



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Biosíntesi, distribució, acumulació i funció de la vitamina E en llavors: mecanismes de control

Laura Siles Suárez



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

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

This doctoral thesis is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0. Spain License.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Barcelona, febrer de 2017

Biosíntesi, distribució, acumulació i funció de la vitamina E en llavors: mecanismes de control

Memòria presentada per Laura Siles Suarez per a optar al grau de Doctora per la
Universitat de Barcelona.

Aquest treball s'emmarca dins el programa de doctorat de BIOLOGIA VEGETAL
del Departament de Biologia Evolutiva, Ecologia i Ciències Ambientals (BEECA)
de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona.

El present treball ha estat realitzat al Departament de Biologia Evolutiva, Ecologia
i Ciències Ambientals de la Facultat de Biologia (BEECA) de la Universitat de
Barcelona sota la direcció de la Dra. Leonor Alegre Batlle i el Dr. Sergi Munné
Bosch.

Doctoranda: Directora i Codirector de Tesi: Tutora de Tesi:

Laura Siles Suarez Dra. Leonor Alegre Batlle Dra. Leonor Alegre Batlle

Dr. Sergi Munné Bosch

“Mira profundamente en la naturaleza y entonces comprenderás todo mejor”-
Albert Einstein.

“La creación de mil bosques está en una bellota”-Ralph Waldo Emerson.

A mi familia, por apoyarme siempre,
y a mis bichejos peludos

ÍNDIX

AGRAÏMENTS	<i>i</i>
ABREVIATURES	<i>v</i>
INTRODUCCIÓ GENERAL	1
1. Vitamina E	3
1.1. Descobriment i estudi	3
1.2. Estructura química i classes	3
2. Distribució de la vitamina E	5
3. Biosíntesi de vitamina E	6
3.1. Ruta biosintètica	7
3.2. Regulació hormonal	12
3.3. Regulació redox	18
4. Acumulació de la vitamina E	20
5. Funcions de la vitamina E	24
6. Models d'estudi	29
6.1. Família Arecaceae i <i>Chamaerops humilis</i>	29
6.2. <i>Cistus albidus</i>	32
OBJECTIUS	35
INFORME DELS DIRECTORS DE TESI SOBRE L'IMPACTE DELS ARTICLES PUBLICATS I LA PARTICIPACIÓ DE LA DOCTORANDA	39
RESULTATS	45
Capítol 1: L'anàlisi de vitamina E en llavors revela un presència dominant de tocotrienols enfront tocoferols a la família Arecaceae	47
Capítol 2: Augments dels continguts de tocoferols durant els primers estadis de germinació en llavors de <i>Chamaerops humilis</i> var. <i>humilis</i>	67
Capítol 3: Eternament joves: la producció i qualitat de llavors en poblacions controlades i naturals de <i>Cistus albidus</i> revelen un mecanisme compensatori que prevé la senescència en termes de producció i viabilitat de llavors	85

Capítol 4: Diferències marcades en la dormició de llavors en dues poblacions de l'arbust mediterrani, *Cistus albidus* L. **109**

DISCUSSIÓ **125**

1. Distribució de la vitamina E en llavors al llarg de l'evolució **127**

2. Acumulació de vitamina E en llavors: influència de l'edat de la planta mare i l'ambient **130**

3. Funció de la vitamina E en llavors **135**

3.1. Emmagatzematge i quiescència **135**

3.2. Dormició i germinació **140**

4. Regulació de la biosíntesi de vitamina E **143**

4.1. Regulació transcripcional **143**

4.2. Regulació hormonal **146**

4.3. Regulació redox **149**

5. La vitamina E com a antioxidant i molècula reguladora en llavors **151**

CONCLUSIONS **153**

BIBLIOGRAFIA **157**

APÈNDIX I **183**

APÈNDIX II **191**

AGRAÏMENTS

Per fi ha arribat el moment que pensava que mai arribaria: després de 4 anys (i mig) puc escriure els agraïments de la tesi!!!! 4 anys, ni més ni menys, que no són pocs. Sembla mentida que no faci tant que era una alumna perduda per les diferents aules de la facultat (no sempre fàcils de trobar) sense saber què fer i sempre interessada per diferents temes. Tota aquesta dedicació i esforç no haguessin sigut possibles sense el suport de moltes persones, i per això, us ho vull agrair.

Suposo que la meua història comença agraint als meus profes de Biologia i Física del batxillerat, Martí i Emilio, per incentivar-me el "bichillo" de la curiositat científica. Gràcies al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte per donar-me la oportunitat de "pul·lular" per un laboratori "de veritat" quan encara estava estudiant i de realitzar aquesta tesi. Agrair-li també tots els mals de caps que genera la paperassa de la FPU! Sense els *handicaps* burocràtics la tesi no hagués estat tan entretinguda. Però sobretot gràcies a vosaltres, Sergi i Henar! Sergi, crec que l'any que vas entrar en aquella classe arrossegant una planta gegant i fent preguntes rares com si les plantes parlen entre elles, vas fer "pleno"! No només vas despertar la curiositat de la Marteta, la Mel i el Xavi (que per cert, no era conscient que estàvem tots a la mateixa classe), sinó també la meua. Gràcies per transmetre'ns la teua passió per les plantes i fer-nos pensar. Gràcies per permetre que em "llencés a la piscina" amb la incertesa del què passaria després, i per haver començat aquesta aventura envoltada de *Cistus*, excursions a Montserrat mig perduts sense trobar el funicular a ple Juliol i llavors inacabables. Gràcies per estar sempre allà, per a qualsevol dubte i inquietud, per ser un jefe "molón" que t'anima (i que també t'estressa una mica, tot s'ha de dir jeje), que et fa pensar que pots fer coses impossibles i que no importen les hores que s'hi dediquin per a aconseguir-ho. Gràcies per estar a prop i sentir que podia comptar amb tu tot i estar a molts km de distància així com per preocupar-te per mi, tant personal com professionalment. Deu ser per alguna cosa que "estos del Munné" estan sempre al peu del canó! I tu, Henar, simplement gràcies per ser tu! Per tots els riures, pels viatges al Delta amb la "sombrella" del sol que sempre sortia volant donant igual el que féssim per evitar-ho i per quedar-nos enfonsades al fang fins als genolls buscant *Cymodocea*. Sense dubte, els viatges no haguessin sigut ni tan divertits ni esbojarrats si no hi haguessis estat. Gràcies per haver sigut la meua directora, per escoltar-me, aconsellar-me, recolzar-me i ensenyar-me, no només microscopia i fisiologia, sinó també, de la vida. Perquè les xerrades improvisades de camí al lab i els ànims que sempre em dones alegren el dia a qualsevol. Ens queda pendent fer un arrosset al Delta després d'anar a mirar ocells per celebrar que, per fi, he defensat la tesi. Vosaltres dos formeu l'equip de directors més divertit i contrastat que mai m'hagués arribat a imaginar que podria tenir. Moltes gràcies a tots dos per la confiança que heu depositat en mi en tot moment.

Agraïments

Tota aquesta aventura no hagués sigut tan especial sense els personatges que he anat coneixent al llarg d'aquest temps, tant amb els qui vaig poder coincidir una temporada com aquells amb els qui convisc més el dia a dia. Jana, moltes gràcies per agafar-me de la maneta i ensenyar-me de què anava això de la ciència. Gràcies per ensenyar-me la teva habilitat gairebé màgica per parlar amb les abelles i evitar que ens piquessin entre els gats i les llagostes que habitaven als *Cistus*, així com per presentar-me al nostre amic Jasco i insistir que a les 5 havia de marxar a casa, ja saps que els bons costums són els primers que es perden. Marteta, la meva rubia preferida! Estic molt agraïda d'haver pogut compartir l'inici de la meva tesi amb tu. Les teves bromes, la teva alegria i les teves frases tan encertades en tot moment, així com tus "pero bueno!!!" i "bon dia!!!" em treien el mal humor provocat pels retards de la "ten fe", que em feien arribar 1 hora més tard. I què he de dir de la Laia, que tenia solucions per a tot, i que a ritme de Justin Timberlake em va ensenyar que a partir de les 5 el departa "es la Ciudad sin ley".

Pero especialmente quiero agradecerle a ti, Veruchi, el estar siempre a mi lado (y aguantarme, obviously). Evidentemente, esto no hubiese sido lo mismo sin ti. Resultaste ser no solo una "ayudante" excelente (no haré comentarios sobre lo de contar...) sino también una gran amiga. Ni la fabricación de tropecientas bolsas con la máquina de coser, los muestreos de 12 horas ni la trituración de semillas hubiesen sido lo mismo sin nuestros ataques de risa (¡jardilla!). Solo alguien que se asusta de un saltamontes puede sentir la misma emoción y soltar un grito al encontrar un embrión entre sierras y martillos. Ánimos, curranta, ¡que te queda poco! ¡Saca esa alma de negra que llevas dentro y acaba con esas cerecitas!

La resta de l'equip ANTIOX no es queda enrere, però. Gracias Melanina no solo por asustarte en los momentos más inesperados y ser medio bruja, sino por tu alegría y tu lado siempre optimista de ver las cosas (¡Cristian!). Gracias Iker, no solo por saberlo todo sino que gracias a ti entendí al fin las dichosas diluciones!! Moltes gràcies Maren per la teva paciència infinita i per fer petar la xerrada mentre filtrem mostres. Com no, moltes gràcies Cubri per les nostres guerres de cadires. Agradecer también a Bárbara, por tu forma ideal y maravillosa de ver todo lo que se planta ante ti, así como tu incansable espíritu de hacer cosas, y a Eva, por tu visión a cámara rápida y revolucionaria de la vida. Gràcies Erola, pel teu esperit musical i la teva visió més ecòloga del món. No desesperis que tens temps de sobra, dona! A l'Alba, per cuidar de les meves plantuchis i fomentar la meva gula. Gràcies als teus remeis amb herbes no he caigut malalta. Agrair també a la Paula, que simplement m'encanta, ets una risa! Ja saps que pots comptar amb mi per les chorrromil coses que vulguis. Moltes gràcies Tana per ser tan autèntica, se'ns dubte t'he trobat molt a faltar, y muchas gracias a mis brasileñas favoritas: Dani (xuuuuuuu), Leilane y Elisa, por endulzarme la vida con deliciosos brigadeiros y vuestro ritmo a base de samba y forró.

Les hores de dinar no haguessin sigut el mateix si no fossin pel Jordi, que sempre estava de broma, l'Edu, el Xavier Serrat i els seus tappers, la Rut, la Susan i el Rubén. Gràcies a la Marta Pintó per descobrir-me el Santa Burg. Com no, agrair a la Carme Cañueto i a l'Esther, no només perquè em salveu sempre que ho necessito, sinó per omplir el departament amb una mica d'alegria! Los experimentos no hubiesen sido lo mismo sin tu ayuda Ricardo, siempre dispuesto a dejarme un martillo o un tornillo de banco para pelearme con mis semillitas. Gràcies Josep, per fer-nos replantejar els experiments i intentar millorar-los. Gràcies Esther, per fer-nos la vida més fàcil amb el Jasco i estar sempre tan atenta.

Y qué hubiera hecho yo sin Ari y Daniela. ¡Mi estancia no hubiese sido lo mismo sin vosotras! Ari, nunca pensé que podría encontrar a alguien tan parecido a mí en la otra punta del mundo, ¡en Lincoln teníamos que coincidir! Gracias chicas por nuestros viajes, tardes de películas, viajes al mall, aventuras en autobús a -20°C, risas en el laboratorio y juegos en la nieve. I want also to thank all the people I met there: Athen; for our English lessons and bugs in the gels; Pernilla, the crazy Swedish girl; Chad, Cristian, Jesús, Evans, Ray, Hardick and Mariela, you guys are the best. But I want to especially thank Dr. Cahoon, not only for giving me the opportunity of going to your lab, thanks for being so kind with me. I learned and enjoyed a lot during my stay in Lincoln and I liked to be one of the two "special" girls. Thanks Becky for all your help and for taking me to the cat shelter, I really appreciated it. Thanks Tara and Hae Jin for teaching me and answer all my questions, you were my saviors.

Moltes gràcies Marta, Irene, Siria, Ramón, Xavi (Coll), Laura, Carlos i Marc per fer-me desconnectar de "esto de la tesis". Ens queden moltes coses pendents per fer, i les farem! Prometo no desaparèixer més. Y a ti Marc, te iremos a ver a NY.

Gracias a mi familia por apoyarme siempre y creer que soy la mejor en todo. Muchas gracias por creer en mí y pensar que soy capaz de hacer todo lo que me proponga, siempre bajo el lema del "tú vales mucho". Muchas gracias por estar siempre ahí aun sin entender muy bien que es lo que hago o que es eso de "un paper". Sin vuestro apoyo no hubiese llegado tan lejos. Y sobre todo, gracias mama, por escucharme siempre que te hablaba de proteínas, plantas, bacterias... sin bostezar ni una sola vez.

Hook, aunque esta aventura la empezamos juntos, la he acabado sola. Gracias por hacerme ver la vida de otra manera, pequeñín. Gracias Neula por tus ronroneos y por tus duras críticas de edición de tesis, creo que ayudaste a escribir alguna frase rara de las mías mientras te paseabas por el teclado del portátil. Y como no a Chufi, tú sí que no entiendes porque no puedo estar jugando todo el día con lo mona que eres (¿¿¿jugamos, jugamos, jugamos?!?!).

Agraïments

I bé, qui ens anava a dir que anéssim a acabar així...aquell noi que em posava tan nerviosa i que no em deixava mai fer servir la balança, la pipeta, la centrífuga... perquè l'anava a fer servir de seguida (mentira, ¡¡y lo sabes!!). Què et puc dir que no sàpigues ja, si estem les 24 hores junts i que ni 8 hores de diferència horària ens poden separar. Moltes gràcies pel teu esperit crític, per ensenyar-me a tenir una visió més relaxada de la vida, per la teva paciència infinita però sobretot, pel teu suport (la veritat és que els pastelitos dolços que em portes estan boníssims!). Saps que aquesta última etapa no hagués sigut el mateix sense tu, moltes gràcies, de veritat.

Sense el suport de tots vosaltres, no hagués pogut amb la tesi. Per això i molt més, **MOLTES GRÀCIES A TOTS!**

ABREVIATURES

$^1\text{O}_2$	Singlet d'oxigen	LOOH	Hidroperòxids lipídics
2-iP	2-isopentenil adenina	MDA	Àcid malondialdehid
γ-TMT	γ -tocoferol metiltransferasa	MeJA	Metil jasmonat
ABA	Àcid abscísic	MGGBQ	2-metil-6-geranil-geranilbenzoquinol
ABRE	Elements de resposta a l'ABA	MPBQ	2-metil-6-fitilbenzoquinol
ACC	Àcid 1-aminociclopropà-1-carboxílic	MPBQ MT	2-metil-6-fitilbenzoquinol metiltransferasa
DMPBQ	2,3-dimetil-6-fitilbenzoquinol	O_2^-	Radical superòxid
DMGGBQ	2,3-dimetil-6-geranilgeranilbenzoquinol	OPDA	Àcid 12-oxofitodienoic
GAs	Gibberel·lines	PDP	Fitil difosfat
GGDP	Geranilgeranil difosfat	PrBQMT	Prenilbenzoquinol metiltransferasa
GGR	Geranilgeranil reductasa	PUFA	Àcids grassos poliinsaturats
HGA	Àcid homogentísic	ROS	Espècies reactives de l'oxigen
HO^-	Radical hidroxil	SA	Àcid salicílic
H_2O_2	Peròxid d'hidrogen	SAM	S-adenosil-metionina
HPP	<i>p</i> -hidroxifenilpiruvat	TAT	Tirosina aminotransferasa
HPPD	Hidroxifenilpiruvat dioxigenasa	TC	Tocoferol/tocotrienol ciclase
HGGT	Homogentisat geranilgeraniltransferasa	TMT	Tocoferol/tocotrienol metiltransferasa
HPT	Homogentisat fitiltransferasa		
IAA	Àcid indol-3-acètic		
JA	Àcid jasmònic		
LOO^-	Radicals lipídics peroxil		



INTRODUCCIÓ GENERAL

INTRODUCCIÓ GENERAL

1. Vitamina E

1.1. Descobriment i estudi

L'any 1922, el Dr. Herbert McLean Evans i la Dra. Katharine Scott Bishop van descobrir un factor essencial en la dieta de ratolins que influenciava la fecundació. Sense aquest, els ratolins eren estèrils, no obstant, la fertilitat es podia restablir si a la dieta s'incloïen fulles d'enciam o fulles seques d'alfals, fet que els va fer pensar que es tractava d'algun tipus de vitamina. Al descartar les vitamines A, B i C com a responsables, van denominar aquest factor dietari com a "X" (Evans & Bishop, 1922), i no va ser fins l'any 1925 que el van anomenar vitamina E (Combs, 2012). L'any 1936 es va aïllar aquesta vitamina per primer cop a partir de l'oli del germen del blat, proposant el nom d' α -tocoferol (Evans *et al.*, 1936), el qual prové de les paraules gregues *tókos*, que significa "donar a llum", i *phérein*, "per fer néixer"; i el sufix -ol es va afegir per indicar la seva natura alcoholica. El 1938 es va elucidar la seva estructura i es va sintetitzar per primer cop (Fernholz, 1938; Karrer *et al.*, 1938) però no va ser fins al 1966 que es va associar amb una propietat antioxidant (Epstein *et al.*, 1966). Des de llavors s'ha estudiat àmpliament el paper d'aquesta vitamina en humans i animals, la qual té una funció important en la salut. Entre d'altres, la vitamina E redueix els nivells de colesterol (Qureshi *et al.*, 1986), inhibeix el creixement de cèl·lules cancerígenes i prevé malalties cardiovasculars (Lumpur, 1999; Pryor, 2000). Posteriorment es va començar a estudiar la funció d'aquesta vitamina a les plantes. Tot i que en aquest organismes no és un factor dietari, s'ha mantingut el terme de vitamina E.

1.2. Estructura química i classes

L'estructura química fonamental de la vitamina E, així com les seves propietats antioxidants, van ser estudiades per Kamal-Eldin & Appelqvist (1996). La vitamina E es divideix en dos grups, els tocoferols i els tocotrienols. Tots ells són molècules lipídiques amfipàtiques que comparteixen una estructura bàsica comuna, que consisteix en un cap cromanol polar, format per un anell fenòlic i un

Introducció

d'heterocíclic, i una cua poliprenil hidrofòbica de 13 carbonis. Ambdues formes de vitamina E es diferencien, en l'estat de saturació de la cadena isoprenoide. Mentre que els tocoferols es caracteritzen per tenir la cua totalment saturada derivada del fitil difosfat (PDP, sigles provinents de l'anglès per a *phytyl diphosphate*), la cua dels tocotrienols disposa de tres dobles enllaços (*trans*) a les posicions 3', 7' i 11' que deriva del geranilgeranil difosfat (GGDP, sigles provinents de l'anglès per a *geranylgeranyl diphosphate*). L'adquisició de dobles enllaços genera diferents estructures d'aquestes cadenes: mentre la cua dels tocoferols és lineal, la dels tocotrienols no ho és degut a que en la cadena insaturada no hi ha una rotació lliure de la unió C-C. Segons el número i la posició del grup metil al cap cromanol, es diferencien 4 homòlegs: α -, β -, γ - i δ - (**Figura 1**). La forma α disposa de tres grups metil al cap cromanol, les formes β i γ en tenen dos en diferents posicions, mentre que la forma δ en disposa d'un. Les diferències estructurals entre els diferents homòlegs, com el grau de metilació o el grau de saturació de les cadenes, confereixen propietats fisicoquímiques diferents, conferint diferents distribucions a la membrana lipídica i diferents capacitats antioxidants, les quals s'expliquen a **l'apartat 5 (Funcions de la vitamina E)**.

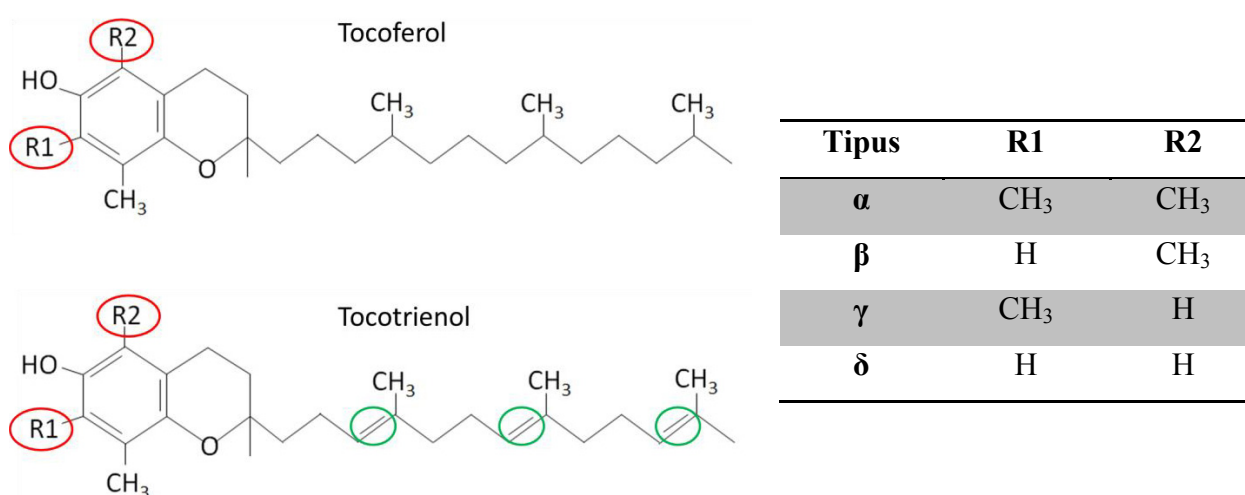


Figura 1. Estructura química dels tocoferols i dels tocotrienols. El número i la posició dels grups metil a l'anell cromanol, i per tant el corresponent homòleg, es troben indicats a la taula i estan encerclats en vermell a la figura. Les diferències estructurals es troben encerclades en verd.

2. Distribució de la vitamina E

Tot i que ambdues formes de vitamina E estan presents als organismes fotosintètics, la distribució de la vitamina E al regne vegetal és heterogènia. Mentre que els tocoferols són constituents universals de les plantes vasculars (Threfall & Whistance, 1971a); tot i que també estan presents a algues, fongs, molses i a alguns cianobacteris (Lichtenthaler, 1968); els tocotrienols mostren una distribució més restringida, trobant-se només presents en certes famílies d'espècies vegetals (Falk & Munné-Bosch, 2010).

En les angiospermes, i en concret en les monocotiledònies, s'ha detectat tocotrienols als ordres Arecales, Poales i Bromeliales. Aquests també s'han detectat en algunes famílies d'espècies dicotiledònies no molt relacionades entre si, distribuïnt-se als ordres Ranunculales, Proteales, Caryophyllales, Polygonales, Saxifragales, Myrtales, Celastrales, Malpighiales, Fabales, Rosales, Rhamnales, Curcubitales, Brassicales, Malvales, Sapindales, Ericales, Gentianales, Lamiales, Solanales, Apiales i Asterales. En quan a les gimnospermes, s'han trobat tocotrienols a *Juniperus communis*, *Pinus pinea*, *P. sylvestris* i a *Picea* sp, pertanyents a l'ordre Pinales; i a *Gnetum* sp., de l'ordre Gnetales (Horvath *et al.*, 2006a; Falk & Munné-Bosch, 2010).

Així doncs, sembla que els tocotrienols estan distribuïts en un petit grup de famílies vegetals degut a la seva presència puntual en les gimnospermes i la seva específica distribució entre diferents ordres de dicotiledònies. Tot i així, a les espècies monocotiledònies els tocotrienols es distribueixen preferentment en les Arecales i Poales, ordres molt propers l'un de l'altre que pertanyen, juntament amb les Bromeliales, a la subclasse Commelinidae. Aquesta preferent distribució en aquests dos ordres, juntament amb la falta d'un patró taxonòmic clar entre les espècies de dicotiledònies, suggereix que la síntesi de tocotrienols ha evolucionat de manera independent en algunes famílies (Horvath *et al.*, 2006a). Tot i així, no s'ha de descartar la presència de tocotrienols en diferents ordres o famílies encara no estudiats.

El fet pel qual els tocoferols es troben distribuïts a totes les famílies vegetals i els tocotrienols no, és una qüestió no resolta. Una possible explicació podria estar relacionada amb el paper protector dels tocoferols a l'aparell fotosintètic, malgrat que s'hagi demostrat que els tocotrienols també poden protegir els tilacoides de la fotooxidació (Matringe *et al.*, 2008). Podria ser que els tocoferols (especialment l' α -tocoferol), juntament amb els carotenoides (en concret el cycle de les xantofil·les), haguessin estat seleccionats evolutivament com a mecanisme de fotoprotecció a les plantes, mantenint-los presents en tots els organismes fotosintètics. L' α -tocoferol i el cycle de les xantofil·les van tenir una funció essencial en l'adaptació de les plantes als ambients terrestres, fent front a l'increment dels processos fotooxidatius provocats per la disminució de concentració de CO₂ i a l'augment d'O₂ disponible, així com a l'increment d'estressos ambientals, com el risc a la deshidratació i a la fotoinhibició (Esteban *et al.*, 2009). Aquests dos mecanismes representen els isoprenoides fotoprotectors que es troben àmpliament distribuïts i presents en la majoria de plantes vasculars (Peñuelas & Munné-Bosch, 2005), els quals donen lloc a mecanismes compensatoris entre ells. Per exemple, tal i com s'observa en el mutant d'*Arabidopsis thaliana npq1*, l'absència d'un cycle de les xantofil·les funcional pot ser compensat per nivells elevats de tocoferols durant el procés de fotoaclimatació (Havaux *et al.*, 2000, 2005). Al llarg de l'evolució, però, sembla haver hagut una tendència evolutiva a incrementar el contingut d' α -tocoferol; el qual s'acumula molt més a plantes vasculars que en organismes fotosintètics evolutivament més primitius; i a disminuir la quantitat total de pigments implicats en el cycle de les xantofil·les, els quals són més abundants en algues i molses que en plantes vasculars (Esteban *et al.*, 2009).

3. Biosíntesi de vitamina E

La vitamina E es sintetitza exclusivament en organismes fotosintètics, i per tant, la seva síntesi es duu a terme en plantes, algues i alguns cianobacteris. La ruta biosintètica dels tocoferols, com molts dels enzims associats a aquesta, va ser descoberta als anys 70. Mitjançant estudis amb intermediaris de la ruta marcats

radioactivament, es van descobrir els precursors i els productes d'aquesta via, demostrant també que la síntesi de tocoferols i tocotrienols comparteix una sèrie de reaccions enzimàtiques comunes (Whistance & Threfall, 1970; Threfall & Whistance, 1971*a,b*). Posteriorment, les aproximacions genòmiques realitzades principalment en la planta model *A. thaliana* i el cianobacteri *Synechocystis sp.* PCC6803, han permès identificar molts dels gens implicats en aquesta ruta i confirmar els diferents passos de la ruta biosintètica que havien estat establerts prèviament amb estudis bioquímics (Mène-Saffrané & DellaPenna, 2010).

La síntesi dels tocoferols es duu a terme als plastidis, i degut a la seva similitud estructural, s'ha suggerit que els tocotrienols també es sintetitzen en aquests orgànuls (Munné-Bosch & Alegre, 2002). Horvath *et al.* (2006*a*) van detectar tocotrienols als coleòptils de *Triticum aestivum*, *Oryza sativa*, *Hordeum vulgare* i *Secale cereale*. Per tal d'identificar l'origen d'aquests tocotrienols, aquests investigadors van realitzar un estudi amb precursors radioactius de la ruta biosintètica de la vitamina E en tiges i cloroplasts aïllats de coleòptils de *T. aestivum*. Els resultats van mostrar que ni aquest teixit ni orgànul sintetitzaven tocotrienols, però sí tocoferols, conclouent que la síntesi de tocotrienols es realitzava en plastidis no fotosintètics. Tot i la manca de més evidències sobre la localització de la síntesi de tocotrienols a les cèlules vegetals, els plastidis són els únics orgànuls que disposen dels enzims i proteïnes implicades en la síntesi dels tocotrienols, tal i com s'explica a continuació.

3.1. Ruta biosintètica

Els tocoferols i els tocotrienols comparteixen la mateixa via de síntesi (Soll & Schull, 1979; Dörmann, 2003), la qual requereix dos substrats. Un d'ells és l'àcid homogentísic (HGA), que prové de la via de l'àcid siquímic (Herrmann & Weaver, 1999) i dona lloc a l'anell aromàtic del cap cromanol (anell fenòlic). La cua poliprenil, en canvi, requereix un prenildifosfat de 20 carbonis que prové de la via del metileritritol-4-fosfat (Lichtenthaler, 1999; Estévez *et al.*, 2001). Aquest pot ser un fitil difosfat (PDP), el qual dona lloc als tocoferols, o un geranilgeranil difosfat

Introducció

(GGDP), que origina els tocotrienols. Mentre que la via dels isoprenoides es realitza als plastidis, la ruta de l'àcid siquímic es duu a terme al citosol de la cèl·lula vegetal.

L'HGA és el resultat d'una sèrie de reaccions que comencen amb la condensació del fosfoenolpiruvat i l'eritrosa-4-fosfat, els quals a partir d'una sèrie de reaccions que impliquen sintases, deshidrogenases i quinases donen lloc al siquimat-3-fosfat. Aquest, mitjançant una altra sèrie de reaccions, donarà lloc al corismat, el precursor dels aminoàcids aromàtics i de diversos metabòlits secundaris. A causa de l'acció d'una mutasa, el corismat es converteix a pafenat, arogenat i tirosina. La tirosina és desaminada per l'enzim tirosina aminotransferasa (TAT) cap a *p*-hidroxifenilpiruvat (HPP), que posteriorment serà oxigenat mitjançant l'enzim hidroxifenilpiruvat dioxigenasa (HPPD) per a formar finalment HGA (Herrmann & Weaver, 1999), el qual serà transportat del citosol cap al plastidi (**Figura 2**, Schnell, 1998; Keegstra & Cline, 1999).

Els prenildifosfats, en canvi, deriven de la via del metileritritol-4-fosfat, la qual es duu a terme als plastidis. Aquesta via comença amb un piruvat i un gliceraldehid-3-fosfat per a formar 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfat. A partir d'aquest substrat i mitjançant diverses reaccions, on estan implicades reductases i quinases, es forma l'isopentenil difosfat (IPP). Quatre molècules d'IPP s'uneixen per tal de formar el GGDP, el qual és substrat no només de tocoferols i tocotrienols, sinó també de clorofil·les, carotenoides, quinones, gibberel·lines i àcid abscísic (Lichtenthaler, 1999; Estévez *et al.*, 2001). El GGDP es pot unir amb l'HGA per a sintetitzar tocotrienols o bé es pot reduir mitjançant l'enzim geranilgeranil reductasa (GGR) per tal de formar PDP, el qual es pot unir amb l'HGA per a sintetitzar tocoferols (Keller *et al.*, 1998). Generalment es considerava que el PDP només podia provenir de la reducció del GGDP, però recentment s'ha demostrat a *A. thaliana* que el PDP pot provenir també del fitol resultant de la degradació de la clorofil·la (Ischebeck *et al.*, 2006; Valentin *et al.*, 2006). El GGDP pot servir com a substrat per a la clorofil·la sintasa per tal de formar geranilgeranil clorofil·la, la qual és reduïda cap a clorofil·la per la GGR. La hidròlisi de la clorofil·la

mitjançant una clorofil·lase allibera fitol, que pot ser reassimilat mitjançant dues reaccions de fosforilació. La primera es duu a terme mitjançant una fitol quinasa, que dóna lloc al fitil fosfat, i la segona mitjançant una fitil fosfat quinasa que dóna lloc al PDP, el qual s'utilitza com a substrat tant per a la síntesi de tocoferols com de clorofil·les (**Figura 2**). A *A. thaliana* el gen que codifica per a la fitol quinasa s'anomena *VTE5* (Ischebeck *et al.*, 2006; Valentin *et al.*, 2006) i el que codifica per a la fitil fosfat quinasa s'anomena *VTE6* (vom Dorp *et al.*, 2015). La formació de PDP per ambdues rutes es duu a terme tant en fulles com en llavors (Valentin *et al.*, 2006). A *A. thaliana* s'ha observat que a les fulles la principal via de formació de PDP per a la síntesi de tocoferols es produeix a partir del fitol provinent de la degradació de la clorofil·la (vom Dorp *et al.*, 2015), mentre que a llavors la formació de PDP mitjançant la reducció produïda per la GGR és molt important en aquelles llavors que no acumulen clorofil·la (Zhang *et al.*, 2015).

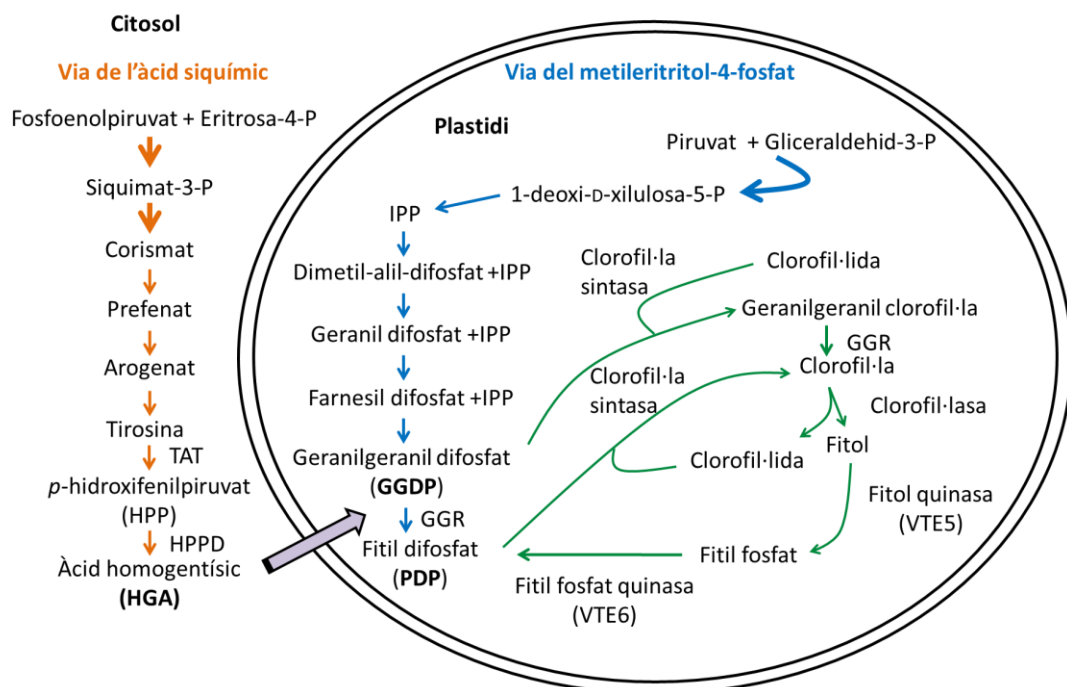


Figura 2. Via de l'àcid siquímic (en taronja) i del metileritritol-4-fosfat (en blau) per tal de donar lloc als substrats per a la síntesi de vitamina E, els quals estan ressaltats en negreta (HGA, GGDP i PDP). En verd es mostren les reaccions que es produeixen per a la formació i degradació de la clorofil·la. *TAT*, tirosina aminotransferasa; *HPPD*, hidroxifenilpiruvat dioxigenasa; *IPP*, isopentenil difosfat; *GGR*, geranilgeranil reductasa.

Un cop format els substrats, el primer pas per a la síntesi d'aquestes molècules és la unió del cap aromàtic (HGA) amb la cua poliprenil (PDP o GGDP) per tal de formar tocoferols i tocotrienols, respectivament (**Figura 3**). Aquesta unió es realitza a través d'una prenilttransferasa. En el cas dels tocoferols, l'homogentisat fitilttransferasa (HPT) uneix l'HGA amb el PDP per tal de formar el 2-metil-6-fitilbenzoquinol (MPBQ). En canvi, per sintetitzar els tocotrienols és l'homogentisat geranilgeranilttransferasa (HGGT) la que uneix l'HGA amb el GGDP, formant el 2-metil-6-geranilgeranilbenzoquinol (MGGBQ). Tot i que l'HGGT s'ha descrit com a específica de llavors de monocotiledònies, es creu que altres espècies i teixits acumuladors de tocotrienols, com llavors de dicotiledònies, utilitzarien prenilttransferases similars a l'HGGT que fins al dia d'avui no s'han descrit (Cahoon *et al.*, 2003). Tot i així, les espècies que no disposen d'HGGT també poden formar tocotrienols mitjançant l'HPT, tot i que aquest enzim presenti entre nou i dotze cops més afinitat pel PDP (Sadre *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2011). De la mateixa manera, l'HGGT també es pot unir al PDP per formar tocoferols, tot i tenir sis cops més afinitat pel GGDP (Yang *et al.*, 2011). Per a la formació de δ -tocoferol i δ -tocotrienol, el MPBQ i el MGGBQ pateixen una ciclació per tal de tancar i obtenir l'anell cromanol, respectivament. Aquesta ciclació es duu a terme per la tocoferol/tocotrienol ciclasa (TC). A partir del δ -tocoferol/tocotrienol es formen el β -tocoferol/tocotrienol mitjançant una metilació al carboni 5 de l'anell cromanol per la tocoferol/tocotrienol metilttransferasa (TMT). En canvi, per a la formació dels homòlegs γ , és necessari que el MPBQ i el MGGBQ es metilin a la posició 3 de l'anell benzoquinol mitjançant la preniltbenzoquinol metilttransferasa (PrBQMT); la qual dóna lloc al 2,3-dimetil-6-fitilbenzoquinol (DMPBQ) i al 2,3-dimetil-6-geranilgeranilbenzoquinol (DMGGBQ); abans de la ciclació duta a terme per la TC per a obtenir γ -tocoferol/tocotrienol, respectivament. Finalment, els homòlegs γ es tornen a metilar per la TMT per a formar α -tocoferol/tocotrienol. A totes les metilacions el grup metil prové de la S-adenosil-metionina (SAM; Soll & Schultz, 1980). En aquesta ruta biosintètica, les metilttransferases i ciclases

implicades en la síntesi de tocoferols semblen ser les mateixes que per a la síntesi de tocotrienols (Mène-Saffrané & DellaPenna, 2010).

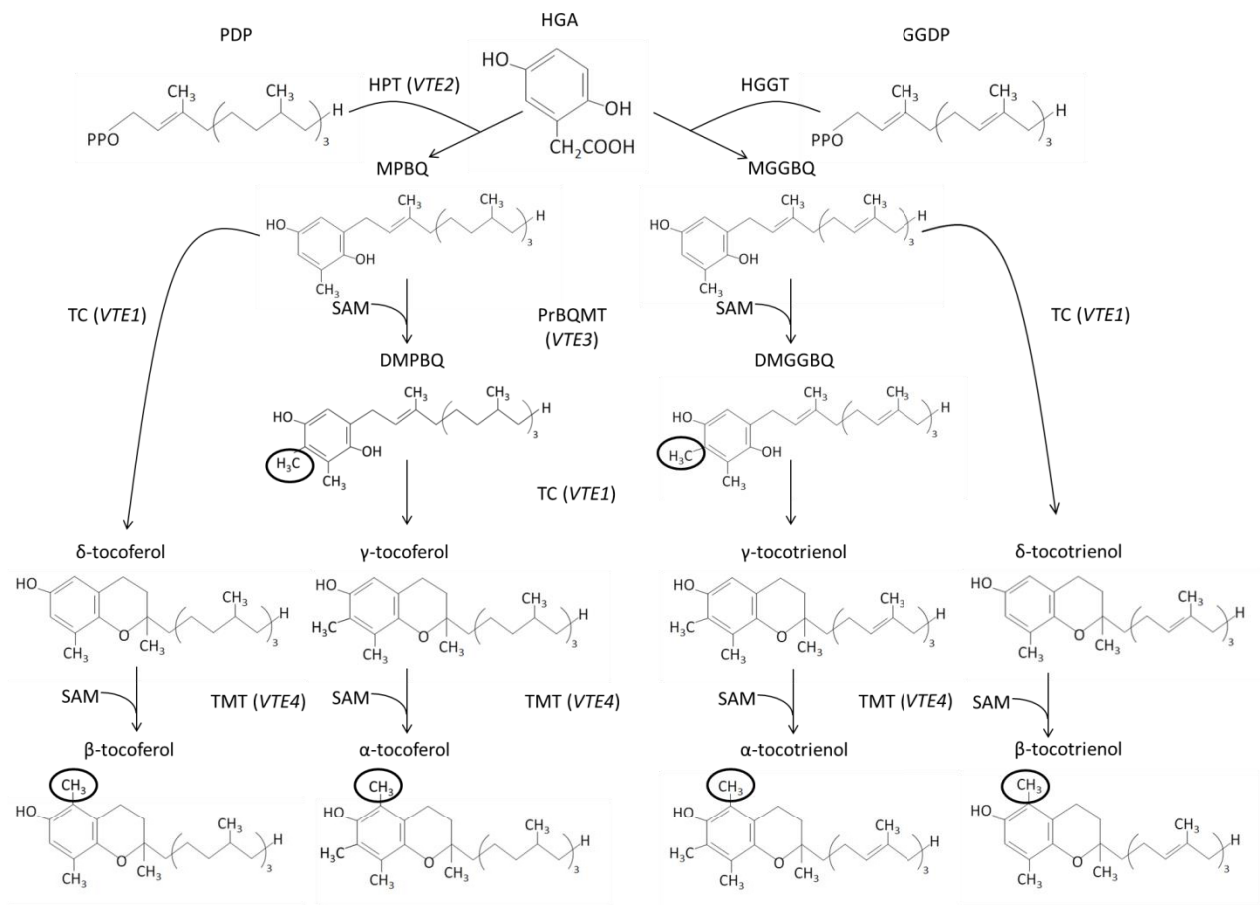


Figura 3. Ruta de síntesi de tocoferols i tocotrienols, on es mostren els substrats, enzims i productes d'aquesta via. Entre parèntesi s'indica el nom dels enzims a la planta model, *A. thaliana*. Encerclats es troben els principals grups metil afegits durant la síntesi de tocoferols i tocotrienols. *HPT*, homogentisat fitiltransferasa; *HGGT*, homogentisat geranilgeraniltransferasa; *MPBQ*, 2-metil-6-fetilbenzoquinol; *MGGBQ*, 2-metil-6-geranilgeranilbenzoquinol; *DMPBQ*, 2,3-dimetil-6-fetilbenzoquinol; *DMGGBQ*, 2,3-dimetil-6-geranilgeranilbenzoquinol; *TC*, tocoferol/tocotrienol ciclasa; *PrBQMT*, prenilbenzoquinol metiltransferasa; *TMT*, tocoferol/tocotrienol metiltransferasa; *SAM*, S-adenosil-metionina.

La major part dels estudis sobre la síntesi de vitamina E s'han realitzat en cloroplasts. Tots els enzims implicats en aquesta ruta, excepte el HPPD, han estat localitzats als plastidis. Mentre que l'HPPD es troba al citosol (Falk *et al.*, 2002), les preniltransferases i metiltransferases es troben a la membrana interna dels cloroplasts (Soll & Schultz, 1980; Soll *et al.*, 1980) i dels cromoplasts (d'Harlingue & Camara, 1985; Arango & Heise, 1998; Vidi *et al.*, 2006). La GGR es localitza a les membranes dels plastidis (Keller *et al.*, 1998), la TC als

plastoglòbuls dels cloroplasts però no a la membrana interna (Austin, 2006; Vidi *et al.*, 2006) i la fitol quinasa i la fitil fosfat quinasa es troben a la membrana dels cloroplasts (Ischebeck *et al.*, 2006; vom Dorp *et al.*, 2015). Moltes de les funcions dels gens que codifiquen per a enzims d'aquesta via es van conèixer gràcies a mutants d'*A. thaliana*. És per això que els enzims d'aquesta via també es coneixen com a VTE2 per a l'HPT, VTE3 per a PrBQMT, VTE1 per a la TC i VTE4 per a la TMT, tal i com s'observa a la **Figura 3**.

3.2. Regulació hormonal

La ruta biosintètica de la vitamina E presenta diversos punts de regulació, on les hormones hi juguen un paper important. La funció hormonal reguladora de la ruta biosintètica de la vitamina E s'ha descobert, principalment, en les fulles de plantes que patien algun tipus d'estrès abiòtic, ja que en aquestes condicions es genera un increment de l'estrès oxidatiu. Per tal de protegir-se i evitar que es produeixi dany oxidatiu i mort cel·lular, és necessari un augment dels mecanismes antioxidants, com la vitamina E (Munné-Bosch, 2005*b*; Lushchak & Semchuk, 2012).

Un grup d'hormones implicades en la regulació de la síntesi de vitamina E són els jasmonats. A partir de l'àcid linolènic, i mitjançant una sèrie de reaccions enzimàtiques, es formen l'àcid 12-oxofitodienoic (OPDA) i l'àcid jasmònic (JA) (Schaller, 2001; Wasternack & Hause, 2013). El JA es pot conjuguar amb diferents aminoàcids, formant el jasmonat isoleucina (Fonseca *et al.*, 2009), el jasmonat alanina, el jasmonat valina i el jasmonat metionina, sent tots ells molècules actives a les plantes que poden induir a gens de resposta a JA (Yan *et al.*, 2016). El jasmonat isoleucina, així com l'OPDA, el JA i el metil jasmonat (MeJA), regulen l'expressió de gens implicats en la defensa de la planta (Berger, 2002; Halitschke & Baldwin, 2003; Danon *et al.*, 2005; Devoto & Turner, 2005; Taki *et al.*, 2005), però només s'ha descrit un paper regulador de la síntesi de vitamina E per part del JA i el MeJA, tal i com s'explica a continuació.

Gràcies a l'aplicació exògena de coronatina a la planta model *A. thaliana*, una fitotoxina anàloga a l'OPDA i al JA, es va aïllar el gen *COR13* que codifica per a la

TAT. La inducció d'aquest gen per part de la coronatina va mostrar que la *TAT* es podia induir pels jasmonats, observant que l'àcid metil 12-oxofitodienoic i el MeJA no només augmentaven els nivells d'ARN missatger d'aquest gen, sinó que també augmentaven l'activitat de l'enzim (Lopukhina *et al.*, 2001). Posteriorment, gràcies a la utilització de plantes d'*A. thaliana* amb la mutació *dde1* (*delayed dehiscence*), les quals produeixen OPDA però no JA degut a la interrupció del gen que codifica per a OPDA, es va esclarir que el JA, i no pas l'OPDA, és requerit per a la regulació positiva de la *TAT* (Sandorf & Holländer-Czytko, 2002). Aquesta regulació és important quan les plantes estan exposades a danys mecànics o llum ultraviolada, ja que en aquestes condicions s'indueixen els jasmonats i les seves proteïnes. Per tant, sota condicions d'estrès s'activa la síntesi de jasmonats incrementant a la seva vegada la inducció de la *TAT* i, per tant, la síntesi de vitamina E com a mecanisme de protecció. El JA no només regula l'activitat de la *TAT*, sinó que el MeJA també regula l'expressió gènica d'*HPPD* en segments de fulles d'ordi (*H. vulgare*, Falk *et al.*, 2002). Així doncs, els jasmonats regulen la biosíntesi de vitamina E en dos punts de la ruta, en ambdós casos modulant l'expressió dels gens que codifiquen per a la *TAT* i per a l'*HPPD* (**Figura 4**).

Una altra hormona implicada en la regulació de la biosíntesi de vitamina E és l'àcid abscísic (ABA), el qual és necessari per a l'adaptació a diversos estressos abiòtics, com la sequera, el fred i l'estrès salí (Xiong *et al.*, 2002). Aquesta hormona es troba implicada en la inducció de diversos gens que codifiquen per a enzims que es troben en la ruta biosintètica de la vitamina E. Efectes d'aquesta regulació s'observen, per exemple, a *Vellozia gigantea*, una planta endèmica del Brasil que durant l'estació seca mostra uns augments dels nivells d'ABA i de vitamina E a les fulles per tal de fer front a l'estrès hídric (Morales *et al.*, 2015). Una relació positiva entre els nivells d'ABA i d' α -tocoferol també s'ha trobat en *Zea mays* (Jiang & Zhang, 2001; Fleta-Soriano & Munné-Bosch, 2017) i en *Cannabis sativa* (Mansouri *et al.*, 2009). Entre els gens regulats per ABA, es troba el que codifica per a HPT, i un exemple d'aquesta regulació es va trobar a plantes de *Cistus creticus* sota dèficit hídric. En aquestes condicions, els nivells d'ARN

Introducció

missatger per *HPT* augmentaven i es correlacionaven amb nivells alts d' α -tocoferol, el qual, a la seva vegada, es correlacionava amb augments d'ABA (Munné-Bosch *et al.*, 2009). Mitjançant l'aplicació d'ABA en cèl·lules en suspensió d'*Eucaliptus gunnii* es va observar un increment de l'expressió del gen que codifica per a la tocoferol ciclasa (TC). Sembla que tant la *TC* com l'*HPPD* són regulats per ABA mitjançant uns motius específics d'ABA a les regions promotores dels gens (Munné-Bosch, 2005a; El Kayal *et al.*, 2006).

Tot i així, l'evidència més clara de la regulació d'alguns gens implicats en la síntesi de vitamina E per part de l'ABA es van obtenir a l'estudiar la seva expressió a plàntules d'arròs (*O. sativa*) en condicions d'estrès. Si bé en fred, dèficit hídric o estrès salí els nivells d'expressió gènica de la *TC*, *HGGT* i *MPBQ MT* no es van veure afectats; els d'*HPT* i γ -*TMT* per a aquesta espècie es van reduir lleugerament en dèficit hídric, mentre que els d'*HPPD* van augmentar molt durant la deshidratació i fred respecte al control. A partir d'aquests resultats, els autors van examinar els elements promotors d'aquest últim gen, trobant-hi elements de resposta a l'ABA (també anomenats ABRE, sigles provinents de l'anglès per a *ABA Responsive Element*). No només van trobar-los per a *HPPD*, sinó que també per a γ -*TMT* i per a *MPBQ MT*. Específicament, aquests autors van trobar quatre ABREs per a *HPPD*, dos per a *MPBQ MT* i un per a γ -*TMT*. A més, per a *HPT* es va trobar un motiu IIB, el qual es troba implicat en la resposta a l'ABA. La presència d'aquests elements de resposta a l'ABA a les regions promotores indiquen la possible participació d'aquests gens en les respostes a l'estrès en les que intervé l'ABA (Chaudhary & Khurana, 2009). Per tant, l'ABA té un paper important sobre la regulació transcripcional de *TC*, *HPT*, *HPPD*, γ -*TMT* i *MPBQ MT*.

La funció de l'etilè sobre la biosíntesi de vitamina E es va observar mitjançant l'aplicació exògena d'aquesta hormona en segments de fulles d'ordi (*H. vulgare*). Gràcies a aquest experiment, Falk *et al.* (2002) van observar que els nivells d'ARN missatger d'*HPPD* augmentaven. Un increment en l'expressió d'aquest gen així com un augment dels nivells de tocoferols es va observar durant la maduració del

mango (Singh *et al.*, 2011). Aplicacions exògenes d'etilè al fruit van incrementar l'expressió d'*HPPD*, mostrant una regulació transcripcional per part d'aquesta hormona. Aquesta regulació no només es va observar al fruit, sinó també a les fulles joves i senescents, demostrant que la inducció per etilè d'aquest gen és independent del teixit (Singh *et al.*, 2011). Tot i que en l'estudi de Park *et al.* (2010) no es van quantificar els nivells de vitamina E, van trobar que tant en fulles com cotilèdons, càpsules en desenvolupament i llavors de sèsam; l'etilè, l'ABA i la foscor generaven una disminució dels nivells d'ARN missatger del gen *GGR*.

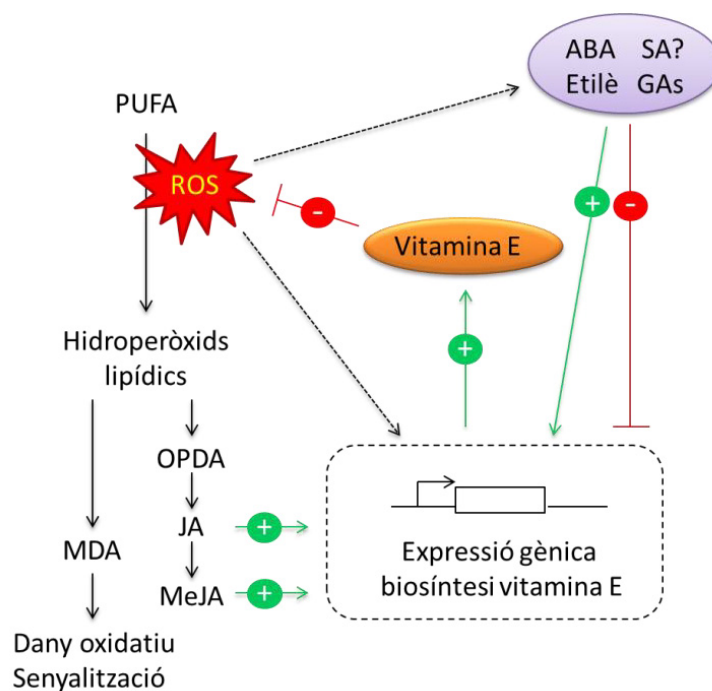


Figura 4. Esquema representatiu de la regulació hormonal i redox de la síntesi de vitamina E, així com de la formació de MDA i jasmonats (OPDA, JA, MeJA) a partir de la peroxidació lipídica. *PUFA*, àcids grassos poliinsaturats; *ROS*, espècies reactives de l'oxigen; *OPDA*, àcid 12-oxofitodenoic; *JA*, àcid jasmònic; *MeJA*, metiljasmonat; *ABA*; àcid abscísic; *SA*, àcid salicílic; *GAs*, gibberel·lines.

S'ha proposat que la inducció de l'*HPPD* per etilè i MeJA pot estar lligada a la senescència i a l'estrès oxidatiu, però es desconeix mitjançant quins mecanismes (Falk *et al.*, 2002). Cela *et al.* (2009b) van observar que l'etilè pot estar implicat en la regulació de la síntesi de tocoferols durant l'estrès per dèficit hídric i per l'envelliment de la fulla. Mitjançant la utilització de diferents mutants implicats en

la percepció i senyalització de l'etilè, es va observar que la major part dels compostos de la senyalització d'aquesta hormona, incloent factors de transcripció, influenciaven l'acumulació de tocoferols a les fulles d'*A. thaliana*. Mutacions en *EIN3*, *EIN2*, components senyalitzadors de la via, i *EIL1*, un regulador transcripcional, provocaren reduccions en els nivells acumulats de vitamina E respecte a les plantes control en condicions d'estrès hídric. D'altra banda, mutacions en *ETR1*, el qual codifica per un dels cinc receptors d'etilè d'*A. thaliana*, induïren una acumulació dels nivells de tocoferols en les fulles velles. Tot i que en aquest estudi es van observar canvis en les quantitats acumulades de tocoferols, els nivells d'expressió gènica per a *HPPD*, *VTE1*, *VTE2* i *VTE4* no es varen veure afectats, de manera que no s'observaren evidències de regulació transcripcional.

L'etilè és important en condicions d'estrès salí. La pèrdua de funció d'*EIN3*, un factor de transcripció implicat en la senyalització de l'etilè, genera una sèrie de mecanismes compensatoris, com pot ser l'augment de JA a causa de l'augment de la peroxidació lipídica en condicions d'estrès (Asensi-Fabado *et al.*, 2012). Això dóna lloc a una possible connexió entre l'etilè i el JA, els quals poden actuar per activar a *ERF1*, un element de resposta a l'etilè, i així regular la síntesi de vitamina E (Lorenzo *et al.*, 2003; Shinshi, 2008; Zhu *et al.*, 2011). A més, l'ABA també es troba implicat en la regulació de diversos *ERF* (sigles provinents de l'anglès per a *Ethylene Response Factors*) sota estressos abiòtics, regulant la inducció d'*ERF1* però sense afectar necessàriament la inducció d'aquest per part de l'etilè i el JA (Müller & Munné-Bosch, 2015).

En el cas de l'àcid salicílic (SA) es desconeix quins són els mecanismes pels quals es regula la síntesi de vitamina E, però hi ha força evidències que el SA té algun paper en la regulació d'aquest antioxidant, tot i que sembla que a diferents teixits la regulació pot ser diferent. Mitjançant la utilització en *A. thaliana* del mutant *sid2*, el qual té truncada la formació d'isocorismat sintasa, enzim clau en la via de síntesi d'aquesta hormona; i el transgènic *NahG*, es va observar que el SA

regula d'alguna manera els nivells de vitamina E. Abreu & Munné-Bosch (2009) van trobar que llavors *sid2* i *NahG* presentaven nivells més elevats de tocoferols que les llavors control, mentre que a fulles d'*A. thaliana*, les línies transgèniques *NahG* mostraven valors més baixos que a les plantes control, tant en condicions de dèficit hídric com en condicions control (Munné-Bosch *et al.*, 2007a). En les fulles de *Ctenate setosa* l'aplicació exògena de SA prevenia la peroxidació lipídica durant la sequera. En aquest cas, l' α -tocoferol augmentava amb l'aplicació de SA durant l'estrès més que a les plantes control (Kadioglu *et al.*, 2011). També s'ha observat que els nivells de SA estan fortament relacionats amb els nivells d' α -tocoferol en fulles de *Phyllirea angustifolia* en condicions d'estrès hídric (Munné-Bosch & Peñuelas, 2003). Finalment, en el cas d'estrès per calor, a *Quercus Ilex* es va observar que el MeSA (una forma volàtil que prové de l'àcid salicílic) indueix l'augment d' α -tocoferol a les fulles d'aquesta espècie, però que una acumulació excessiva d'aquest compost genera, molt probablement, una producció incontrolada de ROS, sobrepasant la capacitat de les defenses antioxidants originant mort cel·lular (Llusià *et al.*, 2005). Tot i que encara no es coneix com aquesta hormona regula els nivells de vitamina E, degut a que el JA i el SA interactuen en la transducció de senyals en resposta als estressos (Sudha & Ravishankar, 2002), no es pot descartar un possible paper transcripcional d'aquesta hormona o bé un paper conjunt amb el JA.

Les gibberel·lines (GAs) afecten a la regulació de la síntesi de vitamina E de forma molt més indirecta. Aquestes, així com el JA, indueixen el gen que codifica per l'enzim 3-deoxi-D-arabino-heptulosonat-7-fosfat a *Coptis japonica* (Hara *et al.*, 1994) i a *Nicotiana tabacum* (Suzuki *et al.*, 1995), el qual es troba implicat en la primera reacció de la via de l'àcid siquímic, en la que el fosfoenolpiruvat i la eritrosa-4-fosfat es condensen (Herrmann & Weaver, 1999). D'aquesta manera, tant les GAs com el JA indueixen la via de l'àcid siquímic formant més HGA, substrat per a la síntesi de vitamina E, tot i que també ho és per a la formació d'altres compostos. Recentment, Du *et al.* (2015) van observar que l'aplicació exògena de GA₃ augmentava la producció de tocoferols a les llavors d'*A. thaliana* i

Introducció

Brassica napus. Mentre que a la primera espècie l'aplicació d'aquesta hormona incrementava els nivells d'expressió de γ -TMT i HPPD, a la segona incrementava els d'HPPD i TC.

Per tant, la regulació hormonal de la síntesi de vitamina E és un procés complex que encara requereix força estudi per tal d'elucidar la regulació sobre els diferents gens implicats en la seva síntesi per part d'altres hormones; esbrinar el mecanisme d'acció de la seva regulació; el paper regulador de la interacció de diferents hormones, així com els canvis en la regulació en diferents teixits o fases del desenvolupament i creixement de les plantes.

3.3. Regulació redox

La regulació de la síntesi de vitamina E també pot ser duta a terme per les espècies reactives de l'oxigen (ROS). El radical hidroxil (HO^\cdot), el radical superòxid (O_2^\cdot), el peròxid d'hidrogen (H_2O_2) i el singlet d'oxigen ($^1\text{O}_2$) són les principals ROS derivades del metabolisme aeròbic. Aquestes són molècules reactives químicament i potencialment tòxiques biològicament, sent el HO^\cdot l'espècie més reactiva de totes (Hajiboland, 2014). En condicions d'estrès oxidatiu; en el que es produeix un desequilibri entre la producció de ROS i els mecanismes antioxidants; les ROS tenen efectes deleteris, provocant danys oxidatius irreversibles a proteïnes, lípids i ADN (Møller, 2001; Foyer & Noctor, 2011).

Un dels principals processos desencadenats per les ROS és la peroxidació lipídica dels àcids grassos poliinsaturats (PUFA) de membrana, sent l'àcid linoleic (18:2) i l'àcid linolènic (18:3) els més abundants en la membrana plasmàtica i els més reactius a la peroxidació lipídica no enzimàtica (Weber *et al.*, 2004; Møller *et al.*, 2007). Com a conseqüència d'aquesta peroxidació es formen hidroperòxids lipídics (LOOH) a partir dels quals es sintetitzen l'àcid malondialdehid (MDA) de manera no enzimàtica, i els jasmonats, mitjançant enzims que es troben als plastidis, citosol i peroxisomes (Schaller, 2001). El MDA té una funció dual. En el seu paper deleteri pot afavorir el dany oxidatiu, formant conjugats amb l'ADN i les proteïnes, inhibint-ne la seva funció biològica (Farmer & Mueller, 2013); així com

pot afectar a la permeabilitat selectiva de la bicapa lipídica (Sattler *et al.*, 2006). En canvi, també pot actuar com a molècula missatgera induint l'expressió de gens de resposta a estressos abiòtics (Weber *et al.*, 2004). D'altra banda, el JA i el MeJA poden induir l'expressió de gens de defensa i desenvolupament (Mueller & Berger, 2009), i a la seva vegada poden regular l'expressió de gens implicats en la síntesi d'antioxidants, concretament de la vitamina E (Falk *et al.*, 2002; Sandorf & Holländer-Czytko, 2002), tal i com s'ha explicat anteriorment.

Per tant, mitjançant la peroxidació lipídica, les ROS poden regular la síntesi de vitamina E modulant els nivells de JA, considerant-se una senyalització retrògrada, on la informació es transfereix del plastidi al nucli (Pfannschmidt & Munné-Bosch, 2013). D'altra banda, la vitamina E, mitjançant la inhibició de la propagació de la peroxidació lipídica (Munné-Bosch & Alegre, 2002), controla els nivells de LOOH i de JA, regulant així la seva pròpia síntesi. Aquesta regulació per part de l' α -tocoferol va ser suggerida per Munné-Bosch *et al.* (2007b) en un estudi realitzat en fulles de mutants *vte1* d'*A. thaliana*. Així doncs, la vitamina E; i més concretament els tocoferols; a més d'exercir un paper antioxidant regulant l'homeòstasi redox cel·lular, podria exercir un paper regulador sobre la seva pròpia síntesi (**Figura 4**).

Tot i així, noves funcions per les ROS s'han identificat en els últims anys. Aquestes es troben implicades en diversos processos biològics, com en la mort cel·lular programada de la capa d'aleurona, l'estimulació de la germinació i el trencament de la dormició, la iniciació dels nòduls de les arrels així com l'obertura i tancament dels estomes mitjançant la interacció amb hormones (Gomes *et al.*, 2014). A més, en alguns estudis s'ha observat que el H₂O₂ pot induir l'expressió de gens implicats en funcions antioxidants (Gechev *et al.*, 2002; Neill *et al.*, 2002; Navabpour, 2003; Kravchik *et al.*, 2013). Arrom & Munné-Bosch (2010) van suggerir una possible inducció dels nivells de tocoferols com a conseqüència dels augments de ROS en tèpals senescents de *Lilium* L.A. var. "Courier". Així doncs, tot i la manca de més estudis en relació a aquests tipus de regulació, no es podria descartar que les ROS, interaccionant amb les hormones o bé actuant per si

mateixes, regulessin els nivells de vitamina E modulant la transcripció d'alguns dels gens implicats en la biosíntesi d'aquest antioxidant.

4. Acumulació de la vitamina E

L'acumulació dels tocoferols i dels tocotrienols varia depenent dels teixits que s'analitzin. Els tocoferols són la forma predominant de vitamina E que s'acumula als teixits fotosintètics (Munné-Bosch & Alegre, 2002). No obstant, aquests també es troben en una gran varietat de teixits vegetals, com a arrels (Caro & Puntarulo, 1996), tubercles (Spychalla & Desborough, 1990; Crowell *et al.*, 2008), gemmes florals (Hernández *et al.*, 2015), sèpals i pètals de flors (Bartoli *et al.*, 1997; Arrom & Munné-Bosch, 2010; Miret *et al.*, 2014), fruits (Ebong *et al.*, 1999), ceres cuticulars (Gülz *et al.*, 1992; Shepherd *et al.*, 1999), llavors (Garcia *et al.*, 2012) i hipocòtils (Yoshida *et al.*, 1999). A més, en cada teixit varia molt el contingut de tocoferols, amb concentracions totals que van des de nivells molt baixos al tubercle de la patata (<1 µg/g de pes sec) fins a nivells alts en fulles i llavors (>1 mg/g de pes sec, Demo *et al.*, 1998; Goffman *et al.*, 1999; Grusak & DellaPenna, 1999). No només varia la seva concentració sinó també l'homòleg acumulat de manera predominant. Mentre que a les fulles, tiges, arrels, fruits, tubercles, cotiledons, hipocòtils i flors la forma més abundant que s'hi troba és l'α-tocoferol, a les llavors s'hi acumulen tant α- com γ-tocoferol, depenent de l'espècie (Munné-Bosch & Alegre, 2002).

En canvi, els tocotrienols estan presents només en certs grups de plantes, trobant-se majoritàriament en llavors de monocotiledònies (Falk *et al.*, 2004; Horvath *et al.*, 2006a; Falk & Munné-Bosch, 2010). No només els tocotrienols es troben en llavors, sinó que també en fruits (Lehmann *et al.*, 1989), sent en algunes espècies, com *Ananas sativus*, *Garcinia mangostana*, *Diospyros kaki*, *Passiflora edulis* i *Passiflora ligularis* la forma majoritària de vitamina E present (Cela *et al.*, 2010). A més, els tocotrienols també es troben a l'oli que s'extreu dels cereals (Goffman & Bo, 2001), com al mesocarp de la palmera *Elaeis* sp. (Lubrano *et al.*, 1994) sent l'oli de palma la major font comercial de tocotrienols (Ong, 1993). Els

tocotrienols també són presents al pericarp dels fruits (Osuna-García *et al.*, 1998) i en algunes cèl·lules especialitzades, com ho són els tubs de làtex d'*Hevea brasiliensis* (d'Auzac *et al.*, 1989; Schultz, 1990; Horvath *et al.*, 2006a).

A diferència dels tocoferols, es considera que els tocotrienols no s'acumulen, en general, a les fulles de les angiospermes (Threfall, 1971). No obstant, s'han detectat tocotrienols en fulles de *Picea* sp. (Franzen *et al.*, 1991), als coleòptils de *T. aestivum*, *H. vulgare*, *O. sativa* i *S. cereale* (Horvath *et al.*, 2006a), així com a fulles de *V. gigantea* (Morales *et al.*, 2014). En el cas de *T. aestivum*, la presència de tocotrienols als coleòptils es va relacionar amb teixits i orgànuls no fotosintètics, atribuint la seva localització a una translocació des de la llavor fins al coleòptil, i no a una síntesi *de novo* d'aquest antioxidant (Horvath *et al.*, 2006a). En canvi, Morales *et al.* (2014) van suggerir que els tocotrienols podrien representar un avantatge adaptatiu a l'aportar tolerància a l'estrès fotooxidatiu en plantes superiors. Degut a que actualment hi ha poques evidències de la translocació de la vitamina E, són necessaris més estudis de localització i de dissecció de teixits per a poder esclarir si els tocotrienols es troben restringits exclusivament a teixits no fotosintètics, trobant-se, per exemple, localitzats en els conductes de làtex i no en les fulles, com és el cas d'*H. brasiliensis* (Horvath *et al.*, 2006a); o si, per contra, poden trobar-se en teixits fotosintètics i complir funcions no descrites fins ara. Tot i així, mitjançant l'estudi de plantes transgèniques de tabac, s'ha demostrat que els tocotrienols poden substituir als tocoferols en les seves funcions antioxidants en les fulles d'aquesta espècie (Matringe *et al.*, 2008).

A nivell d'orgànul, la vitamina E es troba als plastidis, on és sintetitzada. Els tocoferols i els tocotrienols s'acumulen als amiloplasts de les llavors i tubercles, als cloroplasts de teixits fotosintètics així com als leucoplasts dels pètals i als cromoplasts dels fruits (Lichtenthaler *et al.*, 1981; Fryer, 1992; Kruk & Strzalka, 1995). En concret, l' α -tocoferol es troba a la membrana dels plastidis on es sintetitza (Soll *et al.*, 1985; Arango & Heise, 1998), als plastoglòbuls dels cloroplasts, on s'emmagatzema (Lichtenthaler *et al.*, 1981), i a les membranes dels

Introducció

tilacoides, on exerceixen la seva funció antioxidant (Fryer 1992; Havaux, 1998). Tot i així, s'ha descrit una localització extraplastidial dels tocoferols en alguns casos, detectant-los a vacuoles i nuclis de fulles d'ordi (Rautenkranz *et al.*, 1994), a mitocondris d'algues (Shigeoka *et al.*, 1986; Kusmic *et al.*, 1998), a les cèl·lules parenquimàtiques del xilema de plantes llenyoses (Fleta-Soriano *et al.*, 2014), a les membranes dels microsomes de les arrels de soja (Caro & Puntarulo, 1996) i als cossos lipídics de les llavors (Fisk *et al.*, 2006; White *et al.*, 2006).

A nivell ultraestructural, la vitamina E es localitza a les membranes. En concret als cloroplasts s'ha suggerit que els tocoferols es troben tant a la membrana cloroplàstica com a la til·lacoidal (Fryer, 1992; Havaux, 1998; Havaux *et al.*, 2000). Gràcies als estudis amb membranes model, actualment es coneix que la vitamina E, degut a les seves característiques lipofíliques, es troba ancorada a aquestes gràcies a la seva cadena poliprenil, i que el seu cap cromanol es troba orientat cap a la interfase lípid-aigua de la bicapa lipídica, sense arribar a aquesta i quedant-se continguda entre els lípids (Kagan & Quinn, 1988; Wang & Quinn, 2000; Atkinson *et al.*, 2008).

Hi han diversos factors que varien la quantitat de vitamina E que s'acumula en els teixits vegetals, sent un d'ells els estressos ambientals. Aquests estan associats a un increment de les ROS, fet que provoca un estrès oxidatiu. Per evitar-lo, la planta varia els seus nivells d'antioxidants, entre ells els de vitamina E, fet que depèn de la tolerància als estressos que presenti cada espècie. Les plantes resistents incrementen els nivells de tocoferols, els quals mitjançant la reducció dels nivells de ROS i la inhibició de la peroxidació lipídica, prevenen el dany oxidatiu. En canvi, les plantes sensibles a aquests, o bé plantes resistents sota estressos molt severos, pateixen una disminució dels nivells d'antioxidants, on la degradació de tocoferols excedeix la seva síntesi, fet que comporta mort cel·lular en el cas que la deficiència d'aquest antioxidant no pugui ser compensada per altres mecanismes de protecció, com ho són l'ascorbat, el glutatió i els flavonoides (Munné-Bosch, 2005b). Diversos estudis han demostrat un augment de tocoferols en condicions

d'alta intensitat lumínica (Porfirova *et al.*, 2002), dèficit hídric (Munné-Bosch, 2003; Cela *et al.*, 2009a), ions de metalls pesants, com zinc i cadmi (Artetxe *et al.*, 2002; Yusuf *et al.*, 2010); estrès salí (Abbasi *et al.*, 2007; Noreen & Ashraf, 2009; Yusuf *et al.*, 2010), tractaments amb ozó (Burkey *et al.*, 2000) i fred (Leipner *et al.*, 1999). Així mateix, altres estudis han mostrat una relació entre un estrès i un augment dels nivells d'expressió de gens que es troben implicats en la síntesi de vitamina E, com l'*HPPD* (Collin *et al.*, 2008; Chaudhary & Khurana, 2009), l'*HPT* (*VTE2*, Collakova & DellaPenna, 2003a; Munné-Bosch *et al.*, 2009; Cela *et al.*, 2011), la *TC* (*VTE1*, Cela *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2011) i la γ -*TMT* (*VTE4*, Oh *et al.*, 2009; Cela *et al.*, 2011).

L'acumulació diferencial dels nivells de vitamina E no només es troba influenciada per les condicions ambientals, sinó que també es relaciona amb els diferents estadis fisiològics de les plantes. Variacions en el contingut de vitamina E es fan paleses durant la formació i desenvolupament de les llavors, ja que el seu contingut va disminuint fins a nivells constants durant la seva maduració (Horvath *et al.*, 2006b). A més, durant la germinació els nivells de vitamina E varien per tal de fer front als increments de ROS que es produeixen, el quals fluctuen en resposta a l'estrès oxidatiu (Puntarulo, 1993). Els nivells de vitamina E acumulats en les llavors durant el seu emmagatzematge, a la seva vegada, afecten a la viabilitat d'aquestes, ja que una disminució d'aquests antioxidants resulta en un envelliment accelerat i en una pèrdua de viabilitat degut a l'increment de peroxidació lipídica (Sattler *et al.*, 2004; Menè-Saffrané *et al.*, 2010).

En resum, l'acumulació de la vitamina E varia molt depenent de les espècies així com dels òrgans que s'analitzin, fins i tot dins de la mateixa espècie. Diferents concentracions de tocoferols i tocotrienols semblen estar relacionades amb la capacitat fotosintètica que presenten els teixits, així com del moment de desenvolupament, maduració o formació en el que es trobin, sent també influenciats pels factors ambientals.

5. Funcions de la vitamina E

En general, la vitamina E actua com a agent estabilitzador de membrana i té un important paper antioxidant. En estudis realitzats principalment amb membranes models s'ha observat que la cadena prenil de la vitamina E s'ancora a la bicapa lipídica. Per contra, mitjançant l'hidrogen del grup hidroxil, el cap cromanol s'uneix al carbonil de les unions èster dels fosfolípids que formen la membrana. Gràcies a la complementarietat entre aquest antioxidant i l'asimetria dels fosfolípids, aquesta associació proporciona estabilitat a la membrana (Salgado *et al.*, 1993). Així doncs, la vitamina E interacciona amb els lípids de membrana incrementant la seva rigidesa. No obstant, una acumulació excessiva en les membranes afecta negativament a la seva fluïdesa, fet de vital importància quan les plantes estan desenvolupant-se o en condicions d'estrès. En aquestes condicions, i per tal d'augmentar la tolerància a l'estrès, el número d'àcids grassos insaturats que mantenen la fase líquida cristal·lina augmenta (Hincha, 2008), i una major rigidesa no resulta beneficiosa.

Els processos metabòlics en plantes, com la fotosíntesi, fotorespiració i respiració, així com altres vies metabòliques, comporten la formació de ROS. Un dels efectes més perillosos de la seva acumulació és la peroxidació lipídica, on els PUFA de les membranes o de les reserves lipídiques de les llavors es degraden (Bailly, 2004; Falk & Munné-Bosch, 2010). Aquesta peroxidació genera una disminució de la fluïdesa de la membrana, augmentant la seva permeabilitat i causant danys secundaris a les proteïnes de membrana (Møller *et al.*, 2007). La peroxidació lipídica comença a causa d'un iniciador, com poden ser, per exemple, diverses ROS (HO^\cdot , H_2O_2), l'enzim lipooxigenasa (LOX), calor, llum o metalls traça, generant un radical alquil molt reactiu. Aquest es combina amb l'oxigen molecular per a formar radicals lipídics peroxil (LOO^\cdot), els quals extreuen un hidrogen dels PUFA donant lloc als hidroperòxids lipídics (LOOH) i a un nou radical alquil, el qual propaga la reacció per la membrana (**Figura 5**). De manera alternativa, el singlet d'oxigen ($^1\text{O}_2$) pot reaccionar amb els PUFA i donar directament LOOH (Munné-Bosch & Alegre, 2002). Els LOOH poden ser

fragmentats en una varietat d'aldehids reactius, incloent el MDA (Weber *et al.*, 2004). Així mateix, mitjançant reaccions enzimàtiques, a partir dels LOOH es formen els jasmonats, OPDA i JA (Schaller, 2001). Com a antioxidants, el principal paper dels tocoferols i els tocotrienols és del reaccionar de manera química (en anglès, *scavenging*) amb els LOO[·] (Liebler, 1993). Per a això, l'anell cromanol perd un àtom d'hidrogen que és donat als LOO[·], evitant l'extracció de l'hidrogen dels PUFA. D'aquesta manera es formen radicals tocoferoxil i tocotrienoxil que poden ser reciclats cap a tocoferols i tocotrienols mitjançant el cicle de l'ascorbat-glutatió (Munné-Bosch & Alegre, 2002; Falk & Munné-Bosch, 2010). En absència d'aquest reciclatge, els radicals tocoferoxil i tocotrienoxil poden acoblar-se entre ells i formar dímers i/o trímers (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996). A més, aquests radicals també poden donar un electró als LOO[·], resultant en l'obertura de l'anell cromanol per a formar quinones (Liebler, 1993; Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996).

Una altra funció antioxidant dels tocoferols és la de reaccionar, tant de manera química com física (en anglès, *quenching*), amb el ¹O₂. Aquesta ROS es forma exclusivament als cloroplasts a partir dels estats excitats de la clorofil·la (Triantaphylidès & Havaux, 2009), i per aquesta raó s'ha estudiat principalment el paper antioxidant dels tocoferols, i no el dels tocotrienols. Durant la reacció física, el ¹O₂ es desactiva cap a triplet d'oxigen mitjançant un sistema de transferència de càrregues, en el que un electró dels tocoferols es perd i és donat al ¹O₂. Una sola molècula d' α -tocoferol pot desactivar 120 molècules de ¹O₂ mitjançant transferència d'energia de ressonància abans de ser degradada (Fahrenholtz *et al.*, 1974). De manera química, els tocoferols també poden reaccionar amb el ¹O₂ formant un intermediari, la tocoferol hidroperoxidienona, que es descomposa en tocoferol quinona i epòxids de tocoferol quinona (Murkovic *et al.*, 1997). La tocoferol quinona, a la seva vegada, pot ser convertida a tocoferol quinol de manera enzimàtica en una reacció depenent de NADH o NADPH (Kruk & Strzalka, 1995). Aquest tocoferol quinol és també un potent antioxidant que actua químicament amb els radicals lliures (Munné-Bosch & Alegre, 2002). A més,

Introducció

aquesta tocoferol quinona o tocoferol quinol poden ser reciclats cap a tocoferol mitjançant una deshidratasa encara no caracteritzada, als cloroplasts. Aquesta els hi extreu el grup hidroxil de la cua fitil i els hi introdueix un doble enllaç per a formar uns intermediaris, els quals mitjançant la TC formen tocoferols (Kobayashi & DellaPenna, 2008). Per tant, les funcions de la vitamina E són protegir a les membranes mitjançant les reaccions químiques i físiques amb el $^1\text{O}_2$, així com inhibir la propagació de la peroxidació lipídica mitjançant la reacció química amb els radicals lipídics.

Pel que fa a la funció química dels tococromanols, aquesta ve donada per la capacitat que té l'anell cromanol de donar hidrogen fenòlic als radicals lipídics. De fet, aquesta efectivitat antioxidant ve determinada per substitucions d'electrons a la zona pròxima del grup hidroxil del cap cromanol, i en membranes biològiques s'ha demostrat que les formes α són els donadors d'hidrogen més potents, seguits per les formes β i γ , i finalment, les δ . Tot i així, la capacitat antioxidant no només depèn de l'estructura de la vitamina E, sinó també de la seva mobilitat i accessibilitat a les membranes (Serbinova *et al.*, 1991). Mentre que *in vitro* l' α -tocoferol i l' α -tocotrienol tenen una activitat equivalent quan s'estudien en hexà, l' α -tocotrienol mostra una major activitat antioxidant contra els radicals lipídics peroxil quan s'incorporen en liposomes de fosfatidilcolina (Suzuki *et al.*, 1993). Això podria ser degut a que a les membranes biològiques, que consisteixen en una complexa varietat de lípids polars distribuïts de forma no homogènia, l' α -tocoferol no es troba distribuït de manera tan homogènia i es troba més associat a zones fluïdes (Gómez-Fernández *et al.*, 1989). En canvi, l' α -tocotrienol es troba més a prop de la superfície de la membrana, té una distribució més uniforme en la bicapa lipídica així com una major capacitat de reciclatge, per la qual cosa s'ha proposat que aquest té una major efecte antioxidant que l' α -tocoferol (Serbinova *et al.*, 1991; Suzuki *et al.*, 1993; Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996).

Als cloroplasts la funció antioxidant dels tocoferols, en concret de l' α -tocoferol, permet, per tant, protegir el fotosistema II del $^1\text{O}_2$ (Trebst *et al.*, 2002; Kruk *et al.*, 2005). En aquests orgànuls, els tocoferols tenen un funció

Introducció

En aquest estudi es van utilitzar llavors mutants *vte1*; les quals sintetitzen els precursors dels tocoferols (MPBQ i DMPBQ); i *vte2*, les quals no sintetitzen tocoferols ni els seus precursors. Mentre que la germinació no es va veure afectada per la deficiència de tocoferols, si els mutants es trobaven en condicions d'envelliment accelerat, el percentatge de germinació disminuïa molt en comparació amb les control. Així mateix, als mutants *vte2* es va observar que les deficiències en tocoferols generaven plàntules més petites amb defectes als cotiledons i a les arrels com a conseqüència d'una peroxidació lipídica no controlada. Aquests efectes, però, no s'observaren al mutant *vte1*, ja que el DMPBQ, que també té funció antioxidant, va prevenir la peroxidació lipídica. Aquest, però, no va poder mantenir la longevitat de la llavor. Així doncs, gràcies a la utilització d'aquests mutants (*vte1* i *vte2*) es va observar que els tocoferols tenen un paper essencial en mantenir la longevitat de les llavors així com són necessaris per a controlar els nivells de peroxidació lipídica durant la germinació i el correcte desenvolupament de les plàntules (Sattler *et al.*, 2004). Resultats similars van ser obtinguts a l'estudi de Mène-Saffrané *et al.* (2010), els quals, addicionalment, van observar que els tocoferols també són essencials per a limitar la peroxidació lipídica durant la dessecació de les llavors d'*A. thaliana*.

Una altra funció dels tocoferols podria ser la regulació de l'expressió gènica i les respostes de defensa mitjançant la modulació dels nivells de productes de peroxidació lipídica. Mutants *vte2* de plàntules d'*A. thaliana* mostraren que nivells elevats de peroxidació no enzimàtica corresponien a un increment de l'expressió de gens de defensa, els quals no foren induïts al mutant *vte1*. Per tant, els tocoferols, o el DMPBQ en plantes *vte1*, limiten la peroxidació no enzimàtica durant la germinació i desenvolupament de la plàntula, prevenint l'activació bioquímica i transcripcional inapropiada de respostes de defensa (Sattler *et al.*, 2006).

Si bé la funció dels tocoferols a les llavors és coneguda, evidències sobre el paper dels tocotrienols en aquestes són més escasses. Franzen *et al.* (1991), Falk *et al.* (2004) i Horvath *et al.* (2006b) van suggerir que els tocotrienols poden estar

protegint de la peroxidació lipídica als greixos i olis dels cossos lipídics que es troben a l'endosperm. Tot i que la distribució dels tocotrienols en certes famílies d'espècies vegetals així com la seva acumulació preferencial en llavors pot estar indicant funcions diferents a les que duen a terme els tocoferols en les fulles, són necessaris estudis sobre localització tissular dels tocotrienols per tal de comprendre les funcions específiques que realitzen en les llavors.

6. Models d'estudi

6.1. Família Arecaceae i *Chamaerops humilis*

La família Arecaceae és un grup monofilètic del clade de les commelinídes de les monocotiledònies que es divideix en cinc subfamílies: Calamoideae, Nypodeae, Coryphoideae, Ceroxyloideae i Arecoideae (Asmussen *et al.*, 2006; Baker *et al.*, 2009). Aquesta família conté entre 2.400 i 2.600 espècies de palmeres que es van originar al bioma dels boscos tropicals. La seva diversificació va començar a la meitat del període Cretàcic a Laurasia; el continent sorgit a l'hemisferi nord resultat de la separació del supercontinent Pangea. Aquesta diversificació es va produir a una taxa constant fins al final de l'Oligocè, quan van començar a aparèixer més espècies (Couvreur *et al.*, 2011).

Els fruits d'aquesta família són drupes fibroses o baies que poden contenir fins a deu llavors, però moltes espècies contenen només una llavor per fruit tot i que l'ovari sigui tricarpelar. Els fruits estan compostos, des de la part més externa fins a la més interna, per un exocarp, mesocarp i endocarp. Aquest últim és dur en el cas de les drupes o carnós en el cas de les baies, tot i que en alguns taxons es troba indiferenciat. Les llavors, depenent de la seva tolerància a la dessecació, poden ser ortodoxes o recalcitrants, i consisteixen en un embrió i un endosperm normalment rodejat d'una coberta molt prima que es troba en estret contacte amb l'endocarp (**Figura 6**, Baskin & Baskin, 2013).

Degut a la gran quantitat de lípids que acumulen i a la seva fàcil obtenció a causa de la seva extensió ornamental, les llavors d'aquesta família s'han escollit en

Introducció

aquesta tesi com a model per a estudiar la distribució de vitamina E entre diferents subfamílies i espècies, així com l'acumulació diferencial d'aquesta vitamina en diferents teixits.

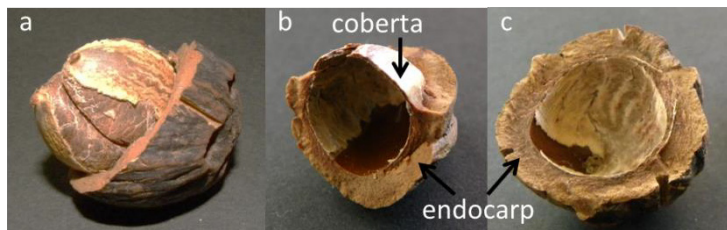


Figura 6. Fruits de *Parajubaea torallyii* var. *microcarpa*: a) fruit amb dues llavors; b) i c) detall del fruit i de la llavor on es pot observar la coberta de la llavor, que es troba en estret contacte amb l'endocarp.

Chamaerops humilis L. pertany a la família Arecaceae, en concret a la subfamília Coryphoideae. El seu nom prové de les paraules gregues “chamai”, que vol dir petit, i “rhops”, que vol dir arbust. És la única espècie del gènere *Chamaerops* i és autòctona de la Península Ibèrica (Merlo *et al.*, 1993). Juntament amb *Phoenix theophrasti* i *P. canariensis* (palmera autòctona de les illes Canàries) són les úniques palmeres natives d'Europa continental, estenent-se per la conca Mediterrània occidental, la costa Mediterrània d'Espanya i Portugal, oest d'Itàlia, algunes parts del sud de França, diverses illes Mediterrànies i nord-oest d'Àfrica (Global Biodiversity Information Facility [GBIF], 2016). Creix en diversos tipus de sòls, com en pedra calcària, i sempre es troba en localitzacions assolellades i seques (Merlo *et al.*, 1993).

Des del punt de vista ecològic, aquesta espècie ajuda a prevenir l'erosió i la desertificació del terreny, és resistent als incendis forestals actuant com a espècie rebrotadora i és molt tolerant a les pertorbacions, com la deforestació i el pastoreig. És una planta dioica amb fulles escleròfil·les palmades amb un tronc fibrós sense branques, el qual es troba recobert de cicatrius de les corones de les fulles d'anys anteriors (**Figura 7**). Aquesta espècie es pot propagar de manera vegetativa a través de rizomes o bé a través de llavors. Les seves flors són inflorescències que apareixen a la primavera, i mentre que les flors masculines són sempre grogues, les

flors femenines són grogues, tornant-se verdes un cop pol·linitzades. Els fruits apareixen entre setembre i octubre, són grocs però es tornen vermellorsos i marronosos quan maduren, i cadascun conté una sola llavor coberta per un mesocarp fibrós (Herrera, 1989; Merlo *et al.*, 1993).

La llavor de *C. humilis* està formada per un embrió, un endosperm molt dur i una coberta que es troba en contacte amb l'endocarp, el qual s'interna i està en contacte amb l'endosperm. A l'embrió, que no es troba completament desenvolupat, s'hi poden diferenciar dues parts: el pecíol cotiledonar, que es troba adjacent a l'opercle, i una fulla cotiledonar, que es troba a l'interior de la llavor. Aquesta fulla actua com a *haustorium*, absorbint i metabolitzant els productes de la hidròlisi de l'endosperm. En canvi, el pecíol cotiledonar conté la beina cotiledonar, la qual conté l'eix plumular; que consisteix en un epicòtil amb primordi foliar; i l'eix radicular; que conté l'àpex radicular a l'extrem proximal. Durant la germinació, el pecíol cotiledonar és el que trenca l'opercle, sent el primer teixit que surt de la llavor, mentre que l'*haustorium* s'expandeix fins a ocupar gairebé tota la llavor a mesura que aquesta va germinant i la plàntula va desenvolupant-se. En el cas de les palmeres, la germinació no s'acaba amb l'emergència del pecíol cotiledonar, sinó que continua amb la seva protrusió, trobant dues etapes de germinació: I) emergència del pecíol cotiledonar i II) emergència de la radícula i de la plúmula de la beina cotiledonar. Per tant, en les palmeres, es considera que la germinació comença amb la protrusió del pecíol cotiledonar i acaba amb la emergència de la plúmula. La germinació de les palmeres és epigea, és a dir, es produeix sota terra, i en el cas de *C. humilis* la germinació és remota ligular, on l'eix embrionari del pecíol cotiledonar es separa de la llavor, la radícula surt de la beina cotiledonar i la plúmula emergeix d'una esquerda longitudinal (en anglès, *longitudinal rift*) d'aquesta (Baskin & Baskin, 2013; 2014). A mesura que la plàntula es va desenvolupant, les arrels secundàries apareixen lateralment a la radícula provinent de la beina cotiledonar, mentre que de la plúmula sorgeix la primera fulla vertadera protegida per una beina.

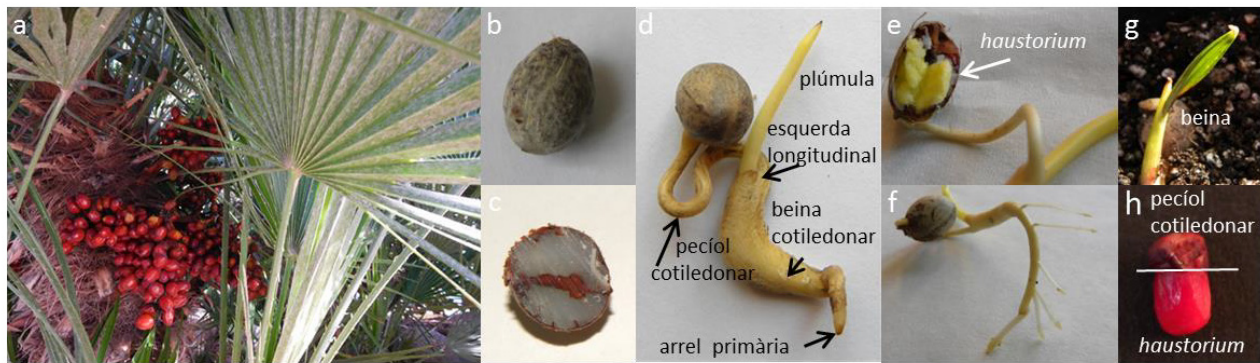


Figura 7. a) Femella de *C. humilis* amb fruits madurs; b) llavor no germinada; c) tall transversal d'una llavor. S'observa l'endocarp (marró) i l'endosperm (blanc); d) llavor germinada on s'observa la beina cotiledonar de la qual sorgeix la plúmula i l'arrel primària; e) detall de l'*haustorium* d'una llavor ja germinada. S'observa com gairebé no queda endosperm; f) arrels secundàries que sorgeixen de l'eix radicular; g) primera fulla que sorgeix de la plúmula. S'observa la beina; h) embrió no desenvolupat tenyit amb tetrazoli. Es diferencien dues parts: el pecíol cotiledonar i la que generarà l'*haustorium*.

Degut a que les llavors d'aquesta espècie són ortodoxes (González-Benito *et al.*, 2006) i presenten dormició morfofisiològica (Baskin & Baskin, 2014), un cop les llavors cauen de la planta mare formen bancs de llavors, on les llavors romanen en dormició fins èpoques climàtiques favorables per a la seva germinació.

Les llavors de *C. humilis* contenen un gran contingut de vitamina E, en concret de tocotrienols. Així doncs, aquesta espècie es va escollir com a planta model per tal d'estudiar el paper de la vitamina E en llavors en estat de dormició així com en diferents fases de germinació, tant en condicions naturals com en cambres de germinació.

6.2. *Cistus albidus*

Cistus albidus L. és una espècie dicotiledònia pertanyent a la família Cistaceae. Aquesta espècie es distribueix entre el sudoest d'Europa fins al nord-est d'Àfrica, i en concret es troba àmpliament distribuït per l'oest del Mediterrani des del nivell del mar fins als 1400 metres (Blasco & Mateu, 1995). Creix en sols calcaris i és resistent a l'estrès per sequera, mostrant una gran capacitat per a créixer en ambients degradats. És una planta monoica que presenta un arbust escleròfil·le que forma branques. Les seves fulles són ovalades, amb la característica de ser

amfistomàtiques i de disposar tricomes en les superfícies adaxials i abaxials. Aquestes tenen entre 20-50 mm de llargada i 10-30 mm d'amplada, i poden girar-se durant la sequera. Les flors hermafrodites són roses, disposen de 5 pètals i es produeixen des de febrer fins al juny (Roy & Sonié, 1992).

Els seus fruits són càpsules que contenen moltes llavors, les quals presenten dormició física degut a la inhabilitat de la coberta per a absorbir aigua (**Figura 8**, Baskin & Baskin, 2014). Aquesta característica, típica de la família Cistaceae, es deu a que la coberta disposa d'unes cèl·lules macrosclereides en forma de palissada amb parets secundàries lignificades, les quals contenen impregnacions de substàncies resistents a l'aigua com ceres, suberina, cutina i lignina, fent impermeables aquestes llavors (Rolston, 1978; Baskin *et al.*, 2000; Baskin & Baskin 2014).



Figura 8. a) Planta de *Cistus albidus* al parc natural de Montserrat; b) fruits madurs; c) disposició de les llavors dintre d'un fruit.

En condicions naturals, les llavors del gènere *Cistus* es mantenen en dormició fins que la calor generada pel foc (Thanos & Georghiou, 1988; Roy & Sonié, 1992) o el moviment del sòl per efecte humà o animal (Trabaud & Renard, 1999) fa més tova la coberta, creant una obertura per la que es produeix l'entrada d'aigua. Un cop l'aigua arriba a l'embrió, la germinació es promou en una gran quantitat de temperatures i condicions de llum (Thanos & Georghiou, 1988; Trabaud & Renard, 1999).

Introducció

Des del punt de vista ecològic, *C. albidus* és una de les principals espècies que germinen després d'un incendi. Degut al seu grau d'impermeabilitat i als llargs períodes de temps que aquestes passen formant bancs de llavors fins a poder germinar, *C. albidus* s'ha escollit com a planta model per tal d'estudiar la producció i la qualitat de les llavors que produeix mitjançant l'estudi de la seva viabilitat, germinació i contingut de vitamina E. A més, com que aquesta espècie presenta longevitats de 15 anys (Roy & Sonié, 1992), la fa un bon model per tal d'estudiar com la producció de llavors es veu afectada per l'edat. Així mateix, al ser una espècie molt representativa de la nostra flora, es poden estudiar diferents poblacions per tal d'observar si la qualitat de les llavors es veu afectada per l'ambient, alhora que si es produeixen canvis en els continguts de vitamina E, es pot estudiar com aquests estan afectant a la germinació i dormició de les llavors.



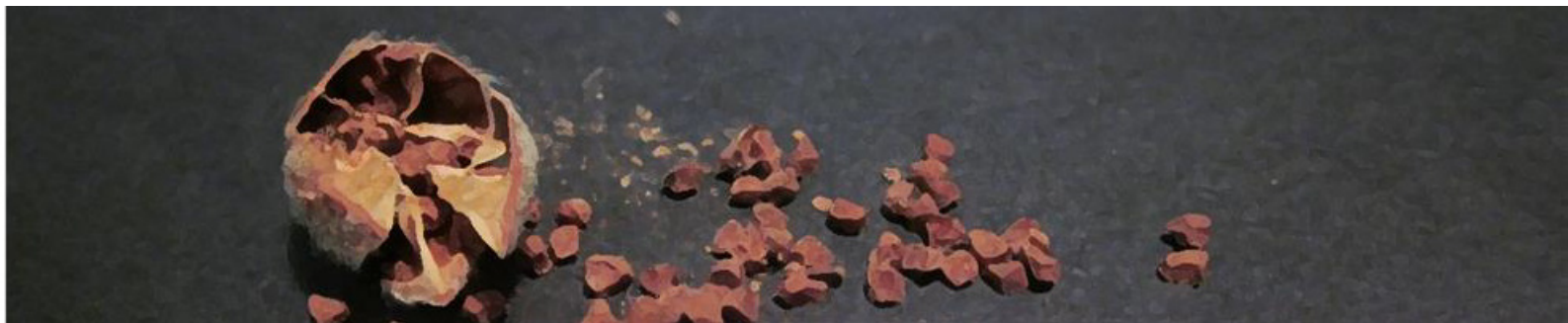
OBJECTIUS

OBJECTIUS

L'objectiu principal d'aquesta tesi ha estat estudiar la distribució, acumulació, funció i biosíntesi dels tocoferols i tocotrienols (vitamina E) en llavors, així com els seus mecanismes de control.

Per a dur a terme aquest objectiu, es van proposar els següents objectius específics:

- Estudiar la distribució dels tocoferols i tocotrienols a les llavors de la família Arecaceae per tal d'explorar possibles tendències evolutives, així com avaluar la seva acumulació diferencial en diverses parts de les llavors a fi de determinar possibles funcions específiques.
- Analitzar la funció antioxidant dels tocotrienols i tocoferols durant l'emmagatzematge, quiescència, dormició i germinació de les llavors utilitzant com a model d'estudi llavors de la família Arecaceae.
- Determinar l'efecte hormonal i redox sobre la regulació transcripcional de la vitamina E durant la germinació de les llavors de *C. humilis*.
- Avaluar l'efecte de l'edat de la planta mare sobre els nivells de vitamina E amb la finalitat de determinar mecanismes de control de producció i qualitat de llavors utilitzant com a planta model l'espècie mediterrània *C. albidus*.
- Estudiar l'efecte de la influència materna sobre la viabilitat, dormició i capacitat germinativa de les llavors de *C. albidus* en dues poblacions exposades a condicions ambientals contrastades, avaluant l'efecte de la vitamina E sobre aquests paràmetres.



INFORME DELS DIRECTORS DE TESI



Barcelona, 19 de desembre de 2016

La Dra. Leonor Alegre Batlle i el Dr. Sergi Munné Bosch, com a directora i co-director, respectivament, de la Tesi Doctoral titulada “**Biosíntesi, distribució, acumulació i funció de la vitamina E en llavors: mecanismes de control**” presentada per la doctoranda Laura Siles Suarez,

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

Capítol 1. Article “**Vitamin E analyses in seeds reveal a dominant presence of tocotrienols over tocopherols in the *Arecaceae* family**”, publicat a la revista *Phytochemistry*, índex d'impacte (2015) de 2.779. En aquest treball es fa un cribratge dels nivells de tocoferols i tocotrienols en llavors de 84 espècies de palmeres amb l'objectiu de comprendre millor la seva distribució en llavors de monocotiledònies. Cal destacar l'aproximació experimental original en que s'analitzen els nivells de vitamina E per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) en les llavors d'un gran nombre d'espècies. Es descriu de forma original que mentre pràcticament totes les espècies estudiades (83 de 84) acumulen tocotrienols, només el 58,3% (49 de 84) acumulen a més tocoferols a les llavors, la qual cosa demostra que l'acumulació de tocotrienols (i no la de tocoferols) és un tret conservat per l'evolució en la família de les *Arecaceae*. La doctoranda ha realitzat tot el mostreig, les anàlisis de les mostres, el tractament estadístic i l'elaboració dels resultats, i a més ha participat en el disseny experimental i discussió dels resultats, constant per tant com a primera autora del treball. La doctoranda ha demostrat una gran capacitat de treball, així com un excel·lent maneig en els mostrejos i una excel·lent predisposició en la introducció a l'ús de

l'HPLC per a les anàlisis de vitamina E. La doctoranda demostra també una gran capacitat d'anàlisi i interpretació dels resultats.

Capítol 2. Article “**Enhanced tocopherol levels during early germination events in *Chamaerops humilis* var. *humilis* seeds**”, publicat a la revista *Phytochemistry*, índex d'impacte (2015) de 2.779. En aquest treball s'examinen les variacions en els continguts de vitamina E en el margalló, única palmera que es troba de forma natural a la península ibèrica, amb un èmfasi especial en la possible funció dels tocoferols i tocotrienols en la protecció de la peroxidació lipídica durant la germinació de les llavors. Cal destacar la importància de l'estudi en quan a la dificultat de treballar en aquest tipus de llavors que implica la posada a punt de nous protocols de germinació i el treball minuciós amb diferents tipus de teixits per esbrinar el paper diferencial dels tocoferols i tocotrienols en llavors de monocotiledònies. La doctoranda ha realitzat tot el mostreig, les anàlisis de les mostres, el tractament estadístic i l'elaboració dels resultats, i a més ha participat en el disseny experimental i discussió dels resultats, constant per tant com a primera autora del treball. La doctoranda ha demostrat una gran capacitat de treball, així com una excel·lent predisposició a la millora dels experiments realitzats.

Capítol 3. Article “**Perennially young: seed production and quality in controlled and natural populations of *Cistus albidus* reveal compensatory mechanisms that prevent senescence in terms of seed yield and viability**”, publicat a la revista *Journal of Experimental Botany*, índex d'impacte (2015) de 5.677. En aquest treball es descriu, entre altres aspectes, la importància de la vitamina E com a marcador de la qualitat de les llavors en estudis de senescència en plantes perennes. Cal destacar l'aproximació experimental, amb un caire molt més ecofisiològic que en els anteriors capítols, original i amb un alt valor científic, ja que es demostra per primera vegada que les reduccions de biomassa degudes a condicions ambientals desfavorables en condicions naturals poden evitar l'aparició de símptomes de senescència en plantes d'edat avançades, com per exemple reduccions en la viabilitat de les llavors o canvis negatius en la seva composició

com podrien ser alteracions en els nivells de vitamina E. La doctoranda ha realitzat part dels mostreigs i anàlisis de les mostres, ha col·laborat en el tractament estadístic i l'elaboració dels resultats, i a més ha participat en el disseny experimental i discussió dels resultats, constant per tant com a co-primera autora del treball. La doctoranda demostra una gran capacitat de treball, així com d'anàlisi i interpretació dels resultats, a més d'un excel·lent maneig al camp i al laboratori.

Capítol 4. Article “**Marked differences in seed dormancy in two populations of the Mediterranean shrub, *Cistus albidus* L.**”, enviat per a la seva publicació a la revista *Plant, Ecology and Diversity*, índex d'impacte (2015) de 2.349. En aquest darrer treball experimental es descriu la importància de l'ambient matern com a determinant de processos de dormició de llavors en una espècie d'un gran valor ecològic, amb un èmfasi especial en l'estudi d'hormones i vitamina E com a possibles determinants de la dormició i viabilitat de les llavors, respectivament. Es descriu per primera vegada que *C. albidus* presenta dormició fisiològica regulada pels nivells d'àcid abscísic i gibberel·lines. A més, es discuteixen alguns dels factors que determinen diferents graus d'acumulació de vitamina E en llavors. La doctoranda ha realitzat tot el mostreig, les anàlisis de les mostres, el tractament estadístic i l'elaboració dels resultats, i a més ha participat en el disseny experimental i discussió dels resultats, constant per tant com a primera autora del treball. La doctoranda ha demostrat una gran capacitat de treball i ha participat també activament en la redacció de l'article. La doctoranda demostra un excel·lent grau de maduresa científica.

I, per que així consti als efectes oportuns,

Dra. Leonor Alegre Batlle

Dr. Sergi Munné Bosch



RESULTATS

Capítol 1

L'anàlisi de vitamina E en llavors revela una presència dominant de tocotrienols enfront tocoferols a la família Arecaceae



Chapter 1

Vitamin E analyses in seeds reveal a dominant presence of tocotrienols over tocopherols in the Arecaceae family

Laura Siles, Jana Cela, Sergi Munné-Bosch

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

Publicat a **Phytochemistry** (2013) 95: 207-214

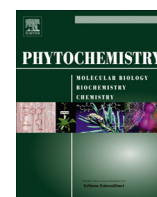
RESUM DEL CAPÍTOL 1

Tot i que es considera que els tocoferols prevenen el dany oxidatiu durant la quiescència i la dormició de les llavors en totes les angiospermes, diverses espècies monocotiledònies acumulen tocotrienols a les llavors, la funció dels quals encara és incerta. En aquest treball es va voler descriure la distribució dels tocoferols i tocotrienols en llavors de la família Arecaceae per tal d'examinar possibles tendències en l'acumulació de la vitamina E entre diferents clades de la mateixa família. Amb aquest fi, es va examinar el contingut de tocoferols i tocotrienols en llavors de 84 espècies. A més, es va avaluar la composició de vitamina E de la coberta, endosperm i embrió de 6 espècies diferents per tal de determinar possibles funcions específiques de teixit per a diferents homòlegs de vitamina E. Mentre que les llavors d'un 98,8% (83 de 84) de les espècies acumulaven tocotrienols, només un 58,3% (49 de 84) van acumular tocoferols. La presència dels tocoferols no va mostrar una tendència evolutiva clara, apareixent només en alguns clades de manera aleatòria. La localització específica de vitamina E en els diferents teixits de la llavor va revelar que l'embrió contenia majoritàriament α -tocoferol (en les espècies que acumulaven tocoferols) o α -tocotrienol (en les espècies deficientes en tocoferols). No obstant, algunes espècies, com *Socratea exorrhiza*, acumularen majoritàriament β -tocotrienol, mentre que *Parajubaea torallyi* acumulava una barreja de tocoferols i tocotrienols a l'embrió. Aquests resultats suggereixen que els tocotrienols poden jugar un paper protector similar al que exerceixen els tocoferols a les llavors, almenys en algunes espècies de la família Arecaceae. Es conclou que l'acumulació de tocotrienols, més que no pas de tocoferols, és un tret conservat de les llavors de la família Arecaceae.



Contents lists available at ScienceDirect

Phytochemistry

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

Vitamin E analyses in seeds reveal a dominant presence of tocotrienols over tocopherols in the Arecaceae family



Laura Siles, Jana Cela, Sergi Munné-Bosch *

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 April 2013

Received in revised form 9 July 2013

Available online 3 August 2013

Keywords:

Dormant seeds
Palm trees
Seed composition
Seed quality
Tocochromanols
Vitamin E

ABSTRACT

Tocopherols are thought to prevent oxidative damage during seed quiescence and dormancy in all angiosperms. However, several monocot species accumulate tocotrienols in seeds and their role remains elusive. Here, we aimed to unravel the distribution of tocopherols and tocotrienols in seeds of the Arecaceae family, to examine possible trends of vitamin E accumulation within different clades of the same family. We examined the tocopherol and tocotrienol content in seeds of 84 species. Furthermore, we evaluated the vitamin E composition of the seed coat, endosperm and embryo of seeds from 6 species, to determine possible tissue-specific functions of particular vitamin E forms. While seeds of 98.8% (83 out of 84) of the species accumulated tocotrienols, only 58.3% (49 out of 84) accumulated tocopherols. The presence of tocopherols did not follow a clear evolutionary trend, and appeared randomly in some clades only. In addition, the tissue-specific location of vitamin E in seeds revealed that the embryo contains mostly α -tocopherol (in seed tocopherol-accumulating species) or α -tocotrienol (in seed tocopherol-deficient species). However, some species such as *Socratea exorrhiza* mostly accumulate β -tocotrienol, and *Parajubaea torallyi* accumulates a mixture of tocopherols and tocotrienols in the embryo. This suggests that tocotrienols can play a similar protective role to that exerted by tocopherols in seeds, at least in some species of the Arecaceae family. We conclude that tocotrienol, rather than tocopherol, accumulation is a conserved trait in seeds of the Arecaceae family.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Tocochromanols, including both tocopherols and tocotrienols, are lipid-soluble antioxidant molecules that belong to the group of vitamin E compounds, formed by a chromanol ring system and a polyprenyl side chain. Whereas tocopherols saturate the chain, tocotrienols have double bonds at the 3', 7' and 11' positions. Depending on the position of methyl groups on the chromanol ring, tocochromanols are classified into four homologues: α -, β -, γ - and δ - forms (Kamal-Eldin and Appelqvist, 1996).

Tocopherols are thought to play an essential role in plants by preventing oxidative damage during seed quiescence and dormancy in all angiosperms (Horvath et al., 2006a; Smirnoff, 2007; Falk and Munné-Bosch, 2010), although this role has only been demonstrated in *Arabidopsis thaliana* (Sattler et al., 2004; Mène-Saffrané et al., 2010). Reactive oxygen species (ROS) are key signaling metabolites when they are produced transiently, but at high concentrations they are considered potentially harmful molecules for seeds, since they can cause cell damage by oxidizing several essential components, including lipids, proteins and nucleic acids

(Bailly, 2004). ROS have different roles in seeds. While ROS production is kept to a minimum to maintain seed longevity and dormancy, ROS signaling is a key factor to break dormancy, since it acts as a signaling trigger alone or by interacting with hormones (Bailly et al., 2008). During germination, ROS production is largely increased and antioxidant compounds, like tocochromanols, have to modulate transient ROS accumulation (signaling effect) and prevent sustained ROS accumulation (deleterious effect, Bailly, 2004). Tocochromanols scavenge lipid peroxyl radicals, and quench and scavenge singlet oxygen and various other ROS (Simontacchi et al., 1993; Sattler et al., 2004; Falk and Munné-Bosch, 2010). These antioxidants are accumulated in seeds to protect the polyunsaturated fatty acids (PUFAs) from lipid peroxidation (Simontacchi et al., 2003; Falk and Munné-Bosch, 2010).

It is generally assumed that tocopherols are present ubiquitously in the plant kingdom and in almost all plant parts, while tocotrienols are only present in some species and in specific tissues or organs, such as the fruits, seeds and latex of some species (Horvath et al., 2006a; Falk and Munné-Bosch, 2010). In seeds, the predominant tocopherol form that is accumulated is γ -tocopherol (Hess, 1993; Munné-Bosch and Alegre, 2002; Falk and Munné-Bosch, 2010). However, in some species, α -tocopherol is the predominant form, including several *Euphorbia* species, *Picea abies*, *Vitis vinifera*, *Nigella sativa* and *Pisum sativum* (Gaunt and Stowe,

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

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

1967; Franzen and Haab, 1991; Bruni et al., 2004; Al-Saleh et al., 2006; Horvath et al., 2006a,b). Monocots, including *Xyris bialata* and *Xyris peregrina*, accumulate tocopherols and tocotrienols in seeds (García et al., 2011). Other species such as *Zea mays*, *Hordeum vulgare* and *Avena sativa* mainly accumulate tocotrienols in seeds, rather than tocopherols (Falk et al., 2004; Horvath et al., 2006b; Gutiérrez-González et al., 2013).

Arecaceae is a family of palm trees that contain significant amounts of vitamin E in seeds and fruits. The family has its origins in the tropical rainforest biome, and its diversification started in the mid-Cretaceous period in Laurasia. Diversification occurred at a constant rate until the end of the Oligocene period (Couvreur et al., 2011), when more species started to appear. Currently, this family, which is a monophyletic group within the commelinid clade of monocots (Asmussen et al., 2006; Baker et al., 2009), can be divided into five subfamilies: *Calamoideae*, *Nypodeae*, *Coryphoideae*, *Ceroxyloideae* and *Arecoideae* (Asmussen et al., 2006; Baker et al., 2009). *Elais guineensis* and other palm oils are known to be good sources of vitamin E which, indeed, comes from the fruit mesocarp and not from the seed. Red palm oil and palm olein predominantly accumulate γ -tocotrienol (Dauqan et al., 2011) and *E. guineensis* is a good source of α -tocopherol (Choo et al., 2004). However, the oil extracted from *Phoenix dactylifera* is obtained from the seeds, and the principal compound is α -tocopherol (Besbes et al., 2004). The oil obtained from *Washingtonia filifera* seeds is richer in γ -tocotrienol, but all tocopherol forms are found (Nehdi, 2011). Despite these examples, there is still very little information about the content and distribution of vitamin E in different tissues of the seeds in this family.

In the present study, we aimed to unravel the distribution of tocopherols and tocotrienols in seeds of the Arecaceae family, to

examine possible trends of tocotrienol accumulation within different clades. We evaluated the tocopherol and tocotrienol content in seeds of 84 species. In addition, we analyzed the vitamin E composition of the coat, endosperm and embryo of seeds from 6 species to unravel possible tissue-specific functions for particular vitamin E forms.

2. Results

2.1. Vitamin E distribution in the Arecaceae family

The amount of total vitamin E in seeds varied among the different species of the Arecaceae family. It ranged from 0.23 to 1555.82 $\mu\text{g/g}$ seed in *Ptychosperma caryotoides* and *Daemonorops sabut*, respectively. *D. sabut* contained very high levels of vitamin E in seeds compared to the other species of the same family, with values 13.3-fold higher than *Dypsis lutescens*, the species with the second highest vitamin E levels within the Arecaceae (Fig. 1). *D. sabut* was not only extraordinary for the high vitamin E content, but also because it was the only species analyzed (out of 84) that contained tocopherols only. The predominant vitamin E compound in seeds of this family was tocotrienol (in 83 out of 84 species, 98.8%), while tocopherols were present in 58.3% of the species (49 out of 84).

Some species, including *D. lutescens*, *Wodyetia bifurcata*, *Phoenix paludosa*, *Acanthophoenix rousseii*, *Chamaedorea pinnatifrons*, *Chamaedorea elatior* and *Dypsis nauseosa* (species numbers 2, 16, 34, 42, 46, 49 and 70, respectively) contained more than 90% of vitamin E in the tocopherol form (Fig. 1, Suppl. Table 1). α - and γ -tocopherol were the two most abundant compounds in most of the tocopherol-accumulating species. α -tocopherol was the

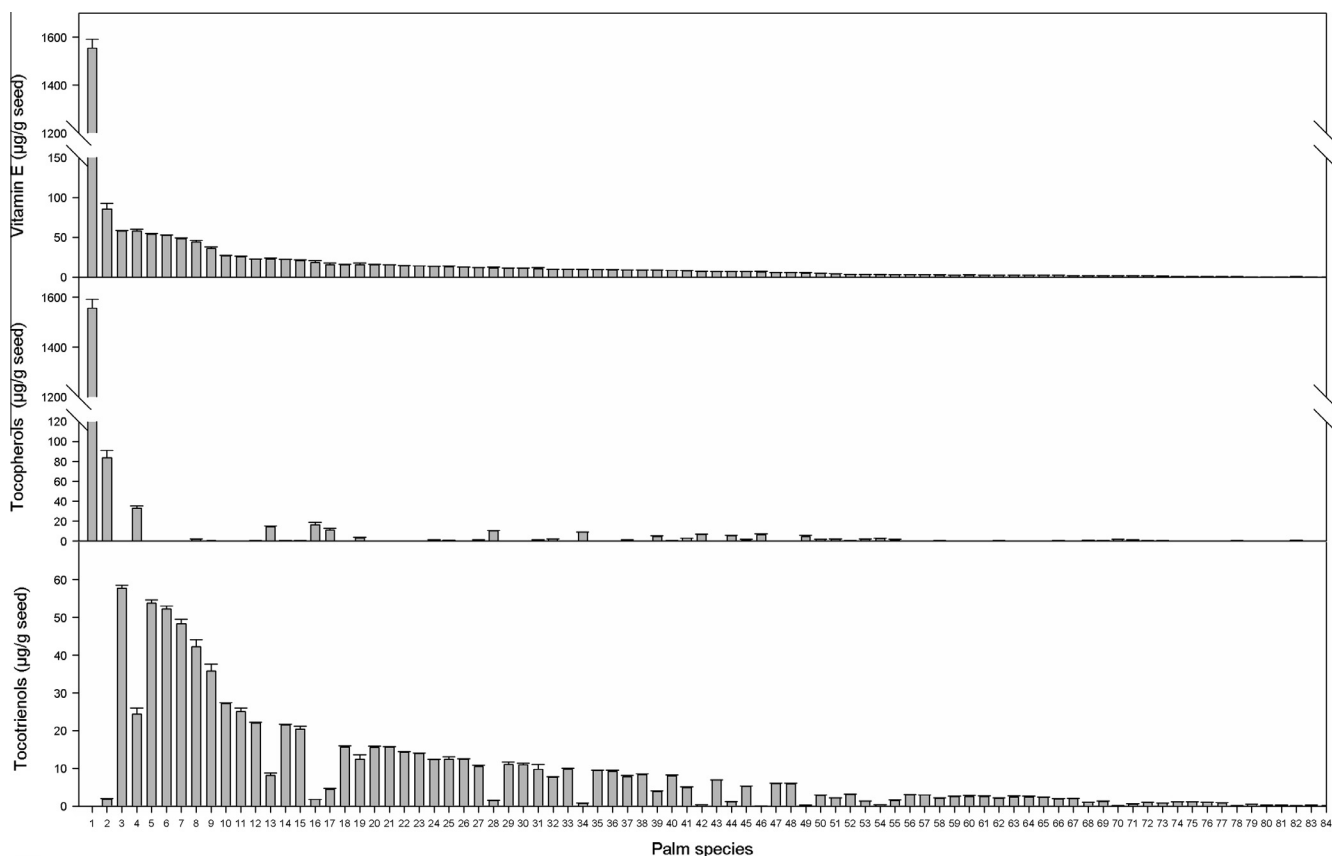


Fig. 1. Amounts of total vitamin E, total tocopherols and total tocotrienols in seeds of the Arecaceae family. Data correspond to the mean \pm SE of $n = 3$. The numbers of the species correspond to the seed list found in Supplementary Table 1.

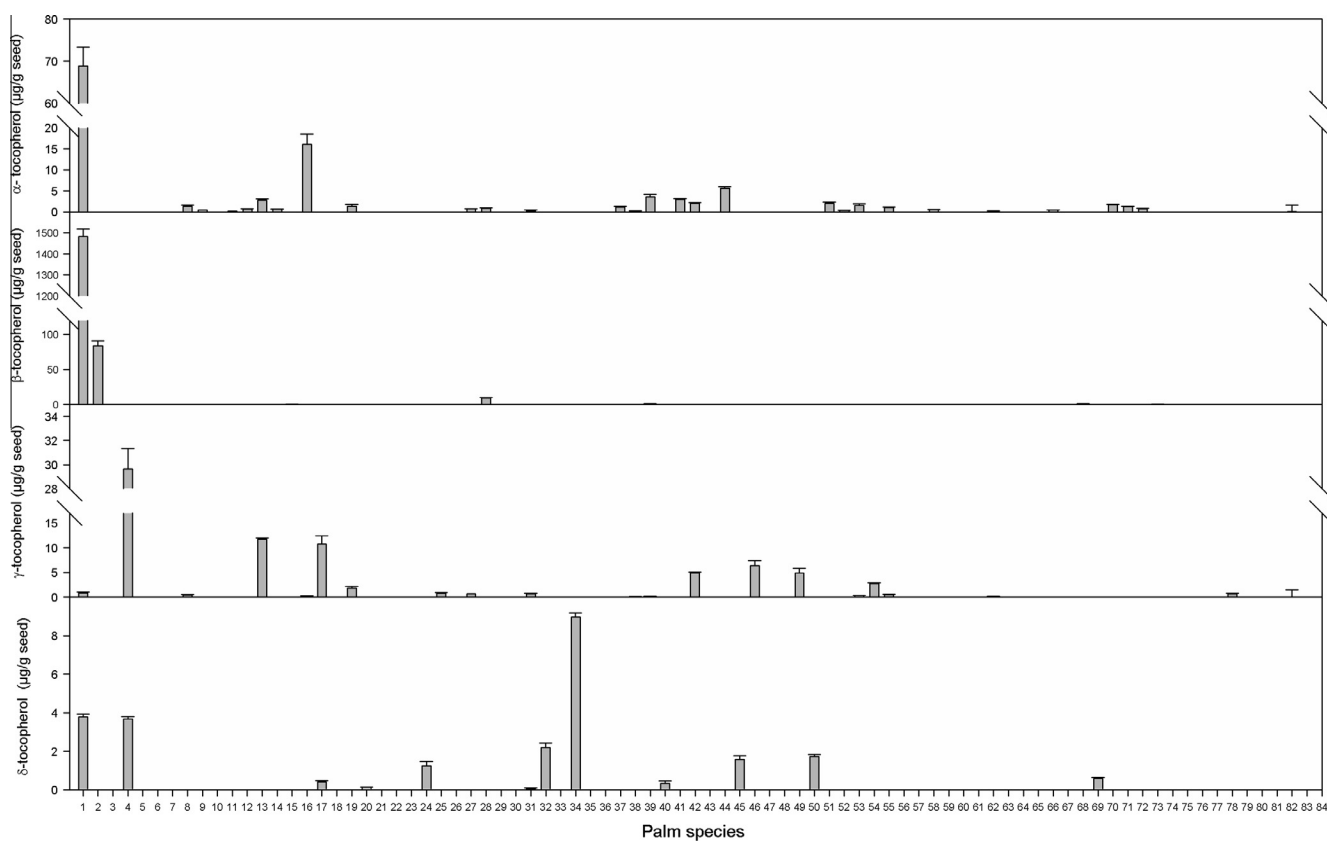


Fig. 2. Amounts of α -, β -, γ - and δ -tocopherol in seeds of the Arecaceae family. Data correspond to the mean \pm SE of $n = 3$. The numbers of species correspond to the seed list found in Supplementary Table 1.

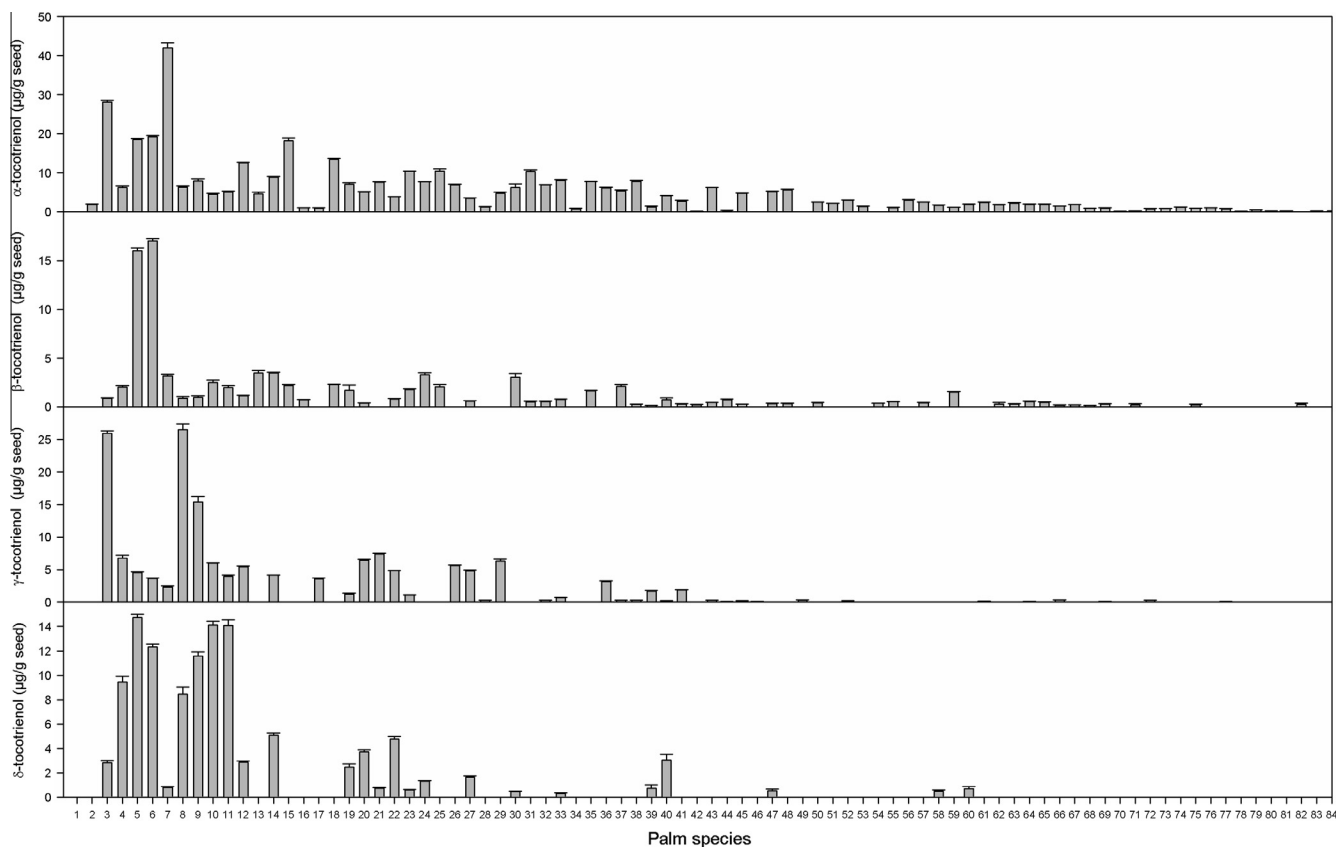


Fig. 3. Amounts of α -, β -, γ - and δ -tocotrienol in seeds of the Arecaceae family. Data correspond to the mean \pm SE of $n = 3$. The numbers of the species correspond to the seed list found in Supplementary Table 1.

compound with the highest values, especially in *D. sabut* (69 µg/g seed), *Butia catarinensis* (species number 4) was the species with the highest amount of γ-tocopherol (29 µg/g seed). Seeds of this family had very low or undetectable levels of β-tocopherol, except the richest vitamin E species *D. sabut* and *D. lutescens* (species numbers 1 and 2, with 1482 and 83 µg/g seed, respectively). Finally, δ-tocopherol was present at low amounts and in a few species only; seeds of *P. paludosa* (species number 34) contained the highest amount of this compound (9 µg/g seed; Fig. 2, Suppl. Table 1).

Tocotrienols were detected in all species examined, with the exception of *D. sabut*. α- and β-tocotrienol were the best represented compounds in most of the species, whereas γ- and δ-tocotrienol were the least. α-tocotrienol followed by γ-tocotrienol were the substances with the highest values, whereas there were similar amounts of β- and δ-tocotrienol. The dominant tocotrienol homologue was different in each species (Fig. 3, Suppl. Table 1).

2.2. Tissue-specific localization of vitamin E in seeds

The distribution of vitamin E between different seed tissues (seed coat, endosperm and embryo) was analyzed in 6 species,

including *Chamaerops humilis* var. *cerifera*, *Parajubaea torallyi* var. *microcarpa*, *Syagrus orinocensis*, *Jubaea chilensis*, *Astrocaryum standleyanum* and *Socratea exorrhiza*. A completely varied distribution between tissues and species was found (Fig. 4, Table 1). The embryo contained the highest amount of vitamin E in all the species analyzed, with the exception of *S. exorrhiza*, in which vitamin E was distributed almost equally between the seed coat and the embryo, but was not detected in the endosperm (Fig. 4).

In species accumulating tocopherols in seeds (*P. torallyi* var. *microcarpa*, *S. orinocensis*, *J. chilensis*, *A. standleyanum* and *S. exorrhiza*), α-tocopherol was the predominant form in the embryo (Table 1). In species accumulating exclusively tocotrienols in seeds (*C. humilis* var. *cerifera*), α-tocotrienol was the predominant form in the embryo. The composition of vitamin E homologues in the seed coat and the endosperm varied greatly between species, but α and γ homologues were the predominant forms in the seed coat, and α, γ and δ homologues in the endosperm (Table 1).

3. Discussion

3.1. Vitamin E distribution in the Arecaceae family

In general, this family accumulates tocotrienols rather than tocopherols. Many species contain tocopherols, but generally in low amounts. Among the tocotrienols, α-tocotrienol seems to be present in most species (only 5 species do not contain α-tocotrienol in seeds). *D. sabut* was the only species of the 84 analyzed that contained tocopherols, but not tocotrienols. Previous studies have demonstrated that tocopherols play an important role in maintaining viability during seed quiescence and longevity in *A. thaliana* (Sattler et al., 2004; Mène-Saffrané et al., 2010). However, the predominant accumulation of tocotrienols rather than tocopherols in the Arecaceae family indicates that tocopherols may be dispensable to protect seeds from oxidative damage. This change in the form of vitamin E accumulated in seeds indicates that tocotrienols may be as efficient as tocopherols for slowing down the ROS produced during long periods of dormancy or storage. In that respect, Matringe et al. (2008) found that tocotrienols can function as efficiently as tocopherols as antioxidants protecting membrane lipids from peroxidation in tobacco leaves. It appears therefore that from a functional point of view tocotrienols can substitute the antioxidant function of tocopherols both in seeds and leaves. It should be considered, however, that aside from tocopherols and tocotrienols, other tocochromanols, such as plastochromanol-8 (PC-8) can exert a protective antioxidant role in seeds (Mène-Saffrané et al., 2010). Therefore, further research is needed to examine the distribution of PC-8 in seeds of the Arecaceae family and establish possible redundant roles, if any, between tocotrienols, tocopherols and PC-8, at least in some of the species.

It appears that the capacity to accumulate tocopherols in seeds was lost more than once in the evolutive process and the viability was not affected. The species analyzed in the present study were spread across three subfamilies: *Calamoideae*, *Coryphoideae* and *Arecoideae* (Fig. 5). The oldest subfamily was *Calamoideae*, which appeared in the Cretaceous period, whereas *Coryphoideae* and *Arecoideae* subfamilies appeared in the middle and at the end of the Cretaceous period, respectively. Only one species of the *Calamoideae* was studied: *D. sabut* (number 1), which is the only species lacking tocotrienols and accumulating the highest amounts of tocopherols. In the *Coryphoideae* subfamily, 65.15% of the genera contain tocopherols, whereas in the *Arecoideae* subfamily this figure stands at 59.14%. These results suggest that the more modern Arecaceae subfamilies contain lower tocopherol content (with the exception of *D. lutescens*, which is within the *Arecoideae* subfamily yet has 97.8% of tocopherols). This contention is however not

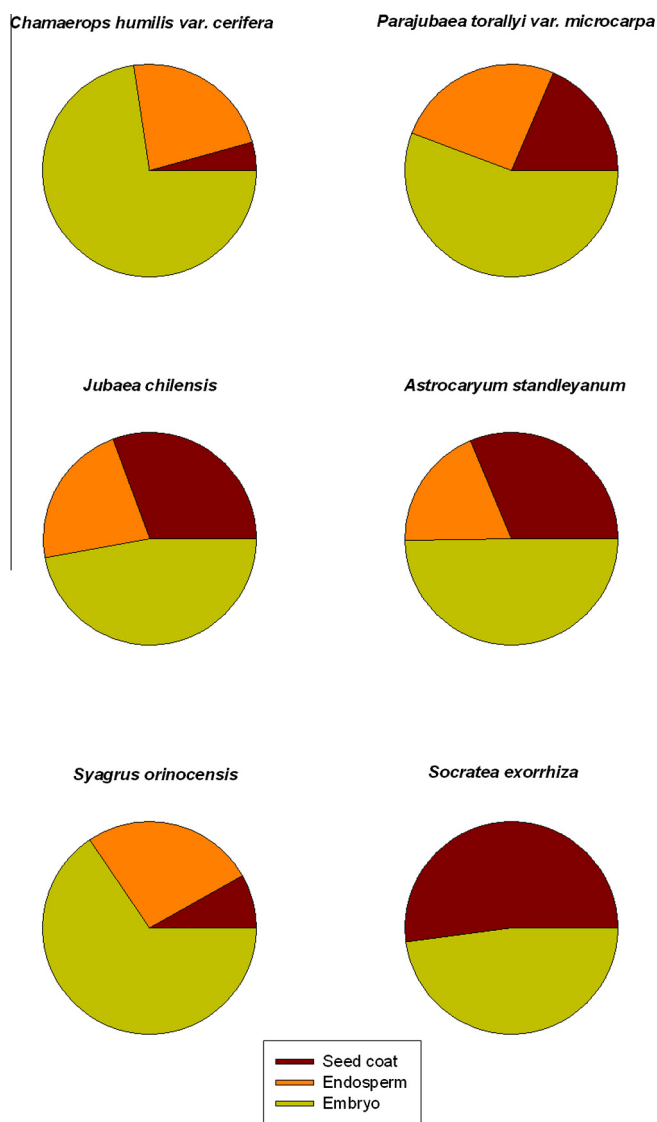


Fig. 4. Distribution of total vitamin E in the seed coat, endosperm and embryo of six species of the Arecaceae family. Data correspond to the mean of n = 3. SE was less than 5% in all tissues and species, except in the seed coat of *Chamaerops humilis* var. *cerifera* (SE = 32% of the mean).

Table 1
Distribution of tocopherols and tocotrienols in the seed coat, endosperm and embryo of six species of the Arecaceae family. Data correspond to the mean ± SE of n = 3. ND, not detected. T, tocopherol. Tt, Tocotrienol.

	α-T	β-T	γ-T	δ-T	α-Tt	β-Tt	γ-Tt	δ-Tt
<i>Jubaea chilensis</i>								
Seed coat	ND	ND	ND	ND	15.47 ± 0.18	1.03 ± 0.10	2.58 ± 0.02	2.96 ± 0.16
Endosperm	ND	ND	ND	ND	0.72 ± 0.03	0.71 ± 0.03	2.94 ± 0.08	11.63 ± 0.19
Embryo	7.77 ± 0.40	ND	ND	ND	16.61 ± 0.66	4.11 ± 0.04	2.08 ± 0.06	3.32 ± 0.17
<i>Parajubaea torally</i> var. <i>microcarpa</i>								
Seed coat	ND	ND	ND	ND	5.85 ± 0.27	0.20 ± 0.07	14.38 ± 0.22	2.56 ± 0.11
Endosperm	ND	ND	ND	ND	4.16 ± 0.23	0.53 ± 0.10	16.16 ± 0.82	11.04 ± 0.58
Embryo	23.12 ± 1.15	ND	ND	ND	12.78 ± 0.64	0.56 ± 0.10	17.40 ± 0.90	15.25 ± 0.81
<i>Astrocaryum standleyanum</i>								
Seed coat	24.55 ± 0.29	ND	ND	ND	5.45 ± 0.17	1.44 ± 0.12	0.92 ± 0.08	0.59 ± 0.15
Endosperm	ND	ND	ND	ND	5.97 ± 0.26	3.74 ± 0.12	3.93 ± 0.12	6.34 ± 0.19
Embryo	49.49 ± 1.98	1.32 ± 0.05	ND	ND	1.38 ± 0.06	0.21 ± 0.01	ND	ND
<i>Syagrus orinocensis</i>								
Seed coat	3.18 ± 0.08	ND	0.14 ± 0.02	ND	0.22 ± 0.13	0.47 ± 0.07	0.25 ± 0.12	ND
Endosperm	ND	ND	0.67 ± 0.06	ND	4.31 ± 0.23	0.52 ± 0.02	6.42 ± 0.24	1.76 ± 0.32
Embryo	21.05 ± 0.42	1.47 ± 0.07	3.30 ± 0.29	ND	2.64 ± 0.13	5.72 ± 0.27	ND	ND
<i>Socratea exorrhiza</i>								
Seed coat	1.32 ± 0.07	ND	2.28 ± 0.18	ND	ND	0.34 ± 0.06	ND	ND
Endosperm	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Embryo	0.57 ± 0.03	ND	ND	ND	ND	3.04 ± 0.50	ND	ND
<i>Chamaerops humilis</i> var. <i>cerifera</i>								
Seed coat	ND	ND	ND	ND	9.49 ± 3.10	0.40 ± 0.14	ND	ND
Endosperm	ND	ND	ND	ND	46.24 ± 1.55	2.97 ± 0.10	2.76 ± 0.07	1.01 ± 0.10
Embryo	ND	ND	ND	ND	159.84 ± 5.35	4.68 ± 0.16	1.20 ± 0.04	1.19 ± 0.09

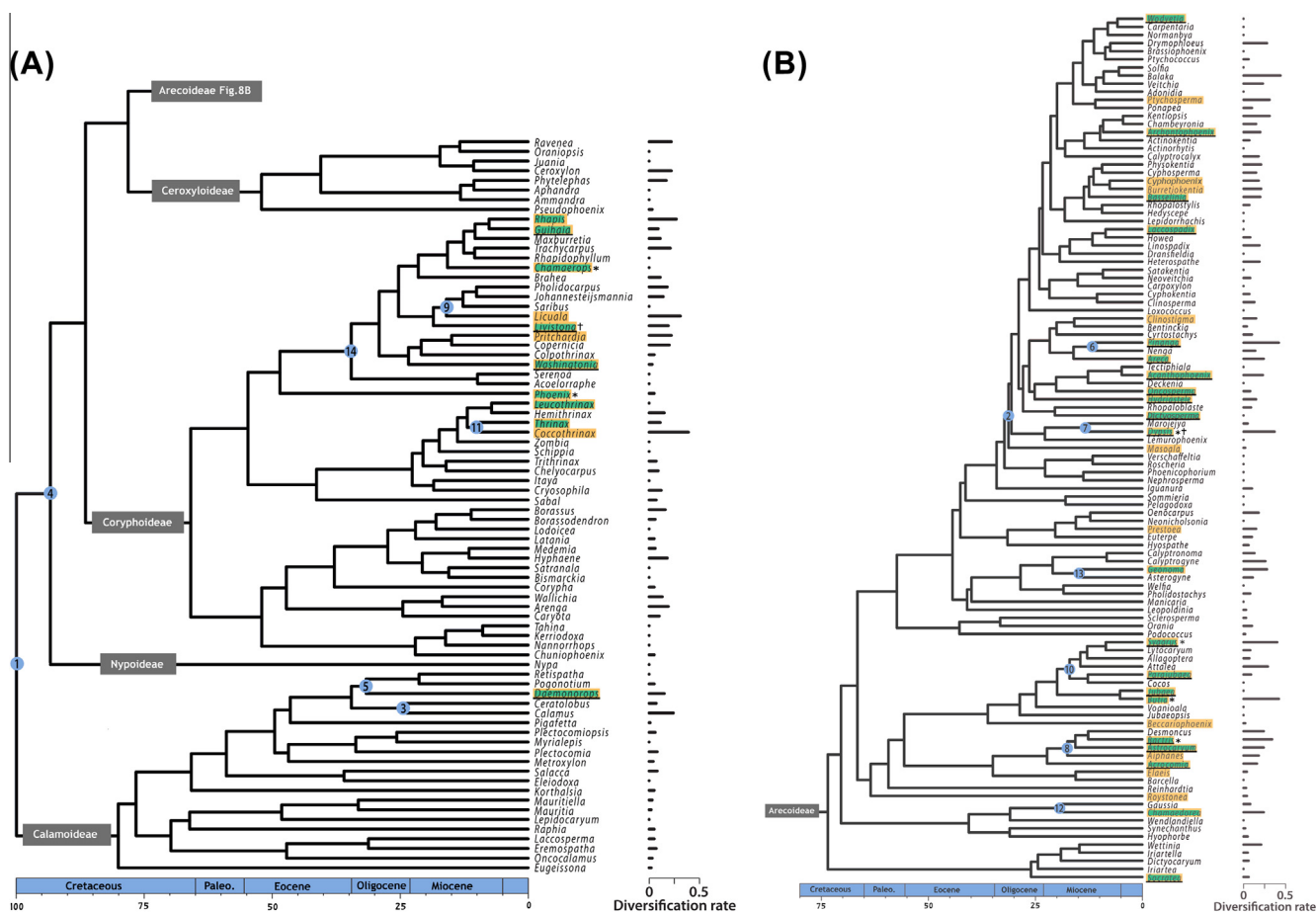


Fig. 5. Cladogram of the Arecaceae family. Genera highlighted in orange are those used in this experiment. The genera highlighted in green are those in which tocopherols were detected and the underlined genera are those in which α-tocopherol was present. An asterisk indicates the genus whose species (or varieties in the case of *Chamaerops humilis*) differ in the presence or absence of tocopherols. † indicates the genus whose species differ in the presence or absence of α-tocopherol. Numbers represent 14 diversification rates and the bars next to the generic names represent diversification rates under no extinction (adapted from Baker and Couvreur, 2012).

supported within the subfamilies. In *Coryphoideae*, 3.03% of the genera containing tocopherols appeared in the Eocene period, 9.09% in the early Miocene period, and 36.36% at the end of the Miocene period. In the *Arecoideae* subfamily, 8.06% of the genera containing tocopherols appeared in the Oligocene and 51.07% in the Miocene. In addition, no tocopherols were found in some genera, such as *Roystonea*, which appeared in the Paleocene period. These results suggest that the capacity to synthesize tocopherols in the *Areceaceae* family has been lost several times during evolution.

The global distribution of the 84 species of the *Areceaceae* family analyzed here was similar for species with and without tocopherols (Fig. 6). The only representative in Africa was *E. guineensis*, which is one of the few species that can be found on this continent. In fact, the diversification rate in Africa is lower than in the other continents, which explains the absence of species there (Baker and Couvreur, 2012). *D. sabut* is found throughout Indonesia and Malaysia, where more species with and without tocopherols are also present. Therefore, it seems that the species distribution is clearly not determined by the vitamin E composition.

Another factor that might influence the vitamin E composition is the degree of seed dormancy. Among the seeds analyzed, *Archontophoenix alexandrae* is recalcitrant with no primary dormancy (Martins et al., 2003), *Dypsis leptocheilos* is possibly recalcitrant or with intermediary dormancy (Pimenta, 2009), *E. guineensis* and *Roystonea regia* show intermediary dormancy (Orozco-Segovia et al., 2003), and *C. humilis* var. *cerifera*, *D. lutescens*, *Butia eriospatha*, *Acrocomia aculeata*, *W. bifurcata*, *Areca triandra* and *W. filifera* are orthodox seeds with deep dormancy (Dickie et al., 1992; Yang et al., 2007; Ribeiro et al., 2012; González-Benito et al., 2006; González et al., 2012). To our knowledge, other species studied here have not been characterized in this respect, but the mentioned examples, such as *C. humilis* var. *cerifera* and *Butia eriospatha*,

which are orthodox and lack tocopherols, indicate that tocotrienols may be as effective as tocopherols in maintaining viability during seed dormancy in the *Areceaceae* family.

3.2. Vitamin E in seed tissues

The distribution of tocopherols in seed tissues can vary depending on the species. In *H. vulgare* and *A. sativa*, tocotrienols, and particularly α -tocotrienol, are dominant in the endosperm. The germ fraction or embryo accumulates principally α -tocopherol (Falk et al., 2004; Gutiérrez-González et al., 2013). The same pattern is found in corn oil, which is extracted from the embryo (Dauqan et al., 2011). The embryo needs more antioxidant protection than the other tissues, because germination and early seedling development are an oxidative bottleneck for plants (Baillly, 2004). Various palm seeds use lipids as energy stores for germination. When germination starts, the stored lipids can be mobilized and used by β -oxidation and gluconeogenesis. Both processes are major sources of ROS that need to be controlled. Tocotrienols are found in the endosperm, while tocopherols have been identified in the germ of several cereals (Grams et al., 1970; Morrison et al., 1982; Peterson, 1995; Hoa et al., 2003). With the exception of *S. exorrhiza*, half of the total vitamin E analyzed in the embryos was α -tocopherol or α -tocotrienol. The fact that the α homologues were predominant suggests that the methyl groups in the head-ring may play a more important role in the maintenance of oxidative status than the presence or absence of double bounds in the prenyl chain. In the endosperm, tocotrienols were the main compounds. This distribution is in agreement with previous studies in which similar results were found in cereals (Falk et al., 2004; Horvath et al., 2006a). The accumulation of tocopherols and tocotrienols in the seed coat varied among species. There did not appear to be a clear pattern of

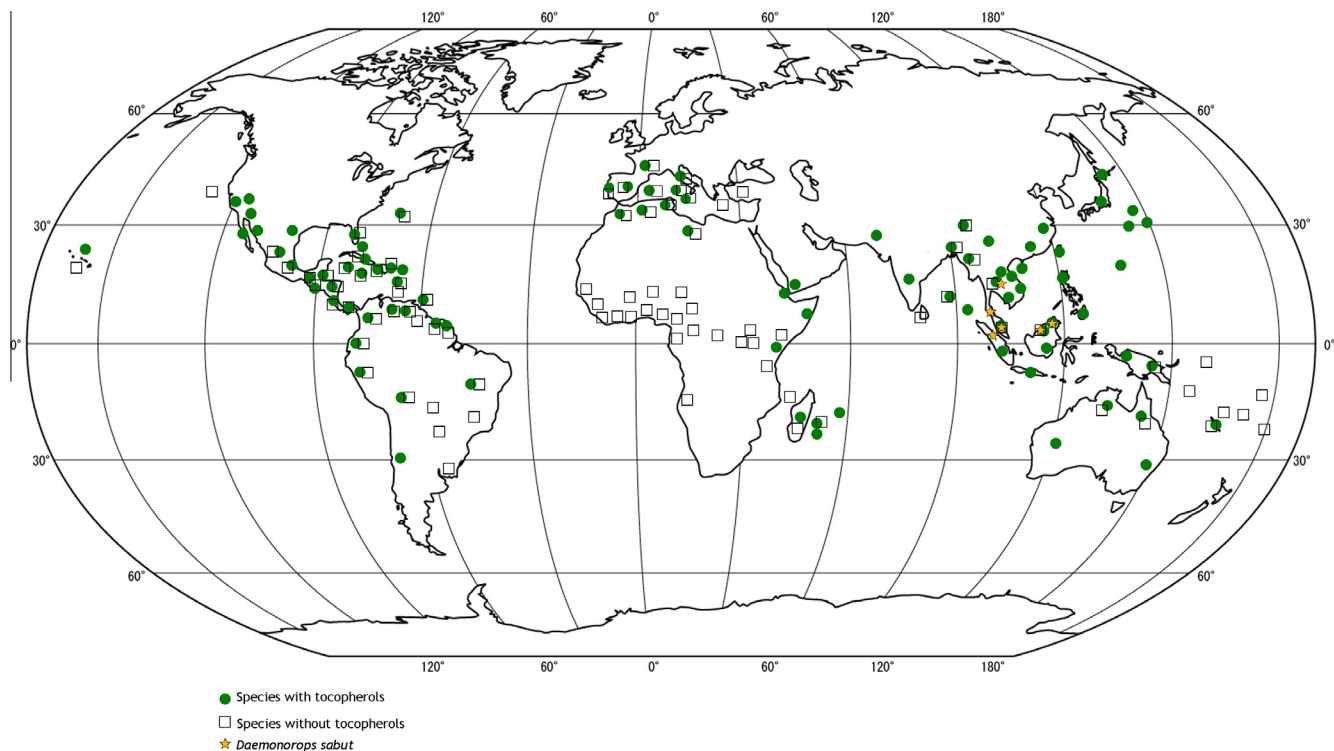


Fig. 6. World map distribution of the 84 species of the *Areceaceae* family studied. Green circles indicate the distribution of species with tocopherols and squares indicate species without tocopherols. The six yellow stars show the distribution of *Daemonorops sabut*. The specific distribution of each species can be consulted in Supplementary Tables 2 and 3 (information taken from <http://www.palmweb.org/> and the World Checklist of Selected Plant Families from Royal Botanic Gardens, Kew).

accumulation or an explanation for the role of these compounds in the testa (indeed, no other studies have examined this).

4. Conclusions

Not all terrestrial plants accumulate tocopherols in seeds. This appears to be particularly true for Arecaceae, as tocopherols were not detected in 35 of the 84 species analyzed. Consequently, it appears that tocopherols are not needed for seed dormancy in these species. Tocotrienols can play a similar protective role to that exerted by tocopherols in seeds. Further research is however needed to unravel the possible antioxidant function of other tocopherols, such as PC-8, in seeds of the Arecaceae family.

5. Experimental

5.1. Plant material

Seeds (covered by the fruit endocarp) of 84 palm species of different subfamilies were provided by Tobias W. Spanner (<http://www.rarepalmseeds.com>). The species used in the study are listed in Supplementary Table 1. After purchase, seeds were stored at 23 °C and 50% relative humidity for 4 months in the dark prior to analyses. All seed lots were confirmed to be viable. For each species, a variable number of seeds were analyzed, depending on their size. A minimum of 3 and a maximum of 32 seeds were used. The endocarp was removed with the aid of a saw and a hammer to obtain the seed.

5.2. Seed dissection

In a second set of analyses, the seeds of six randomly selected species were dissected and the seed coat, endosperm and embryo were evaluated separately. The selected species were *C. humilis* var. *cerifera*, *P. torallyi* var. *microcarpa*, *J. chilensis*, *A. standelayanum*, *S. orinocensis* and *S. exorrhiza*. The embryo was the first tissue separated from the rest of the seed, with the aid of a scalpel. Then, the seed coat was peeled back using a scalpel and milled with a mortar. Finally the seeds were split using a hammer, the endosperm was isolated with a scalpel, and a coffee grinder was used to mill the tissue. In addition, if the seed coat had fuzz over its surface, this was removed using a scalpel and tweezers before beginning the dissection. Seed parts were obtained and immediately used for analyses.

5.3. Analysis of vitamin E

For the extraction of tocopherols and tocotrienols, seeds were crushed using a hammer and then milled with a coffee grinder. Seed parts were crushed with a mortar and pestle, and three replicates of 100 mg in 1.5 mL of methanol or 10 mg in 200 μ L methanol (for embryos) were performed for each species. Samples were sonicated for 30 min and then incubated for 18 h at room temperature. Afterwards, samples were sonicated for another 30 min and incubated at room temperature for 3 h. This process was then repeated for 2 additional hours. Finally, samples were centrifuged for 15 min at 4 °C and 10,000 rpm and transferred to vials for analysis. The HPLC analysis was performed as described by Amaral et al. (2005). In brief, the HPLC equipment consisted of an integrated system with a Jasco PU-2089 Plus pump, a Jasco AS-2055 Plus auto-sampler (Jasco, Japan) and a FP-1520 fluorescence detector (Jasco, Japan). All tocopherol forms were separated on an Inertsil 100A (5 μ m, 30 \times 250 mm, GL Sciences Inc., Japan) normal-phase column, operating at room temperature. The flow rate was 0.7 mL min⁻¹ and the injection volume was 10 μ L. The mobile

phase was a mixture of *n*-hexane and *p*-dioxane (95.5; 4.5 v/v). Detection was carried out at an excitation of 295 nm and emission at 330 nm. Quantification was based on the results obtained from the fluorescence signal and compared to that of a calibration curve made with authentic standards of each compound (Sigma–Aldrich, Steinheim, Germany).

Acknowledgments

Support for the research was received through grants BFU2012-32057, BFU2009-07294, BFU2009-06045 and CSD2008-00040 from the Spanish Government, and the ICREA Academia prize to S.M.-B., which is funded by the Catalan Government. We thank William J. Baker from the Royal Botanic Garden in Kew for his advices and help with Arecaceae phylogeny and Leonardo M. Ribeiro from the Universidade Estadual de Montes Claros (Brazil) for his advices on the physiology of seed palms. We also thank Lucille Banham for English correction of the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.07.008>.

References

- Al-Saleh, I.A., Billedo, G., El-Doush, I.I., 2006. Levels of selenium, DL- α -tocopherol, DL- γ -tocopherol, all-trans-retinol, thymoquinone and thymol in different brands of *Nigella sativa* seeds. *J. Food. Compd. Anal.* 19, 167–175.
- Amaral, J.S., Casal, S., Torres, D., Seabra, R.M., Oliveira, B.P.P., 2005. Simultaneous determination of tocopherols and tocotrienols in hazelnuts by a normal phase liquid chromatographic method. *Anal. Sci.* 21, 1545–1548.
- Asmussen, C.B., Dransfield, J., Deickmann, V., Barford, A.S., Pintaud, J.C., Baker, J.W., 2006. A new subfamily classification of the palm family (Arecaceae): evidence from plastid DNA phylogeny. *Bot. J. Linn. Soc.* 151, 15–38.
- Bailey, C., 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci. Res.* 14, 93–107.
- Bailey, C., El-Maarouf-Bouteau, H., Corbineau, F., 2008. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *C. R. Biol.* 331, 806–814.
- Baker, W.J., Savolainen, V., Asmussen-Lange, C., Chase, M.W., Dransfield, J., Florest, F., Harley, M.M., Uhl, N.W., Wilkinson, M., 2009. Complete generic-level phylogenetic analyses of palms (Arecaceae) with comparison of supertree and supermatrix approaches. *Syst. Biol.* 58, 240–256.
- Baker, W.J., Couvreur, T.L.P., 2012. Global biogeography and diversification of palms sheds light on the evolution of tropical lineages. II. Diversification history and origin of regional assemblages. *J. Biogeogr.* 40, 286–298.
- Besbes, S., Blecker, C., Deroanne, C., Bahloul, N., Lognay, G., Drira, N.-E., Attia, H., 2004. Date seed oil: phenolic, tocopherol and sterol profiles. *J. Food Lipids* 11, 251–265.
- Bruni, R., Muzzoli, M., Ballero, L., Fantin, M.C., Poli, F., Sacchetti, G., 2004. Tocopherols, fatty acids and sterols in seeds of four Sardinian wild *Euphorbia* species. *Fitoterapia* 75, 50–61.
- Choo, Y.M., Ma, A.N., Chuah, C.H., Khor, H.T., Bong, S.C., 2004. A developmental study on the appearance of tocopherols and tocotrienols in developing palm mesocarp (*Elaeis guineensis*). *Lipids* 39, 561–564.
- Couvreur, T.L.P., Forest, F., Baker, J.W., 2011. Origin and global diversification patterns of tropical rain forests: inferences from a complete genus-level phylogeny of palms. *BMC Biol.* 9, 44.
- Dauqan, E., Abdullah Sani, H., Abdullah, A., Muhamad, H., Top, G.M.d., 2011. Vitamin E and beta carotene composition on four different vegetable oils. *Am. J. Appl. Sci.* 8, 407–412.
- Dickie, J.B., Balick, M.J., Linington, I.M., 1992. Experimental investigations into the feasibility of *ex situ* preservation of palm seeds; an alternative strategy for biological conservation of this economically important plant family. *Biodivers. Conserv.* 1, 112–119.
- Falk, J., Krahnstöver, A., van der Kooji, T.A.W., Schlensog, M., Krupinska, K., 2004. Tocopherol and tocotrienol accumulation during development of caryopses from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Phytochemistry* 65, 2977–2985.
- Falk, J., Munné-Bosch, S., 2010. Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. *J. Exp. Bot.* 61, 1549–1566.
- Franzen, J., Haab, M.M., 1991. Vitamin E content during development of some seedlings. *Phytochemistry* 9, 2911–2913.
- García, Q.S., Giorni, V.T., Müller, M., Munné-Bosch, S., 2011. Common and distinct responses in phytohormone and vitamin E changes during seed burial and dormancy in *Xyris bialata* and *X. peregrina*. *Plant Biol.* 14, 347–353.

- Gaunt, J.K., Stowe, B.B., 1967. Analysis and distribution of tocopherols and quinones in the pea plant. *Plant Physiol.* 42, 851–858.
- González, J.D., Fernández, B.B., Carreño, F.S., 2012. Influence of different preservation methods on the germination of areca palm (*Dypsis lutescens*, H. Wendel). *Cultivos Tropicales* 33, 56–60.
- González-Benito, M.E., Huertas-Micó, M., Pérez-García, F., 2006. Seed germination and storage of *Chamaerops humilis* (dwarf fan palm). *Seed Sci. Technol.* 34, 143–150.
- Grams, G.W., Blessin, C.W., Inglett, G.E., 1970. Distribution of tocopherol within the corn kernel. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 47, 337–339.
- Gutiérrez-González, J.J., Wise, M.L., Garvin, D.F., 2013. A developmental profile of tocol accumulation in oat seeds. *J. Cereal Sci.* 57, 79–83.
- Hess, J.L., 1993. Vitamin E, α -tocopherol. In: Alscher, R.G., Hess, J.L. (Eds.), *Antioxidants in Higher Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 111–134.
- Hoa, T.T., Al-Babili, S., Schaub, P., Potrykus, I., Beyer, P., 2003. Golden indica and japonica rice lines amenable to deregulation. *Plant Physiol.* 133, 161–169.
- Horvath, G., Wessjohann, L., Bigirimana, L., Monica, H., Jansen, M., Guisez, Y., Caubergs, R., Horemans, N., 2006a. Accumulation of tocopherols and tocotrienols during seed development of grape (*Vitis vinifera* L.cv. Albert Lavallée). *Plant Physiol. Biochem.* 44, 724–731.
- Horvath, G., Wessjohann, L., Bigirimana, L., Monica, H., Jansen, M., Guisez, Y., Caubergs, R., Horemans, N., 2006b. Differential distribution of tocopherols and tocotrienols in photosynthetic and non-photosynthetic tissues. *Phytochemistry* 67, 1185–1195.
- Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L., 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31, 671–701.
- Martins, C.C., Bovi, M.L.A., Nakagawa, J., 2003. Desiccation effects on germination and vigor of King palm seeds. *Hortic. Bras.* 21, 88–89.
- Matringe, M., Ksas, B., Rey, P., Havaux, M., 2008. Tocotrienols, the unsaturated forms of vitamin E, can function as antioxidants and lipid protectors in tobacco leaves. *Plant Physiol.* 147, 764–778.
- Mène-Saffrané, L., Jones, A.D., DellaPenna, D., 2010. Plastochromanol-8 and tocopherols are essential lipid-soluble antioxidants during seed desiccation and quiescence in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 12, 17815–17820.
- Morrison, W.R., Conventry, A.M., Barnes, P.J., 1982. The distribution of acyl lipids and tocopherols in flour millstreams. *J. Sci. Food Agr.* 33, 925–933.
- Munné-Bosch, S., Alegre, L., 2002. The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21, 31–57.
- Nehdi, I.A., 2011. Characteristics and composition of *Washingtonia filifera* (Linden ex André) H. Wendl. seed and seed oil. *Food Chem.* 126, 197–202.
- Orozco-Segovia, A., Batis, A.L., Roja-Aréchiga, M., Mendoza, A., 2003. Seed biology of palms: a review. *Palms* 47, 79–94.
- Peterson, D.M., 1995. Oat tocols: concentration and stability in oat products and distribution within in the kernel. *Cereal Chem.* 72, 21–24.
- Pimenta, R.S., 2009. Germinação e aspectos morfológicos de sementes de *Dypsis leptocheilos* (Hodel) Beentje & J. Dransf. (Arecaceae). Ph.D. Thesis. Universidade Estadual Paulista.
- Ribeiro, L.M., Oliveira, T.G.S., Carvalho, V.S., Silva, P.O., Neves, S.C., Garcia, Q.S., 2012. The behaviour of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) seeds during storage. *Seed Sci. Technol.* 40, 344–353.
- Sattler, S.E., Gilliland, L.U., Magallanes-Lundback, M., Pollard, M., DellaPenna, D., 2004. Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell* 16, 1419–1432.
- Simontacchi, M., Caro, A., Fraga, C.G., Puntarulo, S., 1993. Oxidative stress affects α -tocopherol content in soybean embryonic axes upon imbibition and following germination. *Plant Physiol.* 103, 949–953.
- Simontacchi, M., Sadovsky, L., Puntarulo, S., 2003. Profile of antioxidant content upon developing of *Sorghum bicolor* seeds. *Plant Sci.* 164, 709–715.
- Smirnoff, N., 2007. Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions. In: Smirnoff, N. (Ed.), *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK.
- Yang, Q.-H., Ye, W.-H., Yin, X.-J., 2007. Dormancy and germination of *Areca triandra* seeds. *Sci. Hort.* 113, 107–111.

Supplementary Table 1. Percentage (mean values) of tocopherols and tocotrienols in seeds of 84 species of the Arecaceae family. Data correspond to the mean of n=3 (an asterisk indicates S.E. is in the range 5-10% of the mean, ** for >10%; no asterisk when S.E. is <5%). Species containing tocopherols in seeds are indicated in grey and those containing α -tocopherol are underlined. ND= not detected. α -T: α -tocopherol, β -T: β -tocopherol, γ -T: γ -tocopherol, δ -T: δ -tocopherol, α -Tt: α -tocotrienol, β -Tt: β -tocotrienol, γ -Tt: γ -tocotrienol, δ -Tt: δ -tocotrienol.

No.	Species	Total vitamin E (%)			Tocopherols (%)				Tocotrienols (%)			
		Tocopherols	Tocotrienols		α -T	β -T	γ -T	δ -T	α -Tt	β -Tt	γ -Tt	δ -Tt
1	<u><i>Daemonorops sabut</i></u>	100	ND	4.4*	95.3	0.1**	0.2	ND	ND	ND	ND	
2	<i>Dypsis lutescens</i>	97.8	2.2*	ND	100	ND	ND	100	ND	ND	ND	
3	<i>Acrocomia aculeata</i>	0.3*	99.7	100	ND	ND	ND	48.6	1.6	44.9	4.9*	
4	<i>Butia catarinensis</i>	57.7	42.3	ND	ND	88.9	11.0	25.3	8.4	27.7	38.7	
5	<i>Aiphanes horrida</i>	ND	100	ND	ND	ND	ND	34.4	29.8	8.5	27.4	
6	<i>Aiphanes eggersii</i>	ND	100	ND	ND	ND	ND	36.8	32.6	7.0	23.6	
7	<i>Chamaerops humilis var. cerifera</i>	ND	100	ND	ND	ND	ND	86.9	6.6	4.8*	1.7**	
8	<u><i>Washingtonia filifera</i></u>	4.0**	96.0	75.1	ND	24.9**	ND	15.0	2.1**	62.9	20.0	
9	<u><i>Parajubaea torally var. microcarpa</i></u>	1.3	98.7	100	ND	ND	ND	22.0	2.7**	42.9	32.4	
10	<i>Butia eriospatha</i>	ND	100	ND	ND	ND	ND	16.8	9.3**	22.0	51.9	
11	<u><i>Jubaea chilensis</i></u>	0.6	99.4	100	ND	ND	ND	20.2	7.8*	15.7	56.2	
12	<u><i>Acrocomia intumescens</i></u>	3.1**	96.9	100	ND	ND	ND	56.9	5.3	24.8	13.0	
13	<u><i>Acanthophoenix crinita</i></u>	64.2	35.8	18.8*	ND	81.2	ND	56.7	43.3	ND	ND	
14	<u><i>Astrocaryum standlevanum</i></u>	2.9**	97.1	95.9*	4.1*	ND	ND	41.1	16.1	19.2	23.6	
15	<i>Chamaerops humilis var. vulcano</i>	2.6**	97.4	ND	100	ND	ND	89.1	10.9	ND	ND	
16	<u><i>Wodvetia bifurcata</i></u>	90.0	10.0**	98.5	ND	1.5**	ND	59.0	41.0	ND	ND	
17	<i>Chamaedorea elegans</i>	70.6	29.4*	ND	ND	96.2	3.8	21.7	ND	78.3	ND	
18	<i>Coccothrinax boschiana</i>	ND	100	ND	ND	ND	ND	85.3	14.5	0.3**	ND	
19	<u><i>Livistona eastonii</i></u>	20.2**	79.8	40.7**	ND	59.3*	ND	57.0*	13.0**	10.3*	19.7	
20	<u><i>Leucothrinax morrisii</i></u>	0.9	99.1	ND	ND	ND	100	32.3	2.5**	41.4	23.8	
21	<i>Beccariothrinax alfredii</i>	ND	100	ND	ND	ND	ND	48.1	ND	47.2	4.6*	

Material suplementari

22	<i>Butia yatay</i>		ND	100	ND	ND	ND	ND	ND	27.2	5.7	33.8	33.3
23	<i>Syagrus romanzoffiana(Litoralis)</i>		ND	100	ND	ND	ND	ND	ND	75.2	12.7	7.9	4.2**
24	<i>Phoenix loureiroi var humili</i>		9.2**	90.8	ND	ND	ND	ND	100	62.3	26.9	ND	10.8
25	<i>Livistona carinensis</i>		5.6**	94.4	ND	ND	ND	ND	100	83.4	16.6*	ND	ND
26	<i>Pritchardia hillebrandii</i>		ND	100	ND	ND	ND	ND	ND	55.2	ND	44.8	ND
27	<i>Syagrus orinocensis</i>		12.2*	87.8	50.2*	2.0*	47.8*	ND	ND	32.9	5.5*	45.9	15.6
28	<i>Basselinia pancheri</i>		86.8	13.2	8.3*	91.7	ND	ND	ND	84.0	ND	16.0**	ND
29	<i>Pritchardia pacifica</i>		ND	100	ND	ND	ND	ND	ND	42.7	ND	57.3	ND
30	<i>Coccothrinax argentata</i>		ND	100	ND	ND	ND	ND	ND	95.4	4.6**	ND	ND
31	<i>Livistona inermis</i>		10.2**	89.8	28.9**	ND	65.8	5.3**	ND	63.7	31.5	ND	4.8*
32	<i>Thrinax parviflora</i>		22.1*	77.9	ND	ND	ND	ND	100	88.9	7.3*	3.9	ND
33	<i>Coccothrinax ekmanii</i>		ND	100	ND	ND	ND	ND	ND	82.0	7.9	7.1	3.0**
34	<i>Phoenix paludosa</i>		92.6	7.5**	ND	ND	ND	ND	100	100	ND	ND	ND
35	<i>Phoenix theophrasti</i>		ND	100	ND	ND	ND	ND	ND	82.6	17.4	ND	ND
36	<i>Roystonea regia</i>		ND	100	ND	ND	ND	ND	ND	66.2	ND	33.8	ND
37	<i>Bactris setulosa</i>		13.2**	86.8	100	ND	ND	ND	ND	69.2	27.4	3.4*	ND
38	<i>Guihata arayrata</i>		3.0**	97.0	83.8**	ND	16.2**	ND	ND	93.6	3.1**	3.3*	ND
39	<i>Dictyosperma album</i>		53.7*	46.3**	78.8	18.2	3.0**	ND	ND	33.6**	4.4	43.4*	18.5**
40	<i>Livistona chinensis</i>		3.9**	96.1	ND	ND	ND	ND	100	51.0*	9.4**	2.2**	37.5**
41	<i>Dypsis utilis</i>		37.7	62.3	100	ND	ND	ND	ND	56.4	5.6**	38.0	ND
42	<i>Acanthophoenix rousselii</i>		94.4	5.6**	28.5*	ND	71.5	ND	ND	44.3*	55.7*	ND	ND
43	<i>Coccothrinax gracilis</i>		ND	100	ND	ND	ND	ND	ND	89.2	6.6*	4.1	ND
44	<i>Areca triandra</i>		82.8	17.2	100	ND	ND	ND	ND	28.7	64.1	7.3**	ND
45	<i>Thrinax radiata</i>		23.2**	76.8	ND	ND	ND	ND	100	90.6	5.6*	3.8**	ND
46	<i>Chamaedorea pinnatifrons</i>		98.5	1.5	ND	ND	100	ND	ND	ND	ND	100	ND
47	<i>Dypsis madagascariensis</i>		ND	100	ND	ND	ND	ND	ND	85.2	5.7*	ND	9.1**
48	<i>Dypsis lanceolata</i>		ND	100	ND	ND	ND	ND	ND	94.1	5.9**	ND	ND
49	<i>Chamaedorea elatior</i>		94.8	5.2**	ND	ND	100	ND	ND	ND	ND	100	ND
50	<i>Rhapis excelsa</i>		37.4	62.6	ND	ND	ND	ND	100	85.7	14.3**	ND	ND
51	<i>Dypsis leptocheilios</i>		47.0*	53.0*	100	ND	ND	ND	ND	100	ND	ND	ND
52	<i>Dypsis arenarum</i>		9.7**	90.3	100	ND	ND	ND	ND	93.8	ND	6.2	ND
53	<i>Basselinia eriostachys</i>		56.9**	43.1**	78.1*	ND	21.9**	ND	ND	100	ND	ND	ND

54	<i>Geonoma deversa</i>	88.1	11.9*	ND	ND	100	ND	ND	ND	100	ND	ND	ND
55	<i>Hydriastele wendlandiana</i>	51.0*	49.0*	67.4*	ND	32.6**	ND	64.5	35.5*	ND	ND	ND	ND
56	<i>Licuata peltata</i> var. <i>sumawongii</i>	ND	100	ND	ND	ND	ND	100	ND	ND	ND	ND	ND
57	<i>Licuata grandis</i>	ND	100	ND	ND	ND	ND	85.9	14.1*	ND	ND	ND	ND
58	<i>Laccospadix australasicus</i>	20.4	79.6	100	ND	ND	ND	77.2*	ND	ND	ND	22.8**	ND
59	<i>Bactris gracilior</i>	ND	100	ND	ND	ND	ND	41.8	58.2	ND	ND	ND	ND
60	<i>Dypsis pachyramea</i>	ND	100	ND	ND	ND	ND	73.9*	ND	ND	ND	26.0**	ND
61	<i>Elaeis guineensis</i>	ND	100	ND	ND	ND	ND	93.7	ND	ND	6.3*	ND	ND
62	<i>Oncosperma tigillarum</i>	17.5	82.5	52.5	ND	47.5	ND	87.2*	12.8**	ND	ND	ND	ND
63	<i>Cyphophoenix elegans</i>	ND	100	ND	ND	ND	ND	88.0	12.0*	ND	ND	ND	ND
64	<i>Clinostigma harlandii</i>	ND	100	ND	ND	ND	ND	76.7	21.2*	2.1**	ND	ND	ND
65	<i>Burretiockentia viellardii</i>	ND	100	ND	ND	ND	ND	80.5	19.5	ND	ND	ND	ND
66	<i>Archontophoenix alexandrae</i>	17.5**	82.5	100	ND	ND	ND	74.9	8.1**	17.0*	ND	ND	ND
67	<i>Masoala madagascariensis</i>	ND	100	ND	ND	ND	ND	90.1	9.9**	ND	ND	ND	ND
68	<i>Dypsis corniculata</i>	49.0*	51.0*	ND	100	ND	ND	85.1	14.9*	ND	ND	ND	ND
69	<i>Livistona saribus</i>	30.5*	69.5	ND	ND	ND	ND	70.5	24.2*	5.4**	ND	ND	ND
70	<i>Dypsis nauseosa</i>	90.9	9.1**	100	ND	ND	ND	100	ND	ND	ND	ND	ND
71	<i>Pinanga malaiana</i>	73.6*	26.4**	100	ND	ND	ND	60.3**	36.2**	3.5**	ND	ND	ND
72	<i>Archontophoenix mvolensis</i>	43.6	56.4	100	ND	ND	ND	71.0	ND	29.0*	ND	ND	ND
73	<i>Dypsis baronii</i>	34.8	65.2	ND	100	ND	ND	100	ND	ND	ND	ND	ND
74	<i>Licuata rumphii</i>	ND	100	ND	ND	ND	ND	100	ND	ND	ND	ND	ND
75	<i>Dypsis faneva</i>	ND	100	ND	ND	ND	ND	79.2	20.8**	ND	ND	ND	ND
76	<i>Licuata peltata</i> var. <i>peltata</i>	ND	100	ND	ND	ND	ND	100	ND	ND	ND	ND	ND
77	<i>Dypsis malcomberi</i>	ND	100	ND	ND	ND	ND	85.0	ND	15.0	ND	ND	ND
78	<i>Geonoma mooreana</i>	79.3	20.7**	ND	ND	100	ND	100	ND	ND	ND	ND	ND
79	<i>Burretiockentia hapala</i>	ND	100	ND	ND	ND	ND	100	ND	ND	ND	ND	ND
80	<i>Dypsis confusa</i>	ND	100	ND	ND	ND	ND	100	ND	ND	ND	ND	ND
81	<i>Dypsis remotiflora</i>	ND	100	ND	ND	ND	ND	100	ND	ND	ND	ND	ND
82	<i>Socratea exorrhiza</i>	71.1*	28.9*	40.5*	ND	59.6*	ND	ND	100	ND	ND	ND	ND
83	<i>Prestoea longipetiolata</i>	ND	100	ND	ND	ND	ND	100	ND	ND	ND	ND	ND
84	<i>Ptychosperma caryotoides</i>	ND	100	ND	ND	ND	ND	100	ND	ND	ND	ND	ND

Supplementary Table 2. Species with tocopherols.

Subfamily	No.	Species	Distribution
Calamoideae	1	<i>Daemonorops sabut</i>	Borneo, Malaysia, Sumatra, Thailand
Coryphoideae	8	<i>Washingtonia filifera</i>	Arizona, California, Florida, Hawaii, Northwest Mexico, Nevada, New South Wales
Coryphoideae	15	<i>Chamaerops humilis</i> var. <i>vulcano</i>	Algeria, Balears, France, Italy, Libya, Morocco, Portugal, Sardinia, Sicilia, Spain, Tunisia. Native to Volcano Island.
Coryphoideae	19	<i>Livistona eastonii</i>	Western Australia
Coryphoideae	20	<i>Leucothrinax morrisii</i>	Bahamas, Cuba, Florida, Haiti, Leeward Islands, Puerto Rico
Coryphoideae	24	<i>Phoenix loureiroi</i> var. <i>humilis</i>	China, India, Pakistan, Philippines
Coryphoideae	25	<i>Livistona carinensis</i>	Djibouti, Somalia, Yemen
Coryphoideae	31	<i>Livistona inermis</i>	Northern Territory, Queensland
Coryphoideae	32	<i>Thrinax parviflora</i>	Jamaica
Coryphoideae	34	<i>Phoenix paludosa</i>	Andaman Island, Assam, Bangladesh, Cambodia, India, Malaysia, Myanmar, Nicobar Island, Sumatra, Thailand, Vietnam
Coryphoideae	38	<i>Guihaia argyrata</i>	Southeast China, Vietnam
Coryphoideae	40	<i>Livistona chinensis</i>	Bermuda, Southeast China, Florida, Hawaii, Japan, Java, Kazan-tetto, Marianas, Mauritius, Nansei-shoto, New Caledonia, Reunion, Taiwan, Vietnam
Coryphoideae	45	<i>Thrinax radiata</i>	Bahamas, Belize, Cayman Islands, Cuba, Dominican Republic, Florida, Haiti, Honduras, Jamaica, Southeast Mexico, Nicaragua
Coryphoideae	50	<i>Raphis excelsa</i>	Southeast-Central China, Hainan, Japan, Nansei-shoto, Vietnam
Coryphoideae	69	<i>Livistona saribus</i>	Borneo, Southeast China, Java, Malaysia, Philippines, Society Islands, Thailand, Vietnam
Arecoideae	2	<i>Dypsis lutescens</i>	Madagascar, Trinidad-Tobago
Arecoideae	4	<i>Butia catarinensis</i>	Southern Brazil
Arecoideae	9	<i>Parajubaea torallyi</i> var. <i>microcarpa</i>	Endemic to Bolivia
Arecoideae	11	<i>Jubaea chilensis</i>	Chile
Arecoideae	12	<i>Acrocomia intumescens</i>	Northeast Brazil
Arecoideae	13	<i>Acanthophoenix crinita</i>	Mauritius, Reunion
Arecoideae	14	<i>Astrocaryum standleyanum</i>	Colombia, Costa Rica, Ecuador, Panama
Arecoideae	16	<i>Wodyetia bifurcata</i>	Queensland
Arecoideae	17	<i>Chamaedorea elegans</i>	Belize, Guatemala, Mexico
Arecoideae	27	<i>Syagrus orinocensis</i>	Colombia, Venezuela

Arecoideae	28	<i>Basselinia pancheri</i>	New Caledonia
Arecoideae	37	<i>Bactris setulosa</i>	Colombia, Ecuador, Peru, Surinam, Trinidad-Tobago, Venezuela, Venezuelan Antilles
Arecoideae	39	<i>Dictyosperma album</i>	Mauritius, Rodriguez, Reunion
Arecoideae	41	<i>Dypsis utilis</i>	Madagascar
Arecoideae	42	<i>Acanthophoenix roussetii</i>	Reunion
Arecoideae	44	<i>Areca triandra</i>	Andaman Islands, Assam, Bangladesh, Borneo, Cambodia, China Southeast-Central Laos, Malaysia, Myanmar, Panama, Philippines, Sumatra, Thailand, Vietnam
Arecoideae	46	<i>Chamaedorea pinnatifrons</i>	Bolivia, Brazil, North Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Honduras, South Mexico, Nicaragua, Panama, Peru, Venezuela
Arecoideae	49	<i>Chamaedorea elatior</i>	Guatemala, Honduras, Mexico
Arecoideae	51	<i>Dypsis leptocheilos</i>	Madagascar
Arecoideae	52	<i>Dypsis arenarum</i>	Madagascar
Arecoideae	53	<i>Basselinia ertostachys</i>	New Caledonia
Arecoideae	54	<i>Geonoma deversa</i>	Belize, Bolivia, North Brazil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, French Guiana, Guatemala, Guiana, Panama, Peru, Surinam, Venezuela
Arecoideae	55	<i>Hydriastele wendlandiana</i>	Northern Territory, Queensland
Arecoideae	58	<i>Laccospadix australasicus</i>	Queensland
Arecoideae	62	<i>Oncosperma tigillarum</i>	Borneo, Cambodia, Java, Malaysia, Society Islands, Sumatra, Thailand
Arecoideae	66	<i>Archontophoenix alexandrae</i>	Hawaii, Queensland
Arecoideae	68	<i>Dypsis corniculata</i>	Madagascar
Arecoideae	70	<i>Dypsis nauseosa</i>	Madagascar
Arecoideae	71	<i>Pinanga malaina</i>	Malaysia, Sumatra, Thailand
Arecoideae	72	<i>Archontophoenix myolensis</i>	Queensland
Arecoideae	73	<i>Dypsis baronii</i>	Madagascar
Arecoideae	78	<i>Geonoma mooreana</i>	Panama
Arecoideae	82	<i>Socratea exorrhiza</i>	Bolivia, North Brazil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, French Guiana, Guiana, Nicaragua, Panama, Peru, Surinam, Venezuela

Supplementary Table 3. Species without tocopherols.

Subfamily	No.	Species	Distribution
Coryphoideae	7	<i>Chamaerops humilis</i> var. <i>cerifera</i>	Algeria, Balears, France, Italy, Libya, Morocco, Portugal, Sardinia, Sicilia, Spain, Tunisia. Native to Moroccan Atlas.
Coryphoideae	18	<i>Coccothrinax boschiana</i>	Dominican Republic
Coryphoideae	26	<i>Pritchardia hillebrandii</i>	Hawaii
Coryphoideae	29	<i>Pritchardia pacifica</i>	Fiji, Marquesas, Marshall Islands, Niue, Samoa, Society Islands, Solomon Islands, Tonga, Trinidad-Tobago, Vanuatu
Coryphoideae	30	<i>Coccothrinax argentata</i>	Bahamas, Colombia, Florida, Southwest Caribbean
Coryphoideae	33	<i>Coccothrinax ekmanii</i>	Dominican Republic, Haiti
Coryphoideae	35	<i>Phoenix theophrasti</i>	East Aegean Islands, Kriti, Turkey
Coryphoideae	43	<i>Coccothrinax gracilis</i>	Dominican Republic, Haiti
Coryphoideae	56	<i>Licuala peltata</i> var. <i>sumawongii</i>	Malaysia, Thailand
Coryphoideae	57	<i>Licuala grandis</i>	Malaysia, Santa Cruz Islands, Society Islands, Vanuatu
Coryphoideae	74	<i>Licuala rumphii</i>	Maluku
Coryphoideae	76	<i>Licuala peltata</i> var. <i>peltata</i>	Andaman Islands, Assam, Bangladesh, East Himalaya, Malaysia, Myanmar, Nicobar Islands, Thailand
Arecoideae	3	<i>Acrocomia aculeata</i>	Northeast Argentina, Belize, Bolivia, Brazil, Colombia, Costa Rica, Cuba, Dominican Republic, El Salvador, French Guiana, Guatemala, Guyana, Haiti, Honduras, Jamaica, Leeward Islands, South Mexico, Nicaragua, Panama, Paraguay, Surinam, Trinidad-Tobago, Venezuela, Windward Islands
Arecoideae	5	<i>Aiphanes horrida</i>	Bolivia, North Brazil, Colombia, Peru, Trinidad-Tobago, Venezuela
Arecoideae	6	<i>Aiphanes eggersii</i>	Endemic to Ecuador
Arecoideae	10	<i>Butia eriospatha</i>	Northeast Argentina, South Brazil
Arecoideae	21	<i>Beccariophoenix alfredii</i>	Madagascar
Arecoideae	22	<i>Butia yatay</i>	Northeast Argentina, Southeast Brazil, Uruguay
Arecoideae	23	<i>Syagrus romanzoffiana</i> (<i>Litoralis</i>)	Northeast Argentina, Bolivia, Brazil, Florida, Mauritius, New South Wales, Paraguay, Queensland, Uruguay
Arecoideae	36	<i>Roystonea regia</i>	Bahamas, Belize, Cayman Islands, Cuba, Florida, Honduras, Southeast Mexico, Panama
Arecoideae	47	<i>Dypsis madagascariensis</i>	Madagascar
Arecoideae	48	<i>Dypsis lanceolata</i>	Comoros
Arecoideae	59	<i>Bactris gracilior</i>	Costa Rica, Nicaragua, Panama
Arecoideae	60	<i>Dypsis pachyramea</i>	Madagascar

Arecoideae	61	<i>Elaeis guineensis</i>	Angola, Benin, Bismarck Archipelago, Burkina, Burundi, Cameroon, Caroline Island, Central African Republic, Chad, Comoros, Congo, Costa Rica, Fiji, Gabon, Ghana, Guinea, Ivory Coast, Kenya, Liberia, Madagascar, Malaysia, Nicaragua, Nigeria, Rwanda, Senegal, Sierra Leone, Society Islands, Sri Lanka, Sumatra, Tanzania, Togo, Uganda, Zaire
Arecoideae	63	<i>Cyphophoenix elegans</i>	New Caledonia
Arecoideae	64	<i>Clinostigma harlandii</i>	Vanuatu
Arecoideae	65	<i>Burretokentia vierlardii</i>	New Caledonia
Arecoideae	67	<i>Masoala madagascariensis</i>	Madagascar
Arecoideae	75	<i>Dyopsis faneva</i>	Madagascar
Arecoideae	77	<i>Dyopsis malcomberi</i>	Madagascar
Arecoideae	79	<i>Burretokentia hapala</i>	New Caledonia
Arecoideae	80	<i>Dyopsis confusa</i>	Madagascar
Arecoideae	81	<i>Dyopsis remotiflora</i>	Madagascar
Arecoideae	83	<i>Prestoea longipetiolata</i>	Colombia, Costa Rica, Nicaragua, Panama, Venezuela
Arecoideae	84	<i>Pychosperma caryotoides</i>	New Guinea

Capítol 2

Augment dels continguts de tocoferols durant els primers estadis de germinació en llavors de *Chamaerops humilis* var. *humilis*



Chapter 2

Enhanced tocopherol levels during early germination events in *Chamaerops humilis* var. *humilis* seeds

Laura Siles, Leonor Alegre, Verónica Tijero, Sergi Munné-Bosch

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

Publicat a **Phytochemistry** (2015) 118: 1-8

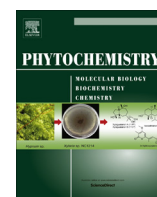
RESUM CAPÍTOL 2

La majoria de les angiospermes acumulen vitamina E en forma de tocoferols a les llavors, els quals exerceixen un paper protector antioxidant. No obstant, diverses palmeres acumulen principalment tocotrienols a les llavors, més que tocoferols, fet que també succeeix a altres monocotiledònies. Per a estudiar el paper protector tant dels tocoferols com dels tocotrienols contra la peroxidació lipídica durant la germinació de *Chamaerops humilis* var. *humilis*, la viabilitat, la capacitat germinativa natural i induïda, el contingut hídric, els nivells d'àcid malondialdehid (com a indicador de la extensió de la peroxidació lipídica) i els nivells de vitamina E (incloent tocoferols i tocotrienols) es van examinar en diverses fases de germinació en un banc de llavors simulat, en condicions naturals. En estadis molt primerencs de la germinació (obertura de l'opercle), els nivells d'àcid malondialdehid van incrementar 2,8 vegades, per després disminuir un 74%, indicant, per tant, una peroxidació lipídica transitòria en estadis molt inicials de la germinació. A llavors quiescents no es van detectar tocoferols, i els seus nivells no van incrementar durant l'obertura de l'opercle. No obstant, els seus nivells van augmentar després, presumptament disminuint l'acumulació d'àcid malondialdehid. A partir de l'augment dels nivells de tocoferols, aquests van continuar incrementant mentre que els nivells de peroxidació lipídica disminuïen. En canvi, els nivells de tocotrienols es van mantenir constants o fins i tot van disminuir a mesura que la germinació progressava, no mostrant cap tipus de correlació amb els nivells de peroxidació lipídica. Per tant, es creu que tot i els elevats continguts de tocotrienols dels que disposen, les llavors sintetitzen tocoferols durant la germinació per tal de protegir els lípids dels processos metabòlics que generen peroxidació.



Contents lists available at ScienceDirect

Phytochemistry

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

Enhanced tocopherol levels during early germination events in *Chamaerops humilis* var. *humilis* seeds



Laura Siles, Leonor Alegre, Verónica Tijero, Sergi Munné-Bosch*

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 December 2014
Received in revised form 23 July 2015
Accepted 27 July 2015
Available online 1 August 2015

Keywords:

Dormancy
Germination
Lipid peroxidation
Natural seed bank
Tocochromanols
Vitamin E

ABSTRACT

Most angiosperms accumulate vitamin E in the form of tocopherols in seeds, exerting a protective antioxidant role. However, several palm trees principally accumulate tocotrienols, rather than tocopherols, in seeds, as it occurs in other monocots. To unravel the protective role of either tocopherols or tocotrienols against lipid peroxidation during seed germination in *Chamaerops humilis* var. *humilis*; seed viability, natural and induced germination capacity, seed water content, malondialdehyde levels (as an indicator of the extent of lipid peroxidation) and vitamin E levels (including both tocopherols and tocotrienols) were examined at various germination phases in a simulated, natural seed bank. At the very early stages of germination (operculum removal), malondialdehyde levels increased 2.8-fold, to decrease later up to 74%, thus indicating a transient lipid peroxidation at early stages of germination. Tocopherol levels were absent in quiescent seeds and did not increase during operculum removal, but increased later presumably dampening malondialdehyde accumulation. Thereafter, tocopherols continued increasing, while lipid peroxidation levels decreased. By contrast, tocotrienols levels remained constant or even decreased as germination progressed, showing no correlation with lipid peroxidation levels. We hypothesize that despite their high tocotrienol content, seeds synthesize tocopherols during germination to protect lipids from peroxidation events.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Germination starts with seed imbibition, a fast initial uptake of water that resumes seed metabolism and recommences respiratory activity (Bewley, 1997; Bewley and Black, 1994). These changes may provide an important source of reactive oxygen species (ROS), which can either act as signaling molecules or have deleterious effects in seeds. ROS play an important role in the completion of germination, for example, by acting as a signal in dormancy alleviation and by stimulating the expression of genes involved in gibberellin signaling (Bailly et al., 2008; El-Maarouf-Bouteau and Bailly, 2008). However, the uncontrolled and sustained accumulation of ROS is highly toxic for the cell, inducing an oxidative stress that can cause cellular damage. One of the best known harmful effects of ROS accumulation is massive lipid peroxidation, in which the polyunsaturated fatty acids (PUFAs) present in the membranes or in the reserve lipids of oily seeds are degraded (Falk and Munné-Bosch, 2010; Bailly, 2004). ROS can also oxidize nucleic acids, proteins (Beckman and Ames, 1997) and deactivate some enzymes (Charles and Halliwell, 1980).

Tocopherols and tocotrienols, known as tocochromanols, are vitamin E compounds formed by a polar chromanol head group linked to a polyprenyl hydrophobic tail. Whereas tocopherols have a fully saturated tail, tocotrienols have three (trans) double bonds at the 3', 7' and 11' positions. Four different homologues can be distinguished depending on the number and the position of methyl groups on the aromatic portion of the chromanol head group: the α -, β -, γ - and δ -forms (Falk and Munné-Bosch, 2010; Hunter and Cahoon, 2007; Munné-Bosch and Alegre, 2002). In seeds, tocochromanols scavenge lipid peroxy radicals, quench and scavenge singlet oxygen and protect from lipid peroxidation during seed storage, germination and seedling development (Falk and Munné-Bosch 2010; Sattler et al., 2004, 2006; Simontacchi et al., 1993).

Seeds can accumulate tocopherols (α - and γ -forms of tocopherol are present depending on the species) and tocotrienols (Falk and Munné-Bosch, 2010; Horvath et al., 2006; Munné-Bosch and Alegre, 2002). While tocopherols are present in almost all parts of plants, tocotrienols are not universally found within the plant kingdom and are only located in seeds, fruits, latex and in leaves of some species (Morales et al., 2014; Falk and Munné-Bosch, 2010; Horvath et al., 2006). Moreover, there is a high variation in the relative abundance of each tocotrienol homologue

* Corresponding author.

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

depending on the plant species (Falk and Munné-Bosch, 2010). Tocotrienols have been found in seeds of some dicots (Amaral et al., 2005a; Horvath et al., 2004; Velasco et al., 2000; Osuna-Garcia et al., 1998), and several monocots, reaching very high concentrations in the oil extracted from cereals and most particularly in the palm oil (Cela et al., 2011; Garcia et al., 2011; Horvath et al., 2006). The seeds of *Avena sativa*, *Triticum sp.*, *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa* and *Zea mays* accumulate tocotrienols rather than tocopherols. Specifically, in the *Arecaceae* family, some species, such as *Cocos nucifera*, accumulate more tocotrienols than tocopherols in seeds (Horvath et al., 2006). Indeed, it has recently been shown that this is not the exception and that several species of the *Arecaceae* family contain principally tocotrienols in its quiescent seeds (Siles et al., 2013). Tocotrienols can be equally efficient as tocopherols or even better antioxidants than tocopherols under some conditions (Matringe et al., 2008; Kamal-Eldin and Appelqvist, 1996; Suzuki et al., 1993); it is therefore likely that tocotrienols can have the same role as tocopherols in protecting membrane lipids from peroxidation. However, the relative importance of tocopherols and tocotrienols in protecting seeds from lipid peroxidation has been largely unexplored thus far.

Chamaerops humilis is a dwarf palm native of continental Europe found in the Iberian Peninsula with an outstanding ecological interest (Fedriani and Delibes, 2011) that at the same time accumulates large amounts of tocotrienols in quiescent seeds, as it occurs with other monocots (Siles et al., 2013). Therefore, we hypothesized that tocotrienols may protect seeds from lipid peroxidation during germination. Here, we aimed to get correlative evidence between the vitamin E composition and lipid peroxidation levels to support this hypothesis. Moreover, we explored the vitamin E composition in the endosperm and the embryo of seeds to shed light on the possible tissue-specific function of tocotrienols. Finally, we evaluated seed viability both in a simulated seed bank for 6 months and after storage at 4 °C for 1 year.

2. Results and discussion

2.1. Seed viability, germination and dormancy

Seed viability and germination were studied for 6 months in a simulated, natural seed bank of *C. humilis* var. *humilis*. The percentage of living seeds was maintained stable (ranging between 44% and 55%) throughout the experiment. It is known that seed viability can be affected by storage conditions, especially under harsh conditions in seeds buried in the soil (Bonner, 2008). Although seed viability in terms of alive seeds was kept constant during 6 months of burial, the percentage of dying (weakly and patchy) seeds decreased significantly; and consequently the percentage of the dead ones increased, from a 5.2% to a 45.3% (Fig. 1A).

Seeds were buried in the soil during September and viable seeds started to germinate during December (25.2%, Fig. 1B), just after the rainy, autumn season (Suppl. Fig. 1). Seeds continued germinating during winter, with a germination capacity of 36.9% during March 2014 (Fig. 1B). Seeds germinated after autumn rainfalls (December) and during the winter (March) thanks to the optimal climatic conditions with high water availability and mild temperatures typical of the maritime Mediterranean climate where the simulated, natural seed bank was established (see Suppl. Fig. 1 for a detail of climatic conditions). Water availability is essential for imbibition and seed metabolism resumption to break primary dormancy (Bewley, 1997). The water content of the seeds largely increased during December 2013, with the more developed germinated seeds containing more water in their tissues (Suppl. Fig. 2). *C. humilis* seeds have a very characteristic, remote germination (i.e. a cotyledonary petiole grows out and away from the seed, Iossi et al.,

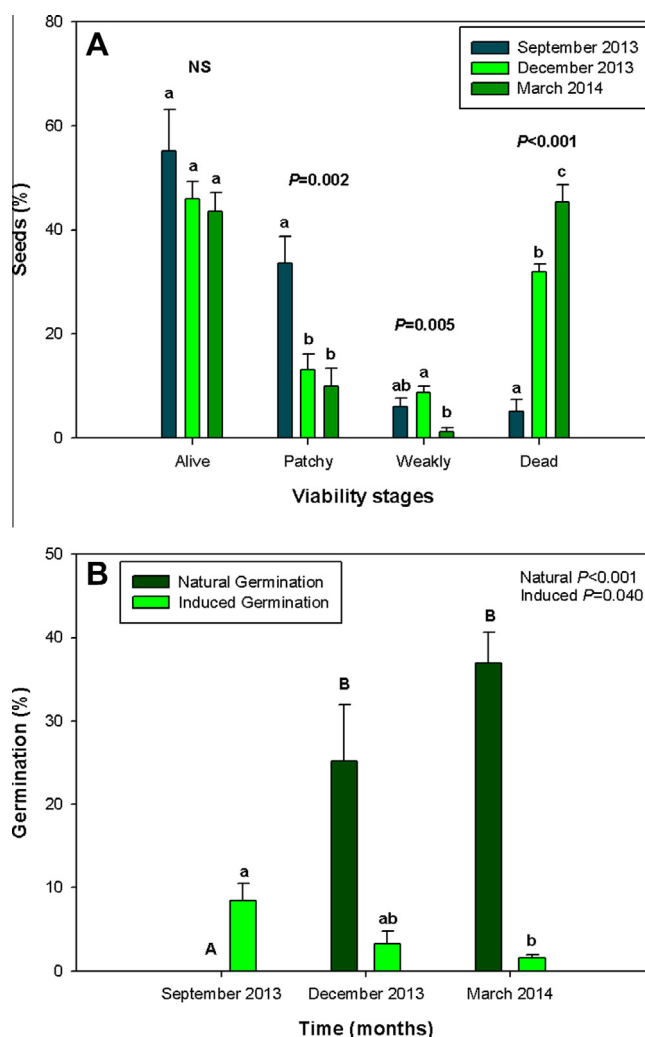


Fig. 1. (A) Percentage of alive, dying (patchy and weakly) and dead seeds at the establishment of the seed bank (September 2013), and after 3 and 6 months of burial (December 2013 and March 2014, respectively). (B) Percentage of natural and induced germination after 0, 3 and 6 months of burial. Data are the mean \pm SE of $n = 5$. Each replicate is a plot, which represents the mean of 3 bags with 50 seeds each. Different letters indicate significant differences between different time points (ANOVA, $P \leq 0.05$). Capital letters refer to natural germination and small letters refer to induced germination. NS, not significant.

2006), with up to five different germination stages being observed during the study (Fig. 2). Induced germination was additionally measured in non-germinated seeds, and it was 8.4% during September. This percentage decreased after 3 and 6 months of burial (to 3.2% and 1.6% respectively, Fig. 1B). During March 2014, there was a 43.5% of viable seeds and a 36.9% of germinated seeds. The remaining 6.6% of non-germinated viable seeds appeared to be dormant. The low germination percentage of the non-germinated seeds by induced germination (1.6%) suggests that 5.0% of the viable seeds present secondary dormancy. Hence, *C. humilis* orthodox seeds have principally primary dormancy: seeds are in a dormant state until the appearance of favorable environmental germination factors (González-Benito et al., 2006; Baskin and Baskin, 2004; Bewley, 1997).

2.2. Vitamin E composition in quiescent seeds

Quiescent seeds of *C. humilis* var. *humilis*, contained tocotrienols, mainly in the form of α -tocotrienol (>80%), and tocopherols

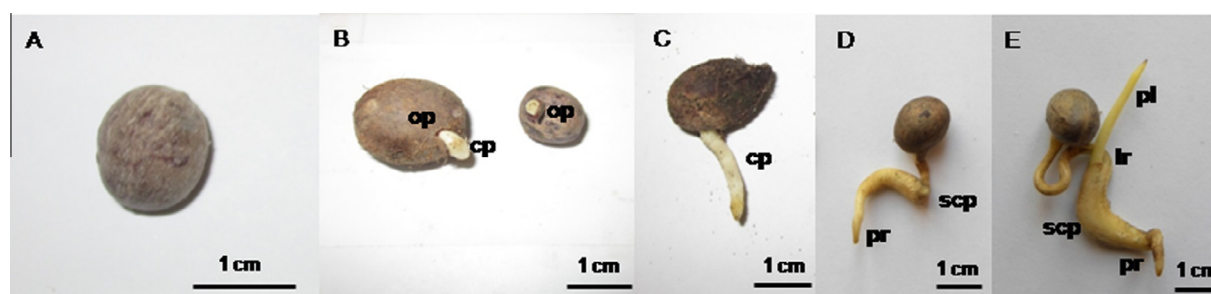


Fig. 2. Germination phases observed through the experiment. (A) Non germinated seeds (phase 0). (B) Seeds with the operculum opened (phase I). (C) Seeds with the cotyledonary petiole emerging (phase II). (D) Seeds with the primary radicle and the cotyledonary petiole already swelled (phase III). (E) Appearance of the plumule from the longitudinal rift of the cotyledonary petiole. Op, operculum. Cp, cotyledonary petiole. Scp, swelled cotyledonary petiole. Pr, primary root. Lr, longitudinal rift. Pl, plumule.

were found at very low, non-quantifiable amounts (traces, Fig. 3). In a previous study, we showed that *C. humilis* var. *argentea* (syn. *cerifera*) and *C. humilis* var. *vulcano* also predominantly accumulated tocotrienols, mainly in the form of α -tocotrienol, rather than tocopherols in quiescent seeds (Siles et al., 2013). In contrast, Nehdi et al. (2014) found δ -tocotrienol as the major component (32%), followed by α -tocotrienol (29%), γ -tocopherol (21%) and γ -tocotrienol (12%) in the oil obtained from *C. humilis* var. *argentea* seeds collected in Tunisia and over-dried at 60 °C for 24 h. Different genotype, ecotype, storage conditions and/or extraction pre-treatments in *C. humilis* var. *argentea* seeds from Siles et al. (2013) and Nehdi et al. (2014) may be the possible cause of the contrasting tocochromanol composition obtained in these studies.

A detailed study of the tocochromanol composition of seed tissues in *C. humilis* var. *humilis*, including the embryo and endosperm, revealed that the endosperm only contained tocotrienols (tocopherols were not detected). The embryo contained 138 $\mu\text{g/g}$ seed of total tocotrienols and 0.7 $\mu\text{g/g}$ seed of total tocopherols, that is a 99.4% of tocotrienols and very few tocopherols (0.6%, Fig. 3). The major tocotrienol form found was α -tocotrienol. The seed and the endosperm had similar percentages of α -tocotrienol (81.4% and 83.0%, respectively), and the embryo accumulated more than 90% of tocochromanols in the form of α -tocotrienol (Fig. 3), thus confirming that this is the major tocochromanol form in seeds from *C. humilis* var. *humilis*.

When tocotrienol levels were measured in quiescent seeds after 6 months of burial, results showed a decrease from 40 to 26 $\mu\text{g/g}$ seed of α -tocotrienol, while variations in the other tocotrienol forms during the same period were negligible (<1 $\mu\text{g/g}$ seed, data not shown). Furthermore, this was accompanied by a 50% reduction in the extent of lipid peroxidation in quiescent seeds after 6 months of burial (as indicated by MDA levels, which decreased from 62 to 28 nmol/g seed, $P \leq 0.05$, data not shown). The high amounts of tocotrienols, particularly α -tocotrienol, in *C. humilis* var. *humilis* quiescent seeds suggest that tocotrienols may be as efficient as tocopherols against lipid peroxidation during storage and dormancy, acting as antioxidants substituting tocopherols. It is tempting to speculate that the tocochromanol composition of seeds may vary depending on prevailing environmental conditions during fruit and seed maturation in *C. humilis*. Depending on the variety, genotype and ecotype, tocotrienols may be the unique tocochromanols found in mature, quiescent seeds that can therefore exert a role against lipid peroxidation, as it occurs in our study and many other seeds from the Arecaceae family (Siles et al., 2013).

2.3. Linking lipid peroxidation with vitamin E composition in germinating seeds

A correlative study between MDA accumulation and the vitamin E composition of seeds was performed to examine what

vitamin E form is involved in the protection of lipids from peroxidation during germination of *C. humilis* var. *humilis* seeds. As this species mostly accumulates tocochromanols in the form of α -tocotrienol in quiescent seeds, we expected that the correlative evidence obtained might support a role for α -tocotrienol in the protection of germinating seeds from lipid peroxidation. During germination, malondialdehyde (MDA) levels increased 2.8-fold between phases 0 and I, just when the operculum opened. This might favor oxidative processes, including activation of the mitochondrial respiratory chain and the mobilization of seed storage lipids by β -oxidation and gluconeogenesis, which are known to be sources of elevated ROS during seed germination (Bailly, 2004; Sattler et al., 2004, 2006). Between phases I and II, MDA levels remained stable to later decrease by 74% between phases II and III, thus indicating a transient lipid peroxidation at early stages of germination (Fig. 4). Interestingly, while tocopherols were not present (or just found as traces) up to operculum removal (phase I), tocopherols levels (particularly the α -tocopherol) increased between phases I and II. In the later stages, the levels of tocopherols continued increasing, which was associated with a decrease of lipid peroxidation. In contrast, tocotrienols levels remained stable or even decreased as germination progressed (Fig. 5). Levels of tocopherols negatively correlated with those of MDA ($r = -0.339$, $P < 0.001$), while those of tocotrienols did not. The decrease in MDA levels during germination might therefore be associated with the *de novo* tocopherol synthesis. These results provide correlative evidence of a protective role of tocopherols against lipid peroxidation during germination in *C. humilis*. This is consistent with the fact that tocopherols only accumulate in the embryo of the seed (and not in the endosperm, Fig. 3A), and therefore, although at only low abundance (<1 $\mu\text{g/g}$ of embryo in quiescent seeds), tocopherols appear to be concentrated in this important tissue once synthesized during germination, and as such might protect it from effects of lipid peroxidation. Interestingly, however, tocotrienols are much more abundant than tocopherols in the embryo (>99% of vitamin E is in the form of tocotrienols in quiescent seeds – Fig. 3A), and despite the dramatic increase in tocopherols during germination (Fig. 5), presumably in growing tissues only, tocotrienols – present also in the endosperm – may still be more abundant than tocopherols in growing tissues of germinating seeds. This is deduced from the predominant accumulation of tocotrienols in the embryo (Fig. 3A) and the high absolute amounts of these antioxidants in seeds during all germination phases (Fig. 5). Therefore, it might be some interplay between tocopherols and tocotrienols in the developing embryo during germination. But why then, if tocotrienols could exert an antioxidant role protecting lipids from peroxidation in the embryo, are tocopherols being synthesized during germination? Based on the correlative evidence obtained in the present study, it is hypothesized that, despite their high tocotrienol content, seeds

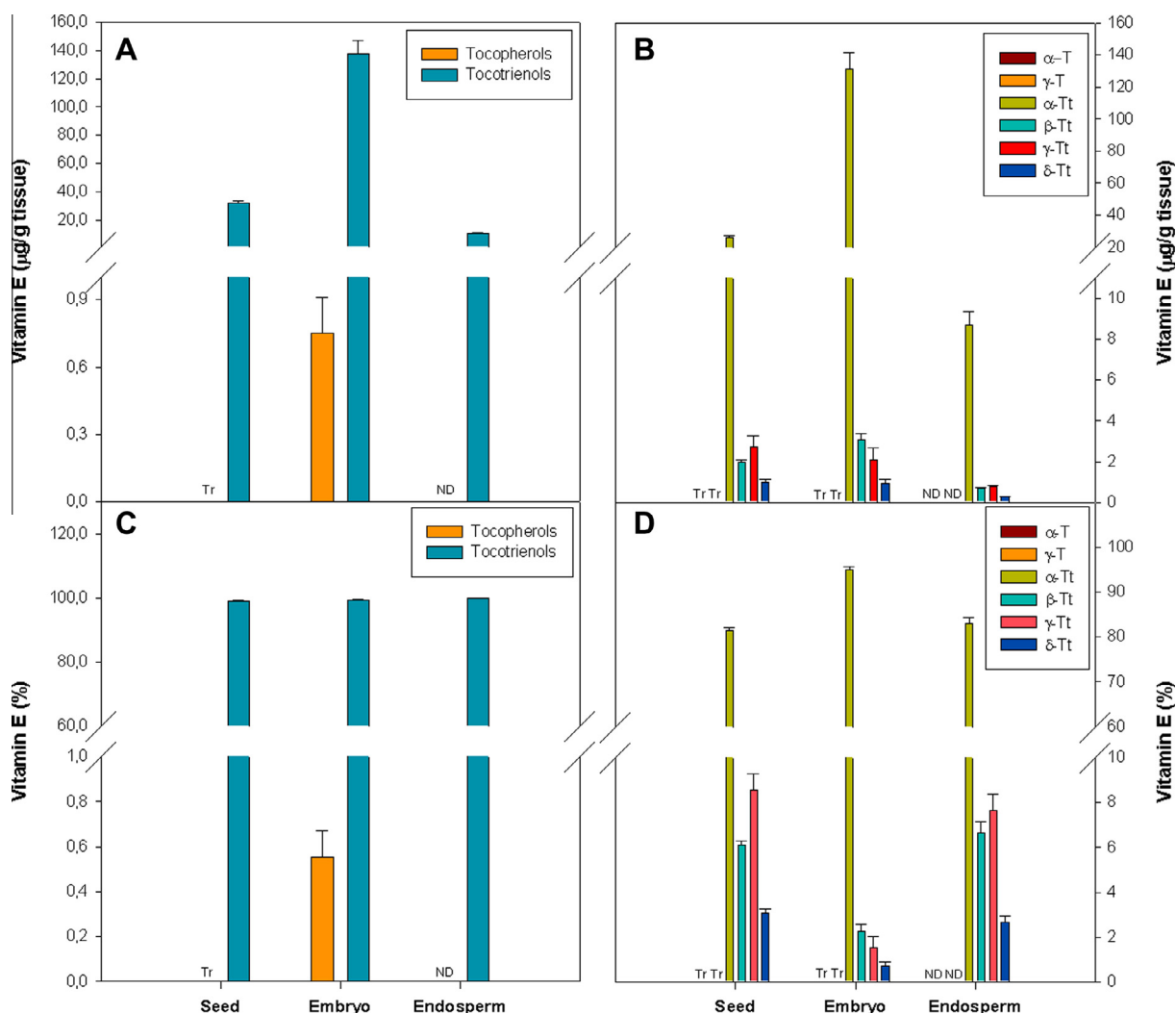


Fig. 3. Vitamin E levels in entire seeds, and isolated embryos and endosperms of quiescent *C. humilis* var. *humilis* seeds. (A) Amounts of total tocopherols and total tocotrienols. (B) Distribution and amount of different homologues. (C) Percentage of total tocopherols and tocotrienols. (D) Percentage and distribution of the different vitamin E homologues. Data are the mean ± SE of $n = 5$. Tr, traces. ND, not detected. α -T: α -tocopherol, γ -T: γ -tocopherol, α -Tt: α -tocotrienol, β -Tt: β -tocotrienol, γ -Tt: γ -tocotrienol, δ -Tt: δ -tocotrienol.

synthesize tocopherols during germination to protect lipids from peroxidation events.

The antioxidant activity of tocopherols may protect seeds from lipid peroxidation during germination by quenching and scavenging singlet oxygen and by providing phenolic hydrogens to lipid radicals, deactivating them chemically and consequently preventing the propagation of lipid peroxidation (Falk and Munné-Bosch, 2010; Kamal-Eldin and Appelqvist, 1996). Previous studies using *Arabidopsis thaliana* vitamin E-deficient mutants have shown that tocopherols are essential for protecting PUFAs from the damaging effects of ROS during germination and early seedling growth (Mène-Saffrané et al., 2010; Sattler et al., 2004, 2006). Therefore, the accumulation of tocopherols during germination, just after operculum removal, may help protect *C. humilis* seeds from lipid peroxidation events during germination. Obviously, this antioxidant activity can be exerted together with that of other antioxidants that might be present in *C. humilis* seeds, including tocotrienols. The relative contribution of tocopherols and tocotrienols in the protection from lipid peroxidation in germinating seeds needs further investigation, but our results suggest tocopherols exert a role against lipid peroxidation during germination of *C. humilis* var. *humilis* seeds.

Previous studies have shown that tocopherols are also essential for maintaining viability during seed quiescence and longevity in *A. thaliana* (Sattler et al., 2004, 2006). This does not appear to be the case in *C. humilis* var. *humilis*, since this monocot accumulates tocotrienols, rather than tocopherols, in quiescent seeds. It is still, however, unknown why tocopherols are needed to protect germinating seeds from lipid peroxidation, while tocotrienols is the only vitamin E form that accumulates in quiescent *C. humilis* var. *humilis* seeds. Tocopherol accumulation may presumably exert an adaptive advantage over tocotrienol accumulation in germinating seeds of some monocot species, but the mechanism and interplay with other antioxidants, including tocotrienols, is still to be elucidated. The possibility should not be excluded that tocopherols exert a specific regulatory function during germination related to lipid peroxidation events and cell signaling (Sattler et al., 2006; Munné-Bosch et al., 2007; Morales et al., 2015; Simancas and Munné-Bosch, 2015), but this requires further investigations in palm seeds.

2.4. Seed viability during storage

The establishment of artificial seed banks plays an important role in the conservation of endangered species and in the

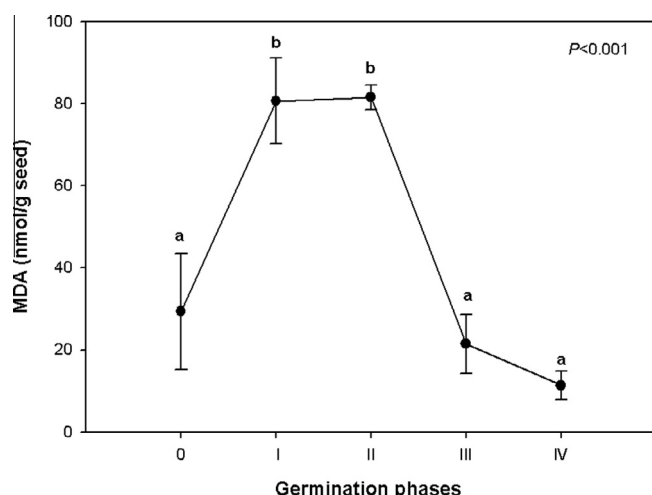


Fig. 4. Changes in the extent of lipid peroxidation, as indicated by malondialdehyde (MDA) levels, during germination in *C. humilis* var. *humilis* seeds. Data are the mean \pm SE of 5 plots, including 5 bags each. Different letters indicate significant differences between phases of germination (ANOVA, $P \leq 0.05$). Phase 0: Non germinated seeds. Phase I: Opening of the operculum. Phase II: Emergence of the cotyledonary petiole. Phase III: Swelling of the cotyledonary petiole and appearance of the radicle. Phase IV: Emergence of the plumule and development of the radicle.

vegetation regeneration and restoration of degraded habitats. They are important for conservation of genetic diversity, research of unknown species, for keeping the survival of plant populations of interest and for preventing extinction of several species. Artificial seed banks also protect seeds from catastrophic natural events, climate change, man-made disasters and diseases (Bakker et al., 1996). *C. humilis* is the only native palm of continental Europe. It helps preventing erosion and desertification having therefore a high ecological value (González-Benito et al., 2006; Herrera, 1989). We evaluated here how storage for 12 months at 4 °C in darkness can affect seed viability in *C. humilis* var. *humilis*, and to what extent lipid peroxidation and tocotrienol levels were affected by seed storage under these conditions. In our artificial seed bank, the percentage of alive seeds kept constant and the percentage of dead seeds increased (from 5.2% to 19.4%), due to the fact that seed storage at 4 °C for 1 year caused death of dying seeds, but did not cause death of completely alive (healthy) seeds (Fig. 6A). Meanwhile, the levels of MDA and tocotrienols kept unaltered (Fig. 6B and C). Since tocopherols were not present in quiescent seeds and lipid peroxidation did not increase during seed storage at 4 °C, the results suggest that tocotrienols are exerting some protective effect against lipid peroxidation during cold storage. As discussed previously, tocotrienols are as effective as tocopherols as antioxidants and prevent efficiently the propagation of lipid peroxidation in lipid membranes and oils. Furthermore, it is suggested from the present study that storage at 4 °C for up to 1 year is adequate to keep seed viability in this species.

3. Conclusions

C. humilis is a species with orthodox seeds that germinate as soon as they encounter favorable climatic conditions, establishing very low percentages of secondary dormancy in a simulated, natural seed bank. Tocotrienols may exert a protective role in quiescent seeds during storage and dormancy. Furthermore, despite the high amounts of tocotrienols present in quiescent seeds, tocopherols are *de novo* synthesized in germinating seeds and may help protect lipids from peroxidation during germination. This may result from an increased demand for antioxidants as a result of enhanced ROS

production and lipid peroxidation during early germination events. Further research is however needed to know the relative contribution of tocopherols and tocotrienols in the protection from lipid peroxidation in germinating seeds and how they interact to better understand the mechanisms underlying the protective function of these compounds in seeds.

4. Experimental

4.1. Plant material and sampling

Ten kg of *C. humilis* var. *humilis* seeds covered by the fruit endocarp were provided by Semillas Silvestres S.A. (Córdoba, Spain). Fruits were collected by the company during August 2013 in La Sierrezuela (Southern Spain) from individuals growing in calcareous soil and stored at 4 °C until sent to the University of Barcelona during September 2013. Two independent experiments were performed with these seeds.

To mimic a natural seed bank, five plots were dug at the experimental fields of the Faculty of Biology at the University of Barcelona (Barcelona, Spain), where 25 nylon bags with 50 seeds each were buried at 8 cm depth in a Calcic Luvisol (FAO) during September 2013. A total of 125 bags (6,250 seeds) were buried. The nylon bags were 21.0 \times 14.8 cm (300 μ m mesh size) and were used for stocking up the seeds, avoiding the entrance of soil's predators and allowing the gas exchange. After burial, a net was placed above the plots to prevent seed damage (Suppl. Fig. 3). Three samplings to measure seed viability, the extent of lipid peroxidation and vitamin E composition were carried out. The first one during September 2013, before seed burial; the second one during December 2013, 3 months after burial (after the rain season); and the last one during March 2014, 6 months after burial. At each sampling point, seeds were separated according to their germination stage (Fig. 2). For biochemical analyses, seeds at every developmental stage (obtained during March 2014) were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C until analyses.

To mimic an artificial seed bank, 1000 seeds were kept at 4 °C for 12 months in darkness, until September 2014, when a part of the seeds were immediately used for viability tests and the other seeds were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C until subsequent biochemical analyses to estimate the extent of lipid peroxidation and the vitamin E composition of seeds.

4.2. Seed dissection

One set of analyses included the dissection of 30 seeds. The embryo was the first tissue separated from the rest of the seed, localizing previously the operculum. Then, the seed was sawed and the embryo was isolated with the aid of a scalpel and milled with a vibratory grinder (Retsch MM 400). Later, the endosperm was isolated with a scalpel, milled with a mincer (Philips HR 1396 400 W) and finally with a grinder (Taurus Aromatic 150 W). Seeds parts were obtained and immediately used for biochemical analyses to estimate the vitamin E composition of seeds.

4.3. Biochemical analyses

The extent of lipid peroxidation was estimated spectrophotometrically by measuring the amount of malondialdehyde (MDA) in seeds following the method described by Hodges et al. (1999), which takes into account the possible influence of interfering compounds in the thiobarbituric acid-reactive-substances (TBARS) assay.

The vitamin E composition of seeds was measured in methanolic extracts by high-performance liquid chromatography (HPLC) as

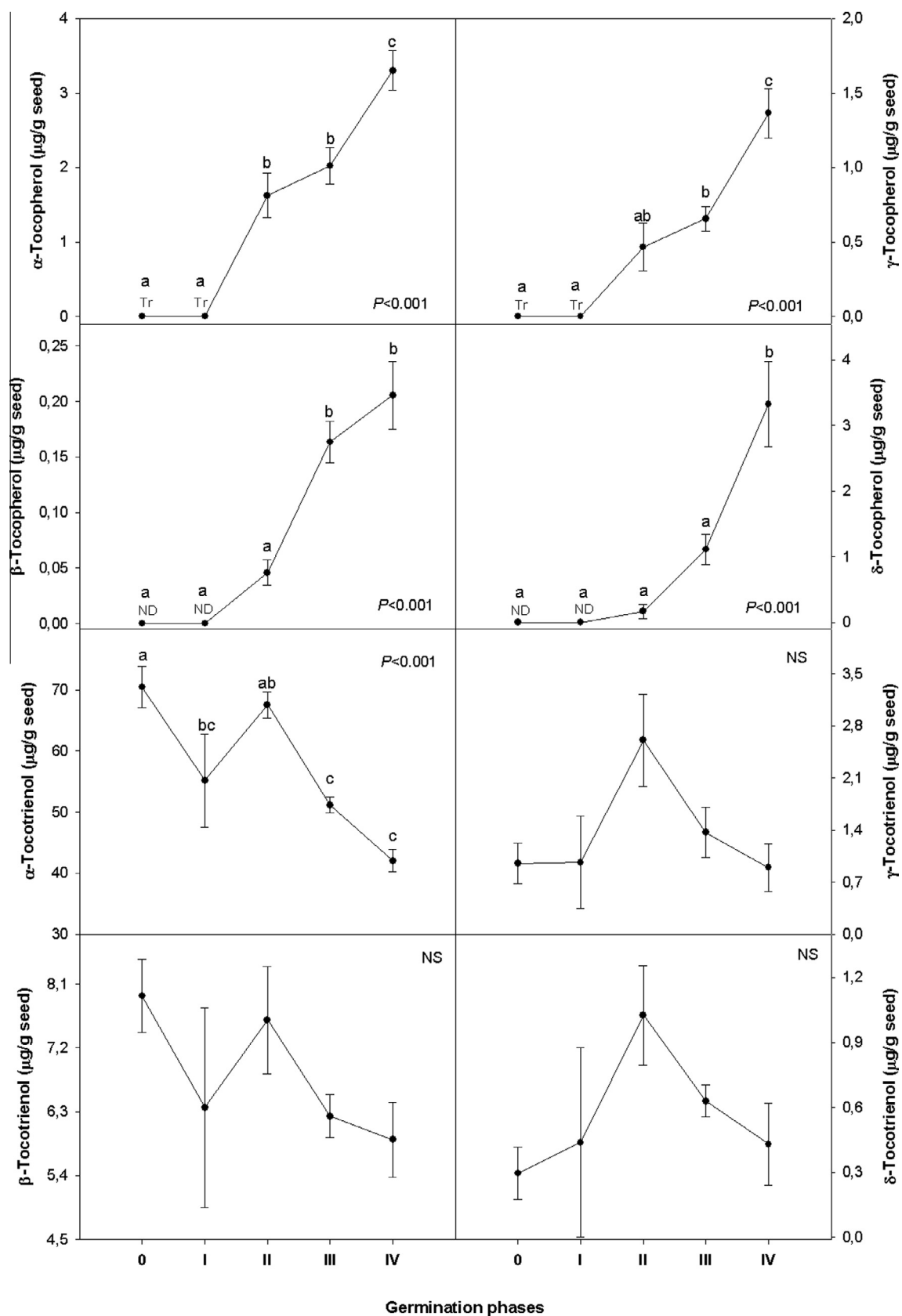


Fig. 5. Changes in the amounts of α -, β -, γ - and δ -tocopherols and tocotrienols during germination in *C. humilis* var. *humilis* seeds. Data are the mean \pm SE of 5 plots, including 5 bags each. Different letters indicate significant differences between phases of germination (ANOVA, $P \leq 0.05$). Phase 0: Non germinated seeds. Phase I: Opening of the operculum. Phase II: Emergence of the cotyledonary petiole. Phase III: Swelling of the cotyledonary petiole and appearance of the radicle. Phase IV: Emergence of the plumule and development of the radicle. Tr, traces. ND, not detected. NS, not significant.

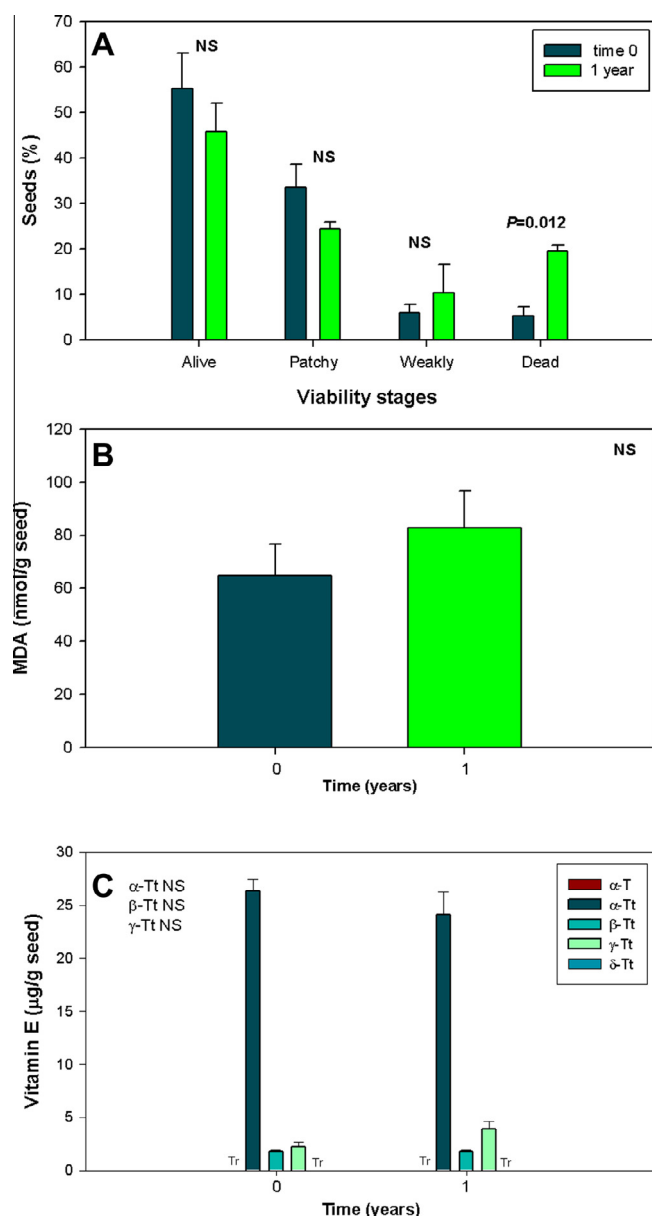


Fig. 6. (A) Percentage of alive, dying (patchy and weakly) and dead seeds at the start of the experiment and after 12 months of storage at 4 °C in darkness (artificial seed bank). Data are the mean \pm SE of $n = 5$, each replicate including 50 seeds. (B) Malondialdehyde (MDA) levels. (C) Vitamin E levels. Data are the mean \pm SE of $n = 5$. Different letters indicate significant differences between different time points (ANOVA, $P \leq 0.05$). Tr, traces.

described by Siles et al. (2013). For the extraction of tocopherols and tocotrienols, seeds were crushed using a hammer and then milled with a mincer (Philips HR 1396 400 W) and with a grinder (Taurus Aromatic 150 W). Five replicas of 100 mg in 1.5 mL of methanol or 10 mg in 200 μ L methanol (for embryos and endosperm) were used for analyses. Samples were sonicated using a Branson 2510 ultrasonic cleaner for 30 min and then incubated overnight at room temperature. Afterwards, samples were sonicated for 30 min and incubated at room temperature in the dark for 3 h, and this process was performed again for 2 additional hours. Finally, samples were centrifuged for 15 min at 4 °C and 10,000 rpm and transferred to vials for analysis. A detailed study was performed to confirm this was the most efficient extraction procedure, including extraction in methanol, 24 h of maceration and 3 cycles of sonication (see Suppl. Figs. 4 and 5 for comparison

of extraction methods and stability of tocopherols in methanolic extracts, respectively). The HPLC analysis was performed as described by Amaral et al. (2005b). In brief, the HPLC equipment consisted of an integrated system with a Jasco PU-2089 Plus pump, a JascoAS-2055 Plus auto-sampler (Jasco, Japan) and a FP-1520 fluorescence detector (Jasco, Japan). All tocopherol forms were separated on an Inertsil 100A (5 μ m, 30 \times 250 mm, GL Sciences Inc., Japan) normal-phase column operating at room temperature. The flow rate was 0.7 mL min⁻¹ and the injection volume was 10 μ L. The mobile phase was a mixture of *n*-hexane and *p*-dioxane (95.5;4.5 v/v). Detection was carried out at an excitation of 295 nm and emission at 330 nm. Quantification was based on the results obtained from the fluorescence signal and compared with those of calibration curves made with authentic standards (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).

4.4. Natural and induced seed germination

The percentage of natural seed germination was obtained counting the germinated and non-germinated seeds of each nylon bag used for the analyses.

For the induced germination test, 50 non-germinated seeds (including dormant and dead seeds) from each plot were collected (a total of 250 seeds). Germination tests were carried out as described by González-Benito et al. (2006). In brief, the non-germinated seeds were chemically scarified with sulphuric acid at 96% during 15 min and then washed thoroughly with tap water to eliminate the endocarp, with a last distilled water wash. Then, the seeds were sterilized in an aqueous solution with antifungals at 10% (15% m/v Carbendazim and 35% m/v Tetramethylthiuram disulfide) during 15 min. Once the seeds were treated, 50 seeds were placed in plastic recipients of 29 \times 19 \times 7 cm with 1.500 ml of autoclaved vermiculite and watered with 444 ml of distillate water, which corresponds to the 80% of the vermiculite water absorption. Finally, the recipients were placed in a germination chamber at 15°/25 °C, photoperiod 8-h dark/16-h light and 100% relative humidity. All steps of the germination test were performed in darkness.

4.5. Viability tests and water content

Viability tests were performed as follows. Seeds were imbibed for 24 h in darkness and then the operculum and the embryo were identified. The seeds were sawed and the parts which contained the embryo were soaked in a tetrazolium solution at 1% and incubated at 37 °C in darkness for 24 h. Subsequently, the viable and non-viable seeds were counted. Seeds were considered to be alive when the embryo was intact and fully stained with rich formazan red. Seeds were considered to be non-viable when staining of the embryo was patchy, weak (pink), or absent. A fraction of these latter seeds were empty (aborted seeds).

The water content (WC) of seeds was estimated as WC (gH₂O/gDW) = (fresh weight-dry weight)/dry weight. The dry weight was obtained drying the seeds at 100 °C until constant weight.

4.6. Climatological conditions

Environmental conditions during experiments were monitored every 5 min by means of a weather station situated at 100 m from the experimental fields. Data was obtained by a photosynthetically-active photon flux density (PPFD) pyranometer sensor CM11 (KIPP and ZONEN, Delft, The Netherlands) and a HMP35AC thermohygrometer (Vaisala, Helsinki, Finland).

4.7. Statistical analyses

Differences between viability stages, time and/or germination phases were evaluated using the analysis of variance (ANOVA) with Tukeys' post hoc tests. Results were considered significant at a probability level of $P \leq 0.05$.

Acknowledgements

We are very grateful to the Serveis Científico-Tècnics and Serveis dels Camps experimentals (Universitat de Barcelona) for technical assistance. We also thank Leonardo M. Ribeiro from the Universidade Estadual de Montes Claros (Brazil) for his advices with the antifungal solutions, induced germination and tetrazolium tests. This work was supported by the Spanish Government (BFU 2012-39527). Support for the research was also received through the prize ICREA Academia given to S.M.-B., funded by the Catalan Government. L.S. holds a FPU fellowship from the Spanish Government.

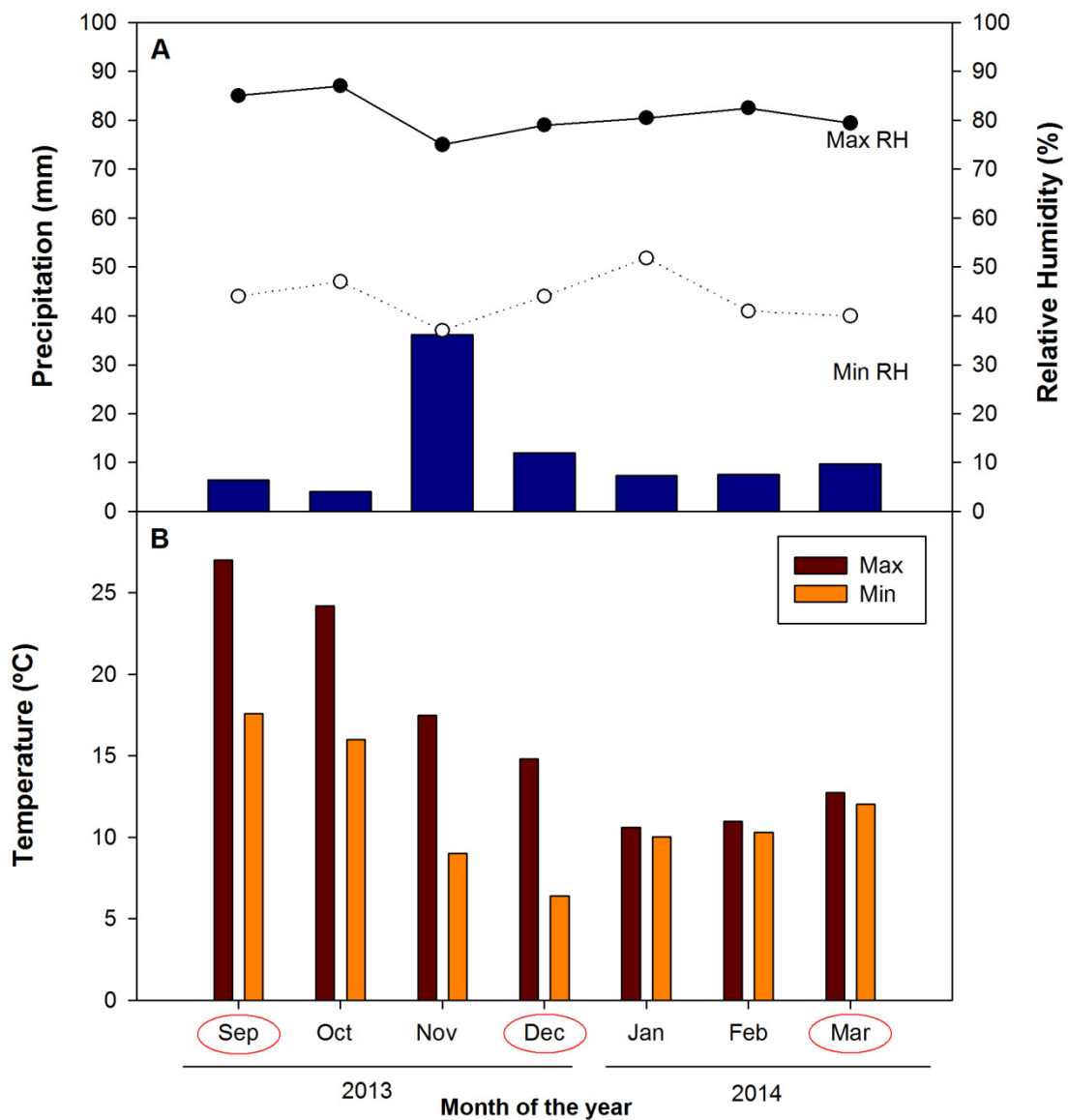
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.07.018>.

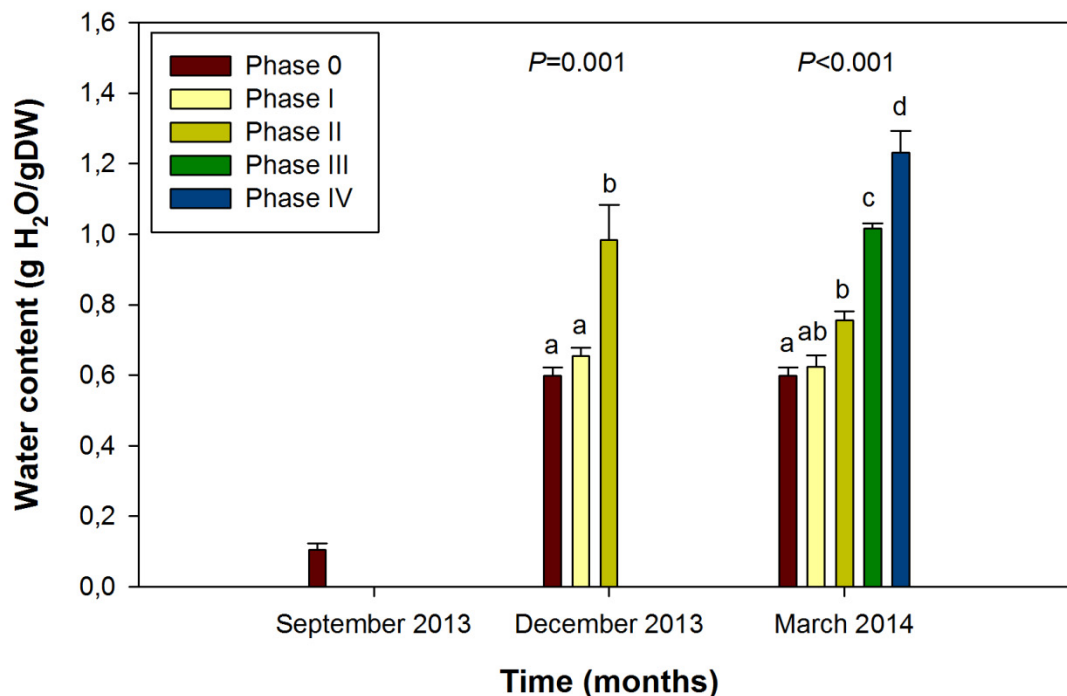
References

- Amaral, J.S., Alves, M.R., Seabra, R.M., Oliveira, B.P., 2005a. Vitamin E composition of walnuts (*Juglans regia* L.): a 3-year comparative study of different cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 53, 5467–5472.
- Amaral, J.S., Casal, S., Torres, D., Seabra, R.M., Oliveira, B.P.P., 2005b. Simultaneous determination of tocopherols and tocotrienols in hazelnuts by a normal phase liquid chromatographic method. *Anal. Sci.* 21, 1545–1548.
- Bailly, C., 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci. Res.* 14, 93–107.
- Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H., Corbineau, F., 2008. From intracellular signalling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *C. R. Biol.* 331, 806–814.
- Bakker, J.P., Poschlod, P., Strykstra, R.J., Bekker, R.M., Thompson, K., 1996. Seed banks and seed dispersal: important topics in restoration ecology. *Acta Bot. Neerl.* 45, 461–490.
- Baskin, J.M., Baskin, C.C., 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Sci. Res.* 14, 1–16.
- Beckman, K.B., Ames, B.N., 1997. Oxidants, antioxidants, and aging. In: Scandalios, J.G. (Ed.), *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Bewley, J.D., 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9, 1055–1066.
- Bewley, J.D., Black, M., 1994. *Seeds: Physiology of Development and Germination*. Plenum Press, New York.
- Bonner, F.T., 2008. Storage of seeds. in: Bonner, F.T., Karfalt, R.P. (Eds.), *Woody Plant Seed Manual*. US Department of Agriculture Forest Service: Washington, DC, *Agriculture Handbook*, pp. 85–96.
- Cela, J., Müller, M., Munné-Bosch, S., 2011. Tocopherol and tocotrienol (vitamin E) composition of some edible fruits. In: Lindberg, A. (Ed.), *Vitamin E: Nutrition, Side Effects and Supplements*. Nova Science Publisher, Hauppauge, NY, pp. 277–287.
- Charles, S.A., Halliwell, B., 1980. Effect of hydrogen peroxide on spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplast fructose biphosphatase. *Biochem. J.* 189, 373–376.
- El-Maarouf-Bouteau, H., Bailly, C., 2008. Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant Signal. Behav.* 3, 175–182.
- Falk, J., Munné-Bosch, S., 2010. Tocochromanols functions in plants: antioxidation and beyond. *J. Exp. Bot.* 61, 1549–1566.
- Fedriani, J.M., Delibes, M., 2011. Dangerous liaisons disperse the mediterranean dwarf palm: fleshy-pulp defensive role against seed predators. *Ecology* 92, 304–315.
- García, Q.S., Giorni, V.T., Müller, M., Munné-Bosch, S., 2011. Common and distinct responses in phytohormone and vitamin E changes during seed burial and dormancy in *Xiris bialata* and *X. peregrina*. *Plant Biol.* 14, 347–353.
- González-Benito, M.E., Huertas-Micó, M., Pérez-García, F., 2006. Seed germination and storage of *Chamaerops humilis* (dwarf fan palm). *Seed Sci. Technol.* 34, 143–150.
- Herrera, J., 1989. On the reproductive biology of the dwarf palm, *Chamaerops humilis* in southern Spain. *Principes* 33, 27–32.
- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F., Prange, R.K., 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207, 604–611.
- Horvath, G., Wessjohann, L., Guisez, Y., Biebau, E., Caubergs, R.J., Horemans, N., 2004. Seeds of grapes of *Vitis vinifera* var. Alphonse lavelle (Royal) a possible model tissue for studying tocotrienols biosynthesis. *Acta Hort.* 652, 415–424.
- Horvath, G., Wessjohann, L., Bigirimana, L., Monica, H., Jansen, M., Guisez, Y., Caubergs, R., Horemans, N., 2006. Differential distribution of tocopherols and tocotrienols in photosynthetic and non-photosynthetic tissues. *Phytochemistry* 67, 1185–1195.
- Hunter, S.C., Cahoon, E.B., 2007. Enhancing vitamin E in oilseeds: unravelling tocopherol and tocotrienols biosynthesis. *Lipids* 42, 97–108.
- Iossi, E., Vittimoro, F., Sader, R., 2006. Seed anatomy and germination of *Phoenix roebelenii* O'Brien (Arecaceae). *Rev. Bras. Sementes* 28, 121–128.
- Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L., 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31, 671–701.
- Matringe, M., Ksas, B., Rey, P., Havaux, M., 2008. Tocotrienols, the unsaturated forms of vitamin E, can function as antioxidants and lipid protectors in tobacco leaves. *Plant Physiol.* 147, 764–778.
- Mène-Saffrané, L., Jones, A.D., DellaPenna, D., 2010. Plastochromanols-8 and tocopherols are essential lipid-soluble antioxidants during seed desiccation and quiescence in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 17815–17820.
- Morales, M., García, Q.S., Siqueira-Silva, A.I., Silva, M.C., Munné-Bosch, S., 2014. Tocotrienols in *Vellozia gigantea* leaves: occurrence and modulation by seasonal and plant size effects. *Planta* 240, 437–446.
- Morales, M., García, Q.S., Munné-Bosch, S., 2015. Ecophysiological response to seasonal variations in water availability in the arborescent, endemic plant *Vellozia gigantea*. *Tree Physiol.* 35, 253–265.
- Munné-Bosch, S., Alegre, L., 2002. The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21, 31–57.
- Munné-Bosch, S., Weiler, E.W., Alegre, L., Müller, M., Dürting, P., Falk, J., 2007. α -Tocopherol may influence cellular signaling by modulating jasmonic acid levels in plants. *Planta* 225, 681–691.
- Nehdi, I.A., Mokbli, S., Sbihi, H., Tan, C.P., Al-Resayes, S.I., 2014. *Chamaerops humilis* L. var. *argentea* André date palm seed oil: a potential dietetic plant product. *J. Food Sci.* 79, C534–C539.
- Osuna-García, J.A., Wall, M.M., Wadell, C.A., 1998. Endogenous levels of tocopherols and ascorbic acid during fruit ripening of New Mexican-type Chile (*Capsicum sativum*) cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 46, 5093–5096.
- Sattler, S.E., Gilliland, L.U., Magallanes-Lundback, M., Pollard, M., DellaPenna, D., 2004. Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell* 16, 1419–1432.
- Sattler, S.E., Mène-Saffrané, L., Farmer, E.E., Krischke, M., Mueller, M.J., DellaPenna, D., 2006. Nonenzymatic lipid peroxidation reprograms gene expression and activates defense markers in *Arabidopsis* tocopherol-deficient mutants. *Plant Cell* 18, 3706–3720.
- Siles, L., Cela, J., Munné-Bosch, S., 2013. Vitamin E analyses in seeds reveal a dominant presence of tocotrienols over tocopherols in the Arecaceae family. *Phytochemistry* 95, 207–214.
- Simancas, B., Munné-Bosch, S., 2015. Interplay between vitamin E and phosphorus availability in the control of longevity in *Arabidopsis thaliana*. *Ann. Bot.* <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcv033>.
- Simontacchi, M., Caro, A., Fraga, C.G., Puntarulo, S., 1993. Oxidative stress affects α -tocopherol content in soybean embryonic axes upon imbibition and following germination. *Plant Physiol.* 103, 949–953.
- Suzuki, Y.J., Tsuchiya, M., Wassall, S.R., Choo, Y.M., Govil, G., Kagan, V.E., Packer, L., 1993. Structural and dynamic membrane properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. Implication to the molecular mechanism of the antioxidant potency. *Biochemistry* 32, 10692–10699.
- Velasco, L., Goofman, F.D., Pujadas-Salva, A.J., 2000. Fatty acids and tocochromanols in seeds of *Orobanche*. *Phytochemistry* 54, 295–300.

Suppl. Fig. 1. Climatological conditions during the experimental period at the Experimental Fields of the Faculty of Biology at the University of Barcelona, where the simulated, natural seed bank was established. A) Monthly precipitation (bars) and maximum and minimum monthly relative humidity (RH) during the experiment. B) Maximum and minimum monthly temperatures during the experiment. Sampling time points are indicated in red to show the time of seed bank establishment (September) and samplings after 3 and 6 months (December and March, respectively).



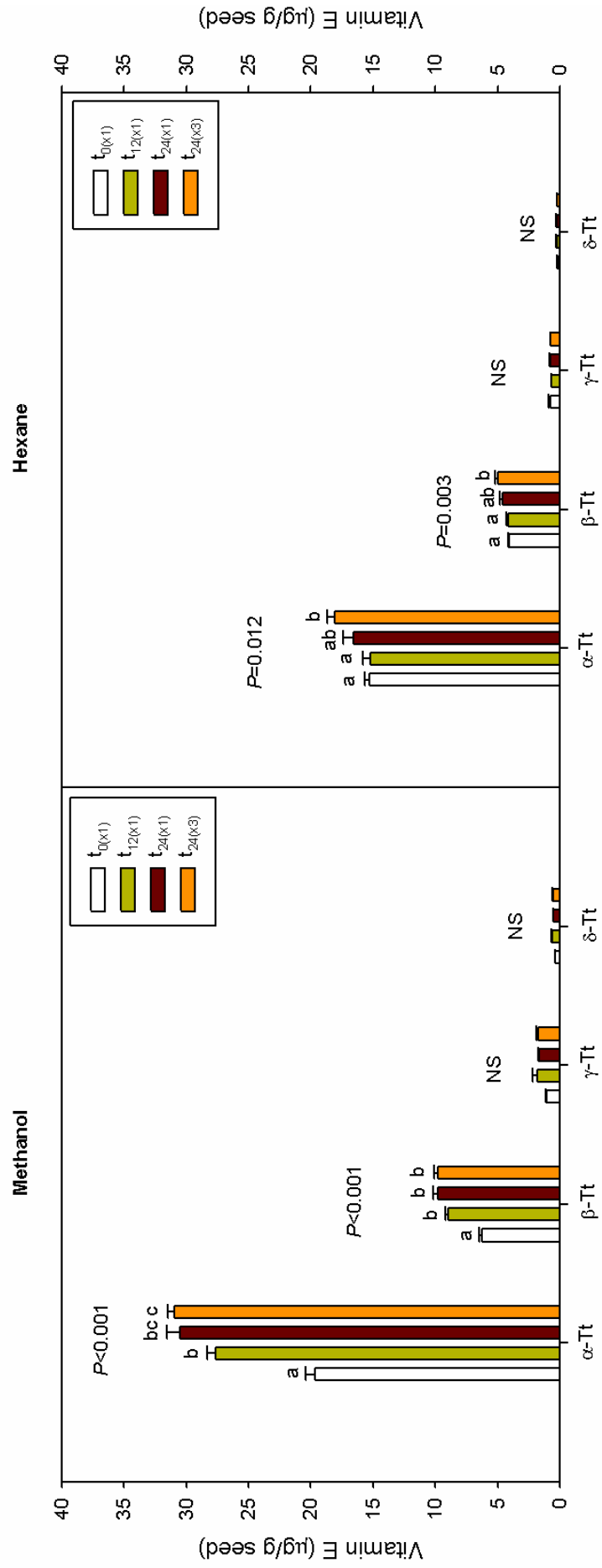
Suppl. Fig. 2. Water contents at different phases of germination at the time of seed bank establishment (September 2013) and after 3 and 6 months of seed burial (December 2013 and March 2014, respectively). Note that 3 stages could be differentiated after 3 months of burial, while 5 stages were observed during March 2014. Data are the mean \pm SE of n=5. Each replicate is the mean obtained from seeds (or seedlings) from 3 different bags at each experimental plot (see materials and methods for details). Different letters indicate significant differences between phases of germination (ANOVA, $P\leq 0.05$). Phase 0: Non-germinated seeds. Phase I: Opening of the operculum. Phase II: Emergence of cotyledonary petiole. Phase III: Swelling of the cotyledonary petiole and appearance of the radicle. Phase IV: Emergence of the plumule and development of the radicle.



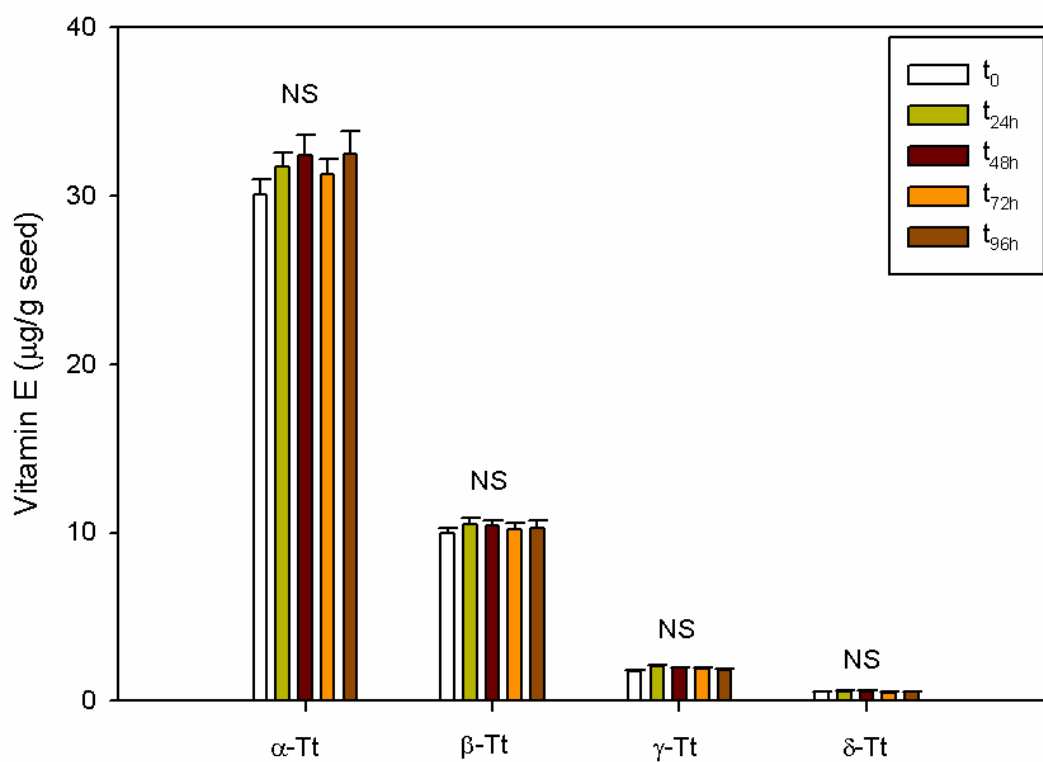
Suppl. Fig. 3. A) Nylon bags (21x14.8 cm with 300 μ m of mesh size) used for storing 50 seeds on the ground. B) Depth of burial during seed bank establishment (8 cm). C) Plot with 25 nylon bags covered with a net and marked with sticks to delimitate the zone.



Suppl. Fig. 4. Tocochromanol composition of quiescent seeds using extraction with methanol or hexane, including evaluation of various maceration times (time of incubation of the ground tissue in the solvent) and sonication cycles (number indicated in parentheses). Data are the mean±SE of n=5. Note that methanol is much more efficient than hexane for tocotrienol extraction in *C. humilis* var. *humilis* seeds. Tt, tocotrienol. Traces of α - and γ -tocopherol were found using extraction with methanol and hexane. Different letters indicate significant differences between methods of extraction (ANOVA, $P \leq 0.05$). NS, not significant.



Suppl. Fig. 5. Stability of tocochromanols in *C. humilis* var. *humilis* extracts kept in methanol at 22-23°C for up to 4 days. Tocochromanols were extracted and measured by HPLC at different time intervals following extraction (0, 24, 48, 72 and 96 hours). Data are the mean \pm SE of n=5. No significant differences were observed between time intervals (ANOVA, $P>0.05$). NS, not significant. Tt, tocotrienol.



Capítol 3

Eternament joves: la producció i qualitat de llavors en poblacions controlades i naturals de *Cistus albidus* revelen un mecanisme compensatori que prevé la senescència en termes de producció i viabilitat de llavors



Chapter 3

Perennially young: seed production and quality in controlled and natural populations of *Cistus albidus* reveal compensatory mechanisms that prevent senescence in terms of seed yield and viability

Maren Müller*, Laura Siles*, Jana Cela, Sergi Munné-Bosch

*= contributed equally

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

Publicat a **Journal of Experimental Botany** (2014) 65: 287-297

RESUM CAPÍTOL 3

La pregunta de si les plantes perennes entren o no en senescència a nivell d'organisme encara està per resoldre. L'objectiu d'aquest estudi va ser esbrinar si l'edat de la planta pot o no influenciar la producció i la composició de les llavors. Amb aquest fi, es va examinar la producció de flors i llavors a plantes de *Cistus albidus* de 3, 8 i 13 anys que creixien als camps experimentals de la Facultat de Biologia, les quals corresponen a tres generacions de la mateixa població (F_2 , F_1 i F_0). A més, es va avaluar el contingut de fitohormones, àcids grassos i vitamina E de les llavors, així com la seva viabilitat. També es va examinar si hi ha diferències en la qualitat de les llavors depenent de l'edat de la planta mare en una població natural que es trobava a la muntanya de Montserrat (NE Espanya). Els resultats van indicar que en condicions controlades (camps experimentals), les plantes de més edat no només produïen menys flors, sinó que tenien taxes més elevades d'embrions avortats en llavors madures. Tot i així, la capacitat germinativa no es trobava afectada negativament per l'edat de la planta. Les llavors de les plantes de més edat contenien nivells significativament més elevats d'àcid salicílic, àcid jasmònic i vitamina E comparats amb els de les plantes més joves. Per altra banda, tot i que el vigor (en termes de creixement de planta) es va veure reduït de manera severa degut a les dures condicions ambientals a les que es trobaven sotmeses les plantes a la població natural, els individus de més edat de la població produïen llavors igual de viables que els més joves. La biomassa de les llavors estava correlacionada positivament amb la seva viabilitat. En conclusió, l'increment de la mida de la planta pot explicar la pèrdua de viabilitat dels individus que creixien a camps experimentals, en canvi, els individus més petits que es trobaven en poblacions naturals poden escapar de la senescència en termes de pèrdua de viabilitat de les llavors.

RESEARCH PAPER

Perennially young: seed production and quality in controlled and natural populations of *Cistus albidus* reveal compensatory mechanisms that prevent senescence in terms of seed yield and viability

Maren Müller*, Laura Siles*, Jana Cela and Sergi Munné-Bosch†

Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

* These authors contributed equally to this work.

† To whom correspondence should be addressed. E-mail: smunne@ub.edu

Received 2 September 2013; Revised 2 October 2013; Accepted 11 October 2013

Abstract

The question of whether or not perennial plants senesce at the organism level remains unresolved. The aim of this study was to unravel whether or not plant age can influence the production and composition of seeds. Flower and seed production was examined in 3-, 8-, and 13-year-old *Cistus albidus* plants growing in experimental plots corresponding to the F₂, F₁, and F₀ generations of the same population. Furthermore, the phytohormone, fatty acid, and vitamin E content of the seeds was evaluated, and their viability was examined. Whether or not age-related differences in seed quality were observed in a natural population in the Montserrat Mountains (NE Spain) was also tested. The results indicate that under controlled conditions, the oldest plants not only produced fewer flowers, but also had higher rates of embryo abortion in mature seeds. However, germination capacity was not negatively affected by plant ageing. Seeds of the oldest plants contained significantly higher salicylic acid, jasmonic acid, and vitamin E levels compared with those from younger plants. Despite vigour (in terms of plant growth) being severely reduced due to harsh environmental conditions in the natural population, the oldest individuals produced seeds with no decline in viability. Seed biomass was instead positively correlated with seed viability. In conclusion, increased plant size may explain the loss of seed viability in the experimental field, but older smaller individuals in natural populations can escape senescence in terms of seed viability loss.

Key words: Ageing, *Cistus albidus* L., perennials, seed composition, seed production, senescence, vitamin E.

Introduction

It is well documented that annual plants enter a controlled senescence programme. In most cases, this is associated with flowering in monocarpic plants (annuals, biennials, and some perennials with a single reproductive episode). However, it is a matter of current debate as to whether or not iteroparous perennial plants, such as trees and shrubs, senesce (Munné-Bosch, 2008; Wingler *et al.*, 2009; Peñuelas and Munné-Bosch, 2010; de Witte and Stöcklin, 2010; Thomas, 2013). While some recent studies have shown symptoms of senescence at

the whole-plant level in iteroparous perennials (Ally *et al.*, 2010; Herrera and Jovani, 2010), other studies failed to report senescence symptoms with plant ageing (García *et al.*, 2011; Morales *et al.*, 2013). These results present new challenges for general theories of biological ageing, as they question whether or not ageing of living organisms is a universal pattern in nature. The arguments against these theories are based, at least in part, on the fact that perennials maintain the capacity to develop new leaves and grow throughout their

Abbreviations: ABA, abscisic acid; GA, gibberellin; IAA, indole-3-acetic acid; JA, jasmonic acid; SA, salicylic acid; Z, zeatin.

© The Author 2013. Published by Oxford University Press on behalf of the Society for Experimental Biology.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

life, due to the presence of meristems. Unless damaged, meristems can potentially give rise to new structures throughout the entire life of a plant. Therefore, some individuals can live for millennia, even without using clonal growth (e.g. the oldest known bristlecone pine has been dated to >4500 years). However, have these organisms suffered age-associated physiological deterioration, or are they young, potentially immortal individuals?

Plants grow vigorously in the early stages of development, until a maximum height is attained at a certain age. Growth rates then tend to decline. With increasing age and size, relative leaf growth and photosynthetic rates in woody perennials tend to slow down. Increased size, rather than meristem ageing, has been proposed as a factor that determines age-related reductions in growth and photosynthetic rates in leaves (Mencuccini *et al.*, 2005; Vanderklein *et al.*, 2007; Oñate and Munné-Bosch, 2008). Similarly, flower production increases with size and total leaf area at early stages of plant development. When advanced developmental ages are reached, flower production becomes stable. For instance, the production of flowers increases with total leaf area in the herbaceous perennial *Corydalis intermedia*. It then reaches a plateau around an age of 11 years, after which the number of flowers produced remains constant (Ehlers and Olesen, 2004). This study suggests that, given a limited amount of resources, an individual plant allocates a fraction of its resources to reproduction and the remaining resources to survival and growth. Another study found that flower production in the herbaceous perennial *Potentilla recta* correlates much better with site elevation than with ageing (Perkins *et al.*, 2006). Furthermore, it has been shown that flower production remains constant in 5- to 10-year-old *C. albidus* plants, even though flower bud vigour decreases with age. This suggests symptoms of senescence at the whole-plant level (Oñate and Munné-Bosch, 2010). Unfortunately, studies of age-related changes in flower production in woody perennials (shrubs or trees) are limited, particularly in older individuals. This is partly because of the intrinsic limitation of such studies: as time elapses and plants age, so the mortality risk increases. To the authors' knowledge, the effects of plant ageing on seed production in woody perennials has not yet been investigated.

The aim of the present study was to determine whether or not *C. albidus* plants show symptoms of senescence at the whole-plant level when individuals of sufficiently old ages are sampled. The focus was on senescence symptoms in seed production. Two populations were studied: the first under controlled conditions in experimental plots in which F₂, F₁, and F₀ plants from the same population were assessed, while the second one was studied under natural conditions in the Montserrat Mountains (NE Spain).

Materials and methods

Plant material and sampling

Cistus albidus was selected as the experimental model. This is a common Mediterranean shrub that is widely distributed in the western Mediterranean from sea level to 1400 m (Blasco and Mateu, 1995). This shrub is resistant to drought stress and has a high capacity

to grow in degraded environments. The life span of this species is thought to be ~15 years (Roy and Sonié, 1992), so it was possible to evaluate the effects of plant ageing by using plants at advanced developmental stages.

Two independent studies were performed. The first study was conducted using three groups of *C. albidus* plants of different ages (3-, 8-, and 13-year-old plants) in the Experimental Fields of the Faculty of Biology at the University of Barcelona (Barcelona, Catalonia, NE Spain) in 2011. All specimens were considered mature, since this plant becomes reproductive for the first time in the second year of life. The three plant groups corresponded to three consecutive generations of plants obtained under controlled conditions. The F₀ generation (13-year-old plants) corresponded to individuals obtained from seeds that germinated during 1998 and were grown in 0.5 litre pots containing a mixture of soil:peat:perlite (1:1:1, v/v/v), maintained in a greenhouse with controlled temperature and watering for 1 year and then transferred to plots in the Experimental Fields, in which the plants grew for 12 years before the study began. The F₁ and F₂ generations (8- and 3-year-old plants) corresponded to individuals also sampled during 2011 but obtained from seeds of the preceding generation that germinated during 2008 and 2003, and were grown in 0.5 litre pots containing a mixture of soil:peat:perlite (1:1:1, v/v/v), maintained in a greenhouse with controlled temperature and watering for 1 year and then transferred to plots in the Experimental Fields, in which the plants grew for 7 years and 2 years, respectively, before the study began. Although not identical, due to annual variation, all three plant groups were exposed to Mediterranean climatic conditions during their life histories and were grown in three plots of calcic Luvisol (FAO) of exactly the same characteristics. Plants were separated by 2 m. They were not watered manually other than when first transferred to the soil, at which point all plant groups were watered equally and treated with N:P:K (1:1:1) fertilizer at a rate of 100 kg ha⁻¹. Fertilizer was applied again only when mineral deficiencies were detected (maximum application: once a year), but always equally to the three plant groups. All groups were therefore exposed to identical climatic and soil conditions, with the exception of the time spent in these conditions before sampling. Therefore, the effects of ageing were evaluated using three generations grown under the same climatic and soil conditions.

In a second experiment, a natural population of *C. albidus* was studied. Ninety-one individuals growing naturally in the Natural Park of the Montserrat Mountains (50 km northwest of Barcelona, Catalonia, NE Spain) were sampled. More specifically, the plants were found between 1000 m and 1149 m above sea level (UTM: 401.2012,4.606.724) on a north-facing site. The trunk perimeter of the sampled individuals ranged from 2 cm to 22 cm. The Montserrat Mountains are exposed to Mediterranean climatic conditions, but summers are drier and winters colder than at the Experimental Fields in Barcelona. The individuals sampled were on the sunny side of the mountain and the soil was a mixture of conglomerate, sandstone, and red shale. Mature seeds from both populations were obtained from plants during September 2011 in the Experimental Fields and in 2012 in the Montserrat Mountains, when fruits were fully mature.

Age estimation

The trunk perimeter of all individuals growing in the Experimental Fields (for several years) and in the Natural Park (during 2012) was measured ~4 cm from the trunk base with a measuring tape. Since the age of individuals growing in the Experimental Fields was already known (based on sowing time; see previous section) and the age of 15 individuals growing naturally in the Natural Park was estimated by counting the trunk rings, a regression of the trunk perimeter with the age of individuals was calculated.

Flower and fruit production

The number of flowers produced per individual was counted every day during the flowering period (February–June) in plants growing

in the Experimental Fields. Fruit biomass and number of seeds per fruit were estimated from 50 fruits per individual. The percentage of aborted fruits was also estimated by marking 50 flowers (at anthesis) per individual and evaluating the number of mature fruits formed. Fruit and seed biomass were also estimated by weighing the samples both in the Experimental Fields and under natural field conditions. The number of seeds per fruit was also counted.

Seed germination and viability tests

Seed germination and viability tests were performed using seeds collected from both the Experimental Fields and natural field conditions. For the study conducted at the Experimental Fields, 250 seeds per age group were used (five subsamples of 50 seeds). Under natural field conditions, 50 seeds per individual were used.

Germination tests were carried out by sterilizing the seeds in an aqueous solution of bleach and Tween-20 (50:0.15, v/v) for 10 min. The seeds were then imbibed for 24 h in Milli Q water before being subjected to a heat shock (100 °C, 5 min). The seeds were germinated at 17 °C. All steps of the germination test were performed in the dark.

Viability tests were performed as follows. Seeds were imbibed for 24 h in the dark and a heat shock was applied as described above. The seeds were then soaked in a tetrazolium solution at 1% and incubated at 37 °C in darkness for 2 d. Subsequently, seeds were bleached for 10 min at 80% and the viable and non-viable seeds were counted. Seeds were considered to be alive when the embryo was intact and fully stained with rich formazan red. Seeds were considered to be non-viable when staining of the embryo was patchy, weak (pink), or absent. A fraction of these seeds were empty (aborted seeds).

Vitamin E and hormonal profiling

The extraction and analyses of tocopherols and tocotrienols were performed as described by [Cela et al. \(2011\)](#). The extraction and analyses of endogenous concentrations of phytohormones, including gibberellins (GAs), abscisic acid (ABA), auxin [indole-3-acetic acid (IAA)], jasmonic acid (JA), salicylic acid (SA), and cytokinins, were performed as described by [Müller and Munné-Bosch \(2011\)](#).

Elemental and fatty acid analyses

Total C and N concentrations as well as the fatty acid profile were measured in seeds of plants growing in the Experimental Fields. Elemental analyses were measured using the Dumas method and an NA2100 protein nitrogen analyser (Thermo, Milan, Italy). The extraction and analyses of fatty acids were performed as described by [Vrinten et al. \(2005\)](#).

Statistical analyses

Differences between age groups were evaluated using analysis of variance (ANOVA), with DMS's post-hoc test for plants grown in the Experimental Fields. Results were considered significant at a probability level of $P \leq 0.05$. The significance of correlations between parameters measured in seeds obtained from plants growing in the Natural Park was tested using Spearman's rank correlation analyses, and correlations were considered significant when P was ≤ 0.05 .

Results

Flower, fruit, and seed production in the Experimental Fields

Flower production was affected by plant age in the Experimental Fields. The highest rate of flower production was observed in 8-year-old plants, with an average of ~6000

flowers, followed by the oldest plant group with 4000 flowers, and the youngest plant group with 500 flowers per plant. The first flower was observed in the 8-year-old plants. The 13-year-old plants began to flower 6 d later and the smaller 3-year-old plants 16 d later ([Fig. 1a](#)). This timing was consistent with plant size, with the 13- and 8-year-old plants being of similar size, but much bigger than the 3-year-old plants ([Fig. 1b](#)). Therefore, reproduction was reduced and delayed in the youngest plant group. However, the high flower production in the two oldest plant groups seemed to affect the biomass and the number of seeds per fruit negatively ([Table 1](#)). Thirteen- and 8-year-old plants produced 16% and 40% lower fruit biomass and 31% and 53% fewer seeds per fruit, respectively, than the youngest plant group. Seed biomass decreased significantly with increasing plant age ([Table 1](#)). There were no differences between the 3- and 8-year-old plants in the number of alive, dying, and aborted seeds. However, 13-year-old plants produced 20% fewer viable seeds and 3-fold more aborted seeds than the younger plants ([Fig. 1c](#)). Nevertheless, comparison of the seed germination capacity revealed no significant variation between the three plant groups ([Supplementary Fig. S1](#) available at [JXB](#) online).

Biochemical seed composition in the Experimental Fields

A screen of the fatty acid composition showed that the seeds of the oldest plant group had significantly higher total polyunsaturated fatty acid (PUFA) levels than the seeds from 3- and 8-year-old plants. This was mainly due to their higher levels of linoleic acid (C18:2) ([Supplementary Table S1](#) at [JXB](#) online). The seeds of the oldest plant group also showed a tendency to synthesize higher concentrations of very long chain saturated fatty acids. However, only the concentrations of tetracosanoic acid (C24:0) were significantly higher (~17%) than in the seeds of the younger plant groups. Interestingly, the seeds of the oldest plant group had significantly higher total vitamin E levels at $17.6 \mu\text{g (g DW)}^{-1}$ than the seeds from 3- and 8-year-old plants, at 8.3 and $11.6 \mu\text{g (g DW)}^{-1}$, respectively ([Fig. 2](#)). The main vitamin E compound in *C. albidus* seeds was α -tocopherol. δ -Tocopherol, δ -tocotrienol, and γ -tocotrienol were not detected.

No significant variation in GA_4 or the precursor GA_{24} was found between seeds from any of the plant groups. However, the concentration of the precursor GA_9 was significantly lower in the seeds of 3-year-old plants ([Supplementary Fig. S2](#) at [JXB](#) online). Endogenous concentrations of ABA were significantly higher in seeds from 8- and 13-year-old plants [$154.6 \text{ ng (g DW)}^{-1}$ and $133.28 \text{ ng (g DW)}^{-1}$, respectively] than in seeds from 3-year-old plants [$96.92 \text{ ng (g DW)}^{-1}$] ([Fig. 3](#)). However, JA levels also increased significantly with increasing plant age: seeds from 8- and 13-year-old plants contained 42% and 60% higher levels, respectively, than seeds from 3-year-old plants. In contrast, the IAA and SA content was only significantly higher in the seeds of the oldest plants (for IAA, 2- and 4-fold; and for SA, 1.58- and 2.15-fold higher than in seeds from 3- and 8-year-old plants, respectively).

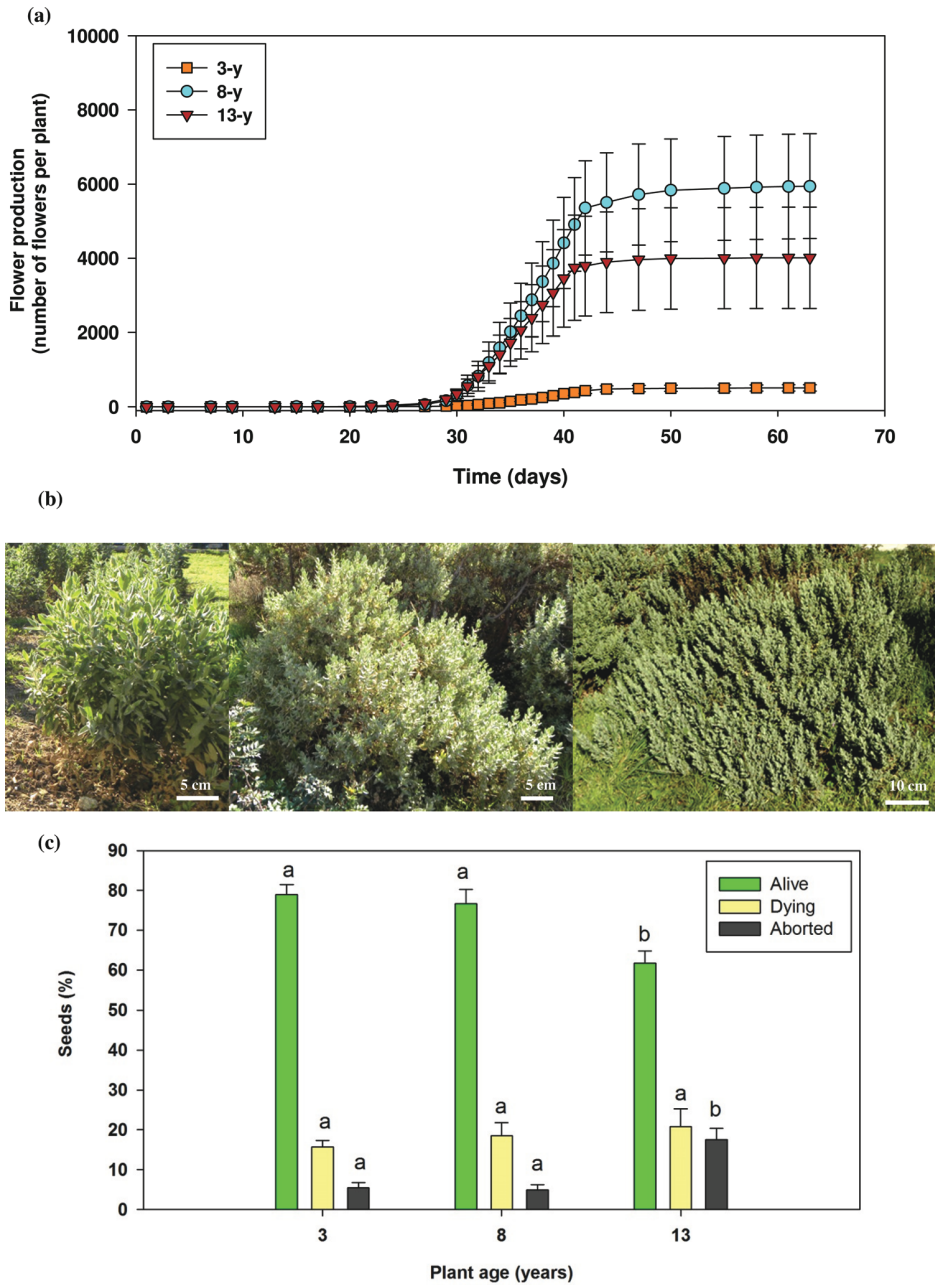


Fig. 1. (a) Flower production (number of flowers) per individual in 3-, 8-, and 13-year-old *C. albidus* plants growing in the Experimental Fields. Time corresponds to days elapsed since the first flower was observed. Arrows indicate the average date of start of flowering in the three plant groups (24.3 ± 1.5 , 7.6 ± 3.5 , and 13.0 ± 4.2 d for 3-, 8-, and 13-year-old plants, respectively). Data are the mean \pm SE of $n=16$ individuals for 3-year-old plants and $n=4$ individuals for 8- and 13-year-old plants. Statistical analyses indicated significant differences between 3- and 8- or 13-year-old plants, but not between 8- and 13-year-old plants in either flower production or time of flowering ($P \leq 0.05$). (b) Photographs of plants growing in the experimental fields. Left to right: 3-, 8-, and 13-year-old plants. (c) Percentage of live, dying, and aborted seeds during fruit production in 3-, 8-, and 13-year-old *C. albidus* plants. Data are the mean \pm SE of $n=4$ individuals with an analysis of 50 seeds per individual. Different letters indicate significant differences between age groups (ANOVA, $P \leq 0.05$). (This figure is available in colour at JXB online.)

Within the cytokinins, no differences were found between the three plant age groups, with the exception of levels of zeatin (Z) (Supplementary Fig. S3). Z is the major cytokinin form found in *C. albidus* seeds, and was ~5-fold higher in seeds from 8-year-old plants than in seeds from 3-year-old plants.

The Z levels found in seeds from 13-year-old plants did not differ significantly from those in the other two plant groups.

No significant variation in C and N concentrations or the C/N ratio was found in seeds of any plant group (Supplementary Fig. S4 at JXB online).

Table 1. Fruit biomass, percentage of aborted fruits (from anthesis), number of seeds per fruit, and seed biomass in 3-, 8-, and 13-year-old *C. albidus* plants growing in the Experimental Fields

Plant age (years)	Fruit biomass (mg FW fruit ⁻¹)	Fruit abortion (%)	No. of seeds per fruit	Seed biomass (mg FW)
3	94.3±2.7 a	1.1±0.6 a	66.6±2.4 a	50.8±0.9 a
8	56.1±3.3 b	None	31.3±3.5 b	43.3±0.6 b
13	79.0±3.0 c	1.1±0.7 a	45.7±2.3 c	39.3±0.7 c

Data are the mean ±SE of *n*=4 with an analysis of 50 fruits per individual. Different letters indicate significant differences between age groups (*P* ≤ 0.05).

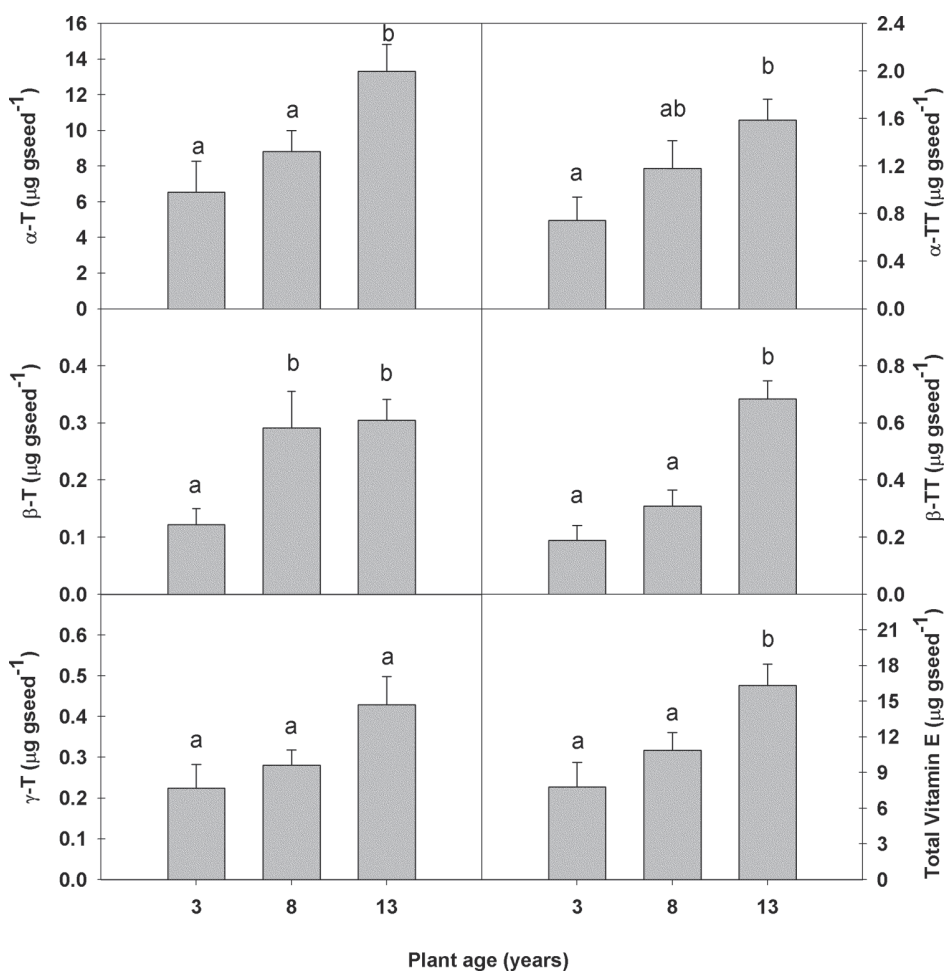


Fig. 2. Tocopherol, tocotrienol, and total vitamin E content in seeds of 3-, 8-, and 13-year-old *C. albidus* plants growing in the Experimental Fields. Data are the mean ±SE of *n*=4 individuals with an analysis of 50 mg of seeds per individual. Different letters indicate significant differences between age groups (ANOVA, *P* ≤ 0.05).

Fruit and seed production in a natural population

Fruit biomass and seed biomass per fruit were not correlated with the trunk perimeter of the individuals sampled in the Natural Park. In contrast, individuals with larger perimeters produced fewer seeds per fruit (from 79 down to 60 seeds) but larger seeds (from 0.9 mg to 1 mg fresh matter per seed; Fig. 4). All individuals (except one with a perimeter of 2.5 cm) had viable seeds, most of them (75 from 85 individuals) with a seed viability ranging from 60% to 100% (Fig. 5). The percentage of dying seeds ranged between 0% and 60%, but in general the number of dying seeds was low. There were very few

aborted seeds except for two individuals. Most importantly, seed viability was not correlated with trunk perimeter. In other words, since trunk perimeter positively correlated with plant ageing (Supplementary Fig. S5 at *JXB* online), seed viability was not negatively affected by plant age. Instead, seed viability was correlated with fruit biomass, seed biomass, and seed biomass per fruit (Fig. 6). The larger the fruits and seeds, the more viable the seeds produced by individuals in the natural population. Seed germination capacity, which was in general lower than in individuals grown under controlled conditions, was also not affected by plant age (Fig. 4).

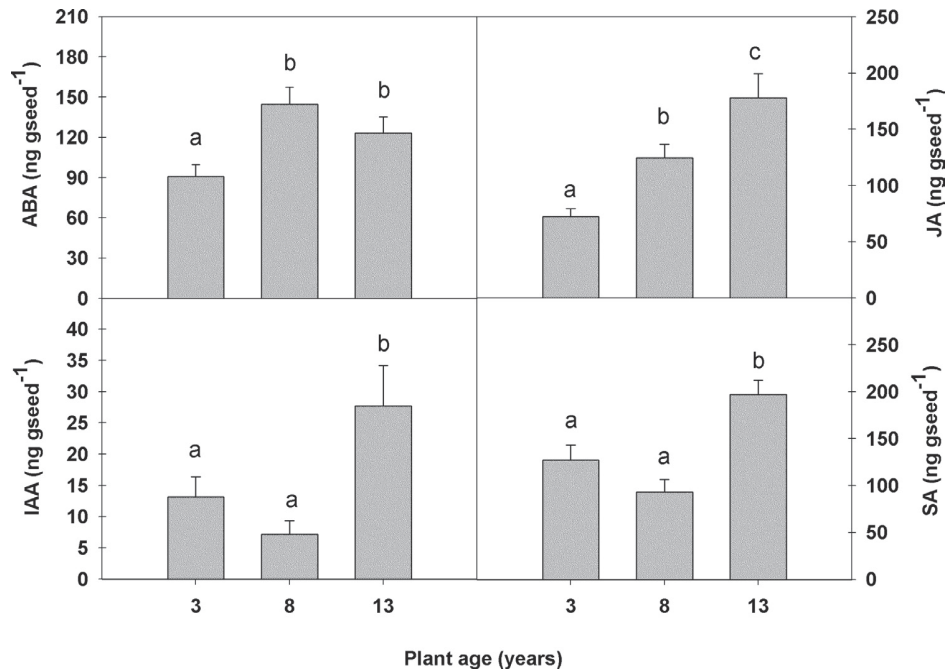


Fig. 3. Abscisic acid (ABA), indole-3-acetic acid (IAA), jasmonic acid (JA), and salicylic acid (SA) content in seeds of 3-, 8-, and 13-year-old *C. albidus* plants growing in the Experimental Fields. Data are the mean \pm SE of $n=4$ individuals with an analysis of 50 mg of seeds per individual. Different letters indicate significant differences between age groups (ANOVA, $P \leq 0.05$).

Biochemical seed composition in a natural population

The vitamin E profiling of seeds of *C. albidus* growing in the Montserrat Mountains confirmed that α -tocopherol is the major vitamin E compound in seeds. The amounts of tocopherols and tocotrienols were not correlated with the perimeter (Supplementary Table S2 at *JXB* online). δ -Tocopherol, γ -tocotrienol, and δ -tocotrienol were not detected. Likewise there was much variability in plant hormones between individuals with different perimeters and even between individuals with the same perimeter, and thus there was no correlation with perimeter or therefore with age. Levels of GA_4 , GA_9 , and GA_{24} , ABA, auxin, SA, JA, and cytokinins were not correlated with the perimeter (Supplementary Table S2).

Discussion

The life span of plants ranges from a few weeks for annuals to thousands of years for some trees (Bliss, 1971; Brundu *et al.*, 2008). Understanding the mechanisms underlying the wide range of longevity in plants or any other organism is fundamental to our understanding of life history, population dynamics, and evolutionary fitness (Vaupel *et al.*, 2004). For most annuals and biennials, reproduction is one of the key factors leading to whole-plant senescence. However, little is known about whole-plant senescence in perennials. To the authors' knowledge, this is the first study to analyse the effect of mother plant age on seed production and quality in woody perennials.

The study performed in the Experimental Fields showed clear signs of senescence in the 13-year-old plants, in which flower production was 40% lower than in the 8-year-old plant

group. The oldest plant group produced more seeds per fruit, but seed production per individual was 13% lower overall. This latter result is based on the assumption that flower vigour was similar in both plant groups, but this is not the case. In a previous study, it was shown that flower bud vigour declines with ageing (Oñate and Munné-Bosch, 2008); therefore, seed production per individual may be even more than 13% lower in 13-year-old compared with 8-year-old plants. Furthermore, seed abortion was higher in the oldest plant group in the Experimental Fields, therefore indicating senescence at the whole-plant level under controlled conditions. This is not surprising, since it has been well documented that when perennials reach an optimal plant size, plant ageing leads to a reduction in growth and photosynthetic rates in leaves (Bond, 2000; Koch *et al.*, 2004; Mencuccini *et al.*, 2005; Oñate and Munné-Bosch, 2008); however, evidence of reproductive senescence (i.e. reproductive decline with ageing) in non-clonal woody perennials is limited. In the perennial *Corydalis intermedia*, an increase in flower production and total leaf area was observed at early stages of plant development. Around the age of 11 years, flowering reached a plateau and the plants then produced a constant number of flowers (Ehlers and Olesen, 2004). Similar results were found for *C. albidus* plants, in which flower production was almost identical in 5- and 10-year-old plants of similar sizes (Oñate and Munné-Bosch, 2010). It has been suggested that maternal regulation of offspring quality (Stephenson, 1981) or genetic load (Stanton, 1984; Wiens *et al.*, 1987) are possible mechanisms for determining seed abortion when resources are limited. Intrafruit resource competition could also lead to seed reduction and arise from the fact that the maternal plant predominantly invests resources in zygotes that have

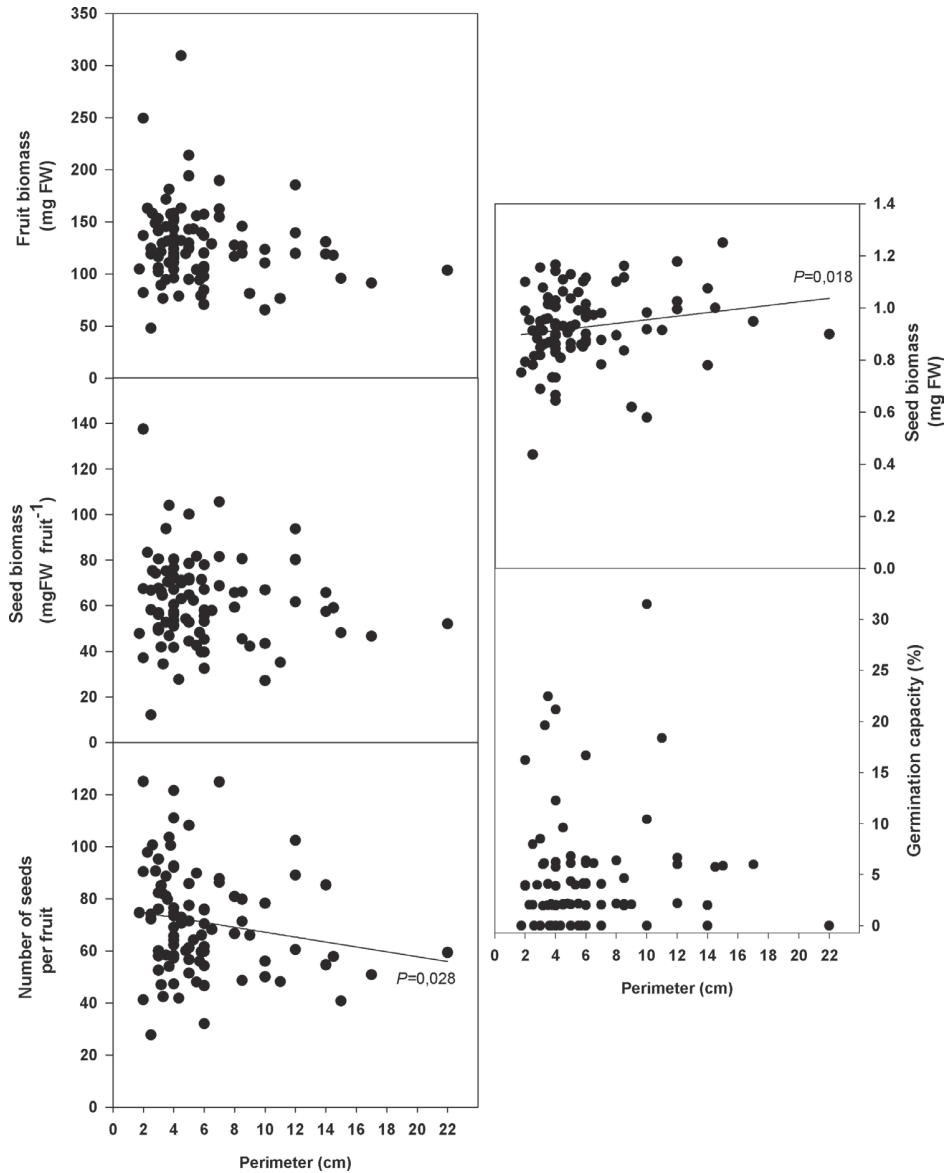


Fig. 4. Fruit biomass, number of seeds per fruit, seed biomass per fruit, biomass of seeds, and seed germination capacity of *C. albidus* plants with different perimeters growing in a natural population in the Montserrat Mountains (NE Spain). *P*-values were calculated by Spearman’s rank correlation, and significant values ($P \leq 0.05$) are shown.

higher probabilities of maturing (Shaanker *et al.*, 1988; De Jong and Klinkhamer, 2005). Therefore, it is not surprising that physiological deterioration occurs in seeds with ageing of the mother plant. However, seeds from 13-year-old plants showed similar germination capacity to seeds from the younger individuals. This suggests that a compensatory mechanism may enable similar reproductive fitness in plants growing in the Experimental Fields, such that the offspring are not affected. The higher levels of vitamin E in seeds from 13-year-old plants could explain the similar germination capacity of this group, as α -tocopherol is an important compound for germination (Sattler *et al.*, 2004). Seed viability and vigour are important aspects determining the success of seed germination, which is a key trait for the survival of a species (Nonogaki *et al.*, 2010), but, at the same time, seed

germination is a very sophisticated process that requires the concerted action and interaction of diverse plant hormones (Kucera *et al.*, 2005). Although there were no differences in either GA or cytokinin content, the higher levels of ABA, JA, IAA, and SA indicate that an altered hormonal balance might be behind the improved germination capacity, despite the increased proportion of aborted seeds. JA and SA are associated with increased resistance to insects and fungi (Davies, 2010), respectively; therefore, increases in the levels of these phytohormones in seeds of the oldest plants could serve a compensatory mechanism and increase the survival of the seeds. Although a complete understanding of the complex hormonal cross-talk and signalling events leading to this phenotype remains elusive, the present results suggest that vitamin E and hormones may underlie the similar

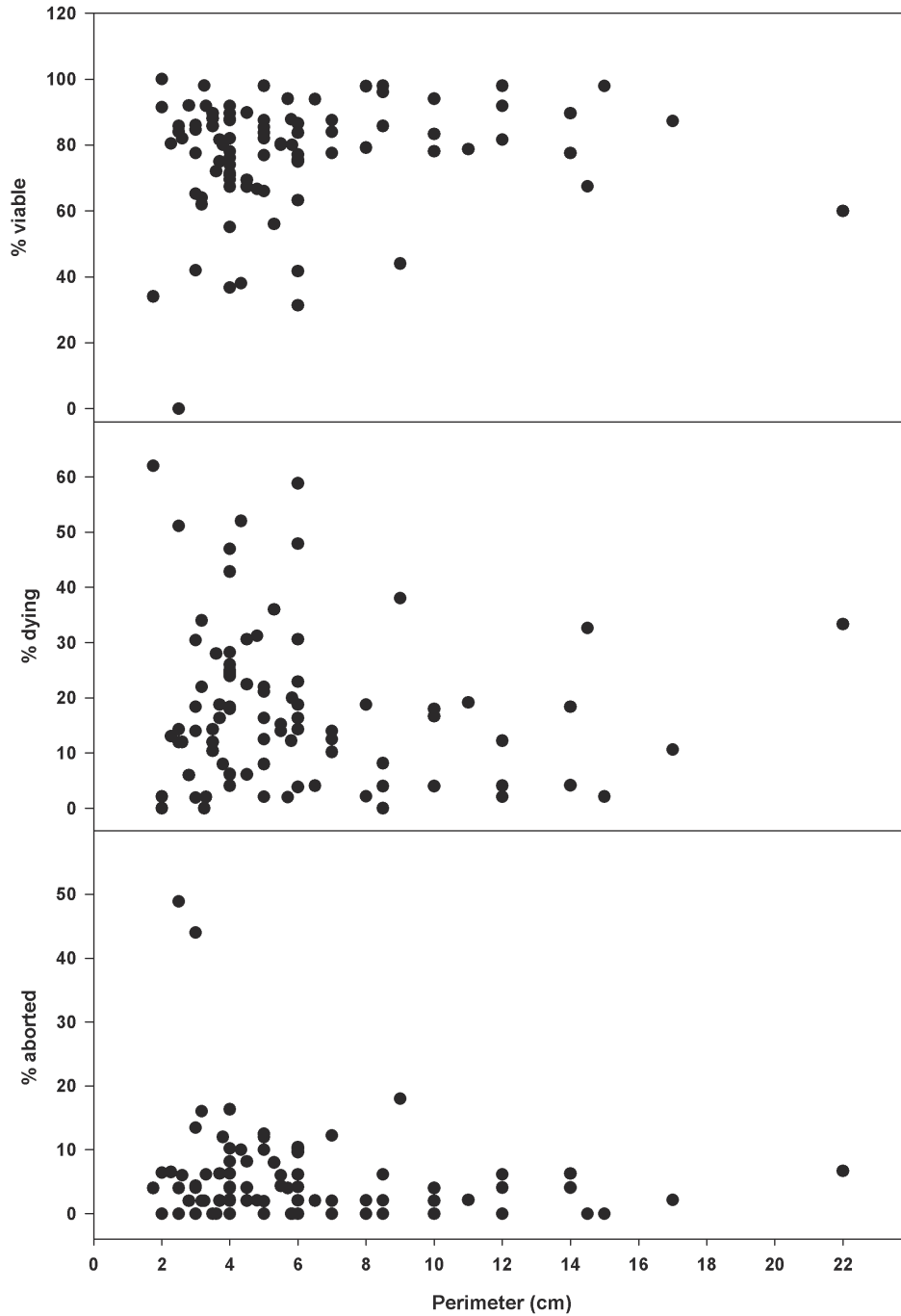


Fig. 5. Percentage of live, dying, and aborted seeds of *C. albidus* plants with different perimeters growing in a natural population in the Montserrat Mountains (NE Spain). Spearman’s rank correlations were not significant for any studied parameter ($P > 0.05$).

germination capacity despite greater embryo abortion in the oldest plant group.

In the second part of this study, the focus was on confirming these results under natural field conditions. However, plants from a natural population sampled in the Montserrat Mountains (NE Spain) did not show the same symptoms of senescence at the organism level. Seed vigour was not reduced with ageing and, although the number of seeds per fruit decreased with larger perimeters, the seed biomass increased, providing a compensatory mechanism to achieve

similar reproductive fitness. Roy and Sonié (1992) found that the annual seed production of 5-year-old *Cistus albidus* and *Cistus monspeliensis* plants was comparable with that of older plants. In addition, the viability and germination capacity were similar in plants of all sizes and the number of aborted seeds was always low and not age dependent. So, what was the difference between the population grown in controlled conditions and one growing naturally? The most likely explanation is the size effect, as can be illustrated using the oldest living individual found in the Montserrat Mountains (Fig. 7), which

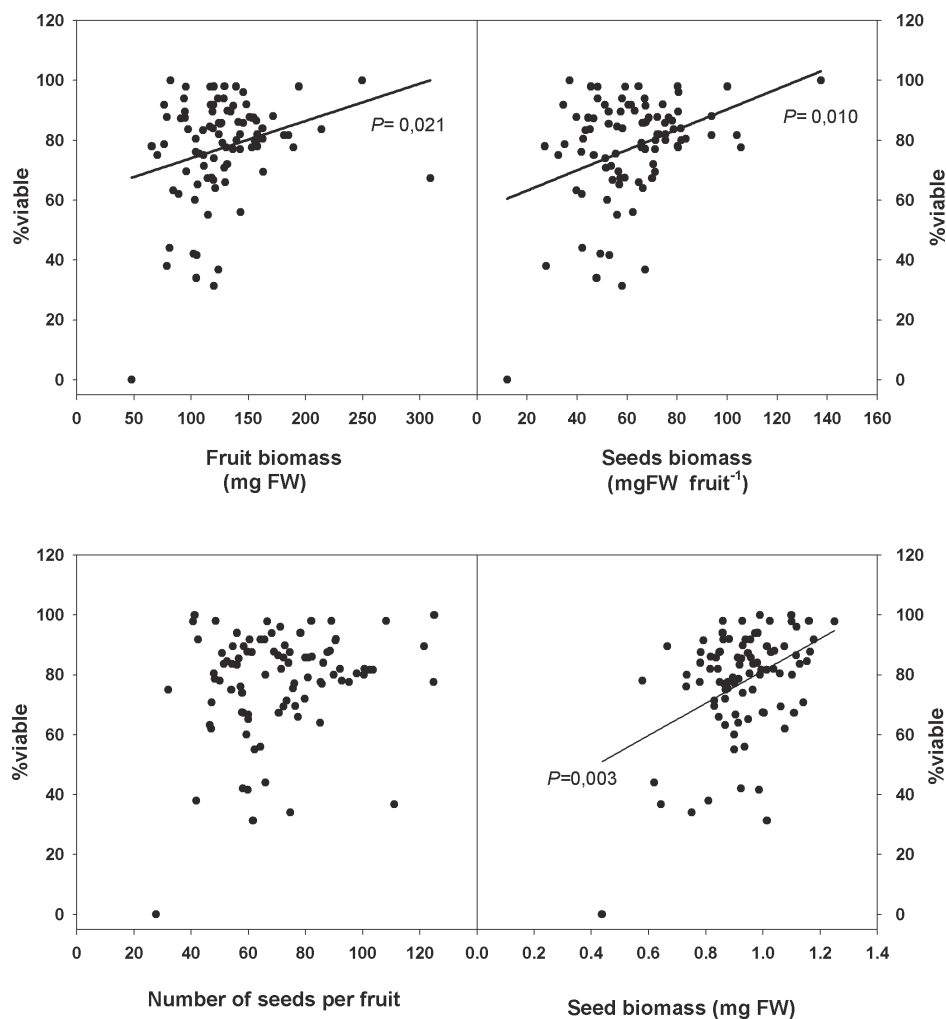


Fig. 6. Correlation between seed viability and fruit biomass, seed biomass per fruit, number of seeds per fruit, and seed biomass in a natural population in the Montserrat Mountains (NE Spain). P -values were calculated by Spearman's rank correlation, and significant values ($P \leq 0.05$) are shown.

was 19 years old. This individual comprised a large amount of necromass and a small amount of biomass. Compared with the individuals in the Experimental Fields, which had a large biomass (Fig. 1b), even in the youngest group, the biomass of *C. albidus* growing in the Montserrat Mountains was very low. Note that this pattern was not only found in the oldest individual, but also in other individuals with different ages and trunk perimeters (Supplementary Fig. S6 at JXB online). All individuals, including the oldest living *C. albidus* from the Montserrat Mountains, had less biomass than the 3-year-old plants growing in the Experimental Fields. This is probably because plants growing in natural conditions are exposed to more severe environmental conditions, such as extreme droughts and contrasting temperatures (winter/summer). Due to the potential for frost damage, *C. albidus* plants usually have a short stem with three or five branches inserted (Barry, 1960). This pattern was found in some of the sampled plants, especially in older individuals. In natural populations, mortality is greatly influenced by the environment (Picó and Retana, 2008), and *C. albidus* plants usually die due to natural causes (Roy and Sonié, 1992), for example

due to competition for water during drought years or biotic causes. Age, size, and growth can also interact with the environment to influence mortality and life span when the environment is stressful (Roach, 2012). Stress also had an effect on the plants in this study as observed with the correlation of the perimeter of the trunk and the age of the plant: individuals growing in natural conditions with similar ages to those in the Experimental Fields had smaller trunks (Supplementary Fig. S5). Furthermore, the oldest living individual found in the Natural Park was 19 years old, while the oldest one found dead was 25 years old. This was the first time that a *C. albidus* older than 15 years old (Roy and Sonié, 1992) has been found. It should be noted that the Montserrat Mountains suffered two important fires, one in 1986 and the other in 1994. The fire of 1986, which occurred 27 years ago, razed much of the forest to the ground. This explains why the oldest individuals are no more than 25 years old.

The *C. albidus* plants growing in the Montserrat Mountains, which are exposed to hard environmental conditions, showed severe biomass loss (including entire branches) and appeared to use their resources to make fewer fruits and

(a)



(b)



Fig. 7 (a) Phenotype of the oldest living individual found in a natural population in the Montserrat Mountains (NE Spain) (perimeter of 22 cm). Approximately half of the photosynthetic biomass was lost. (b) Estimation of the perimeter at the base of the trunk. (This figure is available in colour at *JXB* online.)

seeds but of higher quality. In contrast, in the Experimental Fields, plants produced more fruits and seeds but of lower quality. Although the oldest individuals in the Experimental Fields were 13 years old and were not as old as they could be, the effect of size was apparent. The viability of the seeds was not affected by the perimeter of the trunk in the natural population (Supplementary Table S2 at *JXB* online), but instead was correlated with fruit biomass, seed biomass, and seed biomass per fruit (Fig. 6). Thus the higher the fruit and the seed biomass, the more viable the seed. Furthermore, seed germination capacity was lower than under controlled conditions, suggesting a higher degree of dormancy.

In conclusion, the oldest individuals with a large amount of biomass presented symptoms of senescence at the organism level, as indicated by lower seed production and loss of seed viability, but old individuals that have reduced their size, due to reduced growth and photosynthetic biomass loss, produce seeds of higher quality in natural populations. Such plants are less productive in terms of photosynthetic and seed biomass, but the seeds that they produce are of better quality.

Supplementary data

Supplementary data are available at *JXB* online.

Figure S1. Germination capacity of seeds of 3-, 8-, and 13-year-old *C. albidus* plants growing in the Experimental Fields.

Figure S2. Gibberellin (GA) content, including that of GA₄, GA₉, and GA₂₄, in seeds of 3-, 8-, and 13-year-old *C. albidus* plants growing in the Experimental Fields.

Figure S3. Cytokinin content, including that of zeatin (Z), zeatin riboside (ZR), isopentenyladenosine (IPA), dihydrozeatin (DHZ), dihydrozeatin riboside (DHZR), and 2-isopentenyladenine (2-IP), in seeds of 3-, 8-, and 13-year-old *C. albidus* plants growing in the Experimental Fields.

Figure S5. Correlation between plant age and trunk perimeter in *C. albidus* plants growing in the Experimental Fields and Montserrat Mountains.

Figure S6. Comparison of the plant biomass between *C. albidus* from the Experimental Fields and Montserrat Mountains.

Table S1. Fatty acid composition of seeds of 3-, 8-, and 13-year-old *C. albidus* plants growing in the Experimental Fields.

Table S2. Correlation coefficient (r^2) and *P*-values of Spearman rank correlation analysis between the trunk perimeter and all measured parameters in seeds of *C. albidus* plants growing in a natural population in the Montserrat Mountains (NE Spain).

Acknowledgements

Support for this research was received through grants BFU2012-32057, BFU2009-07294, BFU2009-06045, and CSD2008-00040 from the Spanish Government, and the ICREA Academia prize to SM-B, which is funded by the Catalan Government. We thank Jordi Calaf (Natural Park of the Montserrat Mountains) for help provided in the sampling of individuals for counting the trunk rings. We also thank Iker Hernández (University of Barcelona) for his help in

sampling and counting the trunk rings; and Emília Gutiérrez (University of Barcelona) for her advice on cutting the trunks and sample treatment. We are indebted to Toffa Evans for English correction of the manuscript.

References

- Ally D, Ritland K, Otto SP.** 2010. Aging in a long-lived clonal tree. *PLoS Biology* **8**, e1000454.
- Cela J, Chang C, Munné-Bosch S.** 2011. Accumulation of γ - rather than α -tocopherol alters ethylene signaling gene expression in the *vte4* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **52**, 1389–1400.
- Barry, JP.** 1960. Contribution à l'étude de la végétation de la région de Nîmes. III. Les stades préforestiers. *Année Biologique* **36**, 311–540.
- Blasco S, Mateu I.** 1995. Flowering and fruiting phenology and breeding system of *Cistus albidus* L. *Acta Botanica Gallica* **142**, 245–251.
- Bliss LC.** 1971. Arctic and alpine plant life cycles. *Annual Review of Ecology and Systematics* **2**, 405–438.
- Bond BJ.** 2000. Age-related changes in photosynthesis of woody plants. *Trends in Plant Science* **5**, 349–353.
- Brundu G, Lupi R, Zapelli I, Fossati T, Patrignani G, Camarda I, Sala F, Castiglione S.** 2008. The origin of clonal diversity and structure of *Populus alba* in Sardinia: evidence from nuclear and plastid microsatellite markers. *Annals of Botany* **102**, 997–1006.
- Davies PJ.** 2010. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: Davies PJ, ed. *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!* Dordrecht: Springer, 1–15.
- De Jong TJ, Klinkhamer PGL.** 2005. *Evolutionary ecology of plant reproductive strategies*. New York: Cambridge University Press.
- de Witte LC, Stöcklin J.** 2010. Longevity of clonal plants: why it matters and how to measure it. *Annals of Botany* **106**, 859–870.
- Ehlers BK, Olesen JM.** 2004. Flower production in relation to individual plant age and leaf production among different patches of *Corydalis intermedia*. *Plant Ecology* **174**, 71–78.
- García MB, Dahlgren JP, Ehrlén J.** 2011. No evidence of senescence in a 300-year-old mountain herb. *Journal of Ecology* **99**, 1424–1430.
- Herrera CM, Jovani R.** 2010. Lognormal distribution of individual lifetime fecundity: insights from a 23-year study. *Ecology* **91**, 422–430.
- Koch GW, Sillet SC, Jennings GM, Davis SD.** 2004. The limits to tree height. *Nature* **428**, 851–854.
- Kucera B, Cohn MA, Leubner-Metzger G.** 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research* **15**, 281–307.
- Mencuccini M, Martínez-Vilalta J, Vanderklein D, Hamid HA, Korakaki E, Lee S, Michiels B.** 2005. Size-mediated ageing reduces vigor in trees. *Ecology Letters* **8**, 1183–1190.
- Morales M, Oñate M, García MB, Munné-Bosch S.** 2013. Photo-oxidative stress markers reveal absence of physiological deterioration with ageing in *Borderea pyrenaica*, an extraordinarily long-lived herb. *Journal of Ecology* **101**, 555–565.
- Müller M, Munné-Bosch S.** 2011. Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Plant Methods* **7**, 37.
- Munné-Bosch S.** 2008. Do perennials really senesce? *Trends in Plant Science* **13**, 216–220.
- Nonogaki H, Bassel GW, Bewley JD.** 2010. Germination—still a mystery. *Plant Science* **179**, 574–581.
- Oñate M, Munné-Bosch S.** 2008. Meristem aging is not responsible for age-related changes in growth and abscisic acid levels in the Mediterranean shrub, *Cistus clusii*. *Plant Biology* **10** (Suppl. 1), 148–155.
- Oñate M, Munné-Bosch S.** 2010. Loss of flower bud vigor in the Mediterranean shrub, *Cistus albidus* L. at advanced developmental stages. *Plant Biology* **12**, 475–483.
- Peñuelas J, Munné-Bosch S.** 2010. Potentially immortal? *New Phytologist* **187**, 564–567.
- Perkins DL, Parks CG, Dwire KA, Endress BA, Johnson KL.** 2006. Age structure and age-related performance of sulfur cinquefoil (*Potentilla recta*). *Weed Science* **54**, 87–93.
- Picó FX, Retana J.** 2008. Age-specific, density-dependent and environmental-based mortality of a short-lived perennial herb. *Journals of Ecology* **97**, 1000–1009.
- Roach DA.** 2012. Age, growth and size interact with stress to determine life span and mortality. *Experimental Gerontology* **47**, 782–786.
- Roy J, Sonié L.** 1992. Germination and population dynamics of *Cistus* sp. in relation to fire. *Journal of Applied Ecology* **29**, 647–655.
- Sattler SE, Gilliland LU, Magallanes-Lundback M, Pollard M, DellaPenna D.** 2004. Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *The Plant Cell* **16**, 1419–1432.
- Shaanker U, Ganeshiah KN, Bawa KS.** 1988. Parent–offspring conflict, sibling rivalry, and brood size patterns in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **19**, 177–205.
- Stanton ML.** 1984. Developmental and genetic sources of seed weight variation in *Raphanus raphanistrum* L. (Brassicaceae). *American Journal of Botany* **7**, 1090–1098.
- Stephenson AG.** 1981. Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Annual Review of Ecology and Systematics* **12**, 253–279.
- Thomas H.** 2013. Senescence, ageing and death of the whole plant. *New Phytologist* **197**, 696–711.
- Vanderklein D, Martínez-Vilalta J, Lee S, Mencuccini M.** 2007. Plant size, not age, regulates growth and gas exchange in grafted Scots pine trees. *Tree Physiology* **27**, 71–79.
- Vaupel JW, Baudisch A, Dölling M, Roach DA, Gampe J.** 2004. The case for negative senescence. *Theoretical Population Biology* **65**, 339–351.
- Vrinten P, Hu Z, Munchinsky M-A, Rowland G, Qiu X.** 2005. Two *FAD3* desaturase genes control the level of linolenic acid in flax seed. *Plant Physiology* **139**, 79–87.
- Wiens D, Calvin CL, Wilson CA, Davern CI, Frank D, Seacey SR.** 1987. Reproduction success, spontaneous embryo abortion, and genetic load in flowering plants. *Oecologia* **71**, 501–509.
- Wingler A, Masclaux-Daubresse C, Fischer AM.** 2009. Sugars, senescence, and ageing in plants and heterotrophic organisms. *Journal of Experimental Botany* **60**, 1063–1066.

Material supplementari

Table S1 Fatty acid composition of seeds of 3-, 8- and 13-y-old *C. albidus* plants growing in the Experimental Fields. Data are the mean \pm SE of n = 4 individuals with an analysis of 50 mg of seeds per individual. Different letters indicate significant differences between age groups (ANOVA, $P \leq 0.05$).

Fatty acids	Seeds from 3-y-old plants (mg/g DW)	Seeds from 8-y-old plants (mg/g DW)	Seeds from 13-y-old plants (mg/g DW)
Saturated fatty acids			
C8:0	0.015 \pm 0.001	0.013 \pm 0.002	0.015 \pm 0.004
C10:0	0.007 \pm 0.000	0.006 \pm 0.001	0.007 \pm 0.000
C12:0	0.005 \pm 0.000	0.004 \pm 0.001	0.005 \pm 0.000
C13:0	0.008 \pm 0.000	0.008 \pm 0.001	0.008 \pm 0.000
C14:0	0.016 \pm 0.002	0.016 \pm 0.003	0.018 \pm 0.001
C15:0	0.011 \pm 0.001	0.010 \pm 0.001	0.012 \pm 0.000
C16:0	0.617 \pm 0.089	0.578 \pm 0.149	0.646 \pm 0.051
C16:1	0.014 \pm 0.001	0.013 \pm 0.001	0.014 \pm 0.001
C17:0	0.014 \pm 0.001	0.013 \pm 0.002	0.015 \pm 0.000
C18:0	0.125 \pm 0.016	0.107 \pm 0.030	0.113 \pm 0.012
C20:0	0.034 \pm 0.003	0.032 \pm 0.006	0.034 \pm 0.002
C21:0	0.019 \pm 0.001	0.018 \pm 0.002	0.020 \pm 0.001
C20:0	0.029 \pm 0.002	0.028 \pm 0.005	0.033 \pm 0.001
C23:0	0.022 \pm 0.001	0.020 \pm 0.002	0.024 \pm 0.001
C24:0	0.030 \pm 0.001a	0.031 \pm 0.005ab	0.037 \pm 0.002b
Total	0.969 \pm 0.118	0.897 \pm 0.210	1.000 \pm 0.078
Monounsaturated fatty acids			
C18:1n9c	0.265 \pm 0.041	0.234 \pm 0.061	0.196 \pm 0.024
C20:1	0.016 \pm 0.001	0.014 \pm 0.002	0.015 \pm 0.000
C20:1n9	0.014 \pm 0.001	0.012 \pm 0.002	0.014 \pm 0.001
Total	0.295 \pm 0.042	0.260 \pm 0.065	0.225 \pm 0.026
Polyunsaturated fatty acids			
C18:2n6t	0.013 \pm 0.001	0.012 \pm 0.001	0.012 \pm 0.001
C18:2n6c	1.444 \pm 0.249	1.446 \pm 0.385	1.539 \pm 0.105
C18:3n3	0.014 \pm 0.000	0.012 \pm 0.001	0.013 \pm 0.001
C18:3n6	0.271 \pm 0.043	0.313 \pm 0.080	0.306 \pm 0.024
C20:2	0.021 \pm 0.001	0.018 \pm 0.002	0.020 \pm 0.001
C20:3n3	0.011 \pm 0.000	0.010 \pm 0.001	0.011 \pm 0.003
Total	1.775 \pm 0.045	1.811 \pm 0.084	1.902 \pm 0.028
Saturated	0.969 \pm 0.118	0.897 \pm 0.210	1.000 \pm 0.078
Monounsaturated	0.295 \pm 0.042	0.260 \pm 0.065	0.225 \pm 0.026
Polyunsaturated	1.775 \pm 0.045a	1.811 \pm 0.084ab	1.902 \pm 0.028b
Total	3.038 \pm 0.204	2.968 \pm 0.358	3.127 \pm 0.132

Table S2 Correlation coefficient (r^2) and P values (shown in parentheses) of Spearman rank correlation analysis between the trunk perimeter and all measured parameters in seeds of *C. albidus* plants growing in a natural population in the Montserrat Mountains (NE Spain). Numbers in bold indicate significant P values (Spearman's rank correlation, $P \leq 0.05$).

Parameter	Trunk perimeter
Fruit biomass (mg FW)	-0.111 (0.169)
Seed biomass (mg FW/fruit)	-0.100 (0.172)
Number of seeds per fruit	-0.201 (0.028)
Seed biomass (mg/FW)	0.220 (0.018)
% viable	0.068 (0.263)
% dying	-0.014 (0.448)
% aborted	-0.054 (0.305)
α -tocopherol ($\mu\text{g/g}$ seed)	-0.148 (0.097)
β -tocopherol ($\mu\text{g/g}$ seed)	0.011 (0.463)
γ -tocopherol ($\mu\text{g/g}$ seed)	-0.174 (0.063)
α -tocotrienol ($\mu\text{g/g}$ seed)	-0.066 (0.283)
β -tocotrienol ($\mu\text{g/g}$ seed)	-0.102 (0.185)
Total Vitamin E	-0.134 (0.119)
GA ₄ (ng/g FW)	0.051 (0.327)
GA ₉ (ng/g FW)	-0.071 (0.268)
GA ₂₄ (ng/g FW)	-0.018 (0.437)
ABA (ng/g FW)	-0.063 (0.290)
IAA (ng/g FW)	0.009 (0.470)
JA (ng/g FW)	-0.090 (0.216)
SA (ng/g FW)	-0.098 (0.196)
2-IP (ng/g FW)	-0.014 (0.452)
DHZ (ng/g FW)	0.043 (0.355)
DHZR (ng/g FW)	-0.145 (0.101)
IPA (ng/g FW)	0.005 (0.482)
Z (ng/g FW)	-0.049 (0.335)
ZR (ng/g FW)	-0.077 (0.249)

Material supplementari

Fig. S1 Germination capacity of seeds of 3-, 8- and 13-y-old *C. albidus* plants growing in the Experimental Fields. Data are the mean \pm SE of $n = 4$ individuals with an analysis of 50 seeds per individual. No significant differences were found between any of the three age groups (ANOVA, $P > 0.05$).

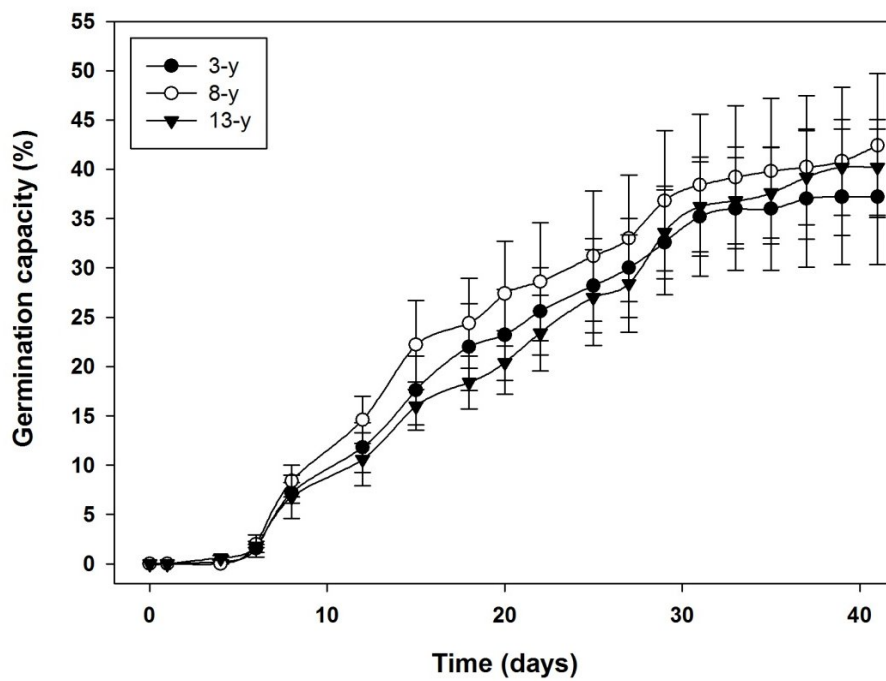
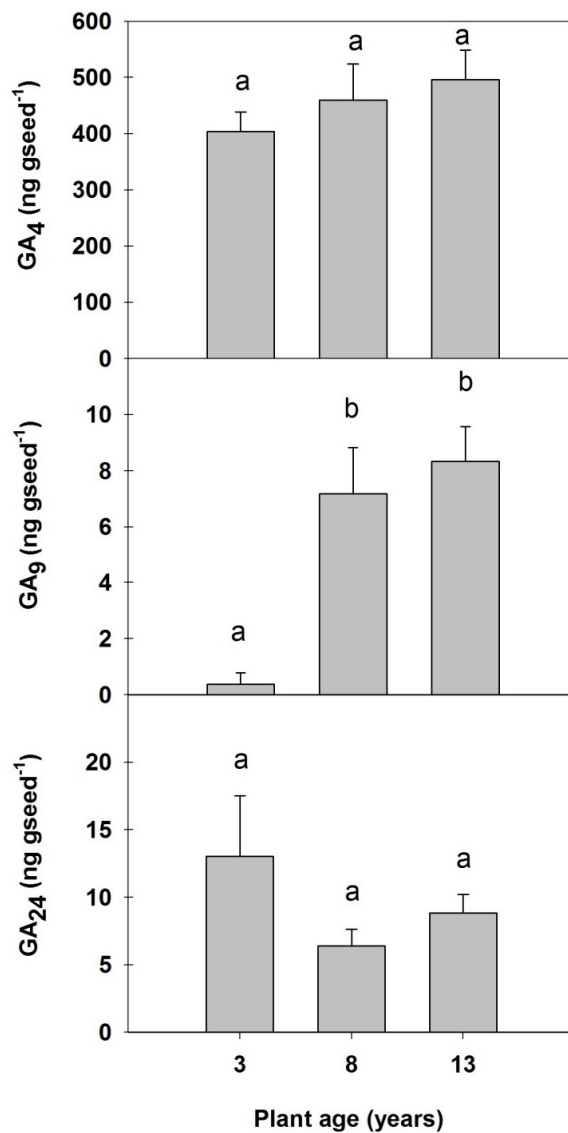


Fig. S2 Gibberellin (GA) content, including that of GA₄, GA₉ and GA₂₄, in seeds of 3-, 8- and 13-y-old *C. albidus* plants growing in the Experimental Fields. Data are the mean ± SE of n = 4 individuals with an analysis of 50 mg of seeds per individual. Different letters indicate significant differences between age groups (ANOVA, $P \leq 0.05$).



Material suplementari

Fig. S3 Cytokinin content, including that of zeatin (Z), zeatin riboside (ZR), isopentenyladenosine (IPA), dihydrozeatin (DHZ), dihydrozeatin riboside (DHZR) and 2-isopentenyladenine (2-IP), in seeds of 3-, 8- and 13-y-old *C. albidus* plants growing in the Experimental Fields. Data are the mean \pm SE of n = 4 individuals with an analysis of 50 mg of seeds per individual. Different letters indicate significant differences between age groups (ANOVA, $P \leq 0.05$).

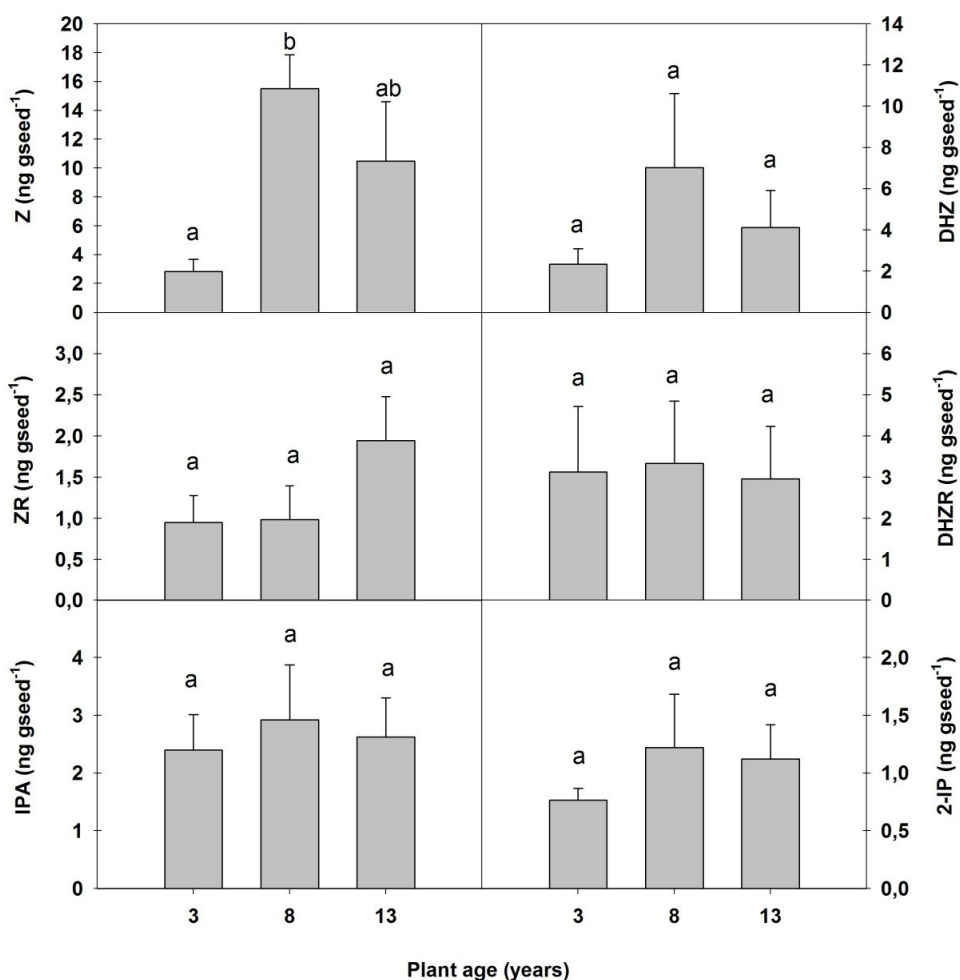
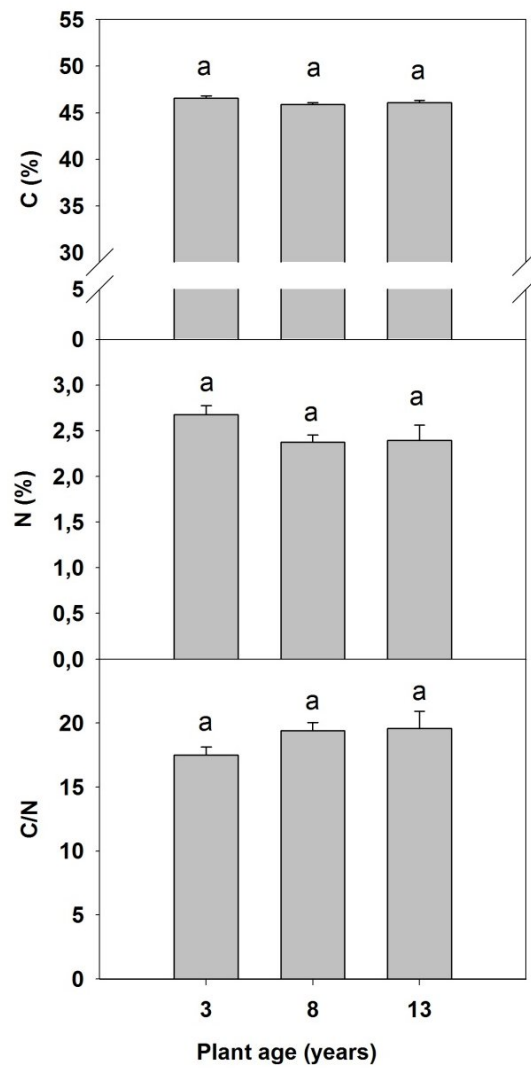


Fig. S4 C and N contents and C/N ratio in seeds of 3-, 8- and 13-y-old *C. albidus* plants growing in the Experimental Fields. Data are the mean \pm SE of n = 4 individuals with an analysis of 50 mg of seeds per individual. No significant differences were found between any of the three age groups (ANOVA, $P \leq 0.05$).



Material suplementari

Fig. S5 Correlation between plant age and trunk perimeter in *C. albidus* plants growing in the Experimental Fields (red circles) and Montserrat Mountains (black circles). Spearman's rank analyses showed significant correlations ($P < 0.001$). Note the differences in the slope of the linear regressions.

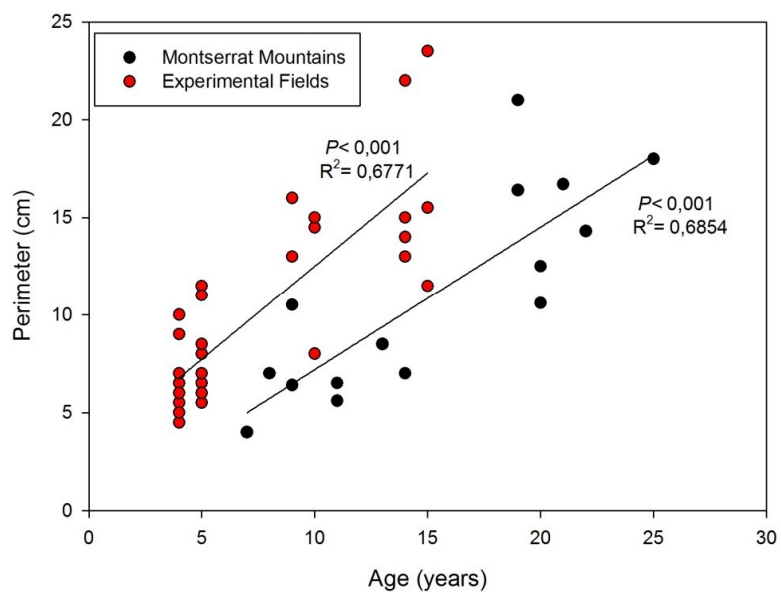
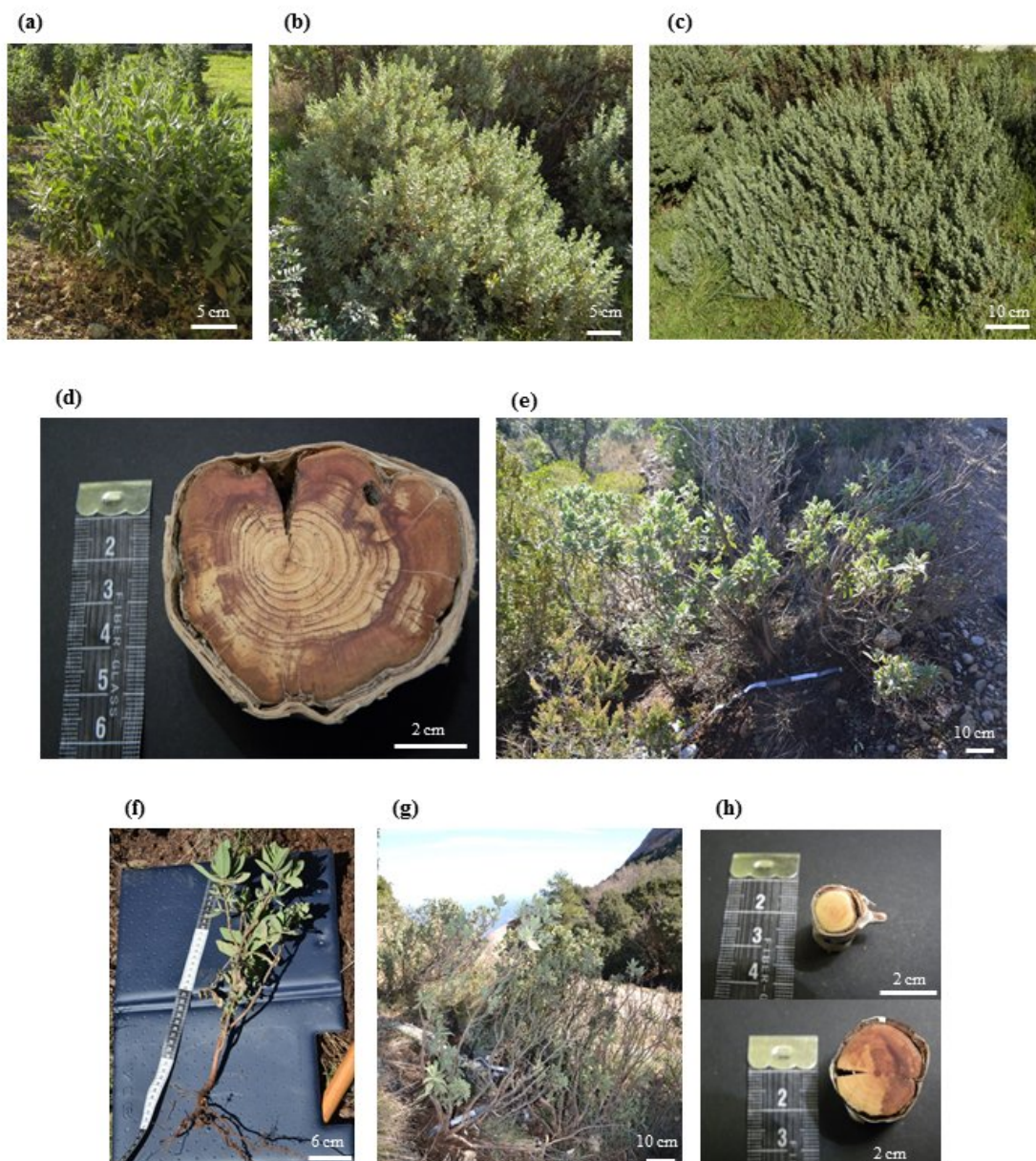


Fig. S6 Comparison of the plant biomass between *C. albidus* from the Experimental Fields and Montserrat Mountains. Examples of trunk rings are also shown. (a–c) Three-, 8 and 13-y-old *C. albidus* plants from the Experimental Fields (from left to right, respectively). (d) Trunk rings from the oldest individual (dead) found in the Montserrat Mountains (25-y-old). (e) Oldest *C. albidus* individual found alive in the Montserrat Mountains (19-y-old). (f–g) Individuals with trunk perimeter of 2.5 and 8 cm in the Montserrat Mountains. (h) Trunk rings from individuals with trunk perimeter of 2.5 and 7 cm, both found in the Montserrat Mountains.



Capítol 4

Diferències marcades en la dormició de llavors en dues poblacions de l'arbust mediterrani, *Cistus albidus* L



Chapter 4

Marked differences in seed dormancy in two populations of the Mediterranean shrub, *Cistus albidus* L

Laura Siles, Maren Müller, Jana Cela, Iker Hernández, Leonor Alegre,

Sergi Munné-Bosch

Departament de Biologia Evolutiva, Ecologia i Ciències Ambientals, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain

Enviat a **Plant, Ecology and Diversity** el dia 1 de febrer de 2017

Referència TPED-2017-0016

RESUM CAPÍTOL 4

- Els efectes materns són considerats determinants principals de la viabilitat i de la dormició de les llavors que poden afectar a la estructura i dinàmica de les poblacions als ecosistemes naturals.
- Vam avaluar les influències materns en la viabilitat i la capacitat germinativa en dues poblacions de l'arbust mediterrani, *Cistus albidus* exposat a condicions ambientals contrastades.
- Vam mesurar la viabilitat i la capacitat germinativa, així com els continguts endògens d'ABA, gibberel·lines i vitamina E en llavors recol·lectades en dues poblacions, incloent-hi un ambient natural i un altre de protegit (Parc Natural de la muntanya de Montserrat i camps experimentals, respectivament) al NE d'Espanya.
- Les plantes que creixien en l'ambient natural van produir llavors amb un percentatge de germinació més baix però de viabilitat similar, indicant un major grau de dormició. L'augment de dormició es relacionava amb continguts més elevats d'ABA i més baixos de gibberel·lines, i els continguts de tocoferols i tocotrienols van ser més elevats a les llavors de la població natural. Els continguts de tocoferols en llavors es van correlacionar positivament amb la taxa de biomassa viva/ biomassa aèria total.
- Es conclou que dues poblacions mediterrànies de *C. albidus* que creixen en dos hàbitats amb condicions ambientals contrastades mostren diferències en la dormició i germinació, les quals poden ser explicades almenys en part per diferències en els continguts hormonals de les llavors.

Marked differences in seed dormancy in two populations of the Mediterranean shrub, *Cistus albidus* L.

Laura Siles, Maren Müller, Jana Cela, Iker Hernández[#], Leonor Alegre, Sergi Munne-Bosch*

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

Background: Maternal effects are considered major determinants of seed viability and dormancy and may therefore affect population structure and dynamics in natural ecosystems.

Aims: We assessed maternal influences on seed viability and germination capacity in two populations of the Mediterranean shrub, *Cistus albidus* exposed to contrasting environmental conditions.

Methods: We measured seed viability and germination capacity, and endogenous contents of ABA, gibberellins and vitamin E in seeds collected from two populations, including a natural and a protected environment (Natural Park of the Montserrat Mountains and an experimental garden, respectively) in NE Spain.

Results: Plants growing in the natural site produced seeds with lower germination percentage but similar viability, indicating higher seed dormancy. Enhanced seed dormancy was paralleled with higher contents of ABA and lower levels of gibberellins. Contents of tocopherols and tocotrienols were higher in seeds of the natural population. Tocopherol contents in seeds correlated positively with the ratio living/total aerial biomass.

Conclusions: Two Mediterranean populations of *C. albidus* growing in two sites with contrasting environmental conditions showed marked differences in seed dormancy and germination, which may be explained at least in part by differences in seed hormonal contents.

Keywords: *Cistus albidus*, environment, maternal effects, phytohormones, plant age, seed dormancy, vitamin E

Introduction

Plants are adapted to the environment in which they develop and grow adjusting their morphology, physiology and reproduction to different environmental conditions through phenotypic plasticity, a very important characteristic to cope with environmental heterogeneity (Valladares et al. 2007; Matesanz et al. 2010). Likewise, environmental conditions exert a strong influence on seed dormancy and germination (Walck et al. 2011), which, in most plant species, vary greatly between individuals and populations. Although some of these variations may be of genetic origin, many of them are known to be due to environmental

factors (Gutterman 2000). Maternal environmental effects are those in which the phenotype of the progeny is altered by the environment experienced by the maternal plant (Donohue 2009). Therefore, factors such as temperature, water stress, day length, light quality and mineral nutrition affecting the mother plant during seed development and maturation influence the degree of seed dormancy and germination. Not only the environment experienced by the mother plant may influence seed viability and germination, but also the age of the mother plant can affect them (Roach and Wulff 1987; Gutterman 2000).

Seed dormancy can be defined as the failure of an intact viable seed to germinate under favourable conditions (Bewley 1997). Different types of seed dormancy evolved to allow plants to adapt to a wide diversity of climates and habitats (Finch-Savage and Leubner-Metzger 2006), and dormancy may be determined by morphological and/or physiological properties of the seeds (Nikolaeva 2004). *Cistus albidus* L., a common shrub typical of Mediterranean-type ecosystems, produces hard seeds unable to imbibe water (Rolston 1978; Thanos et al. 1993), mainly due to the water resistant substances which impregnate the seed coat (Rolston 1978; Baskin et al. 2000). The prevention of germination due to the water impermeability of the seed coat is known as physical dormancy, a characteristic of the Cistaceae family (Baskin and Baskin, 2014). In natural conditions, *Cistus* spp. seeds remain dormant until the heat generated by fire (Thanos and Georghiou 1988; Roy and Sonié 1992) or soil removal (Trabaud and Renard 1999) soft the hard-coated seeds (through scarification) making the seeds permeable to water and overcoming the physical dormancy (Baskin et al. 2000; Gama-Arachchige et al. 2013). Seed scarification opens the water gap, allowing the entrance of water. When seeds are imbibed, seed germination is then promoted in a wide range of temperatures and light conditions (Thanos and Georghiou 1988; Trabaud and Renard 1999). Unfortunately, it is still unknown whether *C. albidus* seeds combine physical dormancy with physiological dormancy or not. Therefore, it is of high interest to elucidate whether or not endogenous hormones, such as ABA and gibberellins (GAs) can play a role in the modulation of seed dormancy in this shrub of high ecological interest, which might help us understand and probably therefore manage seed banks in their natural ecosystem (Baskin and Baskin 2014).

Vitamin E is a group of lipid-soluble compounds with a strong antioxidant potential (Kamal-Eldin and Appelqvist 1996) serving a protective function in seeds. Sattler et al. (2004) showed that tocopherols may serve an essential role in germination and in preventing seed viability loss during storage in *Arabidopsis thaliana*. Furthermore, other studies using non-model plants also indicate that tocopherols may play a role protecting seeds from lipid peroxidation and oxidative-stress related processes during seed germination (Siles et al. 2015). Unfortunately, however, very little is known about the possible influence of vitamin E on seed germination and dormancy in *C. albidus*, despite the ecological interest of this species in Mediterranean-type ecosystems.

The aim of this work was to study the seed viability, dormancy and germination in two Mediterranean populations of *C. albidus* growing in two sites differing in environmental conditions, with an emphasis on evaluating whether or not endogenous contents of phytohormones and vitamin E may explain differences in seed dormancy/germination and viability in these populations. It was hypothesized that a harsher maternal environment may negatively influence seed germination and viability in *C. albidus* through changes in phytohormones and vitamin E levels.

Material and methods

Plant material, growth conditions and sampling

Cistus albidus L., a common Mediterranean shrub widely distributed in the western Mediterranean from sea level to 1400 m (Blasco and Mateu 1995), resistant to drought stress and with a high capacity to grow in degraded environments, was used for the study. Two plant populations were compared. The first one was growing in an experimental garden, particularly at the Experimental Fields of the Faculty of Biology at University of Barcelona at 100 m.a.s.l. (Barcelona,

Catalonia, NE Spain), which, hereinafter, will be referred as a protected environment. Twenty individuals were growing in a Calcic Luvisol soil (FAO), which were treated once a year with N:P:K (1:1:1) fertilizer at a rate of 100 kg ha⁻¹. The second population was growing in a mixture of conglomerate, sandstone and red shale in the Natural Park of the Montserrat Mountains at 1000-1149 m.a.s.l. (50 km northwest of Barcelona, Catalonia, NE Spain), which, hereinafter, will be referred to as a natural environment. Fifteen individuals, aged between 3 and 13 years old, and 84 individuals, aged between 3 and 17 years old, from the protected and natural environment, respectively, were used for experiments. The presence of a “hardseededness” with heat stimulated-germination, short-range dispersal distance, short life cycles (~20 years), and early first reproduction events (~2 years) with full reproduction capacity (~5 years), are all characteristic ecological features of *C. albidus* (Roy and Sonié 1992; de Luis et al. 2008). Climatological conditions were collected from weather stations situated at 50 and 450 m from plants from the protected and natural populations, respectively. Although both populations were growing under Mediterranean conditions, plants growing in the natural environment received less water per year (with an accumulated yearly rainfall of 522 mm vs. 729 mm), particularly during the summer (217 mm vs. 94 mm), and were exposed to lower temperatures during the winter (minimum monthly average temperatures of 0.4°C vs. 6.5°C).

Aside from comparing the two populations, we additionally evaluated the effects of plant age on the natural population, from which a sufficiently high number of individuals was available to examine plant age-related effects. Plant age in the natural population was estimated by using the equation from Figure 1, which was obtained measuring the trunk perimeter and counting

the trunk rings from 126 individuals. Despite the destructive nature of these measurements, trunk ring counting is very effective in the estimation of the age of woody perennials (Schweingruber and Poschold 2005; Bergin and Kimberley 2012) and allowed us to study the effects of maternal age on seed viability, seed germination and dormancy, and endogenous seed phytohormone and vitamin E contents in the natural population.

Seeds were separately collected from each of the 15 and 84 individuals from the protected and natural populations, respectively, during September 2012 from mature fruits for estimation of viability, germination capacity and endogenous contents of phytohormones and vitamin E. For seed germination and viability tests, 50 seeds per individual were evaluated. For phytohormone and vitamin E analyses, 50 mg of seeds per individual were examined. Mature fruits were collected and immediately brought to the laboratory, where seeds were counted and immediately used for seed germination and viability tests. The remaining seeds were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C before biochemical analyses.

Furthermore, aboveground photosynthetic and non-photosynthetic tissues from 6 and 84 individuals from the protected and natural populations, respectively, were separated and weighed after oven-drying the samples at 100°C to constant weight to obtain the dry mass. The 6 individuals taken for estimation of plant growth from the protected environment were selected to be representative (in terms of size) of the 15 individuals from which seeds were collected for estimation of seed viability and germination.

Seed germination and viability tests

Germination capacity tests were carried out as described by Galmés et al. (2006) with some modifications. Seeds were sterilized in

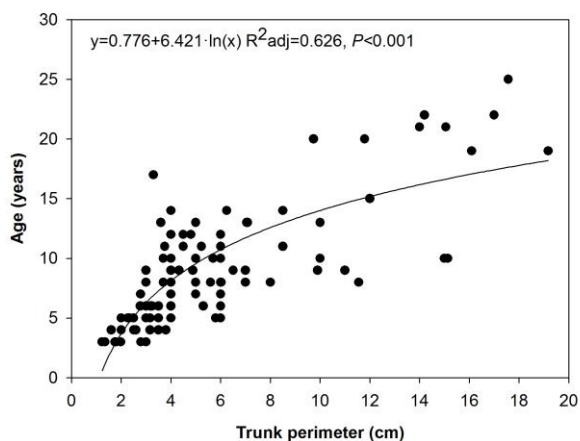


Figure 1. Logarithmic regression between the trunk perimeter and the age of 126 *C. albidus* plants growing in the natural environment (Natural Park of Montserrat Mountains). Corrected determination coefficient (adjusted R^2) and significant P -values ($P \leq 0.05$) are shown.

an aqueous solution of bleach and Tween 20 (50:0.15, v/v) for 10 minutes, followed by 3 rinses in autoclaved Milli Q water. The seeds were then incubated for 24 h in autoclaved Milli Q water at 25°C before being subjected to a heat shock (100°C, 5 minutes) to break physical dormancy. This is a very effective treatment that makes >95% seeds water permeable. Then, 10 ml of autoclaved Milli Q water were placed in each plate with 50 seeds. Seeds were germinated at 17°C in a germination chamber and seeds were counted three times per week during 12 weeks under a green light. All steps of the germination test were performed in the dark.

For viability tests, all seeds were incubated for 24 h in the dark and a heat shock was applied as described before to make seeds permeable to water. The seeds were then soaked in a tetrazolium chloride solution at 1% and incubated at 37°C in darkness for 2 days. Subsequently, viable and non-viable seeds were counted. Seeds were considered to be alive when the embryo was intact and fully stained with rich formazan red. Seeds were considered to be non-viable when staining of the embryo was patchy,

weak (pink) or absent. A fraction of these seeds were empty (aborted seeds).

Phytohormone analyses

The extraction and UHPLC-MS/MS analysis of endogenous concentrations of GA₄ and ABA were performed as described by Müller and Munné-Bosch (2011). Deuterium labelled phytohormones (d₂-GA₄ and d₆-ABA) were used as internal standards.

Vitamin E analyses

The extraction and HPLC analysis of endogenous concentrations of vitamin E, including both tocopherols and tocotrienols, were performed as described by Cela et al. (2011). Quantification was performed by using fluorescence detection. α -, β -, γ - and δ -tocopherols and tocotrienols, which were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), were used as standards.

Statistical analyses

Differences between populations in plant growth, seed germination and viability, or phytohormone and vitamin E contents, were evaluated using analysis of variance (one-way ANOVA). Results were considered significant at a probability level of $P \leq 0.05$. The significance of regressions, which were used to evaluate plant age effects in the natural population, and Spearman's rank correlation analyses, which examined the correlation between the vitamin E levels and all measured parameters in seeds, were considered significant when $P \leq 0.05$.

Results and discussion

It is shown in the present study maternal influences not only in plant growth, but also in seed dormancy and germination in the Mediterranean shrub, *C. albidus*, an effect that appeared to be governed, at least in part, by phytohormones. In the present study, plants at different locations may express

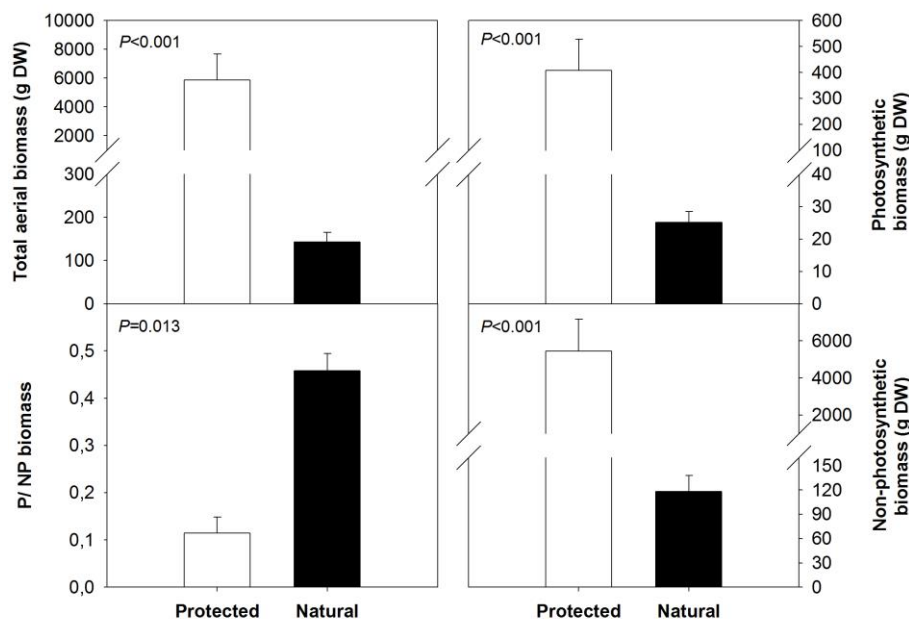


Figure 2. Total aerial biomass, photosynthetic and non-photosynthetic biomass and the ratio of photosynthetic to non-photosynthetic biomass (P/NP) of *C. albidus* plants growing in the protected (white bars) and natural environments (black bars). Data represent the mean \pm SE of n=6 and 84 in the protected and natural environments, respectively. One-way ANOVA significant values ($P \leq 0.05$) are shown.

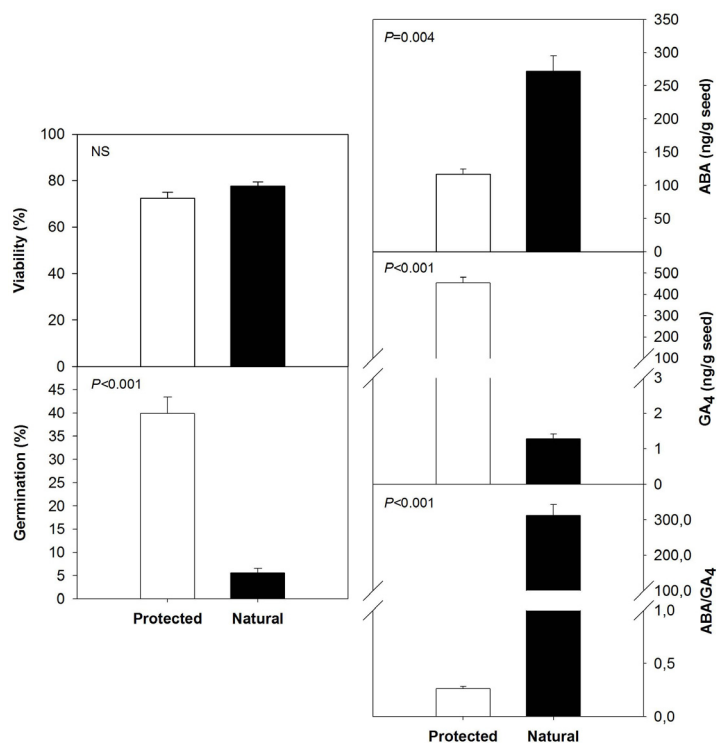


Figure 3. Viability, germination capacity and endogenous concentrations of abscisic acid (ABA), gibberellin 4 (GA₄) and the ABA/GA₄ ratio in seeds collected from *C. albidus* plants growing in the protected (white bars) and natural environments (black bars). Data represent the mean \pm SE of n=15 and 84 in the protected and natural environments, respectively. One-way ANOVA significant values ($P \leq 0.05$) are shown.

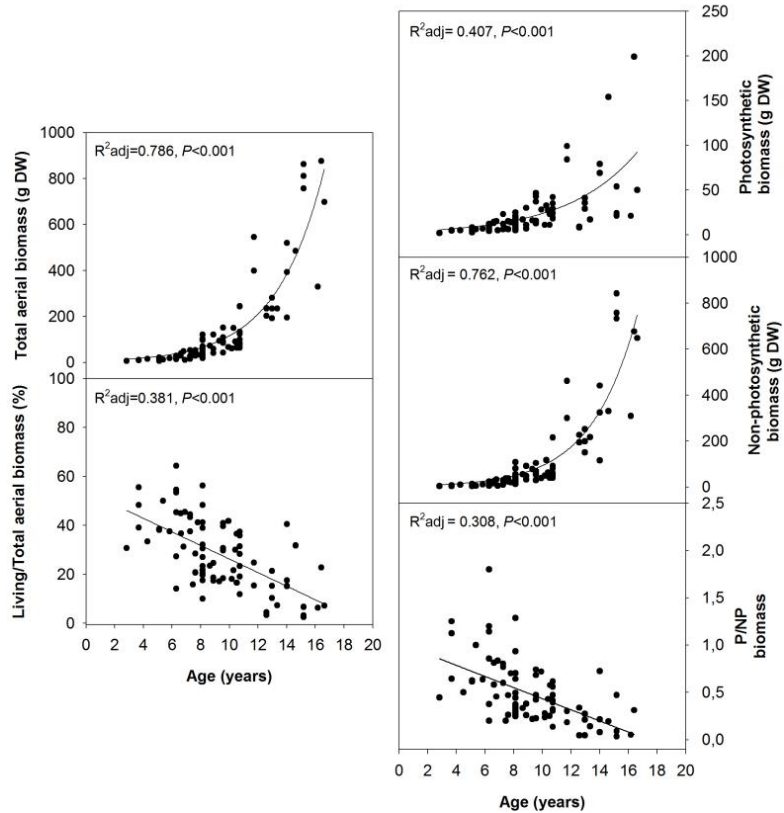


Figure 4. Regression between plant age and total aerial biomass, living/total aerial biomass ratio, photosynthetic biomass (P), non-photosynthetic biomass (NP) and the P/NP ratio in *C. albidus* growing in a natural environment (Natural Park of the Montserrat Mountains). Corrected determination coefficient (adjusted R^2) and significant P -values ($P \leq 0.05$) are shown.

variation in physiological traits due to a plastic response to contrasting environmental conditions at the two sites, but also to genetic differences due to long-term selection pressures at the two sites. Differences in soil type, water and nutrient availability, temperatures and altitude, both in the short and long term, might influence the biomass allocation and plant growth of both *C. albidus* populations investigated in the present study. Plants that grew in a protected environment had 41-fold higher total aerial biomass and 2.3-fold higher percentage of living/total aerial biomass than the individuals which grew in a natural one. The P/NP ratio was, however, 4 fold-higher in plants from the natural environment than in the protected one (Figure 2). Limitations in photosynthetic capacity by cold temperatures, drought stress and nutrient limitation (Evans 1983; Oleksyn et al. 1998; Allen and Ort

2001; Hendrickson et al. 2004) might have led to lower growth rates and a smaller plant size in the natural environment.

Seeds from the natural, more stressful environment germinated less than the ones from the protected environment, while viability was similar, thus indicating a higher degree of dormancy in the natural population compared to the protected one. Seeds from the protected environment showed indeed 7.1-fold higher germination capacity than seeds from the natural environment (Figure 3). This difference between populations was accompanied by changes in the seed hormonal content. Seeds had higher levels of ABA (272 vs. 167 ng/g seed) and lower levels of GA₄ (1.3 vs. 453 ng/g seed) in the natural compared to the protected environment, which resulted in 1180-fold higher ABA/GA₄ ratios in the natural environment compared to the protected one

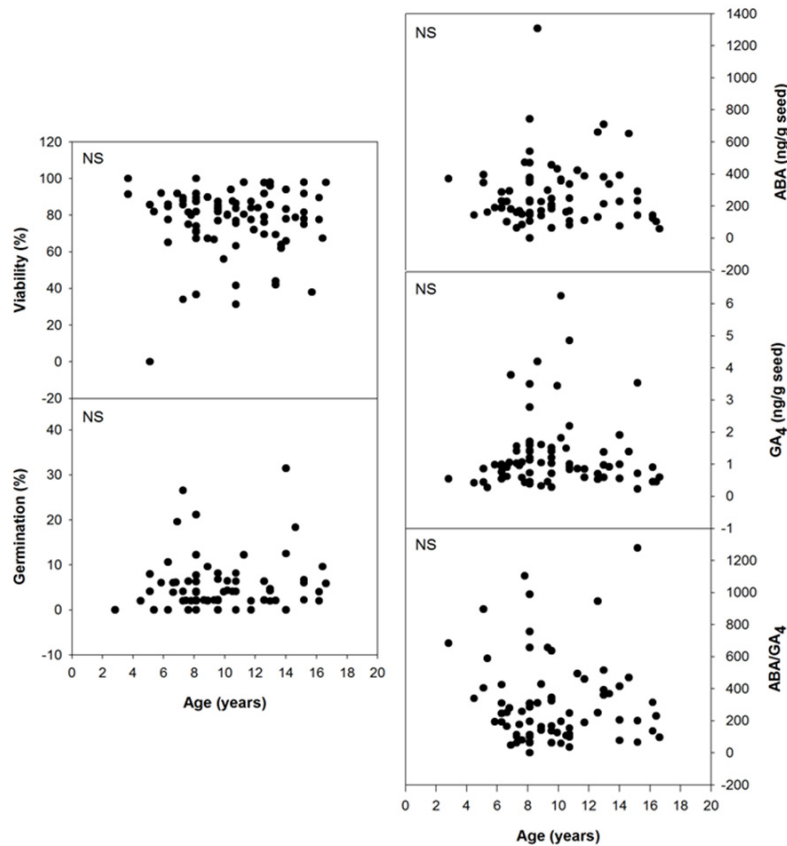


Figure 5. Regressions between plant age and seed viability and germination capacity, endogenous levels of abscisic acid (ABA), gibberellin₄ (GA₄) and the ABA/GA₄ ratio in seeds of *C. albidus* growing in a natural environment (Natural Park of the Montserrat Mountains). NS, not significant.

(Figure 3). While dormancy depends on high ABA/GA ratios, dormancy release and germination involves an increase of GA biosynthesis and ABA degradation, resulting in low ABA/GA ratios (Cadman et al. 2006; Finch-Savage and Leubner-Metzger 2006; Finkelstein et al. 2008; Bewley et al. 2013; Miransari and Smith 2014; Bicalho et al. 2015). Since GA itself is not involved in embryo dormancy loss, a decrease of ABA levels may be required before GA levels and sensitivity can increase (Ali-Rachedi et al. 2004). Hormones control dormancy and germination at transcriptional levels, and in conjunction with the environment experienced by the maternal plant, control testa characteristics, as plants with low ABA levels have thinner seed coats (Bewley 1997; Kucera et al. 2005). Hence, under more stressful environmental conditions, *C. albidus* individuals appear to produce seeds with a

higher degree of physiological dormancy (modulated by higher ABA/GAs ratios).

Although in some species the age of the mother plant can affect the dormancy degree of the seeds, in which old and senescent plants produce more dormant seeds than younger plants (Gutterman 2000; Baskin and Baskin 2014), plant age in the natural habitat did not affect the viability, germination capacity and hormonal levels of seeds in *C. albidus*. Despite age-related differences in total biomass, as well as living/total biomass and P/NP ratios (Figure 4), seed viability, germination capacity and hormonal levels did not show significant differences as plant aged in the natural population (Figure 5). A more thoroughly possible effect of plant age on seed viability study with an increased sample size is however required to completely exclude a possible effect of plant age on dormancy and

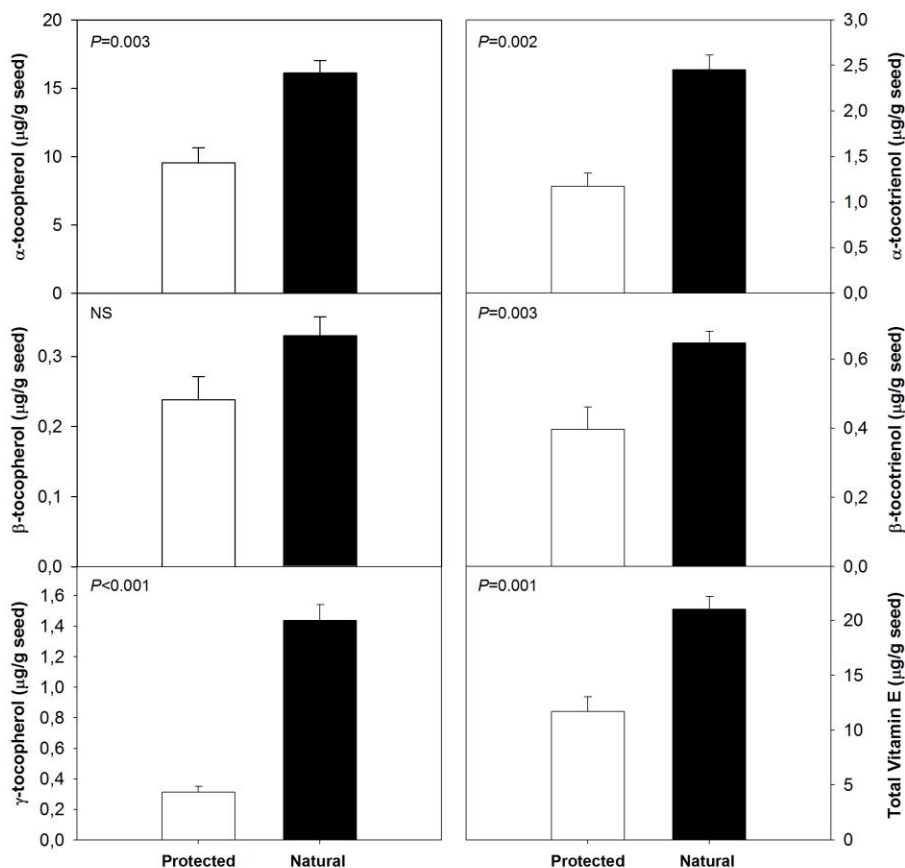


Figure 6. Tocopherol, tocotrienol, and total vitamin E content in seeds from *C. albidus* plants growing in the protected (white bars) and natural environments (black bars). Data represent the mean \pm SE of n=15 and 84 in the protected and natural environments, respectively. One-way ANOVA significant values ($P \leq 0.05$) are shown.

germination/dormancy in natural populations of *C. albidus*.

C. albidus seeds contained both tocopherols and tocotrienols. More than 75% of the vitamin E present in seeds of this species was in the form of α -tocopherol, which is considered to be the most active vitamin E form in plants and animals (Munné-Bosch and Alegre 2002). The second most abundant vitamin E form found in *C. albidus* seeds was α -tocotrienol, followed by γ -tocopherol, which is the immediate precursor of α -tocopherol. α -Tocopherol, which was therefore the major vitamin E form present in *C. albidus* seeds, was found at 70% higher amounts in the natural population compared to the protected one (Figure 6). This is not surprising since α -

tocopherol is considered an important protective molecule against oxidative stress (Munné-Bosch and Alegre 2002). Therefore, plants growing in the natural environment, which were exposed to more stressful conditions, produced more vitamin E in seeds, which might serve to protect seeds during long periods of dormancy (Sattler et al. 2004). Interestingly, seed tocopherol contents, particularly those of γ -tocopherol, correlated positively with the ratio living/total aerial biomass (and negatively with the amount of non-photosynthetic biomass, Table 1) in the natural population. This may reflect a positive correlation between the vigour of the mother plant and that of the seeds they produce. It should be noted, however, that this change in the biochemical

Table 1: Correlation coefficient (r) and P values (shown in parentheses) of Spearman's rank correlation analysis between the vitamin E levels and all measured parameters in seeds of *C. albidus* plants growing in a natural population in the Montserrat Mountains (NE Spain). Numbers in bold indicate significant P values (Spearman's rank correlation, $P \leq 0.05$).

Parameter	α -tocopherol ($\mu\text{g/g seed}$)	β -tocopherol ($\mu\text{g/g seed}$)	γ -tocopherol ($\mu\text{g/g seed}$)	α -tocotrienol ($\mu\text{g/g seed}$)	β -tocotrienol ($\mu\text{g/g seed}$)	Total Vitamin E ($\mu\text{g/g seed}$)
Age (years)	-0,069 (0,565)	0,031 (0,796)	-0,101 (0,400)	0,037 (0,758)	-0,026 (0,831)	-0,047 (0,692)
Total aerial biomass (g DW)	-0,173 (0,147)	-0,026 (0,825)	-0,214 (0,071)	-0,074 (0,536)	-0,120 (0,317)	-0,155 (0,195)
Living/total aerial biomass (%)	0,142 (0,233)	-0,062 (0,604)	0,236 (0,046)	0,039 (0,745)	0,104 (0,384)	0,119 (0,320)
Photosynthetic biomass (g DW)	-0,157 (0,188)	-0,167 (0,161)	-0,173 (0,146)	-0,097 (0,418)	-0,107 (0,370)	-0,150 (0,208)
Non-photosynthetic biomass (g DW)	-0,180 (0,130)	-0,025 (0,838)	-0,232 (0,050)	-0,079 (0,512)	-0,137 (0,252)	-0,163 (0,172)
Germination (%)	-0,183 (0,123)	0,067 (0,575)	-0,165 (0,166)	-0,158 (0,185)	-0,099 (0,407)	-0,175 (0,142)
Viability (%)	-0,114 (0,340)	0,164 (0,168)	-0,107 (0,370)	-0,134 (0,262)	-0,170 (0,154)	-0,108 (0,368)
Dying (%)	0,095 (0,427)	-0,226 (0,056)	0,103 (0,391)	0,114 (0,342)	0,161 (0,176)	0,088 (0,461)
Aborted (%)	0,060 (0,619)	0,056 (0,641)	-0,029 (0,807)	0,044 (0,714)	0,045 (0,707)	0,042 (0,729)
ABA (ng/g seed)	0,032 (0,792)	-0,037 (0,759)	0,059 (0,622)	-0,008 (0,944)	0,040 (0,736)	0,035 (0,773)
GA ₄ (ng/g seed)	0,057 (0,633)	-0,143 (0,232)	0,068 (0,569)	0,073 (0,541)	0,052 (0,665)	0,068 (0,573)
ABA/GA ₄	-0,046 (0,701)	0,074 (0,537)	-0,053 (0,659)	-0,079 (0,507)	-0,022 (0,853)	-0,052 (0,662)

composition of seeds did not lead to an improved viability, thus further investigation is warranted. Furthermore, plant age in the natural habitat did not influence the vitamin E composition of seeds, which suggests that the quality of seeds is not negatively influenced by the age of the mother plant.

Conclusions

It is concluded that the two Mediterranean populations of *C. albidus* growing in two sites with contrasting environmental conditions showed marked differences in seed dormancy and germination, which may be explained at least in part by differences in seed hormonal contents. The results suggest that *C. albidus* seeds experience a combination of physical and physiological dormancy. Harsher environmental conditions might also lead to an enhanced accumulation of vitamin E in seeds to protect embryos during long periods of dormancy, an aspect that warrants further investigations.

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Government under grant numbers BFU2012-32057 and BFU2015-64001-P/MINECO/FEDER. Support for the research was also received through the prize ICREA Academia given to S.M.-B., funded by the Catalan Government. L. Siles holds a FPU fellowship from the Spanish Government. We are very grateful to the Serveis Científic-Tècnics and Serveis dels Camps experimentals (Universitat de Barcelona) for technical assistance. We thank Jordi Calaf (Natural Park of the Montserrat Mountains) for the help provided in the sampling of individuals. We are very grateful to Miriam Lapuyade and Javier A. Miret (University of Barcelona) for their help in the estimation of the plant biomass.

Additional author information

Laura Siles - Laura Siles is a PhD fellow at University of Barcelona and performed field samplings and biochemical analyses

Maren Müller - Maren Müller, Assistant professor and research scientist at University of Barcelona, has interests in phytohormones and their function in plants

Jana Cela - Jana Cela was a research assistant at University of Barcelona and performed vitamin E analyses

Iker Hernández - Iker Hernández was a postdoc at University of Barcelona and is now working in research and development in Futureco Bioscience

Leonor Alegre - Leonor Alegre, Full Professor of Plant Physiology, has interests in plant responses of Mediterranean plants to the environment

Sergi Munné-Bosch - Sergi Munné-Bosch, Associate Professor of Plant Physiology, has interests in antioxidants, stress and senescence-related processes in plants

References

- Ali-Rachedi S, Bouinot D, Wagner M, Bonnet M, Sotta B, Grappin P, Jullien M. 2004. Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 219: 479–488.
- Allen DJ, Ort DR. 2001. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends in Plant Science* 6: 36-42.
- Baskin JM, Baskin CC, Li X. 2000. Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. *Plant Species Biology*, 15: 139-152.

- Baskin C.C., Baskin J.M. 2014. Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination, 2nd edn. Elsevier, London.
- Bergin DO, Kimberley MO. 2012. Reliability of increment core growth ring counts as estimates of stand age in totara (*Podocarpus totara* D.Don). New Zealand Journal of Forestry Science 42: 131-141.
- Bewley JD. 1997. Seed germination and dormancy. Plant Cell 9: 1055-1066.
- Bewley D, Bradford KJ, Hilhorst HWM, Nonogaki H. 2013. Seeds – Physiology of development, germination and dormancy, 3rd edition. Springer, New York, USA, pp. 392.
- Bicalho E, Pintó-Marijuan M, Morales M, Müller M, Munné-Bosch S, Garcia QS. 2015. Control of macaw palm seed germination by the gibberellin/abscisic acid balance. Plant Biology 17: 990-996.
- Blasco S, Mateu I. 1995. Flowering and fruiting phenology and breeding system of *Cistus albidus* L. Acta Botanica Gallica 142: 245–251.
- Cadman CSC, Toorop PE, Hilhorst HWM, Finch-Savage WE. 2006. Gene expression profiles of *Arabidopsis Cvi* seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism. Plant Journal 46: 805–822.
- Cela J, Chang C, Munné-Bosch S. 2011. Accumulation of γ - rather than α -tocopherol alters ethylene signaling gene expression in the *vte4* mutant of *Arabidopsis thaliana*. Plant and Cell Physiology 52: 1389–1400.
- de Luis M, Verdú M, Raventós J. 2008. Early to rise makes a plant healthy, wealthy and wise. Ecology 89: 3061–3071.
- Donohue K. 2009. Completing the cycle: maternal effects as the missing link in plant life histories. Philosophical Transactions of the Royal Society B 364: 1059-1074.
- Evans J.R. 1983. Nitrogen and photosynthesis in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Physiology 72: 297-302.
- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. New Phytologist 171: 501-523.
- Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C. 2008. Molecular aspects of seed dormancy. Annual Review of Plant Biology 59: 387–415.
- Galmés J, Medrano H, Flexas J. 2006. Germination capacity and temperature dependence in Mediterranean species of the Balearic Island. Investigaciones Agrarias: Sistemas Recursos Forestales 15: 88-95.
- Gama-Arachchige NS, Baskin JM, Geneve RL, Baskin CC. 2013. Identification and characterization of ten new water gaps in seeds and fruits with physical dormancy and classification of water-gap complexes. Annals of Botany 112: 69-84.
- Gutterman Y. 2000. Maternal effects on seeds during development. In: Fenner M (ed) Seeds: the ecology of regeneration in plant communities, 2nd edn. CAB International, New York, pp 59-84.
- Hendrickson L, Ball MC, Wood JT, Chow WS, Furbank RT. 2004. Low temperature effects on photosynthesis and growth of grapevine. Plant, Cell and Environment 27, 795-809.
- Kamal-Eldin A, Appelqvist L.Å. 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. Lipids 31: 671–701.

- Kucera B, Cohn MA, Leubner-Metzger G. 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research* 15: 281-307.
- Matesanz S, Gianoli E, Valladares F. 2010. Global change and the evolution of phenotypic plasticity in plants. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1206: 35-55.
- Miransari M, Smith DL. 2014. Plant hormones and seed germination. *Environmental and Experimental Botany* 99: 110-121.
- Müller M, Munné-Bosch S. 2011. Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Plant Methods* 7: 37.
- Munné-Bosch S, Alegre L. 2002. The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21: 31-57.
- Nikolaeva M.G. 2004. On criteria to use in studies of seed evolution. *Seed Science Research* 14: 315-320.
- Oleksyn J, Modrzyński J, Tjoelker MG, Zytkowski R, Reich PB, Karolewski P. 1998. Growth and physiology of *Picea abies* populations from elevational transects: common garden evidence for altitudinal ecotypes and cold adaptation. *Functional Ecology* 12: 573-590.
- Roach DA, Wulff RD. 1987. Maternal effects in plants. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 18: 209-235.
- Rolston M.P. 1978. Water impermeable seed dormancy. *Botanical Review* 44: 365-396.
- Roy J, Sonié L. 1992. Germination and population dynamics of *Cistus* species in relation to fire. *Journal of Applied Ecology* 29: 647-655.
- Sattler SE, Gilliland LU, Magallanes-Lundback M, Pollard M, DellaPenna D. 2004. Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell* 16: 1419-32.
- Schweingruber FH, Poschold P. 2005. Growth rings in herbs and shrubs: Life span, age determination and stem anatomy. *Forest Snow and Landscape Research* 79: 195-415.
- Siles L, Tijero V, Alegre L, Munné-Bosch S. 2015. Enhanced tocopherol levels during early germination events in *Chamaerops humilis* var. *humilis* seeds. *Phytochemistry* 118: 1-8.
- Thanos CA, Georghiou K, Kadis C, Pantazi C. 1993. Cistaceae: a plant family with hard seeds. *Israel Journal of Plant Sciences* 41: 251-263.
- Thanos CA, Georghiou K. 1988. Ecophysiology of fire-stimulated seed germination in *Cistus incanus* spp. *creticus* (L.) Heywood and *C. salvifolius* L. *Plant Cell and Environment* 11: 841-849.
- Trabaud L, Renard P. 1999. Do light and litter influence the recruitment of *Cistus* spp. stands? *Israel Journal of Plant Sciences* 47: 1-9.
- Valladares F, Gianoli E, Gómez JM. 2007. Ecological limits to plant phenotypic plasticity. *New Phytologist* 176: 749-763.
- Walck JL, Hidayati SN, Dixon KW, Thompson K, Poschold P. 2011. Climate change and plant regeneration from seed. *Global Change Biology* 17: 2145-2161.



DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

1. Distribució de la vitamina E en llavors al llarg de l'evolució

La vida es va originar a la Terra fa més de 3.500 milions d'anys. La primera endosimbiosi entre un bacteri fotosintètic (cianobacteri) i un organisme unicel·lular (protozou) es va produir fa, aproximadament, 1.500 milions d'anys, donant lloc a tres línies evolutives: els glaucòfits, les algues verdes i les algues vermelles (McFadden 2001). Es creu que les algues verdes són els ancestres de les plantes terrestres, les quals van haver d'evolucionar per tal de fer front als diversos problemes associats a viure en un ambient no aquàtic, així com van haver d'adaptar la seva forma de reproduir-se. D'entre les plantes terrestres van sorgir els espermatòfits i en concret, les angiospermes van desenvolupar l'habilitat de produir flors, fruits i llavors per tal d'assegurar la dispersió i la supervivència de la progènie (Jones *et al.*, 2003). Les primeres plantes que van produir llavors van aparèixer al Devonià tardà, fa uns 370 milions d'anys (**Figura 9**, Pennisi, 2009; Linkies *et al.*, 2010). Una de les innovacions d'aquest èxit evolutiu va ser la capacitat de mantenir l'embrió en un estat dessecat i viable, és a dir, quiescent, durant llargs períodes de temps; fet en part possible gràcies a l'acumulació de vitamina E i a la seva funció protectora, tal i com s'explica a **l'apartat 3 (Funció de la vitamina E en llavors)**.

Tot i la presència de vitamina E en tot el regne vegetal, la distribució específica de tocoferols i tocotrienols en llavors varia entre ordres, gèneres i espècies vegetals. Al **capítol 1** es va observar que la família Arecaceae acumulava principalment tocotrienols a les llavors, exceptuant l'espècie *Daemonorops sabut*, que acumulava exclusivament tocoferols. Diverses espècies d'aquesta família també van acumular tocoferols en quantitats molt baixes, excepte *Dypsis lutescens*, que n'acumulava elevades quantitats. Les espècies analitzades es trobaven distribuïdes entre les subfamílies *Calamoideae*, *Coryphoideae* i *Arecoideae*, les quals van sorgir en diferents moments del Cretaci. Mentre que el seu ancestre comú va aparèixer fa uns 100 milions d'anys, la subfamília *Calamoideae* va ser la

primera en sorgir, seguida de les subfamílies *Coryphoideae* i *Arecoideae*. Aquestes van aparèixer a la meitat i al final del Cretaci, respectivament (Baker & Couvreur, 2012). Tot i que l'única espècie analitzada de la subfamília *Calamoideae* va ser *Daemonorops sabut*, una tendència a una menor acumulació de tocoferols va ser observada al llarg de l'evolució. Mentre que el gènere pertanyent a la subfamília més antiga (*Calamoideae*) contenia exclusivament tocoferols, un 65% dels gèneres de la subfamília *Coryphoideae* i un 59% dels gèneres pertanyents a la subfamília *Arecoideae* contingueren tocoferols. Per tant, es va observar una menor distribució i acumulació de tocoferols a les subfamílies més modernes, exceptuant a *Dypsis lutescens*; espècie pertanyent a la subfamília *Arecoideae* que contenia un 97,8% de tocoferols. No obstant, una anàlisi més exhaustiva de les dades va revelar que la distribució de la vitamina E dins de cada subfamília no mostrava aquesta tendència evolutiva. A la subfamília *Coryphoideae* un 3% dels gèneres que contenien tocoferols van aparèixer a l'Eocè, un 9% al període inicial del Miocè mentre que un 36% va sorgir al final del Miocè. A la subfamília *Arecoideae* aquest patró també es va observar, on un 8% dels gèneres que contingueren tocoferols van aparèixer a l'Oligocè i un 51% al Miocè. A més, alguns gèneres més antics que van aparèixer al Paleocè, com *Roystonea*, no acumularen tocoferols. Així doncs, si bé no es va poder determinar una menor acumulació de tocoferols al llarg del temps, sí que es va observar que la capacitat de sintetitzar i acumular tocoferols en llavors s'ha anat perdent en diferents gèneres al llarg de l'evolució. Aquests resultats contrasten amb els obtinguts per Esteban *et al.* (2009), on es conclou que hi ha una tendència evolutiva a incrementar el contingut d' α -tocoferol en òrgans fotosintètics, acumulant-se més a plantes vasculars que en organismes fotosintètics evolutivament més primitius, com algues i molles. Per tant, sembla que la distribució de la vitamina E ha variat evolutivament i de manera independent en diferents òrgans vegetals, i que a les llavors de la família Arecaceae la síntesi de tocoferols ha evolucionat de manera independent en alguns gèneres.

La diferent capacitat d'acumular o no tocoferols als gèneres d'aquesta família no va determinar la distribució global de cap de les 84 espècies estudiades, trobant

en les mateixes zones espècies amb i sense tocoferols a les llavors. Així mateix, el tipus de dormició característica de cada espècie analitzada tampoc va estar relacionada amb la distribució i acumulació de vitamina E. S’ha de tenir en compte que encara no s’ha caracteritzat el tipus de dormició per a molts gèneres i espècies d’aquesta família, fet que dificulta l’establiment d’una possible connexió entre la distribució de vitamina E i l’aparició i adquisició de diferents tipus de dormició. Per tant, mentre que l’acumulació de tocotrienols és un tret conservat en les llavors de la família *Arecaceae*, la capacitat de sintetitzar tocoferols s’ha anat perdent diversos cops, variant la seva distribució en aquesta família durant l’evolució. Aquest fet, però, no va afectar a la viabilitat de les llavors. Altres característiques de les llavors, com són la seva mida, la relació embrió: endosperm, així com el tipus de dormició que posseeixen també han anat variant al llarg del temps. En concret, l’adquisició de dormició fisiològica és un tret que també s’ha anat guanyant i perdent diversos cops durant l’evolució (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). Així doncs, aquest patró evolutiu ha donat lloc a una gran diversitat de formes i estratègies per tal d’assegurar la supervivència i adaptació de les espècies.

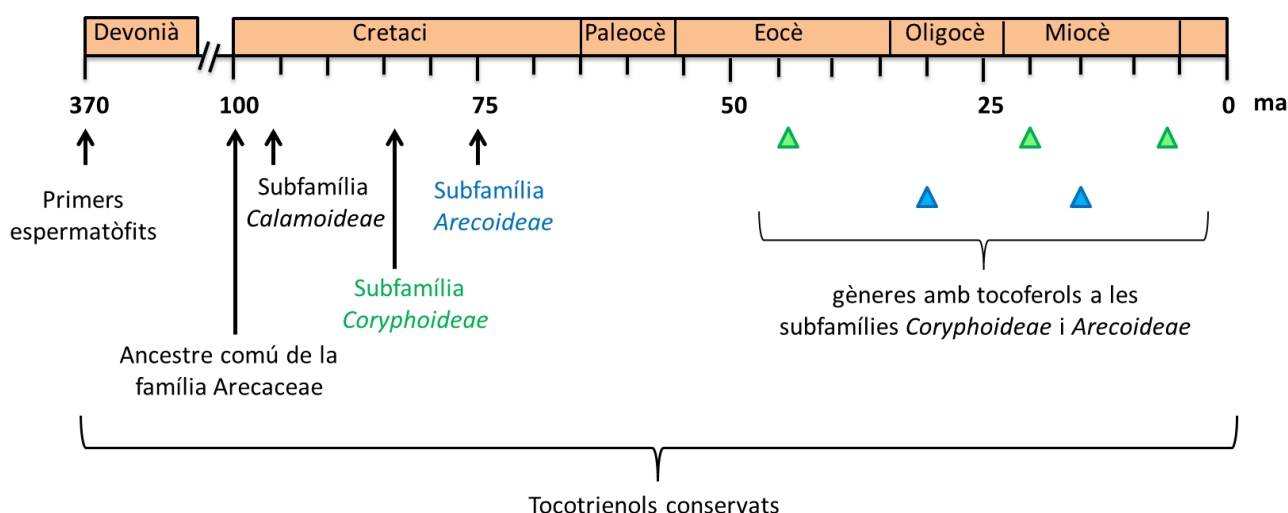


Figura 9. Línia temporal on es mostren els períodes on van aparèixer els primers espermatòfits així com l’ancestre comú i tres de les cinc subfamílies de la família *Arecaceae*. Els triangles indiquen l’aparició de certs gèneres amb tocoferols a les subfamílies *Coryphoideae* (color verd) i *Arecoideae* (color blau), indicant que aquest tret ha anat apareixent en diferents moments de l’evolució. *ma*= milions d’anys.

2. Acumulació de vitamina E en llavors: influència de l'edat de la planta mare i l'ambient

Molts processos fisiològics es troben influenciats per l'edat de la planta mare, així com l'ambient que aquesta experimenta. Entre ells es troben el grau de dormició i germinació de les llavors, els quals poden estar determinats per aquest dos paràmetres (Roach & Wulff, 1987; Gutterman, 2000; Walck *et al.*, 2011). Tot i que variacions en el grau de dormició o germinació entre diferents individus o poblacions poden ser d'origen genotípic, moltes d'elles també poden ser d'origen ambiental. Factors com la temperatura, el fotoperíode, la qualitat lumínica, el dèficit hídric, així com la nutrició mineral que afectin a la planta mare durant la inducció de la floració i formació de la llavor, poden afectar la dormició i germinació de les llavors (Gutterman, 2000). Un factor que manté la viabilitat de l'embrió durant la dormició i que influencia l'èxit de la germinació és el contingut de vitamina E de les llavors (Sattler *et al.*, 2004; Mène-Saffrané *et al.*, 2010). Si bé es coneixen els efectes de l'edat de la planta i de l'ambient sobre els canvis en els continguts de vitamina E en òrgans fotosintètics (Lushchak & Semchuk, 2012), es desconeix si l'edat i l'ambient que experimenta la planta mare poden influir en el contingut de vitamina E de les llavors, regulant la dormició i la germinació per a assegurar l'exitós establiment de la seva progènie.

Per tal d'estudiar l'efecte de l'edat sobre la producció, qualitat i contingut de vitamina E en llavors, es van analitzar individus de diferents edats de dues poblacions de *Cistus albidus*. Al **capítol 3** es va observar com en condicions ambientals controlades l'efecte de l'edat va ser un factor important pel que fa a la producció de llavors. Dels tres grups d'edats que es van estudiar (3, 8 i 13 anys), les plantes de 13 anys mostraren símptomes de senescència reproductiva (disminució de l'eficiència reproductora amb l'increment de l'edat). Aquestes plantes van mostrar una producció de flors un 40% més baixa respecte a les plantes de 8 anys; les quals van ser les que van produir més flors. Tot i que les plantes de 13 anys van produir més llavors per fruit, la producció de llavors per individu va ser un 13% menor respecte a les plantes de 8 anys. A més, la quantitat de llavors

avortades va ser molt més elevat a les plantes de 13 anys respecte els individus de 3 i 8 anys. Per tant, l'edat de la planta mare va afectar la producció de llavors. Malgrat la marcada senescència presentada per les plantes de 13 anys, les llavors dels tres grups d'edat van mostrar capacitats germinatives similars, disposant, per tant, de mecanismes compensatoris per tal d'assolir patrons reproductius equivalents. Les plantes de més edat van incrementar els nivells de vitamina E, especialment els d' α -tocoferol, component essencial per la germinació degut a la seva capacitat antioxidant (Sattler *et al.*, 2004, 2006). Així mateix, també van augmentar els nivells d'ABA, JA, IAA i SA. Tot i el desconeixement del complex mecanisme de comunicació hormonal creuada present en les plantes de 13 anys, augments en JA i SA (hormones associades a l'increment de la resistència a insectes i fongs, Davies, 2010), juntament amb increments en els nivells de vitamina E influenciats per l'edat de la planta mare, podrien actuar com a mecanisme compensatori. D'aquesta manera es manté un patró reproductiu similar a tots els individus de la població tot i el major número d'embrions avortats en plantes de més edat.

En canvi, en condicions naturals, els individus estudiats no van presentar símptomes de senescència a nivell d'organisme (en quant al percentatge de llavors avortades amb l'edat, **capítol 3**). En aquest cas, ni els nivells de vitamina E ni la viabilitat de les llavors es van veure afectats per l'edat de la planta mare, sent la biomassa del fruit, la biomassa de la llavor i la biomassa de la llavor per fruit, els factors que van influir en la viabilitat. En canvi, l'increment de l'edat es va relacionar amb la disminució del número de llavors produïdes per fruit i l'increment de la biomassa de les llavors. En aquestes condicions, tots els individus van mostrar una capacitat germinativa similar amb baixes quantitats de llavors avortades. Així doncs, aquestes plantes van adoptar un altre tipus de mecanisme compensatori per tal d'assolir patrons reproductius similars en tots els rangs d'edat estudiats.

Les diferents estratègies adoptades pels individus de *C. albidus* poden ser conseqüència de les seves respostes plàstiques als ambients on es desenvolupen, tot

i que diferències genètiques entre els individus d'ambdues poblacions no es poden descartar. Les plantes s'adapten a l'ambient en el que es desenvolupen i creixen ajustant la seva morfologia, fisiologia i reproducció (Valladares *et al.* 2007; Matesanz *et al.* 2010). Diferències en el tipus de sòl, disponibilitat de nutrients i d'aigua així com de temperatura i altitud, poden haver influenciat el creixement i la distribució de la biomassa dels individus d'ambdues poblacions. Els individus que es van desenvolupar en condicions ambientals controlades van mostrar 41 cops més biomassa aèria total, un percentatge de biomassa viva/biomassa aèria total 2,3 cops més elevat, així com una taxa de biomassa fotosintètica/no fotosintètica un 80% més baixa que els individus de la població natural (**capítol 4**). Tots els individus de la població natural van mostrar menys biomassa que els individus de 3 anys que creixien en un ambient controlat. Per tant, com a adaptació a les condicions ambientals més severes a les que es trobaven exposats (menor disponibilitat d'aigua i baixes temperatures durant l'hivern), els individus de la població natural van reduir la seva mida i van invertir menys recursos a la producció de biomassa aèria. A mesura que les plantes envellien, aquests paràmetres també van variar, mostrant elevades quantitats de necromassa. Així doncs, en condicions ambientals controlades on els recursos i les condicions ambientals no van ser tan dures, les plantes disposaven d'elevades quantitats de biomassa. A més, produïen moltes llavors, però a mesura que les plantes envellien el percentatge de llavors avortades incrementava. En aquestes condicions, l'edat de la planta va influenciar els nivells de vitamina E, així com els d'hormones, per tal de mantenir el mateix patró reproductiu a tots els rangs d'edat i compensar els efectes de la senescència reproductiva. En canvi, en condicions naturals, els individus van reduir la seva mida, destinant els seus recursos a formar poques llavors i fruits, però d'elevada viabilitat. En aquest cas, no es va observar un efecte de l'edat sobre el contingut de vitamina E, sinó que probablement l'efecte de l'ambient va variar els nivells de vitamina E en aquesta població.

L'efecte de l'ambient, i no l'edat de la planta mare, sembla estar influenciant el grau de dormició de les llavors de *C. albidus*. Al **capítol 4** es va observar que les

llavors de la població natural van presentar nivells més elevats de dormició degut a la seva baixa capacitat germinativa i elevada viabilitat, al contrari del que va succeir a la població en condicions ambientals controlades. Aquesta dormició no només es trobava controlada principalment per la impermeabilitat de la coberta típica de la família Cistaceae (dormició física), sinó també pels continguts d'ABA i de GA₄. Aquestes són les principals hormones que controlen la dormició i la germinació de les llavors (Kucera *et al.*, 2005; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Bicalho *et al.*, 2015). La taxa 1.180 cops més elevada d'ABA/GA₄ present a les llavors de la població natural indicaren un major grau de dormició, i conseqüentment, una menor capacitat germinativa, al contrari del que va succeir a la població de condicions ambientals controlades. No només els nivells hormonals van variar, sinó que les llavors de l'ambient natural contenien un 70% més d' α -tocoferol que les llavors de la població de condicions ambientals controlades. D'aquesta manera les llavors estaven protegides per alts nivells de vitamina E durant llargs períodes de dormició (Sattler *et al.*, 2004; Mène-Saffrané *et al.*, 2010). En canvi, sota condicions ambientals controlades, els nivells de vitamina E no van ser tan elevats degut a la baixa dormició que va presentar aquesta població. Així doncs, en condicions naturals, on els recursos són més limitants, l'ambient va determinar un major grau de dormició de les llavors influenciant els nivells hormonals i de vitamina E.

Per tant, només en condicions ambientals favorables es va observar la influència de l'edat de la planta sobre els nivells de vitamina E. L'ambient molt probablement va afectar al creixement dels individus d'ambdues poblacions, els quals van adoptar diferents estratègies reproductores. En condicions ambientals controlades, on els individus van adoptar una estratègia *r* (molta producció de llavors però de baixa qualitat), l'efecte de l'edat va ser més important que l'efecte de l'ambient en modular els nivells de vitamina E. Aquests van actuar com a mecanisme de control de la germinació per tal de compensar els efectes de la senescència reproductiva, i van contribuir al manteniment d'una elevada capacitat germinativa en els diferents rangs d'edat. En canvi, en condicions naturals on els

Discussió

individus adoptaren una estratègia *K* (poques llavors però d'elevada viabilitat), l'efecte de l'ambient va influenciar els nivells de vitamina E a les llavors, assegurant la supervivència de l'embrió durant els períodes de dormició fins a la posterior germinació en condicions favorables (**Figura 10**). Juntament amb un possible paper coordinat amb les hormones, la vitamina E és un bon mecanisme de control de la germinació i la dormició de les llavors en funció de l'entorn.

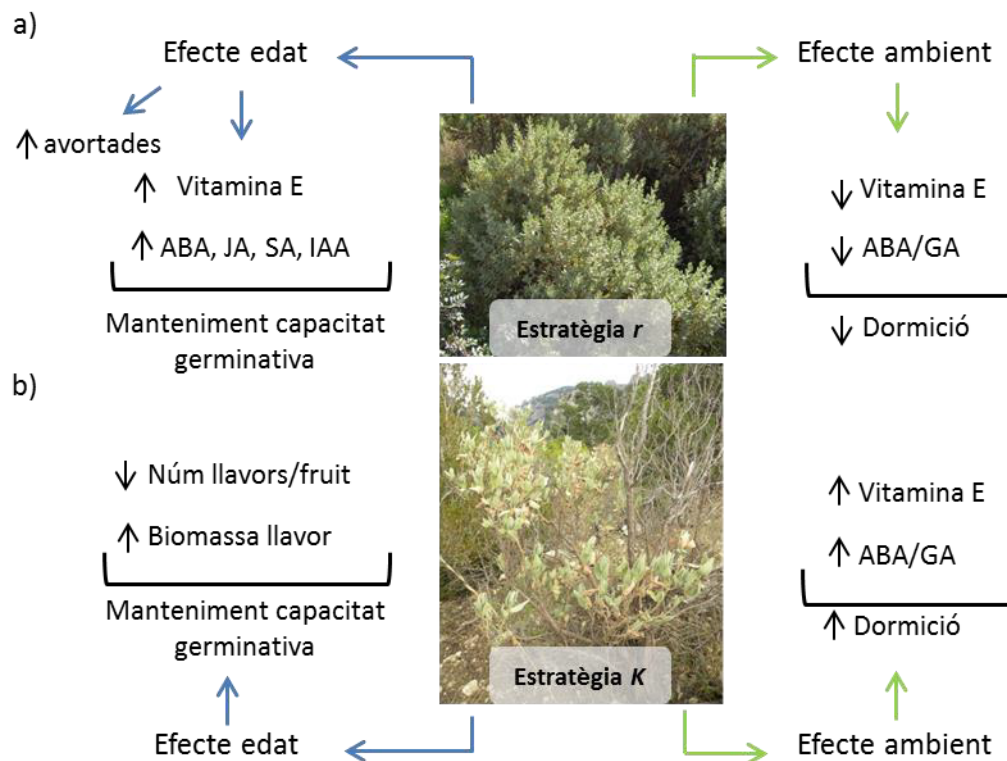


Figura 10. Efecte de l'edat i l'ambient sobre la composició de la vitamina E de les llavors de dues poblacions de *Cistus albidus*, així com els mecanismes compensatoris que desenvolupa cada població per a mantenir la mateixa capacitat germinativa en tots els individus. A) condicions ambientals controlades, b) condicions naturals.

Tot i que la capacitat d'acumular tocoferols a les llavors de la família Arecaceae no determina la distribució global de les espècies d'aquesta família, tal i com s'ha comentat a l'apartat 1 (**Distribució de la vitamina E en llavors al llarg de l'evolució**), podria ser que condicions ambientals contrastades en els diferents moments en els que van sorgir els gèneres d'aquesta família, com èpoques més fredes o de sequera, influenciessin el contingut de vitamina E d'aquestes llavors al

formar-se a la planta mare, variant així la seva capacitat d'acumular tocoferols al llarg de l'evolució.

3. Funció de la vitamina E en llavors

La vitamina E té diverses funcions, com ser un estabilitzador de membrana (Salgado *et al.*, 1993; Wang & Quinn, 2000), així com un important antioxidant; actuant química i físicament amb el $^1\text{O}_2$ (Fahrenholtz *et al.*, 1974), reduint la peroxidació lipídica i inhibint la seva propagació (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996). Si bé les funcions de la vitamina E a plantes han sigut estudiades principalment a teixits fotosintètics en diferents condicions d'estrès, envelliment o senescència (Havaux *et al.*, 2005; Lushchak & Semchuk, 2012; Morales *et al.*, 2013), només tres estudis en llavors d'*A. thaliana* han demostrat que els tocoferols són necessaris per a mantenir la longevitat, així com són essencials per a un correcte desenvolupament de les plàntules (Sattler *et al.*, 2004, 2006; Mène-Saffrané *et al.*, 2010). Tot i així, moltes llavors presenten alts continguts de tocotrienols, i evidències de les seves funcions són escasses (Falk *et al.*, 2004; Horvath *et al.*, 2006a).

3.1. Emmagatzematge i quiescència

Els mecanismes antioxidants són molt importants per tal de mantenir la viabilitat de les llavors durant l'emmagatzematge, fet d'especial importància als bancs de germoplasma per tal de conservar espècies durant llargs períodes de temps. La pèrdua de viabilitat, així com reduccions en la germinació, són fets associats a l'envelliment de les llavors (Bewley *et al.*, 2013; Wojtyla *et al.*, 2016). La teoria més acceptada com a causant d'aquest envelliment és la dels radicals lliures. Aquesta postula que la major part de les alteracions que es produeixen són degudes a l'acumulació de ROS, al dany oxidatiu provocat per aquestes i a la pèrdua de mecanismes antioxidants (Bailly *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2015). Les llavors seques (en anglès, *dry seeds*) tenen un contingut hídric molt baix, i el seu metabolisme es manté gairebé aturat, considerant que es troben en un estat quiescent. En aquestes llavors, així com durant el seu emmagatzematge, les ROS

són molt probablement el resultat de processos no enzimàtics, com la peroxidació lipídica i les reaccions d'Amadori i Maillard (Bewley *et al.*, 2013). Aquestes són un conjunt complex de reaccions no enzimàtiques que tenen lloc després d'una reacció inicial entre grups carbonil i amino (Murthy & Sun, 2000). Els productes resultants tant de la hidròlisi de sucres com de la peroxidació lipídica poden iniciar les reaccions d'Amadori i Maillard, les quals degraden de manera no enzimàtica proteïnes i ADN. Per tant, totes aquestes reaccions contribueixen al deteriorament de les llavors (Murthy & Sun, 2000; Colville *et al.*, 2012). L'acumulació incontrolada de ROS provoca una sèrie de processos associats a l'envelliment de les llavors, com poden ser canvis en els lípids de membrana; incrementant la seva permeabilitat i afavorint la pèrdua d'electròlits; així com oxidacions de proteïnes i àcids nucleics (El-Maarouf-Bouteau & Bailly, 2008; Bewley *et al.*, 2013; Wojtyla *et al.*, 2016). Els antioxidants tenen un paper clau en el manteniment de la longevitat i de la viabilitat de les llavors. Aquests fan front als danys oxidatius provocats per l'acumulació de ROS i també eviten la seva propagació (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996). Si bé la funció dels tocoferols esdevé essencial a les llavors d'*A. thaliana* per al seu emmagatzematge i envelliment (Sattler *et al.*, 2004; Mène-Saffrané *et al.*, 2010), no hi ha cap evidència del paper protector dels tocotrienols.

Al **capítol 1**, a nivell de llavor sencera, es va observar que les llavors de la família *Arecaceae* acumulaven principalment tocotrienols envers tocoferols. Aquest fet va suggerir que els tocoferols podrien no ser indispensables per protegir aquestes llavors del dany oxidatiu, i que els tocotrienols podrien ser antioxidants eficients a l'hora de disminuir la producció de ROS durant períodes de quiescència i emmagatzematge (**Figura 12**). La funció antioxidant dels tocotrienols s'havia observat prèviament en l'estudi dut a terme per Matringe *et al.* (2008) en plantes transgèniques de tabac. En aquest estudi es va observar que els tocotrienols protegien els lípids de membrana de les fulles en condicions d'estrès per alta intensitat lumínica i fred. Per tant, els tocotrienols poden substituir la funció antioxidant dels tocoferols tant en fulles (Matringe *et al.* 2008) com en llavors. El

paper antioxidant dels tocotrienols es va observar al **capítol 2**, en concret a les llavors quiescents de *C. humilis* var. *humilis*. Aquestes van acumular gairebé un 100% de tocotrienols i van mostrar nivells no quantificables (traces) de tocoferols. Després d'un any d'emmagatzematge a 4°C i fosc, els tocotrienols molt probablement van ajudar a mantenir estables els nivells de MDA (indicadors de peroxidació lipídica), així com la viabilitat de les llavors. A més, gràcies almenys en part a la capacitat antioxidant dels tocotrienols, es demostra en aquest estudi que l'emmagatzematge a 4°C durant un any és una forma adequada de mantenir la viabilitat de les llavors de *C. humilis* var. *humilis*, afavorint la conservació d'aquesta espècie de gran importància ecològica.

Tot i la principal acumulació de tocotrienols en llavors de la família Arecaceae, l'acumulació de vitamina E així com dels seus homòlegs en diferents parts de llavors quiescents va variar segons les espècies analitzades (**capítol 1**). Els embrions acumulaven una gran quantitat de vitamina E, indicant que aquests necessiten més protecció antioxidant que l'endosperm o la coberta per tal de fer front a les ROS i mantenir la seva viabilitat i capacitat germinativa. La predominança de l'homòleg α , el qual té la major capacitat antioxidant dels quatre homòlegs possibles de tocoferols i tocotrienols (α , β , γ i δ , Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996), va corroborar la necessitat d'aquesta capacitat antioxidant, sent aquest fet més important que la disposició de dos dobles enllaços a la cua poliprenil. En canvi, l'acumulació de vitamina E va variar entre l'endosperm i la coberta segons les espècies analitzades. Mentre que els tocotrienols van ser els components principalment acumulats als endosperms, les cobertes van acumular tant tocoferols com tocotrienols. Distribucions similars a aquestes s'han observat en llavors d'*Hordeum vulgare* (Falk *et al.*, 2004), *Vitis vinifera* (Horvath *et al.*, 2006b) i *Avena sativa* (Gutierrez-Gonzalez *et al.* 2013). Malgrat que en aquests casos l' α -tocoferol va ser el component majoritari de l'embrió, els tocotrienols, i en concret l' α -tocotrienol, s'acumulaven de forma majoritària a l'endosperm.

Si bé tant en el **capítol 1** com en el **capítol 2** es va estudiar la distribució i acumulació de la vitamina E en llavors ja desenvolupades i madures, l'acumulació

de vitamina E, tant a nivell de llavor sencera com en diferents teixits, es fa palesa durant el seu desenvolupament. Durant la dessecació de les llavors ortodoxes, la vitamina E, juntament amb proteïnes i sucres, s'acumula per tal d'ancorar-se a les membranes i mantenir la seva integritat en el pas de l'estat cristal·lí cap a l'estat vidriós (Bewley *et al.*, 2013). Així mateix, durant el desenvolupament de les llavors de *V. vinifera*, els nivells de vitamina E augmenten (Horvath *et al.*, 2006b). Aquest increment dels nivells de vitamina E sembla estar relacionat amb l'augment dels nivells de tocotrienols a l'endosperm a causa de l'acumulació de les reserves lipídiques (Horvath *et al.*, 2006b), funció que també va ser proposada en l'estudi realitzat a *H. vulgare* (Falk *et al.*, 2004).

Les llavors de palmera acumulen les seves reserves en forma de lípids principalment a l'endosperm, teixit considerat fonamentalment de reserva degut als pocs orgànuls que conté, tal i com s'observa en llavors d'*Acrocomia aculeata* (Moura *et al.* 2010), *Phoenix dactylifera* (DeMason *et al.*, 1983) i *Washingtonia filifera* (DeMason 1986). L'endosperm acumula grans quantitats de cossos lipídics d'entre 0,2 i 6 µm de diàmetre depenent de les espècies. Aquests no són més que un conjunt de triacilglicèrids rodejats d'una monocapa de fosfolípids provinent del reticle endoplasmàtic i unes proteïnes anomenades oleosines. Aquestes tenen la funció d'estabilitzar la membrana que rodeja al cos lipídic, i durant la dessecació i la imbibició, eviten que els cossos lipídics tinguin coalescència (Bewley *et al.*, 2013). Els PUFA de la membrana d'aquests cossos lipídics també són susceptibles a la peroxidació lipídica, així doncs, també requereixen de protecció antioxidant. Tant tocoferols com tocotrienols s'han detectat als cossos lipídics d'*A. sativa* (White *et al.* 2006), i tocoferols als d'*Helianthus annuus* (Fisk *et al.*, 2006). Així doncs, els tocotrienols que es troben a l'endosperm de la família Arecaceae protegeixen als PUFA dels cossos lipídics de la peroxidació lipídica. D'aquesta manera es protegeixen les substàncies de reserva necessàries per al posterior creixement de l'embrió.

Però, com pot ser que si la vitamina E es sintetitza al plastidi es trobi també als cossos lipídics provinents del reticle endoplasmàtic? El mecanisme més probable

es troba relacionat amb la hipòtesi desenvolupada per Mehrshahi *et al.* (2014), on proposen una complementació transorgànul que es pot dur a terme molt probablement mitjançant una hemifusió de membrana entre els plastidis i el reticle endoplasmàtic. A partir d'aquesta hemifusió transmembrana i difusions laterals de lípids, els tocotrienols podrien arribar als cossos lipídics i actuar no només com a antioxidants, sinó també com a estabilitzadors de membrana juntament amb les oleosines (**Figura 11**).

Tal i com s'ha comentat, els embrions requereixen de molta capacitat antioxidant. Tant a l'embrió com a l'endosperm, la vitamina E protegeix els cossos lipídics de la peroxidació lipídica, però a l'embrió també pot protegir als PUFA dels proplastids, els quals es diferenciaran en cloroplasts un cop comenci el desenvolupament de la plàntula (Pogson & Albrecht, 2011).

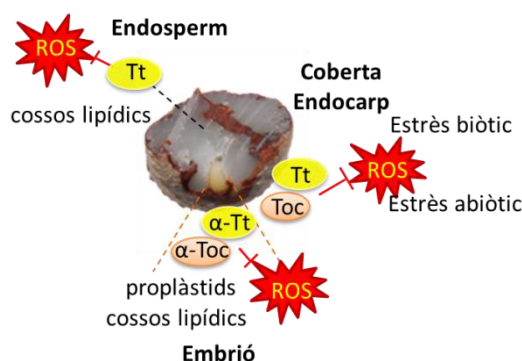


Figura 11. Funcions antioxidants de la vitamina E en diferents parts de la llavor quiescent de *C. humilis*. ROS, espècies reactives de l'oxigen; Tt, tocotrienol, Toc, tocoferol.

En canvi, encara es desconeix la funció dels tocoferols i dels tocotrienols a les cobertes de les llavors, les quals provenen dels integuments de l'òvul de la planta mare (Linkies *et al.*, 2010). Les cobertes són importants per tal de mantenir una elevada longevitat de les llavors en estat quiescent i durant l'emmagatzematge. A més, els flavonoides que contenen protegeixen a les llavors contra els estressos biòtics, com l'atac d'insectes o fongs (Rajjou & Debeaujon, 2008). En el cas específic de les palmeres, la coberta es troba en estret contacte amb l'endocarp

(Baskin & Baskin, 2014), i la vitamina E d'aquesta part de la llavor i del fruit podria estar protegint contra les ROS provocades per estressos biòtics o abiòtics. D'aquesta manera s'afavoreix el manteniment de la viabilitat de les llavors. Sembla ser, doncs, que la diferent acumulació tissular de la vitamina E en llavors quiescents i emmagatzemades està relacionada amb les funcions que realitzen a les diferents parts de la llavor per tal de mantenir la seva viabilitat. A la seva vegada, aquestes funcions semblen ser específiques de llavors i són diferents a les que es duen a terme a fulles.

3.2. Dormició i germinació

L'acumulació diferencial de vitamina E en les llavors sembla estar lligada amb l'habilitat que tenen, o no, de tolerar la dessecació i d'entrar en dormició, característiques que es troben molt lligades entre si. Les espècies que presenten dormició, característica típica de les llavors ortodoxes tolerants a la dessecació, requereixen de més capacitat antioxidant respecte a les llavors que presenten dormició intermèdia o no presenten dormició (característica típica de llavors recalcitrants, però que també pot donar-se en llavors ortodoxes), per tal de mantenir la viabilitat i longevitat de les llavors (Bewley *et al.*, 2013). A més, la dessecació i la posterior hidratació de les llavors són processos que generen elevades quantitat de ROS (Bewley *et al.*, 2013). Tenint en compte la quantitat de vitamina E acumulada preferencialment a cada espècie, al **capítol 1** es va observar que *Archontophoenix alexandrae* (espècie recalcitrant, Martins *et al.*, 2003), *Dyopsis leptocheilos* (espècie possiblement recalcitrant o amb dormició intermèdia, Pimenta, 2009), *Roystonea regia* i *Elaeis guineensis* (espècies amb dormició intermèdia, Orozco-Segovia *et al.*, 2003) contingueren 2,4; 4,2; 9,3 i 2,6 µg/g llavor de vitamina E total, respectivament. Aquests continguts de vitamina E van ser menors que els que van presentar les llavors de *Dyopsis lutescens*, *Acrocomia aculeata*, *Chamaerops humilis* var. *cerifera*, *Washingtonia filifera*, *Butia eriospatha* i *Wodetya bifurcata* (espècies amb concentracions de 85,7; 57,8, 48,3; 43,9; 27,2 i 18,1 µg/g llavor de vitamina E total, respectivament), les quals són llavors ortodoxes amb dormició (Dickie *et al.*, 1992; González-Benito *et al.*, 2006;

Yang *et al.*, 2007; González *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2012). No obstant, *Areca triandra*, espècie considerada ortodoxa i amb dormició, contenia 6,5 µg/g llavor de vitamina E total, no seguint aquest patró que relaciona el grau de dormició amb l'acumulació de vitamina E en llavors d'Arecaceae.

La importància de la vitamina E durant la dormició també es va observar al **capítol 4**. Les llavors de *C. albidus* de la població natural (que presentaven un elevat grau de dormició fisiològica) van mostrar un 70% més d'α-tocoferol que les llavors provinents de la població en condicions controlades, les quals no van mostrar un grau de dormició tan elevat. Per tant, la vitamina E té una funció molt important durant la dormició, acumulant-se en elevades quantitats en les espècies amb un major grau de dormició per tal de protegir a les llavors durant llargs períodes de temps i mantenir la seva viabilitat (Sattler *et al.*, 2004), funció que és exercida tant a espècies monocotiledònies com dicotiledònies. Degut a que espècies com *C. humilis* var. *cerifera* i *B. eriospatha* presenten dormició (Dickie *et al.*, 1992; González-Benito *et al.*, 2006) i no van acumular tocoferols en estat quiescent, els resultats suggereixen que els tocotrienols podrien estar exercint una funció antioxidant per tal de mantenir la viabilitat de l'embrió durant la dormició de llavors de la família Arecaceae (**capítol 1**), fet que es va observar més clarament al **capítol 2 (Figura 12)**.

Si bé els tocotrienols tenen una funció antioxidant durant l'emmagatzematge, quiescència i dormició de les llavors, els tocoferols exerceixen aquesta funció durant la germinació de *C. humilis* var. *humilis* (**capítol 2**). Durant la germinació d'aquesta espècie es va produir un increment de MDA entre les fases 0 i I. Aquest fet es troba associat a l'explosió oxidativa que es genera com a conseqüència de la major disponibilitat d'oxigen a causa del trencament de la coberta i de l'opercle per part de l'embrió (Bewley *et al.*, 2013), afavorint processos oxidatius. No obstant, aquest increment va ser transitori ja que els nivells de MDA s'estabilitzaren i disminuïren fins a nivells similars als inicials a les fases III i IV. Mentre que els nivells de tocotrienols es van mantenir estables o fins i tot van disminuir, la

Discussió

reducció dels nivells de MDA es va correlacionar amb la síntesi *de novo* de tocoferols. Així doncs, els tocoferols, i no els tocotrienols, semblaren ser els responsables de la protecció contra la peroxidació lipídica durant la germinació (Figura 12).

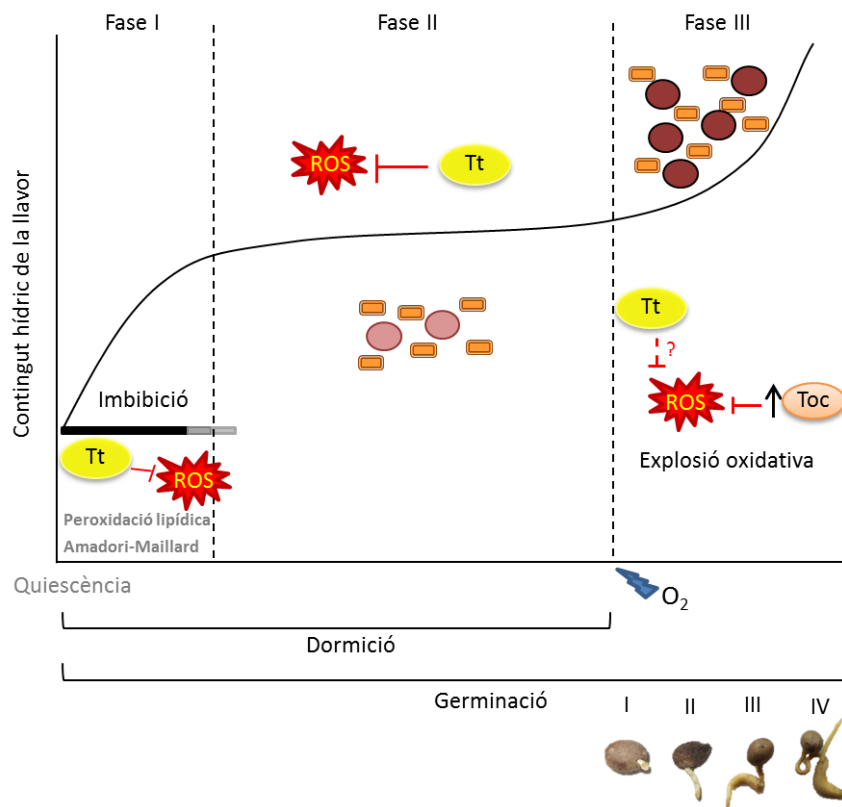


Figura 12. Esquema representatiu de la funció antioxidant dels tocotrienols i tocoferols durant la quiescència, dormició i germinació de *C. humilis* var. *humilis*. S'observa l'increment de mitocondris i glioxisomes a mesura que avança la germinació. A la fase II s'observen glioxisomes no del tot diferenciats. ROS, espècies reactives de l'oxigen; Tt, tocotrienol; Toc, tocoferol.

Aquest resultat, tot i contrastar amb la funció antioxidant exercida pels tocotrienols a les etapes prèvies a la germinació, concorden amb estudis realitzats a *A. thaliana*, on es va demostrar que els tocoferols són components essencials per a protegir als PUFA del efectes deleteris de les ROS durant la germinació i creixement de la plàntula (Sattler *et al.*, 2004, 2006; Mène-Saffrané *et al.*, 2010). El paper protector dels tocoferols a *C. humilis* var. *humilis* (capítol 2) s'estaria exercint a l'embrió, l'única part de la llavor que va acumular tocoferols. Tot i així,

no es pot descartar la contribució relativa dels tocotrienols en la protecció contra la peroxidació lipídica, ja que aquests també es trobaven en elevades quantitats a l'embrió, així com una interacció entre tocoferols i tocotrienols.

A l'estudi realitzat a les llavors de *C. albidus* provinents de la població en condicions ambientals controlades (**capítol 3**), també es va observar un possible paper conjunt de la funció antioxidant exercida tant pels tocoferols com tocotrienols. Si bé els nivells d' α -tocoferol van ser els més elevats, tant les formes α - i β -tocoferol i α - i β -tocotrienol van augmentar a les llavors de plantes que mostraven símptomes de senescència. D'aquesta manera van mantenir la viabilitat i el vigor, assolint la mateixa capacitat germinativa que les llavors provinents d'individus més joves.

4. Regulació de la biosíntesi de vitamina E

Tal i com s'ha observat al **capítol 2**, durant la germinació de *C. humilis* var. *humilis* es va produir una síntesi *de novo* de tocoferols. Per contra, els nivells de tocotrienols es van mantenir estables o van disminuir en el cas de l' α -tocotrienol. A mesura que avança la germinació, les variacions en el contingut de vitamina E suggereixen canvis en la regulació de la seva síntesi. Degut als canvis dels nivells d'aquest antioxidant, es va estudiar el possible paper hormonal i redox sobre la transcripció de gens implicats en la via de síntesi de la vitamina E. Els resultats obtinguts es mostren a l'**apèndix I**, i la metodologia emprada es troba recollida a l'**apèndix II**.

4.1. Regulació transcripcional

L'expressió relativa de la *TAT*, *HPT*, *HGGT*, *TC* i γ -*TMT* es va analitzar durant la germinació de *C. humilis* var. *humilis*. Els canvis d'expressió gènica són bons indicadors de la quantitat relativa d'una proteïna en un moment determinat, sempre tenint en compte que altres factors (com poden ser les modificacions post-transcripcionals o limitacions a nivell ribosomal) poden afectar a la quantitat final d'aquella proteïna i la seva activitat. Així doncs, les variacions observades en els

nivells d'expressió juntament amb els canvis en els nivells de vitamina E, suggereixen una regulació transcripcional de la síntesi de vitamina E. Mentre que els nivells de *TAT* i *HPT* augmentaren, els nivells d'*HGGT* i γ -*TMT* disminuïren a mesura que avançava la germinació. En canvi, els nivells de *TC* es van mantenir estables (**Taula 1**).

La tirosina és un aminoàcid que actua com a regulador de la via de l'àcid siquímic, inhibint l'arogenat deshidrogenasa (enzim necessari per al pas d'arogenat a tirosina), i la corismat mutasa (enzim necessari per a convertir corismat a prefenat, **Figura 13**, DellaPenna, 2005; Zhang *et al.*, 2013). Mitjançant aquesta regulació s'inhibeix la via metabòlica i s'impedeix la formació d'HGA, un dels dos substrats indispensables per a la síntesi de vitamina E (Hunter & Cahoon, 2007). Així doncs, l'increment dels nivells d'expressió de la *TAT* augmentaria el flux de la ruta biosintètica cap a la síntesi d'HPP, el qual posteriorment seria convertit a HGA, afavorint la síntesi de vitamina E.

Les prenilttransferases que es troben presents a les cèl·lules vegetals poden dictar, per si mateixes, si es sintetitzen tocoferols o tocotrienols (Hunter & Cahoon, 2007). D'una banda, l'augment dels nivells d'*HPT* suggereix un increment de la síntesi de tocoferols. A *A. thaliana* s'ha observat que l'activitat d'*HPT* és limitant, i que la seva sobreexpressió incrementa no només la seva activitat, sinó també els nivells de tocoferols totals a fulles i llavors (Collakova & DellaPenna, 2003b). D'altra banda, la disminució dels nivells d'*HGGT* suggereix una disminució en la síntesi de tocotrienols. L'expressió ectòpica d'*HGGT* en fulles d'*A. thaliana*, espècie que no conté aquesta prenilttransferasa de manera natural, provoca la síntesi de tocotrienols envers tocoferols a la vegada que incrementa el contingut total de vitamina E (Cahoon *et al.*, 2003). A més, els canvis en els nivells d'expressió d'*HPT* i d'*HGGT* semblen estar relacionats amb la seva localització a la llavor. Mentre que l'*HPT* es troba preferentment a l'embrió (Yang *et al.* 2011), l'*HGGT* es localitza majoritàriament a l'endosperm (Wu *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2011).

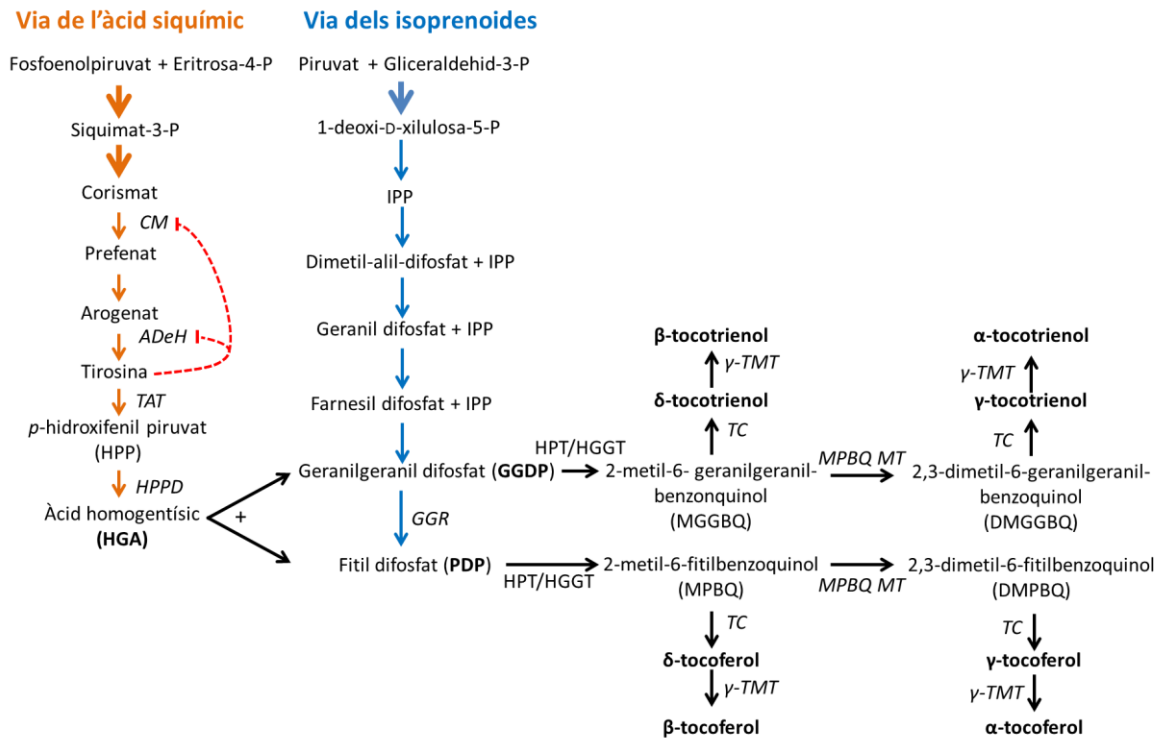


Figura 13. Ruta de síntesi de vitamina E i dels seus precursors. S'observen els punts de regulació negativa exercida per la tirosina. *CM*, corismat mutasa; *ADeH*, arogenat deshidrogenasa, *TAT*; tirosina aminotransferasa, *HPPD*, hidroxifenilpiruvat dioxigenasa; *IPP*, isopentenil; *GGR*, geranilgeranil reductasa; *HPT*, homogentisat prenilttransferasa; *HGGT*, homogentisat geranilgeranil transferasa; *MPBQ MT*, 2-metil-6-fitilbenzoquinol metilttransferasa; *TC*, tocoferol ciclasa, *γ-TMT*, *γ*- tocoferol metilttransferasa.

A mesura que avança la germinació i l'eix embrionari es va desenvolupant, la disminució dels nivells d'expressió d'*HGGT* poden estar relacionats amb la degradació de l'endosperm a mesura que l'*haustorium* va creixent. D'aquesta manera, l'increment dels nivells d'*HPT*, i per tant, de tocoferols a nivell de llavor sencera, es trobarien relacionats amb el creixement de l'embrió. Tot i així, ambdues prenilttransferases també s'expressen en diferents quantitats tant a l'endosperm com a l'embrió (Yang *et al.* 2011). Malgrat només tenir entre un 40 i un 50% d'identitat en les seqüències d'aminoàcids, l'*HPT* i l'*HGGT* disposen d'una K_M similar tant per a GGDP com per a PDP, substrats per a la formació de tocotrienols i tocoferols, respectivament (Cahoon *et al.*, 2003; Sadre *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2011). Per aquest motiu ambdues prenilttransferases poden formar tant tocoferols como tocotrienols (Sadre *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2011). Tot i la seva

localització tissular específica, l'HPT podria estar sintetitzant tocotrienols degut a les altes concentracions de tocotrienols presents a l'embrió.

La síntesi dels diferents homòlegs de tocoferols i tocotrienols es duu a terme mitjançant els mateixos enzims (**Figura 13**, Hunter & Cahoon, 2007; Mène-Saffrané & DellaPenna, 2010). La disminució dels nivells de la γ -TMT podria explicar la disminució dels nivells d' α -tocotrienol, l'homòleg de vitamina E amb les concentracions més elevades en aquestes llavors. El fet que tots els homòlegs de vitamina E es sintetitzin durant la germinació d'aquesta espècie demostra que tota la ruta biosintètica es troba activa. L'enzim TMT té una baixa activitat a llavors de moltes espècies, raó per la qual contenen principalment homòlegs γ envers homòlegs α de vitamina E (Shintani & DellaPenna, 1998). Aquest no és el cas de *C. humilis* var. *humilis*, ja que aquestes llavors contenen principalment α -tocotrienol. Aquest fet també es va observar a les llavors de moltes espècies de la família Arecaceae (**capítol 1**) així com a les llavors de *C. albidus* (**capítols 3 i 4**). Per tant, l'acumulació de tocotrienols, i només de tocoferols durant la germinació, sembla estar associada en el cas de *C. humilis* var. *humilis* als augments de *TAT* i d'*HPT*.

4.2. Regulació hormonal

Durant la germinació es van observar variacions dels nivells hormonaals. Mentre que els nivells de GA₄, àcid 1-aminociclopropà-1-carboxílic (ACC) i JA augmentaren, l'àcid indol-3-acètic (IAA) i el 2-isopentenil adenina (2-iP) van disminuir les seves concentracions. En canvi, ni l'ABA, el SA ni la resta de gibberel·lines i citocinines analitzades van variar les seves concentracions al llarg de la germinació de *C. humilis* var. *humilis* (**Taula 1**). Els increments de GA₄ i JA podrien estar regulant l'increment dels nivells d'expressió de la *TAT* i de l'*HPT*. Aquests resultats concorden amb els resultats obtinguts prèviament als estudis realitzats per Du *et al.* (2015), els quals van observar que l'aplicació exògena de GA₃ augmentava la producció de tocoferols a les llavors quiescents d'*A. thaliana* i *Brassica napus*. A més Sandorf & Holländer-Czytko (2002) van observar que el

JA és requerit per a la regulació positiva de la *TAT* a *A. thaliana*. Increments dels nivells de JA a la vegada que augmentaven els nivells de vitamina E es van observar a les llavors de *C. albidus* de la població que creixia en condicions ambientals controlades (**capítol 3**), podent indicar una regulació hormonal de la síntesi de vitamina E per part del JA a aquestes llavors. Evidències de la funció de l'etilè sobre la regulació de la síntesi de vitamina E es troben a diversos estudis (Falk *et al.*, 2002; Cela *et al.*, 2009b; Singh *et al.*, 2011; Asensi-Fabado *et al.*, 2012). Tot i els augments d'ACC, són necessàries mesures dels nivells d'etilè per a poder establir una relació entre la seva concentració i les variacions dels nivells transcripcionals d'aquests gens.

Expressió gènica				
<i>TAT</i>	<i>HPT</i>	<i>HGGT</i>	<i>TC</i>	<i>γ-TMT</i>
Nivells de vitamina E				
α -toc	β -toc	γ -toc	δ -toc	
α -tt	β -tt	γ -tt	δ -tt	
Nivells hormonals i de H ₂ O ₂				
ABA	GA ₄	ACC	JA	
IAA	2-iP	SA	H ₂ O ₂	

Taula 1. Resum dels nivells relatius d'expressió gènica, així com dels nivells hormonals i de H₂O₂ durant la germinació de *C. humilis* var. *humilis*. Els augments significatius es mostren en verd, les disminucions en vermell i en gris es mostren els valors que es van mantenir estables.

Els canvis hormonals observats durant la germinació suggereixen no només una regulació transcripcional de la síntesi de vitamina E, sinó també una regulació de la germinació. El paper de la GA₄ en estimular la germinació s'ha observat a *A. thaliana* (Ogawa *et al.*, 2013), en algunes monocotiledònies (Yamaguchi 2008), així com a la palmera *Acrocomia aculeata* (Ribeiro *et al.* 2015). Les GAs contraresten els efectes de l'ABA (Kucera *et al.*, 2005), el qual es troba implicat en la inducció i manteniment de la dormició (Lee *et al.*, 2010; Nambara *et al.*, 2010) i

inhibeixen la germinació (Kucera *et al.*, 2005; Miransari & Smith, 2014). Tot i així, és la relació entre ABA i GAs el que realment determina l'habilitat per a germinar o mantenir la dormició, no només a través d'un balanç entre la síntesi i el catabolisme d'aquestes dues hormones, sinó també a través dels canvis en la seva sensibilitat (Kucera *et al.*, 2005; Cadman *et al.*, 2006; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Finkelstein *et al.*, 2008). La importància d'aquest balanç s'ha observat en la germinació d'altres palmeres, com *A. aculeata* (Bicalho *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2015) i *E. guineensis* (Jiménez *et al.*, 2008), però no s'ha observat durant la germinació de *C. humilis* var. *humilis*. L'increment dels nivells d'ACC podrien estimular la germinació, ja que en algunes espècies, com a *A. thaliana*, tractaments amb ACC han revertit parcialment els efectes de l'ABA (Ghassemian *et al.*, 2010). Per altra banda, el paper del JA en la germinació és controvertit. Mentre que en algunes espècies estimula la germinació (Bogatek *et al.* 2002; Yildiz *et al.* 2008), en d'altres, la inhibeix (Dave *et al.* 2011). En el cas específic de la palmera *A. aculeata*, increments en els nivells de JA semblen estar associats al creixement de l'eix vegetatiu (Ribeiro *et al.*, 2015).

Per tant, els augments de GA₄ i JA semblen estar regulant la transcripció dels gens implicats en la biosíntesi de vitamina E, alhora que també semblen estar associats a la regulació de la germinació (**Figura 14**). El paper de l'etilè sobre la síntesi de vitamina E durant la germinació d'aquesta espècie seria interessant d'estudiar degut als increments observats als nivells d'ACC, precursor immediat de l'etilè. Una regulació conjunta per part del JA i l'etilè sobre la síntesi d'aquest antioxidant va ser observada a l'estudi realitzat per Asensi-Fabado *et al.* (2002) en fulles de plantes mutants d'etilè d'*A. thaliana* sota condicions d'estrès salí. Tot i així, no es pot excloure una regulació hormonal sobre altres components de la ruta, així com que altres hormones puguin estar exercint aquest paper regulador en altres estats fisiològics de les llavors. Un exemple podria ser l'ABA, el qual genera resistència a la dessecació a les llavors, en part, induint l'acumulació d'antioxidants (Bewley *et al.*, 2013). Així, podria ser que l'ABA o altres

hormones, també tinguessin un paper regulador sobre la síntesi de vitamina E en llavors.

4.3. Regulació redox

En un inici, l'acumulació de ROS era considerada exclusivament com un símptoma d'estrès oxidatiu que originava processos deleteris que podien donar lloc a la mort cel·lular. No obstant, cada cop hi ha més evidències sobre les seves funcions com a molècules senyalitzadores durant el creixement, desenvolupament, mort cel·lular programada, respostes a estressos biòtics i abiòtics, dormició i germinació (Gechev *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2014).

Durant la germinació de *C. humilis* var. *humilis* els nivells de H₂O₂ van augmentar a la vegada que es va iniciar la síntesi *de novo* de tocoferols (**Taula 1**), suggerint un efecte senyalitzador d'aquesta ROS sobre la síntesi de vitamina E. L'increment dels nivells de H₂O₂ pot estar regulant l'augment dels nivells d'expressió de la *TAT* i de l'*HPT*. La inducció dels nivells d'antioxidants per part del H₂O₂ ja s'havia observat en l'estudi realitzat per Gechev *et al.* (2002). En aquest estudi, l'aplicació exògena de H₂O₂ a fulles de tabac va provocar un increment de l'activitat i dels nivells de catalasa, ascorbat peroxidasa i glutatió. En l'estudi realitzat per Arrom & Munné-Bosch (2010) ja es va suggerir una possible inducció dels nivells de tocoferols com a conseqüència dels augments de ROS durant la senescència en tèmals de *Lilium*. Tot i així, els resultats presentats a **l'apèndix I** són el primer estudi que suggereix una regulació redox sobre la transcripció de la síntesi de vitamina E durant la germinació de llavors d'una monocotiledònia. En aquest cas, l'increment de H₂O₂ també podria estar regulant l'augment de JA provinent dels hidroperòxids lipídics generats com a conseqüència de la peroxidació lipídica (Schaller 2001; Wasternack & Hause, 2013), així com també podria estar regulant els increments de GA₄ i ACC (**Figura 14**). Així doncs, tant si el H₂O₂ actua per si mateix o a través de la modulació dels nivells hormonals, la regulació transcripcional de la vitamina E i l'increment dels

tocoferols es produeix per tal de fer front als estressos que es generen durant la germinació.

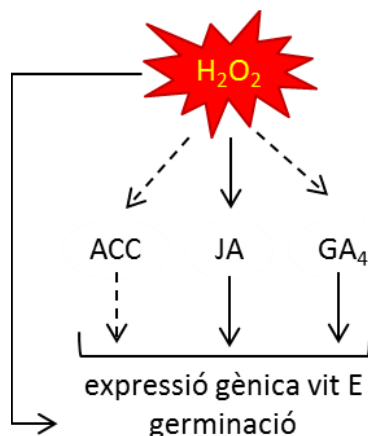


Figura 14. Regulació hormonal i redox sobre els nivells d'expressió gènica de vitamina E i la germinació de *C. humilis* var. *humilis*.

L'augment dels nivells de H_2O_2 sembla estar associat a la regulació de la germinació. Les ROS poden realitzar canvis en l'estat redox de diverses proteïnes per tal de promoure la degradació de proteïnes de reserva (El-Maarouf-Bouteau & Bailly, 2008, Colville & Kranner, 2010; Rajjou *et al.*, 2012) i poden disminuir la dormició mitjançant oxidacions irreversibles a proteïnes (El-Maarouf-Bouteau & Bailly, 2008). També afavoreixen la germinació promovent l'hidrolització de la coberta i de l'endosperm (El-Maarouf-Bouteau & Bailly, 2008; Kranner *et al.*, 2010; Whitaker *et al.*, 2010; Lariguet *et al.*, 2013) i, de manera indirecta, poden estar afectant la germinació mitjançant la protecció contra patògens (Schopfer, 2001; El-Maarouf-Bouteau & Bailly, 2008; Kranner *et al.*, 2010). Una altra forma de regular la germinació és mitjançant el seu paper coordinat amb les hormones. Els nivells de H_2O_2 poden modular el metabolisme de certes hormones; com ABA, GA, ZR, SA i JA; ja sigui mitjançant la reducció de la seva síntesi o incrementant el seu metabolisme (Liu *et al.*, 2010, Barba-Espín *et al.*, 2010, 2011; Bahin *et al.*, 2011). Així, el H_2O_2 pot estimular la germinació (Wang *et al.*, 1998; Meinhard *et al.*, 2002; Barba-Espín *et al.*, 2010; Ishibashi *et al.*, 2012) i pot disminuir la dormició (Oracz *et al.*, 2009; Bahin *et al.*, 2011). A més, l'acumulació de ROS durant la germinació disminueix els nivells de citocinines i d'auxines (Gidrol *et al.*,

1994, Barba-Espín *et al.*, 2011), fet que podria explicar perquè aquestes hormones disminueixen durant la germinació d'aquesta espècie. Tal i com succeeix a *A. aculeata*, el H₂O₂ sembla ser un requeriment per a la germinació relacionat amb la senyalització cel·lular (Bicalho *et al.* 2015). Per tant, l'augment dels nivells de H₂O₂ suggereix un paper regulador d'aquesta ROS, tant per a la síntesi de vitamina E com per la germinació a *C. humilis* var. *humilis*.

5. La vitamina E com a antioxidant i molècula reguladora en llavors

A *C. humilis* var. *humilis*, la vitamina E sembla estar actuant com a molècula reguladora, no només de la seva pròpia síntesi sinó també de la germinació. Gràcies a la seva funció antioxidant, la vitamina E controla els nivells de ROS i la peroxidació lipídica (Munné-Bosch & Alegre, 2002); evitant els possibles danys oxidatius que es generen durant la germinació. D'aquesta manera els nivells de ROS es mantenen dins d'un rang crític, l'esmentada finestra oxidativa definida per Bailly *et al.* (2008), evitant el seus efectes deleteris. Aquest fet es va observar al **capítol 2**, on es va produir una disminució dels nivells de MDA a mesura que avançava la germinació. Per tant, controlant els nivells de ROS, la vitamina E controla la seva transcripció i síntesi. A la seva vegada, mitjançant el control de la seva síntesi, la vitamina E podria exercir un efecte regulador sobre la germinació modulant els nivells hormonals i de ROS (**Figura 15**). Jiang *et al.* (2017) van suggerir que la vitamina E, en concret els tocoferols, poden estar modulant la germinació mitjançant la regulació de la via de senyalització d'ABA. No només la quantitat de vitamina E, sinó també la seva composició, pot exercir un paper regulador amb possibles funcions senyalitzadores. Exemples del paper dels tocoferols com a possible molècula senyalitzadora s'han observat als estudis realitzats per Sattler *et al.* (2006), els quals suggeriren una modulació de les respostes de defensa a través del control dels nivells de la peroxidació no lipídica. Així mateix, Cela *et al.* (2011) van suggerir una modulació de l'expressió dels nivells d'alguns gens relacionats amb la síntesi, percepció i senyalització d'etilè. A més, altres estudis suggereixen un paper senyalitzador de la vitamina E en la modulació de les respostes a estressos biòtics en condicions de sequera (Morales *et*

al. 2015), així com una regulació de la fotoprotecció i defenses químiques mitjançant la síntesi de jasmonats (Simancas & Munné-Bosch, 2015).

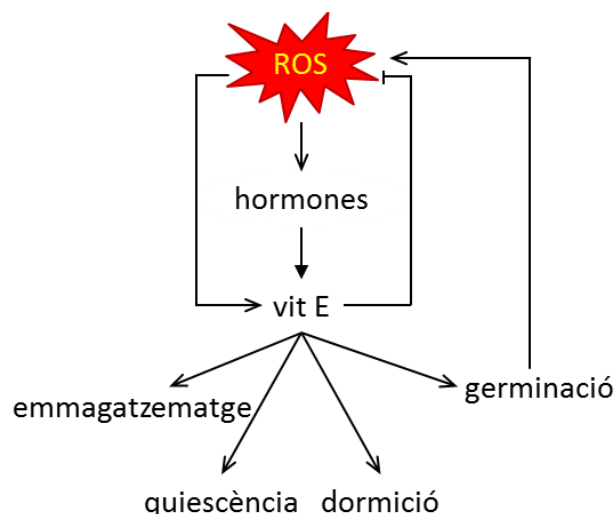


Figura 15. Paper antioxidant i regulador de la vitamina E sobre la seva síntesi i la germinació.

Així doncs, degut al seu paper dual (antioxidant i regulador), la vitamina E, i més concretament els tocoferols, són essencials durant la germinació de les llavors (**capítols 2, 3 i apèndix I**). Aquest paper el poden dur a terme, en canvi, tant els tocoferols com els tocotrienols durant l'emmagatzematge, quiescència i dormició (**capítols 1, 2 i 4**), mantenint la viabilitat de les llavors en condicions ambientals no favorables.



CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

- L'acumulació de tocotrienols és un tret conservat a les llavors de la família Arecaceae, on la capacitat d'acumular tocoferols s'ha anat perdent a diferents gèneres al llarg de l'evolució sense afectar la seva viabilitat. Així doncs, els tocotrienols poden substituir la funció antioxidant dels tocoferols durant períodes d'emmagatzematge i quiescència a les llavors d'aquesta família.
- En condicions ambientals controlades, en les que s'afavoreix el creixement de les plantes, l'edat de la planta mare afecta a la producció de llavors. Incrementos en el contingut de vitamina E, en concret d' α -tocoferol i d'ABA, JA, SA i IAA, mantenen la mateixa capacitat germinativa en tots els individus de la població.
- En condicions naturals on el creixement de les plantes es troba més limitat, l'edat de la planta mare no afecta als continguts de vitamina E. En aquestes condicions, disminucions del número de llavors produïdes per fruit i increments de la biomassa d'aquestes són assolits per a mantenir la capacitat germinativa.
- L'ambient en els que es troben les poblacions de *C. albidus* determina els recursos destinats a la producció de llavors, influenciant la seva estratègia reproductiva (*r vs K*). A la seva vegada, l'ambient influencia el grau de dormició de les llavors, modulant els nivells de vitamina E i d'hormones per tal de mantenir la viabilitat de les llavors durant llargs períodes de dormició.
- Mentre que els tocotrienols tenen una funció antioxidant durant l'emmagatzematge, quiescència i dormició de *C. humilis* var. *humilis*, els tocoferols exerceixen aquesta funció durant la germinació d'aquesta

Conclusions

espècie, sintetitzant-se *de novo* per tal de protegir a l'embrió de la peroxidació lipídica. Tot i així, no es pot descartar una possible interacció entre tocoferols i tocotrienols.

- Els canvis en els nivells d'expressió de *TAT*, *HPT*, *HGGT* i γ -*TMT* indiquen una regulació transcripcional de la síntesi de vitamina E. Una regulació redox i hormonal dels nivells transcripcionals sembla regular la síntesi de vitamina E durant la germinació de *C. humilis* var. *humilis*.
- El peròxid d'hidrogen, ja sigui de manera directa o modulant els nivells hormonals, influencia la germinació. Mitjançant l'increment de tocoferols, s'impedeix el dany oxidatiu i s'afavoreix el desenvolupament de la plàntula.
- Degut al seu paper dual com a antioxidant i molècula reguladora, la vitamina E és essencial durant l'emmagatzematge, quiescència, dormició i germinació de *C. humilis* var. *humilis*.



BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

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

Abreu ME, Munné-Bosch S. 2009. Salicylic acid deficiency in *NahG* transgenic lines and *sid2* mutants increases seed yield in the annual plant *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **60**, 1261-1271.

Arango Y, Heise K. 1998. Localization of α -tocopherol synthesis in chromoplast envelope membranes of *Capsicum annuum* L. fruits. *Journal of Experimental Botany* **49**, 1259-1262.

Arrom L, Munné-Bosch S. 2010. Tocopherol composition in flower organs of *Lilium* and its variations during natural and artificial senescence. *Plant Science* **179**, 289-285.

Artetxe U, García-Plazaola JI, Hernández A, Becerril JM. 2002. Low light grown duckweed plants are more protected against the toxicity induced by Zn and Cd. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**, 859-863.

Asada K, Takahashi M. 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: *Photoinhibition* (eds. Kyle DJ, Osmond CB, Arntzen CJ), pp. 228-287. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier.

Asensi-Fabado MA, Cela J, Müller M, Arrom L, Chang C, Munné-Bosch S. 2012. Enhanced oxidative stress in the ethylene-insensitive (*ein3-1*) mutant of *Arabidopsis thaliana* exposed to salt stress. *Journal of Plant Physiology* **169**, 360-368.

Asmussen CB, Dransfield J, Deickmann V, Barfod AS, Pintaud JC, Baker WJ. 2006. A new subfamily classification of the palm family (Arecaceae): evidence from plastid DNA phylogeny. *Botanical Journal of the Linnean Society* **151**, 15-38.

Atkinson J, Epand RF, Epand RM. 2008. Tocopherols and tocotrienols in membranes: a critical review. *Free Radical Biology and Medicine* **44**, 739-764.

Austin JR II, Frost E, Vidi PA, Kessler F, Staehelin LA. 2006. Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membrane and contain biosynthetic enzymes. *Plant Cell* **18**, 1693-1703.

Bahin E, Bailly C, Sotta B, Kranner I, Corbineau F, Leymarie J. 2011. Crosstalk between reactive oxygen species and hormonal signalling pathway regulates grain dormancy in barley. *Plant, Cell and Environment* **34**, 980-993.

Bailly C. 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research* **14**, 1-16.

Bailly C, El-Maarouf-Bouteau H, Corbineau F. 2008. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes Rendus Biologies* **331**, 806-814.

Baker WJ, Savolainen V, Asmussen-Lange CB, Chase MW, Dransfield J, Forest F, Harley MM, Uhl NW, Wilkinson M. 2009. Complete generic-level phylogenetic analyses of palms (Arecaceae) with comparisons of supertree and supermatrix approaches. *Systematic Biology* **58**, 240-256.

Baker WJ, Couvreur TLP. 2012. Global biogeography and diversification of palms sheds light on the evolution of tropical lineages. II. Diversification history and origin of regional assemblages. *Journal of Biogeography* **40**, 286-298.

Barba-Espín G, Diaz-Vivancos P, Clemente-Moreno MJ, Albacete A, Faize L, Faize M, Pérez-Alfocea F, Hernández JA. 2010. Interaction between hydrogen peroxide and plant hormones during germination and the early growth of pea seedlings. *Plant, Cell and Environment* **33**, 981-994.

Barba-Espín G, Diaz-Vivancos P, Job D, Belghazi M, Job C, Hernández JA. 2011. Understanding the role of H₂O₂ during pea seed germination: a combined proteomic and hormone profiling approach. *Plant, Cell and Environment* **34**, 1907-1919.

Bartoli CG, Simontacchi M, Montaldi ER, Puntarulo S. 1997. Oxidants and antioxidants during aging of chrysanthemum petals. *Plant Science* **129**, 157-165.

Baskin JM, Baskin CC, Li X. 2000. Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. *Plant Species Biology* **15**, 139-152.

Baskin JM, Baskin CC. 2013. What kind of seed dormancy might palms have? *Seed Science Research* **24**, 17-22.

Baskin CC, Baskin JM (eds.). 2014. *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination* (Second edition). San Diego, CA, USA: Academic Press.

- Bewley JD, Bradford KJ, Hilhorst HWM, Nonogaki H.** 2013. Seeds: physiology of development, germination and dormancy (Third edition). New York, NY, USA: Springer.
- Berger S.** 2002. Jasmonate-related mutants of *Arabidopsis* as tools for studying stress signaling. *Planta* **214**, 497-504.
- Bicalho EM, Pintó-Marijuan M, Morales M, Müller M, Munné-Bosch S, Garcia QS.** 2015. Control of macaw palm seed germination by the gibberellin/abscisic acid balance. *Plant Biology* **17**, 990-996.
- Blasco S, Mateu I.** 1995. Flowering and fruiting phenology and breeding system of *Cistus albidus* L. *Acta Botanica Gallica* **142**, 245-251.
- Bogatek R, Côme D, Corbineau F, Ranjan R, Lewak S.** 2002. Jasmonic acid affects dormancy and sugar catabolism in germinating apple embryos. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**, 167-173.
- Burkey KO, Wei C, Eason G, Ghosh P, Fenner GP.** 2000. Antioxidant metabolite levels in ozone-sensitive and tolerant genotypes of snap bean. *Physiologia Plantarum* **110**, 195-200.
- Cadman CSC, Toorop PE, Hilhorst HWM, Finch-Savage WE.** 2006. Gene expression profiles of *Arabidopsis* Cvi seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism. *Plant Journal* **46**, 805-822.
- Cahoon EB, Hall SE, Ripp KG, Ganzke TS, Hitz WD, Coughlan SJ.** 2003. Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. *Nature Biotechnology* **21**, 1082-1087.
- Caro A, Puntarulo S.** 1996. Effect of *in vivo* iron supplementation on oxygen radical production by soybean roots. *Biochimica et Biophysica Acta* **1291**, 245-251.
- Cela J, Arrom L, Munné-Bosch S.** 2009a. Diurnal changes in photosystem II photochemistry, photoprotective compounds and stress-related phytohormones in the CAM plant, *Aptenia cordifolia*. *Plant Science* **177**, 404-410.
- Cela J, Falk J, Munné-Bosch S.** 2009b. Ethylene signaling may be involved in the regulation of tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **583**, 992-996.
- Cela J, Müller M, Munné-Bosch S.** 2011. Tocopherol and tocotrienol (vitamin E) composition of some edible fruits. In: Vitamin E: Nutrition, side effects and supplements (ed. Lindberg AE), pp. 277-287. Hauppauge, NY, USA: Nova Science Publishers.

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

Chaudhary N, Khurana P. 2009. Vitamin E biosynthesis genes in rice: molecular characterization, expression profiling and comparative phylogenetic analysis. *Plant Science* **177**, 479-491.

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

Collakova E, DellaPenna D. 2003b. Homogentisate phytyltransferase activity is limiting for tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **131**, 632-642.

Collin VC, Eymery F, Genty B, Rey P, Havaux M. 2008. Vitamin E is essential for the tolerance of *Arabidopsis thaliana* to metal-induced oxidative stress. *Plant, Cell and Environment* **31**, 244-257.

Colville L, Kranner I. 2010. Desiccation tolerant plants as model systems to study redox regulation of protein thiols. *Plant Growth Regulation* **62**, 241-255.

Colville L, Bradley EL, Lloyd AS, Pritchard HW, Castle L, Kranner I. 2012. Volatile fingerprints of seed of four species indicate the involvement of alcoholic fermentation, lipid peroxidation, and Maillard reactions in seed deterioration during aging and desiccation stress. *Journal of Experimental Botany* **63**, 6519-6530.

Combs GF. 2012. The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health (Fourth edition). Amsterdam, the Netherlands: Elsevier.

Couvreur TL, Forest F, Baker WJ. 2011. Origin and global diversification patterns of tropical rain forests: inferences from a complete genus-level phylogeny of palms. *BMC Biology* **9**, 44.

Crowell EF, McGrath JM, Dousches DS. 2008. Accumulation of vitamin E in potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Transgenic Research* **17**, 205-217.

d'Auzac J, Jacob JL, Chrestin H (eds.). 1989. Physiology of rubber tree latex. The laticiferous cell and latex - a model of cytoplasm. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.

- d'Harlingue A, Camara B.** 1985. Plastid enzymes of terpenoid biosynthesis. Purification and characterization of γ -tocopherol methyltransferase from *Capsicum* chromoplasts. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 15200-15203.
- Danon A, Miersch O, Felix G, Camp RGL, Apel K.** 2005. Concurrent activation of cell death-regulating signaling pathways by singlet oxygen in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **41**, 68-80.
- Dave A, Hernandez ML, He Z, Andriotis VME, Vaistij FE, Larson TR, Graham IA.** 2011. 12-Oxo-phytodienoic acid accumulation during seed development represses seed germination in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**, 583-599.
- Davies PJ.** 2010. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!* (ed. Davies PJ), pp. 1-15. Dordrecht, the Netherlands: Springer.
- DeMason DA, Sexton R, Grant Reid JS.** 1983. Structure, composition and physiological state of the endosperm of *Phoenix dactylifera* L. *Annals of Botany* **52**, 71-80.
- DeMason DA.** 1986. Endosperm structure and storage reserve histochemistry in the palm, *Washingtonia filifera*. *American Journal of Botany* **73**, 1332-1340.
- DellaPenna D.** 2005. A decade of progress in understanding vitamin E synthesis in plants. *Journal of Plant Physiology* **162**, 729-737.
- Demo A, Petrakis C, Kefalas P, Boskou D.** 1998. Nutrient antioxidants in some herbs and Mediterranean plant leaves. *Food Research International* **31**, 351-354.
- Devoto A, Turner JG.** 2005. Jasmonate-regulated *Arabidopsis* stress signalling network. *Physiologia Plantarum* **123**, 161-172.
- Dickie JB, Balick MJ, Linington IM.** 1992. Experimental investigations into the feasibility of *ex situ* preservation of palm seeds; an alternative strategy for biological conservation of this economically important plant family. *Biodiversity and Conservation* **1**, 112-119.
- Dörmann P.** 2003. Corn with enhanced antioxidant potential. *Nature Biotechnology* **21**, 1015-1016.
- Du X, Hussain N, Li Z, Chen X, Hua S, Zhang D, Jiang L.** 2015. Effect of gibberellin on the biosynthesis of tocopherols in oilseed rape (*Brassica napus* L.) and *Arabidopsis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **63**, 360-369.

Bibliografía

- Ebong PE, Owu Du, Isong EU.** 1999. Influence of pail oil (*Elaeis guineensis*) on health. *Plant Foods for Human Nutrition* **53**, 209-222.
- El Kayal W, Keller G, Debayles C, Kumar R, Weier D, Teulieres C, Marque C.** 2006. Regulation of tocopherol biosynthesis through transcriptional control of tocopherol cyclase during cold hardening in *Eucalyptus gunnii*. *Physiologia Plantarum* **126**, 212-223.
- El-Maarouf-Bouteau H, Bailly C.** 2008. Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant Signaling and Behavior* **3**, 175-182.
- Epstein SS, Forsyth J, Saporoschetz IB, Mantel N.** 1966. An exploratory investigation on the inhibition of selected photosensitizers by agents of varying antioxidant activity. *Radiation Research* **28**, 322-335.
- Esteban R, Olano JM, Castresana J, Fernández-Marín B, Hernández A, Becerril JM, García-Plazaola JI.** 2009. Distribution and evolutionary trends of photoprotective isoprenoids (xanthophylls and tocopherols) within the plant kingdom. *Physiologia Plantarum* **135**, 379-389.
- Estévez JM, Cantero A, Reindl A, Reichler S, León P.** 2001. 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 22901-22909.
- Evans HM, Bishop KS.** 1922. On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science* **56**, 650-651.
- Evans HM, Emerson OH, Emerson GA.** 1936. The isolation from wheat germ oil of an alcohol, α -tocopherol, having properties of vitamin E. *Journal of Biological Chemistry* **113**, 319-332.
- Fahrenholtz SR, Doleiden FH, Trozzolo AM, Lamola AA.** 1974. On the quenching of singlet oxygen by α -tocopherol. *Photochemistry and Photobiology* **20**, 505-509.
- Falk J, Krauß N, Dähnhardt D, Krupinska K.** 2002. The senescence associated gene of barley encoding 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is expressed during oxidative stress. *Journal of Plant Physiology* **159**, 1245-1253.
- Falk J, Krahnstöver A, van der Kooij TW, Schlenzog M, Krupinska K.** 2004. Tocopherol and tocotrienol accumulation during development of caryopses from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Phytochemistry* **65**, 2977-2985.
- Falk J, Munné-Bosch S.** 2010. Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. *Journal of Experimental Botany* **61**, 1549-1566.

- Farmer EE, Mueller MJ.** 2013. ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annual Review of Plant Biology* **64**, 429-450.
- Fernholz E.** 1938. Constitution of α -tocopherol. *Journal of the American Chemical Society* **60**, 700-705.
- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G.** 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* **171**, 501-523.
- Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C.** 2008. Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 387-415.
- Fisk ID, White DA, Carvalho A, Gray DA.** 2006. Tocopherol - An intrinsic component of sunflower seed oil bodies. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **83**, 341-344.
- Fleta-Soriano E, Fernández-Marín B, Olano JM, Míguez F, Molinero J, Camarero JJ, García-Plazaola JI.** 2014. Tocochromanols in wood: a potential new tool for dendrometabolomics. *Tree Physiology* **34**, 1411-1418.
- Fleta-Soriano E, Munné-Bosch S.** 2017. Enhanced plastochromanol-8 accumulation during reiterated drought in maize (*Zea mays* L.). *Plant Physiology and Biochemistry* **112**, 283-289.
- Fonseca S, Chini A, Hamberg M, Adie B, Porzel A, Kramell R, Miersch O, Wasternack C, Solano R.** 2009 (+)-7-*iso*-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology* **5**, 344-350.
- Foyer CH, Noctor G.** 2011. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology* **155**, 2-18.
- Franzen J, Bausch J, Glatzle D, Wagner E.** 1991. Distribution of vitamin E in spruce seedling and mature tree organs, and within the genus. *Phytochemistry* **30**, 147-151.
- Fryer MJ.** 1992. The antioxidant effects of thylakoid vitamin E (α -tocopherol). *Plant, Cell and Environment* **15**, 381-392.
- Garcia QS, Giorni VT, Müller M, Munné-Bosch S.** 2012. Common and distinct responses in phytohormone and vitamin E changes during seed burial and dormancy in *Xyris bialata* and *X. peregrina*. *Plant Biology* **14**, 347-353.
- Gechev T, Gadjev I, Van Breusegem F, Inzé D, Dukiandjiev S, Toneva V, Minkov I.** 2002. Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences* **59**,

Bibliografía

708-714.

Gechev TS, Van Breusegem F, Stone JM, Denev I, Laloi C. 2006. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays* **28**, 1091-1101.

Ghassemian M, Nambara E, Cutler S, Kawaide H, Kamiya Y, McCourt P. 2000. Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 1117-1126.

GBIF Secretariat. *Chamaerops humilis* L. In: GBIF Backbone Taxonomy. Accessed via <http://www.gbif.org/species/2736625> on 2016-12-14.

Goffman FD, Bo T. 2001. Relationship between fatty acid profile and vitamin E content in maize hybrids (*Zea mays* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 4990-4994.

Goffman FD, Thies W, Velasco L. 1999. Chemotaxonomic value of tocopherols in Brassicaceae. *Phytochemistry* **50**, 793-798.

Gomes MP, Smedbol É, Carneiro MMLC, Garcia QS, Juneau P. 2014. Reactive oxygen species and plant hormones. In: Oxidative damage to plants, antioxidants networks and signaling (ed. Ahmad P), pp. 65-88. Amsterdam, the Netherlands: Academic Press.

Gómez JC, Villalán J, Aranda FJ, Ortiz A, Micol V, Coutinho A, Berberan-Santos MN, Prieto MJE. 1989. Localization of α -tocopherol in membranes. *Annals of the New York Academy of Sciences* **570**, 109-120.

González-Benito ME, Hueras-Micó M, Pérez-García, F. 2006. Seed germination and storage of *Chamaerops humilis* (dwarf fan palm). *Seed Science and Technology* **34**, 143-150.

González JD, Fernández BB, Carreño FS. 2012. Influence of different preservation methods on germination of areca palm (*Dyopsis lutescens*, H. Wendel). *Cultivos Tropicales* **35**, 56-60.

Gidrol X, Lin WS, Degousee N, Yip SF, Kush A. 1994. Accumulation of reactive oxygen species and oxidation of cytokinin in germinating soybean seeds. *European Journal of Biochemistry* **224**, 21-28.

Grusak MA, DellaPenna D. 1999. Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 133-161.

- Gülz PG, Mueller E, Schmitz K, Marnier FJ, Güth S.** 1992. Chemical composition and surface structures of epicuticular leaf waxes of *Ginkgo biloba*, *Magnolia grandiflora* and *Liriodendron tulipifera*. *Zeitschrift für Naturforschung* **47**, 516-526.
- Gutierrez-Gonzalez JJ, Wise ML, Garvin DF.** 2013. A developmental profile of tocol accumulation in oat seeds. *Journal of Cereal Science* **57**, 79-83.
- Gutterman Y.** 2000. Maternal effects on seeds during development. In: *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities*. Second edition (ed. Fenner M), pp. 59-84. Wallingford, UK: CABI Pub.
- Hajiboland R.** 2014. Reactive oxygen species and photosynthesis. In: *Oxidative damage to plants, antioxidants networks and signaling* (ed. Ahmad P), pp. 1-63. Amsterdam, the Netherlands: Academic Press.
- Halitschke R, Baldwin IT.** 2003. Antisense LOX expression increases herbivore performance by decreasing defense responses and inhibiting growth-related transcriptional reorganization in *Nicotiana attenuata*. *Plant Journal* **36**, 794-807.
- Hara Y, Laugel T, Morimoto T, Yamada Y.** 1994. Effect of gibberellic acid on berberine and tyrosine accumulation in *Coptis japonica*. *Phytochemistry* **36**, 643-646.
- Havaux M.** 1998. Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends in Plant Science* **3**, 147-151.
- Havaux M, Bonfils JP, Lütz C, Niyogi KK.** 2000. Photodamage of the photosynthetic apparatus and its dependence on the leaf developmental stage in the *npq1 Arabidopsis* mutant deficient in the xanthophyll cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase. *Plant Physiology* **124**, 273-284.
- Havaux M, Porfirova S, Rey P, Do P.** 2005. Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **17**, 3451-3469.
- Hernández I, Miret JA, Van Der Kelen K, Rombaut D, Van Breusegem F, Munné-Bosch S.** 2015. Zeatin modulates flower bud development and tocopherol levels in *Cistus albidus* (L.) plants as they age. *Plant Biology* **17**, 90-96.
- Herrera J.** 1989. On the reproductive biology of the dwarf palm, *Chamaerops humilis* in southern Spain. *Principes* **33**, 27-32.
- Herrmann KM, Weaver LM.** 1999. The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 473-503.

Hincha DK. 2008. Effects of α -tocopherol (vitamin E) on the stability and lipid dynamics of model membranes mimicking the lipid composition of plant chloroplast membranes. *FEBS Letters* **582**, 3687-3692.

Horvath G, Wessjohann L, Bigirimana J, Jansen M, Guisez Y, Caubergs R, Horemans N. 2006a. Differential distribution of tocopherols and tocotrienols in photosynthetic and non-photosynthetic tissues. *Phytochemistry* **67**, 1185-1195.

Horvath G, Wessjohann L, Bigirimana J, Monica H, Jansen M, Guisez Y, Caubergs R, Horemans N. 2006b. Accumulation of tocopherols and tocotrienols during seed development of grape (*Vitis vinifera* L. cv. Albert Lavallée). *Plant Physiology and Biochemistry* **44**, 724-731.

Hunter SC, Cahoon EB. 2007. Enhancing vitamin E in oilseeds: unraveling tocopherol and tocotrienol biosynthesis. *Lipids* **42**, 97-108.

Ischebeck T, Zbierzak AM, Kanwischer M, Dörmann P. 2006. A salvage pathway for phytol metabolism in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 2470-2477.

Ishibashi Y, Tawaratsumida T, Kondo K, Kasa S, Sakamoto M, Aoki N, Zheng SH, Yuasa T, Iwaya-Inoue M. 2012. Reactive oxygen species are involved in gibberellin/abscisic acid signaling in barley aleurone cells. *Plant Physiology* **158**, 1705-1714.

Jiang M, Zhang J. 2001. Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant and Cell Physiology* **42**, 1265-1273.

Jiang J, Chen Z, Ban L, Wu Y, Huang J, Chu J, Fang S, Wang Z, Gao H, Wang X. 2017. *p*-HYDROXYPHENYLPYRUVATE DIOXYGENASE from *Medicago sativa* is involved in vitamin E biosynthesis and abscisic acid-mediated seed germination. *Scientific Reports* **7**, 1-15.

Jiménez VM, Guevara E, Herrera J, Alizaga R, Bangerth F. 2008. Changes in hormone concentrations during dormancy release of oil palm (*Elaeis guineensis*) seeds. *Seed Science Technology* **36**, 575-587.

Jones RL, Ougham H, Thomas H, Waaland S. 2003. Plant life: a primer In: The molecular life of plants, pp. 3-40. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.

Kadioglu A, Saruhan N, Sağlam A, Terzi R, Acet T. 2011. Exogenous salicylic acid alleviates effects of long term drought stress and delays leaf rolling by inducing antioxidant system. *Plant Growth Regulation* **64**, 27-37.

- Kagan VE, Quinn PJ.** 1988. The interaction of α -tocopherol and homologues with shorter hydrocarbon chains with phospholipid dispersions, a fluorescence probe study. *European Journal of Biochemistry* **171**, 661-667.
- Kamal-Eldin A, Appelqvist LÅ.** 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* **31**, 671-701.
- Karrer P, Fritzsche H, Ringer BH, Salomen NJ.** 1938. Synthesis of α -tocopherol (vitamin E). *Nature* **141**, 1057.
- Keegstra K, Cline K.** 1999. Protein import and routing systems of chloroplasts. *Plant Cell* **11**, 557-570.
- Keller Y, Bouvier F, d'Harlingue A, Camara B.** 1998. Metabolic compartmentation of plastid prenyllipid biosynthesis. Evidence for the involvement of a multifunctional geranylgeranyl reductase. *European Journal of Biochemistry* **251**, 413-417.
- Kobayashi N, DellaPenna D.** 2008. Tocopherol metabolism, oxidation and recycling under high light stress in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **55**, 607-618.
- Kranner I, Roach T, Beckett RP, Whitaker C, Minibayeva FV.** 2010. Extracellular production of reactive oxygen species during seed germination and early seedling growth in *Pisum sativum*. *Journal of Plant Physiology* **167**, 805-811.
- Kravchik M, Bernstein N.** 2013. Effects of salinity on the transcriptome of growing maize leaf cells point at cell-age specificity in the involvement of the antioxidative response in cell growth restriction. *BMC Genomics* **14**, 24.
- Kruk J, Strzalka K.** 1995. Occurrence and function of α -tocopherol quinone in plants. *Journal of Plant Physiology* **145**, 405-409.
- Kruk J, Holländer-Czytko H, Oettmeier W, Trebst A.** 2005. Tocopherol as singlet oxygen scavenger in photosystem II. *Journal of Plant Physiology* **162**, 749-757.
- Kucera B, Cohn MA, Leubner-Metzger G.** 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research* **15**, 281-307.
- Kumar SPJ, Rajendra Prasad S, Banerjee R, Thammineni C.** 2015. Seed birth to death: dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. *Annals of Botany* **116**, 663-668.
- Kusmic C, Barsacchi R, Barsanti L, Gualtieri P, Passarelli V.** 1998. *Euglena*

gracilis as source of the antioxidant vitamin E. Effects of culture conditions in the wild strain and in the natural mutant *WZSL*. Journal of Applied Phycology **10**, 555-559.

Lariguet P, Ranocha P, DeMeyer M, Barbier O, Penel C, Dunand C. 2013. Identification of a hydrogen peroxide signalling pathway in the control of light-dependent germination in *Arabidopsis*. Planta **238**, 381-395.

Lee SJ, Park J, Lee M, Yu JH, Kim S. 2010. Isolation and functional characterization of CE1 binding proteins. BMC Plant Biology **10**, 277.

Lehmann JW, Putnam DH, Qureshi AA. 1989. Vitamin E isomers in grain amaranths (*Amaranthus* spp.). Lipids **29**, 1987-1991.

Leipner J, Fracheboud Y, Stamp P. 1999. Effect of growing season on the photosynthetic apparatus and leaf antioxidative defenses in two maize genotypes of different chilling tolerance. Environmental and Experimental Botany **42**, 129-139.

Lichtenthaler, HK. 1968. Verbreitung und relative konzentration der lipophilen plastidenchinone in grünen pflanzen. Planta **81**, 140-152.

Lichtenthaler HK, Prenzel U, Douce R, Joyard J. 1981. Localization of prenylquinones in the envelope of spinach chloroplasts. Biochimica et Biophysica Acta **641**, 99-105.

Lichtenthaler HK. 1999. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **50**, 47-65.

Liebler DC. 1993. The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. Critical Reviews in Toxicology **23**, 147-169.

Linkies A, Graeber K, Knight C, Leubner-Metzger G. 2010. The evolution of seeds. New Phytologist **186**, 817-831.

Liu Y, Ye N, Liu R, Chen M, Zhang J. 2010. H₂O₂ mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in *Arabidopsis* seed dormancy and germination. Journal of Experimental Botany **61**, 2979-2990.

Llusià J, Peñuelas J, Munné-Bosch S. 2005. Sustained accumulation of methyl salicylate alters antioxidant protection and reduces tolerance of holm oak to heat stress. Physiologia Plantarum **124**, 353-361.

Lopukhina A, Dettenberg M, Weiler EW, Holländer-Czytko H. 2001. Cloning and characterization of a coronatine-regulated tyrosine aminotransferase from

Arabidopsis. Plant Physiology **126**, 1678-1687.

Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ, Solano R. 2003. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. Plant Cell **15**, 165-178.

Lubrano C, Robin JR, Khaiat A. 1994. Fatty acid and sterol and tocopherol composition of oil from the fruit mesocarp of six palm species in French Guinea. Oléagineux **49**, 59-65.

Lumpur K. 1999. Tocotrienol: A review of its therapeutic potential. Clinical Biochemistry **32**, 309-319.

Lushchak VI, Semchuk NM. 2012. Tocopherol biosynthesis: chemistry, regulation and effects of environmental factors. Acta Physiologiae Plantarum **34**, 1607-1628.

Mansouri H, Asrar Z, Szopa J. 2009. Effects of ABA on primary terpenoids and Δ^9 -tetrahydrocannabinol in *Cannabis sativa* L. at flowering stage. Plant Growth Regulation **58**, 269-277.

Martins CC, Bovi MLA, Nakagawa J. 2003. Desiccation effects on germination and vigor of King palm seeds. Horticultura Brasileira **21**, 88-92.

Matesanz S, Gianoli E, Valladares F. 2010. Global change and the evolution of phenotypic plasticity in plants. Annals of the New York Academy of Sciences **1206**, 35-55.

Matringe M, Ksas B, Rey P, Havaux M. 2008. Tocotrienols, the unsaturated forms of vitamin E, can function as antioxidants and lipid protectors in tobacco leaves. Plant Physiology **147**, 764-778.

McFadden GI. 2001. Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids. Journal of Phycology **37**, 951-959.

Mehrshahi P, Johnny C, DellaPenna D. 2014. Redefining the metabolic continuity of chloroplasts and ER. Trends in Plant Science **19**, 501-507.

Meinhard M, Rodriguez PL, Grill E. 2002. The sensitivity of ABI2 to hydrogen peroxide links abscisic acid-response regulator to redox signalling. Planta **214**, 775-782.

Mène-Saffrané L, DellaPenna D. 2010. Biosynthesis, regulation and functions of tocochromanols in plants. Plant Physiology and Biochemistry **48**, 301-309.

- Mène-Saffrané L, Jones DA, DellaPenna D.** 2010. Plastochromanol-8 and tocopherols are essential lipid-soluble antioxidants during seed desiccation and quiescence in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **107**, 17815-17820.
- Merlo ME, Aleman MM, Cabello J, Peñas J.** 1993. On the Mediterranean fan palm (*Chamaerops humilis*). Principes **37**, 151-158.
- Miransari M, Smith DL.** 2014. Plant hormones and seed germination. Environmental and Experimental Botany **99**, 110-121.
- Miret JA, Cela J, Bezerra LA, Arrom L, Juvany M, Müller M, Munné-Bosch S.** 2014. Application of a rapid and sensitive method for hormonal and vitamin E profiling reveals crucial regulatory mechanisms in flower senescence and fruit ripening. Journal of Plant Growth Regulation **33**, 34-43.
- Møller IM.** 2001. Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **52**, 561-591.
- Møller IM, Jensen PE, Hansson A.** 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. Annual Review of Plant Biology **58**, 459-481.
- Morales M, Oñate M, García MB, Munné-Bosch S.** 2013. Photo-oxidative stress markers reveal absence of physiological deterioration with ageing in *Borderea pyrenaica*, an extraordinarily long-lived herb. Journal of Ecology **101**, 555-565.
- Morales M, Garcia QS, Siqueira-Silva AI, Silva MC, Munné-Bosch S.** 2014. Tocotrienols in *Vellozia gigantea* leaves: occurrence and modulation by seasonal and plant size effects. Planta **240**, 437-446.
- Morales M, Garcia QS, Munné-Bosch S.** 2015. Ecophysiological response to seasonal variations in water availability in the arborescent, endemic plant *Vellozia gigantea*. Tree Physiology **35**, 253-265.
- Moura EF, Ventrella MC, Motoike SY.** 2010. Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). Scientia Agricola **67**, 399-407.
- Mueller MJ, Berger S.** 2009. Reactive electrophilic oxylipins: pattern recognition and signalling. Phytochemistry **70**, 1511-1521.
- Müller M, Munné-Bosch S.** 2015. Ethylene Response Factors: a key regulatory hub in hormone and stress signaling. Plant Physiology **169**, 32-41.

- Munné-Bosch S, Alegre L.** 2003. Drought-induced changes in the redox state of α -tocopherol, ascorbate, and the diterpene carnosic acid in chloroplasts of Labiatae species differing in carnosic acid contents. *Plant Physiology* **131**, 1816-1825.
- Munné-Bosch S.** 2005a. Linking tocopherols with cellular signaling in plants. *New Phytologist* **166**, 363-366.
- Munné-Bosch S.** 2005b. The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *Journal of Plant Physiology* **162**, 743-748.
- Munné-Bosch S, Alegre L.** 2002. The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **21**, 31-57.
- Munné-Bosch S, Peñuelas J.** 2003. Photo- and antioxidative protection, and a role for salicylic acid during drought and recovery in field-grown *Phillyrea angustifolia* plants. *Planta* **217**, 758-766.
- Munné-Bosch S, Peñuelas J, Llusà J.** 2007a. A deficiency in salicylic acid alters isoprenoid accumulation in water-stressed *NahG* transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Science* **172**, 756-762.
- Munné-Bosch S, Weiler EW, Alegre L, Müller M, Düchting P, Falk J.** 2007b. α -Tocopherol may influence cellular signaling by modulating jasmonic acid levels in plants. *Planta* **225**, 681-691.
- Munné-Bosch S, Falara V, Pateraki I, López-Carbonell M, Cela J, Kanellis AK.** 2009. Physiological and molecular responses of the isoprenoid biosynthetic pathway in a drought-resistant Mediterranean shrub, *Cistus creticus* exposed to water deficit. *Journal of Plant Physiology* **166**, 136-145.
- Murkovic M, Wiltschko D, Pfannhauser W.** 1997. Formation of α -tocopherolquinone and α -tocopherolquinone epoxides in plant oil. *Fett-Lipid* **99**, 165-169.
- Murthy NUM, Sun WQ.** 2000. Protein modification by Amadori and Maillard reactions during seed storage: roles of sugar hydrolysis and lipid peroxidation. *Journal of Experimental Botany* **51**, 1221-1228.
- Nambara E, Okamoto M, Tatematsu K, Yano R, Seo M, Kamiya Y.** 2010. Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination. *Seed Science Research* **20**, 55-67.
- Navabpour S.** 2003. Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* **54**, 2285-2292.

Bibliografía

Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT. 2002. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1237-1247.

Noreen Z, Ashraf M. 2009. Assessment of variation in antioxidative defense system in salt-treated pea (*Pisum sativum*) cultivars and its putative use as salinity tolerance markers. *Journal of Plant Physiology* **166**, 1764-1774.

Ogawa M, Hanada A, Yamauchi Y, Kuwahara A, Kamiya Y, Yamaguchi S. 2003. Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *Plant Cell* **15**, 1591-1604.

Oh M-M, Carey EE, Rajashekar CB. 2009. Environmental stresses induce health-promoting phytochemicals in lettuce. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**, 578-583.

Ong ASH. 1993. Natural sources of tocotrienols. In: Vitamin E in health and disease (ed. Packer L, Fuchs J), pp. 3-8. New York, NY, USA: Dekker.

Oracz K, El-Maarouf-Bouteau H, Kranner I, Bogatek R, Corbineau F, Bailly C. 2009. The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signalling during germination. *Plant Physiology* **150**, 494-505.

Orozco-Segovia A, Batis AI, Roja-Aréchiga M, Mendoza A. 2003. Seed biology of palms: a review. *Palms* **47**, 79-94.

Osuna-García JA, Wall MM, Waddell CA. 1998. Endogenous levels of tocopherols and ascorbic acid during fruit ripening of new mexican-type chile (*Capsicum annum* L.) cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 5093-5096.

Park MR, Cho EA, Rehman S, Yun SJ. 2010. Expression of a sesame geranylgeranyl reductase cDNA is induced by light but repressed by abscisic acid and ethylene. *Pakistan Journal of Botany* **42**, 1815-1825.

Pennisi E. 2009. On the origin of flowering plants. *Science* **324**, 28-31.

Peñuelas J, Munné-Bosch S. 2005. Isoprenoids: an evolutionary pool for photoprotection. *Trends in Plant Science* **10**, 166-169.

Pfannschmidt T, Munné-Bosch S. 2013. Plastid signaling during the plant life cycle. Plastid function as developmental reporter and environmental sensor in plant growth and acclimation. In: Plastid development in leaves during growth and senescence (eds. Basanti B, Krupinska K, Biswal UC), *Advances in Photosynthesis*

and Respiration **36**, 503-528. Dordrecht, the Netherlands: Springer.

Pimenta RS. 2009. Germinação e aspectos morfológicos de sementes de *Dypsis leptocheilos* (Hodel) Beentje and J. Dransf. (Arecaceae). Ph.D. Thesis. Universidade Estadual Paulista.

Pogson BJ, Albrecht V. 2011. Genetic dissection of chloroplast biogenesis and development: an overview. *Plant Physiology* **155**, 1545-1551.

Porfirova S, Bergmuller E, Tropf S, Lemke R, Dormann P. 2002. Isolation of an *Arabidopsis* mutant lacking vitamin E and identification of a cyclase essential for all tocopherol biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 12495-12500.

Pryor WA. 2000. Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Radical Biology and Medicine* **28**, 141-164.

Puntarulo S. 1993. Effect of oxidative stress during inhibition of soybean embryonic axes. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh. B: Biological Sciences* **102**, 279-286.

Qureshi AA, Burger WC, Peterson DM, Elson CE. 1986. The structure of an inhibitor of cholesterol biosynthesis isolated from barley. *Journal of Biological Chemistry* **261**, 10544-10550.

Rajjou L, Debeaujon I. 2008. Seed longevity: survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *Comptes Rendus Biologies* **331**, 796-805.

Rajjou L, Duval M, Gallardo K, Catusse J, Bally J, Job C, Job D. 2012. Seed germination and vigor. *Annual Review of Plant Biology* **63**, 507-533.

Rautenkranz A, Li L, Machler F, Martinoia E, Oertli JJ. 1994. Transport of ascorbic and dehydroascorbic acids across protoplast and vacuole membranes isolated from barley (*Hordeum vulgare* L. cv Gerbel) leaves. *Plant Physiology* **106**, 187-193.

Ribeiro LM, Oliveira TGS, Carvalho VS, Silva PO, Neves SC, Garcia QS. 2012. The behaviour of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) seeds during storage. *Seed Science and Technology* **40**, 344-353.

Ribeiro LM, Garcia QS, Müller M, Munné-Bosch S. 2015. Tissue-specific hormonal profiling during dormancy release in macaw palm seeds. *Physiologia Plantarum* **153**, 627-642.

Roach D, Wulff RD. 1987. Maternal effects in plants. *Annual Review of Ecology*

Bibliografia

and Systematics **18**, 209-235.

Rolston MP. 1978. Water impermeable seed dormancy. Botanical Review **44**, 365-396.

Roy J, Sonié L. 1992. Germination and population dynamics of *Cistus* species in relation to fire. Journal of Applied Ecology **29**, 647-655.

Sadre R, Gruber J, Frentzen M. 2006. Characterization of homogentisate prenyltransferases involved in plastoquinone-9 and tocopherol biosynthesis. FEBS Letters **580**, 5357-5362.

Salgado J, Villalain J, Gómez-Fernández J. 1993. α -Tocopherol interacts with natural micelle-forming single-chain phospholipids stabilizing the bilayer phase. Archives of Biochemistry and Biophysics **306**, 368-376.

Sandorf I, Holländer-Czytko H. 2002. Jasmonate is involved in the induction of tyrosine aminotransferase and tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Planta **216**, 173-179.

Sattler SE, Gilliland LU, Magallanes-Lundback M, Pollard M, DellaPenna D. 2004. Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. Plant Cell **16**, 1419-1432.

Sattler SE, Mène-Saffrané L, Farmer EE, Krischke M, Mueller MJ, DellaPenna D. 2006. Nonenzymatic lipid peroxidation reprograms gene expression and activates defense markers in *Arabidopsis* tocopherol-deficient mutants. Plant Cell **18**, 3706-3720.

Schaller F. 2001. Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules. Journal of Experimental Botany **52**, 11-23.

Schnell DJ. 1998. Protein targeting to the thylakoid membrane. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **49**, 97-126.

Schopfer P, Plachy C, Frahry G. 2001. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. Plant Physiology **125**, 1591-1602.

Schultz G. 1990. Biosynthesis of α -tocopherol in chloroplasts of higher plants. Fat Science Technology **92**, 86-91.

Serbinova E, Kagan V, Han D, Packer L. 1991. Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of α -tocopherol and α -

tocotrienol. *Free Radical Biology and Medicine* **10**, 263-275.

Shepherd T, Robertson GW, Griffiths DW, Birch ANE. 1999. Epicuticular wax composition in relation to aphid infestation and resistance in red raspberry (*Rubus idaeus* L.). *Phytochemistry* **52**, 1239-1254.

Shigeoka S, Onishi T, Nakano Y, Kitaoka S. 1986. The contents and subcellular distribution of tocopherols in *Euglena gracilis*. *Agricultural and Biological Chemistry* **50**, 1063-1065.

Shinshi H. 2008. Ethylene-regulated transcription and crosstalk with jasmonic acid. *Plant Science* **175**, 18-23.

Shintani D, DellaPenna D. 1998. Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. *Science* **282**, 2098-2100.

Simancas B, Munné-Bosch S. 2015. Interplay between vitamin E and phosphorus availability in the control of longevity in *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany* **116**, 511-518.

Singh RK, Ali SA, Nath P, Sane VA. 2011. Activation of ethylene-responsive *p*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase leads to increased tocopherol levels during ripening in mango. *Journal of Experimental Botany* **62**, 3375-3385.

Soll J, Schultz G. 1979. Comparison of geranylgeranyl and phytyl substituted methylquinols in the tocopherol synthesis of spinach chloroplasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **91**, 715-720.

Soll J, Schultz G. 1980. 2-Methyl-6-phytylquinol and 2,3-dimethyl-5-phytylquinol as precursors of tocopherol synthesis in spinach chloroplasts. *Phytochemistry* **19**, 215-218.

Soll J, Kemmerling M, Schultz G. 1980. Tocopherol and plastoquinone biosynthesis in spinach chloroplasts subfractions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **204**, 544-550.

Soll J, Schultz G, Joyard J, Douce R, Block MA. 1985. Localization and synthesis of prenylquinones in isolated outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysic* **238**, 290-299.

Spychalla JP, Desborough SL. 1990. Superoxide dismutase, catalase, and α -tocopherol content of stored potato tubers. *Plant Physiology* **94**, 1214-1218.

Sudha G, Ravishankar GA. 2002. Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defense response,

Bibliografia

resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **71**, 181-212.

Suzuki YJ, Tsuchiya M, Wassall SR, Choo YM, Govil G, Kagan VE, Packer L. 1993. Structural and dynamic membrane properties of α -tocopherol and α -tocotrienol: implication to the molecular mechanism of their antioxidant potency. *Biochemistry* **32**, 10692-10699.

Suzuki K, Fukuda Y, Shinshi H. 1995. Studies on elicitor-signal transduction leading to differential expression of defense genes in cultured tobacco cells. *Plant and Cell Physiology* **36**, 281-289

Taki N, Sasaki-Sekimoto Y, Obayashi T, Kikuta A, Kobayashi K, Aina T, Yagi K, Sakurai N, Suzuki H, Masuda T, Takamiya K, Shibata D, Kobayashi Y, Ohta H. 2005. 12-Oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **139**, 1268-1283.

Tang YL, Ren WW, Zhang L, Tang KX. 2011. Molecular cloning and characterization of a tocopherol cyclase gene from *Lactuca sativa* (Asteraceae). *Genetics and Molecular Research* **10**, 693-702.

Thanos CA, Georghiou K. 1988. Ecophysiology of fire-stimulated seed germination in *Cistus incanus* ssp. *creticus* (L.) Heywood and *C. salviifolius* L. *Plant, Cell and Environment* **11**, 841-849.

Threfall DR. 1971. The biosynthesis of vitamins E and K and related compounds. *Vitamins and Hormones* **29**, 153-200.

Threfall DR, Whistance GR. 1971a. Biosynthesis of tocopherols and biogenetically related compounds. *Methods in Enzymology* **18**, 369-396.

Threfall DR, Whistance GR. 1971b. Biosynthesis of isoprenoid quinones and chromanols. In: *Aspects of terpenoid chemistry and biochemistry* (ed. Goodwin TW), pp. 357-359. London, UK: Academic Press.

Trabaud L, Renard P. 1999. Do light and litter influence the recruitment of *Cistus* spp. stands? *Israel Journal of Plant Sciences* **47**, 1-9.

Trebst A, Depka B, Holländer-Czytko H. 2002. A specific role for tocopherol and of chemical singlet oxygen quenchers in the maintenance of photosystem II structure and function in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS letters* **516**, 156-160.

Triantaphylidès C, Havaux M. 2009. Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends in Plant Science* **14**, 219-228.

- Valentin HE, Lincoln K, Moshiri F, Jensen PK, Qi Q, Tyamagondlu VV, Karunanandaa B, Baszis SR, Norris SR, Savidge B, Gruys KJ, Last RL.** 2006. The *Arabidopsis* vitamin E pathway gene5-1 mutant reveals a critical role for phytol kinase in seed tocopherol biosynthesis. *Plant Cell* **18**, 212-224.
- Valladares F, Gialoni E, Gómez JM.** 2007. Ecological limits to phenotypic plasticity. *New Phytologist* **176**, 749-763.
- Vidi PA, Kanwischer M, Baginsky S, Austin JR, Csucs G, Dörmann P, Kessler F, Bréhélin C.** 2006. Tocopherol cyclase (VTE1) localization and vitamin E accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 11225-11234.
- vom Dorp K, Hölzl G, Plohm C, Eisenhut M, Abraham M, Weber APM, Hanson AD, Dörmann P.** 2015. Remobilization of phytol from chlorophyll degradation is essential for tocopherol synthesis and growth of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **27**, 2846-2859.
- Walck JL, Hidayati SN, Dixon KW, Thompson K, Poschlod P.** 2011. Climate change and plant regeneration from seed. *Global Change Biology* **17**, 2145-2161.
- Wang M, van der Meulen RM, Visser K, Van Schaik HP, Van Duijn B, de Boer AH.** 1998. Effects of dormancy-breaking chemicals on ABA levels in barley grain embryos. *Seed Science Research* **8**, 129-137.
- Wang X, Quinn PJ.** 2000. The location and function of vitamin E in membranes. *Molecular Membrane Biology* **17**, 143-156.
- Wasternack C, Hause B.** 2013. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany* **111**, 1021-1058.
- Weber H, Chételat A, Reymond P, Farmer EE.** 2004. Selective and powerful stress gene expression in *Arabidopsis* in response to malondialdehyde. *Plant Journal* **37**, 877-888.
- Whistance GR, Threlfall DR.** 1970. Biosynthesis of phytoquinones-Homogentisic acid: a precursor of plastoquinones, tocopherols and α -tocopherolquinone in higher plants, green algae and blue-green algae. *Biochemical Journal* **117**, 593-600.
- Whitaker C, Beckett RP, Minibayeva F V., Kranner I.** 2010. Alleviation of dormancy by reactive oxygen species in *Bidens pilosa* L. seeds. *South African Journal of Botany* **76**, 601-605.

- White DA, Fisk ID, Gray DA.** 2006. Characterisation of oat (*Avena sativa* L.) oil bodies and intrinsically associated E-vitamins. *Journal of Cereal Science* **43**, 244-249.
- Wojtyła L, Lechowska K, Kubala S, Garneczarska M.** 2016. Different modes of hydrogen peroxide action during seed germination. *Frontiers in Plant Science* **7**, 1-16.
- Wu C, Washida H, Onodera Y, Harada K, Takaiwa F.** 2000. Quantitative nature of the prolamin-box, ACGT and AACA motifs in a rice glutelin gene promoter: minimal *cis*-element requirements for endosperm-specific gene expression. *Plant Journal* **23**, 415-421.
- Xiong L, Schumaker KS, Zhu J-K.** 2002. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* **14**, S165-S183.
- Yamaguchi S.** 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **59**, 225-251.
- Yan J, Li S, Gu M, Yao R, Li Y, Chen J, Yang M, Nan F, Daoxin X.** 2016. Endogenous bioactive jasmonate is composed of a set of (+)-7-*iso*-JA-amino acid conjugates. *Plant Physiology* **172**, 2154-2164.
- Yang QH, Ye W-H, Yin X-J.** 2007. Dormancy and germination of *Areca triandra* seeds. *Scientia Horticulturae* **113**, 107-111.
- Yang W, Cahoon RE, Hunter SC, Zhang C, Han J, Borgschulte T, Cahoon EB.** 2011. Vitamin E biosynthesis: functional characterization of the monocot homogentisate geranylgeranyl transferase. *Plant Journal* **65**, 206-217.
- Yildiz K, Muradoglu F, Yilmaz H.** 2008. The effect of jasmonic acid on germination of dormant and nondormant pear (*Pyrus communis* L.) seeds. *Seed Science and Technology* **36**, 569-574.
- Yoshida H, Takagi S, Mitsuhashi S.** 1999. Tocopherol distribution and oxidative stability of oils prepared from the hypocotyl of soybeans roasted in a microwave oven. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **76**, 915-920.
- Yusuf MA, Kumar D, Rajwanshi R, Strasser RJ, Tsimilli-Michael M, Govindjee, Sarin NB.** 2010. Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. *Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics* **1797**, 1428-1438.

Zhang C, Cahoon RE, Hunter SC, Chen M, Han J, Cahoon EB. 2013. Genetic and biochemical basis for alternative routes of tocotrienol biosynthesis for enhanced vitamin E antioxidant production. *Plant Journal* **73**, 628-639.

Zhang C, Zhang W, Ren G, Li D, Cahoon RE, Chen M, Zhou Y, Yu B, Cahoon EB. 2015. Chlorophyll synthase under epigenetic surveillance is critical for vitamin E synthesis, and altered expression affects tocopherol levels in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **168**, 1503-1511.

Zhu Z, An F, Feng Y, Li P, Xue L, Mu A, Jiang Z, Kim JM, To TK, Li W, Zhang X, Yu Q, Dong Z, Chen WQ, Seki M, ZhouJM, Guo H. 2011. Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 12539-12544.



APÈNDIX I

Regulació hormonal i redox dels nivells transcripcionals de vitamina E durant la germinació de llavors *Chamaerops humilis* var. *humilis*

APPENDIX I

Hormonal and redox regulation of vitamin E transcriptional levels during germination of *Chamaerops humilis* var. *humilis* seeds

APPENDIX I: Hormonal and redox regulation of vitamin E transcriptional levels during germination of *Chamaerops humilis* var. *humilis* seeds

The *de novo* synthesis of tocopherols during the germination of *Chamaerops humilis* var. *humilis* seeds (**chapter 2**) could be related to changes in the redox status and hormonal contents of these seeds. The vitamin E content, the hormonal profiling and the hydrogen peroxide (H₂O₂) levels were analysed in four different germination phases: 0, II, III and IV (**Fig. A1**). These analyses were conducted at the University of Barcelona (UB) under the supervision of Dr. Leonor Alegre Batlle and Dr. Sergi Munné Bosch (see **appendix II** for methodological procedures).

The results of the vitamin E amounts confirmed the *de novo* synthesis of tocopherols and showed a decrease of α -, β -, γ - and δ -tocotrienol contents (**Fig. A2**). The hormonal profiling showed that gibberellin₄ (GA₄), jasmonic acid (JA) and 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) amounts increased, while contents of indole-3-acetic acid (IAA) and isopentenyladenine (2-iP) decreased during the germination of *C. humilis* var. *humilis* (**Fig. A3**). Abscisic acid (ABA) levels remained stable (**Fig. A3**) and the H₂O₂ content increased during the germination of this species (**Fig. A4**).

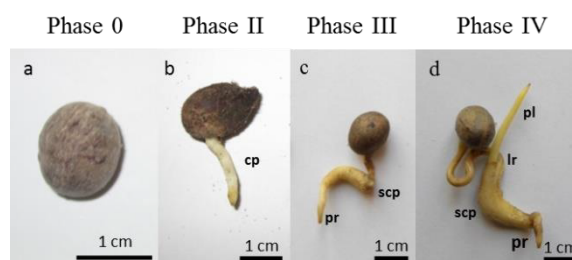


Fig. A1. Germination phases of *Chamaerops humilis* var. *humilis* seeds. a) Non-germinated seed (phase 0); b) seed with the cotyledonary petiole emerging (phase II); c) seed with the primary radicle and the cotyledonary petiole swelled (phase III); d) Appearance of the plumule from the longitudinal rift of the cotyledonary petiole (phase IV). *cp*, cotyledonary petiole; *scp*, swelled cotyledonary petiole; *pr*, primary root; *lr*, longitudinal rift; *pl*, plumule.

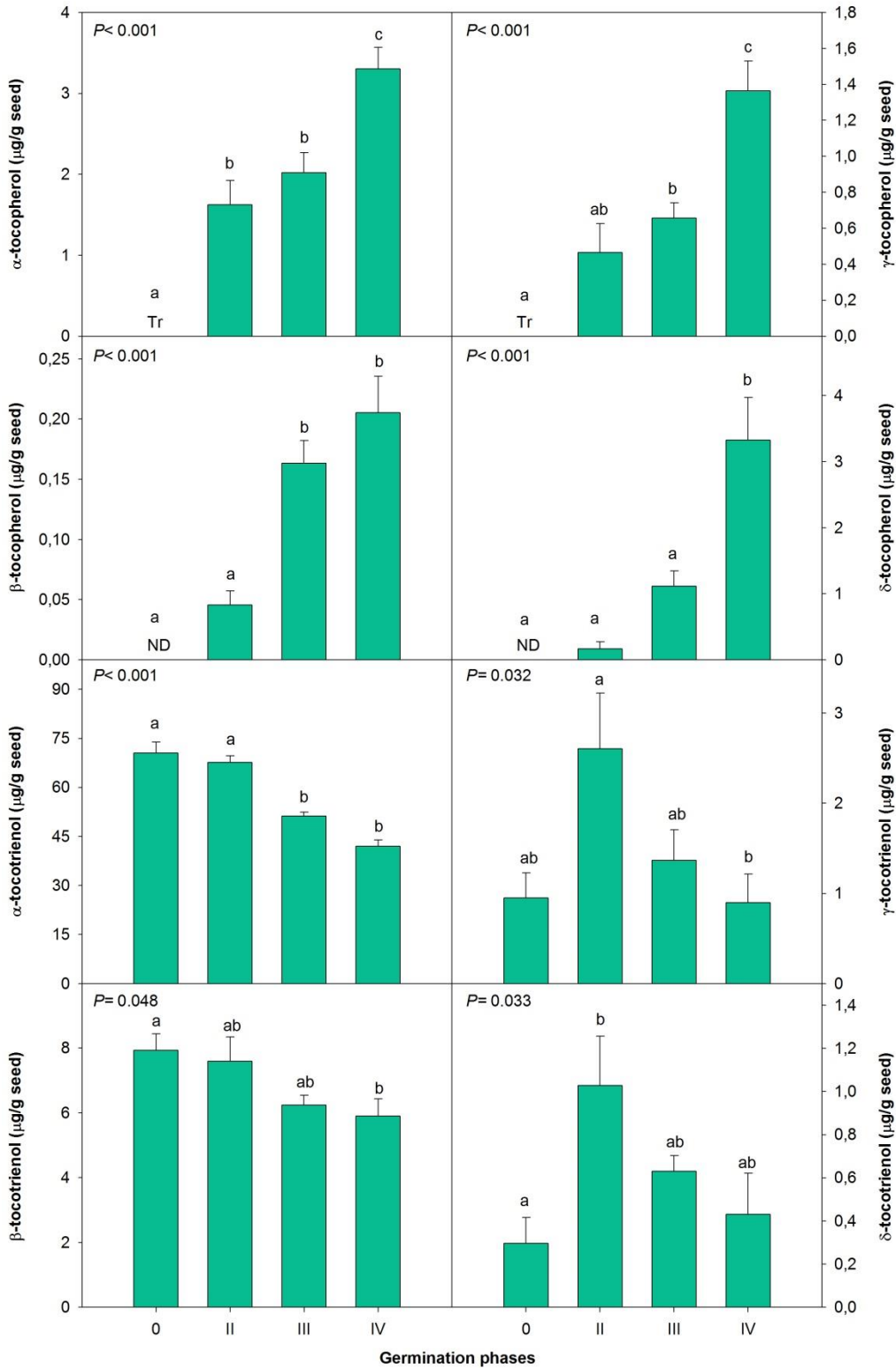


Fig A2. Changes in the levels of α -, β -, γ - and δ -tocopherol and α -, β -, γ - and δ - tocotrienol during germination of *C. humilis* var. *humilis* seeds. Different letters indicate significant differences between phases of germination (ANOVA, $P \leq 0.05$). Phase 0: Non-germinated seeds. Phase II: Emergence of the cotyledonary petiole. Phase III: Swelling of the cotyledonary petiole and appearance of the radicle. Phase IV: Emergence of the plumule and development of the radicle.

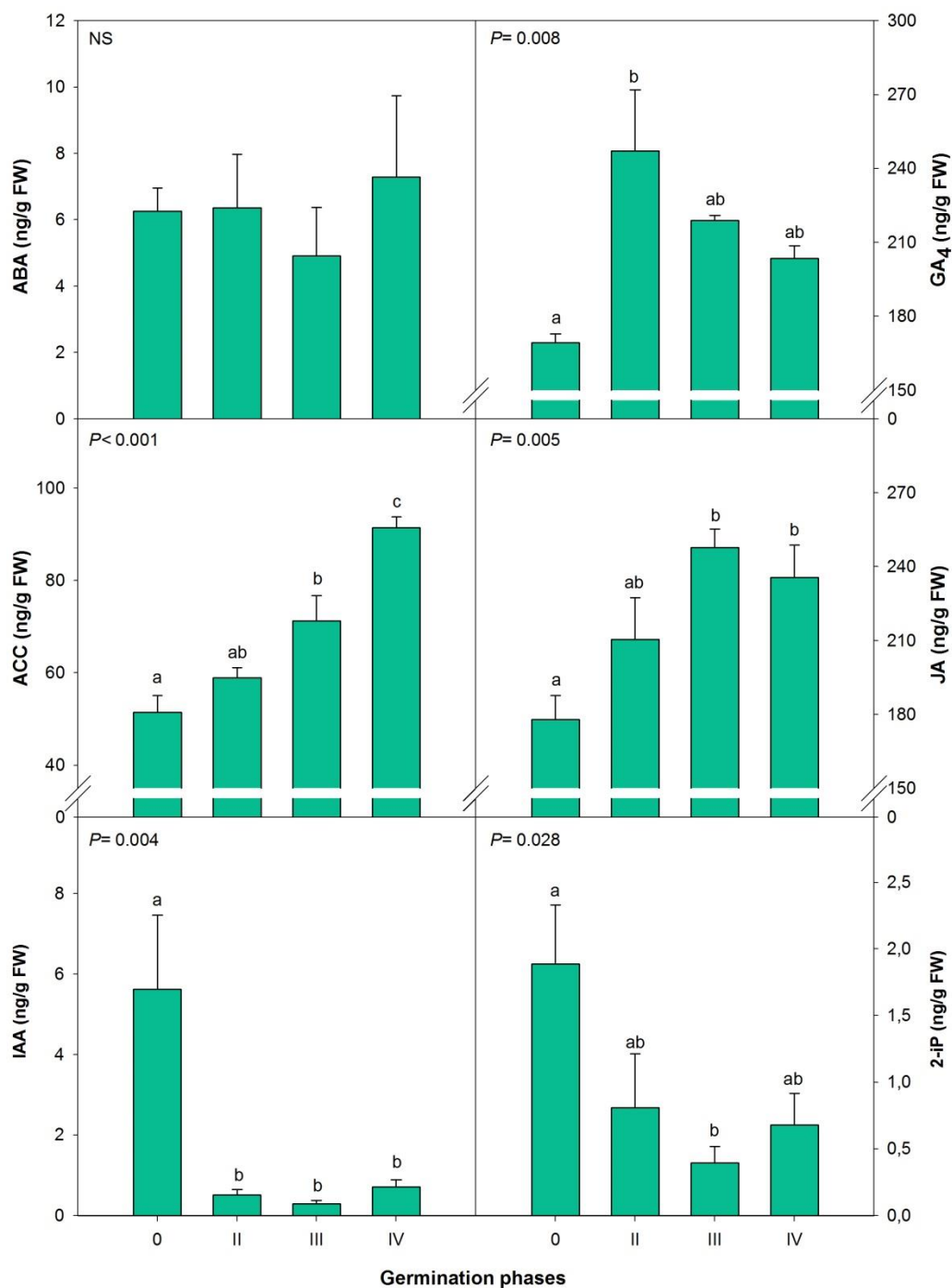


Fig. A3. Contents of abscisic acid (ABA), gibberellin₄ (GA₄), 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), jasmonic acid (JA), indole-3-acetic acid (IAA) and 2-isopentenyl adenine (2-iP) during the germination of *C. humilis* var. *humilis* seeds. Different letters indicate significant differences between phases of germination (ANOVA, $P \leq 0.05$). Phase 0: Non-germinated seeds. Phase II: Emergence of the cotyledonary petiole. Phase III: Swelling of the cotyledonary petiole and appearance of the radicle. Phase IV: Emergence of the plumule and development of the radicle.

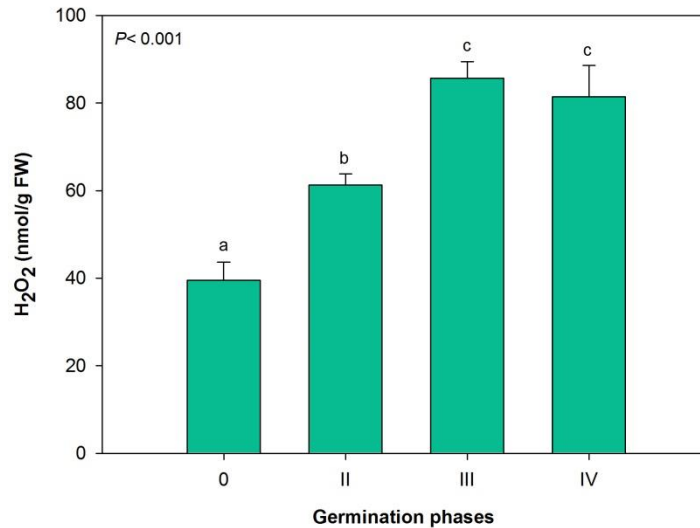


Fig. A4. H₂O₂ levels during the germination of *C. humilis* var. *humilis*. Different letters indicate significant differences between phases of germination (ANOVA, $P \leq 0.05$). Phase 0: Non-germinated seeds. Phase II: Emergence of the cotyledonary petiole. Phase III: Swelling of the cotyledonary petiole and appearance of the radicle. Phase IV: Emergence of the plumule and development of the radicle.

Due to the changes in the vitamin E, hormonal and H₂O₂ levels during the germination of this species, the expression level of some genes of vitamin E biosynthesis were analysed to unravel how vitamin E biosynthesis is regulated during the germination of seeds in this species. The expression levels were analysed under the supervision of Dr. Edgar B. Cahoon at the University of Nebraska (UNL), Lincoln (USA), from January to July of 2016 (see **appendix II** for methodological procedures).

TAT and *HPT* expression levels increased and *HGGT* and γ -*TMT* expression levels decreased, while *TC* levels remained stable during the germination of *C. humilis* var. *humilis* (**Fig. A5**).

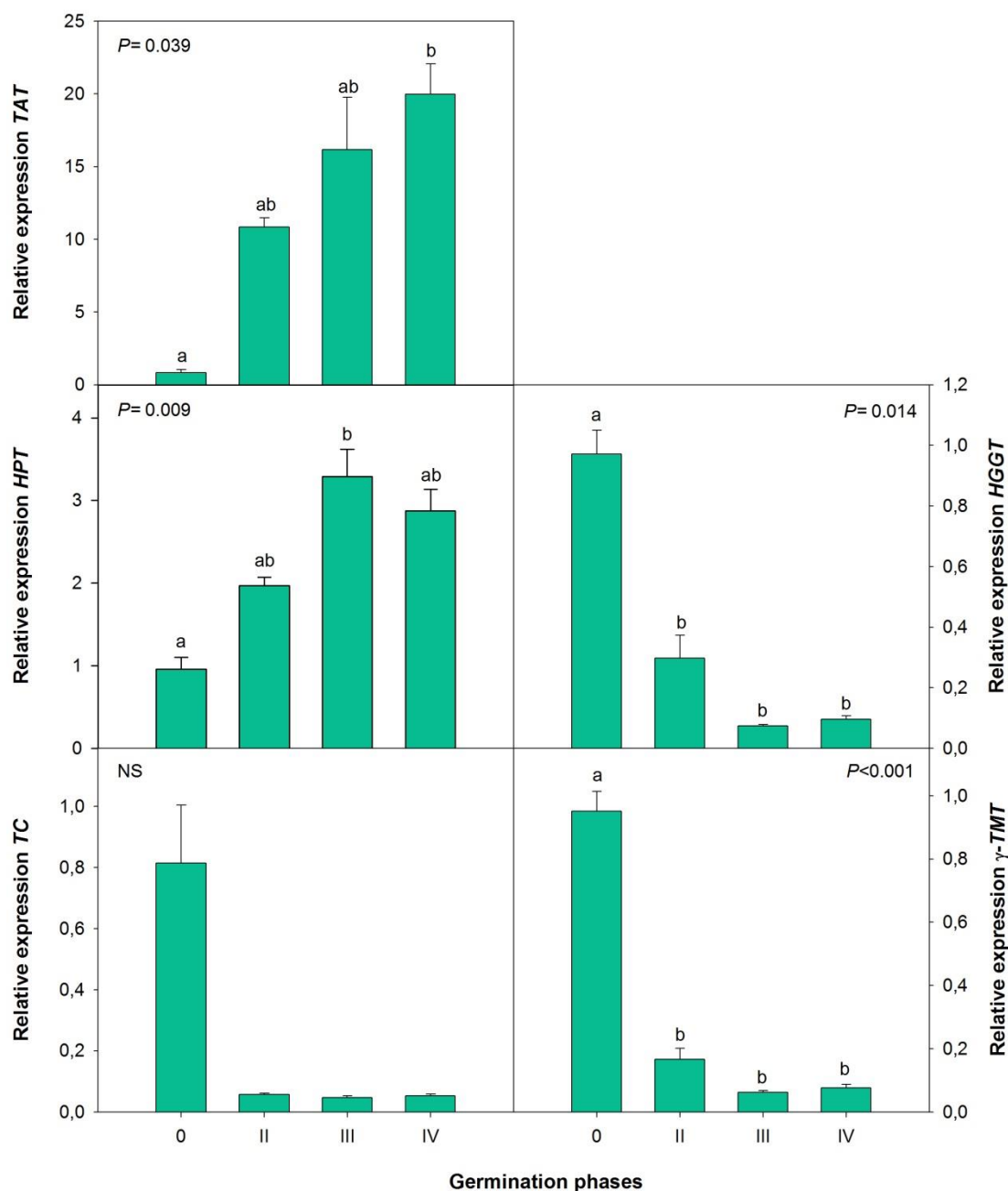
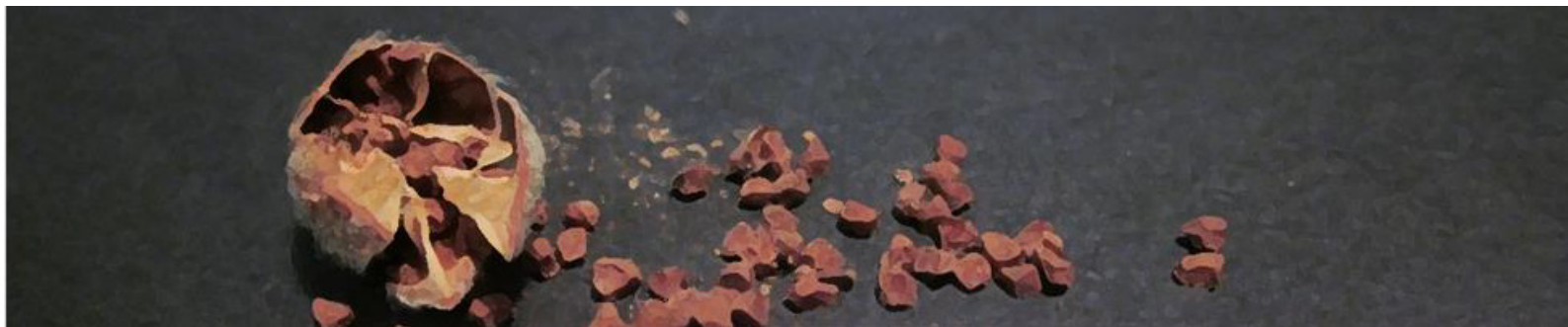


Fig. A5. Variations in relative expression levels of *TAT*, *HPT*, *HGGT*, *TC* and γ -*TMT* during germination of *C. humilis* var. *humilis* seeds. Different letters indicate significant differences between phases of germination (ANOVA, $P \leq 0.05$). Phase 0: Non-germinated seeds. Phase II: Emergence of the cotyledonary petiole. Phase III: Swelling of the cotyledonary petiole and appearance of the radicle. Phase IV: Emergence of the plumule and development of the radicle. NS, not significant



APÈNDIX II

Procediments metodològics

APPENDIX II

Methodological procedures

APPENDIX II: Methodological procedures

In this appendix the methodology used for the hydrogen peroxide and hormonal contents determination, as well as RNA extraction, treatment and conversion to cDNA, primers design, molecular troubleshooting and measurements of the relative expression levels of some vitamin E genes, are explained in more detail.

1. Hydrogen peroxide and hormonal levels determination

For hydrogen peroxide determination, frozen seeds were crushed using a hammer and then milled with a mincer (Philips HR 1396 400W) and with a grinder (Taurus Aromatic 150W). Three replicas of 100 mg for each germination phase were extracted with 1ml of cold 5% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) and a 5% (w/v) of polyvinylpolypyrrolide (PVPP) was added to remove interfering compounds. Samples were vortexed, sonicated using a Branson 2510 ultrasonic cleaner for 20 minutes at 4°C and centrifuged at 13,000 rpm for 10 min at 4°C. The supernatant was recovered, centrifuged and neutralized with Na₂CO₃ 0.2M. Hydrogen peroxide contents were determined in triplicate by the Ferrous-Orange Xylenol (FOX) method after 1 hour of stabilization at room temperature in darkness and quantified at 800 and 550 nm. The extracts were treated with catalase as a negative control for each sample and incubated with ascorbate oxidase to remove interferences by ascorbic acid (Queval *et al.*, 2008).

Endogenous concentrations of abscisic acid (ABA), jasmonic acid (JA), the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), salicylic acid (SA), gibberellins (GAs), auxins and cytokinins of three replicas of 100 mg for each germination phase, obtained as described for the hydrogen peroxide determination, were measured by ultra-high performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry (UPLC/ESI-MS/MS), following the method described by Müller & Munné-Bosch (2011). Deuterated standards were used as internal standards.

2. RNA extraction and DNase treatment

Compared with other vegetal tissues, the RNA extraction of a seed is a complex procedure. Due to the presence of polyphenols and polysaccharides, which precipitate with RNA and DNA, different extraction methods and seed amounts were used to obtain enough RNA amounts with good quality for the genetic assay. The RNA amounts obtained with the cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) method were very low (29.28 ng/ μ l), with low ratios A260/230 and A260/280 (less than 2.0). The extraction method described by Suzuki *et al.* (2004) gave good RNA amounts (between 500 and 700 ng/ μ l) and quality, but only when whole seeds were used. Thus, total RNA was extracted from whole seeds (between 1.3 and 2g according the seed size), which were crushed with the aid of a mortar and a pestle (previously cleaned with chloroform) and liquid nitrogen. The crushed seeds were separated in two 50 ml oak ridge tubes and 20 vol of the extraction buffer were added in total, grinding the seeds again with the aid of a tissue grinder. Then, the tubes were centrifuged at 12,000 g for 5 min at room temperature (RT, **Fig. A1, A**). The supernatant was recovered in new tubes and 1 vol of chloroform: isoamylalcohol (CIA; 24:1) was added, mixing by inversion by hand 15 times (**Fig. A1, B**) and centrifuged at 12,000 g for 7 min at 4°C. Only the upper phase was transferred into a new tube to avoid contaminations (**Fig. A1, C**), and 1 vol of phenol mixture was added. After mixing and incubating for 3 min at room temperature, ½ vol of CIA was added and mixed vigorously for 15 sec by hand. The mixture was centrifuged at 12,000 g for 5 min at 4°C. Only the upper phase was again transferred into a new tube and 0.6 vol of isopropanol was added (**Fig. A1, D**). After mixing and incubating for 10 min at RT and centrifuged at 12,000 g for 15 min at 4°C, the supernatant was poured and the pellet was washed with 5 ml of 75% (v/v) ethanol and centrifuged at 12,000 g for 5 min at 4°C twice. The pellet was air-dried and finally dissolved in 65 μ l of RNase-free water. All the steps were done in a laminar flow cabinet, and no lithium chloride was used because of the quality of the RNA obtained.

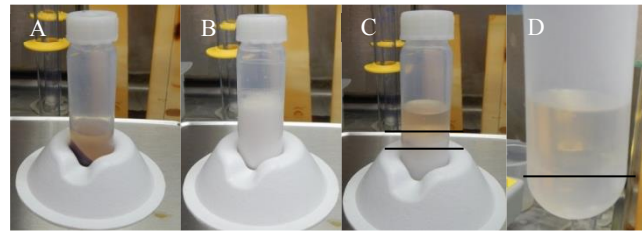


Fig. A1. RNA extraction procedure. The lines in figures C and D indicate the different phases obtained during the extraction.

RNA quality and quantity were determined by taking spectrophotometer readings at 230, 260 and 280 nm (Nanodrop 1000, ThermoFisher Scientific), and 200 ng of RNA were separated on a 0.5% (w/v) agarose gel (**Fig. A2, A**). The RNA was then cleaned up using the RNeasy Plant Kit (Qiagen) according to manufacturer's protocol and treated with DNase I (Invitrogen) for 30 min at 37°C inside a column. To confirm the efficiency of the DNase treatment, the RNA was separated on a 0.5% (w/v) agarose gel (**Fig. A2, B**). Finally, the extracted RNAs were kept at -80° C.

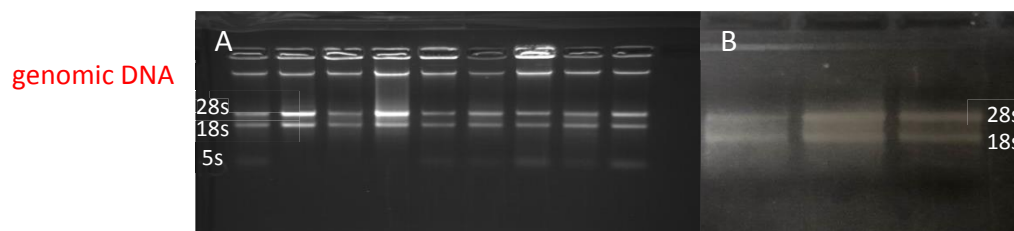


Fig. A2. A) RNA samples from different seeds after the extraction. The genomic DNA and the 28s, 18s and 5s ribosomal RNA are observed. B) RNA samples after the DNase treatment. No genomic DNA is observed.

3. cDNA synthesis

After the DNase treatment, 1 µg of treated RNA was reverse transcribed to cDNA with the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad) according to the manufacturer's protocol.

4. Degenerate primers design

Due to the lack of information of the *C. humilis* var. *humilis* genome, the primer sequences were obtained by two distinct methods. One of them was through the

design of degenerate primers, *i.e.* primers whose sequences are based in the sequences of other species. For their design, homolog protein sequences from other species for the interest genes, especially from monocots and palms, were searched in GenBank. The sequences were found for HPT, HGGT and MPBQ MT, but the actin sequence was obtained by conserved nucleotide sequences, instead of protein sequences, from two palms, *Elaeis guineensis* and *Phoenix dactilyfera* (GenBank accession numbers XM_010938563.1 and XM_008800105.2, respectively) due to the lack of aminoacid sequences of the protein from this gene. Once the homologues sequences were obtained for each gene, they were aligned with the MultAlin interface based on Corpet (1988), and the conserved regions were selected for the primers design (**Fig. A3**). Due to the degeneration of genetic code, more than one codon can codify for the same aminoacid. By using the genetic code, the aminoacid sequences were converted into codons and the degenerate nucleotide sequences were designed using the IUPAC nucleotide code, for each forward and reverse primers of the chosen conserved region (**Fig. A4, Table A1**).

By this procedure, more than one degenerate primer was designed for each gene. The length of the PCR product and the melting temperature (T_m) of the forward and reverse primers were taken into consideration. Once designed, the primers were analysed with the program *Oligo analyser 3.1*, which predicts the capacity of the primer to form dimers with itself (forward-forward) or with the reverse primer (forward-reverse), blocking the cDNA amplification. Due to *HPT* and *HGGT* sequences are very similar (**Fig. A3**), with almost any aminoacid differences in the conserved regions, the same degenerate primers were designed for both enzymes, using the primers for *HPT* previously described by Cahoon *et al.* (2003).

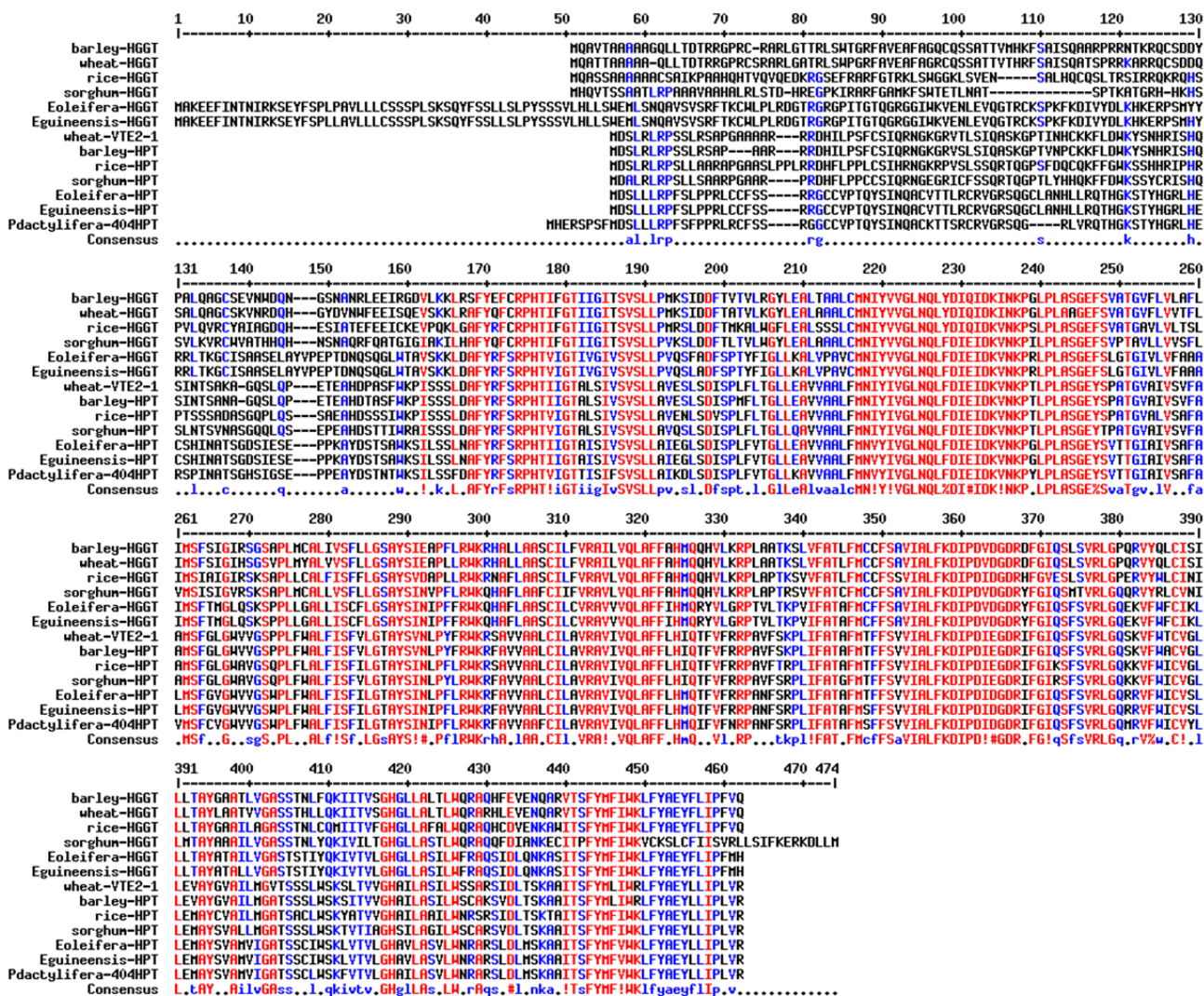


Fig. A3. Alignment of the homologues *HPT-HGGT* protein sequences of some monocots and palms found in GenBank. The red aminoacids indicate coincidence for each sequence in each position (consensus value: 90%), the blue ones represent those aminoacids that are the same in some sequences but not in all of them (consensus value: 50%), and the black ones shows no coincidence between species. The primers were designed from the high conserved regions (red aminoacids) of the sequences.

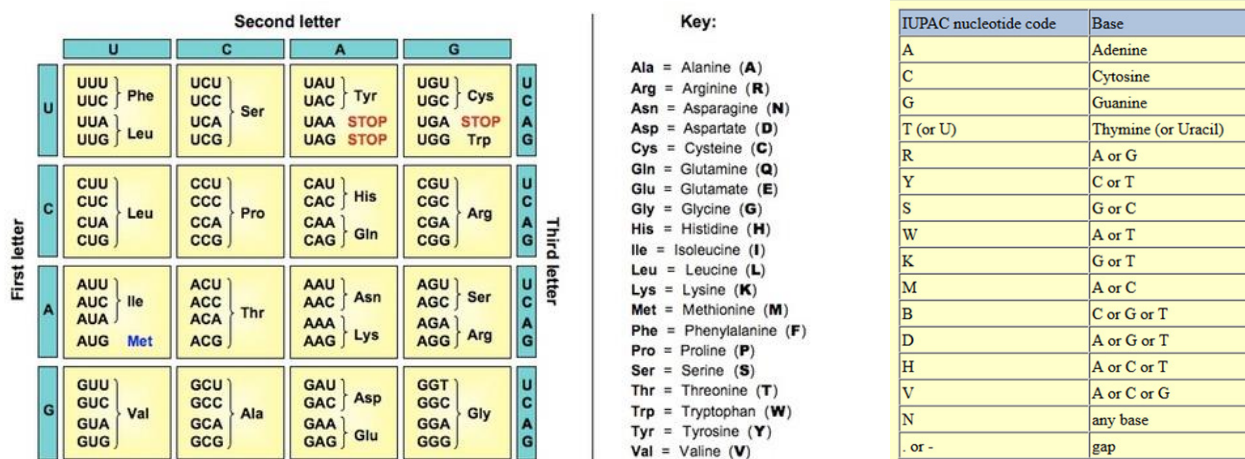


Fig. A4. From left to right: genetic code, aminoacid abbreviations and the IUPAC nucleotide code.

Aminoacid	G	Y	P	V	V	T
Possible codons which codify for the same aminoacid	GGT	TAT	CCT	GTT	GTT	ACT
	GGC	TAC	CCC	GTC	GTC	ACC
	GGA		CCA	GTA	GTA	ACA
	GGG		CCG	GTG	GTG	ACG
Degenerate codon	GGN	TAY	CCN	GTN	GTN	ACN

Table A1. Example of the design of the degenerate nucleotide sequences.

5. Amplification of cDNA with degenerate primers, extraction of the amplified cDNA, purification and ligation into a pCR-Zero Blunt vector

The amplification of the cDNA was complex due to the presence of polymerase inhibitors in the RNA samples. The utilization of the Phusion DNA polymerase (ThermoFisher Scientific) solved this problem. For each reaction, a mix of 4 µl of 5x Phusion HF Buffer + 0.4 µl of dNTPs (10mM) + 1 µl of forward primer (10µM) + 1 µl of reverse primer (10µM) + 1 µl of template + 0.6 µl of DMSO + 0.2 µl of Phusion DNA Polymerase + X µl of RNase free water were used to obtain a final volume of 20 µl. The PCR thermal profile was 98°C x 30 sec followed by 40 cycles of 98°C x 10 sec, 30 sec at a specific melting temperature (T_m) depending on the primers used, 72°C x 30 sec and 72°C x 10 min for the final extension reaction. The PCR products were analysed in a 0.5% (w/v) agarose gel. Due to the unspecificity of the primers for *C. humilis* var. *humilis*, multiple bands were obtained due to unspecific amplifications (**Fig. A5, A**), hence the RT-PCR products were used as a template for a second amplification using the same primers and conditions to reduce the number of the amplifications (**Fig. A5, B**). These PCR products were separated in a 2% (w/v) agarose gel for 2 hours for a good separation of the bands (**Fig A5, C**). Then, they were cut under a UV light, purified with a Gel/PCR DNA fragments extraction kit (IBI Scientific), ligated into a pCR-Zero Blunt vector (Invitrogen) as described in the manufacturer's protocol and transformed into *Escherichia Coli* DH5α cells.

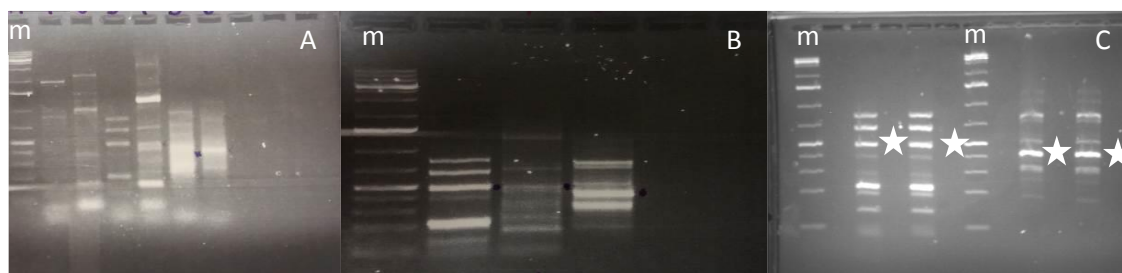


Fig. A5. A) Bands obtained from the first RT-PCR reactions with degenerate primers. Unspecific amplifications are shown. B) Result from a second RT-PCR. Few bands were obtained and the genes of interest appeared more brightly. C) 2% agarose gel. The stars indicate the PCR products of interest. *m*= marker.

6. Transformation into competent *E. coli* cells, extraction and digestion of the PCR products and sequencing

For the transformation, 50 μ l of *E. coli* cells and 5 μ l of the PCR product ligated into the pCR- Zero Blunt vector were placed on ice for 30 min. Then, a heat shock at 42°C was applied for 45 sec. Afterwards, the tubes were placed on ice for 2 min. 1 ml of growth medium Luria Bertani (LB) was added, mixed by inversion and incubated at 37°C during 1h in a shaker (recovery phase). Finally, the cells grew at 37°C overnight on kanamycin LB plates. Therefore, the plates were kept at 4°C until further analyses.

The pCR-Zero Blunt vector has a lethal gen, the *ccdB* (control of cell death), and resistance to two antibiotics (kanamycin and zeocin, **Fig. A6, A**). When the PCR product is ligated into the vector, the lethal gen is inactivated, and due to the *E. coli* cells are not resistant to antibiotics, any colony without the vector can grow in the growth medium (LB) which contains kanamycin. Nevertheless, a 20% of the colonies that can grow in the medium can contain the vector without the PCR product inserted. For this reason, once the colonies grew in plates, 10 colonies were picked and grown in culture tubes with 2 ml of LB and 2 μ l of kanamycin in each tube at 37°C overnight (**Fig. A6, B**). Therefore, the plasmids of each colony were extracted by the High-Speed Plasmid Mini Kit Protocol (IBI Scientific), as described in the manufacturer's protocol (also known as miniprep). Then, the vector was digested with *EcoRI* (ThermoFisher Scientific) as described in the

Appendix II

manufacturer's protocol at 37°C for 1 hour, a restriction enzyme that cuts it near the place where the PCR product has been inserted (**Fig. A6 A, C**). If the PCR product had a region for the EcoRI enzyme, it was also cut. Finally, the result of the digestion was analysed in a 0.5% (w/v) agarose gel, only sequencing the plasmids with the correct PCR product inserted into the vector. Once the plasmids were sequenced, their sequences were compared with BLAST to confirm if the amplified PCR product were the ones of interest. By the degenerate primers design and the RT-PCR, cloning and sequencing steps, only the sequences for *actin*, *HPT* and *MPBQ MT* of *C. humilis* var. *humilis* were obtained. In addition, the *HGGT* sequence from barley was also obtained due to some contamination in the lab.

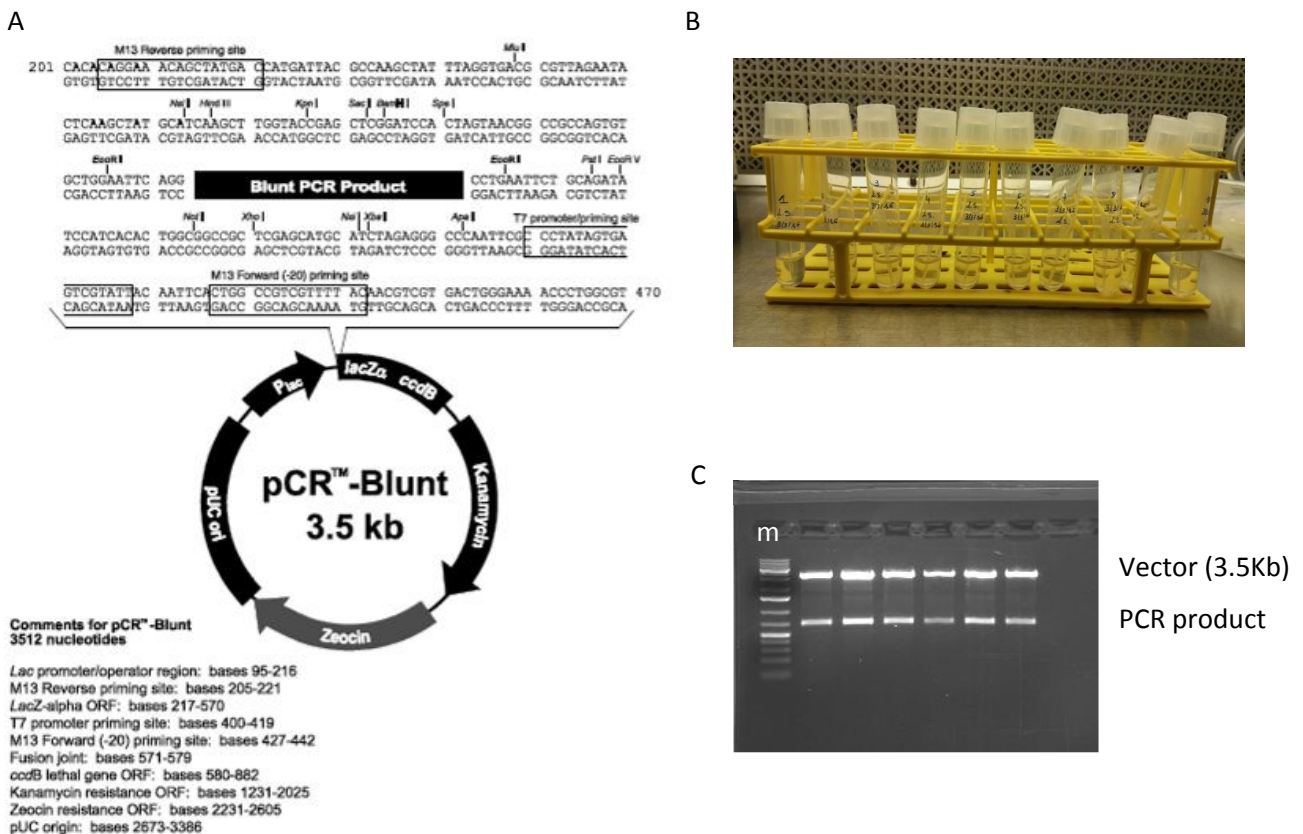


Fig. A6. A) pCR- Zero Blunt vector. The sequences, the restriction enzymes and the regions where the primers M13 and T7 can amplify the vector are shown. B) Picked colonies growing in a culture tube with LB and kanamycin. C) Result from a digestion with EcoRI. The first band corresponds to the vector (3.5Kb) and the second one, to the PCR product, in this case, of 700 bp. *m*=marker; *Kb*= kilo base.

7. Obtaining the *C. humilis* var. *humilis* HGGT sequence

Due to the high aminoacid similarity between the HPT and HGGT protein sequences, the *HPT-HGGT* degenerate primers from Cahoon et al. (2003) can amplify both enzymes in the case they were both present in the cDNA sequence. A colony PCR was done to find the *HGGT* sequences by using the M13 primers and the primers obtained from the barley's *HGGT* sequence. First of all, 16 colonies that grew in the LB plates from the ligation and transformation of the PCR products obtained from the *HPT-HGGT* degenerate primers amplification were selected. Each colony was picked with a tip and placed in single tubes with 70 µl of RNase free water. After mixing, two drops of each tube were placed in a LB plate with kanamycin overnight at 37°C and then placed into the fridge (4°C) for future analysis. The colonies in the tubes were broken at 95°C for 10 min and centrifuged for 30 sec. Using the supernatant as a template for the PCR, the PCR reaction was done with the M13 forward and reverse primers to confirm that the colonies had the PCR product inserted into the vector. In this case, for each reaction, a mix of 2.5 µl of 10x Buffer (Thermo Scientific + (NH₄)₂SO₄-MgCl₂) + 3 µl of template + 1 µl of M13 forward primer + 1 µl of M13 reverse primer + 1.5 µl of 25mM MgCl₂ + 0.5 µl of dNTPs (10 mM) + 0.5 µl of Homemade Taq Polymerase + X µl of RNase free water to a final volume of 25 µl was used. The PCR thermal profile was 95°C x 2 min followed by 35 cycles of 95°C x 30 sec, 50°C x 30 sec, 72°C x 1 min and 72°C x 10 min. 14 colonies out of the 16 had a PCR product inside the vector. These 14 colonies were picked from the plate and used as a template for a new PCR with the primers from the barley's *HGGT* sequence. The procedure and the PCR conditions were the same as for the M13 primers. 12 out of the 14 colonies were amplified; hence, these 12 colonies contained the *HGGT* from barley (**Fig. A7**). From the 2 colonies that were not amplified, they were purified and digested with EcoRI. Both PCR products were different and sent to sequence, being only one of them the *HGGT* sequence from *C. humilis* var. *humilis*. This sequence showed a 93% of similarity with the *HGGT* sequence from *Elaeis guineensis* and *Elaeis oleifeira* available in the GenBank.

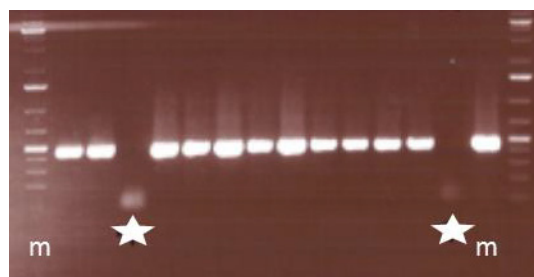


Fig. A7. Result from the colony PCR using the primers from the barley's *HGGT* sequences. 12 out of 14 colonies were amplified with these primers. Only two colonies were not amplified (marked with stars). *m*=marker.

8. RNASeq

The RNA of two seeds were extracted and sent to an enterprise for sequencing. Because the RNASeq data had too low coverage to do a transcriptome assembly, the sequences for the genes of interest were reconstructed by mapping the RNASeq data to the reference sequences of *Elaeis guineensis* found in GenBank, starting with a fairly strict similarity score and slowly relaxing it until there was higher ambiguity and the sequences generated from the strict mapping started changing. By this procedure, the *TAT*, *HPPD*, *GGR*, γ -*TMT* and *TC* sequences were obtained, and the *actin*, *HPT*, *HGGT* and *MPBQ* *MT* sequences were confirmed. The relaxed, moderate and strict sequences for the same genes were aligned and consensus regions were selected for the primer designs.

9. RNA extraction, DNase treatment and cDNA conversion for the Reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR)

For gene expression analyses, RNA was extracted as explained previously (section 2. RNA extraction and DNase treatment), but due to RNA degradation, it was not cleaned up with the RNeasy Plant Kit (Qiagen). 4 μ g of RNA were treated with 6 μ l of DNase I (Invitrogen) for 15 minutes at RT, and then 25mM of EDTA were added and the DNase was inactivated at 65°C for 10 minutes. 1 μ g of treated RNA was then reverse transcribed to cDNA with the iScript cDNA synthesis kit (BIO-RAD). The conversion with this kit was not very efficient and in many samples the conversion to cDNA was low, also showing some genomic DNA (Fig. A8, A). The

SuperScript IV Vilo Master Mix kit (ThermoFisher Scientific) was used according to the manufacturer's protocol, which gave much cleaner cDNA than the Bio-Rad kit used previously with a better conversion from ARN to cDNA (**Fig. A8, B**). The efficiency of the conversions was tested by RT-qPCRs using actin as a primer. This primer binds to the cDNA and also to the genomic DNA. Although the treatment with DNase, the RNA contained genomic DNA that was not observed in the gel after the DNase treatment but was amplified in the RT-qPCR reactions. When the actin primers amplified the genomic DNA, the amplicon length was bigger than the amplicon obtained from the amplification of the cDNA. If the RNA was not converted to cDNA, no band appeared. If the sample contained genomic DNA, a band of 250bp appeared. The samples with cDNA had a band of 150bp and if the sample was only partially converted and also contained genomic DNA, double bands appeared (250bp and 150bp). Due to the difficulty of the RNA extraction from the samples, the removal of the genomic DNA and the conversion to cDNA, a RT-qPCR with actin primers was always done with the respective –RT sample to assure the good conversion to cDNA.



Fig. A8. Results from a RT-qPCR using actin as a primer. Samples and –RT of some samples are shown. A) Result from a RT-qPCR using as a template the cDNA converted by the iScript cDNA synthesis kit (BIO-RAD). The red boxes indicate that the primer amplified genomic DNA, the blue boxes indicate that the primer amplified genomic DNA and RNA and only 6 samples (the yellow boxes) amplified actin only from the cDNA. B) Result from a RT-qPCR using as a template the cDNA converted by the SuperScript IV Vilo Master Mix kit (ThermoFisher Scientific). In this case, except the first sample, the conversion of the other samples was very efficient, only amplifying actin from the cDNA (yellow boxes). *m*= marker.

10. *Chamaerops humilis* var. *humilis* specific RT-qPCR primers design

Once the specific sequences of the genes of interests were obtained, specific primers for the RT-qPCR were designed with a length of 120-220 bp and a similar *T_m* for each gene (**Table A2**).

11. Optimization of RT-qPCR conditions and efficiency of the RT-qPCR

The optimization of the RT-qPCR conditions was done to avoid amplification of unspecific products. At the end of each RT-qPCR, the PCR products were analysed in a 3% agarose gel. Once the optimal conditions were confirmed, the efficiency of the RT-qPCR for each primer was tested. For this, 1/10 dilutions of the cDNA sample were done and the RT-qPCR was performed for each gene using the diluted cDNAs as templates. With the RT-qPCR results, a standard curve between the \log_{10} of the cDNA and the threshold cycle (Ct) was done for each gene and the slope was calculated, so that the qPCR efficiency was determined with the ThermoFisher qPCR efficiency calculator, being around a 100% efficient for each primer.

12. RT-qPCR measurements of *Chamaerops humilis* var. *humilis* vitamin E genes

RT-qPCR was carried out in a Bio-Rad MyiQ iCycler qPCR instrument using 1 μg of cDNA and SYBR Green was used as the fluorophore in a qPCR supermix (Qiagen). The thermal profile was: 95°C x 15 min, followed by 45 cycles of 94°C x 15 sec, 60°C x 30 sec, 72°C x 30sec. The PCR products were further analysed by a dissociation curve program (95°C \times 1 min, 60°C \times 1 min and 95°C \times 15 s) and all the reactions gave a single peak. All genes were analysed but the levels of *GGR*, *HPPD* and *MPBQ MT* could not be measured due to the same band amplification was obtained for both sample and the -RT, meaning that the primer could be amplifying genomic DNA from the cDNA sample or a mix between the genomic DNA and the cDNA (**Fig. A9**). Data for *TAT*, *HGGT*, *HPT*, *TC* and γ -*TMT* were analysed using the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method. All RT-qPCRs were run in triplicates with different cDNAs synthesized from three biological replicates for each germination phase and genes. Actin was used as an internal reference gene.

Oligonucleotide	Oligonucleotide sequence	Amplicon length	T _m
actin 5' actin 3'	5'-GACCCAAATCATGTTTGAGAC-3' 5'-CATATCCTTCATAGATTGGAAC-3'	152 bp	60°C
TAT 5' TAT 3'	5'-GCTCATATTGAAGCACTGCAAT-3' 5'-CAATGACAAAACCTGGAACC-3'	164 bp	60°C
HPPD 5' HPPD 3'	5'-GAGCCAAATCCAAACATATCTG-3' 5'-GACTCCCTGGTAGTAATTCGG-3'	165 bp	60°C
HPT 5' HPT 3'	5'-GCAATTGTTTCAGCTTTTGCTG-3' 5'-CGACTGCAAATCTCTCCATCTC-3'	151 bp	60°C
HGGT 5' HGGT 3'	5'-GGGCGACCAATAGTGTTGAC-3' 5'-ACTTGATGCAAAAACAAAACAC-3'	178 bp	60°C
GGR 5' GGR 3'	5'-GAGGGCGGAGATGTACGTC-3' 5'-CTCCCACCCTCGATCTTGT-3'	174 bp	60°C
MPBQ MT 5' MPBQ MT 3'	5'-GGTGTTTCGTCGGCATGGTC-3' 5'-GATGAAGCGCAAGAGGAAGG-3'	143 bp	65°C
TC 5' TC 3'	5'-GTTGGATAGAGTGGGATGGTG-3' 5'-CTTCCTCATGCCACCTGC-3'	166 bp	60°C
γ-TMT 5' γ-TMT 3'	5'-GCATATTACCTACCAGCCTG-3' 5'-CTTCGTAACAGTGATGTGAAAC-3'	170 bp	60°C

Table A2. RT-qPCR primer sequences, amplicon length and T_m for each gene sequence used for relative quantification of gene expression in *Chamaerops humilis* var. *humilis*.

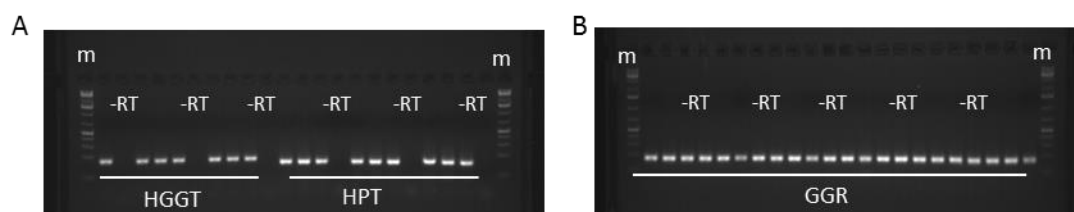


Fig. A9. A) Amplification of three methodological replicates for *HGGT* and *HPT*. The -RT was not amplified. B) For the *GGR*, the samples and the -RT showed the band amplified. The same pattern was observed for *HPPD* and *MPBQ MT*.

References

Cahoon EB, Hall SE, Ripp KG, Ganzke TS, Hitz WD, Coughlan SJ. 2003. Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. *Nature Biotechnology* **21**, 1082-1087.

Corpet F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic*

Acids Research **16**, 10881-10890.

Müller M, Munné-Bosch S. 2011. Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Plant Methods* **7**, 37.

Queval G, Hager J, Gakière B, Noctor G. 2008. Why are literature data for H₂O₂ contents so variable? A discussion of potential difficulties in the quantitative assay of leaf extracts. *Journal of Experimental Botany* **59**, 135-146.

Suzuki Y, Kawazu T, Koyama H. 2004. RNA isolation from siliques, dry seeds, and other tissues of *Arabidopsis thaliana*. *BioTechniques* **37**, 542-544.