genotipos sometidos a inundación no se observaron diferencias, siendo los valores de concentración de ABA endógena muy similares.

En cuanto a la evolución del ABA en la savia xilemática, se observó que su comportamiento fue muy similar al de las hojas, ya que la inundación provocó en AC un aumento significativo del 90% en la concentración de ABA con respecto a los valores control (0.87 frente a 0.08 ng/g muestra), mientras que la inundación en *flacca* provocó un ligero aumento, aunque no significativo (figura 18c). Además, los valores de concentración del genotipo silvestre sometido a la inundación fueron un 95% superiores a los valores de *flacca*.

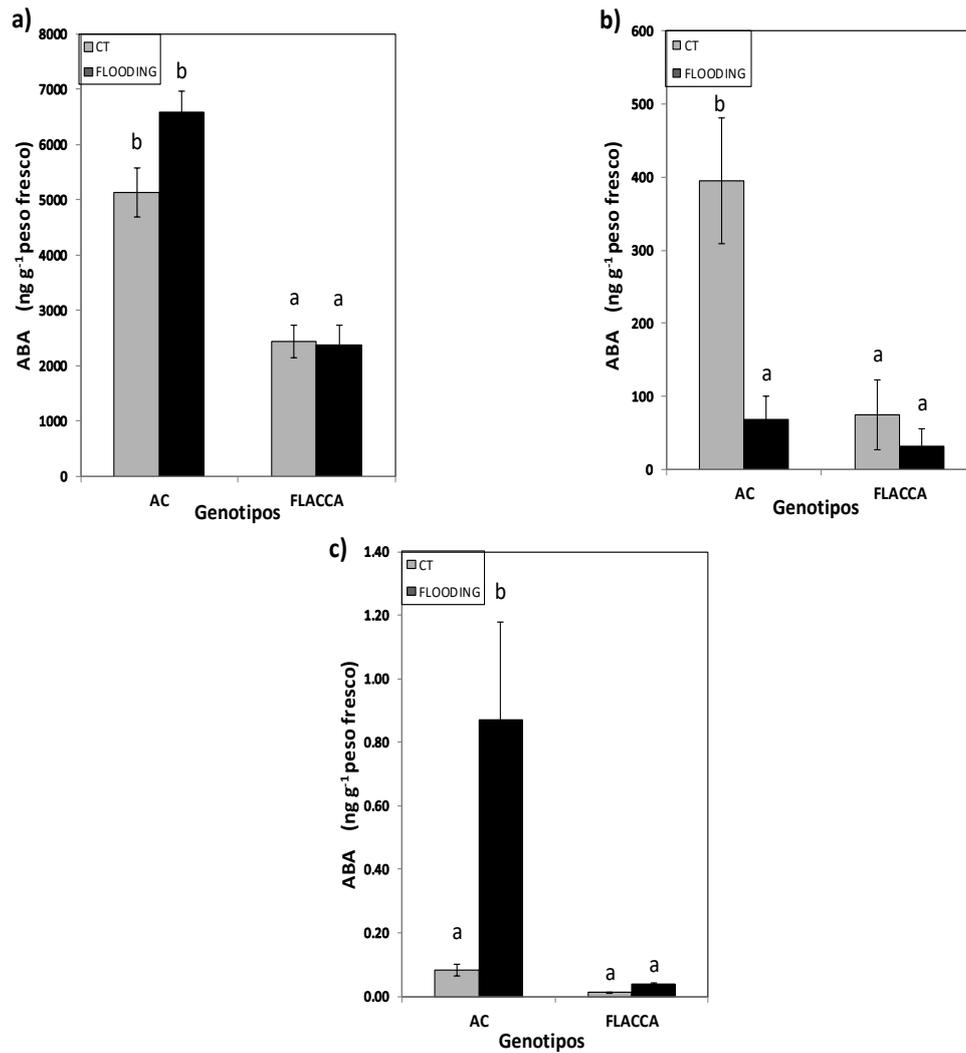


Figura 18. Concentración de ABA Foliar (a), Radicular (b) y Xilemático (c). La figura muestra los valores promedio de la concentración de ABA presente en hojas, raíces y savia xilemática, junto con su error, expresados en ng/g muestra. Además, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Duncan ($p \leq 0.05$).

4.1.4.2. Concentración de SA

En la figura 19 se presenta el contenido de SA foliar, radicular y de la savia xilemática. La inundación del sustrato no tuvo un efecto significativo sobre los niveles de SA foliares, radicales y xilemáticos en AC o *flacca*, aunque la concentración foliar de esta fitohormona fue superior en el genotipo mutante (figura 19a). No obstante, aunque no se detectaron diferencias significativas por la gran variabilidad existente entre muestras, los resultados sugieren cierta acumulación de SA en respuesta a la inundación en hojas de *flacca* y raíces y savia xilemática de AC (figuras 19a, 19b y 19c).

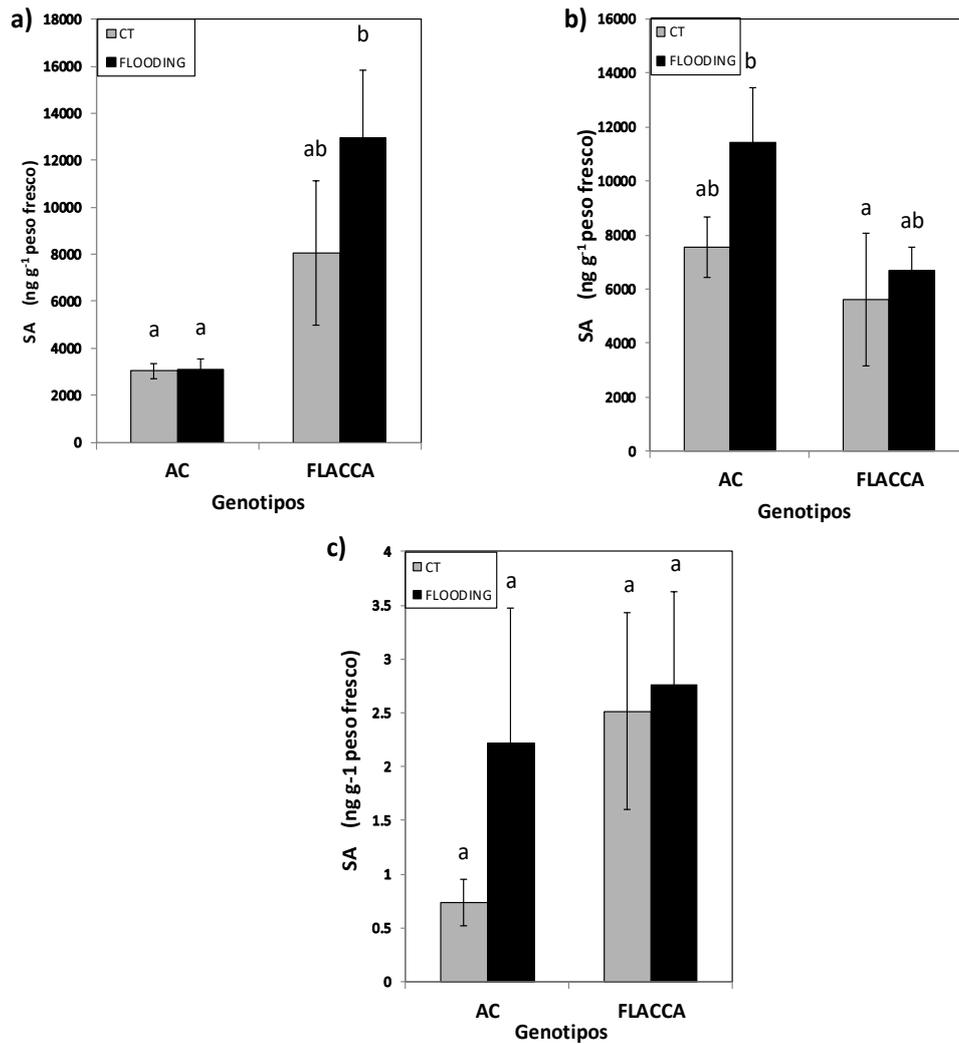


Figura 19. Concentración de SA Foliar (a), Radicular (b) y Xilemático (c). La figura muestra los valores promedio de la concentración de SA presente en hojas, raíces y savia xilemática, junto con su error, expresados en ng/g muestra. Además, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Duncan ($p \leq 0.05$).

4.1.4.3. Concentración de JA

La evolución del contenido de JA foliar, radicular y de la savia xilemática se muestra en la figura 20. Como respuesta al encharcamiento del sustrato, la concentración de JA endógena foliar de AC disminuyó un 63% con respecto a los valores control (406.05 frente a 150.84 ng/g muestra), mientras que en *flacca* la inundación provocó un ligero aumento, aunque no significativo (figura 20a).

En raíces, tras la inundación el contenido endógeno radicular de JA en ambos genotipos disminuyó, pero únicamente varió de forma significativa en AC, ya los valores del genotipo inundado se redujeron un 79% con respecto a los valores control (1192.71 frente a 250.38 ng/g muestra). Los valores control en el genotipo silvestre fueron siempre

superiores a los de *flacca*, tanto en tejido foliar como en radicular, aunque tras el tratamiento esta relación cambió (figura 20a y 20b)

En cuanto a la evolución del JA en la savia xilemática, se observó que no había diferencias significativas entre las plantas control y las tratadas (figura 20c).

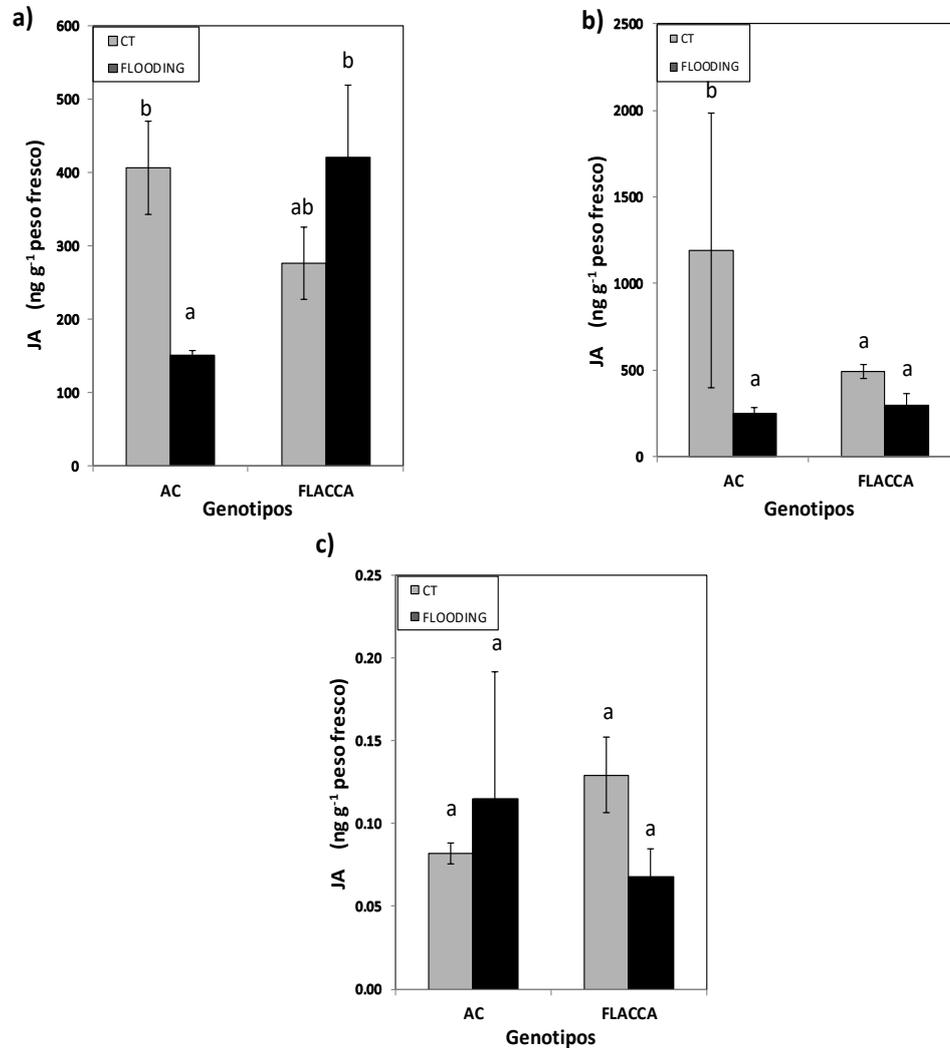


Figura 20. Concentración de JA Foliar (a), Radicular (b) y Xilemático (c). La figura muestra los valores promedios de la concentración de SA presente en hojas, raíces y savia xilemática, junto con su error, expresados en ng/g muestra. Además, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Duncan ($p \leq 0.05$).

4.1.4.4. Concentración de JA-Ile

En la figura 21 se presenta el contenido de JA-Ile foliar, radicular y de la savia xilemática. Como respuesta al encharcamiento del sustrato, la concentración de JA-Ile endógena foliar de *flacca* aumentó un 95% con respecto a los valores control (792.22 frente a 35.94 ng/g muestra), mientras que en AC no hubo variaciones significativas tras

el tratamiento. Además, como respuesta a la inundación, los valores de JA-Ile que presentó *flacca* fueron un 97% superiores a los de AC.

En cuanto a la concentración endógena de JA-Ile en raíces no se observaron variaciones significativas entre genotipos ni entre tratamientos, aunque en ambos casos se intuye que el contenido en JA-Ile en las plantas tratadas fue inferior a los valores obtenidos en las plantas control. En savia xilemática, aunque no se detectaron variaciones significativas entre plantas control e inundadas debido a la variabilidad existente entre muestras, los resultados sugieren valores basales elevados en *flacca* (alrededor de 10 veces) que el tratamiento de inundación redujo en más de un 90% (figura 21c).

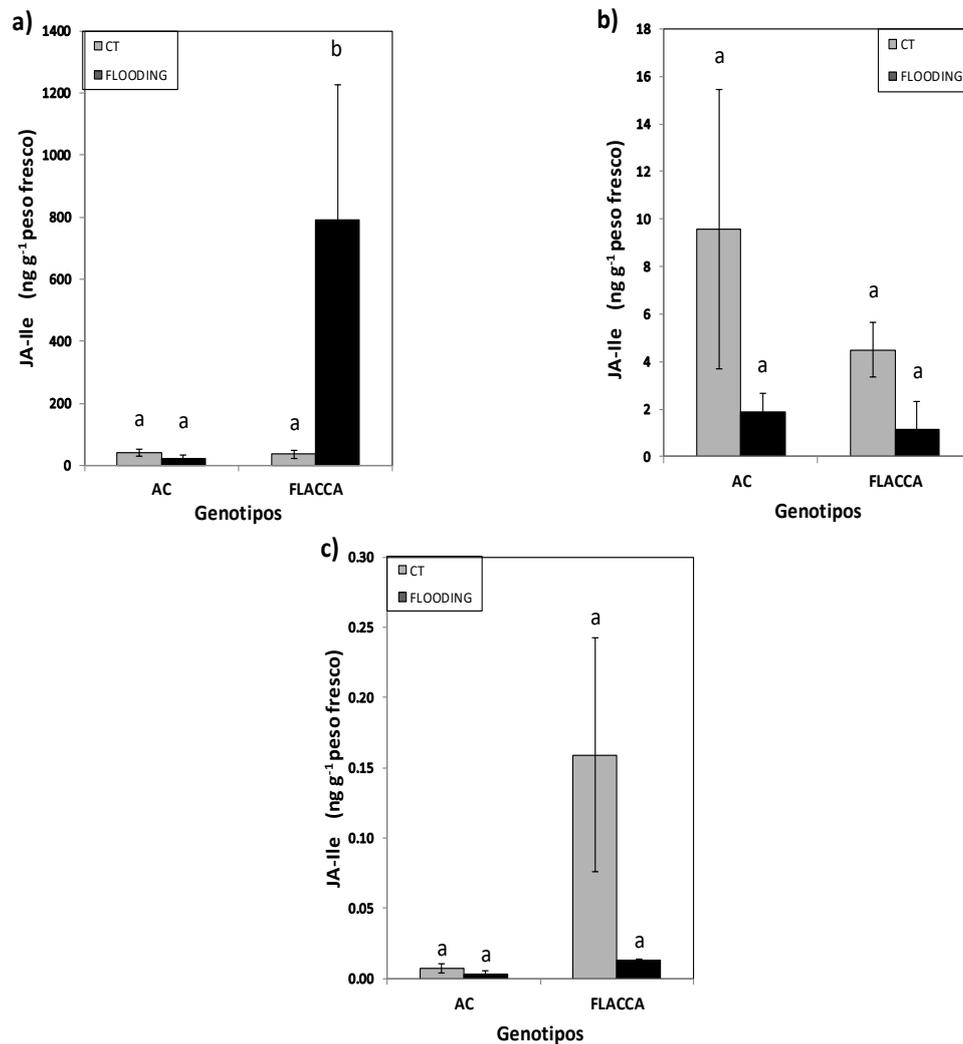


Figura 21. Concentración de JA-Ile Foliar (a), Radicular (b) y Xilemático (c). La figura muestra los valores promedios de la concentración de JA-Ile presente en hojas, raíces y savia xilemática, junto con su error, expresados en ng/g muestra. Además, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Duncan ($p \leq 0.05$).

4.1.4.5. Concentración de OPDA

La evolución del contenido de ácido 12-oxofitodienoico (OPDA) foliar, radicular y de la savia xilemática se muestra en la figura 22.

El estrés por inundación no tuvo un efecto claro sobre los niveles de OPDA en hojas, aunque los resultados sugieren cierta acumulación en respuesta al encharcamiento en el genotipo *flacca* (figura 22a). En raíces se observa que tiene un comportamiento similar al JA (figura 22b), ya que, en ambos genotipos tras la inundación, disminuye la concentración de dicha hormona. En savia xilemática, si se observaron diferencias significativas entre plantas control e inundadas de AC, constatándose un incremento de los niveles de OPDA de un 31% respecto de valores control (0.02 frente a 0.01 ng/g muestra) (figura 22c).

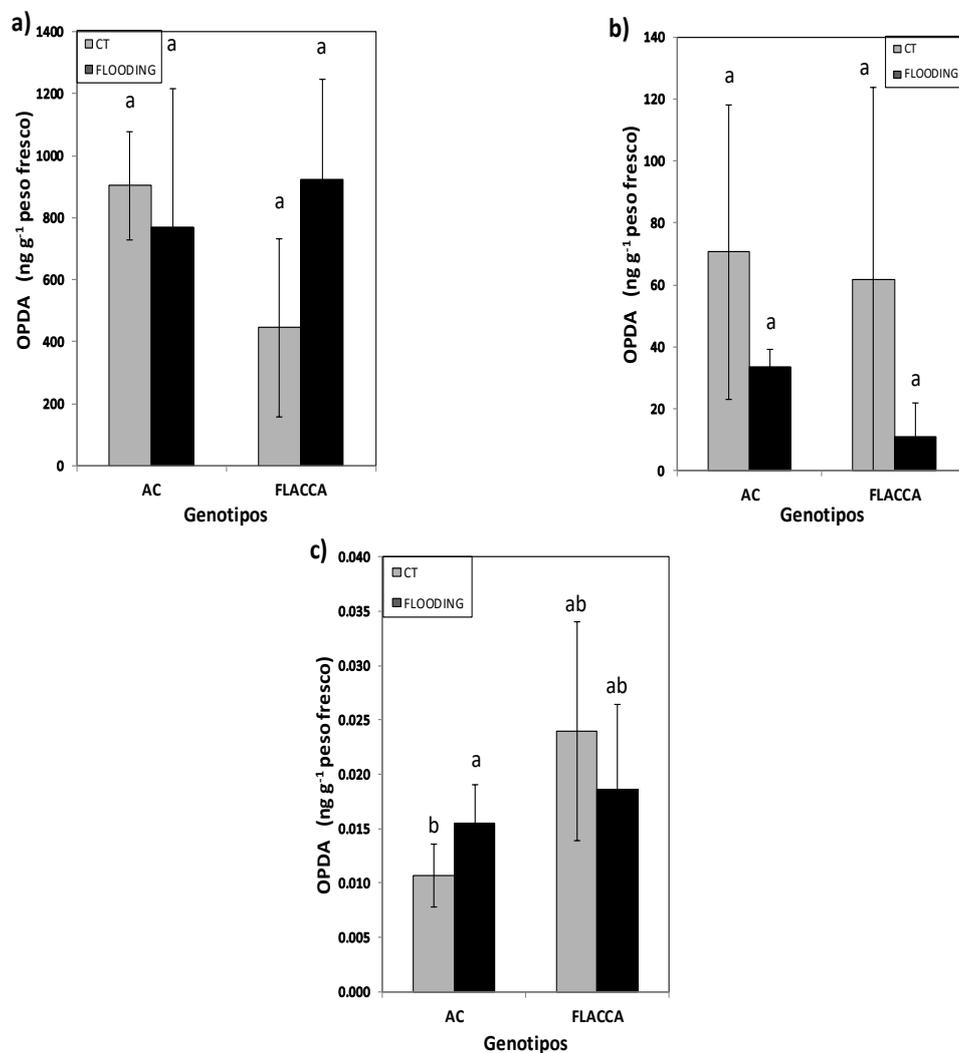


Figura 22. Concentración de OPDA Foliar (a), Radicular (b) y Xilemático (c). La figura muestra los valores promedios de la concentración de OPDA presente en hojas, raíces y savia xilemática, junto con su error, expresados en ng/g muestra. Además, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Duncan ($p \leq 0.05$).

4.1.5. Análisis metabólicos

En general, las rutas metabólicas que se vieron afectadas de forma predominante tras el encharcamiento del sustrato fueron aquellas implicadas en el metabolismo energético y de aminoácidos. Los metabolitos que se alteraron como respuesta a la inundación en parte aérea y radicular fueron diferentes. Las figuras 23a y 23b representan un diagrama de Venn donde se observa aquellos metabolitos inducidos y reprimidos propios de cada genotipo, así como aquellos que se comparten como respuesta al estrés.

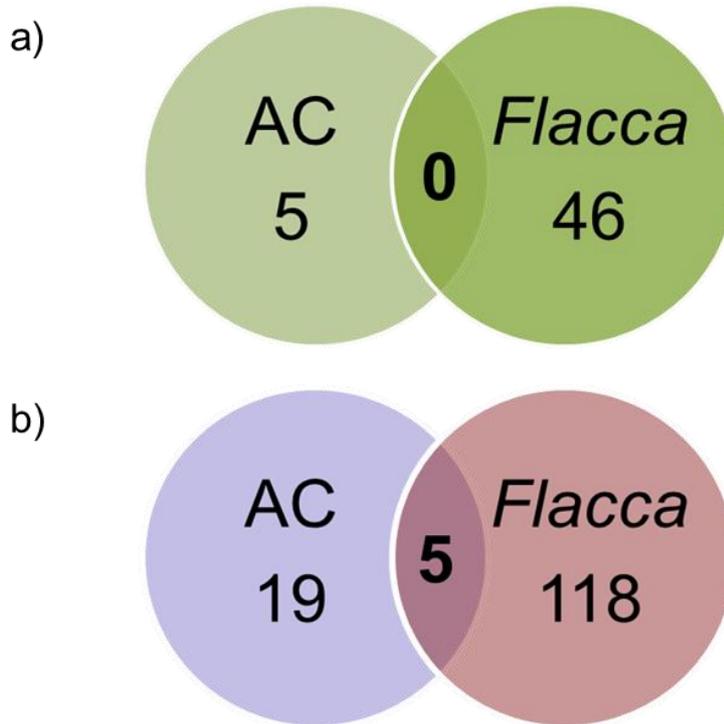


Figura 23. Diagramas de Venn que representan las señales diferenciales analizadas exclusivas y compartidas por ambos genotipos en parte aérea (a) y raíces (b). El solape de las figuras representa los compartidos, el círculo naranja representa los metabolitos de AC mientras que el círculo azul representa los de *flacca*.

En plantas de AC, se identificaron cerca de 1006 analitos, de los cuales únicamente fueron significativos 5 como se muestra en la tabla 1, cuatro de ellos regulados de forma negativa respecto del control. En la figura 24 se observa un gráfico circular que representa los porcentajes asociados con la regulación de los metabolitos. De éstos, se identificaron aminoácidos como la serina, implicado en la síntesis y en el metabolismo de aminoácidos, en la síntesis de lípidos de membrana y de metabolitos secundarios (KEGG, 2018). Por otro lado, algunos compuestos de carácter glucídico, como la lactulosa y el eritritol, también se redujeron tras la inundación. Además, se

destaca que dos compuestos fenólicos implicados en la síntesis de lignina, se comportaron de diferente forma. El ácido sinápico se redujo en relación a los valores control, mientras que el coniferil aldehído se acumuló considerablemente.

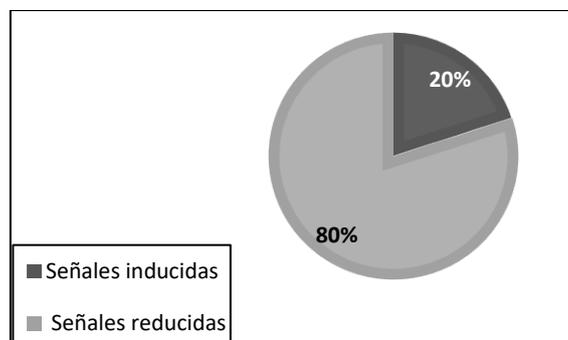


Figura 24. Señales diferenciales en respuesta al estrés por inundación en parte aérea de plantas de tomate var. Ailsa Craig.

Tabla 1. Compuestos cuyos niveles se vieron reducidos e inducidos en respuesta al estrés por inundación en parte aérea de plantas de tomate var. Ailsa Craig.

Nombre del componente	Fold change	Tipo de señal	Tipo de compuesto	Ruta	Ruta metabólica
Ácido cis-sinápico	0.15	Reducida	Compuesto fenólico	Metabolismo fenilpropanoides	Biosíntesis de lignina
Serina	0.20	Reducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo glicina, treonina, serina, cisteína y metionina
Esfingosina	0.36	Reducida	Esfingolípido	Metabolismo lípidos	Metabolismo de los esfingolípidos
Eritritol	0.62	Reducida	Polialcohol	Metabolismo intermediario	Biosíntesis de terpenos
Coniferil aldehído	3.00	Inducida	Compuesto fenólico	Metabolismo fenilpropanoides	Biosíntesis de lignina

En raíces, se identificaron un total de 19 metabolitos diferenciales (figura 25), la mayoría de ellos inducidos, como se muestra en la tabla 2, entre los que destacamos compuestos fenilpropánicos como el ácido cis-sinápico y el cis-cafeico implicados en la síntesis de ligninas así como otros compuestos con papel protector, en la misma línea se observó un incremento en los niveles de triptófano, aminoácido implicado en la síntesis de compuestos indólicos incluyendo las auxinas. Además, se acumularon otros compuestos implicados en la síntesis de ácido ascórbico (el ácido galactónico y el ácido treónico). Los metabolitos reducidos incluyeron varios compuestos de carácter lipídico y

un metabolito implicado en el metabolismo de la tirosina (3,4-hidroxifenilglicol aldehído) (KEGG, 2018).

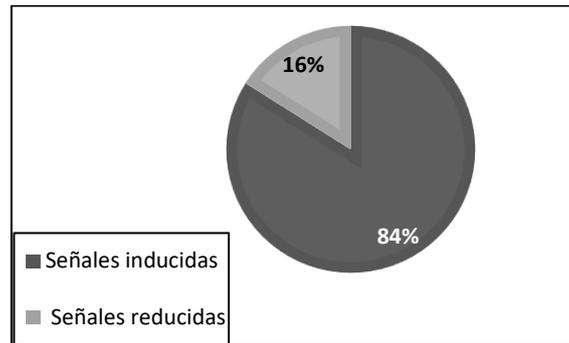


Figura 25. Señales diferenciales en respuesta al estrés por inundación en raíces de plantas de tomate var. Ailsa Craig.

Tabla 2. Compuestos cuyos niveles se vieron reducidos e inducidos en respuesta al estrés por inundación en raíces de plantas de tomate var. Ailsa Craig.

Nombre del componente	Fold change	Tipo de señal	Tipo de compuesto	Ruta	Ruta metabólica
Ácido itacónico	2.58	Inducida	Ácido graso	Metabolismo de lípidos	Metabolismo ácidos grasos
Ácido treonico	14146.87	Inducida	Ácido orgánico	Metabolismo antioxidante	Biosíntesis ácido ascórbico
Ácido cis- sinápico	10.47	Inducida	Compuesto fenólico	Metabolismo fenilpropanoides	Biosíntesis lignina
Ácido 8-amino-octanoico	3.39	Inducida	Ácido orgánico	Metabolismo de lípidos	Biosíntesis ácidos grasos
Ácido 2-dihidroxibutanoico	3.65	Inducida	Acilglicerol	Metabolismo de lípidos	Metabolismo butanoato
N-butanol-homoserina lactona	13.66	Inducida	Acilglicerol	Metabolismo de lípidos	Biosíntesis de ácidos grasos
Prolina	1.35	Inducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo arginina y prolina
Triptófano	4.68	Inducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Síntesis de compuestos indólicos
2-aminofenol	2.73	Inducida	Compuesto fenólico	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo triptófano
Ácido cis-cafeico	69.55	Inducida	Compuesto fenólico	Metabolismo fenilpropanoides	Biosíntesis de lignina
Ácido 3-indolenolacetaldehído	3.35	Inducida	Compuesto indólico	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo triptófano
Ácido 3-indolacetónitrilo	3.13	Inducida	Compuesto indólico	Metabolismo intermediario	Biosíntesis de fitoalexinas

4. RESULTADOS

Purina	1.75	Inducida	Compuesto nitrogenado	Metabolismo ácidos nucleicos	Biosíntesis de adenina y guanina
Dihidroesfingosina	53.39	Inducida	Esfingolípido	Metabolismo de lípidos	Metabolismo de los esfingolípidos
2-deoxiribosa	5.67	Inducida	Glúcido	Metabolismo energético	Ruta pentosa fosfato
Ácido galactónico	7.68	Inducida	Glúcido	Metabolismo energético	Biosíntesis de ácido ascórbico
Dodecano	0.60	Reducida	Acilglicerol	Metabolismo de lípidos	Biosíntesis de ácidos grasos
3,4dihydroxyfenilglicol aldehído	< 0.001	Reducida	Catecolamina	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo tirosina
Estigmaterol	0.003	Reducida	Esterol	Metabolismo de lípidos	Biosíntesis metabolitos secundarios

Por otra parte, en el caso de *flacca*, se analizaron la misma cantidad de metabolitos que en plantas silvestres de Ailsa Craig, pero hubo muchos más metabolitos significativos en relación al control, tanto en parte aérea como en raíces. En parte aérea, se identificaron un total de 46 compuestos, de los cuáles la mayoría se indujeron en respuesta al encharcamiento y tan solo uno se vio reducido respecto de valores control (figura 26), que fue identificado como glicerol, un polialcohol implicado en la gluconeogénesis y glucólisis. El resto de metabolitos (tabla 3), que presentaron valores de concentración superiores en plantas encharcadas, fueron intermediarios del metabolismo de la tirosina (ácido indol 3-láctico y ácido 3-(4-dihidroxifenil) láctico como compuestos indólicos, el primero de éstos implicado también en el metabolismo del triptófano; el 3-iodo-tirosina y ácido 2-amino-3(4-hidroxifenil) propanoico; la tiramina y el ácido 3-hidroxifenil acético derivado de ésta) y, los ácidos fenólicos quínico y shikímico, precursores de aminoácidos indólicos y aromáticos. En paralelo, el 3-indol-pirúvico, 3-indol-acetaldehído, el 5-hidroxitriptófano y el propio triptófano también presentaron valores superiores en hojas de plantas sometidas a inundación, indicando una fuerte activación del metabolismo secundario. Otros aminoácidos a destacar por su sobreacumulación fueron los aminoácidos fenilalanina, histidina, lisina, glicina, serina, treonina, valina, leucina, isoleucina, alanina, glutamato y aspartato y diversos compuestos de carácter glucídico (glucosa, 2-amino-2-deoxi-glucosa, 1-O-metil- α -D-glucopiranososa, 1,6-dehidro- β -D-glucosa, gulosa y lixosa), dentro de este grupo, se resaltan la ribosa 5-fosfato por su papel en la síntesis de nucleótidos (tal y como respalda la acumulación paralela de adenosina 5-monofosfato) y la ribulosa 5-fosfato, como sustrato principal en el ciclo de Calvin, sugiriendo cierta capacidad fotosintética en este genotipo. Por otra parte, algunos

4. RESULTADOS

compuestos lipídicos como los ácidos grasos tetradecanoico, docosanoico y nonadecanoico vieron sus niveles incrementados en respuesta al encharcamiento del sustrato.

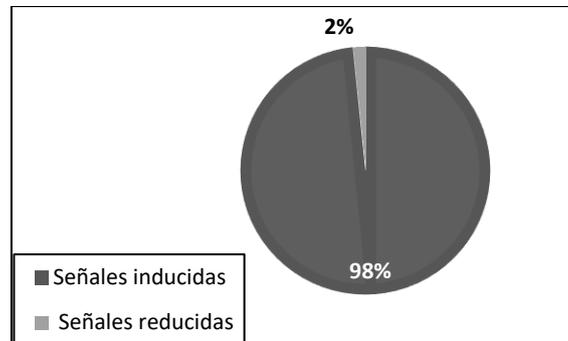


Figura 26. Señales diferenciales en respuesta al estrés por inundación en parte aérea de plantas de tomate del mutante *flacca* (var. Ailsa Craig).

Tabla 3. Compuestos cuyos niveles se vieron reducidos e inducidos en respuesta al estrés por inundación en parte aérea de plantas del mutante *flacca* (var. Ailsa Craig).

Nombre del componente	Fold change	Tipo de señal	Tipo de compuesto	Ruta	Ruta metabólica
Ácido tetradecanoico	2.70	Inducida	Ácido graso saturado	Metabolismo de lípidos	Biosíntesis de ácidos grasos
Ácido docosanoico	2.90	Inducida	Ácido graso saturado	Metabolismo de lípidos	Biosíntesis de ácidos grasos insaturados; síntesis de cutina, suberina y ceras
Ácido nonadecanoico	1.51	Inducida	Ácido graso saturado	Metabolismo de lípidos	Biosíntesis de ácidos grasos
Ácido 2-metil-málico (citramalato)	1.91	Inducida	Ácido orgánico	Metabolismo de aminoácidos	Biosíntesis valina, leucina, isoleucina
Ácido quínico	2.82	Inducida	Ácido orgánico	Metabolismo de aminoácidos	Biosíntesis de fenilalanina, triptófano y tirosina
Ácido shikímico	3.46	Inducida	Ácido orgánico	Metabolismo de aminoácidos	Biosíntesis de fenilalanina, triptófano y tirosina
Ácido isoascórbico	2.92	Inducida	Ácido orgánico	Metabolismo de antioxidantes	Reacciones de óxido-reducción
Semialdehído del ácido tartrónico	2.60	Inducida	Ácido orgánico	Metabolismo energético	Glucólisis
Ácido tartárico	3.10	Inducida	Ácido orgánico	Metabolismo energético	Glucólisis
Ácido 2-oxogluconico	4.51	Inducida	Ácido orgánico	Metabolismo energético	Ruta pentosa fosfato

4. RESULTADOS

Ácido 3-oxalomálico	1.94	Inducida	Ácido orgánico	Metabolismo energético	Metabolismo del glioxilato y dicarboxilato
Ácido subérico	2.02	Inducida	Ácido orgánico	Metabolismo intermediario	Metabolismo de ácidos orgánicos y lípidos
Prostaglandina E2	1.63	Inducida	Ácidos grasos	Metabolismo de lípidos	Metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados
Ácido 5- aminolevulinico	1.89	Inducida	Ácidos grasos	Metabolismo intermediario	Biosíntesis de clorofila
Ácido pantoténico	2.05	Inducida	Amida	Metabolismo intermediario	Biosíntesis de metabolitos secundarios
Ácido nicotínico	2.46	Inducida	Amina	Metabolismo intermediario	Biosíntesis de metabolitos secundarios
Ácido-4-piridóxico	6.79	Inducida	Amina aromática	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo de la glicina y serina
Aspargina	3.23	Inducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Biosíntesis alanina, aspartato y glutamato
Ácido 2-amino-3(4-hidroxifenil) propanoico	2.07	Inducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Biosíntesis tirosina
Cistationina	1.73	Inducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Biosíntesis lisina, serina y treonina
Lisina	4.28	Inducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Biosíntesis lisina
Ácido 2-ciclohexilamino-etanosulfónico	2.11	Inducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo del sulfuro
Histidina	2.73	Inducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo histidina; biosíntesis de metabolitos secundarios
3-iodo-tirosina	3.83	Inducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo tirosina
5-hidroxitriptofano	1.80	Inducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo triptófano
Triptófano	2.57	Inducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo triptófano
Ácido 3-(2-hidroxifenil) propanoico	2.84	Inducida	Compuesto fenólico	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo fenilalanina
Ácido 3-(4-dihidroxifenil) láctico	1.92	Inducida	Compuesto fenólico	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo tirosina
Ácido hidrocafeico	2.61	Inducida	Compuesto fenólico	Metabolismo fenilpropanoides	Biosíntesis lignina

4. RESULTADOS

Ácido-1-fosfato-galacturónico	4.25	Inducida	Glúcido	Metabolismo energético	Biosíntesis de pectinas
Ácido glucurónico	2.08	Inducida	Glúcido	Metabolismo energético	Interconversión pentosa-glucuronato; metabolismo aminoazúcares y nucleótidos
β -D-alosa	3.17	Inducida	Glúcido	Metabolismo energético	Metabolismo fructosa y manosa
1,6-Anhydro- β -D-glucosa	2.40	Inducida	Glúcido	Metabolismo energético	Glucólisis
1-O-metil- α -D-glucopiranososa	2.90	Inducida	Glúcido	Metabolismo energético	Glucólisis
Gulosa	3.68	Inducida	Glúcido	Metabolismo energético	Glucólisis
2-amino-2-deoxi-glucosa	4.94	Inducida	Glúcido	Metabolismo energético	Glucólisis
D-glucopiranososa	6.34	Inducida	Glúcido	Metabolismo energético	Glucólisis
Eritrosa	2.05	Inducida	Glúcido	Metabolismo energético	Ruta pentosa fosfato
Lixosa	2.75	Inducida	Glúcido	Metabolismo energético	Ruta pentosa fosfato
Ribulosa-5-fosfato	2.21	Inducida	Glúcido	Metabolismo energético	Ruta pentosa fosfato
Ribosa-5-fosfato	4.40	Inducida	Glúcido	Metabolismo energético	Ruta pentosa fosfato
α -D-manopiranosil-(1,2) α -D-manopiranososa	2.09	Inducida	Glúcido	Metabolismo energético	Síntesis de ATP/ADP
Isomaltosa	2.49	Inducida	Glúcido	Metabolismo energético	Síntesis de ATP/ADP
myo-inositol	2.15	Inducida	Polialcohol	Metabolismo energético	Síntesis de lípidos de membrana
Secologanina	1.66	Inducida	Terpenoide	Metabolismo de lípidos	Síntesis de compuestos lipídicos
Glicerol	0.003	Reducida	Polialcohol	Metabolismo energético	Glucólisis y gluconeogénesis

En cuanto a los metabolitos identificados en raíces, 118 presentaron diferencias significativas, la mayoría (un 75.4%) presentaron niveles reducidos respecto de los valores control como se observa en la figura 27. Dentro de las señales reguladas

positivamente encontramos una mayoría de compuestos glucídicos de los que destacan la rafinosa, por su papel en defensa frente al estrés abiótico (Hernández, 2014) y la sacarosa, como metabolito de transporte de carbohidratos en los vegetales. Además, el ácido 1,4-lactona galacturónico cuyos niveles también incrementaron en respuesta al encharcamiento, participa en la interconversión pentosa-glucuronato y en el metabolismo del almidón respectivamente, apoyando la movilización de reservas en respuesta al estrés. Se observó también una acusada acumulación de fructosa, implicada también en la síntesis de sacarosa. Por otra parte, la acumulación de los ácidos 1,4-lactona-glucárico, glucurónico, el 2-amino-2-deoxi-glucónico, 2-oxoglucónico e isoascórbico, sugiere la inducción de la síntesis de ácido ascórbico, metabolito clave en la defensa frente al estrés oxidativo. Se observaron una serie de compuestos lipídicos sobreacumulados (ácidos palmitoico y tetradecanoico, esfingosina y dihidroesfingosina).

De igual manera que en hojas, se observó la acumulación de ácido 4-hidroxifenil pirúvico, sugiriendo una activación del metabolismo secundario especialmente la ruta de compuestos indólicos y fenilpropanoides, tal y como respalda la acumulación de ácido indolacético, 3-indolacetónitrilo, cis-cafeico y el coniferil aldehído. A este respecto, es destacable la acumulación de ácido indolacético y t-zeatina, dos hormonas vegetales implicadas en el crecimiento vegetal. En experimentos previos realizados en cítricos, se observó la acumulación de auxinas en raíces sometidas a inundación prolongada (Arbona y Gómez Cadenas, 2008).

Por lo que respecta a las señales reguladas de forma negativa o reducidas respecto del control, la mayoría de metabolitos identificados están relacionados con el metabolismo de aminoácidos (tabla 4). Algunos ácidos orgánicos como el ácido fenilpirúvico y el antralínico están implicados en la biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptófano; el ácido 2-pirrol carboxílico participa en el metabolismo de la arginina y prolina; el ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico es el precursor del etileno y deriva del aminoácido metionina; el ácido maleico y acetoacético están implicados en el metabolismo de la tirosina, pero el acetoacético también interviene en el metabolismo de la lisina, valina, leucina e isoleucina. Además, el ácido 2-oxovalérico participa en el metabolismo de los últimos tres aminoácidos destacados anteriormente. Otros metabolitos que intervienen en el metabolismo de aminoácidos son la histamina, histidina, histinidol y N-formil-L-aspartato, que participan en el metabolismo de la histidina y en la síntesis de metabolitos secundarios. También intervienen otros aminoácidos o derivados, tales como la prolina y la 3-hidroxi prolina (cis y trans); la 3-5-

iodo-tirosina, el ácido rosmarínico, 3-hidroxifenil acético y el 3,4-hidroximandélico que también participan en el metabolismo de la tirosina. Además, el ácido 3-hidroxifenil acético, aunque este además participa en el metabolismo de la fenilalanina, igual que la 2-fenil acetamida. Asimismo, la sacaropina participa en el metabolismo de la lisina y en la biosíntesis de metabolitos secundarios; la metil-selenocisteína participa en el metabolismo de los compuestos selénicos; el 2-aminofenol interviene en el metabolismo del triptófano; la cisteinilglicina en el metabolismo del glutatión. Por otra parte, en cuanto a los metabolitos que participan en el metabolismo energético, la reducción de éstos sigue la misma tendencia en todos los casos (Tabla 4), ya que en el caso del ácido pirúvico, fosfórico, dimetilsuccínico, glicerol-2-fosfato, etc. presentan niveles de reducción muy similar, compatibles con la reducción del metabolismo energético por la falta de O₂. Además, también se regularon de forma negativa algunos metabolitos intermediarios incluyendo algunos terpenoides y flavonoides (hesperetina, eriodictol y quercitina), alcaloides y algunos ácidos orgánicos como el ácido gálico, maleámico y 1,5-lactona mevalónico, implicado en la síntesis de terpenoides.

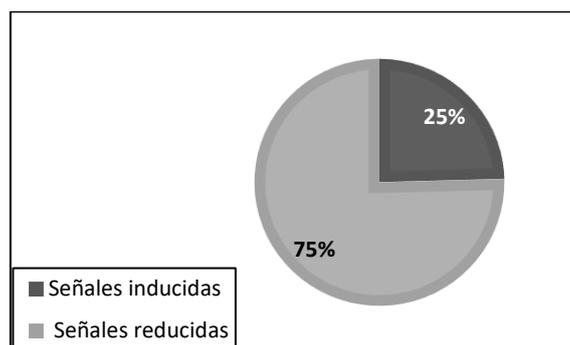


Figura 27. Señales diferenciales en respuesta al estrés por inundación en raíces de plantas del mutante *flacca* (var. Ailsa Craig).

4. RESULTADOS

Tabla 4. Compuestos cuyos niveles se vieron alterados en respuesta al estrés por inundación en raíces de plantas de tomate del mutante *flacca* (var. Ailsa Craig).

Nombre del componente	Fold change	Tipo de señal	Tipo de compuesto	Ruta	Ruta metabólica
Ácido palmitoico	5.74	Inducida	Ácido graso insaturado	Metabolismo de lípidos	Biosíntesis ácidos grasos
Ácido tetradecanoico	6.65	Inducida	Ácido graso saturado	Metabolismo de lípidos	Biosíntesis ácidos grasos
Ácido isoascórbico	2.87	Inducida	Ácido orgánico	Metabolismo antioxidante	Reacciones de oxido-reducción
Ácido 4-hidroxifenil pirúvico	43.77	Inducida	Ácido orgánico	Metabolismo aminoácidos	Biosíntesis fenilalanina, tirosina y triptófano; biosíntesis ubiquinonas y otras quinonas terpénicas
Ácido 2-oxogluconico	3.65	Inducida	Ácido orgánico	Metabolismo energético	Ruta pentosa fosfato
Ácido 2-metil cítrico	12.43	Inducida	Ácido orgánico	Metabolismo intermediario	Metabolismo del propanoato
Asparragina	7.12	Inducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Biosíntesis alanina, aspartato y glutamato y de metabolitos secundarios
Dihidroesfingosina	8.44	Inducida	Compuesto fenólico	Metabolismo de lípidos	Metabolismo de los esfingolípidos
Ácido cis-cafeico	50.37	Inducida	Compuesto fenólico	Metabolismo fenilpropanoides	Biosíntesis de fenilpropanoides
Ácido 3-indolacetónitrilo	9.44	Inducida	Compuesto Indólico	Metabolismo intermediario	Biosíntesis de fitoalexinas
Ácido 3-indolacético	5.73	Inducida	Compuesto Indólico	Metabolismo intermediario	Síntesis de auxinas
Guanosina	5.69	Inducida	Compuesto nitrogenado	Metabolismo ácidos nucleicos	Metabolismo purina
7,8-dihidroneopterina	4.46	Inducida	Compuesto nitrogenado	Metabolismo intermediario	Biosíntesis de folato (anión del ácido fólico)
Metanefrina	2.72	Inducida	Compuesto nitrogenado	Metabolismo intermediario	Biosíntesis de metabolitos secundarios
Trans-zeatina	3.24	Inducida	Compuesto nitrogenado	Metabolismo intermediario	Biosíntesis de zeatina; biosíntesis de hormonas y metabolitos secundarios
Esfingosina	2.68	Inducida	Esfingolípido	Metabolismo de lípidos	Metabolismo de los esfingolípidos
Coniferil aldehído	5.64	Inducida	Compuesto fenólico	Metabolismo fenilpropanoides	Biosíntesis de lignina
Ácido-1,4-lactona glucárico	5.40	Inducida	Glúcido	Metabolismo energético	Biosíntesis de ascorbato y aldarato

4. RESULTADOS

1,O-metil-a-glucopiranosas	2.50	Inducida	Glúcido	Metabolismo energético	Glucólisis
2-amino-2-deoxy glucosa	3.17	Inducida	Glúcido	Metabolismo energético	Glucólisis
Gulosa	8.66	Inducida	Glúcido	Metabolismo energético	Glucólisis
Ácido glucurónico	5.20	Inducida	Glúcido	Metabolismo energético	Interconversión pentosa-glucuronato, metabolismo aminoazúcares y nucleótidos
Rafinosa	3.37	Inducida	Glúcido	Metabolismo energético	Metabolismo galactosa
Ácido galactónico	9.61	Inducida	Glúcido	Metabolismo energético	Metabolismo galactosa
Ácido -1,4-lactona galacturónico	8.61	Inducida	Glúcido	Metabolismo energético	Metabolismo galactosa; Interconversión pentosa-glucuronato
Sacarosa	10.18	Inducida	Glúcido	Metabolismo energético	Metabolismo galactosa; metabolismo del almidón y sacarosa
Fructosa	23.21	Inducida	Glúcido	Metabolismo energético	Metabolismo manosa y galactosa; metabolismo del almidón y sacarosa
Ácido 2-amino-2-deoxy glucónico	6.67	Inducida	Glúcido	Metabolismo energético	Ruta pentosa fosfato
α -D-manopiranosil-(1,2)-D-manopiranosas	24.06	Inducida	Glúcido	Metabolismo energético	Síntesis de ATP/ADP
Sorbitol	18.76	Inducida	Polialcohol	Metabolismo energético	Metabolismo fructosa, manosa y galactosa
Ácido 4-metiltio-2-oxobutanoato	0.51	Reducida	Ácido graso	Metabolismo de lípidos y aminoácidos	Metabolismo cisteína y metionina; Biosíntesis de glucosinolatos y metabolitos secundarios
5,6- β -epoxicolesterol	0.54	Reducida	Ácido graso poliinsaturado	Metabolismo de lípidos	Biosíntesis ácidos grasos
Ácido eicosanoico	0.43	Reducida	Ácido graso saturado	Metabolismo de lípidos	Biosíntesis ácidos grasos insaturados
Ácido fosfórico	0.51	Reducida	Ácido inorgánico	Metabolismo energético	Fosforilación oxidativa; Fotosíntesis
3-ureidopropionato	0.40	Reducida	Ácido orgánico	Metabolismo de ácidos nucleicos	Metabolismo pirimidina, biosíntesis de CoA y pantotenato
Ácido fenilpirúvico	0.54	Reducida	Ácido orgánico	Metabolismo de aminoácidos	Biosíntesis fenilalanina, tirosina y triptófano
Ácido antralínico	0.46	Reducida	Ácido orgánico	Metabolismo aminoácidos	Biosíntesis fenilalanina, tirosina y triptófano

4. RESULTADOS

1-amino-ciclopropano-1-carboxílico	0.51	Reducida	Ácido orgánico	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo cisteína y metionina
Ácido 2- pirrol carboxílico	0.28	Reducida	Ácido orgánico	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo de la arginina y prolina
Ácido maleico	0.47	Reducida	Ácido orgánico	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo tirosina
Ácido acetoacético	0.43	Reducida	Ácido orgánico	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo tirosina, lisina, valina, leucina e isoleucina
Ácido 2-oxovalerico	0.57	Reducida	Ácido orgánico	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo valina, leucina e isoleucina
Trietanolamida	0.52	Reducida	Ácido orgánico	Metabolismo de lípidos	Metabolismo glicerofosfolipídico
Fosfomicina	0.39	Reducida	Ácido orgánico	Metabolismo energético	Glucólisis
Ácido pirúvico	0.47	Reducida	Ácido orgánico	Metabolismo energético	Glucólisis; ruta pentosa fosfato; ciclo de Krebs
Ácido 1,4-lactona lixónico	0.57	Reducida	Ácido orgánico	Metabolismo energético	Interconversión pentosa-glucuronato, metabolismo ascorbato y aldarato
Glicerol 2-fosfato	0.48	Reducida	Ácido orgánico	Metabolismo energético	Metabolismo glicerofosfolipídico
2-oxoglutarato	0.39	Reducida	Ácido orgánico	Metabolismo energético y de aminoácidos	Ciclo de Krebs; biosíntesis de arginina y lisina; metabolismo alanina, aspartato, glutamato, glutamina e histidina
Ácido 2,2-dimetilsuccinico	0.42	Reducida	Ácido orgánico	Metabolismo energético y de aminoácidos	Ciclo de Krebs; fosforilación oxidativa; metabolismo alanina, aspartato, glutamato, tirosina y fenilalanina
Ácido 1,4- dihidroxi-2-naftoico	0.52	Reducida	Ácido orgánico	Metabolismo intermediario	Biosíntesis de ubiquinonas y otras quinonas terpénicas
Ácido 1,5-lactona mevalónico	0.48	Reducida	Ácido orgánico	Metabolismo intermediario	Biosíntesis metabolitos secundarios
Ácido gálico	0.50	Reducida	Ácido orgánico	Metabolismo intermediario	Degradación del aminobenzoato; biosíntesis de fenilpropanoides
Ácido maleámico	0.42	Reducida	Ácido orgánico	Metabolismo intermediario	Metabolismo de la nicotina y nicotinamida
5,6 dimetil benzimidiazol	0.49	Reducida	Ácido orgánico	Metabolismo intermediario	Metabolismo de las riboflavinas
Dodecano	0.52	Reducida	Acilglicerol	Metabolismo de lípidos	Biosíntesis ácidos grasos

4. RESULTADOS

Pentadecano	0.52	Reducida	Acilglicerol	Metabolismo de lípidos	Biosíntesis ácidos grasos
Ácido 2-dihidroxi-butanoico	0.54	Reducida	Acilglicerol	Metabolismo de lípidos	Metabolismo butanoato
Ácido 4-hidroxi-butanoico	0.43	Reducida	Acilglicerol	Metabolismo intermediario	Metabolismo butanoato
Ácido metil jasmónico	0.39	Reducida	Acilglicerol	Metabolismo de lípidos	Metabolismo del ácido linolénico; biosíntesis de metabolitos secundarios
Senecionina	0.41	Reducida	Alcaloide	Metabolismo intermediario	Biosíntesis de alcaloides derivados de la ornitina, lisina y ácido nicotínico
Alstonina	0.40	Reducida	Alcaloide	Metabolismo intermediario	Biosíntesis de alcaloides indólicos
Histamina	0.35	Reducida	Amina	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo de la histidina; biosíntesis de alcaloides derivados de la histidina y purina
Piridoxal-5-monofosfato	0.51	Reducida	Amina aromática	Metabolismo antioxidante	Metabolismo tiamina
Treonina	0.51	Reducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Biosíntesis de valina, leucina e isoleucina; metabolismo glicina, serina y treonina
Cis 3-hidroxi-prolina	0.53	Reducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo arginina y prolina
Ciclo-serina	0.55	Reducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo arginina y serina
Glutamina	0.48	Reducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo de la alanina, aspartato, glutamato, glutamina
Trans-3-hidroxi-prolina	0.46	Reducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo de la arginina y prolina
Prolina	0.52	Reducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo de la arginina y prolina
Ácido cisteínosulfínico	0.45	Reducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo de la cisteína y metionina
N-formil-metionina	0.49	Reducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo de la cisteína y metionina
Metionina	0.36	Reducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo de la cisteína y metionina
N-acetil metionina	0.52	Reducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo de la cisteína y metionina
Homocisteína	0.36	Reducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo de la cisteína y metionina

4. RESULTADOS

2-fenil acetamida	0.46	Reducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo de la fenilalanina
Alotreonina	0.22	Reducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo de la glicina, serina y treonina
N,N-dimetilglicina	0.36	Reducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo de la glicina, serina y treonina
Serina	0.48	Reducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo de la glicina, serina y treonina
Sacaropina	0.39	Reducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo de la lisina; biosíntesis de metabolitos secundarios
Trans-3-hidroxiprolina	0.46	Reducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo de la arginina y prolina
N-formil-L-aspartato	0.51	Reducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo histidina
Histinidol	0.56	Reducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo histidina
Histidina	0.59	Reducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo histidina
3,5- diodo tirosina	0.53	Reducida	Aminoácido	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo tirosina
Metilseleno cisteína	0.45	Reducida	Aminoácido	Metabolismo intermediario	Metabolismo de compuestos selénicos
Ácido 3,4-dihidroxi mandelico	0.53	Reducida	Catecolamina	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo tirosina
Ácido rosmarínico	0.51	Reducida	Compuesto fenólico	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo tirosina
2- aminofenol	0.50	Reducida	Compuesto fenólico	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo triptófano
Ácido 2-cis-metoxicinnamico	0.50	Reducida	Compuesto fenólico	Metabolismo fenilpropanoides	Biosíntesis de fenilpropanoides
Ácido 2-trans-metoxicinnamico	0.51	Reducida	Compuesto fenólico	Metabolismo fenilpropanoides	Biosíntesis de fenilpropanoides
Ácido 2,5-dimetoxitrans cinámico	0.54	Reducida	Compuesto fenólico	Metabolismo fenilpropanoides	Biosíntesis fenilpropanoides
Piceatanol	0.50	Reducida	Compuesto fenólico	Metabolismo intermediario	Biosíntesis metabolitos secundarios
Citosina	0.47	Reducida	Compuesto nitrogenado	Metabolismo de ácidos nucleicos	Metabolismo pirimidina
Uracilo	0.43	Reducida	Compuesto nitrogenado	Metabolismo de ácidos nucleicos	Metabolismo pirimidina (uracilo, timina); biosíntesis de CoA y pantotenato
β -alanina	0.51	Reducida	Compuesto nitrogenado	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo cisteína y metionina

4. RESULTADOS

Cisteinilglicina	0.57	Reducida	Dipéptido	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo del glutatión
0-1-β-galactosil esfingosina	0.48	Reducida	Esfingolípido	Metabolismo de lípidos	Metabolismo de los esfingolípidos
24,25 dihidrolanosterol	0.34	Reducida	Esterol	Metabolismo de lípidos	Biosíntesis de brasinoesteroides
Lanosterol	0.34	Reducida	Esterol	Metabolismo de lípidos	Biosíntesis de esteroides (colesterol) y metabolitos secundarios
β- sitosterol	0.001	Reducida	Esterol	Metabolismo de lípidos	Biosíntesis metabolitos secundarios
Ácido 3-hidroxifenil acético	0.50	Reducida	Flavonoide	Metabolismo aminoácidos	Metabolismo de la tirosina y fenilalanina
Aloxacina	0.42	Reducida	Flavonoide	Metabolismo energético	Metabolismo de las riboflavinas
Hesperetina	0.48	Reducida	Flavonoide	Metabolismo intermediario	Biosíntesis flavonoides
Eriodictol	0.50	Reducida	Flavonoide	Metabolismo intermediario	Biosíntesis flavonoides
Quercitina	0.50	Reducida	Flavonoide	Metabolismo intermediario	Biosíntesis flavonoides
Ácido 2-amino-2-deoxi glucónico	0.53	Reducida	Glúcido	Metabolismo energético	Ruta pentosas fosfato
Fenilacetaldehído	0.48	Reducida	Glúcido	Metabolismo de aminoácidos	Metabolismo fenilalanina
Gliceraldehido	0.51	Reducida	Glúcido	Metabolismo energético	Ruta pentosas fosfato; metabolismo glicerofosfolípidos; metabolismo fructosa, manosa, galactosa
5-metil citosina	0.52	Reducida	Nucleótido	Metabolismo de ácidos nucleicos	Metabolismo pirimidina
Alanil- alanina	0.46	Reducida	Péptido	Metabolismo de aminoácidos	Metabolismo alanina
Treitol	0.51	Reducida	Polialcohol	Metabolismo energético	Metabolismo glucólisis
Putrescina	0.50	Reducida	Poliamina	Metabolismo de aminoácidos	Metabolismo arginina, prolina, glutatión; metabolismo secundario
N-hexanoil-homoserina lactona	0.37	Reducida	Proteína	Regulación genética	Mecanismos de regulación de la expresión génica
Trans-escualeno	0.55	Reducida	Terpenoide	Metabolismo de lípidos	Biosíntesis esteroides y metabolitos secundarios

4. RESULTADOS

Filoquinona	0.44	Reducida	Terpenoide	Metabolismo intermediario	Biosíntesis de ubiquinonas y otras quinonas terpenoides
Filohidroquinona	0.002	Reducida	Terpenoide	Metabolismo intermediario	Biosíntesis metabolitos secundarios
Alcohol perílico	0.48	Reducida	Terpenoide	Metabolismo intermediario	Degradación de limoneno y pineno
Aldehído perílico	0.47	Reducida	Terpenoide	Metabolismo intermediario	Degradación de limoneno y pineno
α -Tocoferol acetato	0.44	Reducida	Tocoferol	Metabolismo intermediario	Metabolismo antioxidante

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Los datos presentados en este trabajo indican que existen diferencias en la capacidad de tolerar el estrés por inundación del sustrato entre plantas del cultivar Ailsa Craig y un mutante de éste, deficiente en la producción de ABA, conocido como *flacca*.

En plantas superiores, el ABA deriva de un precursor de epoxicarotenoide que se oxida para producir xantoxina (Parry *et al.*, 1988). Después de la reacción, la xantoxina se convierte en ABA mediante una serie de modificaciones en el anillo para producir aldehído abscísico, que se oxida a ABA mediante las aldehído oxidasas (AO), enzimas que contienen un cofactor de molibdeno (Mo-Co) (Walker-Simmons *et al.*, 1989; Leydecker *et al.*, 1995) y que desempeñan un papel en la etapa final de oxidación requerida para la biosíntesis de ABA. Además de AO, otros enzimas que requieren la presencia de Mo-Co son la nitrato reductasa (NR) y xantina deshidrogenasa (XDH).

La mutación en *flacca* es una delección de 6 pares de bases en un cofactor de molibdeno-sulfurasa (Sagi *et al.*, 2002). Esta mutación reduce la capacidad oxidante de AO (Schwartz *et al.*, 1997) que cataliza la conversión del aldehído abscísico a ABA, desempeñando un papel en la etapa final para la biosíntesis de esta hormona. Por todo ello, éste mutante está marcadamente perjudicado para sintetizar ABA.

El mutante de tomate *flacca* muestra fenotípicamente un marchitamiento foliar aparentemente debido a la transpiración excesiva que resulta de la falta de control del cierre de los estomas (Tal, 1966). Se ha sugerido que la razón principal es la deficiencia en el contenido endógeno de ABA en las hojas (Imber y Tal, 1970), aunque otros modelos sugirieron que los caracteres fenotípicos de marchitez se deben a los cambios en la actividad enzimática destacados anteriormente (Marin y Marion-Poll, 1997) o en la determinación de la concentración y síntesis de ABA (Taylor *et al.*, 1988). En algunos trabajos de investigación realizados con *flacca* y con su WT (Ailsa Craig) se encontró que los niveles de Mo-Co eran similares entre ambos genotipos, tal y como se ha mostrado en el apartado 4.1.4.1., por ello la deficiencia de Mo-Co en *flacca* no sería la responsable del fenotipo marchito (Sagi *et al.*, 1998), sino que la responsable sería la deficiencia en la síntesis de ABA.

En tomate, el encharcamiento del sustrato provoca diversos cambios morfológicos a modo de adaptaciones a la condición de estrés (Ezin *et al.*, 2010). Una respuesta característica al encharcamiento del sustrato es la inducción de epinastia foliar, que únicamente se observó en el genotipo silvestre Ailsa Craig (datos no presentados). Por el

contrario, en *flacca*, tras el anegamiento, se observó un acusado marchitamiento foliar, como ya se ha mencionado, pero no epinastia, que posiblemente estaría enmascarada por el fenotipo marchito. Esta respuesta diferencial se atribuyó directamente a la deficiencia en ABA que presenta *flacca* que está mediada por la acumulación de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) en raíces inundadas que luego es transportado a la parte aérea donde es oxidado a etileno (Vidoz *et al.*, 2010). En cítricos, la acumulación masiva de ACC en raíces estresadas, así como su oxidación a etileno en hojas, depende de la señalización mediada por ABA (Gómez-Cadenas *et al.*, 1996). La ausencia de epinastia foliar y el mayor grado de marchitez observados en *flacca* estarían, por tanto, vinculados directamente a la deficiencia en ABA. A nivel radical, se observó la formación de raíces adventicias en la base del tallo tras la aplicación del estrés. Estas estructuras únicamente se observan en el mutante *flacca* (figura 28), y su formación se apoya en algunos modelos experimentales publicados por Tal *et al.*, (1979); Hussain *et al.*, (2000), donde se observó que plantas de tomate deficientes en la producción de ABA como *flacca* y *notabilis*, producían mayor cantidad de etileno que las plantas WT, aunque el etileno no es el factor principal que promueve su formación, sino que está apoyado por las auxinas, ya que el transporte de éstas es clave en el desarrollo de primordios foliares y en la formación de las raíces adventicias. Además, un mecanismo de tolerancia a las inundaciones en las plantas incluye la capacidad de desarrollar un gran sistema de raíces adventicias (Jackson *et al.*, 1984; Colmer *et al.*, 2008; Verma, 2009) .



Figura 28. Plantas del genotipo *flacca* (var. Ailsa Craig) sometidas a encharcamiento del sustrato en las que se observa claramente la formación de raíces adventicias.

El comportamiento de los parámetros de intercambio gaseoso se ha correlacionado de forma clara, en cítricos y en algunas especies forestales y hortícolas con la tolerancia frente al estrés por inundación (Arbona *et al.*, 2008; Islam y Macdonald., 2004; Jackson *et al.*, 2005). En este trabajo, solo el genotipo *flacca* presentó una reducción significativa de la tasa fotosintética neta tras la inundación. Esta regulación de la tasa fotosintética estaría promovida mecanismos no estomáticos relacionados con una alteración en el complejo antena del fotosistema, ya que como se ha destacado anteriormente los niveles de ABA en *flacca* no podrían correlacionarse con la regulación estomática. Por ello, *flacca* sería más sensible al encharcamiento del sustrato. Por lo que respecta a la E, en el genotipo silvestre Ailsa Craig experimentó una drástica reducción mientras que en *flacca* no presento diferencias significativas respecto del control. La conductancia estomática mostró un comportamiento paralelo a la transpiración. En este sentido, las disminuciones de Gs y de E por cierre estomático en respuesta a inundaciones se han propuesto como un mecanismo para regular el balance hídrico de las plantas y prevenir la deshidratación de las hojas (Ashraf, 2003; Striker *et al.*, 2005), ya que el control estomático de la transpiración responde a la necesidad de mantener el estado hídrico de la planta equilibrando la salida de vapor de agua y la entrada de CO₂ al mesófilo para no limitar la actividad fotosintética (Arbona *et al.*, 2008), por tanto, los resultados sugieren que la

mayor tolerancia de Ailsa Craig al encharcamiento del sustrato estaría vinculada a la capacidad de control estomático ausente en *flacca*.

Además, durante la realización del trabajo se observó que los valores de potencial hídrico foliar en *flacca* eran menores que los de AC, lo cual estaría en consonancia con la deficiencia en ABA, la incapacidad para el control estomático y mantenimiento del balance hídrico. Sin embargo, no se observaron diferencias entre las plantas sometidas a la inundación y plantas control de ambos genotipos, aunque los valores de potencial hídrico radical si parecían mayores que los valores de potencial hídrico foliar (no se dispone de dichos datos). Por ello, la ausencia de diferencias en los niveles de potencial hídrico foliar entre plantas control y tratadas, se reflejó en una ausencia de diferencias en los niveles de prolina tanto foliares como radicales, tal y como se correlaciona en otros modelos experimentales (Molinari *et al.*, 2004).

La incidencia de una situación medioambiental adversa provoca un incremento en el estrés oxidativo, que afecta de forma similar en todas las especies (Blokhina *et al.*, 2003). Cuando el estrés oxidativo es provocado por un tipo de estrés abiótico o ambiental, su origen se asocia principalmente a deficiencias en las cadenas de transporte electrónico fotosintético y mitocondriales y a un incremento en la producción de ROS. Este daño es más acusado cuanto mayor es la presión ejercida por el estrés, correlacionándose de forma positiva con la sensibilidad a determinada condición adversa (Arbona *et al.*, 2003; 2008).

En este trabajo, el daño oxidativo, medido en forma de acumulación de MDA en parte aérea y radicular, fue en general superior en AC que en *flacca*. No obstante, los niveles en hojas de plantas estresadas se redujeron respecto de los valores control, sugiriendo una respuesta eficiente del sistema antioxidante que no se observó en *flacca*. A pesar de los niveles superiores de MDA en AC respecto de *flacca*, la reducción de éstos en parte aérea en respuesta al encharcamiento del sustrato indica que se produjeron cambios bioquímicos que redujeron la incidencia del estrés oxidativo, asociados en varias especies con la mayor tolerancia al estrés (Arbona *et al.*, 2008).

Las hormonas vegetales juegan un papel crucial en la adaptación de las plantas a condiciones de estrés abiótico y, de todas ellas, el ABA es probablemente la hormona más estudiada en respuesta al estrés abiótico (Eyidogan *et al.*, 2012). En este sentido, el JA que tradicionalmente ha sido vinculado a las respuestas a patógenos y heridas, recientemente ha adquirido relevancia en la regulación de la respuesta frente a estrés abiótico (Arbona y Gómez-Cadenas, 2008; de Ollas *et al.*, 2013). En el trabajo realizado,

se ha evaluado el comportamiento de algunas hormonas vinculadas en la regulación de las respuestas al estrés por inundación.

En cuanto al ABA, en general se observó que los valores de concentración foliar y radical eran mayores en AC que en *flacca*, debido a la deficiencia de éste en su producción. Tras la inundación, el genotipo que sufrió alteraciones en su concentración fue AC, reduciendo el contenido endógeno de ABA radical, como se ha observado en otros modelos experimentales con cítricos (Arbona y Gómez-Cadenas., 2008) y *Arabidopsis* (Hsu *et al.*, 2011), y aumentando el xilemático. Esto indicaría que la inundación provocaría, por un lado, la oxidación del ABA a ácido faséico y dihidrofaséico o la conjugación de éste con monosacáridos (ABAGE) inactivando así la actividad de la hormona y provocando una reducción de sus niveles. Y, por otro lado, como se ha observado en otros modelos experimentales (Saika *et al.*, 2007; Ollas *et al.*, 2015), algunas condiciones de estrés alteran la expresión de la enzima NCED. Es posible que el estrés por encharcamiento del sustrato reduzca su expresión y, por tanto, la tasa de conversión de neoxantina o violaxantina a xantosina provocando así la reducción de la síntesis ABA. No obstante, en raíces de cítricos sometidas a estrés por encharcamiento a corto plazo, este efecto no se ha podido constatar (Arbona *et al.*, 2017). Además, la disminución del ABA en raíces también se podría relacionar con un posible transporte xilemático de éste hacia la parte aérea para intervenir en la regulación de las respuestas de defensa frente a la condición de inundación. No obstante, si se tienen en cuenta las concentraciones de ABA foliar en comparación con la radicular y la xilemática, no se puede descartar, como algunos autores ya han descrito (Else *et al.*, 2001) que los mayores niveles de ésta hormona observados en hojas sean el resultado de una síntesis *de novo* moderada en hoja y una reducción en la redistribución floemática. Tal y como se ha explicado, el metabolismo del ABA en hojas y raíces de plantas inundadas difiere en gran medida porque las respuestas que se dan en cada tejido son específicas (Arbona y Gómez-Cadenas 2008; Hsu *et al.*, 2011) y tanto el aumento de ABA en hojas como la disminución en raíces tras la inundación, podrían ser una señal frente al estrés.

Por lo que respecta a los jasmonatos (JA, JA-ile, OPDA), algunos autores han demostrado que bajo condiciones de estrés abiótico y bajo inundación del sustrato, éstos suelen aumentar la concentración endógena foliar como respuesta a dichas condiciones (Arbona y Gómez-Cadenas., 2008). En este trabajo, la afirmación anterior no se cumple totalmente, ya que los genotipos sometidos a la inundación responden de forma diferente en cuanto a la acumulación de dicha fitohormona en la parte aérea, siendo *flacca* el

genotipo donde se observa la tendencia acumulativa. Esto podría deberse a la limitación de *flacca* para la síntesis de ABA, ya que como se ha mencionado, es deficiente en la producción de un cofactor de molibdeno implicado en la producción de ABA y podría relacionarse con los datos publicados recientemente por de Ollas et al. (2013), en los que se describe la relación entre el JA y el ABA a nivel biosintético, ya que según este modelo el JA ejercería el papel de “interruptor principal” actuando principalmente sobre la biosíntesis de ABA. En cuanto a la evolución de los jasmonatos en las raíces, parecen tener una evolución común con el ABA, ya que tras la inundación el contenido endógeno radicular de éstos disminuye. Este comportamiento se da en ambos genotipos, independientemente de sus diferentes niveles de tolerancia a esta señal ambiental (Arbona y Gómez-Cadenas., 2008). Sin embargo, en condiciones control, AC tenía niveles basales más elevados de ABA y jasmonatos, lo que puede indicar un estado diferente de dichas hormonas antes de la imposición del estrés. Se podría especular que este diferente estado basal está detrás de la mayor tolerancia de AC a las inundaciones del suelo, como se sugiere en cítricos y otras especies y bajo condiciones de estrés abiótico (Argamasilla *et al.*, 2014). La reducción observada en los niveles de las hormonas debe considerarse una respuesta al estrés más que un resultado del agotamiento de O₂ porque otros metabolitos que requieren oxígeno en su biosíntesis no se vieron afectados o incluso se regularon al alza (por ejemplo, IAA o precursores de lignina), tal y como se ha observado en este trabajo y en otros modelos experimentales (Argamasilla *et al.*, 2014; Arbona *et al.*, 2010).

Para terminar con las hormonas, se destaca la participación del SA en respuesta a estreses abióticos (Daneshmand *et al.*, 2009; Umebese *et al.*, 2009; Idrees *et al.*, 2011; Pál et al., 2013), aunque en este trabajo las alteraciones observadas tras las condiciones de inundación no fueron significativas.

En cuanto a los metabolitos, la respuesta en las raíces fue más intensa que en las hojas en ambos genotipos, y también fue mayor la respuesta metabólica en *flacca* bajo las mismas condiciones de inundación. Estos datos sugieren la existencia de mecanismos dependientes de ABA que previenen la modificación del metabolismo vegetal en respuesta al encharcamiento del sustrato. En otros sistemas experimentales, incluyendo la especie modelo *Arabidopsis thaliana* y su pariente cercano *Thellungiella halophila*, que presenta características de tolerancia a estreses abióticos, se observó una respuesta similar del metabolismo secundario en condiciones de sequía (Arbona *et al.*, 2010).

Algunos cambios metabólicos específicos en las plantas sometidas a la inundación del sustrato incluyen la acumulación de azúcares, polialcoholes o intermediarios del ciclo

de Krebs. En respuesta a una combinación de estreses abióticos, las plantas de *Arabidopsis thaliana* acumularon sacarosa, probablemente derivada de la descomposición del almidón (Rizhsky *et al.*, 2004). Por lo tanto, este proceso junto con la producción de energía en las mitocondrias podría jugar un papel importante en el metabolismo de las plantas bajo condiciones de estrés abiótico (Rizhsky *et al.*, 2002, Rizhsky *et al.*, 2004). En este trabajo, se observó la acumulación de la sacarosa, además de otros azúcares como la fructosa, la rafinosa, gulosa, el ácido galactónico y el 1-4-lactona glucárico, el 2-amino-2-deoxi-glucónico, 2-oxoglucónico e isoascórbico, el sorbitol, myo-inositol, etc., todos ellos podrían estar implicados en la reserva de CH para posteriormente utilizarlos en situaciones extremas, por ello sugieren tener un papel de defensa frente al estrés abiótico (Hernández, 2014).

Los intermediarios del ciclo de Krebs o del ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) también estuvieron implicados en la respuesta de las plantas al estrés aplicado (Geigenberger, 2003). El ciclo de TCA es una vía metabólica central para los procesos aeróbicos y es responsable de una gran parte de la oxidación de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos que conduce a la producción de energía y poder reductor (Ferne *et al.*, 2004). En este trabajo, algunos metabolitos implicados en el ciclo de TCA disminuyeron en raíces de *flacca* como respuesta al estrés, incluidos α -oxoglutarato y succinato, aunque en las hojas algunos productos intermediarios sobreexpresados sugerían la activación de la glucólisis, ya que se acumularon productos intermediarios que participan en ésta directamente o indirectamente, como la ribulosa, ribosa, eritrosa, anhidro- β -D-glucosa, D-glucopiranososa y la gulosa en el caso de *flacca*. Mientras que, en AC, no se observó ninguna variación. Esto sugiere que la inundación del sustrato genera un mayor impacto en la glucólisis y en el ciclo de los TCA en *flacca*, indicando que dicho genotipo presenta mayor sensibilidad al encharcamiento que el genotipo silvestre AC y que una de las respuestas es la activación del metabolismo energético en los órganos aéreos, posiblemente para suplir con energía e intermediarios a los órganos sumergidos. En otros modelos experimentales y diferentes condiciones de estrés, Zandalinas *et al.*, (2016) propusieron que, en cítricos, la sobreacumulación de productos intermediarios implicados en la glucólisis y el TCA está relacionada con una mayor sensibilidad a la combinación de sequía y elevadas temperaturas.

La vía del glioxilato/dicarboxilato se modula o interviene de manera importante en *flacca*, ya que se acumula el ácido 3-oxalomálico en respuesta al estrés en tejidos fotosintéticos, con el objetivo de disipar el exceso de poder reductor y energía. Por lo

tanto, se previene la acumulación de ROS al mitigar así el estrés oxidativo en condiciones de estrés abiótico (Voss *et al.*, 2013).

La acumulación de aminoácidos, tanto en hojas como en raíces, podría estar asociada con el tipo de estrés aplicado. En el trabajo realizado se acumulan la tirosina, triptófano, histidina, lisina, asparragina, etc, además de algunos precursores de aminoácidos como la cistationina, hidroxitriptófano, ácido hidroxifenil propanoico y láctico, el ácido 3-indolpirúvico, 3-indoláctico, 3-indolacetaldehído, el ácido 3-hidroxifenil acético y 4-hidroxifenil pirúvico, interviniendo el último de ellos, en la síntesis de aminoácidos aromáticos (triptófano, tirosina y fenilalanina) y alifáticos (valina, alanina, leucina). La acumulación de aminoácidos y de precursores de éstos, sugiere que puede existir una respuesta proteolítica asociada al almacenamiento de sustratos para el metabolismo energético; por tanto, los aminoácidos acumulados en cada genotipo y en cada tejido vegetal difieren entre ellos. En este sentido, *flacca* presentó una mayor acumulación de aminoácidos que pueden generar intermediarios para la generación de energía y poder reductor en condiciones de estrés por encharcamiento del sustrato. Además, la acumulación de determinados compuestos nitrogenados se ha relacionado con el ajuste osmótico celular (Rizhsky *et al.*, 2004).

Los intermediarios de la ruta biosintética de los fenilpropanoides representan un flujo principal de carbono desde el metabolismo primario hasta el metabolismo secundario. Entre los metabolitos que presentaron alteraciones en respuesta a la inundación se identificaron el ácido sinápico y el coniferil aldehído, ambos derivados del ácido ferúlico, el ácido caféico y cafeoilquínico derivados, a su vez, del ácido cumárico. Éstos son precursores directos, entre otros compuestos con actividad protectora, de la síntesis de ligninas (figura 29), sugiriendo que una de las respuestas frente al encharcamiento del sustrato podría ser la lignificación de los tejidos como se ha sugerido en cítricos (Argamasilla *et al.*, 2014). Además, la intensidad de la lignificación se correlacionaría con la presión ejercida por el estrés y la sensibilidad relativa de la especie vegetal (Cabane *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012).

En general, los datos analizados indican que *flacca* es el genotipo más susceptible a las condiciones de inundación, ya que como se puede observar en las tablas 3 y 4 altera profundamente su metabolismo para hacer frente a los efectos perjudiciales causados por el encharcamiento del sustrato, activando la glucólisis, la ruta de las pentosas fosfato y la interconversión pentosas-glucuronato para suplir las necesidades energéticas celulares, así como el metabolismo de los fenilpropanoides estrechamente vinculado a la síntesis de ligninas y otros metabolitos secundarios con actividad protectora. Por tanto, en el genotipo AC las pocas modificaciones en el metabolismo primario observadas sugieren la existencia de otros mecanismos no metabólicos y dependientes de ABA que protegen a las plantas de tomate del daño ejercido por el encharcamiento del sustrato.

Los resultados obtenidos en este experimento no permiten de forma inequívoca relacionar la señalización dependiente de ABA con las respuestas biológicas observadas. Para ello, se requeriría un análisis profundo empleando más mutantes deficientes y un abordaje molecular. Además, otro aspecto interesante sería evaluar la interacción con otras hormonas como el JA o el propio etileno, cuyo análisis permitiría establecer la relación existente con la epinastia y la formación de raíces. Por otro lado, dado que no se ha logrado establecer una relación clara entre la producción de daño oxidativo (MDA) y las respuestas al estrés, una alternativa sería la evaluación de otras especies oxidantes como las RNS (Especies Reactivas de Nitrógeno) cuya implicación en las respuestas al estrés ha sido ampliamente documentada. No obstante, este estudio constituye una primera aproximación para la evaluación de la respuesta metabólica de los vegetales al encharcamiento del sustrato en relación con la deficiencia hormonal y la respuesta fisiológica. Como resultado, queda patente que la primera línea de defensa es de tipo fisiológico y está sujeta a una importante regulación hormonal. La inducción de cambios metabólicos estaría relacionada con la sensibilidad al estrés. El análisis no dirigido de los cambios metabólicos podría constituir una herramienta útil para la evaluación de la tolerancia en grandes colecciones de germoplasma vegetal.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

- 1) La deficiencia en ABA de *flacca* provoca un fenotipo de sensibilidad al encharcamiento del sustrato frente a Ailsa Craig, reflejado en la ausencia de cierre estomático y un descenso de la capacidad fotosintética.
- 2) Como consecuencia de la deficiencia en la capacidad de producción de ABA, *flacca* no presenta un cierre estomático efectivo en respuesta al encharcamiento y esto se correlaciona con un menor potencial hídrico foliar, como mecanismo para regular el balance hídrico.
- 3) Las diferencias en los niveles de potencial hídrico foliar entre los dos genotipos no está aparentemente relacionada con diferencias en los niveles de prolina foliar y radicular.
- 4) A pesar que Ailsa Craig presentó niveles superiores de daño oxidativo que *flacca*, la reducción de éstos en parte aérea en respuesta al encharcamiento del sustrato por parte de este genotipo indica que se produjeron cambios bioquímicos que redujeron la incidencia del estrés oxidativo, asociados en varias especies con la mayor tolerancia al estrés.
- 5) El comportamiento paralelo de los niveles de ABA y JA en raíces inundadas de ambos genotipos sugiere la interacción de dichas hormonas en la regulación de las respuestas radiculares al estrés por inundación.
- 6) La comparación de la respuesta metabólica observada en Ailsa Craig y *flacca* sugiere la existencia mecanismos no metabólicos dependientes de ABA que protegen a las plantas de tomate del daño ejercido por el encharcamiento del sustrato. La ausencia de esta regulación en *flacca* obligaría a este genotipo a inducir profundas modificaciones del metabolismo vegetal en respuesta al encharcamiento del sustrato.
- 7) A nivel metabólico, una de las respuestas de defensa es la activación del metabolismo energético en los órganos aéreos, posiblemente para suplir con energía a los órganos sumergidos y para inducir el metabolismo de los fenilpropanoides, estrechamente vinculados a la síntesis de ligninas y otros

6. CONCLUSIÓN

metabolitos secundarios con actividad protectora. Éste efecto es más acusado en el genotipo sensible.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Arbona, V., Zandalinas, S.I., Manzi, M., González-Guzmán, M., Rodríguez, P.L., Gómez-Cadenas, A., 2017. Depletion of abscisic acid levels in roots of flooded Carrizo citrange (*Poncirus trifoliata* L. Raf. x *Citrus sinensis* L. Osb.) plants is a stress-specific response associated to the differential expression of PYR/PYL/RCAR receptors. *Plant Mol. Biol.* 93: 623–640.
- Arbona, V., Argamasilla, R., Gómez-Cadenas, A. (2010) Common and divergent physiological, hormonal and metabolic responses of *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila* to water and salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 167, 1342–1350.
- Arbona, V., Flors, V., Jacas, J., García-Agustín, P., Gómez-Cadenas, A. (2003). Enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses of Carrizo citrange, a salt-sensitive citrus rootstock, to different levels of salinity. *Journal of Plant Cell Physiology*, 44, 388–394.
- Arbona, V., Gómez-Cadenas, A. (2008). Hormonal modulation of citrus responses to flooding. *J. Journal of Plant Growth Regulation*, 27, 241–250.
- Arbona, V., Hossain, Z., López-Climent, M. F., Pérez-Clemente, R. M., Gómez-Cadenas, A. (2008). Antioxidant enzymatic activity is linked to waterlogging stress tolerance in citrus. *Journal of Physiology Plant*, 132, 452–466.
- Arbona, V., López-climent, M. F., Pérez-Clemente, R. M., Gómez-cadenas, A. (2009) Maintenance of a high photosynthetic performance is linked to flooding tolerance in citrus. *Environmental and Experimental Botanical*, 66, 135–142.
- Argamasilla, R., Gómez-Cadenas, A., Arbona, V. (2014). Metabolic and regulatory responses in citrus rootstocks in response to adverse environmental conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*.
- Ashraf, M. (2003). Relationships between leaf gas exchange characteristics and growth of differently adapted populations of Blue panicgrass (*Panicum antidotale* Retz.) under salinity or waterlogging. *Plant Science*, 165, 69–75.

- Avila, C. A., Arévalo-Soliz, L. M., Jia, L., Navarre, D. A., Chen, Z., Howe, G. A., Meng, Q-W., Smith J. E., Goggin, F. L. (2012) Loss of function of Fatty acid desaturase7 in tomato enhances basal aphid resistance in a salicylate-dependent manner. *Journal of Plant Physiology*, 158, 2028–41.
- Azcón-Bieto, J., Talón, M. (2008). Fundamentos de Fisiología Vegetal. Capítulo 29: Fisiología de las plantas y el estrés. Interamericana-McGraw-Hill, Madrid, pp.557-597
- Bailey-Serres, J., Voeselek, L.A. (2008) Flooding stress: acclimations and genetic diversity. *Annual Review Plant Biology*, 59, 313-339.
- Balaguera, H. E., Álvarez-Herrera, J. G., Rodríguez, J. D. (2008). Effect of the water deficit on the transplant of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). *Agronomía Colombiana*, 26, 246–255.
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Annals of Botany*.
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., Martin-Tanguy, J. (1999). Polyamines and environmental challenges: recent development. *Journal of Plant Science*, 140, 103–125.
- Bray, E. A. (2007). Plant response to water-deficit stress. *Encyclopedia of Life Sciences*, 121–140.
- Cabane, M., Afif, D., Hawkins, S. (2012). Lignins and Abiotic Stresses. *Advances in Botanical Research*, 61, 219–262.
- Cheeseman, J. M. (2007). Hydrogen peroxide and plant stress: A challenger relationship. *Journal of Plant Stress*, 1, 4–15.
- Chmielewski, F. M., Muller, A., Bruns, E. (2004). Climate changes and trends in phenology of fruit trees and field crops in Germany, 1961-2000. *Journal of Agricultural Forest Meteorology*, 121, 69-78.
- Claussen, W. (2005). Proline as a measure of stress in tomato plants. *Journal of Plant Science*, 168,241–248.

- Colmer, T.D., Flowers, T.J. (2008). Flooding tolerance in halophytes. *New Phytologist*, 179, 964–974.
- Cuadros-Inostroza, A., Caldana, C., Redestig, H., Kusano, M., Lisec, J., Peña-Cortés, H. (2009). TargetSearch - a Bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data. *BMC Bioinformatics*. 10, 428.
- Daneshmand, F., Arvin, M. J., Kalantari, K. M. (2009). Effect of Acetylsalicylic Acid (Aspirin) on Salt and Osmotic Stress Tolerance in *Solanum bulbocastanum* in Vitro:Enzymatic Antioxidants. *American-Eurasian Journal Agricultural and Environmental Sciences*, 6, 92–99.
- De Ollas, C., Hernando, B., Arbona, V, Gómez-Cadenas, A. (2013). Jasmonic acid transient accumulation is needed for abscisic acid increase in citrus roots under drought stress conditions. *Journal of Physiologia Plantarum*, 147, 296–306.
- De Ollas, C., Manzi, M., Arbona, V. (2015). Interacciones hormonales en la respuesta frente al estrés abiótico. Revisión: Boletín de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarín, M. G., González, L., Tablada, M., Robledo, C. W. (2012). InfoStat. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Durgbanshi, A., Arbona, V., Pozo, O., Miersch, O., Sancho, J. V., Gómez-Cadenas, A. (2005). Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Agriculture Food Chem*, 53, 8437–8442.
- Else, M. A., Coupland, D., Dutton, L., Jackson, M. B. (2001). Decreased root hydraulic conductivity reduces leaf water potential, initiates stomatal closure and slows leaf expansion in flooded plants of castor oil (*Ricinus communis*) despite diminished delivery of ABA from the roots to shoots in xylem sap. *Journal of Physiologia Plantarum*, 111, 46–54.
- Else, M. A., Coupland, D., Dutton, L., Jackson, M. B. (2001). Decreased root hydraulic conductivity reduces leaf water potential, initiates stomatal closure and slows leaf

- expansion in flooded plants of castor oil (*Ricinus communis*) despite diminished delivery of ABA from the roots to shoots in xylem sap. *Physiologia Plantarum*, 111, 46–54.
- Else, M. A., Tiekstra, A.E., Croker, S.J., Davies, W.J., Jackson, M.B. (1995). Stomatal closure in flooded tomato plants involves ABA and a chemically unidentified anti-transpirant in xylem sap. *Journal of Physiologia Plantarum*, 112, 239–247.
- Evans, D. E. (2003). Aerenchyma formation. *Journal of New Phytology*, 161, 35–49.
- Eyidogan, F., Oz, M. T., Yucel, M., Oktem, H.A. (2012). Signal transduction of phytohormones under abiotic stresses. *Phytohormones and abiotic stress tolerance in plants*, eds, 1-48.
- Ezin, V., De La Pena, R., Ahanchede, A. (2010). Flooding tolerance of tomato genotypes during vegetative and reproductive stages. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 22, 131-142.
- FAO (2002). Food and Agriculture Organization of the United Nations. El cultivo protegido en clima mediterráneo. Disponible en Internet: <http://www.fao.org/3/a-s8630s.pdf>
- FAOSTAT. (2018): <http://faostat.fao.org>
- Fernie, A.R., Carrari, F. and Sweetlove, L.J. (2004). Respiratory metabolism: Glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 254–261.
- Geigenberger, P. (2003). Response of plant metabolism to too little oxygen. *Current Opinion in Plant Biology*. Elsevier Ltd.
- Hernández, N. (2014). El estrés en plantas. Universidad Complutense de Madrid. España.
- Horchani, F., Aloui, A., Brouquisse, R., Aschi-Smiti, S. (2008). Physiological responses of tomato plants (*Solanum lycopersicum*) as affected by root hypoxia. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194, 297–303.

- Hossain, Z., López-Climent, M. F., Arbona, V., Pérez-Clemente, R. M., Gómez-Cadenas, A. (2009). Modulation of the antioxidant system in citrus under waterlogging and subsequent drainage. *Journal of Plant Physiology*, 166, 1391–1404.
- Hsu, F. C., Chou, M. Y., Peng, H. P., Chou, S. J., Shih, M. C. (2011). Insights into hypoxic systemic responses based on analyses of transcriptional regulation in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*, 6.
- Hsu, Y., Tseng, M., Lin, C. (1999). The fluctuation of carbohydrates and nitrogen compounds in flooded wax-apple trees. *Botanical Bulletin of Academia*, 40, 193–198.
- Hunt, B. G., Elliott, T. (2002). Mexican mega drought. *Climate Dynamics* (Alemania).
- Idrees, M., Naeem, M., Aftab, T., Khan, M. M. A., Moinuddin. (2011). Salicylic acid mitigates salinity stress by improving antioxidant defence system and enhances vincristine and vinblastine alkaloids production in periwinkle [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 987–999.
- Imber, D., Tal, M. (1970). Phenotypic reversion of *flacca*, a wilted mutant of tomato, by abscisic acid. *Science*, 169, 592–593.
- Islam, M. A., Macdonald, S. E. (2004). Ecophysiological adaptations of black spruce (*Picea mariana*) and tamarack (*Larix laricina*) seedlings to flooding. *Trees - Structure and Function*, 18, 35–42.
- Jackson, M. B. (1985). Ethylene and responses of plants to soil waterlogging and submergence. *Annual Review of Plant Biology*, 36, 145–174.
- Jackson, M. B., Colmer, T. D. (2005). Response and adaptation by plants to flooding stress. *Annals of Botany*.
- Koornneef, A., Pieterse, C. M. J. (2008). Cross talk in defense signaling. *Journal of Plant Physiology*, 146, 839–844.
- Koppitz, H. (2004). Effects of flooding on the amino acid and carbohydrate patterns of *Phragmites australis*. *Journal of Limnologia*, 34, 37-47

- Koussevitzky, S., Suzuki, N., Huntington, S., Armijo, L., Sha, W., Cortes, D., Shulaev, V., Mittler, R. (2008). Ascorbate peroxidase plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. *Journal of Biology Chemistry*, 283, 34197–34203.
- Kozlowski, T. T. (1997). Responses of woody plants to flooding and salinity. *Tree Physiology*, 17, 490–490.
- Krasensky, J., Jonak, C. (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, 63, 1593–1608.
- Lambers, H., Stuart-Chapin III, F., Pons, T.L. (1998). *Plant physiological Ecology*. Preinger-Verlag, New York.
- Li, Z., Peng, Y., Ma, X. (2013). Different response on drought tolerance and post-drought recovery between the small-leafed and the large-leafed white clover (*Trifolium repens* L.) associated with antioxidative enzyme protection and lignin metabolism. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 213–222.
- Lin, K. H., Chao, P. Y., Yang, C. M., Cheng, W. C., Lo, H. F., Chang, T. R. (2006). The effects of flooding and drought stresses on the antioxidant constituents in sweet potato leaves. *Botanical Studies*, 47, 417–426.
- Lin, K. H., Chiou, Y. K., Hwang, S. Y., Chen, L. F. O., Lo, H. F. (2008). Calcium chloride enhances the antioxidative system of sweet potato (*Ipomoea batatas*) under flooding stress. *Annals of Applied Biology*. 152, 157–168
- Maestri, E., Klueva, N., Perrotta, C., Gulli, M., Nguyen, H. T., Marmioli, N. (2002). Molecular genetics of heat tolerance and heat shock proteins in cereals. *Plant Molecular Biology*. 48, 667–681.
- Marin, A., Marion-Poll, A. (1997). Tomato *flacca* mutant is impaired in ABA aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase activities. *Plant Physiology Biochemistry*, 35, 369–372.

- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance Review. *Trends in Plant Science* 7, 405-410.
- Molinari, H. B. C., Marur, C. J., Filho, J. C. B., Kobayashi, A. K., Pileggi, M., Júnior, R. P. L., Pereira, L. F. P., Vieira, L. G. E. (2004). Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. *Journal of Plant Science*, 167, 1375-1381.
- Morgan, J. M. (1992). Adaptation to water deficits in three grain legume species. Mechanisms of turgor maintenance. *Field Crops Research*, 29, 91–106.
- Nahar, K., Gretzmacher, R. (2011). Response of shoot and root development of seven tomato cultivars in hydroponic system under water stress. *Academic Journal of Plant Sciences*, 4, 57–63.
- Pál, M., Kovács, V., Szalai, G., Soós, V., Ma, X., Liu, H., Mei, H., Janda, T. (2013). Salicylic acid and abiotic stress responses in rice. *Journal of Agronomy and Crop Science*.
- Parry, A. D., Neill, S. J., Horgan, R. (1988). Xanthoxin levels and metabolism in the wildtype and wilted mutants of tomato. *Planta*, 173, 397–404.
- Patil, J. R., Chidambara Murthy, K. N., Jayaprakasha, G. K., Chetti, M. B., Patil, B. S. (2009). Bioactive compounds from Mexican lime (*Citrus aurantifolia*) juice induce apoptosis in human pancreatic cells. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 57, 10933–10942.
- Peleg, Z., Blumwald, E. (2011). Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology*
- Perez, O., J. M. Dell'Amica e I. Reynaldo. (1999). Performance of tomato seedlings under soil flooding. *Cultivos Tropicales*, 20, 41–44.
- Phung, H. T., Knipling, E. B. (1976). Photosynthesis and transpiration of citrus seedlings under flooded conditions. *HortScience*, 11, 131–133.
- Pozo, M. J., Van Loon, L. C., Pierse, C. M. J. (2005). Jasmonates–signals in plantmicrobe interactions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 23, 211–222.

- Rizhsky, L., Liang, H., Mittler, R. (2002). The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Journal of Plant Physiology*, 130, 1143–1151.
- Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., Mittler, R. (2004). When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Journal of Plant Physiology*, 134, 1683–1696.
- Rojo, E., Solano, R., Sánchez-Serrano, J. J. (2003). Interactions between signalling compounds involved in plant defense. *Journal of Plant Growth Regulation*, 22, 82–98.
- Ruiz-Sánchez, M. C., Domingo, R., Morales, D., Torrecillas, A. (1996). Water relations of Fino lemon plants on two rootstocks under flooded conditions. *Journal of Plant Science*, 120, 119-125.
- Sagi, M., Fluhr, R., Lips, S. H. (1999). Aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in a *flacca* tomato mutant with deficient abscisic acid and wilted phenotype. *Journal of Plant physiology*, 120, 571–578
- Sagi, M., Omarov, R.T., Lips, S.H. (1998). The Mo-hydroxylases xanthine dehydrogenase and aldehyde oxidase in ryegrass as affected by nitrogen and salinity. *Plant Science*, 135, 125–135
- Sagi, M., Scazzocchio, C., Fluhr, R. (2002). The absence of molybdenum cofactor sulfuration is the primary cause of the *flacca* phenotype in tomato plants. *Plant Journal*, 31, 305–17.
- Saika, H., Okamoto, M., Miyoshi, K., Kushiro, T., Shinoda, S., Jikumaru, Y., Fujimoto, M., Arikawa, T., Takahashi, H., Ando, M., Arimura, S. I., Miyao, A., Hirochika, H., Kamiya, Y., Tsutsumi, N., Nambara, E., Nakazono, M. (2007). Ethylene promotes submergence-induced expression of OsABA8ox1, a gene that encodes ABA 8'-hydroxylase in rice. *Plant Cell Physiology*, 48, 287–298.
- Sairam, R. K., Dharmar, K., Chinnusamy, V., R. C. Meena. (2008). Waterlogging-induced increase in sugar mobilization, fermentation, and related gene expression

- in the roots of mung bean (*Vigna radiata*). *Journal of Plant Physiology*, 166, 602-616
- Schaffer, B., Davies, F. S., Crane, J. H. (2006). Responses of subtropical and tropical fruit trees to flooding in calcareous soil. In *HortScience*, 549–555.
- Schaller, F., Schaller, A., Stintzi, A. (2005). Biosynthesis and metabolism of jasmonates. *Journal of Plant Growth Regulation*, 23, 179-199.
- Schaller, F., Zerbe, P., Reinbothe, S., Reinbothe, C., Hofmann, E. (2008). The allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana* - localization and cyclization. *The Federation of European Biochemical Societies (FEBS) journal*, 275, 2428–2441.
- Scholander, P., Hammel, H., Bradstreet, E. Y., Hemmingsen, E. (1965). Sap pressure in vascular plants. *Journal of Science*, 37, 247–274.
- Schulze, E. D. (1988). Adaptation mechanisms of non-cultivated arid-zone plants: Useful lessons for agriculture. En: Bidinger, F.R.; Johansen, C., edit. Drought research priorities for the dryland tropics. ICRISAT, Patancheru, India.
- Schwartz, S. H., Tan, B. C., Gage, D.A., Zeevaart, J. A. D., McCarty, D. R. (1997). Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Journal of Science*, 276, 1872–1874.
- Smith, C. a, Want, E. J., O’Maille, G., Abagyan, R., Siuzdak, G. (2006). XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Journal of Analytical Chemistry*, 78, 779–787.
- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J. y Farmer, E. E. (2001). Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 12837– 42.
- Striker, G.G. (2008). Visiting the methodological aspects of flooding experiments: Quantitative evidence from agricultural and ecophysiological studies. *Journal of Agronomy & Crop Science*, 194, 249–255.

- Taiz, L., Zeiger, E. (2006). Fisiología Vegetal. Vol 2. Colección “Ciències experimentals” Universitat Jaume I.
- Taki, N., Sasaki Sekimoto, Y., Obayashi, T., Kikuta, A., Kobayashi, K. (2005). 12-oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology*, 139, 1268–1283.
- Tal, M. (1966). Abnormal stomatal behavior in wilted mutants of tomato. *Plant Physiology*, 41, 1387–1391.
- Tang, W., Newton, R. J. (2005). Polyamines reduce salt-induced oxidative damage by increasing the activities of antioxidant enzymes and decreasing lipid peroxidation in Virginia pine. *Journal of Plant Growth Regulation*, 46, 31–43.
- Taylor, I. B., Linforth, R. S. T., Al-Nieb, R. J., Bowman, W.R., Marples, B. A. (1988). The wilted tomato mutants *flacca* and *sitiens* are impaired in the oxidation of ABA-aldehyde to ABA. *Plant Cell Environmental*, 11, 739–745.
- Timasheff, S. N., Arakawa, T. (1989). Stabilization of protein structure by solvents. In Protein Structure: A Practical Approach (Creighton, T.E., ed.), IRL Press, Oxford.
- Turner, N. C., M. M. Jones. (1980). Turgor maintenance by osmotic adjustment: a review and evaluation. In: N.C. Turner and P.J. Kramer (eds.). Adaptation of plants to water and high temperature stress. *Journal of Wiley Interscience*, New York.
- Umebese, C. E., Olatimilehin T. O., Ogunsusi, T. A. (2009). Salicylic acid protects nitrate reductase activity, growth and proline in amaranth and tomato plants during water deficit. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 4, 224–229.
- Vendruscolo, E. C. G., Schuster, I., Pileggi, M., Scapim, C. A., Molinari, H. B. C., Marur, C. J., Vieira, L. G. E. (2007). Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *Journal of Plant Physiology*, 164, 1367–1376.
- Verma, K.K. (2009). Effect of waterlogging on plant growth physiological, biochemical and biomass characteristics in *Jatropha curcas*. Ph.D. Thesis, Department of Botany, University of Lucknow.

- Verma, K.K., Singh, M. (2018). Flooding stress in a changing environment. *Asian Journal of Botany, Vol I*.
- Vidoz, M. L., Loreti, E., Mensuali, A., Alpi, A., Perata, P. (2010). Hormonal interplay during adventitious root formation in flooded tomato plants. *Plant Journal*, 63, 551–562.
- Voss, I., Sunil, B., Scheibe, R., Raghavendra, A. S. (2013). Emerging concept for the role of photorespiration as an important part of abiotic stress response. *Journal of Plant Biology*, 15, 713–722.
- Walther, G.R. (2010). Plants in a warmer world. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 6, 169-185.
- Wasternack, C. (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany*, 100, 681–697.
- Yin, D., Chen, S., Chen, F., Guan, Z., Fang, W. (2010). Morpho-anatomical and physiological responses of two *Dendranthema* species to waterlogging. *Environmental and Experimental Botany*, 68, 122–130.
- Zandalinas, S. I., Rivero, R. M., Martínez, V., Gómez-Cadenas, A., Arbona, V. (2016). Tolerance of citrus plants to the combination of high temperatures and drought is associated to the increase in transpiration modulated by a reduction in abscisic acid levels. *BMC Plant Biology*, 16, 105.
- Zhao, J., Davis, L. C., Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Journal of Biotechnology Advances*, 23, 283–333.

