



Escola de Camins
Escola Tècnica Superior d'Enginyeria de Camins, Canals i Ports
UPC BARCELONATECH

Estudio metabólico de los efectos relacionados con la escasez de agua durante el crecimiento de los cultivos de arroz (*Oryza sativa japonica*)

Treball realitzat per:

Guillermo Iriondo Frias

Dirigit per:

Dr. Joaquim Jaumot Soler (CSIC-IDAEA)

Prof. Joan García (UPC)

Màster en:

Enginyeria Ambiental

Barcelona, 23 de juny del 2016

Departament d'Enginyeria Hidràulica, Marítima i Ambiental

TREBALL FINAL DE MÀSTER

Agradecimientos

Mi sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su soporte, orientación y conocimientos han hecho posible la realización de este trabajo.

Al Prof. Joan García agradecerle su tutoría durante el curso y al Prof. Romà Tauler por darme la oportunidad de participar en este proyecto.

Especialmente agradecer al Dr. Joaquim Jaumot Soler y a Meritxell Navarro su paciencia, dedicación y enseñanzas. Han sido mis guías y referentes en este proyecto. Dar las gracias también a todos los compañeros del laboratorio que me han hecho sentir uno más del grupo desde el primer día.

Finalmente, agradecer a mis padres su paciencia y ánimos en los momentos de más incertidumbre.

Resumen

La metabolómica consiste en el estudio de los compuestos de bajo peso molecular (metabolitos) de un organismo vivo. Los metabolitos están involucrados en la mayoría de procesos biológicos y, por lo tanto, su cuantificación e identificación aportan información sobre el estado celular del organismo. El estudio de los perfiles metabólicos permite la comparación entre organismos sometidos a una perturbación determinada y organismos a los que no se aplica esta perturbación. De esta forma, se estudian sistemáticamente los cambios en los perfiles químicos (aparición o desaparición de compuestos) provocados por perturbaciones a las cuales se encuentra sometido el organismo como pueden ser, por ejemplo, efectos ambientales como la escasez de agua.

En este proyecto se estudian los cambios a nivel fenotípico y lipidómico (metabolitos hidrofóbicos) provocados por la falta de agua y el aumento de la temperatura durante las etapas de crecimiento de un organismo vegetal modelo, concretamente el arroz (variedad *Oryza sativa japonica*). Con el fin de conseguir este objetivo se lleva a cabo todo el proceso de estudio metabolómico comenzando con el cultivo de las plantas en las condiciones ambientales estresantes y de control, el análisis cromatográfico y fenotípico de las muestras y, finalmente, el análisis quimiométrico e interpretación biológica de los resultados. El estudio fenotípico ha permitido establecer una tendencia orientativa sobre los efectos de la sequía en el crecimiento de las plantas. Respecto al estudio lipidómico, los lípidos más afectados por los factores ambientales estudiados pertenecen a los grupos de lípidos estructurales de membrana (glicerofosfolípidos) y de lípidos de almacenamiento (ácidos grasos).

En conclusión, se puede afirmar que la sequía producida por una cantidad insuficiente de agua disponible y/o un aumento de la temperatura reduce el crecimiento de la planta ya que estos factores ambientales producen cambios a nivel físico y metabólico.

Palabras clave: Metabolómica, *Oryza sativa japonica*, lipidómica, fenotipo, perturbación, escasez, temperatura, metabolitos, cromatografía, quimiometría, glicerofosfolípidos, ácidos grasos.

ÍNDICE

1. Introducción	13
1.1. La era de las "ómicas"	13
1.2. Metabolómica y lipidómica	15
1.3. Estudio metabolómico/lipidómico	18
1.3.1. Organismo modelo	19
1.3.2. Factores ambientales	22
1.3.2.1. Temperatura.....	23
1.3.2.2. Agua.....	24
1.3.3. Aproximaciones metabolómicas	25
1.3.4. Muestreo, almacenamiento e interrupción del metabolismo.....	25
1.3.5. Extracción de los metabolitos	26
1.3.6. Técnicas instrumentales de análisis	27
1.3.7. Tratamiento quimiométrico de los datos.....	29
1.3.7.1. Método de componentes principales (PCA).....	32
1.3.7.2. Estudio de la significación de los factores (ASCA).....	33
1.3.7.3. Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA).....	33
2. Objetivos.....	37
3. Metodología	39
3.1. Cultivo de arroz.....	39
3.2. Condiciones de crecimiento del arroz	40
3.3. Muestreo	42
3.4. Estudio fenotípico.....	42
3.4.1. Protocolos de medida de los estudios fenotípicos.....	43
3.5. Estudio lipidómico	44
3.5.1. Extracción de los lípidos	44

3.5.2. Reconstrucción de muestras y preparación de los controles de calidad (QCs).....	45
3.5.3. Análisis cromatográfico y quimiométrico.....	46
4. Resultados.....	49
4.1. Estudio fenotípico.....	49
4.1.1. Longitud del tallo y las raíces	49
4.1.2. Área de la parte aérea.....	51
4.1.3. Contenido de agua	52
4.2 Análisis lipidómico.....	53
4.2.1. Parte aérea.....	55
4.2.1.1. Análisis de componentes principales	55
4.2.1.2. Estudio de la significación de los factores (ANOVA-ASCA).....	59
4.2.1.3. Análisis discriminante (PLS-DA)	59
4.2.2. Raíces	63
4.2.2.1. Análisis de componentes principales	63
4.2.2.2. Estudio de la significación de los factores (ANOVA-ASCA).....	66
4.2.2.3 Análisis discriminante (PLS-DA)	66
4.3. Interpretación biológica de los resultados	70
5. Conclusiones	73
6. Referencias bibliográficas.....	76

Índice de figuras, tablas y ecuaciones

Figuras

Figura 1. Cascada "ómica".....	14
Figura 2. Grupo funcional éster (R y R': cadena hidrocarbonada de elevado peso molecular).....	16
Figura 3. Estructuras de las grasas neutras.....	16
Figura 4. Estructura general de los fosfolípidos.....	17
Figura 5. Estructuras principales de un esfingolípido.....	17
Figura 6. Estructura general de las ceras.....	17
Figura 7. Estructura base de los esteroides.....	18
Figura 8. Esquema de trabajo seguido en un estudio metabolómico.....	19
Figura 9. Organismos modelo.....	20
Figura 10. Genealogía de la evolución del arroz cultivado propuesta por Morishima (1976).....	21
Figura 11. <i>Oryza sativa</i> (autor Franz Eugen Köhler).....	22
Figura 12. Imagen de un estoma al microscopio.....	23
Figura 13. Etapas del tratamiento de datos en un estudio metabolómico.....	30
Figura 14. Conversión de datos y gráficos correspondientes al espectro de masa y al TICs.....	31
Figura 15. Procedimiento de aplicación del análisis de componentes principales para un conjunto de datos.....	32
Figura 16. Obtención de los diagramas de scores y loadings.....	34
Figura 17. Distribución de los semilleros.....	39
Figura 19. Cámara Panasonic MLR-352H.....	40
Figura 18. Semillero preparado para iniciar la etapa experimental.....	40
Figura 20. Ciclos diarios de intensidad lumínica, humedad y rangos de temperatura de la cámara de crecimiento.....	41
Figura 21. Cultivo de arroz en la cámara de crecimiento.....	42
Figura 22. Cálculo del área de la planta seleccionada con el programa ImageJ.....	43
Figura 23. Extracción MTBE para lípidos.....	45
Figura 24. Longitud promedio del tallo para cada condición de riego en: A) Rango de temperatura: 22-28°C; B) Rango de temperatura: 25-31°C).....	50
Figura 25. Longitud promedio de las raíces para cada condición de riego: A) Rango de temperatura: 22-28°C; B) Rango de temperatura: 25-31°C).....	50
Figura 26. Área promedio de la parte aérea para cada condición de riego en: A) Rango de temperatura: 22-28°C; B) Rango de temperatura: 25-31°C.....	51
Figura 27. Contenido de agua promedio de la parte aérea para cada condición de riego en: A) Rango de temperatura: 22-28°C; B) Rango de temperatura: 25-31°C.....	52

Figura 28. Contenido de agua promedio de las raíces para cada condición de riego en: A) Rango de temperatura: 22-28°C; B) Rango de temperatura: 25-31°C	53
Figura 29. Ejemplo de TIC obtenido del análisis cromatográfico	54
Figura 30. Gráfico score en modo positivo y negativo para las muestras de la parte aérea.....	55
Figura 31. Comparación de las muestras de la parte aérea en el rango de temperaturas altas y los controles de calidad (QC) en: A) Ionización positiva; B) Ionización negativa.	55
Figura 32. Gráficos scores de cada grupo de riego de la parte aérea: A) Baja temperatura modo positivo; B) Baja temperatura modo negativo; C) Alta temperatura modo positivo; D) Alta temperatura modo negativo.	56
Figura 33. Gráficos scores en positivo de los dos rangos de temperatura de la parte aérea: A) Temperatura baja vs alta; B) Identificación de cada grupo (nivel de riego, recuperación y temperatura); C) Temperatura baja vs alta (sin muestras control).....	57
Figura 34. Gráficos scores en negativo de los dos rangos de temperatura de la parte aérea: A) Temperatura baja vs alta; B) Identificación de cada grupo (nivel de riego, recuperación y temperatura); C) Temperatura baja vs alta (sin muestras control).....	58
Figura 35. Diagramas scores de las partes aéreas comparando: A) Rangos de temperatura en modo positivo; B) Rangos de temperatura en modo negativo; C) Condiciones de riego en modo positivo; D) Condiciones de riego en modo negativo.....	60
Figura 36. Diagramas de VIPs de la parte aérea comparando: A) Rangos de temperatura en modo positivo; B) Rangos de temperatura en modo negativo; C) Niveles de riego en modo positivo; D) Niveles de riego en modo negativo.	61
Figura 37. Proporción de cada categoría de lípidos en el análisis discriminantes de la temperatura en ionización positiva de las muestras de las partes aéreas.	62
Figura 38. Gráficos scores en modo positivo y negativo para las muestras de las raíces.....	63
Figura 39. Comparación de las muestras de las raíces en el rango de temperaturas altas y los controles de calidad (QC) en: A) Ionización positiva; B) Ionización negativa.....	64
Figura 40. Gráficos scores de cada grupo de riego de las raíces: A) Baja temperatura en modo positivo; B) Baja temperatura en modo negativo; C) Alta temperatura en modo positivo; D) Alta temperatura en modo negativo.	65
Figura 41. Gráficos scores de los dos rangos de temperatura de las raíces en: A) Ionización positiva; B) Ionización negativa.	65
Figura 42. Diagramas scores de las raíces comparando: A) Rangos de temperatura en modo positivo; B) Rangos de temperatura en modo negativo; C) Condiciones de riego en modo positivo; D) Condiciones de riego en modo negativo	67

Figura 43. Diagramas loadings de las raíces comparando: A) Rangos de temperatura en modo positivo; B) Rangos de temperatura en modo negativo; C) Niveles de riego en modo positivo; D) Niveles de riego en modo negativo.68

Figura 44. Proporción de cada categoría de lípidos en el análisis discriminante de la temperatura en ionización positiva de las muestras de las raíces.69

Figura 45. Células vegetales en condiciones de: A) Turgencia; B) Plasmólisis.....70

Tablas

Tabla 1. Efectos de la temperatura en los diferentes estados de crecimiento de la planta de arroz.....24

Tabla 2. Tabla de diagnóstico del modelo PLS-DA.....35

Tabla 3. Método de elución aplicado.....46

Tabla 4. Diseño experimental.....54

Tabla 5. *p*-valores de los factores y las interacciones entre ellos de los datos de las partes aéreas.....59

Tabla 6. Diagnóstico del modelo PLS-DA de la parte aérea para la comparación de las temperaturas en modo positivo.....60

Tabla 7. Resultados obtenidos comparando los dos rangos de temperatura en modo positivo en las muestras de las partes aéreas.....62

Tabla 8. *p*-valores de los factores y las interacciones entre ellos de los datos de las raíces.....66

Tabla 9. Diagnóstico del modelo PLS-DA de las raíces para la comparación de las temperaturas en modo positivo.....67

Tabla 10. Resultados obtenidos comparando los dos rangos de temperatura en modo positivo en las muestras de las raíces.....69

Ecuaciones

Ecuación 1. Relación entre las velocidades de reacción con un aumento de 10°C.....23

Ecuación 2. Cálculo del % de humedad.....43

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

Actualmente la explotación no sostenible de los recursos naturales y la intervención humana en el medio ambiente ha generado un desequilibrio en los diferentes ecosistemas naturales, generando graves impactos en el suelo, el agua i la atmósfera.

En el caso de los recursos hídricos, solo el 3% del volumen total de agua del planeta es agua dulce. De este porcentaje solo el 1% se encuentra en estado líquido aprovechable para el consumo humano. A pesar de que el agua es un recurso renovable, las actividades humanas han alterado directa e indirectamente la calidad y cantidad de este recurso¹.

A causa de la aceleración del cambio climático actual es muy probable que el aumento de la temperatura altere los patrones globales de circulación atmosférica y los ciclos hidrológicos, modificando los patrones de precipitación regional. Los modelos climáticos más aceptados a nivel mundial prevén un aumento de las precipitaciones en los trópicos y las latitudes altas y una disminución en zonas subtropicales. En consecuencia, se prevé un incremento de los fenómenos extremos, un menor número de días de lluvia y períodos de sequía más prolongados².

El ser humano también se enfrenta a una crisis alimentaria a nivel mundial a causa del aumento de la inseguridad alimentaria y la malnutrición. Las actividades agrícolas son uno de los instrumentos más eficaces para cubrir las necesidades alimentarias de la población³. Por este motivo es importante tener en cuenta los factores que pueden generar serias amenazas para la producción agrícola. Entre los factores bióticos más importantes destacan las plagas y las enfermedades biológicas. Respecto a los factores abióticos destacan la sequía, la salinidad, la temperatura, la contaminación y la deficiencia nutricional⁴.

Delante de este escenario en el que las dos crisis están fuertemente relacionadas, se propone estudiar el efecto de la falta de agua y la temperatura en un cultivo modelo, concretamente el arroz (*Oryza sativa japonica* Nipponbare), para ampliar el conocimiento sobre la respuesta del organismo sometido a condiciones de estrés. Así, se estudia los cambios inducidos en el arroz considerando los niveles fenotípico y metabolómico. Debido a la gran diversidad de metabolitos que hay dentro de un organismo, se decide centrar el estudio en el análisis de lípidos ya que son moléculas orgánicas de vital importancia en determinadas funciones de los organismos vivos como la reserva energética (*i. e.* triglicéridos), estructural (*i. e.* fosfolípidos en las membranas celulares) y reguladora (*i. e.* esteroides).

1.1. La era de las "ómicas"

El estudio de los organismos vivos a nivel molecular tiene como objetivo entender la totalidad de los mecanismos bioquímicos y analizar las respuestas biológicas generadas por perturbaciones externas. A

causa de la elevada complejidad del funcionamiento de los seres vivos y los diferentes niveles de estudio se han desarrollado distintas disciplinas que se agrupan dentro de las ciencias "ómicas".

El sufijo -ómico u -oma deriva del griego y se define como "totalidad o conjunto de". Este sufijo se usa en los estudios que pretenden obtener el máximo de información posible sobre un organismo modelo en un momento concreto y unas condiciones determinadas⁵.

Se trata de disciplinas holísticas ya que requieren conocimientos multidisciplinares de biología, química, física, estadística, entre otras. El objetivo de las "ómicas" es entender el funcionamiento global de un organismo a partir del funcionamiento de cada una de sus partes y de las interacciones entre ellas. Por estos motivos es necesario desarrollar un conjunto de técnicas experimentales e informáticas que permitan la generación de las muestras, su análisis instrumental y el posterior tratamiento e interpretación de los datos obtenidos.

Las cuatro disciplinas "ómicas" principales son la genómica, la transcriptómica, la proteómica y, más recientemente, la metabolómica. En la Figura 1 se presenta la relación e interdependencia de estas disciplinas, conocida como cascada "ómica"⁵.

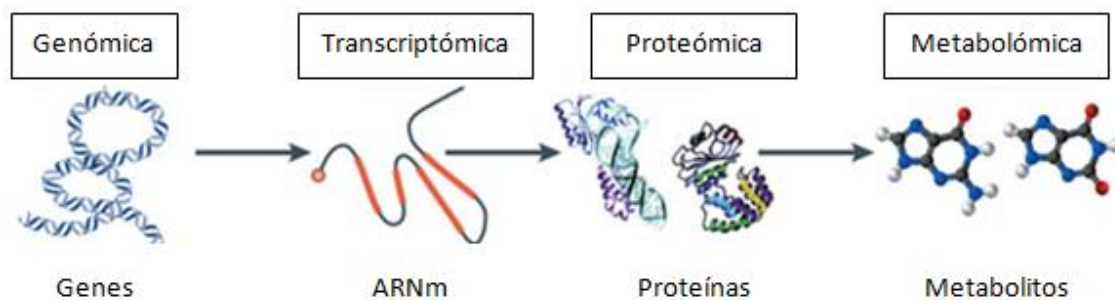


Figura 1. Cascada "ómica"

Las ciencias "ómicas" permiten estudiar todos los procesos moleculares que ocurren en un organismo vivo desde los genes hasta los metabolitos, que es el nivel más cercano al fenotipo muestral. El estudio y comparación del genoma, el transcriptoma, el proteoma y el metaboloma en diferentes situaciones permite identificar biomarcadores, es decir, elementos que su presencia, ausencia o alteración se correlaciona con determinados estados fisiológicos⁶.

La genómica es el estudio del contenido, la organización, la función y la evolución de la información molecular del ADN. Se trata del estudio de todos los genes de un organismo, es decir, el genoma. Esta ciencia se divide en la genómica estructural y funcional. La primera se basa en la caracterización y localización de las secuencias de ADN con la finalidad de obtener mapas genéticos de los organismos. En cambio, la genómica funcional se centra en el análisis de las funciones que realizan los genes⁶.

La transcriptómica es el estudio del transcriptoma de un organismo, es decir, del conjunto de ARN mensajeros (ARNm) que hay en una célula, tejido u órgano. Los transcriptomas presentan una mayor

variabilidad en comparación con el genoma, ya que muestran qué genes se están expresando en un momento determinado⁶.

La proteómica es el estudio a gran escala del conjunto de proteínas presentes en un organismo, es decir, del proteoma. Las proteínas son moléculas orgánicas de vital importancia ya que son los componentes principales de las rutas metabólicas de las células. A diferencia del genoma, que es prácticamente invariable, el proteoma puede variar de célula a célula y modificarse según las interacciones entre el genoma y el medio ambiente. Por otra parte, el proteoma es más diverso y variable que el genoma ya que un único gen puede codificar diferentes versiones de una proteína⁶.

La proteómica se divide en tres ramas principales⁶:

- La proteómica de expresión estudia la abundancia relativa de las proteínas y de sus modificaciones post-transcripcionales.
- La proteómica estructural analiza la estructura tridimensional de las proteínas.
- La proteómica funcional se encarga del estudio de las funciones de las proteínas analizando su localización, distribución e interacciones que se producen entre ellas y otras moléculas.

1.2. Metabolómica y lipidómica

La metabolómica es la disciplina que estudia el conjunto de metabolitos existentes en un sistema biológico, es decir, el metaboloma. Los metabolitos son compuestos de bajo peso molecular resultantes de la actividad celular. A diferencia de las proteínas o los genes, que necesitan modificaciones post-transcripcionales o epigenéticas respectivamente para ser activos, los metabolitos son indicadores directos de la actividad bioquímica de la célula en un momento determinado⁷. Por este motivo se considera que la metabolómica es el punto final de la cascada "ómica".

El estudio del metaboloma implica el análisis de un vasto número de compuestos como, por ejemplo, ácidos nucleicos, aminoácidos, azúcares y lípidos. Estos compuestos presentan diferentes propiedades fisicoquímicas y rangos de concentración que pueden variar en el espacio y el tiempo.

La lipidómica está estrechamente vinculada a la metabolómica ya que se considera una subdisciplina de ésta con el objetivo de detectar y cuantificar el conjunto de lípidos que hay en una muestra biológica. Esto permite poder entender el papel que juegan estos compuestos en los procesos celulares y el impacto que pueden generar las perturbaciones ambientales. El espectro global de lípidos presente en una muestra biológica se conoce como lipidoma⁸.

Aunque no hay una definición exacta para este grupo de metabolitos, su definición se basa en sus propiedades fisicoquímicas principales. Los lípidos son moléculas orgánicas compuestas principalmente de carbono, hidrógeno y, en menor medida, oxígeno. También pueden contener otros elementos como fósforo, nitrógeno o azufre⁹.

A pesar de ser un grupo muy heterogéneo, todos los compuestos considerados como lípidos tienen dos características en común: son insolubles en agua (hidrofóbicos) o tienen una parte insoluble (anfífilos) y son solubles en disolventes orgánicos como éter o cloroformo, entre otros⁹.

Se trata de un conjunto de sustancias muy diversas con propiedades biológicas distintas. Algunos lípidos son componentes vitales en la estructuración y organización de las membranas celulares (*i. e.* fosfolípidos, esfingolípidos, esteroides), otros actúan como material de reserva de las células (*i. e.* ácidos grasos, triglicéridos, ceras) o como vitaminas y hormonas (*i. e.* hormonas esteroides, vitaminas A, D, E y K, quinonas). Algunos lípidos forman capas protectoras de la superficie de un organismo (*i. e.* ceras vegetales)¹⁰.

En general, los lípidos se clasifican en los siguientes grupos⁹:

1. Grasas neutras.

Son ésteres de la molécula de glicerina cuyos grupos hidroxilos se unen a las moléculas de ácidos grasos mediante enlaces ésteres. La composición general de este tipo de grasas se muestra en la Figura 2.

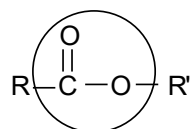


Figura 2. Grupo funcional éster (R y R': cadena hidrocarbonada de elevado peso molecular).

Las grasas neutras son la familia de lípidos más común y está formada principalmente por mono-, di- y triacilgliceridos. A continuación, la Figura 3 muestra la estructura de los tres tipos de grasas neutras.

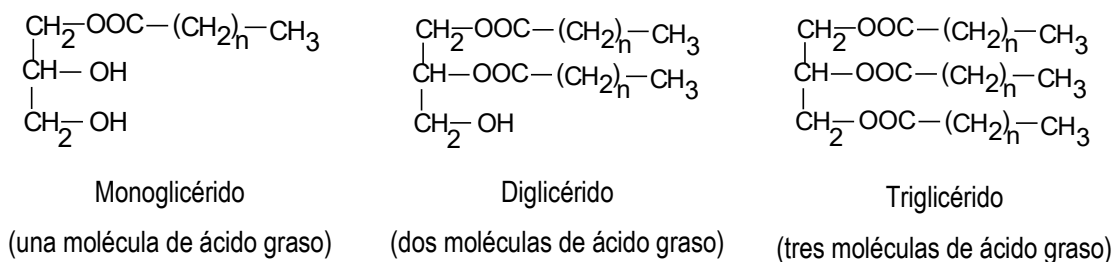


Figura 3. Estructuras de las grasas neutras.

Estos lípidos forman parte de los tejidos de reserva, tanto en plantas como en animales, ya que son las principales sustancias de reserva energética del organismo.

2. Fosfolípidos.

Los fosfolípidos son un grupo de lípidos que contienen un grupo fosfato. Se trata de moléculas con carácter anfipático ya que están formados por una parte polar y otra apolar. Son el grupo de lípidos más representativo en la organización y formación de las membranas celulares. Debido a su bipolaridad, otorgan a las membranas celulares su carácter semipermeable. El principal grupo de fosfolípidos son los fosfoglicéridos. En la Figura 4 se presenta la estructura general de los fosfolípidos.

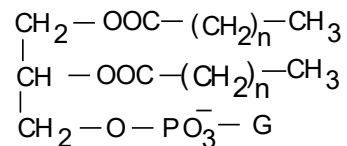


Figura 4. Estructura general de los fosfolípidos.

Una molécula de fosfolípido incluye una de glicerina, dos de ácidos grasos y una de ácido fosfórico. A veces los fosfoglicéridos pueden contener un grupo alcohol o etanol (G) formando el grupo de las lecitinas (G = aminoalcohol colina) y de las cefalinas (G = aminoalcohol etanolamina).

3. Esfingolípidos.

Son un grupo de fosfolípidos de gran importancia biológica ya que forman parte de la estructura de las membranas celulares. En el caso de los animales, los esfingolípidos son moléculas muy abundantes en el tejido nervioso formando parte de las vainas de mielina (esfingomielina y cerebrósidos). A continuación, se presenta la estructura general de los esfingolípidos en la Figura 5.

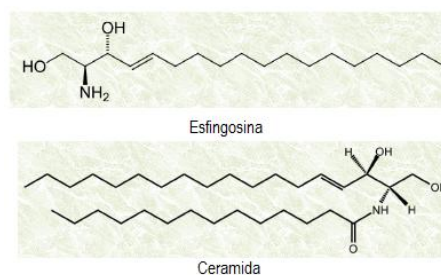


Figura 5. Estructuras principales de un esfingolípidos⁹.

Su base estructural es la molécula de ceramida (esfingosina con un ácido graso unido a su grupo amino mediante enlace amida). En general, los esfingolípidos están formados por ácidos grasos de cadena larga saturados o monoinsaturados.

4. Ceras.

Las ceras están formadas por ésteres de ácidos grasos y de alcoholes alifáticos de peso molecular elevado. En la Figura 6 se presenta la estructura general de estos compuestos.

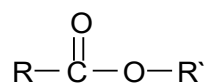


Figura 6. Estructura general de las ceras.

Son moléculas especialmente insolubles en agua, por lo que suelen desempeñar funciones de recubrimiento de las superficies de los organismos.

5. Esteroides.

Son compuestos orgánicos aromáticos derivados del hidrocarburo ciclopentanoperhidrofenantreno. Se encuentran en todos los seres vivos e intervienen en muchos procesos metabólicos. La Figura 7 muestra la estructura base de los esteroides.

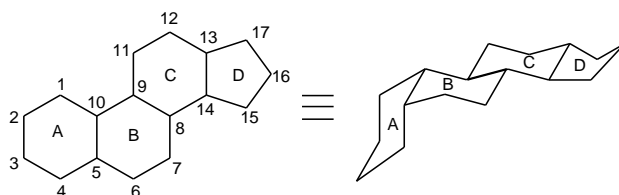


Figura 7. Estructura base de los esteroides.

Algunos esteroides cumplen funciones de vital importancia en las membranas celulares como, por ejemplo, el colesterol, que aporta fluidez a la membrana. Entre los esteroides más destacados cabe citar el colesterol, las hormonas sexuales, los ácidos biliares, la vitamina D y las saponinas.

6. Terpenos.

Son un grupo de lípidos muy abundantes en los vegetales. Pueden considerarse derivados de la polimerización de unidades del hidrocarburo isopreno. Algunos ejemplos de terpenos son algunas esencias vegetales (*i.e.* mentol, geraniol, alcanfor, etc.), el alcohol fitol (componente de la clorofila), los carotenos (rojos o anaranjados) y las xantofilas (amarillas).

7. Prostaglandinas.

Son un grupo de moléculas muy diverso que pueden considerarse derivadas de ácidos grasos. Las prostaglandinas tienen una importante actividad reguladora sobre el organismo y algunas son antagonistas de determinadas hormonas. Se forman en numerosos tejidos corporales y constituyen un complejo sistema de estimulación e inhibición de diversos procesos metabólicos. También intervienen como factores protectores de las membranas celulares ante cambios ambientales.

En el caso particular de las plantas, los lípidos presentan varias funciones biológicas: como fuente de energía (ácidos grasos), componentes de membrana (fosfolípidos, glicolípidos y esteroides), control metabolómico (mensajeros intracelulares y reguladores del crecimiento), defensa contra el ataque de algunos microorganismos y protección contra la pérdida de agua excesiva (cutina y ceras).

1.3. Estudio metabolómico/lipidómico

Los estudios metabolómicos permiten entender en más profundidad los sistemas biológicos y las interacciones entre los diferentes niveles moleculares. Sin embargo, la ausencia de protocolos globales representa un problema para la identificación, detección y cuantificación de los metabolitos.

Generalmente, se propone la integración de diferentes técnicas analíticas para aumentar el rango de detección e identificación del mayor número de metabolitos posible.

En un estudio metabolómico hay que tener en cuenta diferentes factores o etapas que pueden ser fuente de variabilidad y errores en la interpretación de los resultados. En la Figura 8 se presenta el esquema de trabajo habitual seguido en un estudio metabolómico.



Figura 8. Esquema de trabajo seguido en un estudio metabolómico¹¹.

Como se observa en la Figura 8, un estudio metabolómico consta de una fase inicial en la que se plantea el problema y el diseño experimental que se realizará para dar respuesta a dicho problema. Seguidamente, se realizan las etapas de obtención de muestra (generación de las muestras control y estresadas y la interrupción del metabolismo), preparación de las muestras (extracción, limpieza/purificación, concentración, derivatización) y análisis instrumental de las muestras (Resonancia Magnética Nuclear, Espectrometría de masas acoplada a técnicas de separación). Finalmente, se procede al tratamiento de los datos obtenidos. Esta etapa final consta del preprocesado (filtrado, alineamiento y normalización), del análisis estadístico (métodos univariantes o multivariantes) y de la validación e interpretación biológica y ambientales de los resultados obtenidos.

1.3.1. Organismo modelo

Los organismos modelo son especies de microorganismos, de vegetales o de animales (Figura 9) que han sido ampliamente estudiadas y que se usan para la investigación de múltiples aspectos de la biología. Estos organismos deben presentar ventajas experimentales y ser fáciles de mantener y reproducir en un entorno de laboratorio. El uso de estos organismos tiene como objetivo obtener información de otras especies que son más difíciles de estudiar, pero tienen características similares o pertenecen al mismo grupo filogenético.

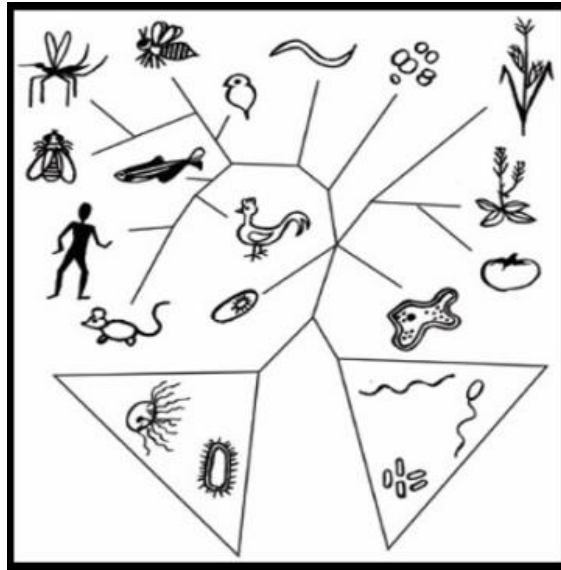


Figura 9. Organismos modelo.

Normalmente, los organismos modelo que se utilizan más en el ámbito de la investigación son:

- Bacterias: *Escherichia coli*
- Levaduras: *Saccharomyces cerevisiae*
- Plantas: *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*
- Animales: *Caenorhabditis elegans* (gusano), *Drosophila melanogaster* (mosca), *Danio rerio* (pez cebra) y *Mus musculus* (ratón).

En el presente trabajo se ha seleccionada la planta de arroz (*Oryza sativa japonica* Nipponbare) como especie modelo de organismos vegetales. Se han aplicado diferentes criterios de selección para elegir dicho organismo.

Se trata de una especie muy utilizada en muchos estudios de investigación y, por lo tanto, se dispone de amplia información en todos los niveles ómicos. El genoma del arroz es el primer genoma de cultivos vegetales secuenciado con elevada precisión. Además, tiene uno de los genomas más pequeños dentro de los vegetales y comparte muchas similitudes con otras especies de gramíneas como el maíz. Debido a todas estas características, se trata de un cultivo del que se tiene una gran cantidad de información y, además, es fácil de manipular y estudiar¹².

El cultivo de arroz se considera uno de los más importantes a nivel mundial por diferentes motivos históricos, culturales, económicos y alimentarios. Se cultiva aproximadamente en unos 115 países, y está fuertemente integrado en el patrimonio cultural de muchas sociedades. El arroz es el alimento básico de más de la mitad de la población mundial y el 40% depende de este cultivo para el 80% de su dieta¹³. A nivel mundial, ocupa el segundo lugar después del maíz respecto a superficie cultivada. Des del punto de vista energético, proporciona más calorías por hectárea que cualquiera de los otros cereales cultivados¹⁴.

Históricamente, hay muchas hipótesis sobre el origen del arroz y de su cultivo. La hipótesis más aceptada actualmente propone que se empezó a cultivar hace unos 10.000 años en diferentes regiones húmedas de Asia tropical y subtropical. Posteriormente, se habría extendido a países como China o la India. Alrededor del año 800 a.C. el arroz asiático se instaló en Oriente y Europa meridional. A España, llegó mucho más tarde a través de la conquista árabe de la península ibérica hacia el año 700 d.C. Años después se propagó por Italia y Francia, y a partir del siglo XV llegó a América a través de los colonizadores europeos¹⁴. La Figura 10 muestra una de las hipótesis más aceptadas en la actualidad sobre la evolución del arroz cultivado.

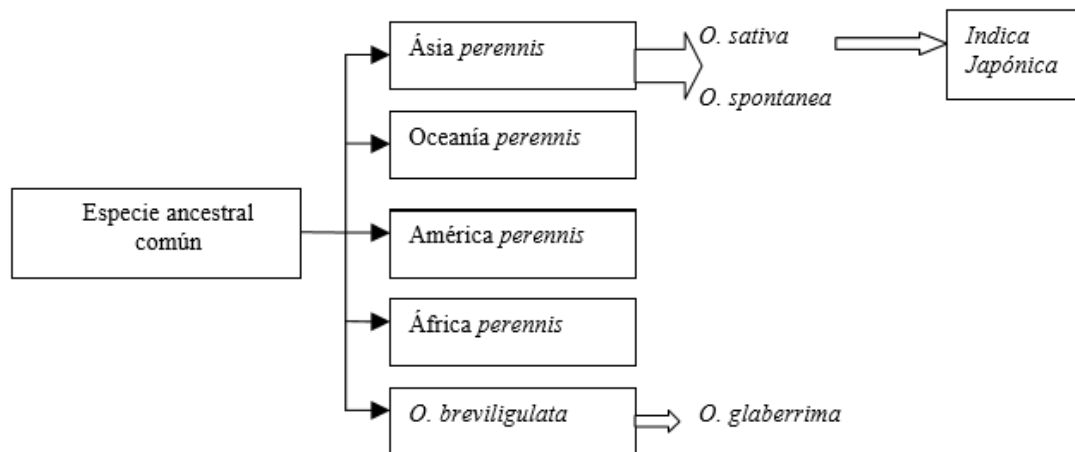


Figura 10. Genealogía de la evolución del arroz cultivado propuesta por Morishima (1976)¹⁴.

Existen dos especies de arroz cultivables, la asiática (*Oryza sativa*) y la africana (*Oryza glaberrima*). La especie *O. sativa* es la que tiene más importancia económica ya que se cultiva en la mayoría de zonas tropicales y templadas, desde el sur de Argentina hasta China. En cambio, la especie *O. glaberrima* solo se cultiva en la zona oeste de África. Desde el punto de vista de la variabilidad genética, *O. sativa* presenta una mayor diversidad encontrando hasta tres subespecies (Índica, Japónica y Javánica)¹⁴. La subespecie Índica se distribuye en los trópicos y subtropicos, la Javánica se cultiva en Indonesia y la Japónica se encuentra en zonas templadas como Estados Unidos, Japón y España. La subespecie Japónica es la más cultivada a nivel mundial y es de la que se dispone más información ya que es la más utilizada para realizar trabajos de investigación¹³. En el caso de *O. glaberrima* no se ha observado esta variabilidad genética. Por estos motivos, la especie seleccionada para realizar el presente trabajo es *Oryza sativa japonica* Nipponbare, que es la variedad de arroz más cultivada en Japón y no requiere una cantidad de agua tan elevada como otros tipos de arroz¹⁴.

Oryza sativa es una gramínea autógama y monocotiledónea que crece con más facilidad en los climas tropicales y medios calientes y húmedos. Originariamente era una planta que se cultivaba en seco, pero con las mutaciones producidas con el paso del tiempo se ha convertido en semiacuática, aunque puede crecer en medios bastante diversos. En los trópicos puede completar su ciclo de vida en un periodo de 110 a 210 días. Se trata de una planta anual que puede medir entre 0,6 y 1,8 metros de altura. Presenta tallos compuestos de nudos y entrenudos muy ramificados y hojas en forma de lámina. Los tallos acaban en una inflorescencia o panícula de 20 a 30 centímetros de largo. Cada panícula está formada entre 50 y 300 flores aproximadamente a partir de las cuales se formarán los granos¹³. En la Figura 11 se presentan las diferentes partes de la planta de arroz.



Figura 11. *Oryza sativa* (autor Franz Eugen Köhler).

Respecto al sistema de cultivo, hay sistemas de secano en el cual el cultivo crece en condiciones de suelo seco y sistemas de riego o inundación en el que los arrozales son irrigados por lluvia o por canales. El arroz de secano se cultiva a veces en zonas de montaña con precipitaciones naturales y sin la necesidad de embalses. En este caso se necesita un periodo de lluvia mínimo de 3 a 4 meses. En el caso del sistema húmedo o de inundación el arrozal crece en agua estancada desde la plantación hasta la recogida y la profundidad de la capa de agua puede variar entre 0-25 cm (poco profunda) y 25-50 cm (profundidad media)¹³.

1.3.2. Factores ambientales

En los estudios metabolómicos, y en consecuencia lipidómicos, en los que se pretende analizar la influencia de una perturbación en un organismo, ya sea física o química, se debe disponer de dos tipos de muestras: muestras control y grupos de muestras sometidos a diferentes grados de perturbación. De esta manera se pueden comparar los resultados y poder detectar diferencias entre las distintas condiciones experimentales.

El ambiente de crecimiento de una planta está determinado principalmente por factores abióticos como la radiación solar en forma de luz y la temperatura como fuentes de energía, el agua y los factores químicos como base de todos los procesos de metabolismo y crecimiento y factores mecánicos, como el fuego o el viento que perjudican el desarrollo de la planta. También existen factores bióticos que pueden influenciar el desarrollo de las plantas. Estos factores hacen referencia a todas las interacciones que tiene la planta con otros organismos como, por ejemplo, plagas o enfermedades¹⁵.

En el caso de este trabajo, el estudio se centra en la influencia de la temperatura y la escasez de agua. A continuación, se analizan los principales efectos que pueden provocar estos factores en la planta.

1.3.2.1. Temperatura

La temperatura ambiente depende principalmente de la radiación solar, aunque actualmente las actividades humanas también han influenciado indirectamente en los cambios de temperatura. Este factor influye sobre todos los procesos vitales de las plantas, especialmente en la fotosíntesis, la respiración, la biosíntesis y la transpiración ya que estos procesos están catalizados por enzimas. Las reacciones enzimáticas siguen la regla de Van t'Hoff que relaciona la velocidad de reacción con la temperatura. Según esta regla, la velocidad de reacción se dobla aproximadamente al aumentar la temperatura 10°C tal como se observa en la ecuación 1¹⁵.

$$Q_{10} = \frac{k_{T+10}}{k_T} \approx 2$$

Ecuación 1. Relación entre las velocidades de reacción con un aumento de 10°C¹⁵.

Donde:

- Q_{10} : relación entre las velocidades de reacción con un aumento de 10°C.
- k_T : velocidad de reacción a una temperatura T.
- k_{T+10} : velocidad de reacción al aumentar 10°C la temperatura.

La temperatura está relacionada con la economía hídrica de la planta ya que un aumento de temperatura favorece el paso de agua de la fase líquida a la gaseosa (aumenta la transpiración) y, en consecuencia, la planta adoptará estrategias para evitar la pérdida de agua como el cierre de los estomas. Los estomas son oberturas, que se encuentran en el reverso de las hojas, y es por donde las plantas realizan el intercambio de gases¹⁵.



Figura 12. Imagen de un estoma al microscopio¹⁶.

En la Tabla 1 se presentan los efectos de la temperatura en los diferentes estados de crecimiento de la planta de arroz.

Tabla 1. Efectos de la temperatura en los diferentes estados de crecimiento de la planta de arroz¹⁷.

Crecimiento y desarrollo de la planta	Baja temperatura		Alta temperatura		Temp. óptima
	Rango	Efecto	Rango	Efecto	
Germinación	10	<i>Inhibición</i>	45	-	20-35
Emergencia de la plántula	12-13	<i>Demorada</i>	35	-	25-30
Enraizamiento	16	<i>Raquitismo</i>	35	-	25-28
Hoja	7-12	<i>Decoloración de la hoja, raquitismo</i>	45	<i>Punta blanca, bandas cloróticas y manchas</i>	31
Macollaje	9-16	<i>Reducido</i>	33	<i>Reducido</i>	25-31
Iniciación de la panoja	15	<i>Demorada</i>	-	<i>Panoja blanca</i>	-
Diferenciación de la panoja	15-20	<i>Degeneración del ápice de la panoja, alta esterilidad de la espiguilla</i>	38	<i>Número reducido de espiguillas</i>	-
Exerción de la panoja	22	<i>Exerción incompleta, floración demorada</i>	35	<i>Esterilidad</i>	30-33
Grano	12-18	<i>Madurez irregular</i>	30	<i>Menor llenado del grano</i>	20-25

1.3.2.2. Agua

El agua es el componente principal para la vida en la Tierra. Puede actuar como disolvente universal y, a veces, como sustrato en el metabolismo celular. Se trata de un componente indispensable para todos los procesos vitales que ocurren en el desarrollo de las plantas ya que interviene en la fotosíntesis, la absorción de nutrientes y es el medio en el cual se producen las reacciones metabólicas de las células¹⁵.

El proceso de absorción de agua se produce principalmente en las raíces. Este fenómeno sólo es posible cuando hay una diferencia de potencial hídrico suficiente entre el suelo y la planta que permita el movimiento del agua desde el suelo al interior de las raíces. Una parte importante del valor de esta diferencia es el potencial osmótico, que depende de la concentración de compuestos disueltos en el agua que hay dentro y fuera de la planta. Por lo tanto, una disminución del contenido de agua en el suelo puede interrumpir la absorción de agua ya que la concentración de solutos en el suelo aumenta¹⁵.

La escasez de agua influye indirectamente en la fotosíntesis ya que la deshidratación del plasma puede afectar negativamente los procesos enzimáticos y las estructuras funcionales. Las pérdidas de agua se pueden producir en forma de vapor (transpiración) o en forma líquida (glutación). Cuantitativamente, la transpiración es mucho más importante y significativa que la glutación ya que por transpiración las plantas pierden grandes volúmenes de agua. La transpiración es la evaporación de agua en la superficie de la planta. Se produce principalmente en las hojas, que son las mayores superficies expuestas a la radiación solar. La pérdida excesiva de agua por transpiración está relacionada con la absorción de CO₂ necesario para la fotosíntesis ya que ambos procesos tienen lugar en los estomas. En consecuencia, si hay escasez de agua en el medio, la planta cerrará los estomas para evitar la pérdida de agua y, por lo tanto, se interrumpirá la absorción de CO₂¹⁵.

1.3.3. Aproximaciones metabolómicas

La identificación y la cuantificación de la totalidad de metabolitos son tareas complejas que requieren un elevado esfuerzo y tiempo. Debido a esta complejidad, antes de empezar el estudio metabolómico se debe determinar la aproximación que se realizará en función de la información previa disponible sobre el objetivo de estudio. Existen dos enfoques principales: aproximación dirigida y aproximación no dirigida. La selección del tipo de aproximación que se realizará y, por lo tanto, la complejidad del método analítico que se aplicará dependerá de los objetivos del estudio metabolómico. Si el objetivo del estudio se centra en un análisis dirigido, la preparación de la muestra se centrará en los metabolitos de interés. Por el contrario, si se pretende realizar un estudio global, se aplicarán protocolos no selectivos con la finalidad de maximizar la capacidad de detección de metabolitos.

La aproximación dirigida se utiliza en los casos en los que se pretende estudiar un grupo de metabolitos o ruta metabólica en concreto. Este conocimiento facilita la selección del procedimiento experimental ya que permite optimizar el método de extracción y la técnica analítica para su medida⁷.

En cambio, las aproximaciones no dirigidas se realizan en los estudios en los que no hay información previa de los metabolitos que pueden estar implicados en un proceso biológico o bioquímico. El objetivo del enfoque no dirigido es obtener un perfil global del metaboloma de una muestra determinada. Por lo tanto, el escenario óptimo para realizar los estudios no dirigidos es utilizar diferentes técnicas analíticas que sean complementarias entre sí. La técnica más utilizada para este tipo de estudios es la cromatografía acoplada a un espectrómetro de masas. También hay muchos casos en los que se utiliza únicamente la Resonancia Magnética Nuclear (RMN)⁷.

1.3.4. Muestreo, almacenamiento e interrupción del metabolismo

Uno de los puntos más importantes en este tipo de estudios es la selección del material biológico ya que según el tipo de análisis que se desee realizar se elegirá un biofluido o tejido. Se trata de una de las etapas más críticas debido a su influencia en los resultados, por lo tanto, se requiere un conocimiento previo del sistema biológico de estudio para poder diseñar protocolos de preparación de la muestra según las características de ésta.

En los estudios centrados en vegetales se dispone de una gran variedad de posibles muestras como hojas, raíces, frutas, tubérculos, flores, resinas y otros materiales derivados como aceite, vino, etc¹⁸.

El muestreo también es un factor a tener en cuenta, tanto si se trata de la cantidad muestreada como del método de muestreo. En primer lugar, para obtener unos resultados estadísticamente significativos y representativos se debe trabajar con un número de muestras suficiente para cada tipo de condición de estudio y se debe asegurar que hay suficiente cantidad de muestra para realizar el estudio. En segundo lugar, el proceso de muestreo idealmente debería tener un carácter no invasivo y asegurar la representatividad de la muestra.

El almacenamiento de las muestras también es un aspecto crítico en el análisis metabolómico ya que un almacenamiento inadecuado puede provocar modificaciones en el perfil metabólico de la matriz biológica. Para evitar este problema el método más recomendado es congelar inmediatamente las muestras a -80°C (nitrógeno líquido) y trabajar siempre a bajas temperaturas durante la preparación de la muestra. Este hecho permite asegurar la integridad de la muestra e inhibir o minimizar los cambios en la concentración y estructura de los metabolitos. Así, durante el almacenamiento de las muestras se debe asegurar la interrupción del metabolismo ("*quenching*"). Existen varias estrategias para conseguir dicha interrupción, pero todas deben cumplir con los siguientes requisitos¹⁸:

- La interrupción del metabolismo debe ser más rápida que los cambios metabólicos que ocurren en la muestra.
- Se debe preservar la integridad de la muestra durante todo el proceso. Por lo tanto, no debe haber variaciones en la concentración y estructura de los metabolitos.
- Después de la interrupción, la muestra debe conservar la compatibilidad con el resto de etapas del proceso analítico.

Los métodos más usados para la interrupción del metabolismo se basan en cambios bruscos de pH usando bases o ácidos fuertes (KOH, NaOH, HCl, etc.) o de temperatura enfriando las muestras por debajo de -20°C usando, por ejemplo, nitrógeno líquido (-196°C). A pesar de estas técnicas de almacenamiento e interrupción del metabolismo es recomendable que el intervalo de tiempo que transcurre entre el muestreo y el análisis sea lo más reducido posible¹⁸.

1.3.5. Extracción de los metabolitos

Los métodos de extracción tienen como objetivos aislar y concentrar eficientemente los metabolitos de la muestra, eliminar las posibles interferencias que puedan dificultar el análisis (sales o proteínas) y conseguir un extracto compatible con la técnica analítica empleada.

Para elegir el método analítico de extracción se utilizan diferentes criterios de selección. Uno de ellos depende del objetivo del estudio y de la aproximación o enfoque que se le dé. Para un análisis no dirigido o global no se requieren métodos de extracción muy selectivos ya que pretende obtener el perfil metabólico del organismo de estudio. En cambio, para un análisis dirigido u orientado sí que son necesarios métodos de extracción muy selectivos que proporcionen extractos (concentrados) con únicamente los metabolitos de interés¹⁸.

Respecto a las muestras líquidas, se pueden analizar directamente con una mínima preparación de la muestra como ajuste del pH, evaporación o centrifugación. El análisis directo minimiza las pérdidas de metabolitos pero pueden haber problemas en la detección instrumental en las muestras que presenten un alto contenido de sales generando fenómenos de supresión salina, formación de aductos o afectar negativamente el funcionamiento de los equipos. Actualmente existen dos técnicas de extracción

ampliamente utilizadas¹⁸. La extracción líquido-líquido (LLE) se basa en la polaridad del extractante y de los metabolitos, consiguiendo dos fases separadas que contienen por un lado los compuestos polares y, por otro lado, los compuestos no polares. En cambio, la extracción en fase sólido (SPE) se utiliza preferentemente para la extracción selectiva de compuestos obteniendo una elevada precisión y sensibilidad. En este caso, los analitos son absorbidos en el material de soporte y, posteriormente, se eluyen según sus afinidades entre el material absorbente y la fase móvil utilizada.

Para las muestras sólidas es necesario un procesamiento previo de trituración o tamizado de la muestra para obtener un polvo homogéneo. Esta etapa es muy importante para muestras vegetales ya que es necesario romper la pared vegetal de las células para liberar los metabolitos que contienen. Los métodos más comunes para realizar esta etapa son mecánicos como morteros, sondas de ultrasonidos y agitadores térmicos. Para mejorar la trituración de la muestra se recomienda utilizar condiciones de frío que se pueden mantener con nitrógeno líquido. Finalmente, la muestra en polvo se debe liofilizar para eliminar la humedad que contiene y almacenar en frío hasta el momento de analizarla. Para realizar la extracción de los metabolitos se utilizan disolventes orgánicos como metanol o acetonitrilo ya que tienen una alta eficiencia en la precipitación de proteínas, una elevada permeabilidad de las membranas celulares y una elevada facilidad de evaporarse lo que permite concentrar los extractos. Los extractos resultantes se pueden separar en dos fases mediante centrifugación para su caracterización por separado.

Finalmente, los metabolitos se encuentran diluidos en el extractante que debe ser eliminado parcial o totalmente con la finalidad de concentrarlos antes de su análisis. El método más utilizado para eliminar el extractante es la evaporación en condiciones de vacío¹⁸.

1.3.6. Técnicas instrumentales de análisis

En el ámbito de las ciencias ómicas existen diversas técnicas instrumentales que permiten el análisis de los diferentes niveles ómicos (genoma, transcriptoma, proteoma y metaboloma) de un organismo. La selección de los instrumentos más adecuados para realizar el estudio dependerá de sus objetivos y de los requisitos que se necesiten para cumplirlos. Los factores que se tienen más en cuenta son la selectividad química, la sensibilidad instrumental y la disponibilidad de la instrumentación¹¹.

Entre las técnicas analíticas más utilizadas en los estudios de metabolómica se consideran las técnicas de separación y las de detección.

Las técnicas de separación más utilizadas son la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida (LC)¹¹. En toda cromatografía existe dos fases: una fase fija conocida como fase estacionaria y una fase móvil que arrastra los compuestos desde el punto de inyección hasta el detector. Los analitos de la solución problema se separan según la afinidad que tengan por una u otra fase y llegarán antes o más tarde al detector, por lo que cada compuesto se caracteriza por un tiempo de retención determinado.

La cromatografía de gases es una técnica en la que la fase móvil es un gas mezclado con los compuestos de la muestra y la fase estacionaria un sólido o un líquido con soporte sólido contenido en una columna. En los estudios metabolómicos, es una técnica menos versátil debido a que solo es aplicable a compuestos volátiles y térmicamente estables. Por este motivo, algunas veces requiere procesos de derivatización para aumentar la volatilidad de los compuestos¹¹.

La cromatografía líquida es una técnica basada en la introducción de los analitos de la muestra juntamente con la fase móvil líquida a presiones y temperaturas elevadas en una columna con relleno sólido. Las columnas más utilizadas son las de fase inversa concretamente la C18 y la C8. Con estas columnas no se pueden usar partículas menores de 3-5 μm ya que el aumento de presión que se produciría no es tolerado por los equipos convencionales de HPLC (*high-performance liquid chromatography*). Por otro lado, los equipos de UHPLC (*ultrahigh-performance liquid chromatography*) si permiten trabajar con partículas de tamaños inferiores a 2 μm ¹¹. En cromatografía líquida, la separación de los analitos se produce según su polaridad. Normalmente se aplica una separación en fase inversa en la que se utiliza un método por gradientes. Se comienza con una fase móvil con un elevado contenido acuoso y se va aumentando el porcentaje de disolvente orgánico (acetonitrilo o metanol). Al principio los analitos más apolares son retenidos en la fase estacionaria pero se van eluyendo a medida que aumenta el porcentaje de disolvente orgánico en la fase móvil. En consecuencia, los compuestos polares se eluyen más rápidamente ya que tienen más afinidad por los disolventes polares, mientras que los compuestos apolares tienen tiempos de retención mayores y se eluyen más lentamente a medida que aumenta el contenido del disolvente. Este tipo de separación permite el análisis de metabolitos polares, semipolares e incluso algunos no polares. Para el análisis de compuestos muy polares, se recomienda la cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC). Generalmente se utilizan columnas de sílice hidratado y fases móviles con un elevado porcentaje en disolventes apolares al inicio y con un alto contenido de fase acuosa al final del proceso cromatográfico. La cromatografía líquida ha desplazado a la cromatografía de gases a causa de su mayor versatilidad y campo de aplicación¹¹.

Las técnicas de detección permiten la identificación directa de los analitos y las más usadas y habituales en este tipo de estudios son la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la Espectrometría de Masas (MS). Estas técnicas se pueden usar sin la necesidad de una técnica separativa de alta resolución previa. Sobre todo en el caso de MS, se utiliza en combinación con una técnica cromatográfica para obtener la información del metaboloma del organismo de estudio de una forma más clara y simple.

La RMN permite la identificación y cuantificación de aquellos isótopos que tengan propiedades magnéticas. Esta técnica presenta múltiples ventajas como su robustez, rapidez y ser una técnica no destructiva. A pesar de estas ventajas, no es recomendable para medir compuestos que se encuentran en muy bajas concentraciones.

La MS es una técnica ampliamente utilizada en los estudios de química analítica debido a su alta sensibilidad y selectividad. Esta técnica permite determinar el tipo, estructura y distribución de los compuestos que hay en una muestra en función de su masa. El espectrómetro de masas está formado por un sistema de introducción de las muestras donde se vaporizan los compuestos, una fuente de ionización en el que se originan iones a partir de las moléculas neutras de la fase gaseosa, un analizador de masas para separar los iones según su relación carga/masa y un sistema de detección. Existen diversas fuentes de ionización que se clasifican según el grado de fragmentación que provocan a los compuestos en fuentes de ionización fuertes como el de impacto electrónico (EI) y fuentes de ionización suaves como el de electrospray (ESI), de ionización química a presión atmosférica (APCI), de ionización química (CI), entre otros. Respecto al analizador de masas hay varios tipos, como el analizador de cuadrupolo (Q), de trampa de iones (IT), de triple cuadrupolo (QQQ), de tiempo de vuelo (TOF), entre otros¹¹.

Por los motivos explicados en este apartado, se ha decidido analizar las muestras mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). En el presente trabajo se ha utilizado un espectrómetro formado por una fuente ionización de electrospray (ESI) y un analizador de tiempo de vuelo (TOF). La fuente de electrospray consiste en hacer pasar la muestra a través de un capilar al que se le aplica un elevado potencial eléctrico. Al salir del capilar, la muestra se dispersa en forma de spray formando pequeñas gotas cargadas que se evaporan rápidamente liberando las moléculas protonadas que llegaran al espectrómetro de masas¹⁹. El analizador por tiempo de vuelo consiste en dar a los iones la misma energía cinética a través de un campo eléctrico y medir el tiempo que tardan a llegar al detector. El tiempo de un ion en recorrer una distancia conocida dependerá de su relación carga/masa, por lo tanto, este hecho permite determinar la masa del ion de estudio.

1.3.7. Tratamiento quimiométrico de los datos

En los estudios metabolómicos se obtienen una gran cantidad de datos de elevada complejidad que deben ser interpretados y convertidos en información útil. Por este motivo, es necesario utilizar potentes herramientas informáticas que permitan y faciliten el tratamiento y análisis estadístico de los datos. Una disciplina que permite tratar este tipo de problemas es la Quimiometría.

La International Chemometrics Society (ICS) define la Quimiometría como:

"La disciplina química que utiliza métodos matemáticos y estadísticos para diseñar o seleccionar procedimientos de medida y experimentos óptimos, y para proporcionar la máxima información química mediante el análisis de datos químicos"

Como se observa en la Figura 13, el tratamiento de los datos comprende de una etapa inicial de preprocesado de la información y otra posterior de análisis estadístico de los resultados¹¹. Finalmente, se procede a la interpretación de los resultados y la posible identificación de biomarcadores.

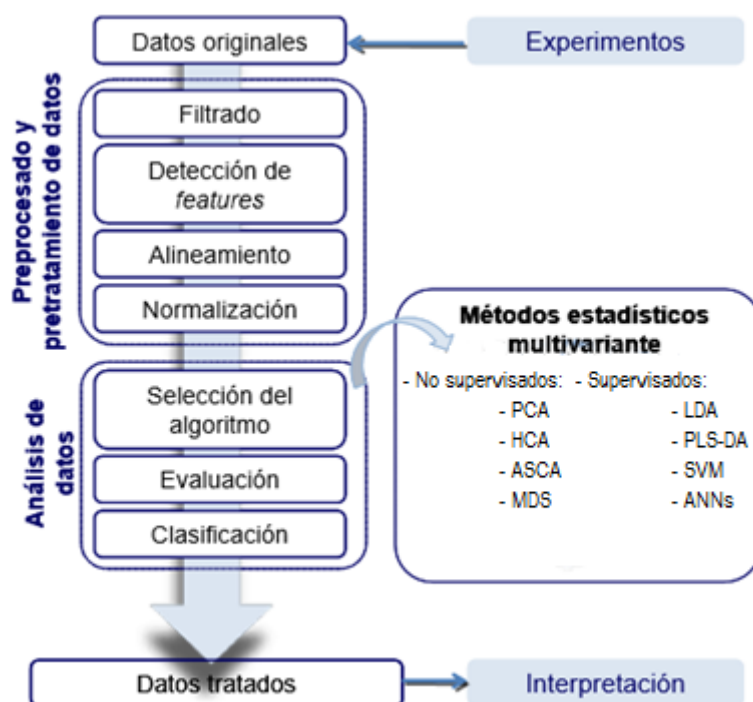


Figura 13. Etapas del tratamiento de datos en un estudio metabolómico¹¹.

En el caso del presente proyecto, por cada muestra analizada mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) se obtiene una matriz o tabla de datos con el tiempo de retención en las filas y los valores de las masas (m/z) de los compuestos en las columnas. Por lo tanto, teniendo en cuenta la cantidad total de muestras, se obtiene lo que se conoce como un cubo de datos tridimensional (tiempo de retención, valores de m/z y muestras). Este cubo de datos presenta los cromatogramas de iones totales (TICs) considerando todos los valores de m/z para cada tiempo de elución y los espectros de masas totales de cada muestra, tal como se muestra en la Figura 14.

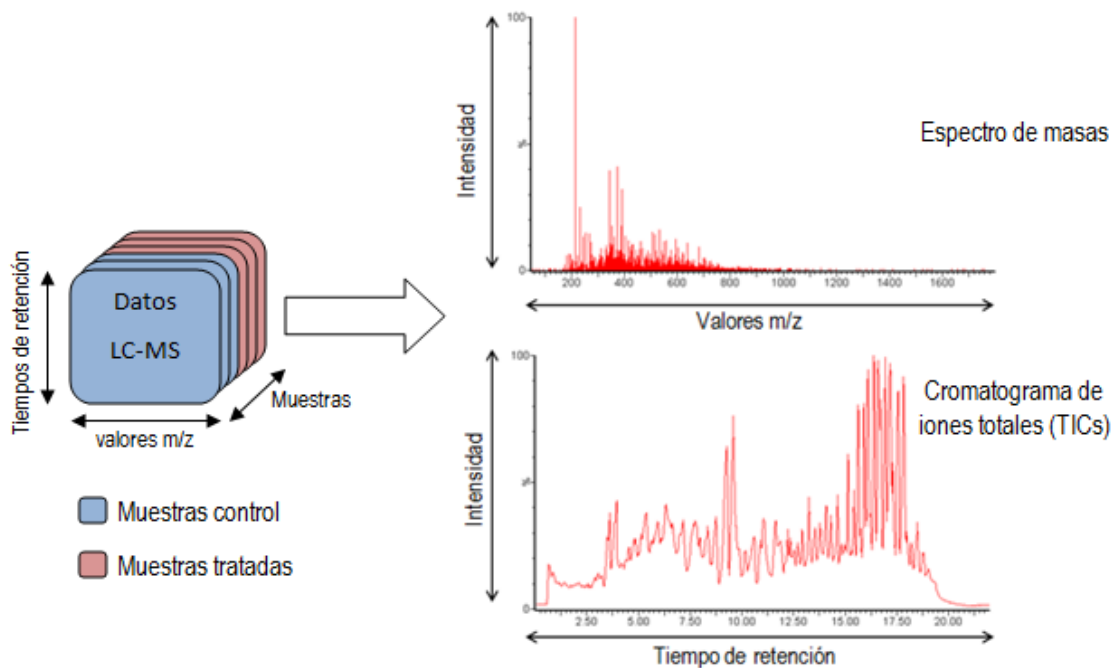


Figura 14. Conversión de datos y gráficos correspondientes al espectro de masa y al TICs

El alineamiento de los cromatogramas es una de las etapas más importantes para la obtención de información útil sobre el problema planteado. Permite comparar los picos cromatográficos entre las condiciones experimentales (muestras control vs. muestras tratadas). Por este motivo es muy importante que esta etapa se realice correctamente, y así poder determinar que las diferencias observadas son debidas a la variación de los analitos presentes en la muestra y no a un inadecuado procesamiento de la señal. Otra parte importante del pretratamiento de datos es la normalización. El objetivo principal de esta etapa es hacer todos los datos comparables eliminando la variabilidad entre las muestras causada por factores instrumentales. Actualmente, existen muchos programas informáticos como *MetAlign*, *MZMine*, *XCMS* o *MetaboNexus* que permiten el alineamiento y normalización de los cromatogramas y el cálculo del área de los picos cromatográficos⁷.

En el presente trabajo se ha utilizado el programa *MetaboNexus*. Este programa utiliza el mismo paquete de algoritmos que *XCMS* y dispone de una interfaz gráfica para seleccionar las condiciones del equipo analítico utilizado. Se trata de una plataforma interactiva de análisis de datos metabolómicos que permite el pretratamiento de los datos adquiridos, incluyendo el alineamiento de los cromatogramas y la corrección de la línea base. El archivo final proporcionado por *MetaboNexus* contiene la relación masa/carga de cada metabolito detectado en las muestras, el tiempo de retención correspondiente y el área de los picos en cada muestra. Esto permite la posterior identificación de los metabolitos de interés ya que cada uno tiene una masa y tiempo de retención determinado, y estudiar los cambios en cada muestra. El programa presenta la opción de normalizar las áreas obtenidas. Si se ha añadido y detectado

cualquier patrón interno a las muestras, es posible realizar la normalización dividiendo las áreas por el valor del área del patrón.

Finalizado el pretratamiento de los datos se procede al análisis estadístico de éstos. En quimiometría los métodos estadísticos multivariantes más utilizados son las técnicas de reconocimiento de pautas. El objetivo de estas técnicas es determinar pautas de comportamiento de las muestras extrayendo la mayor cantidad de información de los datos obtenidos. Como se observa en la Figura 13 existen métodos de reconocimiento de pautas no supervisadas y supervisadas.

Los métodos no supervisados se basan en la agrupación de muestras similares sin utilizar información previa. Entre los métodos más usados hay el análisis de componentes principales (PCA), el análisis de agrupaciones jerárquico (HCA), entre otros¹¹.

Los métodos supervisados pretenden clasificar las muestras analizadas. En este caso, la información de las muestras sobre a qué grupo o clase pertenecen permite construir modelos de clasificación para poder predecir a qué clase pertenecen otras muestras. Los métodos más comunes son el análisis discriminante (PLS-DA), el modelado blando independiente de analogías de clases (SIMCA), entre otros¹¹.

1.3.7.1. Método de componentes principales (PCA)

El PCA es un análisis estadístico multivariante con la finalidad de reducir la dimensionalidad de un gran conjunto de datos y poder representarlos en gráficos en un número reducido de dimensiones (dos o tres). De esta manera se pueden detectar elementos característicos del conjunto de datos como por ejemplo grupos de muestras, valores anómalos (outliers) o las variables que proporcionan información más relacionada con un tipo de muestras²⁰.

El PCA realiza una transformación lineal de los datos originales obteniendo un nuevo sistema de coordenadas (Figura 15). Los componentes principales son los ejes de este nuevo sistema de coordenadas. El primer componente principal (PC1) es aquel que representa la mayor varianza del conjunto de datos. La segunda varianza más grande es el segundo eje (PC2), y así sucesivamente.

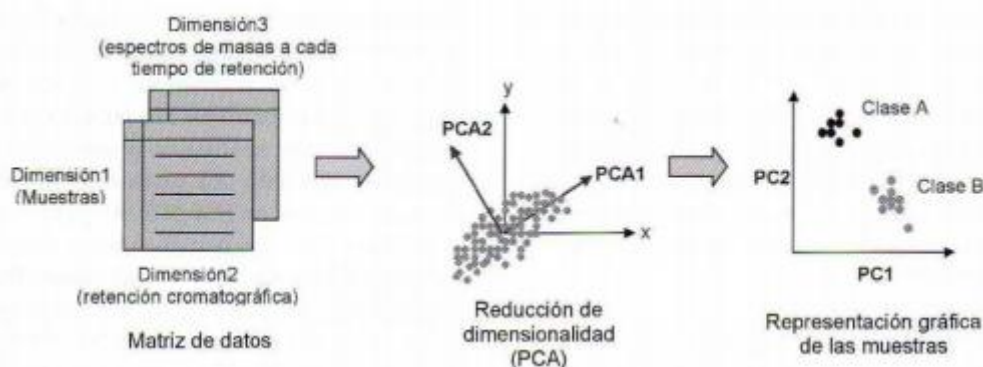


Figura 15. Procedimiento de aplicación del análisis de componentes principales para un conjunto de datos²¹.

Este tipo de análisis estadístico proporciona dos resultados diferentes²²:

- Los mapas de muestras (*scores*) proporcionan información sobre el comportamiento de las muestras. La distancia entre las muestras indica su similitud o diferencia. Por lo tanto, se pueden observar los grupos de muestras que se forman tal como se presentan en la Figura 15.
- Los *loadings* permiten evaluar la contribución que cada variable hace a la información total de los datos.

1.3.7.2. Estudio de la significación de los factores (ASCA)

Para determinar la significación de los factores de estudio se ha realizado un análisis de varianza ASCA (ANOVA – Análisis de Componentes Simultáneos). Se trata de un método multivariante no supervisado que permite el análisis del efecto que tiene cada factor y las interacciones entre ellos. ASCA combina la separación de fuentes de varianza mediante el análisis ANOVA y el modelado de los efectos mediante un análisis por componentes simultáneos (SCA, método muy similar al PCA).

Así, en ASCA se descompone la matriz de datos experimentales en la suma de diferentes matrices caracterizadas por la varianza causada por los factores experimentales considerados. Posteriormente, se aplica SCA a cada una de estas matrices individualmente. La evaluación estadística de los efectos de los diferentes factores y sus interacciones se lleva a cabo mediante un test de permutaciones.

En este proyecto se ha realizado un test de 1000 permutaciones para cuantificar el *p*-valor de cada factor e interacción, también conocido como nivel de significación observada. Se considera que una serie de datos es estadísticamente significativa si su *p*-valor es menor o igual a 0.05 (5%)²³.

1.3.7.3. Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA)

El análisis discriminante es un método quimiométrico de tratamiento estadístico de datos que incluye información sobre las muestras ya que es un método supervisado. Actualmente, el método más utilizado en el campo de la metabolómica es el PLS-DA que considera dos matrices. La matriz **X** contiene la información, y se correlaciona con una propiedad de la matriz **Y**. A diferencia del PCA, en este caso se calculan los componentes (variables latentes) que mejor relacionan la información presente en las matrices **X** e **Y**. Este proceso es muy útil para hacer modelos de calibración destinados a determinar la correlación entre dos elementos, incluso cuando no es evidente²⁴.

En el presente proyecto la matriz **X** está formada por las muestras en las filas y los diferentes metabolitos en las columnas. La matriz **Y** está formada por 0 y 1, dependiendo del factor analizado tendrán un significado u otro. Por ejemplo, en el caso de la temperatura, se le da un valor de 0 a las muestras de baja temperatura y de 1 a las de alta temperatura.

El objetivo de este método es relacionar las dos matrices utilizando un número pequeño de factores relevantes conocidos como variables latentes (LV). La Figura 16 muestra los dos diagramas resultantes

de este análisis. Por un lado, el diagrama de *scores* en el que se observa si existe separación entre los diferentes grupos de muestras y, por otro, los *loadings* se evalúan mediante los índices VIP. Seguidamente se obtiene la matriz de pesos (\mathbf{W}) a partir de la cual se calcularán las Variables Importantes en la Proyección (VIP). El VIP indica la importancia que tiene una variable determinada en el modelo PLS-DA, por lo tanto, cuanto más grande sea el índice VIP más importante será la variable. Por convención internacional, se considera que una variable es significativa si tiene un VIP mayor a 1²⁵.

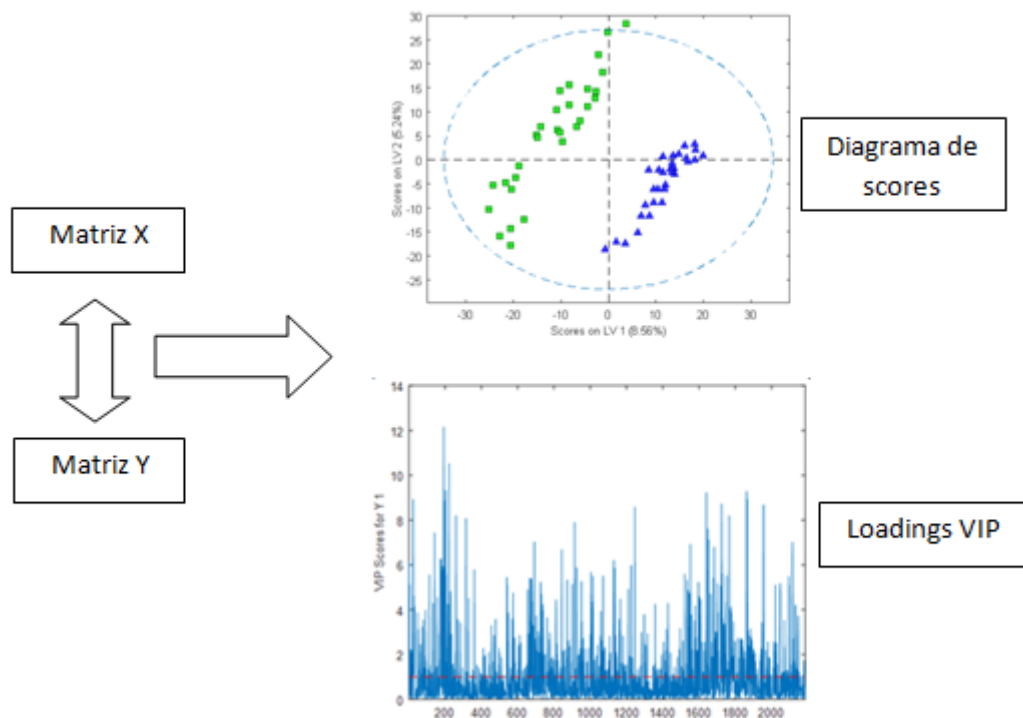


Figura 16. Obtención de los diagramas de scores y loadings.

La calidad del modelo PLS-DA se basa en el análisis de la sensibilidad y especificidad del modelo. La sensibilidad es la probabilidad de asignar correctamente una muestra que pertenece a la clase. La especificidad mide la probabilidad de clasificar correctamente una muestra que no pertenece a la clase. Por lo tanto, hay que tener en cuenta los conceptos de verdaderos positivos (VP), verdaderos negativos (VN), falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN). Los VP son muestras que el modelo las ha clasificado correctamente en el grupo que les pertenecen. Los VN son las muestras que no pertenecen a la clase y no han sido asignados como tal. Los FP son muestras que el modelo clasifica en el grupo pero que no pertenecen a dicho grupo. Los FN son las muestras que pertenecen a la clase, pero el modelo no las clasifica como tal. En la Tabla 2 se presenta una tabla de diagnóstico (contingencia) para analizar la calidad del modelo PLS-DA²⁶.

Tabla 2. Tabla de diagnóstico del modelo PLS-DA.

		Valor real	
		Positivo	Negativo
Valor del modelo	Positivo	Verdaderos Positivos (VP)	Falsos Positivo (FP)
	Negativo	Falsos Negativos (FN)	Verdaderos Negativos (VN)

En el caso de la metabolómica y la lipidómica, el análisis discriminante se usa para diferenciar entre los diferentes tratamientos de muestras y, además, para calcular el VIP de cada metabolito y/o lípido de manera que se puedan identificar aquellos analitos más afectados por el tratamiento. Por lo tanto, es una herramienta útil para analizar el efecto de la temperatura y de la sequía en el lipidoma de la planta de arroz.

Finalmente, conociendo los metabolitos o lípidos más relevantes en el análisis de PLS-DA se pueden identificar buscando su relación carga/masa y su espectro de fragmentación en bases de datos online de metabolómica como METLIN, HMDB (Human Metabolome Database) y/o Lipid Maps⁷.

OBJETIVOS

2. Objetivos

El objetivo general del presente proyecto es estudiar los cambios a nivel lipídico y fenotípico provocados por la falta de agua y un aumento de la temperatura ambiente durante las etapas de crecimiento de un organismo vegetal modelo, concretamente el arroz (*Oryza sativa japonica* Nipponbare).

Además, se pueden detallar una serie de objetivos secundarios:

- Desarrollo de un procedimiento para el estudio fenotípico de muestras de arroz analizando la longitud del tallo y de las raíces, el área de la parte aérea y el contenido de agua de la planta.
- Comprobar que el procedimiento de extracción y el análisis instrumental seleccionados permiten un correcto desarrollo del estudio lipídico.

METODOLOGÍA

3. Metodología

En este apartado se explica la metodología utilizada para la realización del proyecto. Se han llevado a cabo dos tipos de estudios complementarios: fenotípico y lipidómico. En primer lugar, se presenta el procedimiento de obtención de la muestra (cultivo y crecimiento de las plantas) definiendo también las condiciones ambientales a las que se someten. Seguidamente, se expone el procedimiento de análisis utilizado en los dos tipos de estudios.

3.1. Cultivo de arroz

Con el objetivo de acelerar el proceso de germinación, las semillas se colocaron en dos recipientes de vidrio durante dos días en una estufa a 30°C. Pasado este período, se extrajeron las semillas para ser sembradas en semilleros. Durante la etapa de cultivo se sembraron un total de 180 semillas de *Oryza sativa japonica* Nipponbare, agrupadas en 20 bandejas de 9 semilleros cada una (semilleros de 3x3). En la Figura 17 se observa la distribución de los semilleros en una de las bandejas.

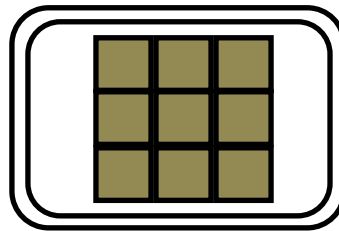


Figura 17. Distribución de los semilleros.

La tierra utilizada durante el cultivo se obtuvo a partir de una mezcla de turba, vermiculita, fertilizante y carbonato de calcio (CaCO_3).

La turba es un material orgánico rico en carbono que procede de la descomposición de los vegetales. Se utiliza principalmente como combustible y abono orgánico. Las características más importantes de la turba son²⁷:

- la elevada capacidad de intercambio catiónico.
- la gran capacidad de retención de agua.
- la facilidad para la extracción de agua por parte de las raíces.
- una elevada porosidad que permite una buena aireación del suelo.

El fertilizante se utiliza para mantener o incrementar el contenido de nutrientes en el suelo y así mejorar el crecimiento vegetativo de las plantas. El fertilizante utilizado contiene principalmente nitrógeno, fósforo, potasio y magnesio, además de contener otros micronutrientes solubles en agua como cobre, hierro, manganeso, boro, molibdeno y zinc.

La vermiculita es un mineral de la familia de las micas compuesto principalmente de silicatos de aluminio, hierro y magnesio. También puede contener restos de potasio, calcio y amonio necesarios para el cultivo. Se trata de un material ligero, de pH neutro, inerte, barato, fácil de utilizar y de mezclar con otros compuestos. Se utiliza con el objetivo de favorecer la aireación del suelo y retener la humedad y nutrientes necesarios para el desarrollo de la planta.

Finalmente, el carbonato de calcio se añade principalmente para mantener el pH del suelo en condiciones neutras y estables y tener una fuente valiosa de calcio para la nutrición de las plantas. Al neutralizar el pH del suelo se obtienen mejoras en la asimilación de nutrientes, la fijación de nitrógeno y el crecimiento de las plantas.

Una vez plantadas las semillas tal como se observa en la Figura 18, se irrigan los semilleros hasta asegurar que la base de la bandeja contuviera la cantidad suficiente agua (150 mL.).



Figura 18. Semillero preparado para iniciar la etapa experimental.

3.2. Condiciones de crecimiento del arroz

Las plantas se cultivaron en una cámara Panasonic MLR-352H que permite simular las fluctuaciones diarias estableciendo las condiciones ambientales deseadas. En la Figura 19 se presenta la cámara de crecimiento utilizada.



Figura 19. Cámara Panasonic MLR-352H

Los parámetros que permite modificar son la humedad, la temperatura y la intensidad de la luz. En la Figura 20 se muestran los ciclos diarios de humedad y temperatura de la cámara para cada caso experimental.

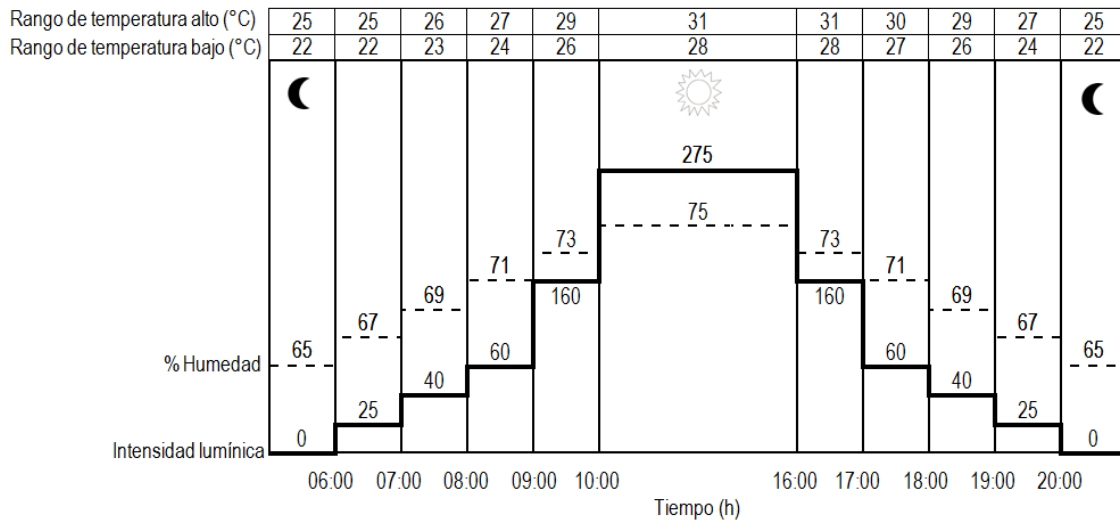


Figura 20. Ciclos diarios de intensidad lumínica, humedad y rangos de temperatura de la cámara de crecimiento.

Como se observa en la Figura 20, se estudió el efecto de la variación de la temperatura en el crecimiento de las plantas. Así, se aumentó la temperatura de la cámara en 3°C manteniendo constantes el resto de condiciones experimentales.

El riego se realizó tres días por semana en un total de 22 días. El experimento tuvo una duración de 22 días porque se considera que es el momento en que surge la tercera hoja de la planta de arroz. Durante los primeros diez días se regaron todas las bandejas con la misma cantidad de agua, concretamente 150 ml., para asegurar el crecimiento de la planta y tener una cantidad de muestra suficiente para realizar los estudios posteriores. A los diez días, se inició el tratamiento durante 12 días estableciendo 4 condiciones de riego: 150 (muestras de control), 100, 50 y 5 ml. Finalmente durante los dos últimos días de riego se escogieron dos bandejas al azar de cada condición para volverlas a regar con 150 ml. y poder analizar la capacidad de recuperación de las plantas. En la Figura 21 se muestran las plantas de arroz en la cámara de crecimiento durante el tratamiento.



Figura 21. Cultivo de arroz en la cámara de crecimiento.

Para poder mantener la uniformidad del cultivo y minimizar la variabilidad causada por la posición de cada bandeja, se estableció un protocolo de rotación diario generado al azar.

3.3. Muestreo

A los 22 días se procedió a recoger las plantas, separando aquellas destinadas al estudio fenotípico y al estudio lipidómico. Para cada planta se separaron la parte aérea y las raíces. Las muestras destinadas al estudio lipidómico se conservaron en nitrógeno líquido para interrumpir el metabolismo de las células y, posteriormente, se colocaron en un congelador a -80°C hasta su análisis. Por otro lado, se separaron las plantas para el estudio fenotípico en el momento del muestreo.

3.4. Estudio fenotípico

Se analizaron 6 plantas de cada condición de riego, teniendo en cuenta que para las condiciones de 100, 50 y 5 ml. se examinaron tres plantas con recuperación y tres plantas sin recuperación. Por lo tanto, para cada condición de temperatura (baja y alta) se dispuso de 24 plantas.

Los parámetros estudiados fueron los siguientes:

- la longitud del tallo y de las raíces
- el área total de la parte aérea
- el contenido de agua en las partes aéreas y las raíces

Estos factores son indicadores visuales del estado en el que se encuentra la planta. Por otro lado, la disponibilidad de agua y la temperatura ambiente influyen en la economía hídrica de la planta por lo que cuantificar el contenido de agua puede permitir establecer una relación entre ambas condiciones ambientales.

3.4.1. Protocolos de medida de los estudios fenotípicos

La longitud del tallo y de las raíces se midió directamente durante el muestreo. Para la determinación de la longitud del tallo se midió desde el inicio del tallo hasta el extremo de la hoja más larga. En el caso de las raíces, se midió desde el inicio de la raíz hasta el extremo de la raíz más larga.

Para la estimación del área de la parte aérea se realizaron fotos de todas las muestras y se utilizó el software ImageJ para determinarla²⁸. Este programa establece una relación entre una distancia conocida de la foto y la cantidad de píxeles que representa esa distancia. Con esta relación se puede determinar el área seleccionada. En la Figura 21 se presenta un ejemplo del cálculo de superficie de la planta seleccionada.

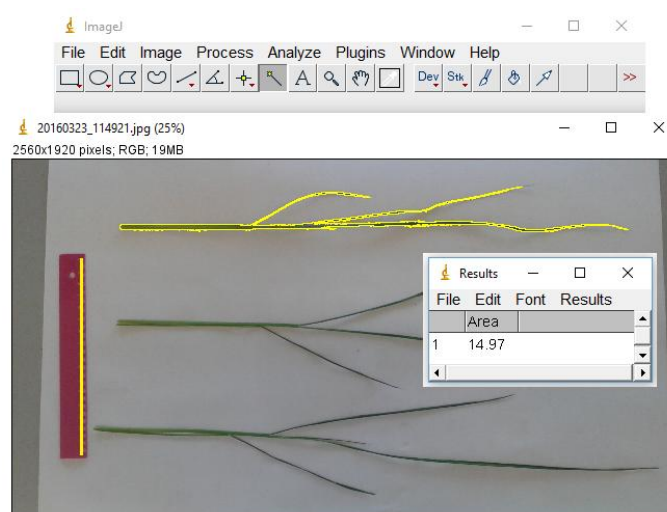


Figura 22. Cálculo del área de la planta seleccionada con el programa ImageJ.

El contenido de agua se cuantificó siguiendo el procedimiento gravimétrico que se expone a continuación paso a paso en el cual se utilizan un desecador, una estufa a presión atmosférica y una balanza analítica.

- Se pesaron las muestras de las partes aéreas y de las raíces por separado en el momento del muestreo y se colocaron en una estufa a 80°C durante tres horas.
- Seguidamente se colocaron en un desecador durante 30 minutos para enfriar las muestras hasta temperatura ambiente.
- Finalmente se realizó una segunda pesada para poder determinar el contenido en agua de cada muestra utilizando la ecuación 2.

$$H(\%) = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \cdot 100$$

Ecuación 2. Cálculo del % de humedad.

La manipulación de las muestras siempre se realizó con guantes y pinzas.

3.5. Estudio lipidómico

En este apartado se presentan los pasos seguidos para realizar el estudio lipidómico. Este procedimiento se divide en la extracción de los metabolitos y la reconstrucción de las muestras, el análisis cromatográfico y, finalmente, el análisis de los datos obtenidos.

3.5.1. Extracción de los lípidos

En esta etapa del estudio lipidómico se aplicó el método MTBE para la extracción de lípidos. Las soluciones necesarias para este método son las siguientes:

MTBE:MeOH (3:1) + 0.01% BHT (Butilhidroxitolueno)

H₂O:MeOH (3:1)

MeOH:H₂O (1:0.85)

Para iniciar al proceso de extracción se trituraron las hojas y las raíces por separado para cada condición de riego en un mortero. En la parte inferior del mortero se colocó nitrógeno líquido para facilitar la trituración. Una vez trituradas todas las muestras, se liofilizaron durante 24 horas para eliminar la humedad restante.

Una vez liofilizadas las muestras en polvo, se siguió el protocolo de extracción que se presenta en la Figura 22 de forma esquemática.

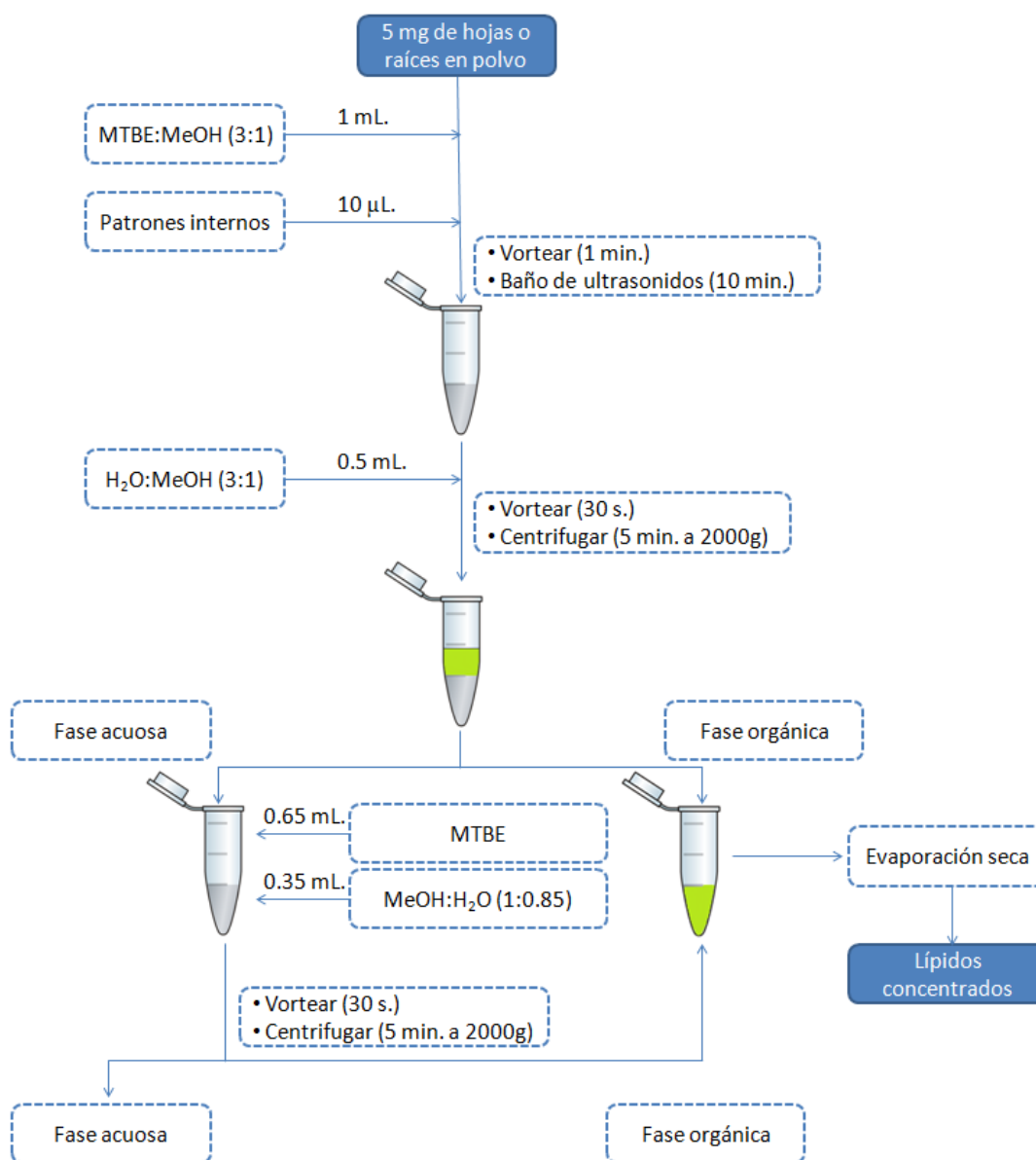


Figura 23. Extracción MTBE para lípidos.

Para cada grupo de condiciones de riego y temperatura se realizaron 8 replicados. Por lo tanto se obtuvieron un total de 128 muestras de las cuales 64 correspondían a hojas y raíces a temperatura normal y las otras 64 a hojas y raíces a una temperatura 3°C superior. Una vez concentrados los analitos, se conservaron en un congelador a -80°C hasta el día del análisis cromatográfico.

3.5.2. Reconstrucción de muestras y preparación de los controles de calidad (QCs)

La etapa de reconstrucción de las muestras se realizó añadiendo 250 µL de una solución de MeOH:H₂O (4:1) y 10 µL de una mezcla de patrones internos (esfingolípidos) a cada muestra. Finalmente, las soluciones obtenidas se traspasaron a sus correspondientes viales para su inyección en el cromatógrafo.

Se prepararon dos muestras para ser utilizadas como controles de calidad (QCs) del análisis instrumental. Así, se añadieron 10 μL de cada muestra reconstruida en un mismo eppendorf. Estos QCs se prepararon con la finalidad de equilibrar el sistema separativo antes de la inyección de las muestras, calcular la precisión instrumental y/o corregir la señal.

3.5.3. Análisis cromatográfico y quimiométrico

Para la separación y detección de los lípidos se utilizó un equipo de cromatografía líquida acoplado a un espectrómetro de masas. El procedimiento cromatográfico se realizó a 30°C en un equipo Acquity UHPLC (Waters, Milford USA) equipado con una bomba cuaternaria, un inyector automático y un horno. Se utilizó una columna KINETEX Phenomenex (1.7 μm C8, 100 Å, 100 x 2.1 mm).

El método de gradientes tiene una duración de 22 minutos por muestra como se presenta en la Tabla 3. Se utilizó la combinación de dos fases móviles:

- Solvente A: Metanol + 1mM formiato de amonio + 0.02% ácido fórmico
- Solvente B: Agua + 2mM formiato de amonio + 0.02% ácido fórmico

Tabla 3. Método de elución aplicado.

Tiempo (minutos)	Flujo	Solvente A	Solvente B	Modo de elución
0 - 3	0.3	80 --> 90	20 --> 10	Lineal
3 -6	0.3	90	10	Isocrático
6 - 15	0.3	90 --> 99	10 --> 1	Lineal
15 - 18	0.3	99	1	Isocrático
18 - 20	0.3	99 --> 80	1 --> 20	Lineal
20 - 22	0.3	80	20	Isocrático

La utilización del método por gradiente permite una mejor separación de los compuestos. Al inicio, la fracción de agua en la fase móvil es mayor por lo tanto los compuestos más polares se eluyen al principio. Con el tiempo aumenta la fracción de metanol y, en consecuencia, eluyen los compuestos apolares.

En la detección de los lípidos se utilizó un espectrómetro de tiempo de vuelo (TOF), concretamente el modelo LCT Premier XE-time-of-flight (TOF) analyzer (Waters, Milford USA) equipado con un electrospray (ESI) como fuente de ionización en modo negativo y positivo. Para la detección se aplicó un rango de masas de 50 a 1800 m/z.

Los datos del equipo cromatográfico se obtuvieron en formato RAW, propiedad de Waters. Utilizando el programa Databridge del programa MassLynx se transformaron al formato CDF. Este paso se realizó para poder cargar todos los datos al programa Metabonexus. Una vez realizada la etapa de pretratamiento, se importaron los datos al entorno MATLAB y mediante la aplicación PLS Toolbox (Eigenvector Research) se realizó el análisis quimiométrico correspondiente.

El PCA se utilizó para realizar un análisis exploratorio del comportamiento de las muestras y observar si los grupos sometidos a diferentes tratamientos se separan o no. En el caso de separarse, se prosiguió con el análisis ASCA para estudiar la significación estadística de los factores de estudio y sus interacciones. Si se trata de factores significativos, quiere decir que existe una probabilidad elevada de que la separación de las muestras observada en el PCA se deba a los factores abióticos de estudio. Finalmente, se realizó un análisis discriminante de PLS-DA comparando los diferentes niveles de los factores significantes y poder obtener los índices VIP de cada lípido detectado. Debido a la gran cantidad de lípidos con un VIP mayor a 1, se decidió identificar la categoría y clase de los 50 lípidos que presentaban VIPs más elevados.

En la base de datos de Lipidmaps²⁹ se introdujeron las masas de estos lípidos y se buscaron los aductos de [H⁺], [NH₄⁺] y [Na⁺] en modo positivo y, [H⁻] y [FA] en modo negativo. Una vez identificada la categoría y clase de los lípidos, sólo se seleccionaron aquellos que tienen un error igual o inferior a 25 ppm. Este procedimiento se realizó para la parte aérea y las raíces de las plantas de arroz y los factores de nivel de riego y temperatura.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. Resultados

En este capítulo se presentan y analizan los resultados obtenidos a partir de la determinación experimental de las alteraciones fenotípicas y lipidómicas que se producen en la planta modelo (*Oryza sativa japonica* Nipponbare) ante situaciones creadas de estrés hídrico y cambios en la temperatura ambiente.

4.1. Estudio fenotípico

Antes de presentar los resultados de este estudio, es necesario comentar que para asegurar la representatividad de la muestra y la significación de los resultados debería repetirse el experimento y así disponer de un mayor número de muestras. A pesar de este hecho, los resultados obtenidos son claramente orientativos y se pueden analizar con la finalidad de observar tendencias generales en los cambios ocasionados por los tratamientos.

A continuación, para cada factor analizado se presentan los resultados en forma de gráficos de barras en los que se muestran los promedios y la desviación estándar para cada condición de riego y rango de temperatura.

4.1.1. Longitud del tallo y las raíces

En la Figura 23 se representan los promedios de las longitudes de los tallos en función de los diferentes niveles de riego y rangos de temperatura. En ambos casos se observa una tendencia decreciente en la longitud del tallo a medida que se reduce la cantidad de agua de riego.

En el rango de temperaturas bajo (22-28°C) el patrón se repite en todas las condiciones de riego. El promedio de la longitud del tallo se reduce pero aumenta en los casos en que se ha realizado la recuperación durante los dos últimos días. Hay que comentar que la desviación estándar en algunos casos es demasiado grande para poder asegurar que la recuperación sea estadísticamente significativa, como por ejemplo en el caso de los 100 mL y 5 mL con recuperación y el grupo de 5 mL sin recuperación del rango de bajas temperaturas.

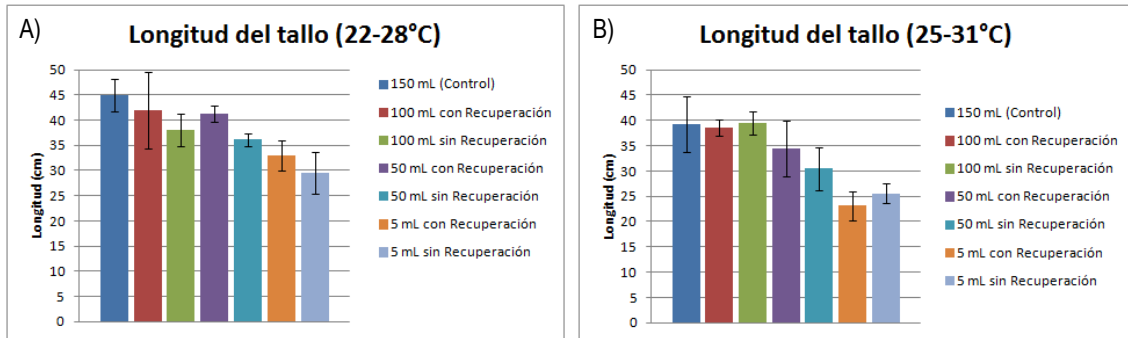


Figura 24. Longitud promedio del tallo para cada condición de riego en: A) Rango de temperatura: 22-28°C; B) Rango de temperatura: 25-31°C)

En el rango de temperaturas alto (25-31°C) no se observan grandes diferencias entre las muestras control y las regadas con 100 mL. Para la condición de 50 mL si hay una reducción del promedio respecto a los controles y las de 100 mL. También se observa una diferencia de 4 cm entre las muestras de 50 mL recuperadas y no recuperadas, aunque los promedios quizá no sean representativos ya que presentan desviaciones de ± 5.4 y ± 4.2 cm, respectivamente. Las muestras de 5 mL presentan un comportamiento contrario, en este caso las muestras sin recuperación presentan un promedio mayor a las muestras con recuperación, aunque la desviación en ambos casos podría justificar que estos resultados no sean significativos estadísticamente. Por lo tanto, los resultados analizados solo permiten establecer una tendencia general ya que las desviaciones estándares son demasiado grandes en algunos casos.

Los resultados de las muestras de las raíces tienen un comportamiento diferente comparado con el de la parte aérea. En la Figura 24 se muestran los resultados para el nivel de temperatura bajo y alto. En el rango de 22-28°C no se observan grandes diferencias entre los promedios ni las desviaciones típicas. Destacar la gran diferencia que se observa en la longitud promedio de las raíces regadas con 5 mL y sin recuperación. Presentan una diferencia de 4.7 y 3.6 cm respecto a las raíces regadas con el mismo volumen, pero con recuperación y las raíces de las muestras control.

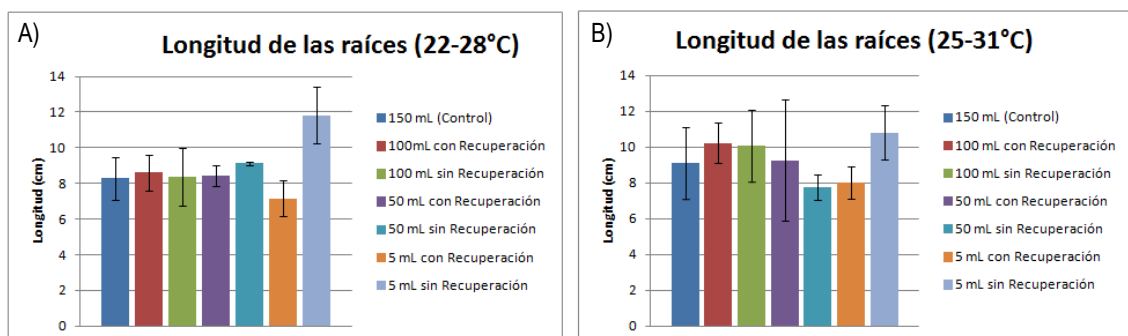


Figura 25. Longitud promedio de las raíces para cada condición de riego: A) Rango de temperatura: 22-28°C; B) Rango de temperatura: 25-31°C)

En el rango de altas temperaturas se observan promedios más elevados comparado con el rango bajo en las condiciones de 150, 100 y 50 mL. con recuperación. También se observa que las raíces sometidas a un déficit de agua más extremo (5 mL sin recuperación) tienen una longitud promedio mayor que el resto, pero la diferencia no es tan grande como en el rango de temperaturas bajas. De nuevo, se debería aumentar el número de muestras analizadas para poder asegurar la significación estadística de los datos.

En el efecto de déficit de agua, las tendencias observadas son muy similares para ambos rangos de temperatura. Respecto a la longitud del tallo, hay una tendencia decreciente a medida que se reduce la disponibilidad de agua. Este hecho puede deberse a que el agua es un componente indispensable en algunos procesos de desarrollo de la planta como la fotosíntesis y la absorción de nutrientes. En el caso de las raíces, la tendencia se mantiene más o menos estable, aunque las muestras con un mayor déficit de agua presentan longitudes más elevadas. La planta al encontrarse bajo condiciones de estrés hídrico debe adaptarse desarrollando el órgano principal de absorción de agua, las raíces. Analizando el efecto de la temperatura, los tallos de las plantas sometidas a temperaturas más elevadas son ligeramente más cortos. Esta observación puede ser causada porque al aumentar la temperatura se incrementa la transpiración de las hojas y la evaporación del agua del suelo. Por lo tanto el déficit hídrico es mayor y se retrasa el desarrollo de la planta. En el caso de las raíces, al aumentar la temperatura se observa que las raíces de las muestras con menos estrés hídrico son ligeramente más largas. Este fenómeno puede ser causado por el aumento del estrés hídrico causado por un incremento de la temperatura.

4.1.2. Área de la parte aérea

Respecto a la superficie de la parte aérea, se presentan los promedios y desviaciones típicas para cada condición de riego y para los rangos de temperatura bajo (22-28°C) y alto (25-31°C) en la Figura 25. En este caso sí que se observan tendencias generales bastante claras.

En el rango de temperatura bajo hay una tendencia decreciente a medida que se reduce la disponibilidad de agua. Se observa que las plantadas sometidas al proceso de recuperación, presentan áreas mayores.

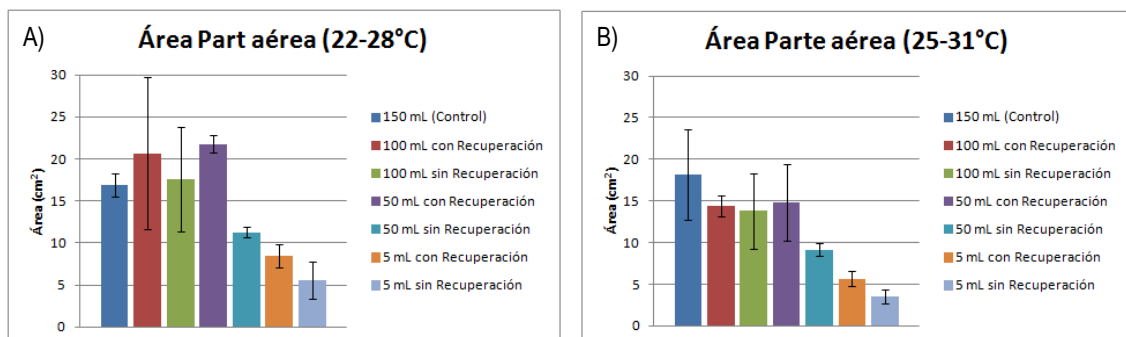


Figura 26. Área promedio de la parte aérea para cada condición de riego en: A) Rango de temperatura: 22-28°C; B) Rango de temperatura: 25-31°C.

Al aumentar la temperatura se sigue observando la tendencia decreciente a medida que aumenta el déficit hídrico. Los niveles altos de riego (150, 100 y 50 mL con recuperación) presentan valores altos de desviación típica. La recuperación también produce cambios en las plantas, sobre todo en las que están sometidos a 50 y 5 mL de agua de riego. En general las plantas expuestas a temperaturas más altas presentan áreas más pequeñas.

El efecto del déficit hídrico y el aumento de la temperatura provocan una tendencia decreciente de la superficie de la parte aérea de la planta ya que ambos factores están relacionados e intervienen en la economía hídrica de la planta.

4.1.3. Contenido de agua

En la Figura 26 se presentan los resultados del contenido de agua en la parte aérea de las plantas para los rangos de temperatura bajo y alto. En ambos casos se observa que el porcentaje de humedad en la parte aérea disminuye a medida que aumenta la falta de agua en el medio. Por el contrario, las plantas recuperadas presentan porcentajes de humedad mayores que la muestras no recuperadas.

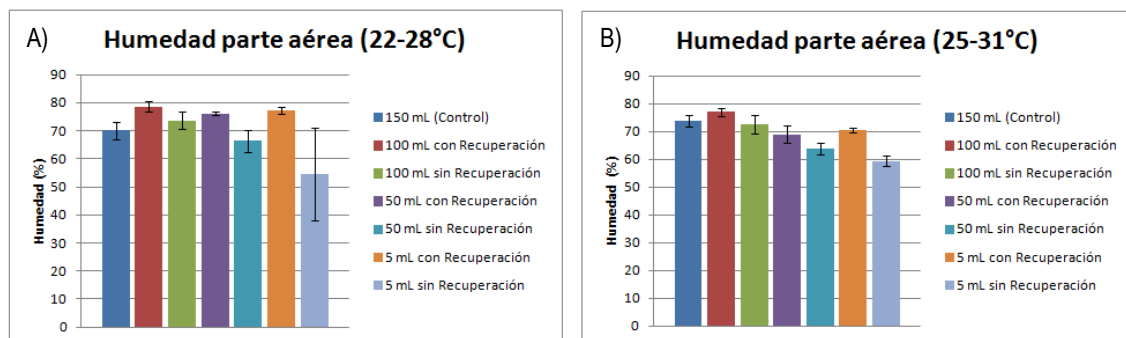


Figura 27. Contenido de agua promedio de la parte aérea para cada condición de riego en: A) Rango de temperatura: 22-28°C; B) Rango de temperatura: 25-31°C

Los resultados de la humedad de las raíces a baja y alta temperatura se presentan en la Figura 27. En el intervalo de temperatura de 22-28°C se observa una tendencia decreciente a medida que se reduce la disponibilidad de agua. Respecto al factor de la recuperación, no hay diferencia entre las muestras de 100 mL pero sí la hay en las muestras de 50 y 5 mL.

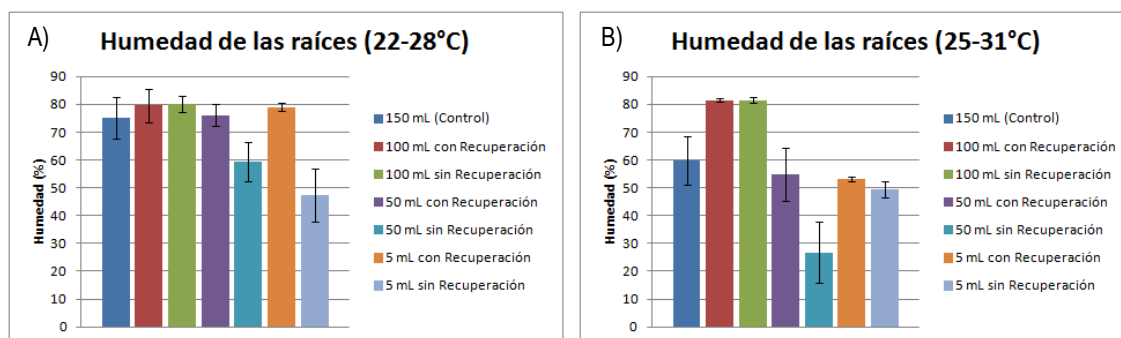


Figura 28. Contenido de agua promedio de las raíces para cada condición de riego en: A) Rango de temperatura: 22-28°C; B) Rango de temperatura: 25-31°C

Al aumentar la temperatura la tendencia es aproximadamente igual al rango de temperaturas bajo, pero se observa un incremento de las diferencias entre las distintas condiciones de riego. Las sometidas a 100 mL presentan los mismo valores en ambos gráficos, pero en las condiciones de 50 y 5 mL el contenido de agua es menor a temperatura elevada. En el caso de las muestras de 50 mL. sin recuperación se observa un promedio muy bajo respecto al resto de condiciones. Sin embargo, presenta una desviación estándar muy elevada por lo que no se puede asegurar la significación de los resultados.

En general, el contenido de agua de la planta está estrechamente relacionado con la cantidad de agua disponible y la temperatura. Si hay menos oferta de agua y aumenta la temperatura la planta entra en condiciones de estrés hídrico ya que tiene menos agua para absorber y aumenta la transpiración de las hojas. Se ha observado que la temperatura tiene mayor efecto en las raíces. Al incrementar la temperatura también aumenta la evaporación del agua del suelo por lo que se podría explicar el incremento de las diferencias en las raíces sometidas a mayor temperatura.

4.2 Análisis lipídomico

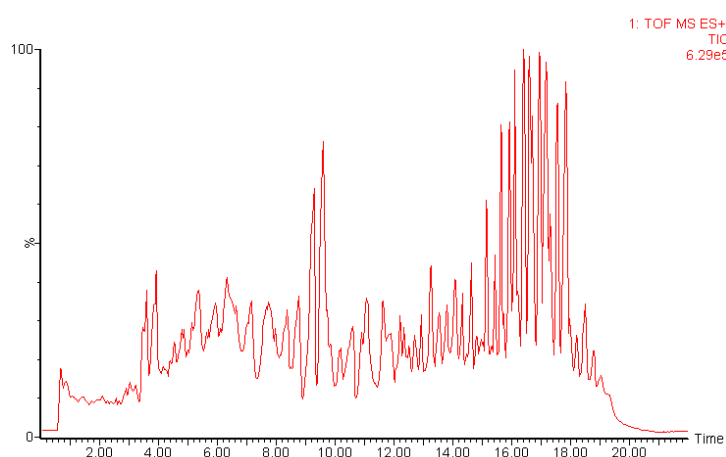
En este apartado se presentan los resultados obtenidos de los análisis estadísticos realizados para las 128 muestras. En la Tabla 4 se muestra el diseño del experimento. Para cada grupo de condiciones de riego (150, 100, 50 y 5 mL.) y temperatura se realizaron 8 replicados, por lo tanto se obtuvieron un total de 128 muestras de las cuales 64 correspondían a hojas y raíces a temperatura normal y las otras 64 a hojas y raíces a una temperatura 3°C superior.

Tabla 4. Diseño experimental.

128 muestras															
Temperatura: 22-28°C								Temperatura: 25-31°C							
32 muestras parte aérea				32 muestras raíces				32 muestras parte aérea				32 muestras raíces			
150	100	50	5	150	100	50	5	150	100	50	5	150	100	50	5
150	100	50	5	150	100	50	5	150	100	50	5	150	100	50	5
150	100	50	5	150	100	50	5	150	100	50	5	150	100	50	5
150	100	50	5	150	100	50	5	150	100	50	5	150	100	50	5
150	100R	50R	5R	150	100R	50R	5R	150	100R	50R	5R	150	100R	50R	5R
150	100R	50R	5R	150	100R	50R	5R	150	100R	50R	5R	150	100R	50R	5R
150	100R	50R	5R	150	100R	50R	5R	150	100R	50R	5R	150	100R	50R	5R
150	100R	50R	5R	150	100R	50R	5R	150	100R	50R	5R	150	100R	50R	5R

*R = recuperación

De cada muestra se obtuvieron sus cromatogramas de iones totales (TICs), se muestra un ejemplo en la Figura 28.

**Figura 29.** Ejemplo de TIC obtenido del análisis cromatográfico.

A continuación, se detectaron los lípidos presentes en las diferentes muestras (*features*) utilizando el programa MetaboNexus basado en el algoritmo XCMS para la detección de compuestos característicos. De esta forma, se detectaron 2185 lípidos en las muestras correspondientes a la parte aérea y 1480 lípidos en las muestras correspondientes a las raíces.

El análisis quimiométrico de las áreas de los lípidos obtenidos en las diferentes muestras se inicia con un Análisis de Componentes Principales (PCA) para comprobar si los tipos de muestras presentan diferencias. Seguidamente, se procede a analizar si los factores y sus interacciones son estadísticamente significativos utilizando el método ASCA (ANOVA – Análisis de Componentes Simultáneos). Finalmente, se realiza la identificación de los lípidos más afectados por los factores considerados significativos mediante un análisis discriminante (PLS-DA).

4.2.1. Parte aérea

4.2.1.1. Análisis de componentes principales

Antes de analizar si las muestras sometidas a diferentes condiciones ambientales presentan variabilidad debida a los tratamientos, se ha comprobado si las muestras se separan correctamente según la ionización utilizada en la espectrometría de masas. La Figura 29 muestra claramente que las muestras se separan según la ionización del espectrómetro de masas (positivo-negativo).

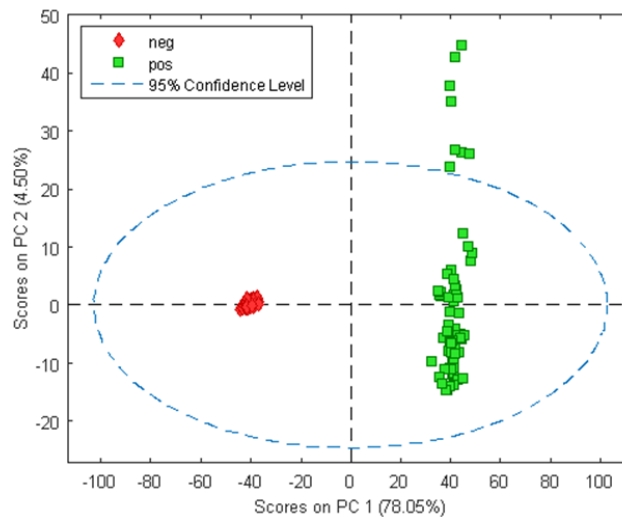


Figura 30. Gráfico score en modo positivo y negativo para las muestras de la parte aérea.

Una vez comprobado que las muestras presentan diferencias según su ionización, se decide analizarlas por separado comparando los diferentes grupos de riego y de temperatura. Seguidamente se comprueban las muestras utilizadas como controles de calidad (QCs) para asegurar la reproducibilidad de las medidas instrumentales durante todo el análisis cromatográfico. En la Figura 30 se observa que los controles de calidad (azul celeste) se agrupan en la misma zona del diagrama lo que indica que la calidad de los datos obtenidos es buena.

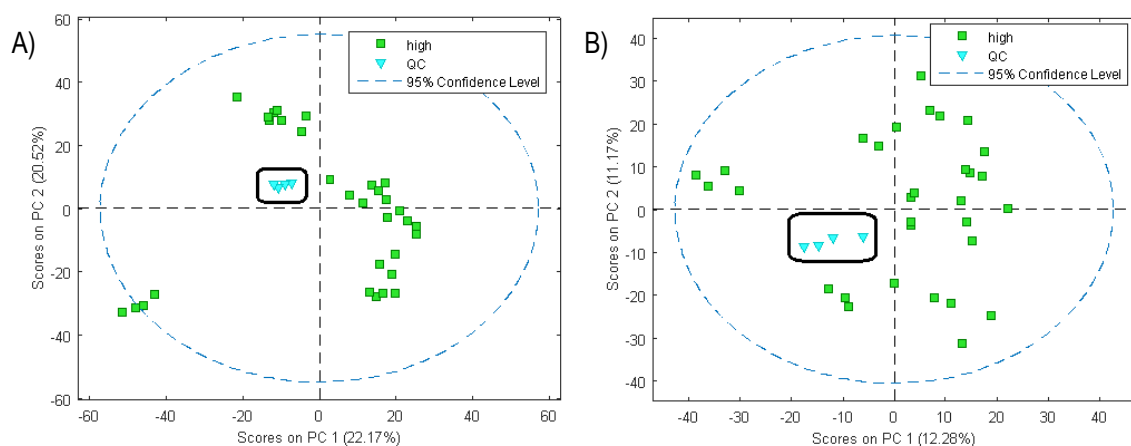


Figura 31. Comparación de las muestras de la parte aérea en el rango de temperaturas altas y los controles de calidad (QC) en: A) Ionización positiva; B) Ionización negativa.

En la Figura 31 se muestra el análisis de PCA en positivo y negativo de los diferentes niveles de riego sometidos a los dos rangos de temperatura. A baja temperatura (31.A y 31.B), el análisis muestra una buena separación de los grupos de 5 y 50 mL entre ellos y el resto de grupos. En los grupos de 100 y 150 mL no se observan diferencias entre ellos ya que se solapan. Respecto al efectos de la recuperación, los PCA presentan diferencias entre los grupos de 5 y 50 mL, excepto en el grupo de 100 mL.

En condiciones de alta temperatura (31.C y 31.D) las muestras de una misma condición de riego se comportan de forma similar y se agrupan separándose de las otras condiciones. En este caso sí que hay una clara separación entre las muestras control (150 mL) y las de 100 mL. La recuperación también tiene un efecto diferenciador de los grupos de muestras menos en el diagrama 31.D, donde las muestras de 100 mL se solapan.

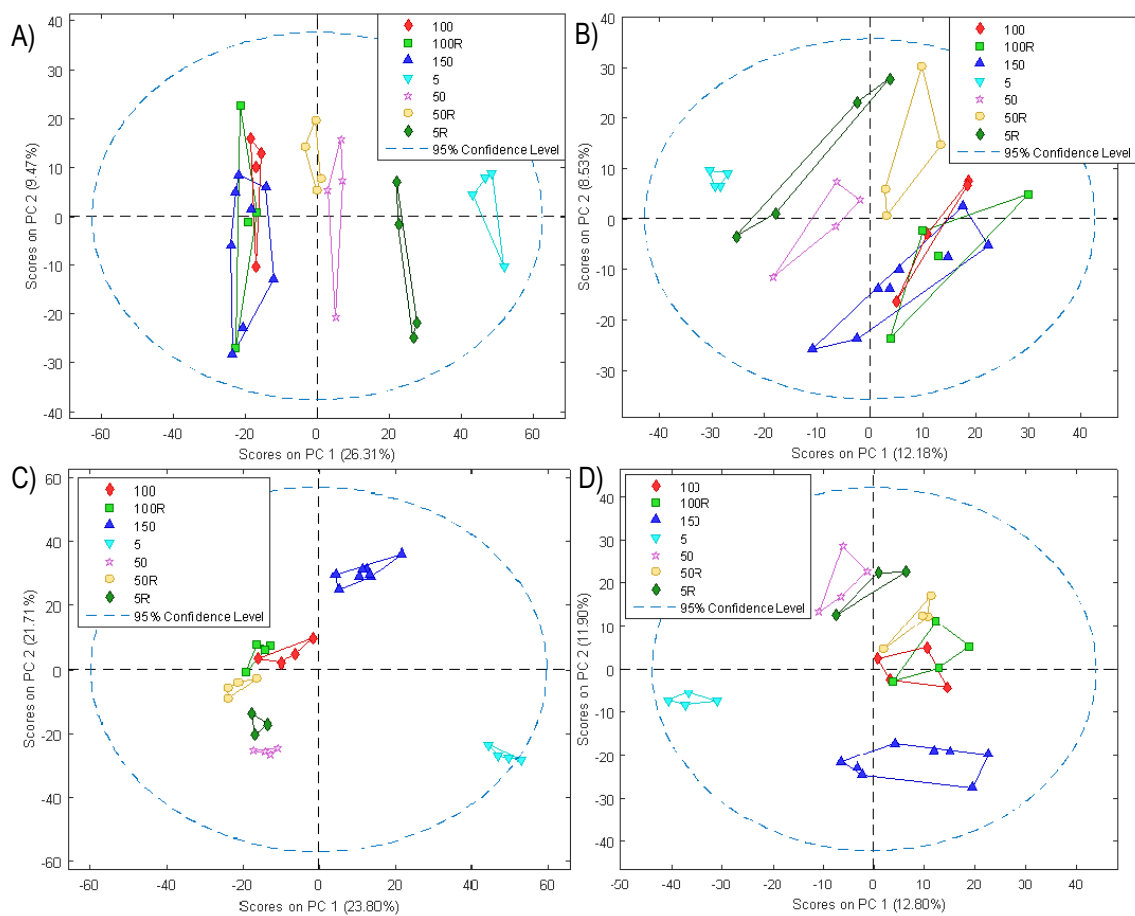


Figura 32. Gráficos scores de cada grupo de riego de la parte aérea: A) Baja temperatura modo positivo; B) Baja temperatura modo negativo; C) Alta temperatura modo positivo; D) Alta temperatura modo negativo.

Si se pretende interpretar la separación obtenida, en el diagrama 31.A se observa que el efecto del déficit hídrico es explicado por el PC1, que es el componente que representa las muestras con mayor varianza (26.31%) y en el que se puede distinguir una ordenación en función de la cantidad de agua de riego. En el

gráfico 31.B, la separación de los grupos de muestras viene determinada por los dos ejes (PC1 y PC2) observando una distribución más diagonal. En los diagramas 31.C y 31.D se observa que el efecto diferenciador de las muestras de 5 mL sin recuperación es explicado por el PC1, mientras que el resto de muestras se separan en base al PC2.

En la Figura 32 se muestra el análisis exploratorio en modo positivo del efecto de la temperatura. El gráfico 32.A presenta una buena separación entre las muestras de baja y alta temperatura. Sin embargo, se observa que algunas muestras del grupo de alta temperatura se agrupan en la misma zona que el grupo de baja temperatura, provocando que los dos grupos se solapen. En el gráfico 32.B se presentan las muestras agrupadas según su nivel de riego, de recuperación y temperatura para poder identificar las muestras de alta temperatura que no se separan de las de baja temperatura. Estas muestras corresponden a los controles de 150 mL. Se separan según la temperatura, pero no lo suficiente para evitar que los dos grupos de temperatura se solapen. Por lo tanto, se deduce que la diferencia entre las muestras control de baja y alta temperatura no es tan grande como en los otros grupos. En consecuencia, se presenta el gráfico 32.C en el que se han eliminado los controles y en este caso sí que se observa una clara separación entre los dos rangos de temperatura. Como se podía esperar por ser condiciones de sequía más extremas, las muestras de 5 mL sin recuperación son las que se separan más del resto de muestras tanto en baja como alta temperatura. Finalmente, se observa que la separación de los dos grupos de muestras es explicada por el PC2, que representa el 16.58% de la varianza de los datos.

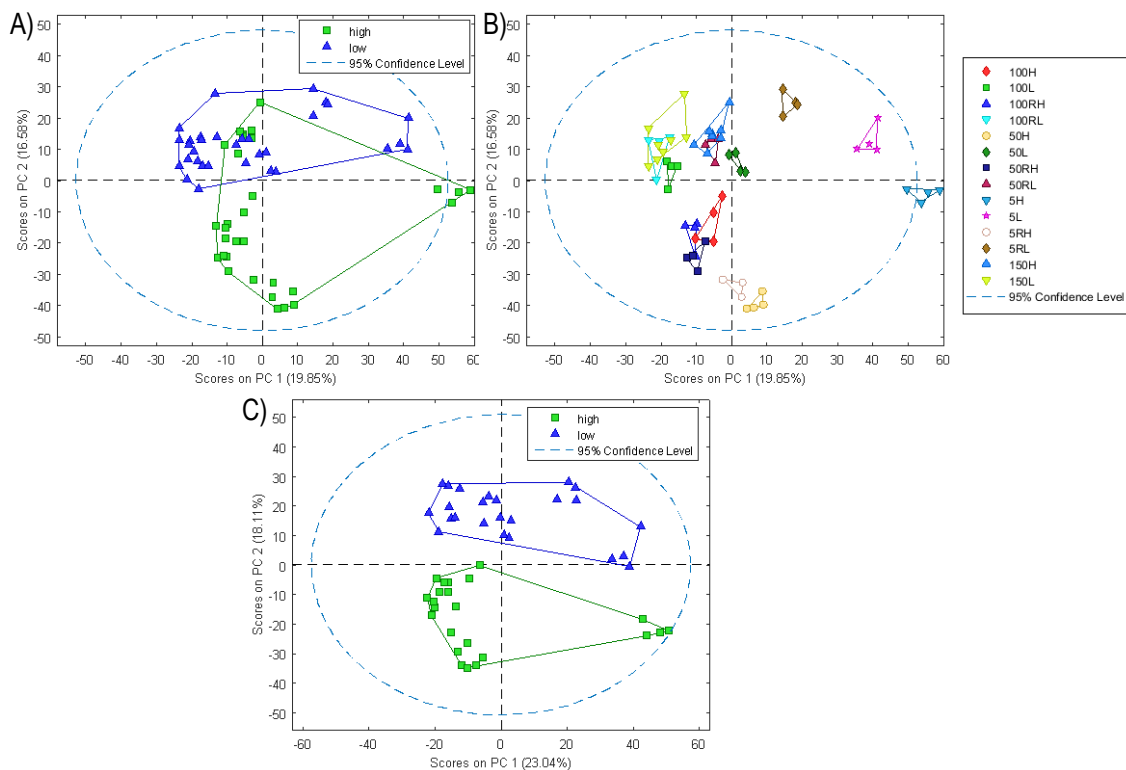


Figura 33. Gráficos scores en positivo de los dos rangos de temperatura de la parte aérea: A) Temperatura baja vs alta; B) Identificación de cada grupo (nivel de riego, recuperación y temperatura); C) Temperatura baja vs alta (sin muestras control).

En la Figura 33 se presentan los resultados del análisis exploratorio del efecto de la temperatura en ionización negativa. El análisis muestra que también hay una buena separación entre los dos grupos de temperatura pero igual que en el modo positivo, hay determinadas muestras del rango de alta temperatura que se solapan con el grupo de bajas temperaturas. Haciendo el mismo análisis que en positivo, se observa que las muestras control de baja y alta temperatura no se separan correctamente entre ellas y se solapan con las de baja temperatura. Por lo tanto, se decide eliminarlas del diagrama consiguiendo una buena separación entre los dos grupos de temperaturas. En este caso las muestra de 5 mL y sin recuperación son las que presentan mayor diferencia con el resto de grupos ya que se encuentran en las condiciones de estrés hídrico más extremas. En este caso, el efecto de la temperatura también es explicado principalmente por el PC2, que representa el 8.32% de la varianza de datos.

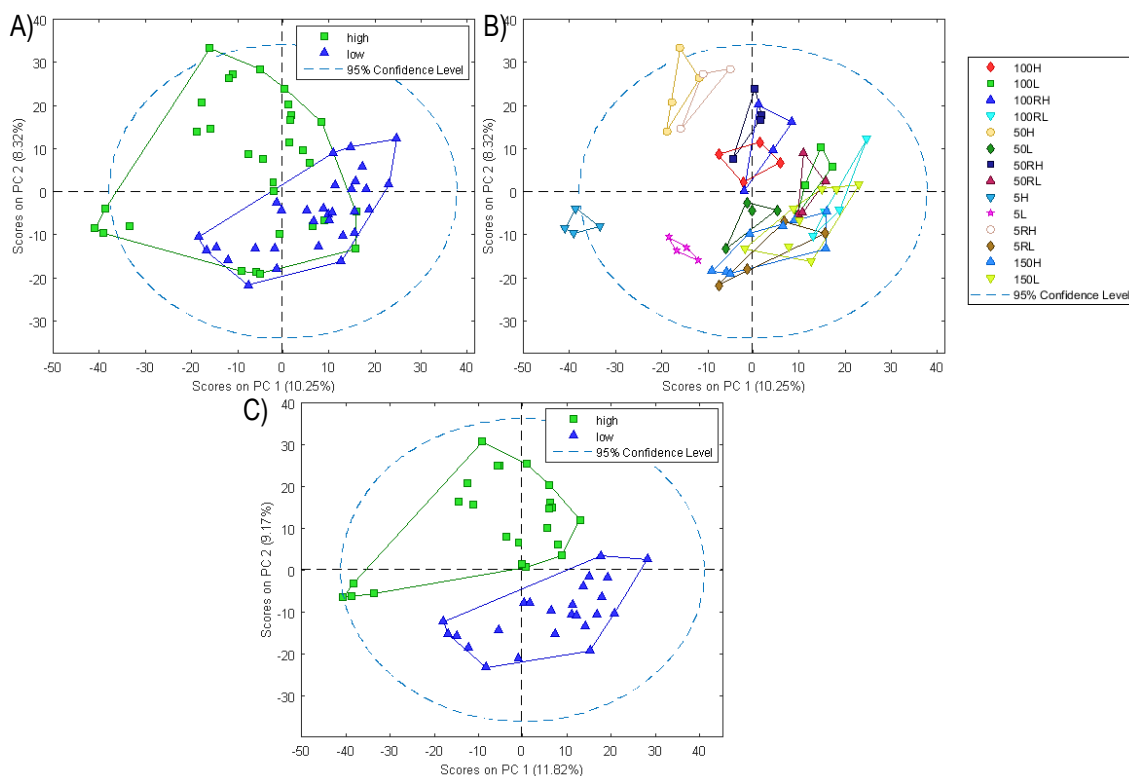


Figura 34. Gráficos scores en negativo de los dos rangos de temperatura de la parte aérea: A) Temperatura baja vs alta; B) Identificación de cada grupo (nivel de riego, recuperación y temperatura); C) Temperatura baja vs alta (sin muestras control).

Finalmente, del análisis de los resultados obtenidos se deduce que a medida que aumenta el déficit hídrico y la temperatura, se incrementa la diferencia entre los grupos de muestras. La recuperación tiene un efecto muy claro ya que se observa que las muestras recuperadas con un déficit de agua mayor tienen un comportamiento similar a las muestras con menor déficit hídrico. Este fenómeno parece lógico respecto a la información teórica recopilada. La disponibilidad de agua y la temperatura ambiente son factores vitales para el desarrollo de la planta por lo que variaciones en ambos factores pueden provocar cambios en su metabolismo y explicar las diferencias que presentan las muestras¹⁵.

4.2.1.2. Estudio de la significación de los factores (ANOVA-ASCA)

Para determinar la significación de los factores de estudio se ha realizado un análisis de varianza ANOVA-ASCA. Como se ha comentado en la introducción, un factor es estadísticamente significativo si tiene un p -valor menor o igual a 0.05 (5%). En la Tabla 5 se presentan los p -valores obtenidos para las series de datos de las muestras de las partes aéreas considerando los factores principales y su interacción de segundo grado. El estudio de cada serie de datos se ha realizado por separado según la ionización que presenten.

Tabla 5. p -valores de los factores y las interacciones entre ellos de los datos de las partes aéreas.

Ionización	Positiva	Negativa
Factores	p -valor	p -valor
Temperatura	0.001	0.001
Nivel de riego	0.001	0.001
Recuperación	0.001	0.034
(Temperatura) x (Nivel de riego)	0.001	0.007
(Temperatura) x (Recuperación)	0.1920	0.272
(Nivel de riego) x (Recuperación)	0.001	0.186

Una vez obtenidos los p -valores para cada caso de estudio se puede constatar que:

- En ionización positiva son significativos todos los factores individuales y las interacciones entre temperatura y nivel de riego y nivel de riego y recuperación.
- En ionización negativa son significativos la temperatura y el nivel de riego y su interacción.

4.2.1.3. Análisis discriminante (PLS-DA)

En el análisis discriminante de los datos se han comparado los dos rangos de temperatura y los cuatro niveles de riego ya que son factores estadísticamente significativos en los dos modos de ionización. En la Figura 34 se presentan los diagramas scores resultantes del análisis PLS-DA considerando como factores la temperatura y las condiciones de riego. Se observa que en todos los casos los grupos se separan correctamente.

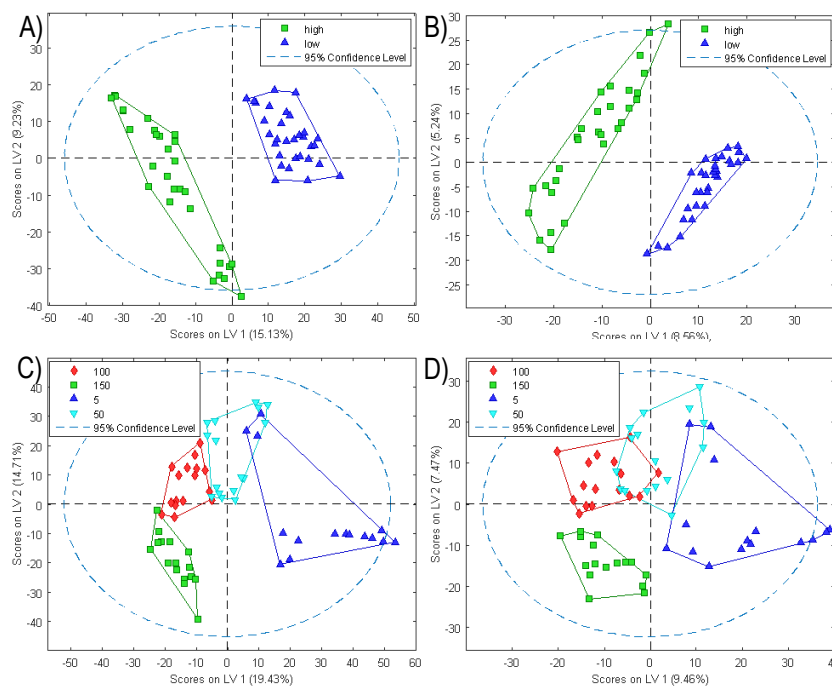


Figura 35. Diagramas scores de las partes aéreas comparando: A) Rangos de temperatura en modo positivo; B) Rangos de temperatura en modo negativo; C) Condiciones de riego en modo positivo; D) Condiciones de riego en modo negativo

En la Tabla 6 se muestra la tabla de diagnóstico en el caso de comparar los dos rangos de temperatura en ionización positiva. En este caso se observa que todas las muestras han sido clasificadas correctamente por el modelo. Para analizar la bondad del modelo PLS-DA se presenta en el anexo 3 los diagnósticos de verificación.

Tabla 6. Diagnóstico del modelo PLS-DA de la parte aérea para la comparación de las temperaturas en modo positivo.

		Valor real	
		Temperatura alta	Temperatura baja
Valor del modelo	Temperatura alta	31	0
	Temperatura baja	0	32

A continuación, en la Figura 35 se muestran los índices VIP para los lípidos detectados en las muestras de las partes aéreas.

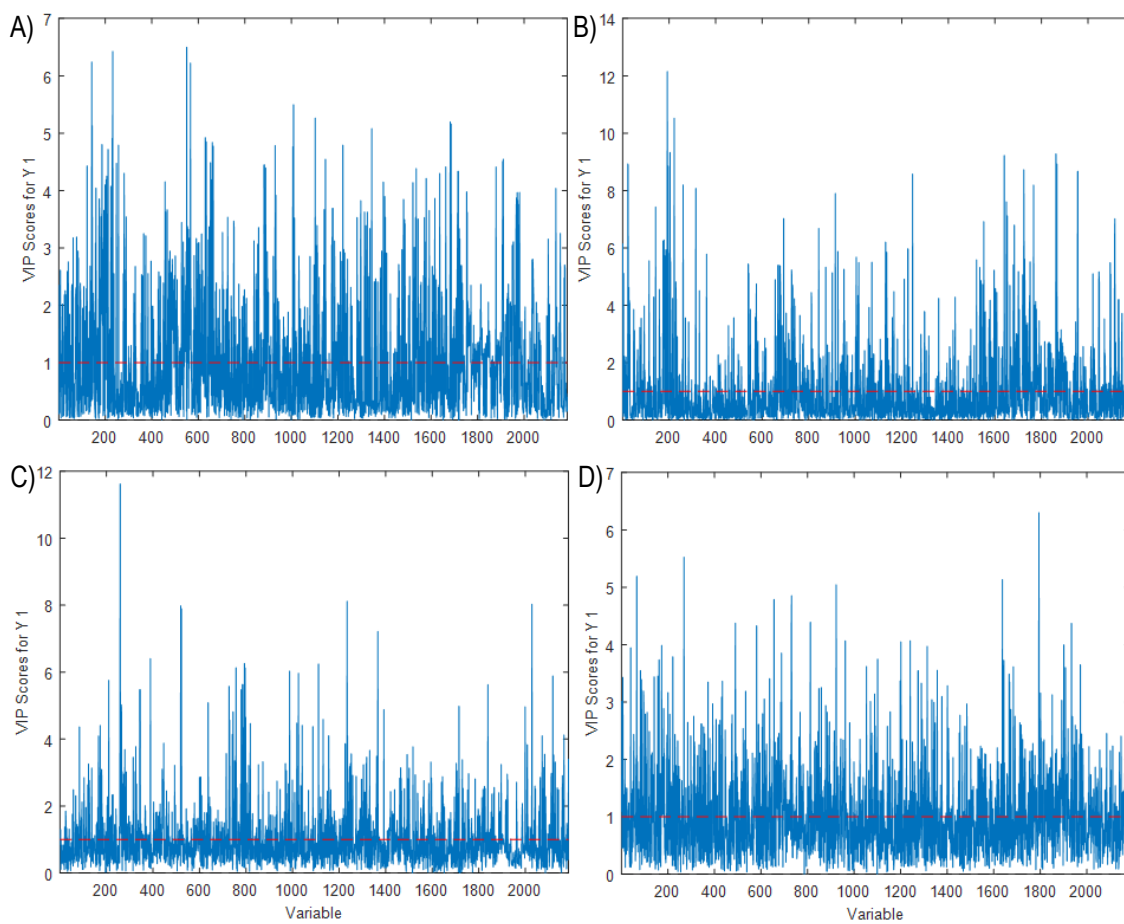


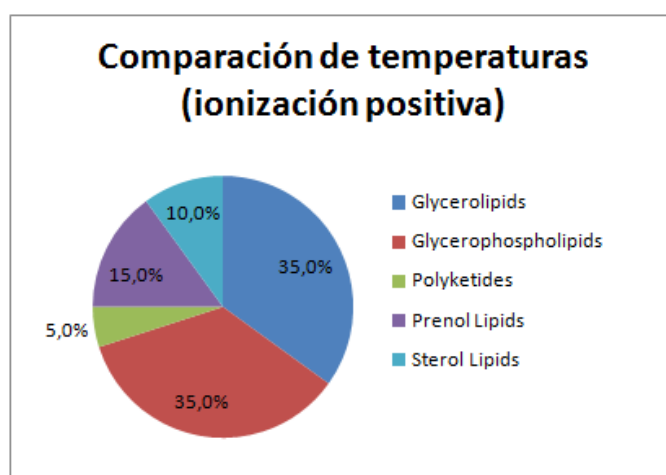
Figura 36. Diagramas de VIPs de la parte aérea comparando: A) Rangos de temperatura en modo positivo; B) Rangos de temperatura en modo negativo; C) Niveles de riego en modo positivo; D) Niveles de riego en modo negativo.

Debido al elevado número de VIPs detectados, se ha identificado con la categoría y clase de lípidos los 50 compuestos con un índice VIP más elevado, ya que son aquellos que permiten diferenciar mejor las variaciones ambientales simuladas experimentalmente. A continuación, en la Tabla 7 se presentan los resultados obtenidos en la comparación de los dos rangos de temperatura en modo positivo, en el que se puede ver el valor de m/z , el tiempo de retención, la categoría, la clase y el error en la identificación tentativa de cada lípido detectado. Esta identificación ha sido posible después de introducir las masas de los lípidos en la base de datos de Lipidmaps²⁹ y seleccionar los aductos de $[H^+]$, $[NH_4^+]$ y $[Na^+]$ en modo positivo y, $[H^-]$ y $[FA]$ en modo negativo. De los 50 lípidos candidatos sólo se muestran aquellos que permiten proponer un posible lípido con un error de identificación igual o inferior a 25 ppm. Por brevedad, el resto de resultados obtenidos de la comparación de los dos rangos de temperatura y de los cuatro niveles de riego de las muestras de las partes aéreas se presentan en el anexo 5.

Tabla 7. Resultados obtenidos comparando los dos rangos de temperatura en modo positivo en las muestras de las partes aéreas.

Variable	Valor m/z	Tiempo de retención (min)	Categoría	Clase	Error (ppm)
232	548,5046	9,57	Prenol Lipids	Hopanoids	15,4
142	433,2347	1,81	Glycerophospholipids	Glycerophosphates	0,6
566	668,6182	6,47	Glycerolipids	Diradylglycerols	0,8
1009	812,6781	13,98	Glycerolipids	Triradylglycerols	23,0
144	435,1416	4,10	Polyketides	Flavonoids	0,4
630	690,6185	14,72	Sterol Lipids	Sterols	0,2
230	540,3308	1,32	Glycerophospholipids	Glycerophosphoserines	22,1
634	691,6228	14,72	Glycerolipids	Diradylglycerols	1,0
660	698,6662	14,20	Glycerolipids	Diradylglycerols	0,7
1221	857,7266	18,76	Sterol Lipids	Sterols	4,4
930	792,7073	15,44	Glycerolipids	Triradylglycerols	0,4
1006	812,6168	9,57	Glycerophospholipids	Glycerophosphocholines Glycerophosphoethanolamines	0,5
883	782,4929	4,20	Glycerophospholipids	Glycerophosphoserines	17,1
122	409,3833	15,31	Prenol Lipids	Isoprenoids	11,0
281	569,4349	7,42	Prenol Lipids	Isoprenoids	0,7
204	520,3398	1,80	Glycerophospholipids	Glycerophosphocholines	0,1
457	622,5563	12,80	Glycerolipids	Diradylglycerols	18,4
1522	931,5433	8,64	Glycerolipids	Glycosyldiradylglycerols	20,8
199	518,3206	2,12	Glycerophospholipids	Glycerophosphocholines Glycerophosphoethanolamines	22,0
160	454,2919	2,11	Glycerophospholipids	Glycerophosphocholines Glycerophosphoethanolamines	2,1

A continuación, se presenta en la Figura 36 las proporciones de cada categoría de lípidos al comparar los dos rangos de temperatura en ionización positiva. Para ver el resto de gráficos ir al anexo 6.

**Figura 37.** Proporción de cada categoría de lípidos en el análisis discriminantes de la temperatura en ionización positiva de las muestras de las partes aéreas.

Analizando los gráficos presentados en el anexo 6 se observa que la mayoría de lípidos más afectados por cambios en la cantidad de agua disponibles y en la temperatura pertenecen a la categoría de los glicerofosfolípidos y glicerolípidos. Se trata de lípidos anfipáticos de vital importancia en la estructura de las membranas celulares. Se han identificado en menor proporción otros lípidos de membrana como ácidos grasos, esfingolípidos y esteroides. Según los resultados obtenidos parece ser que el efecto de la sequía, ya sea por un aumento del déficit hídrico o de la temperatura, provoca cambios en las membranas celulares y en consecuencia en el estado celular de la planta.

4.2.2. Raíces

4.2.2.1. Análisis de componentes principales

Antes de empezar el análisis de componentes principales para cada factor de estudio, se realiza un estudio de la separación de las muestras según su origen de ionización en la Figura 37. En este caso, se observa que las muestras se separan correctamente entre positivas y negativas. Por lo tanto, se procede a realizar el análisis estadístico por separado.

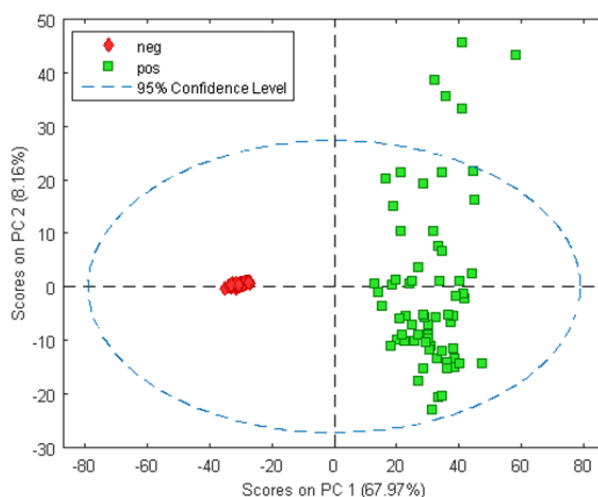


Figura 38. Gráficos scores en modo positivo y negativo para las muestras de las raíces.

Seguidamente se comprueban los controles de calidad (QCs) para asegurar que el conjunto de datos no ha perdido calidad. En la Figura 38 se observa que los controles de calidad (azul celeste) se agrupan en la misma zona del diagrama, este hecho indica que la calidad de los datos obtenidos es buena.

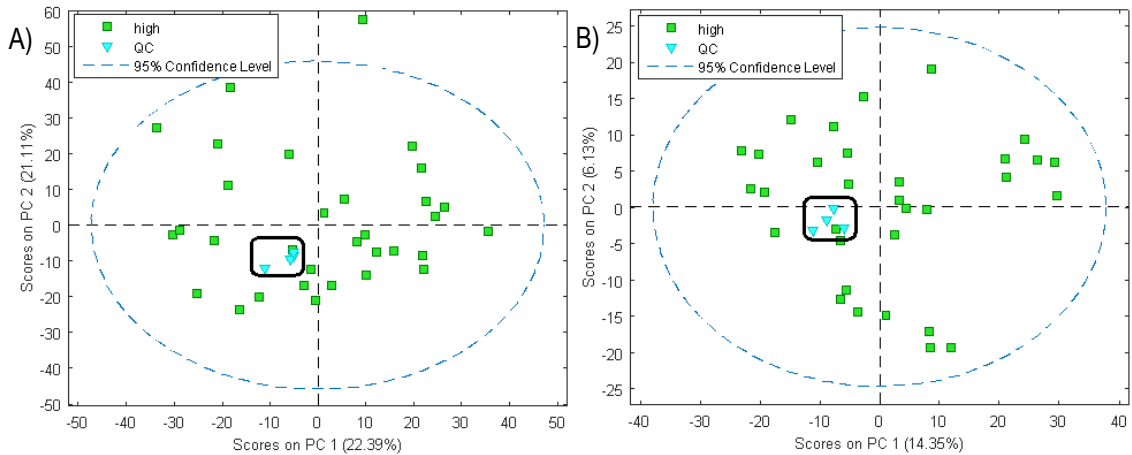


Figura 39. Comparación de las muestras de las raíces en el rango de temperaturas altas y los controles de calidad (QC) en: A) Ionización positiva; B) Ionización negativa.

En la Figura 39, se muestra el análisis de PCA de las raíces en positivo y negativo de los diferentes niveles de riego sometidos a los dos rangos de temperatura. En el diagrama 39.A se pueden apreciar diferencias entre los grupos, donde destacan las muestras de 5 mL. sin recuperación que se separan en la derecha del diagrama y el grupo de 150 mL. que queda desplazado hacia la izquierda. Esta tendencia observada está asociada al PC1, que explica el 21.89% de la varianza de las muestras. En el diagrama 39.B, se observa la misma tendencia que en el gráfico 39.A pero en sentido contrario. Las muestras con un estrés hídrico más extremo se separan a la izquierda y las muestras control a la derecha del diagrama. En este caso, el comportamiento de las muestras también vienen determinado por el PC1, que explica un 14.8% de la varianza. Analizando cada nivel de riego en concreto si se observan diferencias entre las muestras recuperadas y no recuperadas tanto en positivo (39.A) como en negativo (39.B). En los scores de alta temperatura, diagramas 39.C y 39.D, el análisis realizado no muestra una separación tan clara entre los diferentes grupos de riego por lo que no hay muchas diferencias entre los grupos de muestras.

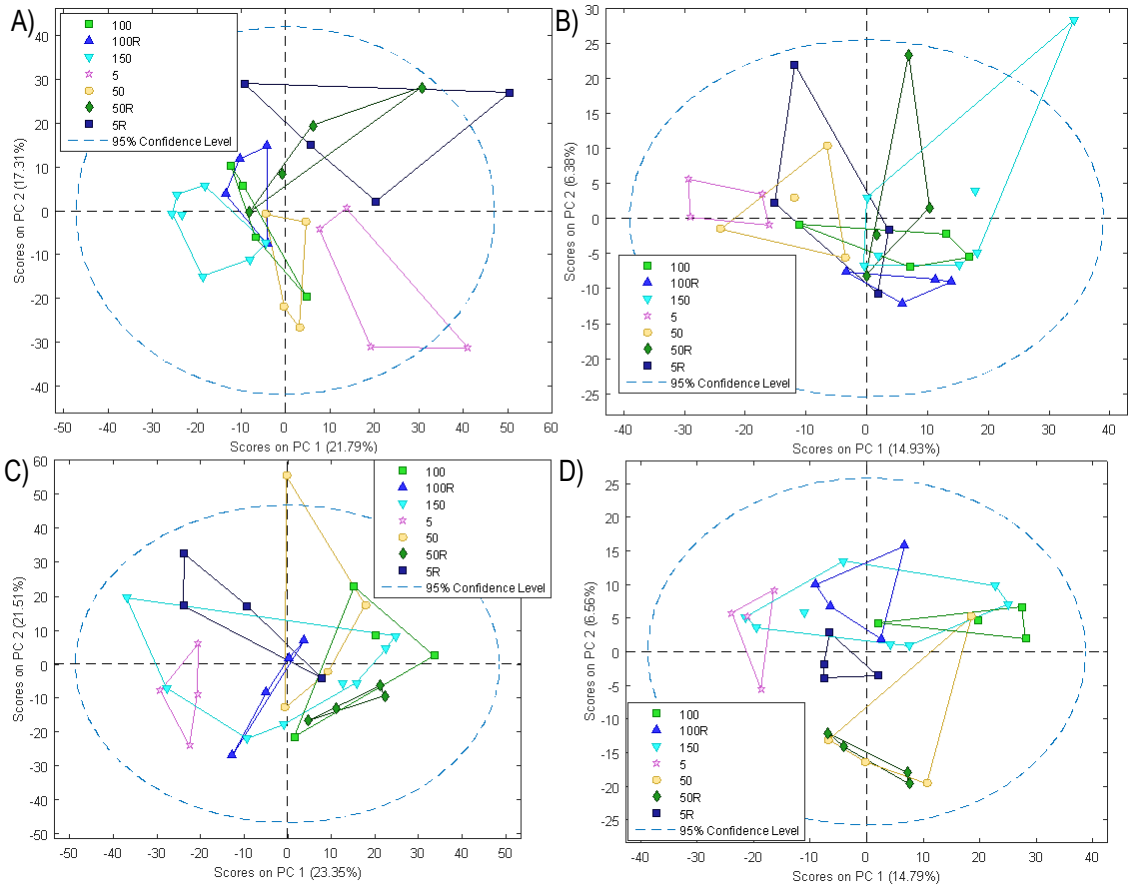


Figura 40. Gráficos scores de cada grupo de riego de las raíces: A) Baja temperatura en modo positivo; B) Baja temperatura en modo negativo; C) Alta temperatura en modo positivo; D) Alta temperatura en modo negativo.

La Figura 40 muestra los resultados del análisis de la temperatura en ionización positiva y negativa. Se observa que los dos grupos de muestras están solapados y no se pueden diferenciar correctamente. Se deduce que la temperatura no tiene un efecto separador de los dos grupos de muestras cuando se consideran los lípidos detectados en las raíces.

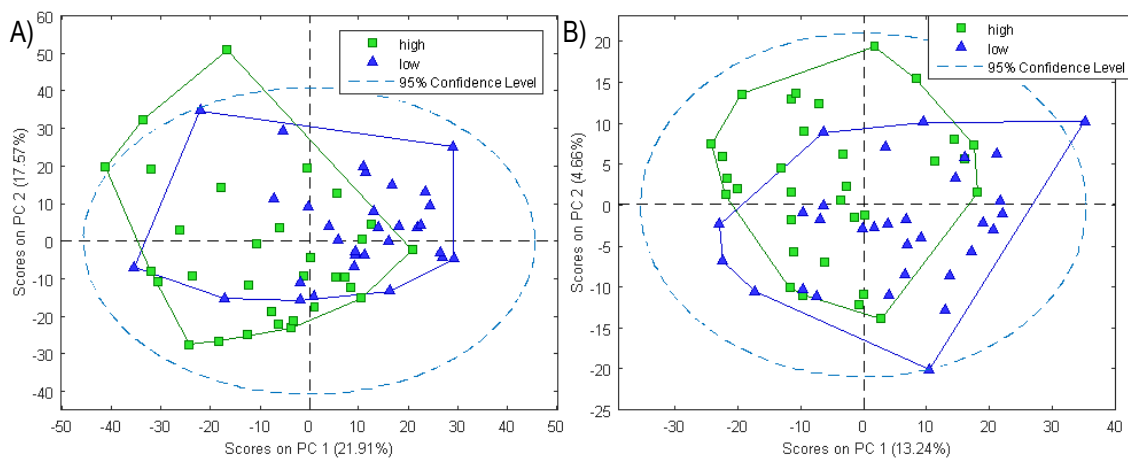


Figura 41. Gráficos scores de los dos rangos de temperatura de las raíces en: A) Ionización positiva; B) Ionización negativa.

Una vez realizado el análisis de los datos, se intuye que la disponibilidad de agua y la temperatura no tienen efectos metabólicos tan claros como en la parte aérea. Este hecho puede explicarse porque las raíces tienen un comportamiento diferente al de las hojas y menos susceptible al déficit de agua o variaciones de temperatura. Por otro lado, la pérdida de agua en las raíces es inferior en comparación al de la parte aérea por dos motivos:

- Las raíces no están en contacto directo con la radiación solar y, por lo tanto, no se ven tan afectadas por el aumento de la evapotranspiración causado por un incremento de la temperatura y de la radiación solar.
- A diferencia de las hojas, las raíces no tienen estomas por donde perder agua.

4.2.2.2. Estudio de la significación de los factores (ANOVA-ASCA)

En este caso, se aplica el mismo procedimiento utilizado para el cálculo de la significación estadística de los datos de la parte aérea. En la Tabla 8 se presentan los p -valores obtenidos para las series de datos de las muestras de las raíces. El estudio de cada serie de datos se ha realizado por separado según la ionización que presenten.

Tabla 8. p -valores de los factores y las interacciones entre ellos de los datos de las raíces.

Ionización	Positiva	Negativa
Factores	p -valor	p -valor
Temperatura	0.013	0.001
Nivel de riego	0.020	0.001
Recuperación	0.295	0.271
(Temperatura) x (Nivel de riego)	0.068	0.529
(Temperatura) x (Recuperación)	0.100	0.024
(Nivel de riego) x (Recuperación)	0.179	0.021

Una vez obtenidos los p -valores para cada caso de estudio se puede constatar que:

- En ionización positiva son estadísticamente significativos los factores de temperatura y nivel de riego y su interacción.
- En ionización negativa son significativos los factores de temperatura y nivel de riego y las interacciones entre temperatura y recuperación y nivel de riego y recuperación.

4.2.2.3 Análisis discriminante (PLS-DA)

Una vez que se han determinado que factores son los más significativos, se realiza un análisis discriminante comparando los dos rangos de temperatura y los cuatro niveles de riego. En la Figura 41 se presentan los diagramas scores resultantes del análisis PLS-DA de la temperatura y las condiciones de riego. Se observa que en todos los casos los grupos se separan correctamente.

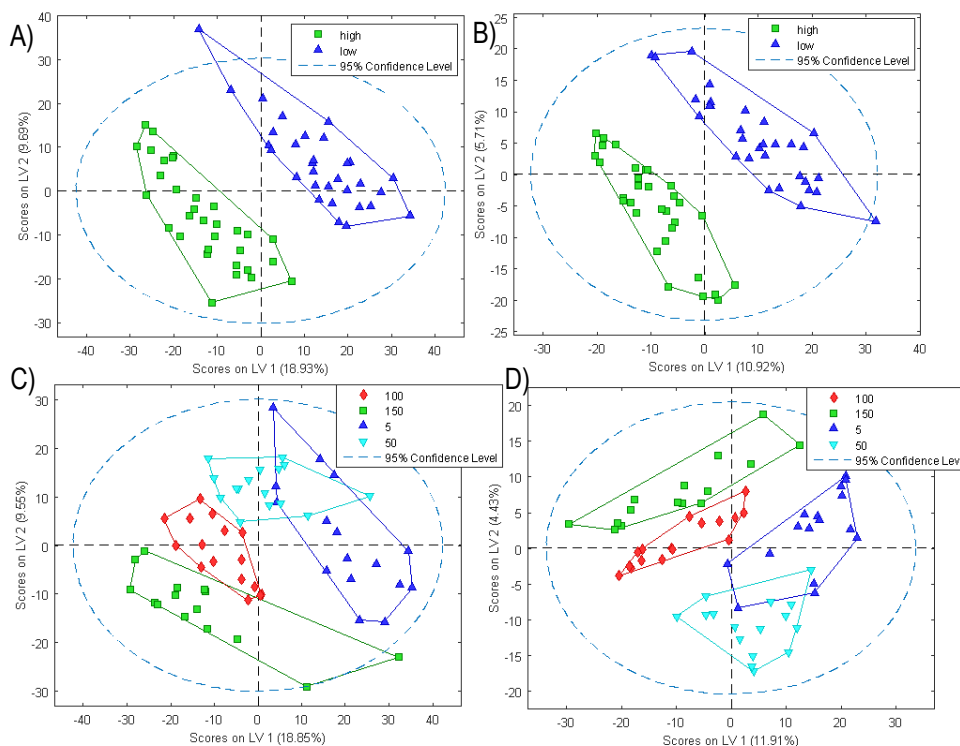


Figura 42. Diagramas scores de las raíces comparando: A) Rangos de temperatura en modo positivo; B) Rangos de temperatura en modo negativo; C) Condiciones de riego en modo positivo; D) Condiciones de riego en modo negativo

En la Tabla 9 se muestra el diagnóstico en el caso de comparar los dos rangos de temperatura en ionización positiva. En este caso se observa que todas las muestras han sido clasificadas correctamente por el modelo menos una que se ha clasificado en el grupo de alta temperatura cuando en realidad pertenece a la clase de baja temperatura. Por lo tanto, hay un falso positivo.

Para analizar la bondad del modelo PLS-DA se presenta en el anexo 4 los diagnósticos de verificación.

Tabla 9. Diagnóstico del modelo PLS-DA de las raíces para la comparación de las temperaturas en modo positivo.

		Valor real	
		Temperatura alta	Temperatura baja
Valor del modelo	Temperatura alta	32	1
	Temperatura baja	0	30

A continuación, la Figura 42 muestra los VIPs de todos los lípidos detectados en las muestras de las raíces a partir de los cuales se determinan los lípidos más relevantes y susceptibles a los cambios ambientales. De nuevo, para cada uno de estas variables se determina el valor de m/z, el tiempo de retención, la categoría, la clase y el error cometido en la identificación. Debido a la gran cantidad de

lípidos que tienen un VIP superior a 1, se ha decidido seleccionar los 50 lípidos con un índice VIP más grande para todos los casos.

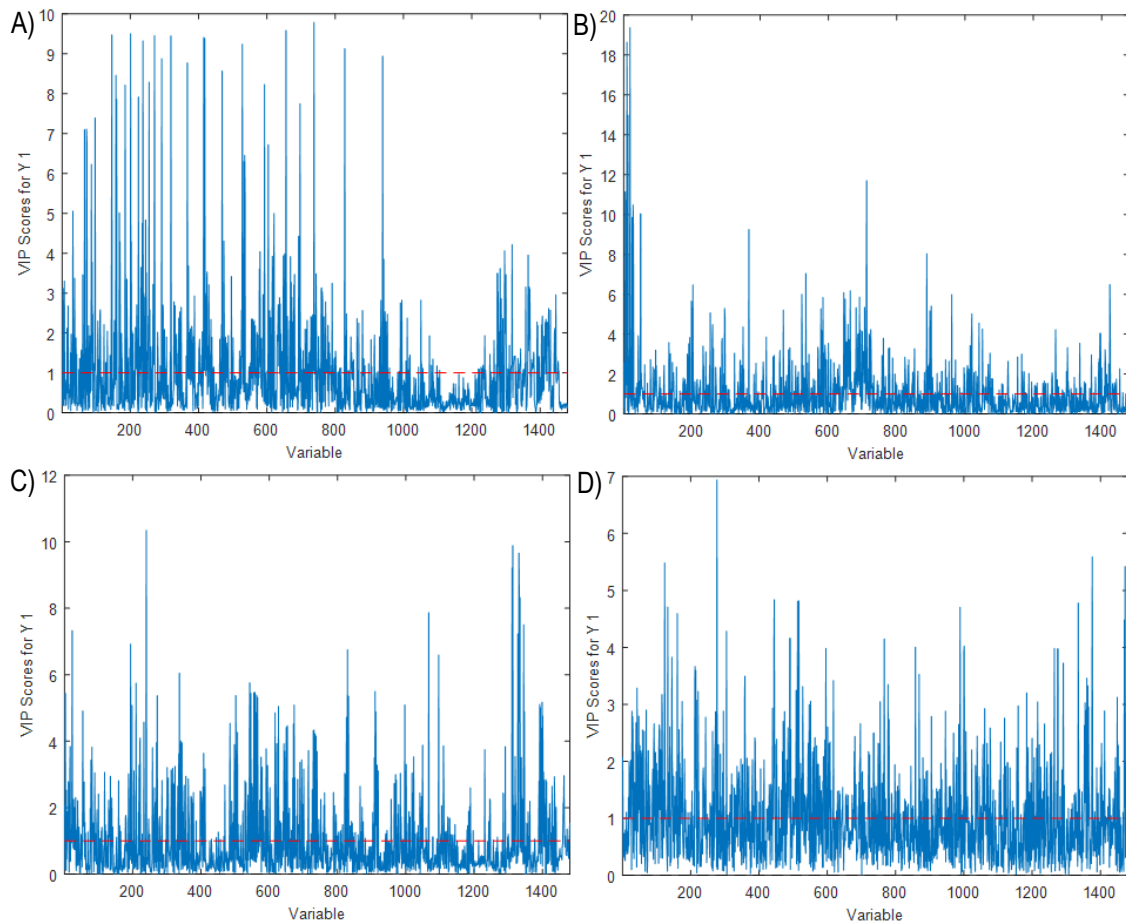


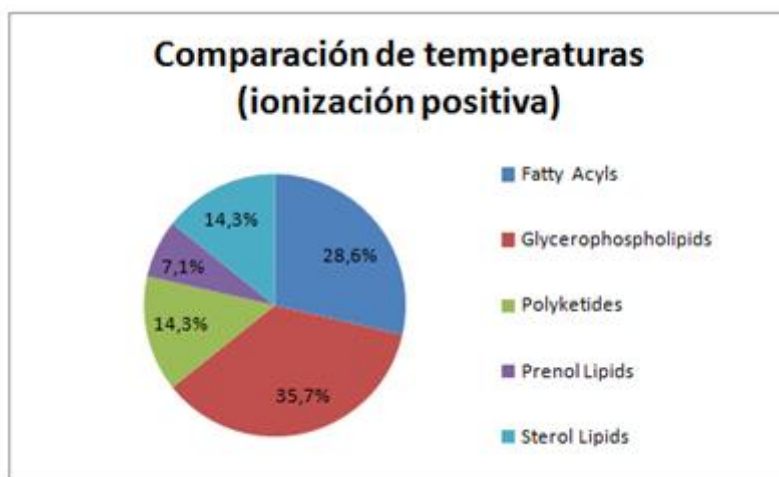
Figura 43. Diagramas loadings de las raíces comparando: A) Rangos de temperatura en modo positivo; B) Rangos de temperatura en modo negativo; C) Niveles de riego en modo positivo; D) Niveles de riego en modo negativo.

A continuación, en la Tabla 10 se presentan los resultados para la identificación tentativa de los lípidos candidatos. Para ver los resultados en los otros casos de estudio ir al anexo 7.

Tabla 10. Resultados obtenidos comparando los dos rangos de temperatura en modo positivo en las muestras de las raíces.

Variable	Valor m/z	Tiempo de retención (min)	Categoría	Clase	Error (ppm)
201	453,169755	0,97	Polyketides	Flavonoids [PK12]	0,2
319	585,289101	0,69	Sterol Lipids	Sterols [ST01]	2,5
528	673,341203	0,69	Polyketides	Ansamycins and related polyketides [PK05]	12,1
292	564,358947	0,75	Glycerophospholipids	Glycerophosphocholines	12,5
158	415,211828	1,00	Fatty Acyls	Fatty Acids and Conjugates	21,2
97	360,325875	3,89	Fatty Acyls	Fatty amides	0,6
86	352,321211	1,93	Fatty Acyls	Fatty amides	0,6
32	310,310521	3,27	Fatty Acyls	Fatty alcohols Oxygenated hydrocarbons	0,3
235	495,272148	0,89	Glycerophospholipids	Glycerophosphoglycerols	0,8
145	408,307904	2,90	Sterol Lipids	Bile acids and derivatives	7,2
474	653,451409	7,83	Glycerophospholipids	Glycerophosphates	0,4
203	454,292915	2,12	Glycerophospholipids	Glycerophosphocholines Glycerophosphoethanolamines	0,2
1318	1026,75429	12,39	Prenol Lipids	Polyprenols	20,9
942	850,533625	4,88	Glycerophospholipids	Glycerophosphocholines	24,7

A continuación, se presenta en la Figura 43 las proporciones de cada categoría de lípidos al comparar los dos rangos de temperatura en ionización positiva. Para ver el resto de gráficos ir al anexo 8.

**Figura 44.** Proporción de cada categoría de lípidos en el análisis discriminante de la temperatura en ionización positiva de las muestras de las raíces.

En el caso de las raíces, comparando los dos rangos de temperatura y los cuatro niveles de riego, los lípidos más relevantes y afectados por estos factores abióticos pertenecen a las categorías de glicerofosfolípidos, ácidos grasos, esteroides y esfingolípidos. Estos tipos de lípidos forman parte de la membrana celular y, por lo tanto, tienen una función vital en la estructura celular. Al igual que la parte aérea, la sequía tiene efectos en la membrana celular y en el estado celular de las raíces de las plantas.

4.3. Interpretación biológica de los resultados

A pesar de que algunos de los resultados del estudio fenotípico no son significativos, sí se puede afirmar que la tendencia observada coincide con la siguiente bibliografía consultada.

El estrés hídrico provoca una reducción del contenido de agua de la planta y ésta experimenta cambios en su fisiología. La mayoría de funciones vitales de la planta se ven afectados por el déficit hídrico¹⁵.

Uno de los efectos más destacados del estrés hídrico es la reducción del crecimiento de la parte aérea de las plantas. La reducción del crecimiento no se debe principalmente a una disminución del metabolismo, sino a una pérdida de la turgencia celular³⁰. En condiciones de déficit hídrico, el agua tiende a salir de las células ya que el potencial hídrico del exterior es menor que el del interior. En consecuencia, las células entran en condiciones de plasmólisis y se reduce el volumen celular y la turgencia de las células, provocando que la membrana celular se despegue de la pared vegetal³⁰. En la Figura 44 se muestra una célula vegetal en el nivel máximo de turgencia y la misma célula en estado de plasmólisis.

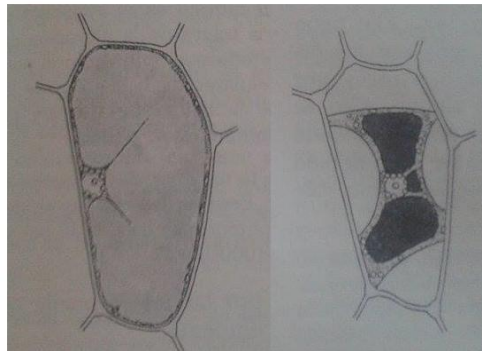


Figura 45. Células vegetales en condiciones de: A) Turgencia; B) Plasmólisis¹⁵.

A pesar de que la pérdida de turgencia es la principal causa de la reducción del crecimiento, también existen otros factores fisiológicos que afectan negativamente al crecimiento como, por ejemplo, la extensibilidad de la pared celular. En condiciones de déficit de agua, el pH de la pared celular aumenta a niveles básicos provocando que la pared sea más difícil de deformar y menos extensible³⁰. Este fenómeno inhibe el crecimiento de la planta.

La inhibición del crecimiento foliar permite que gran parte de los productos asimilados por las plantas se redistribuyan por el sistema radicular. Por lo tanto, a medida que disminuye el contenido de agua en la parte aérea de la planta a causa del efecto de la sequía, las raíces tienen un nivel de desarrollo mayor³⁰.

Respecto al estudio lipidómico, comentar que la mayoría de lípidos que se han identificado como relevantes en los factores ambientales estudiados tanto en las partes aéreas y las raíces pertenecen al grupo de lípidos estructurales de membrana (glicerofosfolípidos) y en algunos casos al grupo de lípidos de almacenamiento (ácidos grasos). Esta observación concuerda con la información recopilada a continuación.

La membrana celular o plasmática está formada por una bicapa de lípidos anfipáticos enfrentados por sus partes apolares, formando una matriz en la que se encuentran proteínas insertadas totalmente (proteínas intrínsecas) o parcialmente (proteínas extrínsecas)¹⁵. Las membranas celulares son muy sensibles a la deshidratación y, en consecuencia, se producen cambios en la composición de lípidos para hacer frente a este estrés³¹.

Algunos estudios han demostrado que la disponibilidad de agua provoca cambios importantes en la composición de lípidos complejos como, por ejemplo, en los lípidos de membrana (sobre todo fosfolípidos) y los lípidos de almacenamiento (sobre todo triacilglicéridos)³¹.

Por lo tanto, los dos estudios realizados en el presente proyecto permiten confirmar que el estrés hídrico produce modificaciones en el crecimiento de la planta ya que afecta a su comportamiento físico y metabólico.

CONCLUSIONES

5. Conclusiones

Analizando los resultados de este proyecto se concluye que los objetivos propuestos se han cumplido satisfactoriamente.

Se ha desarrollado una metodología para el estudio fenotípico y los resultados obtenidos han permitido establecer tendencias generales sobre los efectos del déficit hídrico y el aumento de la temperatura. Se ha podido constatar que ambos factores provocan:

- Tendencias decrecientes en la longitud del tallo, el área de la parte aérea y el contenido en agua.
- Un aumento de la longitud de las raíces de las plantas sometidas a un estrés hídrico más extremo.

Por lo tanto, se concluye que modificaciones en la disponibilidad de agua y la temperatura tienen efectos en el estado y desarrollo de las plantas ya que ambos factores están estrechamente relacionados con su economía hídrica, y pueden influenciar en el volumen celular, la rigidez de la pared celular y en procesos vitales como la fotosíntesis y la absorción de nutrientes. Las plantas sometidas a más estrés hídrico adoptan estrategias de adaptación al medio como por ejemplo el desarrollo de las raíces.

Para poder asegurar que estas tendencias observadas son significativas y comprobar su reproducibilidad, se debería repetir el mismo experimento y así obtener una mayor cantidad de muestras que permita llevar a cabo un estudio estadístico más riguroso.

Respecto al análisis lipidómico de los datos cromatográficos de las partes aéreas se concluye lo siguiente:

- El análisis exploratorio ha permitido constatar que a medida que aumenta el déficit hídrico y/o la temperatura, las diferencias entre los grupos de muestras se incrementan. La recuperación también tiene un efecto muy claro ya que las muestras con una escasez de agua mayor que han sido recuperadas tienen un comportamiento similar a las muestras con menos déficit hídrico.
- Los factores estadísticamente significativos que coinciden tanto en ionización positivo como negativa son la temperatura, el nivel de riego y la interacción entre ellos.
- Los lípidos más relevantes para evaluar los efectos de ambos factores ambientales pertenecen mayormente a lípidos estructurales de membrana (glicerofosfolípidos). Se puede concluir que el efecto de la sequía provoca cambios en las membranas celulares y, en consecuencia, en el estado celular de las plantas.

En el caso de las raíces, el análisis quimiométrico ha demostrado lo siguiente:

- El análisis de componentes principales sólo ha permitido establecer diferencias entre las muestras de diferentes condiciones de riego sometidas al rango de temperatura de 22-28°C. La

temperatura no tiene un efecto diferenciador de los dos grupos de muestras (baja y alta temperatura). Por lo tanto, un aumento del estrés hídrico y/o de la temperatura no implica un aumento claro de las diferencias entre las muestras.

- Los factores ambientales que son estadísticamente significativos en ambos grupos de ionización son la temperatura y el nivel de riego.
- El análisis discriminante ha demostrado que los lípidos más afectados por los factores abióticos estudiados pertenecen a la categoría de los glicerofosfolípidos, ácidos grasos, esteroides y esfingolípidos. En este caso también se tratan de lípidos con una función vital en la estructura de las membranas celulares (glicerofosfolípidos) y de almacenamiento (ácidos grasos). Se concluye que el efecto de la sequía tiene efectos en la membrana celular y en el estado celular de las raíces de las plantas.

En conclusión, se puede afirmar que en condiciones de sequía se reduce el crecimiento de la planta ya que se producen cambios a nivel físico y metabólico. Por lo tanto, los resultados obtenidos en ambos estudios permiten obtener un mayor conocimiento sobre el estrés hídrico en el crecimiento de las plantas de arroz, y además concuerdan con la bibliografía recopilada.

A partir de los resultados obtenidos satisfactoriamente en el presente proyecto se pueden proponer diferentes vías de trabajo futuro como, por ejemplo:

- Extender el estudio fenotípico para confirmar las tendencias observadas en este trabajo.
- Identificar inequívocamente los lípidos afectados por el déficit de agua y el aumento de la temperatura y a partir de aquí determinar las rutas metabólicas afectadas por los cambios ambientales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. Referencias bibliográficas

1 GARROTE, L.; DE LAMA, B.; MARTÍN, F. El cambio climático en España y sus consecuencias en el Sector del Agua. 1ª edición. Universidad Rey Juan Carlos. Capítulo 1. Previsiones para España según los últimos estudios de cambio climático.

2 GRUPO INTERGUBERNAMENTAL DE EXPERTOS SOBRE EL CAMBIO CLIMÁTICO (IPCC). Tercer informe de evaluación, **2001**. Cambio Climático: Impactos, adaptación y vulnerabilidad.

3 ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA (FAO). El estado mundial de la agricultura y la alimentación, **2015**.

4 NAKABAYASHI, R.; SAITO, K. Integrated metabolomics for abiotic stress responses in plants. Current Opinion in Plant Biology, **2015**, 24: 10-16. Editorial Elsevier, Ámsterdam.

5 ROJO, D.; RUPÉREZ, F. J.; BARBAS, C. Química analítica y metodologías "ómicas". Actualidad analítica **2014**, número 46: 7-10.

6 BERNAL RUIZ, M. L. La era de las ciencias ómicas. Academia de farmacia "Reino de Aragón", Zaragoza, **2015**.

7 BELTRAN CARBÓ, A.; YANES TORRADO, O. Metabolómica: nuevo paradigma para el estudio de sistemas biológicos. Boletín GRASEQA nº2. Metabolómica, **2012**.

8 NAMASIVAYAM, E.; KOWSALYA, R.; KUMAR PADARTHI, P.; MANIGANDAN, K.; JAYARAJ, R. L.; JOHNRAVINDAR, D.; JAGATHEESH, K. Plant Lipidomic: Signalling and Analytical Strategies. PlantOmics: The Omics of Plant Science, **2015**, 331-356. Springer.

9 ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. Biología Molecular de la célula, **1994**. 2ª edición. Editorial Omega. España..

10 LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Principios de bioquímica, **1995**. 2ª edición. Editorial Omega. España.

- 11 CARRASCO PANCORBO, A.; GÓMEZ ROMERO, M. Técnicas separativas acopladas a espectrometría de masas (GC-MS, LC-MS y CE-MS) en el ámbito de la metabolómica. Boletín GRASEQA nº2. Metabolómica, **2012**.
- 12 KUMAR AGRAWAL, P.; KALYANA BABU, B.; SAINI, N. Omics of Model Plants. PlantOmics: The Omics of Plant Science, **2015**, 1-32. Springer.
- 13 DIAZ GRANADOS, D. C.; CHAMARRO-GIRALDO, A. Métodos y usos agrícolas de la ingeniería genética aplicada al cultivo de arroz. Rev. Colomb. Biotecno., **2012**, Vol. XIV No. 2, 179-195.
- 14 ACEVEDO, M. A.; CASTRILLO, W. A.; BELMONTE, U. C. Origen, evolución y diversidad del arroz. Agronomía, **2012**, Trop. 56 (2): 151-170.
- 15 SITTE, P.; ZIEGLER, H.; EHRENDORFER, F.; BRESINSKY, A. STRASBURGER Tratado de Botánica, **1991**. 8ª edición. Editorial Omega.
- 16 Facultad de Ciencias Agrarias. Corrientes, Argentina: <http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema13/13-6clasifist.htm>
- 17 Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura (FAO): <http://www.fao.org/docrep/006/y2778s/y2778s04.htm>
- 18 PRIEGO CAPOTE, F. La preparación de la muestra en metabolómica: aspectos clave para la estandarización de métodos analíticos. Boletín GRASEQA nº2. Metabolómica, **2012**.
- 19 GELPÍ, E. Métodos y mecanismos de ionización. Manual de Proteómica, **2014**; 127-172.
- 20 WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELALDI, P. Principal component analysis. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems **1987**, 2 (1-3), 37-52.
- 21 SORIA, A. C. Metabolómica y Cromatografía. Cromatografía y técnicas afines, **2006**. Vol. 27, nº1. Madrid.
- 22 FUKUSAKI, E.; KOBAYASHI, A. Plant Metabolomics: Potential for Practical Operation. Journal of Bioscience and bioengineering. **2005**. Vol. 100, nº4, 347-354.

23 SMILDE, A. K.; JANSEN, J. J.; HOEFSLOOT, H. C. J.; LAMERS, R. A. N.; VAN DER GREEF, J.; TIMMERMAN, M. E. ANOVA-simultaneous component analysis (ASCA): a new tool for analyzing designed metabolomics data. *Bioinformatics* **2005**. Vol. 21 n°13, 3043-3048.

24 BARKER, M.; RAYENS, W. Partial least squares for discrimination. *Journal of Chemometrics* **2003**, 17 (3), 166-173.

25 CHONG, I.-G.; JUN, C.-H. Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2001**, 78 (1-2), 103-112.

26 MASSART, D. L.; BUYDENS, L. M. C.; VANDEGISTE, B. G. M. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*. 1st edn. Editorial Elsevier: Amsterdam. **1997**, Vol. 20.

27 ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA (FAO). El cultivo protegido en clima mediterráneo. Estudio FAO producción y protección vegetal. **2002**, Roma.

28 RINCÓN GUERRERO, N.; OLARTE QUINTERO, M. A.; PÉREZ NARANJO, J. C. Determinación del área foliar en fotografías tomadas con una Cámara Web, un Teléfono Celular o una Cámara semiprofesional. *Rev. Facultad Nacional de Agricultura*, **2012**, 65 (1): 6399-6405. Medellín.

29 Base de datos de Lipidmaps: <http://www.lipidmaps.org/>

30 Repositorio de objetos de aprendizaje de la Universidad de Sevilla: https://rodas5.us.es/file/4949d71b-4d3d-9e69-000a-1b76edf86560/1/texto_estres_hidrico_SCORM.zip/pagina_04.htm

31 RAMADAN, A.; SABIR, J. S. M.; ALAKILLI, S. Y. M.; SHOKRY, A. M.; GADALLA, N. O.; EDRIS, S.; AL-KORDY, M. A.; AL-ZHRANI, H. S.; EL-DOMYATI, F. M.; BAHIELDIN, A.; BAKER, N. R.; WILLMITZER, L.; IRGANG, S. Metabolomic Response of *Calotropis procera* Growing in the Desert to Changes in Water Availability. **2014**. PLoS ONE 9(2): e87895

