



Senescència floral en *Lilium*: Importància dels reguladors endògens i efectes de les aplicacions exògenes

Laia Arrom Mascasas

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

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

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Senescència floral en *Lilium*:

Importància dels reguladors endògens i efectes de les aplicacions exògenes

Memòria presentada per Laia Arrom Mascasas per optar al títol de Doctora per la Universitat de Barcelona.

Programa de doctorat “Biologia Vegetal”, bienni 2008/2010, de la Universitat de Barcelona.

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

Doctoranda

Director de la Tesi

Laia Arrom Mascasas

Dr. Sergi Munné Bosch

Barcelona, Maig de 2012



Universitat de Barcelona

**Als pares i l'àvia,
per ser-hi sempre**

**A l'Uri,
per fer-me sempre costat**

**A les nenes,
per haver-me escoltat sempre**

Now wait,

And try to find another mistake

If you throw it all away then maybe you can change your mind

...

And maybe someday

We'll figure all this out

And we'll put an end to all our doubt

Rob Thomas – Someday (2009)

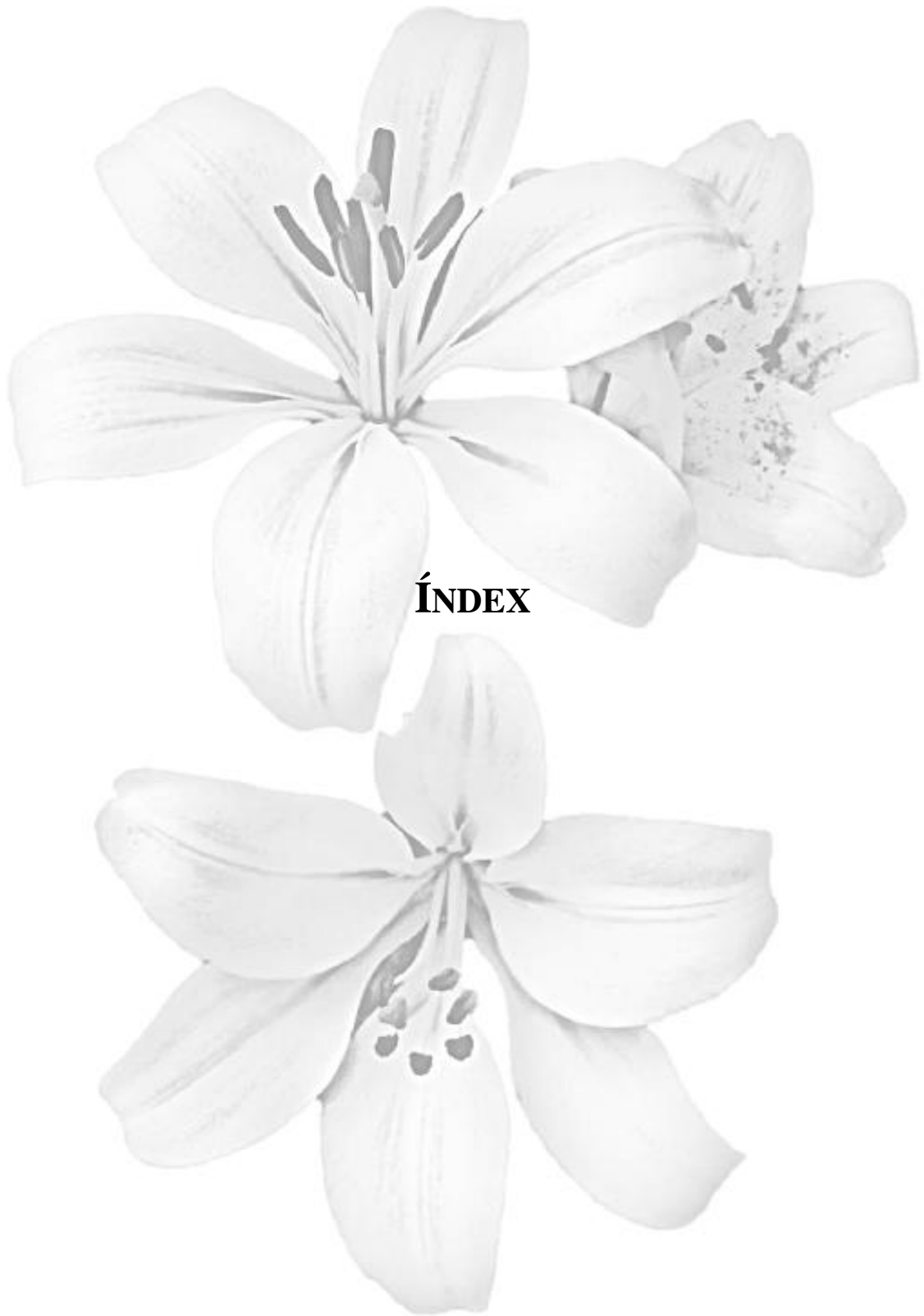
Nobody said it was easy,

It's such a shame for us to part.

Nobody said it was easy,

No one ever said it would be this hard.

Coldplay – The Scientist (2002)



ÍNDEX

AGRAÏMENTS	i
ABREVIATURES	vii
INTRODUCCIÓ	1
1. El procés de senescència	3
2. Reguladors endògens	9
2.1. <i>Fitohormones</i>	9
2.2. <i>Estrès oxidatiu</i>	16
2.3. <i>Sucres</i>	22
3. Senescència floral	25
3.1. <i>Regulació hormonal de la senescència floral</i>	29
3.2. <i>Estrès oxidatiu i senescència floral</i>	36
3.3. <i>Sucres i senescència floral</i>	40
4. Importància econòmica del <i>Lilium</i> en el sector de la floricultura	42
5. Aplicacions exògenes i millora de la qualitat de la flor tallada	46
OBJECTIUS	49
INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESI DEL FACTOR D'IMPACTE DELS	53
ARTICLES PUBLICATS I LA PARTICIPACIÓ DE LA DOCTORANDA	
RESULTATS	59
Capítol 1: Variacions hormonals als teixits florals durant el desenvolupament floral en <i>Lilium</i>	61
Capítol 2: Distribució i variacions de tocoferol en els òrgans florals de <i>Lilium</i> durant la senescència natural i artificial	83
Capítol 3: La sacarosa accelera l'obertura floral i en retarda la senescència mitjançant un efecte hormonal en la flor tallada de <i>Lilium</i>	101
Capítol 4: Regulació hormonal de la senescència foliar en <i>Lilium</i>	119

DISCUSSIÓ	137
1. Regulació hormonal del procés de senescència floral	140
2. Paper de l'estrès oxidatiu en senescència floral	148
3. Implicació dels sucres en senescència floral	154
4. Els òrgans florals com a reguladors del procés de senescència en <i>Lilium</i>	162
4.1. Paper dels tèpals en senescència floral	163
4.2. Òrgans reproductius	164
5. Senescència foliar	165
6. Senescència foliar vs. floral	168
7. Aplicacions exògenes com a procediment per allargar la longevitat floral	172
8. Reguladors endògens i nivells d'anàlisi	175
CONCLUSIONS	181
ANNEX	185
BIBLIOGRAFIA	213



AGRAÏMENTS



Després de les incomptables curses per arribar a temps sembla mentida que escriure els agraïments a aquells que m'heu ajudat durant tot aquest temps sigui una de les tasques més difícils de la tesi... Sóc ben conscient que sense l'ajuda i el suport de tots vosaltres no ho hagués aconseguit i tot i que donar-vos les gràcies no reflexa tot el que m'agradaria transmetre, intentaré ser el més clara i franca possible (...i no deixar-me ningú, també).

En primer lloc, agrair al Dr. Sergi Munné Bosch per donar-me la oportunitat de realitzar aquest viatge pel món de la recerca, però encara més per confiar en mi animant-me a seguir sempre endavant. Ens hem trobat amb complicacions, contratemps i impediments, però la tossudesa d'un o de l'altre ens ha permès arribar més lluny del que ara fa quatre anys podia imaginar. A nivell personal, la proximitat i disponibilitat que sempre mostres a ajudar-nos i guiar-nos no té preu; de vegades crec que la teva preocupació pels nostres futurs és major que la nostra pròpia! A més, la teva inquietud per mantenir un clima de *bon rotllo* al grup permet que les coses rutllin alhora que sembla que tot resulta més fàcil d'aconseguir. A part de tot el contingut científic i la considerable ampliació del *curri*, el que més valoro és l'esperit de treball que m'has transmès i que espero, algun dia poder transmetre jo també a altres persones. Donar-te les gràcies per tot el que m'has ensenyat i el temps que m'has dedicat es queda curt!

A tota la Unitat de Fisiologia Vegetal; als professors, per l'interès en saber què carai estava fent amb tanta flor al laboratori, però en especial a la Lluïsa Moysset, pels ànims i suport que sempre m'has demostrat. A la Carmen Cañueto, per ajudar-me sempre que t'ho he demanat i per les teves solucions pràctiques als problemes logístics que (incomptables vegades) se m'han presentat al llarg d'aquests quatre anys. I per suposat, a les "secres", per tota la feina organitzativa que hi ha darrera del que fem al

laboratori, i en especial a la Mercè i l'Esther, que sempre han trobat un moment per atendre'm i ajudar-me o simplement per xerrar una estona.

Al personal del Parc Científic de Barcelona per l'ajuda prestada i l'amabilitat amb la que sempre m'han tractat, en especial a l'Esther, l'Eva, l'Eli i l'Isidre (HPLC i UPLC MS/MS) i a tot l'equip de la Unitat de Transcriptòmica.

Al Servei de Camps Experimentals, en especial al Josep Matas per aconsellar-me sobre els detalls més tècnics i per recomanar-me solucions per millorar els experiments que hem volgut realitzar.

A la Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA) i l'Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) pel suport econòmic prestat per la realització de la present tesi doctoral i l'estada a l'estranger, respectivament.

I would like to thank Dr Hilary Rogers for receiving me so kindly in your lab and for giving me the chance to learn so much in such a short time, thus arousing in me the interest for the molecular research. Working far from home can be hard, but I was so lucky having you as a teacher who trusted in me and gave me encouragement to carry on (even when everything went wrong). Grazie davvero, Hilary! I would also to thank to Dr Tony Stead, for helping and guiding me in my work in Cardiff, bringing new ideas and perspectives.

Al grup "Munné" d'ara i el de sempre (Beth, Iker, Amparo, Maren, Jana, Martuki, Marta J., Mel i Xavier) per l'ajuda, les bones estones i el suport que sempre he rebut. Sense el "*feeling*" que es respira al grup no seria possible coordinar-nos ni al lab, ni al parc ni als dinars/sopars de grup! En especial, a la Marta Oñate, que a part d'una molt bona companya de feina també ha resultat ser una gran amiga. A parte de ser mi maestra de campo y laboratorio has significado para mí un gran apoyo moral, compartiendo

conmigo tanto los momentos de “desestrés” como las “idas de olla”. Nos ha costado, pero cuatro años más tarde... ¡ya entiendes mis bromas! Me alegro muchísimo de haberte conocido, Martuki! Tampoc m’oblido de l’Arancha Oliván, qui em va obrir la porta al departament. Aran, a parte de ser una gran companyera de classe, del equipo ATP de baloncesto y de fiestas varias, sin tu insistencia incansable en recordarle a Sergi (hasta tres veces, tot s’ha de dir!) que había una chica que quería colaborar con el grupo no hubiera tenido la oportunidad de realizar esta tesis.

A tot el grup de becaris de Fisiologia Vegetal *et al.* per mantenir un ambient tan acollidor i agradable, amb la voluntat d’ajudar sempre que algú necessita ajuda tant a nivell laboral com a nivell personal. En especial als companys que ens reunim per dinar (Ricard, Isis, Mireia, Sam, Rut, Guillem, Jordi, Tana, Gemma,...), per les preocupacions, les “*batallitas*” i les rialles que compartim dia a dia sense oblidar la vessant “lúdico-festiva” que us caracteritza i que sens dubte uneix i fa més fort el meravellós grup que entre tots heu creat. *In short*, sou genials! En especial a la Tana, pel recolzament científic i personal, per la teva predisposició a ajudar-me sempre i per la teva naturalitat i franquesa; m’has ensenyat més del que em sembla que creus...

I per suposat, a la meva família, pel vostre suport incondicional. Encara recordo el dia que us vaig dir que començava el doctorat... “pensa que serà *durillo*, Laia” em va dir... I en determinats moments ho ha estat, però l’esforç ha valgut la pena. A fi de comptes, és el que m’heu ensenyat!! Sense els ànims de la mare, l’interès de l’àvia o les preguntes del pare (i els viatges en cotxe per arribar a temps als *pre-dawns*, tot s’ha de dir...), tot això hagués estat massa dur com per seguir endavant i arribar on he arribat. Gràcies per ser-hi sempre!

A les nenes (Miry, Elitxu, Anna, Ato i Hey) i la colla “del cole *et al.*” (Manel, Pepe, Uri B., Clara, Seco, Laury, Marta Palens, Vane, Ventu, Jefa, etc.), per escoltar (o fer veure que escoltàveu...que ens coneixem!) totes les històries de ciència i plantes que us he anat explicant (o m’he anat inventant) sense adormir-vos, per estar des de sempre al meu costat i per recordar-me que la vida pot ser meravellosa si la comparteixes amb els qui més t’estimes. I encara diria més....

I finalment, però no per això menys important, a tu, Uri, per interessar-te pel que faig i per escoltar-me pacientment parlar dels companys de feina, d’hormones, de iniciadors, etc... generalment sense gaire sentit (que és la majoria dels cops) i repetint el mateix un cop i un altre, i un altre, i un altre... Ets de les poques persones capaç de tranquil·litzar-me quan més ho necessito i la meva font d’energia per seguir endavant. Al teu costat, tot sembla més fàcil d’aconseguir. Espero que puguem compartir molts més anys junts i que poc a poc anem aconseguint nous reptes amb el recolzament de l’altre. D’entrada, tu ja m’has ajudat a assolir-ne un de molt important; he acabat la tesi!

Moltíssimes gràcies a tots!

Ara si que si; FIN!!!!



ABREVIATURES

1-MCP	1-Metilciclopropè	MCP	Mort cel·lular programada
¹O₂	Singlet d'oxigen	MDA	Malondialdehid
8-HQC	Citrat d'hidroxiquinolina	MDHA	Monodehidroascorbat
ABA	Àcid abscísic	MEP	Metileritritol fosfat
ACC	Àcid 1-aminociclopropà-1-carboxílic	O₂⁻	Anió superòxid
ACO	ACC oxidasa	PF	Pes fresc
ACS	ACC sintasa	POL	Poliamines
APX	Ascorbat peroxidasa	PS	Pes sec
ATAPP1	Aminopectidasa P1	ROS	Espècies reactives de l'oxigen
BA	Benziladenina	SA	Àcid salicílic
CAT	Catalasa	SAG	Gen associat a la senescència
CHR	Contingut hídric relatiu	SOD	Superòxid dismutasa
ClO₂	Diòxid de clor	STS	Tiosulfat de plata
DCFDA	Diacetat de 2',7'-diclor-fluoresceïna	Z	Zeatina
DHA	Dehidroascorbat	ZR	Ribòsid de zeatina
ERF	Factor de resposta a l'etilè		
F_v/F_m	Eficiència màxima del fotosistema II		
GA	Gibberel·lina		
GPX	Glutatió peroxidasa		
H₂O₂	Peròxid d'hidrogen		
IAA	Àcid indol-3-acètic		
JA	Àcid jasmònic		
L.A.	<i>L. longiflorum</i> x Asiàtic		
LOX	Lipoxigenasa		



INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

1. El procés de senescència

Al llarg del seu cicle vital, els organismes van passant per diferents fases del desenvolupament; la darrera etapa, abans de la mort de l'individu, és la que coneixem amb el nom de senescència. L'Institut d'Estudis Catalans defineix el terme "senescència" com "l'acció d'envellir" o "envelliment". La paraula prové del llatí "*senex*", que significa home gran o envellit, reflectint així que l'ús generalitzat del mot fa referència al món animal o humà. En el cas dels vegetals, tot i que la línia que separa ambdues definicions és també bastant estreta, considerem l'envelliment com el resultat de l'acumulació d'un seguit de canvis progressius i alteracions seqüencials del desenvolupament que van apareixent amb l'edat de la planta (revisat per Noodén i Guiamet, 1996), mentre que la senescència vegetal és el procés fisiològic dels estadis més tardans del desenvolupament que condueix a la mort de la cèl·lula, teixit, òrgan o organisme que el pateix, mitjançant un programa altament regulat pel seu propi codi genètic (revisat per Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003; Lim i Nam, 2005). D'altra banda, cal tenir en compte que la planta, al ser un organisme viu, està influïda per l'ambient que l'envolta i que, per tant, els factors ambientals també influiran en la modulació dels processos fisiològics (com la senescència).

A nivell cel·lular, podem diferenciar dos tipus de senescència vegetal; la mitòtica i la post-mitòtica. En la senescència mitòtica, la cèl·lula perd permanentment la capacitat de dividir-se per mitosi, mentre que en la senescència post-mitòtica la cèl·lula, que prèviament ha perdut la capacitat de dividir-se, és conduïda a la seva pròpia mort (revisat per Gan, 2003). És el cas de la senescència d'òrgans com les fulles, que alhora resulten

ser els òrgans vegetals que més atenció han rebut al llarg de la història, fet que ha permès caracteritzar molt bé el procés a diferents nivells.

Actualment, és possible reconèixer diferents fases del procés de senescència gràcies al reconeixement dels canvis que s'hi van succeint, fet que alhora permet monitoritzar el procés a diferents nivells; des dels marcadors clàssics com la degradació de clorofil·les, la pèrdua de l'eficiència fotosintètica, les variacions en els nivells de proteïnes o el grau d'integritat de les membranes fins a l'expressió dels gens associats a la senescència (SAGs). De tota manera, cal entendre la senescència com el resultat de la suma de tot un conjunt de canvis fisiològics i, per tant, l'anàlisi d'un sol marcador és tant sols el reflex del canvi associat al paràmetre mesurat (i no pas del procés en conjunt). D'altra banda, la senescència no és un procés exclusiu de les fulles sinó que totes les parts de la planta l'acaben patint. En molts estudis es mostra que la majoria de canvis observats en senescència foliar també es donen en altres parts de la planta (mort cel·lular programada –MCP–, regulació hormonal, estrès oxidatiu, remobilització de nutrients, canvis en els balanços òrgan-embornal, etc.), remarcant el fet que, tot i les possibles diferències puntuals, el procés de senescència és força similar per a tots els òrgans vegetals, fet que alhora l'ha permès caracteritzar com a tal.

A nivell fisiològic, la senescència es caracteritza per l'aparició de canvis com l'augment de la taxa respiratòria, la disminució de la capacitat fotosintètica, la remobilització de nutrients o la disminució generalitzada de la taxa anabòlica (revisat per Lim *et al.*, 2007). A mida que van apareixent nous canvis podem dividir el procés en diferents etapes; en la primera fase, es produeix una degradació selectiva de molècules que poden ser aprofitades i reciclades pels teixits més joves. Seguidament hi ha una degradació generalitzada dels components cel·lulars que implica la pèrdua de la funció

fisiològica de forma irreversible, i finalment es dona la mort de l'òrgan (revisat per Procházková i Wilhelmová, 2007).

En la segona etapa apareixen els majors canvis a nivell bioquímic, estructural i molecular, que a més coincideixen en molts casos amb els esdeveniments característics observats durant els processos de MCP (revisat per Shahri i Tahir, 2011). Així, per exemple, el contingut en proteïnes i d'àcids nucleics disminueix amb l'avenç del procés, cedint compostos nitrogenats i amb fòsfor, respectivament. Un cop alliberades, aquestes molècules tant valuoses podran ser transportades a altres parts de la planta, on alhora son reutilitzades pels teixits en creixement. La degradació lipídica també incrementa al llarg de la senescència com a conseqüència d'un augment en la taxa de peroxidació lipídica (revisat per Procházková i Wilhelmová, 2007). Els lípids alliberats són oxidats a α -cetoglutarat mitjançant el cicle del glioxilat, a partir del que o bé es transformen en sucres mòbils (via gluconeogènesi) o bé són utilitzats com a vehicle per a la remobilització dels aminoàcids alliberats durant la degradació proteica (revisat per Lim *et al.*, 2007). La utilització de lípids com a font d'energia (gràcies a la seva prèvia transformació en sucre) serveix per mantenir el metabolisme cel·lular actiu fins els darrers estadis, permetent remobilitzar gran part dels components cel·lulars (revisat per Buchanan-Wollaston, 2007).

La disminució de l'eficiència fotosintètica és deguda a la degradació de l'aparell fotosintètic, conseqüència del primer canvi estructural associat al procés de senescència foliar; el desmantellament del cloroplast. Durant la senescència del cloroplast l'òrganul pateix la degradació progressiva de les membranes tilacoïdals i la formació dels plastoglòbuls, inclusions lipídiques característiques dels cloroplasts senescents que semblen estar involucrats tant en el metabolisme lipídic associat a senescència com en la degradació de clorofil·les (revisat per Hendry *et al.*, 1987; Buchanan-Wollaston, 2007;

Hopkins *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2007). Alhora, la degradació de les membranes tilacoïdals comporta que les molècules de clorofil·la que s'hi trobaven unides (mitjançant una apoproteïna) quedin lliures i esdevinguin potencialment tòxiques per la cèl·lula, que ràpidament respon a aquesta situació degradant immediatament les clorofil·les (revisat per Buchanan-Wollaston, 2007). Aquesta degradació de clorofil·les esdevé visualment reflectida per l'aparició de la clorosi típica de les fulles senescentes (revisat per Hendry *et al.*, 1987), fent possible reconèixer els teixits fotosintètics que han entrat en senescència. Paral·lelament, la resta d'òrgans cel·lulars també es va degradant a mida que el procés avança i segons un programa controlat que regula les necessitats de la cèl·lula. Així, per exemple, el mitocondri i el nucli són els darrers òrgans a degradar-se, per tal de mantenir la producció energètica i l'organització cel·lular fins els estadis més tardans de la senescència, permetent alhora mantenir l'activitat metabòlica i la emobilització dels components cel·lulars fins última instància (revisat per Buchanan-Wollaston, 2007; Lim *et al.*, 2007; Procházková i Wilhelmová, 2007).

Finalment, l'activitat dels enzims degradadors de lípids com la lipoxigenasa (LOX), la fosfolipasa D o la fosfatasa de l'àcid fosfatídic provoquen la pèrdua de la integritat de la membrana plasmàtica, que alhora es tradueix en la seva disrupció i que té com a resultat la mort cel·lular (revisat per Lim *et al.*, 2007). Així, tot el que un dia fou necessari per al funcionament del cloroplast és ara degradat, permetent alhora la remobilització d'aquestes molècules cap a teixits més joves que els puguin reutilitzar, un dels altres trets característics de la senescència vegetal.

Amb l'edat, el balanç energètic dels òrgans senescentes es troba desplaçat cap al consum de recursos, disminuint la taxa biosintètica i l'exportació de compostos generats *de novo*. Alhora, la importació de components essencials per al teixit també disminueix, pel que ben aviat comencen a faltar compostos crítics per a la supervivència del teixit, que

es va desgastant (revisat per Thomas *et al.*, 2003). En fulles d'*Arabidopsis* es demostrà que, eliminant de l'equació qualsevol factor que n'acceleri l'aparició dels signes de senescència, l'edat resulta ser el factor més influent a l'hora d'iniciar el procés (revisat per Gan i Amasino, 1997). D'altra banda, tot i estar controlada per l'edat, la senescència també es veu influïda pels reguladors endògens i exògens. Al no estar aïllada, l'ambient pot influir en el desenvolupament de la planta. La presència de factors ambientals (disponibilitat de nutrients, llum, temperatura, atacs de patògens, etc.) desfavorables poden provocar una situació d'estrès que indueixi el procés de senescència. A més, també és possible observar aquestes relacions ambient-senescència a nivell d'expressió gènica; per exemple, de 43 factors de transcripció que es troben induïts en senescència, 28 també s'indueixen per diferents estressos (revisat per Lim *et al.*, 2007). Un altre exemple clar de la capacitat d'adaptació a noves situacions d'estrès per part de la planta rau en l'efecte que aquest pot tenir sobre les vies de síntesi i/o senyalització de determinades hormones (p. ex. àcid abscísic, ABA; etilè; àcid jasmònic, JA; àcid salicílic, SA), que alhora pot influir sobre l'expressió gènica de determinats gens associats a la senescència.

L'actual coneixement del procés de senescència, però, no hagués estat possible sense l'existència d'estudis previs que en determinessin aspectes clau. A part, l'avenç del coneixement científic es troba molt lligat a l'avenç tecnològic, que pot limitar o permetre aprofundir en l'estudi d'un determinat procés. En aquest sentit, la determinació del rol de les citocinines en senescència n'és un bon exemple; tot i que amb els resultats dels estudis més preliminars ja s'intuïa el paper inhibidor de la senescència per part de les citocinines, la corroboració inequívoca del seu rol en senescència no fou descrit fins que les tècniques de biologia molecular ho van permetre. Els primers en suggerir un possible rol de les citocinines en senescència foren Richmond i Lang (1975), que mitjançant aplicacions exògenes de quinetina (citocinina) en fulles de *Xanthium strumarium* observaren un

retard en l'aparició dels signes de senescència foliar. Tres dècades més tard, Styaden i col·laboradors descriuriu l'existència d'una correlació inversa entre els nivells de citocinines endògens i el progrés de la senescència foliar (revisat per van Styaden *et al.*, 1988), recolzant la hipòtesi formulada per Richmond i Lang. De tota manera, la demostració definitiva del seu l'efecte inhibidor del procés de senescència no es descrigué fins l'obtenció d'un transgènic capaç de sobre-produir citocinines de forma autoregulada i dependent del procés de senescència (Gan i Amasino, 1995). Si bé és cert que en estudis anteriors també s'havien generat transgènics sobre-productors de citocinines, aquests mostraven l'inconvenient de presentar altres anomalies que podien esbiaixar els resultats. Per contra, el transgènic de Gan i Amasino consistia en la unió del gen *IPT* (codificant per l'enzim isopentenil transferasa) amb el promotor del gen *SAG12* (específic de senescència), fent que les plantes de tabac transformades amb el transgen P_{SAG12} -*IPT* es desenvolupessin normalment (com les *wild type*) fins l'inici de la senescència foliar, moment en què es disparava la sobre-producció de citocinines. A més, al ser un sistema autoregulat, quan l'activitat citocinina inhibia la senescència, el fi del procés també aturava la sobre-producció d'hormones (Gan i Amasino, 1995).

En el cas del paper de l'estrès oxidatiu, Harman fou el primer a enunciar la teoria dels radicals lliures, on suggeria que la causa de l'envelliment rau en l'acumulació de radicals lliures nocius (Harman, 1956). En aquest sentit, molts estudis suggereixen que l'inici de la senescència podria ser degut a un fort augment en la producció d'espècies reactives de l'oxigen (ROS) nocives per la planta (Dhindsa *et al.*, 1981), fent èmfasi sobre la maquinària antioxidant de la planta per combatre'n els efectes (revisat per Sohal i Weindruch, 1996; Procházková i Wilhelmová, 2007). A més, sembla que determinats reguladors endògens com les hormones també poden interactuar amb la maquinària antioxidant per dur a terme el control de l'estat redox de la planta. Com a exemple,

mencionar la vinculació existent entre determinats gens de la via de síntesi de tocoferols es troben sota la regulació de JA (Sandorf i Holländer-Czytko, 2002).

2. Reguladors endògens

Donat que al llarg del temps la majoria d'estudis s'han centrat en la senescència foliar, molta de la informació de la que disposem avui dia sobre els reguladors del procés fa referència a les funcions atorgades en fulles. No obstant, molts dels compostos identificats com a reguladors de la senescència foliar acostumen a conservar les mateixes funcions o activitats en altres parts de la planta (quan s'hi troben).

2.1 Fitohormones

Un dels tipus de reguladors endògens clàssics són les fitohormones o hormones vegetals, molècules orgàniques sintetitzades de forma natural per la pròpia planta amb capacitat de regular processos fisiològics a molt baixes concentracions (menors que les dels nutrients o les vitamines, revisat per Davies, 2004). Depenent de la seva activitat en senescència podem classificar els diversos tipus d'hormones en inhibidores (citocinines, auxines, gibberel·lines, poliamines, Fig. 1) o inductores del procés (etilè, ABA, jasmonats, salicilats, brassinoesteroides, Fig. 2). Generalment, la seva funció en senescència (i en general en qualsevol procés fisiològic) és determinada segons l'efecte provocat per les aplicacions exògenes de la mateixa hormona, per la variació dels nivells endògens al llarg del procés, pels resultats obtinguts mitjançant l'estudi de productes inhibidors de l'efecte hormonal i/o amb transgènics sobre-productors o insensibles. D'altra banda i un cop més, donada la tradició científica referent a l'estudi de la senescència, en la majoria de casos aquesta determinació de l'activitat hormonal s'ha descrit segons els resultats obtinguts en

els estudis de les fulles, però generalment també s'ajusta a l'activitat observada posteriorment en els estudis realitzats en altres parts de la planta.

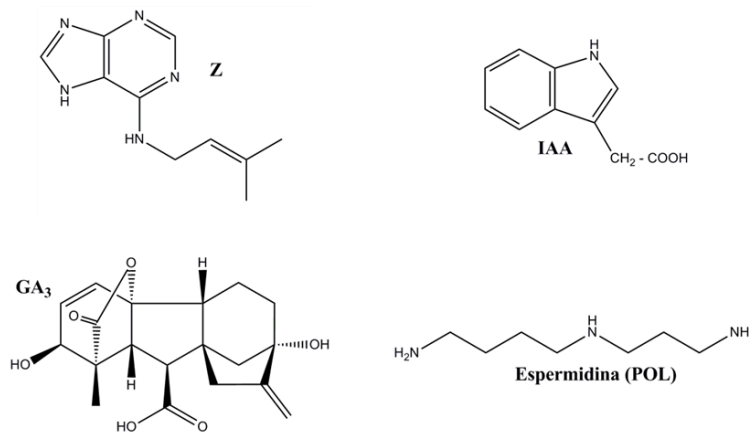


Fig. 1 Estructura química de les principals hormones inhibidores de la senescència. **Z**, zeatina (citocinina); **IAA**, àcid indol-3-acètic (auxina); **GA₃**, gibberel·lina A₃ (àcid gibberèl·lic); **POL**, poliamina.

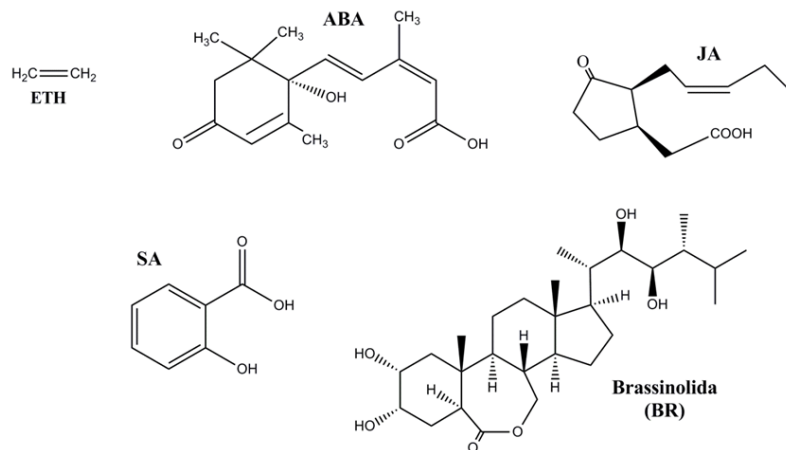


Fig. 2 Estructura química de les principals hormones inductores de la senescència. **ETH**, etilè; **ABA**, àcid abscísic; **JA**, àcid jasmònic; **SA**, àcid salicílic; **BR**, brassinoesteroide.

Les citocinines i l'etilè són potser els dos tipus hormonals més estudiats en senescència, fet que alhora ha permès caracteritzar amb més detall la seva (contrària) intervenció en el procés de senescència; mentre l'etilè juga un clar rol promotor, les citocinines inhibeixen el procés (revisat per Srivastava, 2001; Schippers *et al.*, 2007). En fruits climatèrics i flors sensibles a l'etilè, la senescència es caracteritza per l'aparició d'un augment de la taxa respiratòria i del típic pic de producció d'etilè. Aquesta correlació entre l'augment dels nivells d'etilè i el progrés de la senescència, a més, també

és vàlida en fulles i per la majoria d'espècies, corroborant el rol regulador de l'etilè en senescència (revisat per Gan, 2004).

D'altra banda, mentre que l'aplicació exògena d'etilè generalment indueix el procés de senescència de les fulles, flors i fruits de moltes espècies, el bloqueig de les vies de biosíntesi o senyalització de l'hormona inhibeixen el procés; l'ús d'inhibidors químics de l'acció hormonal, com el tiosulfat de plata (STS) o l'1-metilciclopropè (1-MCP), o de transgènics insensibles a l'etilè permeten retardar l'aparició del procés de senescència. Els mutants *etr1* d'*Arabidopsis* o el *never ripe* de tomàquet són insensibles a l'etilè degut al truncament d'un dels receptors d'etilè, fet que alhora provoca un retard significatiu de la senescència foliar en ambdues espècies i la dels òrgans florals, en el cas del tomàquet transgènic (revisat per Dangl *et al.*, 2000; Srivastava, 2001; Gan, 2004; Schippers *et al.*, 2007). D'altra banda, un cop s'ha iniciat la senescència foliar dels mutants *etr1*, aquesta progressa de forma normal (Grbić i Bleeker, 1995). A part dels mutants insensibles, l'ús de mutants que produeixen menors quantitats d'etilè per expressió *antisense* dels gens de la síntesi (ACS) i/o l'oxidació (ACO) de l'àcid 1-aminociclopropà-1-carboxílic (ACC) també demostra el rol regulador de l'etilè en senescència, ja que aquests mutants també experimenten un retard de la senescència foliar. D'altra banda, l'etilè no pot ser l'únic factor responsable de l'inici de la senescència, ja que tot i que en els mutants insensibles o incapaçs de produir etilè mostren un retard del procés, aquest sempre acaba esdevenint-se (revisat per Dangl *et al.*, 2000; Srivastava, 2001; Gan, 2004; Schippers *et al.*, 2007). A més, l'efecte inductor de la senescència foliar per part de l'etilè només és observat quan els òrgans tractats han assolit un determinat estadi del desenvolupament, ja que en fulles "massa" joves l'aplicació exògena d'etilè no provoca la inducció de la senescència. Per tant, tot i que l'etilè és capaç de modular el ritme de la senescència, el control del procés

també implica necessàriament la regulació temporal (Grbić i Bleecker, 1995; Jing *et al.*, 2002).

Contràriament, l'efecte de les citocinines (Fig. 1) resulta en el retard de l'aparició dels signes (i per tant del procés) de senescència. Tal i com s'observa en el cas de l'etilè, l'aplicació exògena de citocinines també permet, si més no, entreveure la seva funció en senescència. A més, els nivells endògens també es correlacionen amb el progrés de la senescència (en aquest cas, disminuint). De tota manera, la descripció inequívoca de la funció inhibidora de la senescència per part de les citocinines es corroborà amb l'estudi de plantes transgèniques sobre-productores de citocinines (Gan i Amasino, 1995; 1996). Donada la seva capacitat per promoure l'activitat embornal en diferents parts de la planta al llarg del seu desenvolupament, l'efecte retardant de les citocinines en senescència podria ser el resultat d'una remobilització forçosa dels nutrients dels teixits senescents cap als teixits joves (on s'hi acumulen majors quantitats de citocinines) o conseqüència del seu efecte repressiu de l'expressió gènica d'algun SAG clau, inhibint d'aquesta manera l'avenç de la senescència (revisat per Dangl *et al.*, 2000).

A més de les citocinines, les auxines, les gibberel·lines (GAs) o les poliamines (POL) també tenen efectes inhibidors de la senescència. Els seus nivells endògens acostumen a presentar una correlació inversa amb el progrés de la senescència, mentre que les aplicacions exògenes retarden el procés. Les POL (Fig. 1) resulten essencials per al bon creixement i desenvolupament vegetal, fet pel que molts autors (tot i la controvèrsia) les consideren reguladors hormonals. Es tracta d'un grup de molècules alifàtiques tipus amina (derivades de la descarboxilació dels aminoàcids arginina i/o ornitina) presents en totes les cèl·lules vegetals i que alhora resulten essencials, ja que els organismes amb nivells alterats pateixen desordres en el desenvolupament (revisat per Davies, 2004). La seva via de síntesi implica etapes conjuntes amb la via de biosíntesi de

l'etilè, fet pel que ambdues presenten complicades interaccions entre nivells i efectes en diferents etapes del desenvolupament vegetal, com ara la senescència. Pel que fa al seu efecte directe en senescència semblen prevenir tant la senescència mitòtica com la post-mitòtica, donat que els nivells de POL són elevats en cèl·lules on es conserva la capacitat de divisió (però no en aquelles que han aturat el seu creixement per divisió) i que alhora, les aplicacions exògenes en fulles retarden l'aparició de la senescència foliar (revisat per Gan, 2004). No obstant, la seva concentració en la cèl·lula és molt superior a la de la resta d'hormones vegetals i per tant no encaixen dins la típica definició d'hormona. Per aquesta raó, se n'ha suggerit també el paper de missatgers secundaris amb el qual les POL passarien a ser reguladors del creixement vegetal (i no pas hormones) capaços de transmetre el senyal a les veritables hormones responsables del control del desenvolupament vegetal (revisat per Bais i Ravishankar, 2002; Kaur-Sawhney *et al.*, 2003).

D'altra banda, les auxines (Fig. 1) es caracteritzen per ser les hormones responsables de l'expansió cel·lular, la dominància apical, formen part del procés d'abscisió, la floració (bromèlies) o el creixement de les parts florals, entre d'altres, i són sintetitzades en fulles i en llavors a partir del triptòfan i/o de compostos del tipus indòlic (revisat per Davies, 2004). Tot i que els primers estudis enfocats a determinar el paper de les auxines en senescència proposen la funció de retardant del procés, al llarg del temps s'han anat descrivint vàries excepcions que comprometen la certesa de la hipòtesi inicial, pel que actualment el rol de les auxines en senescència encara roman confús (revisat per Gan, 2004). Donada la seva estreta relació amb la via de producció d'etilè, elevats nivells d'auxines poden promoure la inducció de la senescència. A més, determinats estudis mostren augments significatius dels continguts endògens d'auxines al llarg de la senescència foliar (revisat per Gan, 2004).

En el cas de les GAs, parlem d'un extens grup de molècules de 19 o 20 carbonis, generades inicialment a partir a partir de piruvat i gliceraldehid-3-fosfat, al cloroplast, a partir del qual es genera l'intermediari metileritritol fosfat (MEP) i isopentenil difosfat (5 carbonis), unitat biològica bàsica d'isoprenoide, que finalment es condensa en una nova molècula de 10 carbonis; el geranil-geranil difosfat. Després de vàries transformacions que impliquen ambdós plastidi i reticle endoplasmàtic es genera la primera GA, la GA₁₂, a partir de la qual, mitjançant oxidacions citoplasmàtiques, es sintetitzen la resta de GAs (Fig. 3). La nomenclatura ordinal de les diverses GAs segueix l'ordre temporal dels descobriments respectius. Les formes bioactives són les GA₄ i GA₁, generades per 3β-hidroxilació de les GA₉ i GA₂₀, respectivament, que alhora provenen de l'oxidació de les GA₂₄ i GA₁₉, respectivament (Fig. 3).

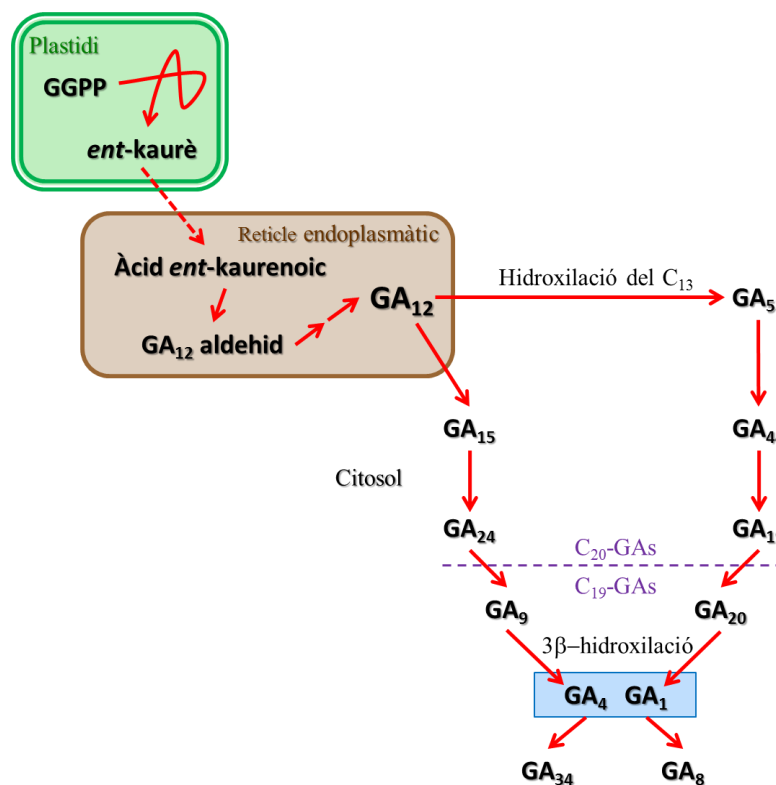


Fig. 3 Biosíntesi de les diferents gibberel·lines. Al plastidi, el geranil-geranil difosfat (GGPP) és convertit a *ent*-kaurè, que seguidament serà transformat a GA₁₂, al reticle endoplasmàtic. A partir de la GA₁₂, existeixen dues vies citosòliques independents per a la síntesi de la resta de gibberel·lines, depenent de si es dona o no una hidroxilació del C₁₃ de la GA₁₂, generant GA₅₃ o GA₁₅, respectivament. Mitjançant l'oxidació dels C₂₀ de les GAs que es van sintetitzant en ambdues vies s'arriba a generar GA₁₉ i GA₂₀ (depenent de la via), precursors de les formes bioactives GA₄ i GA₁, respectivament (marcades en blau). Finalment, la hidroxilació del C₂ de les formes actives provoca la seva re-conversió en formes inactives, generant GA₃₄ (a partir de GA₄) i GA₈ (a partir de GA₁). Adaptat de Sponsel (2006).

D'entre els seus efectes destaquen la promoció de la divisió i expansió cel·lulars, l'elongació de la tija (en resposta a la condició de dia llarg), la inducció de la germinació, la formació i creixement del fruit o la inducció de la masculinització de les flors en dioècies (revisat per Davies, 2004). A més, l'aplicació exògena de GAs inhibeix significativament l'aparició de la senescència foliar i floral en moltes espècies.

Pel que fa les hormones promotores de la senescència, a diferència de les inhibidores, els nivells endògens tendeixen a augmentar a mida que la senescència avança i les aplicacions exògenes indueixen o promouen l'aparició dels signes més típics. L'ABA és conegut per diferents efectes com el tancament estomàtic, la inhibició del creixement o pel seu efecte antagònic de les GAs, però també ha estat descrit com un important inductor de la senescència foliar. En la majoria d'espècies, els nivells d'ABA augmenten a mida que la senescència progressa i les aplicacions exògenes indueixen l'expressió de diversos SAGs. A més, aquest increment del contingut en ABA sembla estar correlacionat amb determinats factors ambientals que indueixen la senescència i amb l'increment de l'estrès oxidatiu (revisat per Lim *et al.*, 2007). En el cas del JA, tot i que el seu rol més conegut és el relacionat amb les respostes de defensa dels vegetals, la primera funció biològica que li va ser atorgada fou la de promoure la senescència foliar en civada (Ueda i Kato, 1980). La seva implicació en senescència queda plasmada amb l'ús d'aplicacions exògenes, que promouen l'aparició dels signes típics, per la regulació a l'alça de l'expressió dels gens involucrats en la seva biosíntesi i per l'augment dels nivells endògens de JA en senescència, que alhora implica l'expressió de diversos SAGs (revisat per Gan, 2004). De forma similar al JA, el SA també és més conegut per la seva funció de senyalització en respostes de defensa de malalties vegetals que pel seu rol en senescència. De la mateixa manera que amb la resta d'hormones promotores, els nivells de SA augmenten a mida que la senescència progressa. A més, els organismes transgènics

deficients en la producció o la via de senyalització del SA mostren un retard de la senescència i variacions en els patrons d'expressió d'alguns SAGs (revisat per Gan, 2004). Finalment, l'aplicació exògena de brassinoesteroides promou l'aparició dels signes de senescència foliar, alhora que els mutants deficients en les rutes de biosíntesi o senyalització mostren un retard del procés. Es tracta d'un grup d'uns 60 compostos esteroïdals endògens presents a la majoria d'espècies (en llavors, pol·len i teixits vegetatius joves) que a molt baixes concentracions són capaços d'interferir en el desenvolupament vegetal (revisat per Clouse, 2004). A diferència de les POL, l'augment del nombre d'evidències existents ha forçat a que actualment es tornin a considerar els brassinoesteroides com a hormones (revisat per Clouse i Sasse, 1998; Asami *et al.*, 2005; Hayat i Ahmad, 2011). Impliquen variacions en l'expressió d'alguns SAGs i a més, també semblen tenir relació amb la senyalització per ROS, doncs els nivells de malondialdehid (MDA), un indicador de peroxidació lipídica, augmenten després del tractament amb brassinoesteroides, alhora s'observen disminucions de les activitats enzimàtiques catalasa (CAT) i superòxid dismutasa (SOD, revisat per Gan, 2004), ambdós relacionats amb la destoxicació de radicals lliures potencialment nocius per la cèl·lula i típics del procés de senescència.

2.2 Estrès oxidatiu

És ben sabut que el procés de senescència implica una disminució de l'estabilitat de membrana, un augment de la taxa de peroxidació lipídica i reduccions dels nivells de determinats enzims de protecció contra el dany oxidatiu (com la CAT o la SOD, Dhindsa *et al.*, 1981), contribuint així a l'increment de l'estrès oxidatiu. A més, a mida que progressa la senescència, tant la quantitat com la producció de noves ROS augmenten, alhora que la maquinària antioxidant va perdent la seva funcionalitat (revisat per Zimmermann i Zentgraf, 2005). La producció de ROS és un procés que es dona

normalment en els vegetals com a conseqüència de la respiració i/o de l'activitat fotosintètica de la planta (revisat per Bolouri-Moghaddam *et al.*, 2010), però en determinades ocasions, la cèl·lula pot disparar-ne la producció en resposta a determinats factors (biòtics i/o abiòtics), contribuint així de forma “voluntària” a l'estrès oxidatiu (revisat per Apel i Hirt, 2004). D'altra banda, donat que les ROS juguen un important paper en senyalització intracel·lular, aquest augment “intencionat” de la quantitat de ROS en resposta a una determinada situació podria formar part de l'estratègia de la cèl·lula per superar les condicions adverses o seguir determinats programes que li venen marcats pel propi codi genètic. En aquest sentit, a nivell molecular la inducció de l'expressió d'alguns SAGs clau per al progrés de la senescència està clarament associada als nivells d'estrès oxidatiu (Navabpour *et al.*, 2003).

La maquinària antioxidant també juga un important paper en la regulació de la senescència, via per la qual la cèl·lula és capaç d'inhabilitar l'acció nociva dels radicals lliures generats com a conseqüència del seu propi metabolisme. Per tant, el balanç entre la producció de ROS i l'activitat antioxidant de la cèl·lula podria ser un factor de regulació del procés de senescència (revisat per Dangl *et al.*, 2000). La cèl·lula disposa tant de sistemes enzimàtics com no enzimàtics per tal d'inhabilitar les espècies tòxiques produïdes durant el metabolisme. Un dels marcadors més utilitzats és l'anàlisi del grau de peroxidació lipídica, responsable de la típica degradació de l'estructura de les membranes cel·lulars en senescència i que ens serveix com a indicador de l'abundància de radicals lliures (revisat per Smirnoff, 1993). A més de la quantificació de ROS, però, també es poden utilitzar l'activitat dels enzims destoxicadors i/o generadors de ROS i l'abundància de les molècules no enzimàtiques amb capacitat antioxidant com a marcadors de l'estat redox de la cèl·lula.

D'entre els antioxidants enzimàtics, destaquen la SOD, les peroxidases de l'ascorbat (APX) i el glutatió (GPX) i la CAT, necessaris per al bon funcionament i manteniment del metabolisme cel·lular. La SOD s'encarrega de transformar l'anió superòxid ($O_2^{\cdot -}$, generat pel fotosistema I) en peròxid d'hidrogen (H_2O_2), que alhora l' H_2O_2 també podria resultar citotòxic. Per tal d'eliminar aquest H_2O_2 , però, cal que la resta d'enzims catalitzin la seva transformació en aigua i/o altres compostos inofensius (Fig. 4). A més, les activitats enzimàtiques APX i GPX generen monodehidroascorbat (MDHA) i glutatió oxidat, respectivament, que alhora poden ser reciclats a ascorbat i glutatió mitjançant un cicle que involucra diferents reductases, reconstituïnt així la capacitat antioxidant enzimàtica de la cèl·lula (revisat per Apel i Hirt, 2004).

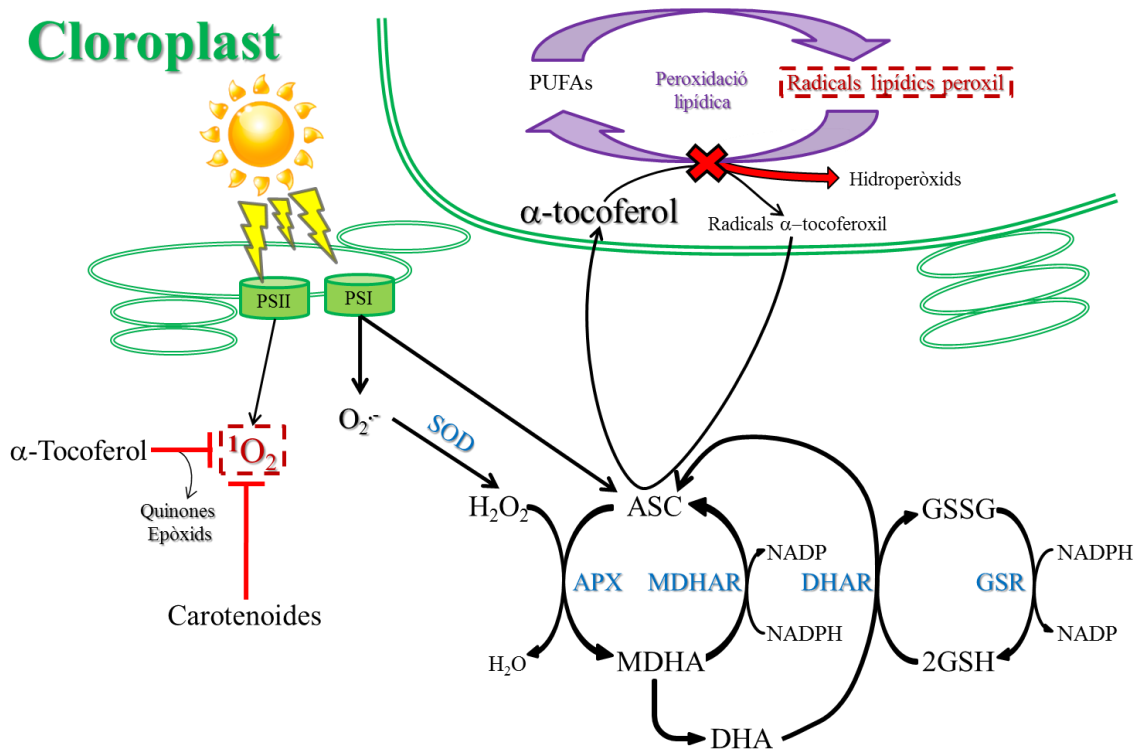


Fig. 4 Esquema representatiu de la maquinària antioxidant del cloroplast.
 PUFA, àcids grassos poliinsaturats; 1O_2 , singlet d'oxigen; PS, fotosistema; ASC, àcid ascòrbic;
 DHA, deshidroascorbat; GSH, glutatió; GSSG, glutatió oxidat; MDA, monodehidroascorbat.
 SOD, superòxid dismutasa; APX, ascorbat peroxidasa; MDHAR, monodehidroascorbat reductasa;
 DHAR, deshidroascorbat reductasa; GSR, glutatió reductasa.

En l'altre grup, les molècules antioxidants tenen l'habilitat per si mateixes d'inhabilitar les ROS produïdes com a conseqüència de l'activitat metabòlica de la

cèl·lula. L'ascorbat, el glutatió, els tocoferols o els carotenoides formen part d'aquest grup no enzimàtic de molècules antioxidants.

Un dels grups més estudiats és el dels tococromanols o vitamina E (Fig. 5), dins del qual s'hi engloben els tocoferols i tocotrienols. La vitamina E fou descoberta el 1922 per Evans i Bishop a partir de mostres d'enciam que resultà ser un compost lipòfil essencial per a la reproducció animal, fet pel que des de llavors ha despertat un enorme interès. La naturalesa bioquímica del compost fou determinada més endavant per Evans i col·laboradors, que aconseguiren purificar diferents molècules a partir d'extractes d'oli de palma. Entre les molècules obtingudes, es determinà l'existència de dos isòmers clarament relacionats amb la vitamina descrita el 1926, conclouent que l'activitat de la vitamina E no rau en una sola molècula sinó que es tracta d'un grup de molècules amb capacitat antioxidant. A més, es va proposar el terme " α -tocoferol" per denominar la isoforma més activa descrita en les seves anàlisis (Evans *et al.*, 1974). Més endavant, es proposà el nom de β -tocoferol per a l'altra isoforma (descrita el 1935) i el de γ -tocoferol per una tercera isoforma descoberta posteriorment (Emerson *et al.*, 1937), que ahora resulta ser el precursor de la síntesi de l' α -tocoferol (Dada *et al.*, 1968). L'activitat antioxidant de les molècules de vitamina E, però, no va ser descrita fins el 1966 (Epstein *et al.*, 1966). Actualment, a més, coneixem una quarta isoforma activa, el δ -tocoferol, i l'existència d'un altre grup d'isòmers (α -, β -, γ - i δ -), també actius i amb capacitat antioxidant anomenats tocotrienols. Estructuralment, els tocotrienols només es diferencien dels tocoferols per la presència de dobles enllaços en la seva cadena lateral, mentre que biològicament, potser la major diferència rau en la seva distribució, pràcticament limitada a les llavors (revisat per Munné-Bosch i Alegre, 2002; Falk i Munné-Bosch, 2010).

D'entre les funcions dels tococromanols destaquen el manteniment de l'estabilitat de membrana, gràcies a la seva capacitat d'inhabilitar els radicals lipídics peroxil (Kamal-Eldin i Appelqvist, 1996), i la inactivació (tant física com química) del singlet d'oxigen (1O_2 , Fahrenholz *et al.*, 1974). Tots els tococromanols comparteixen la mateixa estructura bàsica; consten d'un anell cromanol (que manté la molècula unida a les membranes dels plastidis, on es sintetitzen) unit a una cadena lateral, de caràcter hidrofòbic (Fig. 5).

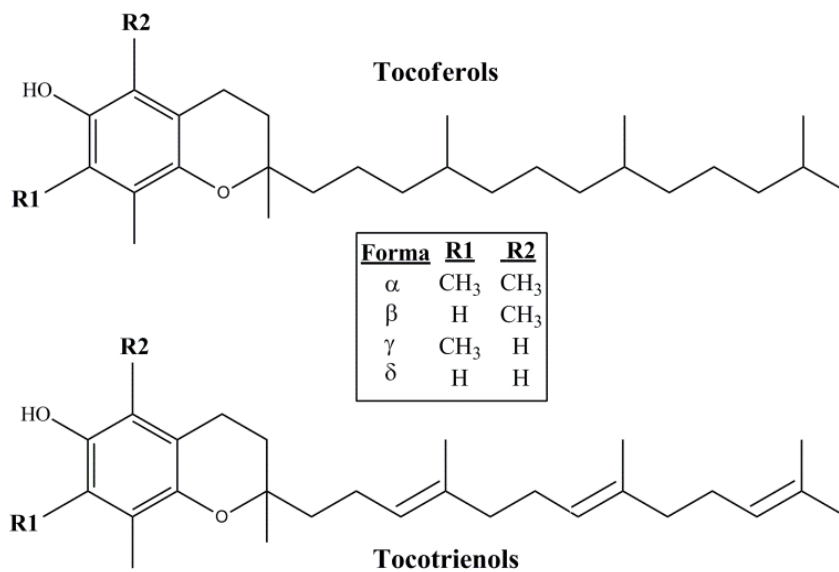


Fig. 5 Estructura dels tocoferols i tocotrienols. Adaptat de Falk i Munné-Bosch (2010).

El grau de saturació de la cadena lateral és el que confereix la diferència estructural entre els dos tipus de molècula de vitamina E; als tocoferols són insaturades i deriven del fitil difosfat mentre que les dels tocotrienols deriven del geranil-geranil difosfat i presenten dobles enllaços en les posicions 3, 7 i 11. A més, segons la posició dels metil en l'anell aromàtic, es generen quatre formes (α , β , γ i δ) a cada grup (revisat per DellaPenna i Pogson, 2006). Pel que fa el grau d'activitat antioxidant, sembla que l'eficiència dels tocotrienols és major a la de l' α -tocoferol (revisat per Sen *et al.*, 2006), mentre que l'abundància dels tocoferols és molt major a la dels tocotrienols, doncs s'ha descrit la presència de tocoferols a tots els organismes fotosintètics (tret d'*Anacystis nidulans*, Omata i Murata, 1984). A més, la distribució en la planta també és força diferent; trobem

tocoferols a quasi totes les parts de la planta, mentre que la distribució dels tocotrienols sembla estar restringida a la llavor (revisat per Munné-Bosch i Alegre, 2002; Falk i Munné-Bosch, 2010). La biosíntesi de la vitamina E està restringida als organismes fotosintètics, implicant les vies de l'àcid shikímic i la del MEP, tot i que un cop generats els precursors, els enzims de ciclació (tocoferol ciclasa) i metilació (γ -tocoferol metil transferasa) són comuns per a les quatre formes (α , β , γ i δ , revisat per Hofius i Sonnewald, 2003). Les quatre formes de tocoferol són actives, tot i que *in vivo* l'activitat antioxidant segueix l'ordre $\alpha > \beta > \gamma > \delta$, mentre que *in vitro* és al revés. En plantes, la forma majoritària de tocoferol és l' α , seguida de la γ . Alhora, en animals l' α -tocoferol és la forma més activa (Weiser *et al.*, 1986) i l'única capaç de ser absorbida en humans (Kamal-Eldin i Appelqvist, 1996).

A més, l'activitat dels tocoferols interacciona amb altres antioxidants com l'àcid ascòrbic o els carotenoides. El reciclatge de l' α -tocoferol és possible gràcies a la interacció de l'àcid ascòrbic amb els radicals α -tocoferoxil, generats com a conseqüència de la inhibició de la toxicitat dels radicals lipídics peroxil. Alhora, l'àcid ascòrbic s'oxida primer a MDHA i seguidament passa espontàniament a dehidroascorbat (DHA), que pot tornar a transformar-se en àcid ascòrbic mitjançant la DHA reductasa. A més, l'oxidació inicial a ascorbat permet que l'APX detoxifiqui paral·lelament l' H_2O_2 generat, per exemple per la SOD, com a conseqüència del metabolisme cel·lular. En el cas dels carotenoides, l'activitat del β -carotè depèn de la concentració d'oxigen cel·lular i de la pròpia molècula. Pel que fa la seva relació amb el tocoferol, la cooperació entre el tocoferol i el β -carotè permet l'extinció del 1O_2 produït en les membranes lipídiques (revisat per Munné-Bosch i Alegre, 2002).

2.3 Sucres

Tot i la seva condició principal com a font d'energia, també se'ls ha descrit com a molècules actives en senyalització intracel·lular (revisat per Rolland *et al.*, 2002; 2006) i amb capacitat antioxidant (revisat per Bolouri-Moghaddam *et al.*, 2010). Les variacions en el contingut endogen de sucres són habituals al llarg del desenvolupament vegetal i a més l'estatus cel·lular referent als nivells de sucres pot modular diversos reguladors endògens que alhora controlen el creixement i desenvolupament vegetal.

En el cas de la senescència, però, el seu rol el desenvolupament del procés encara no ha estat ben definit; diversos estudis suggereixen que l'acumulació d'elevats continguts en sucres indueix el procés de senescència foliar (revisat per Lim *et al.*, 2007), mentre que en altres estudis els resultats recolzen la hipòtesi contrària o no aporten suficients dades per concloure entre ambdues hipòtesis (revisat per van Doorn, 2008; Wingler *et al.*, 2009). D'una banda, l'acumulació de sucres en fulles d'ordi, resultant de la inhibició del transport floemàtic, provoca l'aparició prematura de la clorosi foliar i d'altres marcadors de senescència típics, suggerint que l'increment de la concentració de sucres indueixen el procés de senescència (Parrott *et al.*, 2005). De forma similar, en el model experimental *Arabidopsis* es determinà que la senescència foliar és induïble (i no pas reprimible) per sucres, ja que el tractament amb glucosa provoca un augment molt significatiu de la transcripció del gen específic de senescència *SAG12* (Pourtau *et al.*, 2006). D'altra banda, l'aportació de sucres exògens no sempre provoca l'acceleració de l'aparició dels signes de senescència. Tot i que l'aportació exògena de sucres accelera l'esgrogueïment foliar en *Alstroemeria* i *Lilium*, d'entre un conjunt de diversos gèneres analitzats, en la majoria de casos el tractament no provoca cap efecte (revisat per van Doorn, 2008). Finalment, els estudis que suggereixen que la senescència foliar és induïda per l'absència (o nivells molt baixos) de sucres acostumen a basar-se en la capacitat dels

sucres per revertir l'efecte inductor de senescència provocat pel tractament de foscor, però no permeten determinar el paper dels sucres en el procés de senescència en condicions de llum (revisat per van Doorn, 2008). Una de les poques evidències que recolzen la hipòtesi i que aconsegueixen aproximar-se al procés natural és resultat de l'estudi realitzat per Noh i Amasino (1999) amb fulles d'*Arabidopsis* tallades individualment (aïllades de la planta). Els resultats de l'estudi mostraven que, en condicions control (llum) però no en foscor, l'abundància dels transcrits del gen específic de senescència *SAG12* incrementava a mida que la senescència foliar avançava. A més, en les fulles on la senescència ja s'havia propagat per la meitat de la fulla, l'adició de sacarosa, glucosa i fructosa al medi de manteniment (i en condicions control) provocava un ràpid descens dels transcrits *SAG12*, demostrant que els sucres poden reprimir-ne la seva expressió (Noh i Amasino, 1999). A més, també s'ha vist que la privació de sucres en cultius cel·lulars d'*Arabidopsis* induïx l'expressió del mateix gen, suggerint que els baixos nivells de sucres presents en la fulla són els responsables de l'augment de transcripció del *SAG12* durant la senescència (revisat per Quirino *et al.*, 2000).

A nivell molecular, els diferents estudis realitzats també mostren resultats confusos. A més, tant la sobre-expressió com la inhibició de l'enzim responsable de la fosforilació i percepció de la concentració d'hexoses (hexocinasa) provoquen l'aparició d'efectes pleotròpics, impeding considerant els mutants com a models representatius del desenvolupament natural. De tota manera, tot i que la presència d'altres variacions fisiològiques com a conseqüència de la mutació poden emascarar l'efecte d'aquesta, l'aproximació molecular pot resultar útil a l'hora d'ajudar a esclarir la funció dels sucres en el procés de senescència. El truncament de l'hexocinasa genera fenotips insensibles a la glucosa (mutants *gin*), que alhora s'associa amb el retard de l'aparició de la senescència foliar (revisat per van Doorn, 2008). D'altra banda, aquests mutants també

poden presentar importants variacions fisiològiques com hipersensibilitat a les citocinines o insensibilitat a les auxines (mutants *gin2*, Moore *et al.*, 2003), que alhora podrien ser les responsables (i no els sucres) del retard de la senescència foliar. Per contra, la sobreexpressió de l'enzim provoca hipersensibilitat a la glucosa i l'aparició precoç de la senescència foliar. A més, però, els sucres també mostren irregularitats com el creixement inadequat del brot i les arrels, impeditint decidir quina de les dues teories (excés/manca de sucres) s'ajusta més al procés natural en la fulla (revisat per van Doorn, 2008).

Pel que fa a la interacció dels sucres amb la senyalització hormonal en diferents processos del desenvolupament vegetal, s'han descrit vincles clars en què s'involucren hormones com l'ABA, l'etilè o les auxines (revisat per Eveland i Jackson, 2011). En general, els mutants de la senyalització per sucres contenen baixos nivells d'ABA i mostren una major sensibilitat a l'etilè. Molts dels gens de la biosíntesi d'ABA s'indueixen per la presència de la pròpia hormona, però en determinats casos (*ABA2*; *ABAI*), és la glucosa i no l'ABA qui controla l'expressió gènica, demostrant l'existència d'un vincle directe entre la glucosa i la biosíntesi i acumulació d'ABA (revisat per León i Sheen, 2003; Eveland i Jackson, 2011). Un altre exemple de la relació entre sucres i hormones rau en un estudi realitzat en fulles de tabac transgènic que a l'iniciar-se la senescència esdevé sobre-productor de citocinines. En condicions normals (*wild type*), el contingut en sucres (glucosa i fructosa) augmenta amb l'edat de la fulla, però en el cas dels transgènics aquest increment és encara major. A més, en situacions de poca llum, la concentració de sucres augmenta mentre els nivells de citocinines disminueixen a mida que la senescència foliar avança, suggerint una interacció entre sucres, citocinines i llum durant la senescència foliar (Wingler *et al.*, 1998). A nivell molecular, l'estudi de Noh i Amasino (1999) també implicava els tractaments hormonal amb citocinines i auxines. Els resultats de l'estudi mostraven que així com les citocinines acostumen a disminuir

l'abundància de transcrits del gen *SAG12*, l'efecte de les auxines (concretament de l'àcid indol-3-acètic, IAA) es troba lligat a la durada del tractament; en períodes curts, les auxines permeten disminuir els nivells de transcripció però l'aportació d'IAA durant més temps permet recuperar-ne els nivells inicials (Noh i Amasino, 1999).

Pel que fa a la seva relació amb l'estat redox, els sucres actuen com a molècules senyal en la producció d'antioxidants contra ROS específiques. A més, recentment s'ha descrit la seva capacitat antioxidant *per se*; quan els nivells de sucres endògens són suficientment elevats, les pròpies molècules de sucre (per si soles) poden atrapar i eliminar determinades ROS (revisat per (Bolouri-Moghaddam *et al.*, 2010).

3. Senescència floral

La majoria de les espècies vegetals produeixen flors; l'òrgan encarregat de suportar les estructures reproductores que permetran la perpetuació de l'espècie en el temps. A mode de reflexió, cal recordar que la flor actua com un òrgan únic on les peces florals es coordinen al llarg de tot el seu desenvolupament i fins la seva mort, sent possible alhora que unes exerceixin influència sobre les altres en determinats comportaments. Per tant, per parlar de senescència floral com a tal s'hauria de disposar de la informació obtinguda a totes les peces florals disponibles en l'estructura. Malgrat això, la majoria d'estudis es centren en la caracterització dels canvis observats durant la senescència als pètals o al gineceu, fent evident la manca d'informació que poden aportar tant els sèpals com l'androceu.

Cada peça té un paper dins l'estructura floral; quan els òrgans reproductors encara són immadurs es troben tancats dins d'una estructura formada per altres estructures florals estèrils (sèpals i pètals o tèpals, depenent del tipus de flor), mentre que un cop assoleixen la maduresa (i per tant són capaços de complir la seva funció biològica) queden exposats

a l'ambient. Alhora, les peces estèrils serviran per cridar l'atenció i de suport físic per als organismes pol·linitzadors, si és que són requerits en el procés de fecundació. Cal que el temps que la flor roman oberta sigui suficient per tal de permetre la dispersió del pol·len i/o la pol·linització de l'estigma floral, però un cop fecundada alguns òrgans florals passen a ser una despesa energètica massa cara de la qual cal desfer-se'n (Ashman i Schoen, 1994). És a dir, un cop s'ha complert la funció biològica, la flor entra en senescència per tal de no comprometre el balanç energètic de la planta sencera. Alhora, es permet el reciclatge de nutrients encara continguts en les peces florals, que seran utilitzats per altres òrgans de la planta.

La senescència floral és el procés pel qual les peces florals es van deteriorant progressivament fins morir i desaparèixer. En aquest sentit, és un procés ràpid i similar al que es pateix a nivell de planta sencera o en la fulla i per tant, la informació obtinguda a partir de l'estudi de les fulles pot contribuir, al menys en part, al coneixement del procés en altres òrgans de la planta. A més, les flors són originades a partir de fulles i per tant, tot i les diferències funcionals, és d'esperar que en ambdós tipus d'òrgan el procés de senescència esdevingui força similar. Ja el 1790 Goethe proposava que les flors sorgeixen a partir de les fulles i gràcies a un procés de metamorfosi (Miller, 2009). Un parell de segles més tard, l'avenç tecnològic ha permès estudiar el desenvolupament floral a nivell molecular, fruit del qual sorgí el model ABC que corroborà la idea original de Goethe (revisat per Coen, 2001; Friedman *et al.*, 2004). Per tant, avui dia s'accepta que la flor i les peces contingudes dins la seva estructura són fulles modificades.

A diferència de les fulles, la senescència dels pètals esdevé un procés irreversible i autònom i alhora sotmès a un estricte control mediat pel desenvolupament (revisat per Rogers, 2006; Shahri i Tahir, 2011). Al llarg del desenvolupament de la flor, determinades cèl·lules i teixits moren selectivament en resposta a les necessitats

ecològiques de l'espècie i segons un programa temporal marcat pel codi genètic de l'individu (revisat per Shahri i Tahir, 2011), fet que ha comportat la creació d'una certa confusió entre els termes senescència i MCP, que en senescència floral es poden catalogar de sinònims (revisat per Rogers, 2006; Shahri i Tahir, 2011), doncs la senescència dels pètals involucra majoritàriament processos de MCP. Així com en les fulles, la senescència floral també es caracteritza per l'aparició de canvis específics al llarg del procés com ara variacions en la permeabilitat de membrana, processos d'autofàgia, degradació de proteïnes i àcids nucleics, síntesi de proteïnes específiques de senescència o la remobilització de nutrients essencials (revisat per Shahri i Tahir, 2011).

D'altra banda, si bé és cert que en molts casos la pol·linització sembla ser el senyal desencadenant del procés de deteriorament floral (revisat per O'Neill, 1997), aquesta no pot ser el factor detonant de l'inici de la senescència floral, ja que les flors no fecundades o estèrils tampoc viuen eternament. Nombrosos estudis han demostrat la importància dels reguladors del creixement vegetal a l'hora d'iniciar el procés de senescència floral. En molts casos el regulador més important de la senescència esdevé l'etilè (flors sensibles a l'etilè), mentre que en determinades espècies (insensibles a l'etilè) ni l'augment de la producció ni l'aplicació exògena d'etilè n'acceleren el procés (Woltering i van Doorn, 1988). En aquest últim tipus de flors, doncs, el control del procés recau sobre la resta de reguladors endògens (diferents a l'etilè), tot i que encara no s'ha descrit un model comú per a totes les espècies insensibles a l'etilè estudiades.

Com a norma general, se li atorga a l'ABA un rol inductor de la senescència dels pètals, mentre que les citocinines provoquen l'efecte contrari. A més, sembla que en determinades espècies insensibles a l'etilè, l'aplicació exògena de GAs provoca un allargament de la longevitat floral (revisat per van Doorn i Woltering, 2008). En aquest cas (i en general), l'eficiència de les GAs és tal que els productors de flor tallada

acostumen a pre-tractar les vares florals amb una solució anomenada Promalin[®], una barreja de GAs (GA₄₊₇) i benziladenina (BA, citocinina) a concentracions iguals que retarda considerablement l'aparició de la clorosi foliar alhora que n'allarga la longevitat floral.

D'altra banda, l'estat redox i les variacions dels continguts en carbohidrats també juguen un important paper regulador en senescència floral. Pel que fa a l'estrès oxidatiu, les flors presenten variacions tant en els nivells de la producció d'antioxidants com de ROS al llarg del procés de senescència; generalment s'experimenta un increment de la producció de ROS, acompanyat per un descens en l'activitat de la maquinària antioxidant de la flor (revisat per Rogers, 2012). D'altra banda, el contingut en carbohidrats dels pètals en l'inici de la senescència acostuma a ser força elevat i per tant, la manca de sucres no seria el factor inductor del procés. Contràriament, l'aportació exògena de sucres acostuma a generar efectes beneficiosos sobre la qualitat i longevitat floral, pel que el rol dels sucres en senescència floral tampoc està del tot clar (revisat per van Doorn, 2004).

Alhora, la longevitat floral és una característica intrínseca a la biologia de l'espècie; hi ha flors que s'obren i moren el mateix dia (*Hemerocallis*) i flors que poden romandre obertes fins a setmanes (orquídiades). Sovint, la longevitat floral ve marcada per la durada de la vida dels pètals (o tèpals). Alhora, els la senescència dels pètals (o tèpals) pot implicar processos d'abscisió i/o de marciment i pansiment, depenent de l'espècie (revisat per van Doorn, 2001). Seguidament, es perd la part masculina de la flor (l'androceu), mentre que l'ovari es manté fins l'últim moment permetent, en el cas que la flor sigui fecundada, un bon desenvolupament del zigot.

En el cas de la flor tallada, degut a la seva importància econòmica, l'inici de la senescència dels pètals és potser el factor menys desitjat però que alhora resulta inevitable. Les varietats més longeves seran les millor acceptades pels consumidors i per

tant, les més venudes. Així, donat que els pètals són els primers en entrar en senescència i els òrgans més vistosos de la flor, la majoria d'estudis han estat adreçats al coneixement de la senescència de pètals o de flor sencera, però quasi sempre en espècies d'interès comercial. És per això que la majoria d'estudis en senescència floral s'han centrat més en l'aprenentatge del procés donat en espècies ornamentals i d'interès comercial que no pas en espècies naturals.

3.1 Regulació hormonal de la senescència floral

Donada la importància de les hormones en la regulació de la senescència foliar, és lògic pensar que les activitats característiques de cada una d'elles seguiran tenint els mateixos efectes en senescència floral. Per exemple, l'etilè manté el seu rol de regulador principal en la majoria d'espècies, que normalment inicien la senescència després d'un augment en la producció o de la resposta a l'aplicació exògena d'etilè. La implicació de l'etilè en senescència floral també queda ben caracteritzada a nivell molecular. La inducció dels gens que codifiquen pels últims dos enzims implicats en la via de biosíntesi d'etilè (ACS i ACO), així com la pròpia producció d'etilè estan correlacionades amb el procés de senescència floral en petúnia i clavell; els clavells i petúnies als que se'ls inhibeix l'expressió de l'ACO mostren una major longevitat floral (Reid i Chen, 2007). Contràriament, les citocinines semblen retardar la senescència dels pètals de la majoria d'espècies, ja que les aplicacions exògenes d'aquestes molècules han estat extensament utilitzades per allargar la longevitat floral d'un gran ventall d'espècies (clavell, rosa, tulipa, *Iris*, crisantems, etc.), proposant diferents mecanismes pels quals es podia explicar aquest efecte retardant de la senescència (Goszczyńska *et al.*, 1985). A nivell molecular, l'ús d'una versió del transgènic dissenyat per Gan i Amasino el 1995 en l'estudi de la senescència floral en petúnia va permetre corroborar l'efecte inhibitor del procés de deteriorament als pètals tractats amb citocinines; les plantes transgèniques amb sobre-

expressió del gen *IPT* sota el control del promotor del gen *SAG12* mostraven un marcat retard de la senescència dels pètals, un augment dels nivells de citocinines i una disminució de la sensibilitat a l'etilè (Chang *et al.*, 2003). De tota manera, degut a l'existència de diferents tipus de citocinines (naturals i artificials), el grau d'efectivitat del tractament pot dependre del tipus específic de citocinina aplicada. Els continguts en citocinines acostumen a ser majors en flors joves i en varietats més longeves (revisat per Reid i Chen, 2007). D'altra banda, sembla que la disminució del nivell de citocinines observat en flors senescents pot estar relacionat amb l'efecte degradador de l'etilè en front de les molècules de citocinina (Taverner *et al.*, 1999).

A part de l'etilè, el JA i el SA també s'han suggerit com a reguladors primaris de la MCP als pètals (revisat per Zhou *et al.*, 2005). L'aplicació exògena de jasmonats accelera la senescència de les flors d'orquídia i petúnia mitjançant l'estimulació de la síntesi d'ACC i etilè (Porat *et al.*, 1993). A més, l'aplicació d'àcid linolènic (precursor de la síntesi de JA) també provoca un increment en la producció d'etilè i l'acceleració de la senescència floral de les orquídiades, tot i que l'estudi conclou que, al menys en les orquídiades analitzades, els jasmonats no estan implicats en la senescència floral induïda per pol·linització (Porat *et al.*, 1995). En petúnia, l'anàlisi a nivell molecular dels efectes del tractament amb SA (en relació amb els del tractament amb etilè) ha permès determinar una interacció positiva entre ambdues hormones en senescència floral (Liu *et al.*, 2011). De la mateixa manera, l'ABA sembla accelerar la senescència dels pètals en la majoria de flors, tot i que la majoria d'estudis mostren un vincle entre l'efecte de l'ABA i la via de senyalització de l'etilè (en el cas de les flors sensibles a l'etilè, revisat per Reid i Chen, 2007; Shahri i Tahir, 2011).

D'altra banda, l'aplicació d'espermidina retarda la senescència de les flors de clavell i petúnia gràcies a la seva capacitat d'estabilització d'importants molècules

estructurals intracel·lulars, com els àcids nucleics (revisat per Shahri i Tahir, 2011). A més, en pèsol, s'ha descrit que diverses POL incrementen els seus nivells durant el desenvolupament i la senescència de l'ovari (Pérez-Amador *et al.*, 1996), tot i que depenent del tipus de POL (p. ex. putrescina), els nivells també poden disminuir durant la senescència de l'ovari (Pérez-Amador i Carbonell, 1995). D'altra banda, sembla que les GAs també poden estar implicades en l'inici del procés de senescència en ovaris de pèsol (Carrasco i Carbonell, 1990). L'aplicació de GAs permet retardar la senescència floral en algunes espècies ornamentals, efecte que podria estar relacionat amb la seva condició d'antagonistes naturals de l'ABA (Hunter *et al.*, 2004; Shahri i Tahir, 2011). En *Lilium*, l'aplicació exògena d'àcid gibberèl·lic permet allargar la longevitat i la mida de les flors de la inflorescència, alhora que retarda l'aparició de l'esgrogueïment foliar (Nowak i Mynett, 1985), mentre que a les flors de *Grevillea*, elevades concentracions d'àcid gibberèl·lic indueixen abscisió floral (tot i que a concentracions moderades també perllonga la longevitat (Setyadjit *et al.*, 2006). Així, encara no ha quedat clar el paper de les GAs en senescència; pot ser que participin individualment o que els seus potencials efectes només siguin fruit de la interacció amb altres hormones.

Tot i que el seu rol en senescència floral no és clar, les auxines semblen accelerar el marciment dels pètals de la majoria d'espècies sensibles a l'etilè mitjançant l'estimulació de la producció d'etilè (revisat per O'Neill, 1997). A nivell molecular, aquesta relació auxines-etilè durant la senescència floral sensible a l'etilè també és notable; els pètals senescents d'*Arabidopsis* mostren una forta regulació a l'alça dels gens associats a la biosíntesi i resposta d'auxines i etilè (Wagstaff *et al.*, 2009). A més, l'aplicació exògena d'auxines estimula l'expressió d'alguns gens de biosíntesi de l'etilè en diverses peces florals (revisat per Shahri i Tahir, 2011). Contràriament, en determinades espècies insensibles a l'etilè com *Hemerocallis*, l'aplicació exògena d'auxines pot produir l'efecte

oposat, ja que en retarda la senescència dels pètals (revisat per Rubinstein, 2000). Així, les auxines podrien tenir papers diferents en la regulació de la senescència floral, que a primera vista sembla estar associada a la sensibilitat de la flor en qüestió a la regulació del procés per part de l'etilè.

Aquesta predisposició de la flor per patir un tipus de senescència sensible o insensible a l'etilè sembla venir marcada per la taxonomia de l'espècie (Woltering i van Doorn, 1988), tot i que dins d'una mateixa família poden coexistir espècies amb diferents graus de sensibilitat (revisat per van Doorn, 2001). La sensibilitat a l'etilè s'acostuma a determinar mitjançant els efectes observats en la flor després de tractaments amb la pròpia hormona o amb inhibidors de l'activitat o biosíntesi de l'hormona, que alhora mostren la capacitat de l'hormona per regular i/o induir el deteriorament floral. Així, les espècies sensibles a l'etilè tractades amb inhibidors de la síntesi o l'acció d'aquesta hormona mostraran efectes beneficiosos per a la seva longevitat floral, mentre que l'aplicació exògena d'etilè accelerarà el procés de senescència. En el cas de les espècies insensibles, però, ni els tractaments amb inhibidors de l'etilè ni les aplicacions exògenes amb el mateix gas provoquen efectes considerables sobre la longevitat floral, doncs la regulació del procés de deteriorament de les peces florals no està controlat per aquesta hormona. De tota manera, cal remarcar que encara que el procés de senescència esdevingui insensible a l'etilè, l'hormona pot estar regulant altres processos importants com ara l'obertura floral, el desenvolupament de l'ovari o l'elongació del pedicel (revisat per Serek *et al.*, 2006). Per tant, cal tenir present que quan hom parla d'espècies (o varietats) insensibles a l'etilè, només fa referència a la implicació de l'hormona en el procés de senescència floral.

Tal i com s'ha descrit en el cas de les auxines, que la regulació de la senescència floral estigui o no principalment controlada per l'etilè pot tenir repercussions en el rol de

la resta de reguladors, ja que la implicació o els efectes dels altres components pot variar en funció de si l'etilè és o no el factor clau de la senescència floral. En el cas de les flors de senescència insensible a l'etilè, s'ha proposat l'ABA com el principal regulador del procés (Panavas *et al.*, 1998; revisat per Tripathi i Tuteja, 2007; Shahri i Tahir, 2011), tot i les citocinines també hi semblen estar implicades (revisat per Zhou *et al.*, 2005; van Doorn i Woltering, 2008). D'altra banda, en les espècies de senescència sensible a l'etilè els efectes de la resta d'hormones (citocinines, ABA, auxines, GAs, etc.) semblen venir donats mitjançant la interacció amb les vies de síntesi o senyalització del regulador clau: l'etilè (revisat per Tripathi i Tuteja, 2007; van Doorn i Woltering, 2008; Shahri i Tahir, 2011). Per tant, els mecanismes d'acció de les principals hormones reguladores de la senescència floral poden variar en funció del tipus de flors del que es parli.

En el cas de les espècies sensibles a l'etilè, l'efecte inhibidor de les citocinines sembla estar condicionat al control principal del procés per part de l'etilè, mentre que en el cas de les espècies insensibles, donada la baixa participació de l'etilè en el procés de senescència, l'efecte prolongant de la longevitat floral també és palpable però el mecanisme d'acció ha de ser forçosament diferent. Als pètals de rosa (sensibles a l'etilè), el contingut endogen de citocinines es correlaciona amb la longevitat de les diferents varietats estudiades. A més, l'aplicació exògena de BA allarga la vida de les flors tractades, tot i que el grau d'efectivitat del tractament també varia en funció de la longevitat natural de la varietat tractada, sent major per les varietats que de forma natural viuen menys temps (Mayak i Halevy, 1970). Al clavell (sensible), l'aplicació exògena de quinetina (citocinina) també permet allargar la vida de la flor tallada i alhora també provoca una reducció del típic pic d'etilè observat abans de l'aparició dels primers signes de senescència en flors sensibles a l'etilè. A més, l'efecte de la quinetina exògena redueix la sensibilitat de la flor a l'etilè (Eisinger, 1977). També en petúnia, on l'etilè dispara la

senescència floral, l'aplicació de citocinines implica un retard del marciment dels pètals mitjançant una intervenció en la via d'acció de l'etilè, que en part sembla induir el procés de senescència gràcies a una reducció de l'activitat citocinina (Taverner *et al.*, 1999). Sorprenentment, però, a nivell molecular el tractament amb BA no influeix en l'expressió dels gens *ERF* (factor de resposta a l'etilè) clonats en petúnia (*PhERF1-13*), que es mostra constitutiva i independent del tractament amb BA (Liu *et al.*, 2011). Pel que fa la resta de reguladors endògens, per contra, els tractaments hormonals acostumen a incrementar l'abundància dels transcrits. Les aplicacions d'ABA, IAA i metil jasmonat provoquen un augment de la transcripció dels gens del grup VII (*PhERF2-5*), que també es veu incrementada per l'augment de la producció d'etilè, demostrant l'existència d'un clar vincle entre aquest grup de gens i la senescència dels pètals i gineceu de petúnia (Liu *et al.*, 2011).

En el cas de les flors insensibles a l'etilè, tot i no disposar de tanta informació com en el cas de les flors sensibles a l'etilè, determinades evidències empíriques recolzen el suposat rol inhibidor de senescència floral per part de les citocinines també en la senescència insensible a l'etilè. L'adició de BA a la solució del vas permet retardar en aproximadament un dia l'aparició dels signes visibles de senescència dels pètals d'*Iris* (insensible). A més, a nivell molecular, els nivells d'expressió del gen *DAD-1* (*defender against apoptotic death*), que normalment mostren un descens concomitant amb l'aparició dels signes visibles de senescència, també triguen un dia més a disminuir (van der Kop *et al.*, 2003). De forma similar, en flors de *Grevillea* (insensible a l'etilè, Setyadjit *et al.*, 2004a) l'aplicació de BA per immersió de la tija en una solució hormonal concentrada també té un efecte retardant de la senescència floral, tot i que el manteniment en solucions de fins a 0.1 mM no mostren resultats beneficiosos (Setyadjit *et al.*, 2004b).

A part de les citocinines, el cas més clar de regulació hormonal en ambdós tipus de senescència floral és el de l'ABA, tot i que en aquest cas l'efecte és el contrari. Generalment, l'aplicació exògena d'ABA accelera el procés de deteriorament de la flor i a més, el contingut endogen de l'hormona augmenta en les primeres etapes de la senescència floral (revisat per Tripathi i Tuteja, 2007). En el cas de les flors sensibles a l'etilè, l'efecte de l'ABA s'acostuma a vincular al rol principal de l'etilè en el control del procés. En un estudi amb clavells (sensibles a l'etilè) on el gineceu s'havia eliminat prèviament, es suggeria que l'efecte inductor de la senescència causat per l'ABA està mediat a través de la inducció de la biosíntesi d'etilè per part del gineceu, doncs la manca del gineceu prevenia tant la producció d'etilè com l'esperat marciment prematur dels pètals degut al tractament amb ABA exogen (Shibuya *et al.*, 2000).

Contràriament, pel que fa a les flors insensibles, és al propi ABA a qui se li atribueix el paper de controlador principal (Panavas *et al.*, 1998; Rubinstein, 2000; Zhou *et al.*, 2005; van Doorn, 2008; Shahri i Tahir, 2011). En flors d'*Hemerocallis* (insensibles a l'etilè) el tractament amb ABA accelera la senescència per inducció de la MCP, incrementant la taxa de peroxidació lipídica, la pèrdua d'integritat de membrana i les activitats proteïnasa i RNAsa (Panavas *et al.*, 1998). En flors de cacau tractades amb un inhibidor de la síntesi d'ABA es mostra una davallada del contingut en ABA i un retard del marciment dels pètals, que de forma natural va acompanyat per un increment en el contingut d'ABA (Aneja *et al.*, 1999). Aquest increment dels nivells d'ABA als pètals senescents també ha estat determinat en narcisos (insensibles a l'etilè), tot i que aquest és precedit per un increment previ de l'expressió de determinats SAGs i per tant l'ABA no es correspondria amb el factor inductor del procés de senescència (Hunter *et al.*, 2004). D'altra banda, la hipòtesi del rol regulador de l'ABA en senescència insensible a l'etilè continua rebent recolzament dels estudis més recents. Diversos gens induïbles per ABA

han estat detectats en pètals senescents d'*Iris*. Concretament, el gen *PP2C*, que codifica per una proteïna implicada en la via de transducció del senyal de l'ABA, ha estat detectat tant en pètals on la senescència ha estat induïda per ABA com en pètals de senescència natural (Zhong i Ciafré, 2011).

3.2 Estrès oxidatiu i senescència floral

L'estrès oxidatiu està implicat en el procés de senescència vegetal; les cèl·lules utilitzen l'oxigen per dur a terme l'activitat metabòlica i com a conseqüència d'aquesta es generen espècies molt reactives que poden malmetre les estructures cel·lulars. Per combatre aquesta producció normal de ROS durant el desenvolupament, la cèl·lula disposa d'una maquinària antioxidant que implica tant activitats enzimàtiques (catalases, peroxidases, etc.) com molècules no enzimàtiques (vitamina E, àcid ascòrbic, glutatió, etc.). Amb l'edat, però, el balanç entre les espècies reactives i l'activitat de la maquinària antioxidant es desplaça cap a l'estatus d'estrès, implicant un major dany oxidatiu observat en senescència. Malgrat això, pel que fa als pètals, encara no queda clar si l'augment de ROS és causa o conseqüència del procés de senescència (revisat per Rogers, 2012).

A més, l'estrès oxidatiu també està lligat a la regulació hormonal; en clavell s'ha descrit l'existència d'una correlació entre l'etilè i la capacitat antioxidant del pètal (Bartoli *et al.*, 1996) i en determinades orquídiades alguns dels canvis observats en l'inici de la senescència dels pètals poden ser retardats mitjançant l'aplicació d'auxines i/o l'ús d'inhibidors de l'acció de l'etilè (STS), demostrant l'existència d'un vincle entre etilè i ROS (revisat per Rogers, 2012). D'altra banda, la peroxidació lipídica conseqüència de l'acció de les ROS i l'activitat LOX generen hidroperòxids, a partir dels quals se'n poden formar aldehids ó compostos cetols i/o jasmonats, segons si s'opta per una via no enzimàtica o enzimàtica, respectivament (Fig. 6, revisat per Girotti, 1998; Howe, 2004).

El SA es considera un bon regulador de l'estrès oxidatiu, ja que indueix la producció de ROS per inhibició específica de l'activitat CAT (Chen *et al.*, 1993) i a més, a nivell d'expressió gènica, la seva acumulació en fulles d'*Arabidopsis* està relacionada amb l'homeòstasi de les ROS (Mène-Saffrané *et al.*, 2009).

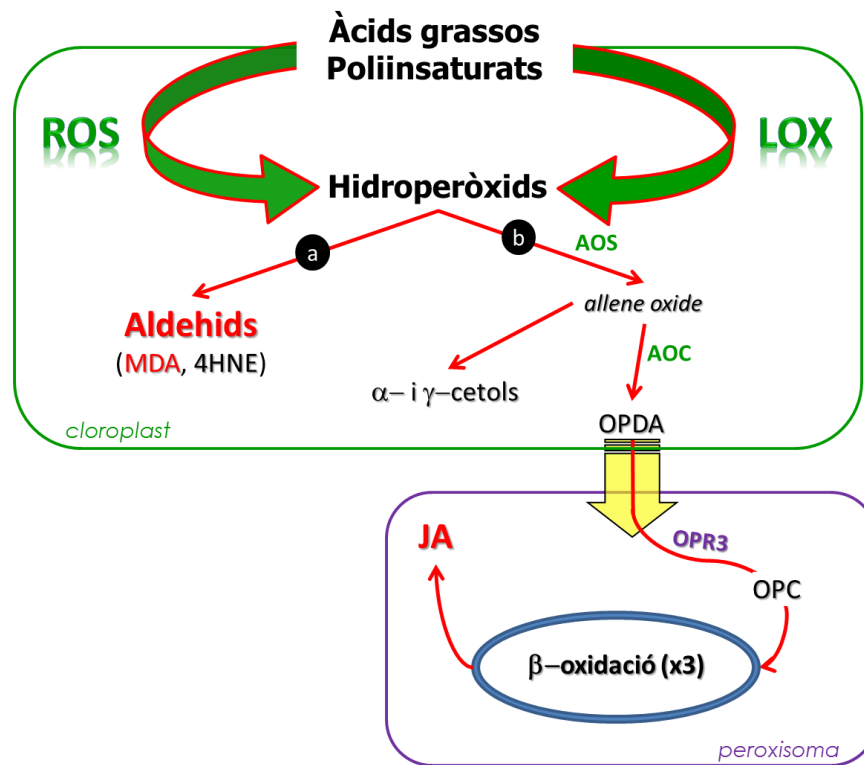


Fig. 6 Esquema representatiu de la generació de malondialdehid (MDA) i àcid jasmònic (JA) com a resultat de la peroxidació lipídica en plantes. Els àcids grassos poliinsaturats de la membrana tilacoïdal s'oxiden a hidroperòxids al reaccionar amb les espècies reactives de l'oxigen (ROS) generades a la planta o mitjançant l'enzim lipoxigenasa (LOX). Els hidroperòxids generats poden seguir per (a) la via no enzimàtica i transformar-se finalment en aldehids com l'MDA o (b) optar per la via enzimàtica, involucrant també el peroxisoma, per la formació del JA. 4HNE, 4-hidroxinonenal; AOS, allene oxide sintasa; AOC, allene oxide ciclasa; OPDA, àcid oxofitodienoic; OPC, àcid ciclopentanoic; OPR3, reductasa peroxisomal.

A més i a diferència de la regulació hormonal, tot i que els patrons de resposta de les maquinàries antioxidants de les flors amb senescència sensible i insensible a l'etilè poden variar, el dany ocasionat per l'estrès oxidatiu és comú en ambdós grups de flors (Bartoli *et al.*, 1997). Per tant, el coneixement dels processos oxidatius durant la senescència dels pètals, així com l'estudi de les molècules amb capacitat antioxidant, permetrà establir nous mecanismes de millora de la longevitat de la flor tallada. En flors, la producció i quantitat de ROS presents en les cèl·lules incrementa a

l'induir el procés de senescència dels pètals (revisat per Rubinstein, 2000; Rogers, 2012). En clavells i crisantems (ambdues sensibles a l'etilè, Bartoli *et al.*, 1996; 1997) i en flors d'*Hemerocallis* (insensibles, Panavas *et al.*, 1998; Chakrabarty *et al.*, 2009), la producció d' H_2O_2 augmenta amb l'envelliment del pètal.

Al crisantem, on el dany de membrana i la peroxidació lipídica estan involucrats en el procés de senescència dels pètals (Bartoli *et al.*, 1995), les activitats enzimàtiques SOD, CAT i glutatió reductasa també augmenten amb la senescència del pètal. A més, el tractament amb paraquat (potent oxidant) en pètals senescents provoca un increment en la producció de ROS que es tradueix en una acceleració de la pèrdua d'estabilitat de membrana, mentre que la maquinària antioxidant (tant els enzims com les molècules no enzimàtiques) no es veu alterada. D'altra banda, el tractament amb àcid ascòrbic (antioxidant) no resulta efectiu a l'hora de prevenir l'estrès oxidatiu, ja que mostra el mateix resultat que l'obtingut amb paraquat (Bartoli *et al.*, 1997). Per tant, la pèrdua d'eficàcia de la resposta antioxidant als pètals vells podria ser deguda bé a l'existència d'algun factor dependent de l'edat que disminueix amb la capacitat metabòlica o bé a que ambdós producció de ROS i disminució d'activitat antioxidant són induïts pel propi procés de senescència (Bartoli *et al.*, 1997). En comparació amb el crisantem, als pètals de clavell el tractament amb etilè provoca un major increment de la producció de ROS que alhora disminueix el contingut en antioxidants no enzimàtics (α -tocoferol i glutatió), efectes que poden ser revertits amb àcid aminooxiacètic (Bartoli *et al.*, 1996).

En el cas de les flors d'*Hemerocallis* s'ha descrit que la pèrdua de l'estabilitat de membrana (mesurada com l'alliberació d'electròlits) resulta inhibida en condicions d'hipòxia però sí que es veu incrementada pel tractament amb H_2O_2 exogen, suggerint la necessitat de la presència d'oxigen per poder incrementar la quantitat de ROS i poder així desestabilitzar la integritat de membrana. Alhora, la producció d' H_2O_2 endogen

disminueix amb el tractament de benzoat de sodi (antioxidant, Panavas i Rubinstein, 1998). En un altre estudi més recent on s'arribava a la mateixa conclusió, es suggeria que l'increment de la producció d' H_2O_2 observat en senescència contribueix a augmentar la taxa de peroxidació lipídica, reflectida alhora per la pèrdua d'integritat de membrana. D'altra banda, tot i que en l'inici de la senescència l'activitat de la maquinària antioxidant es veu reforçada per l'increment de les activitats enzimàtiques SOD, APX i CAT, l'enorme producció de ROS supera la capacitat antioxidant cel·lular provocant l'increment del deteriorament cel·lular observat (Chakrabarty *et al.*, 2009).

A part de l'acció oxidant dels propis ROS, la peroxidació lipídica també pot ser el resultat de l'activitat enzimàtica de la LOX (Fig. 6), que alhora pot contribuir a l'increment de la producció de radicals peroxil i perpetuar així la reacció en cadena (revisat per Rubinstein, 2000). El grau d'activitat LOX acostuma a veure's incrementat amb l'inici de la senescència floral, tot i que aquest pot variar depenent de les espècies (Peary i Prince, 1990). Així, en determinades espècies com el gladiol, el clavell (Peary i Prince, 1990), la rosa (Fukuchi-Mizutani *et al.*, 2000) o la flor de la planta de te (Liu i Han, 2010), l'activitat LOX resulta molt important per a la regulació de la senescència del pètal, mentre que en altres espècies com determinades orquídies (Porat *et al.*, 1995) o en *Alstroemeria* (Leverentz *et al.*, 2002) no sembla ser un factor de control rellevant per al progrés de la senescència floral.

En el cas de la maquinària antioxidant no enzimàtica, estudis anteriors mostren un augment del contingut en tocoferol (Bartoli *et al.*, 1996; 1997), que en determinats casos disminueix en els estadis finals del procés (Bartoli *et al.*, 1997). D'altra banda, d'entre les dues formes detectades en pètals, l' α -tocoferol mostra la major taxa d'acumulació, seguida pel γ -tocoferol (Puckhaber *et al.*, 2002; Ulusoy *et al.*, 2009). Pel que fa la resta d'òrgans florals, en carpels de flors de tabac s'hi ha descrit ambdues formes α - i

γ -tocoferol (Abbasi *et al.*, 2007), mentre que les aplicacions exògenes d' α -tocoferol semblen promoure el creixement del tub pol·línic en *Lilium* (Ozawa *et al.*, 1993) i per tant, també podria trobar-se en l'androceu.

Atès que les estratègies seguides per les espècies estudiades anteriorment (tant dels patrons d'oxidació com dels mecanismes antioxidants) són tan diferents i que no sembla haver una línia clara que es relacioni amb la regulació hormonal diferencial de les flors sensibles o insensibles a l'etilè, esdevé important caracteritzar per cada espècie els canvis associats a l'estrès oxidatiu per tal de poder dissenyar noves estratègies (i específiques per cada cas) que ens permetin millorar la longevitat floral de l'espècie que ens interessi.

3.3 Sucres i senescència floral

Tot i l'existència d'evidències experimentals que recolzen la hipòtesi en que l'excés de sucres indueix la senescència (Pourtau *et al.*, 2006), l'adició de sucres a les solucions de manteniment de la flor tallada generalment permeten allargar-ne la longevitat (revisat per Pun i Ichimura, 2003; van Doorn, 2004; van Doorn i Woltering, 2008). A més, en determinats casos com les flors de tulipa (insensible a l'etilè) sembla que la manca de sucres (i no l'estrès oxidatiu o la producció d'etilè) és el factor responsable de l'activació del procés de senescència dels pètals (Azad *et al.*, 2008).

D'altra banda i donada la seva capacitat de senyalització, els sucres també poden influir en l'acció en senescència floral d'altres reguladors endògens com les hormones o l'estrès oxidatiu. De tota manera, el mecanisme pel qual els sucres són capaços de retardar l'inici de la senescència floral romanen confusos i en ocasions poden variar depenent de l'espècie. Tot i que l'aportació extra de sacarosa permet allargar la longevitat floral del gladiol (Bravdo *et al.*, 1974), la capacitat supressiva del procés de mort cel·lular previ a la senescència dels pètals rau en un altre sucre; la trehalosa (Yamada *et al.*, 2003).

En flors sensibles a l'etilè, l'efecte beneficiós de l'aportació exògena de sucres ha estat atribuït a la seva capacitat per disminuir la sensibilitat dels pètals a l'etilè ó a la supressió de la biosíntesi de la pròpia hormona (revisat per Pun i Ichimura, 2003). De forma similar a la interacció entre les vies de senyalització dels sucres i les hormones en senescència (revisat per León i Sheen, 2003), en el cas particular de la senescència floral s'ha suggerit que l'efecte retardant de la senescència dels pètals observat en flors sensibles a l'etilè tractades amb sucres podria estar mediat per la propiciació d'una situació d'escassa producció d'ABA, que alhora resulta ser antagonista a la via de transducció del senyal de l'etilè (revisat per van Doorn, 2004). A més, recentment s'ha descrit una possible interacció entre el SA i els sucres; en flors de clavell (sensibles a l'etilè) tractades amb SA s'observa una millora de l'estabilitat de membrana i una disminució de l'estrès oxidatiu, efectes que alhora es veuen potenciat a l'afegir sucres en la solució del vas (Kazemi *et al.*, 2011). De forma similar, en les flors d'*Eustoma grandiflorum* (insensibles a l'etilè) el tractament combinat de SA i sucre permet allargar la longevitat floral gràcies als descensos de la taxa de peroxidació lipídica i l'activitat ACO i a l'increment de l'activitat dels enzims antioxidants (Kazemi i Shokri, 2011).

L'efecte dels sucres en el procés de senescència de les flors insensibles a l'etilè, però, encara roman obscur. S'ha suggerit que pot resultar del retard de la mort cel·lular (revisat per van Doorn, 2004) o de la seva condició d'osmelites (que alhora permet mantenir el potencial osmòtic) i en determinats casos d'inductors del tancament estomàtic (impedint així la pèrdua d'aigua per transpiració i contribuint així al manteniment del balanç hídric del pètal, revisat per Pun i Ichimura, 2003).

4. Importància econòmica del *Lilium* en el sector de la floricultura

En el sector comercial de la flor tallada la longevitat floral esdevé un dels factors més importants a tenir en compte a l'hora d'introduir noves varietats o espècies al mercat. A més, donat que els pètals són els òrgans florals més vistosos i els primers en deteriorar-se, l'inici de la seva senescència representa un factor limitant.

El *Lilium* és un gènere de plantes natiu de l'arxipèlag Ryukyu (Japó) de la família Liliaceae (monocotiledònies) que engloba més de 100 espècies bulboses, herbàcies i perennes, actualment distribuïdes per la majoria de zones temperades de l'hemisferi Nord (revisat per Benschop *et al.*, 2010). A Catalunya, trobem dues espècies autòctones; el marcòlic vermell (*L. martagon* L.) i el marcòlic groc (*L. pyrenaicum* G.) (revisat per Bolós *et al.*, 1993).

Generalment la seva comercialització és en forma de flor tallada, ja que les vares florals són prou fortes com per suportar les diferents flors de la inflorescència, i aquesta ocupa la quarta posició en la classificació de ventes de flor tallada a nivell mundial, després de les roses, crisantems i tulipes (Flower Council of Holland, 2007). D'altra banda, es disposa d'un enorme ventall de varietats de colors, fragàncies i formes gràcies a la possibilitat de realitzar encreuaments interespecífics. Depenent de les espècies utilitzades en els encreuaments realitzats per la generació de noves varietats, els *Lilium* es classifiquen en diferents grups. El primer grup d'híbrids generat fou el dels híbrids asiàtics, que comprèn varietats obtingudes a partir d'espècies natives d'Àsia. Seguidament va aparèixer el grup dels híbrids orientals, generat a partir d'encreuaments entre espècies natives de Japó (revisat per Benschop *et al.*, 2010). A més, els encreuaments entre espècies d'aquests dos grups amb l'espècie *L. longiflorum* ha generat l'aparició de nous grups coneguts amb els noms L.A. (*L. longiflorum* x asiàtics), L.O. (*L. longiflorum* x orientals) i O.T. (orientals x trompeta).

Per a la majoria d'espècies de *Lilium* la floració es dona a l'estiu, tot i que degut al seu interès comercial es poden produir durant tot l'any (en condicions mínimament controlades). D'altra banda, els requeriments per al seu cultiu, així com els tractaments post-collita que se'ls poden aplicar depenen del grup al que pertany la varietat amb la que es treballa. En el cas dels híbrids del grup L.A., els bulbs necessiten una temperatura de manteniment de -2°C per tal que la futura planta compleixi amb els paràmetres de qualitat requerits pel mercat, mentre que els orientals es mantenen a $1,5^{\circ}\text{C}$ (International Flower Bulb Centre).

Els paràmetres de qualitat de la flor tallada de *Lilium* no depenen únicament del color, la mida o nombre de les flors contingudes en la inflorescència (característiques que depenen del tipus de bulb a partir del qual es forma la planta) sinó que, donat la notable presència de les fulles en la vara floral, cal que el venedor tingui també en compte el bon estat del fullatge. En aquest sentit, l'ús de solucions de GAs (i citocinines) per prevenir la clorosi foliar està molt estès gràcies a l'existència del Promalin, un producte comercial (GA_{4+7} i BA a parts iguals) que a més, l'aplicació del qual també implica un augment de la longevitat floral del *Lilium*, incrementant així els beneficis del tractament (revisat per van Doorn i Han, 2011)

Les flors de *Lilium* han estat classificades dins del grup de les insensibles a l'etilè (Woltering i van Doorn, 1988; Elgar *et al.*, 1999; van Doorn, 2001; van der Meulen-Muisers *et al.*, 2001; Han i Miller, 2003; van Doorn i Han, 2011); el tractament amb etilè exogen no acostuma a accelerar la senescència dels tèpals (Woltering i van Doorn, 1988; Elgar *et al.*, 1999), tot i que pot promoure l'abscisió prematura dels botons florals i la inhibició de l'obertura floral en determinats casos (revisat per van Doorn i Han, 2011). D'altra banda, l'ús d'inhibidors de la biosíntesi d'etilè com l'STS o l'1-MCP pot tenir efectes positius sobre la longevitat floral del *Lilium* (Verdugo *et al.*, 2003), tot i que

l'efectivitat dels tractaments en aquest gènere és limitada i depèn del genotip (van der Meulen-Muisers *et al.*, 1999). Pel que fa a les fulles, també semblen tenir una senescència independent del control de l'etilè (Elgar *et al.*, 1999; Han i Miller, 2003), tot i que resulten ser molt sensibles al fred i a la presència de sucres en la solució del vas, que alhora semblen mantenir algun tipus de relació amb els efectes de l'etilè (revisat per van Doorn i Han, 2011).

La majoria d'estudis realitzats en flor tallada centren els seus esforços en l'allargament de la longevitat floral mitjançant tractaments amb fred o amb solucions aplicades en esprai o en l'aigua del vas que manté les vares. En el cas del *Lilium*, però, el pretractament amb fred (abans d'arribar a la floristeria) indueix clorosi foliar i l'abscisió floral i redueix la longevitat floral, efectes que poden ser pal·liats per l'aplicació de GAs (Ranwala i Miller, 2000; 2002; van Doorn i Han, 2011). D'altra banda, els efectes negatius del fred semblen mantenir una estreta relació amb la concentració de sucres present a la fulla. En un estudi realitzat amb el cv. 'Stargazer' es suggereix que la manca de sucres (deguda al previ magatzem en fred de les vares florals) és la responsable de l'aparició dels efectes negatius generats per l'emmagatzematge en fred (Ranwala i Miller, 2000). A més, el manteniment de les vares florals en solucions amb sucres millora la coloració dels tèpals de *Lilium*, però alhora també indueix l'aparició de la clorosi foliar (Han, 2003). Així, la concentració afegida al vas esdevé crítica, doncs depenent de la dosi es poden obtenir tant resultats beneficiosos com negatius (sobre la qualitat i longevitat de la flor tallada). En aquest sentit, encara no està clar si la manca o l'excés de carbohidrats representen factors d'inducció del procés de senescència foliar (revisat per van Doorn, 2008) ni en flors, on l'adició de sucres generalment n'allarga la longevitat però alhora el contingut endogen als pètals a l'inici de la senescència és força elevat (revisat per van Doorn, 2004).

El contingut en carbohidrats varia al llarg de la vida de la flor i resulta ser un factor limitant de la longevitat floral del *Lilium*, sobretot en els estadis inicials, on pot comprometre el desenvolupament dels botons florals. A més, el contingut de carbohidrats del tèpal disminueix a mida que aquest es va marcint (revisat per van Doorn i Han, 2011). En aquest sentit, les aplicacions de sucre a la solució del vas permeten restablir els nivells decadents de sucres i allargar així la longevitat floral, pel que el seu ús en solucions preservatives de la flor tallada és força comú. A nivell molecular, els sucres exògens retarden la degradació de proteïnes i l'expressió dels gens involucrats en la mobilització de nutrients (revisat per van Doorn, 2004). D'altra banda, els efectes de l'adició de sucres a la solució del vas no són sempre beneficiosos; en *Lilium* una aportació extra de sucre indueix l'aparició prematura de la clorosi foliar (Nowak i Mynett, 1985; Han, 2003; van Doorn i Han, 2011), tot i que com aquest efecte és contrarestat per l'aplicació d'una solució de GA₄₊₇ o del producte comercial Promalin (GA₄₊₇ + BA).

Pel que fa a l'estat redox dels pètals de *Lilium*, el pretractament amb fred (en conjunt amb la condició de foscor) també provoca un desajust inductor de la senescència floral. El manteniment de les vares florals en condicions de foscor i a baixes temperatures provoca una disminució gradual de l'enzim SOD i un augment significatiu de MDA, originat com a conseqüència de la peroxidació lipídica. A més, l'activitat dels enzims antioxidants de les fulles també disminueix com a conseqüència del pretractament amb fred (Ranwala i Miller, 2000). D'altra banda, el fred només indueix el procés, que alhora és inevitable. Per tant, l'estudi dels efectes i nivells dels reguladors endògens permet establir les bases fisiològiques del *Lilium* per tal d'utilitzar la informació disponible i millorar la qualitat de les vares florals que posteriorment es venguin al mercat.

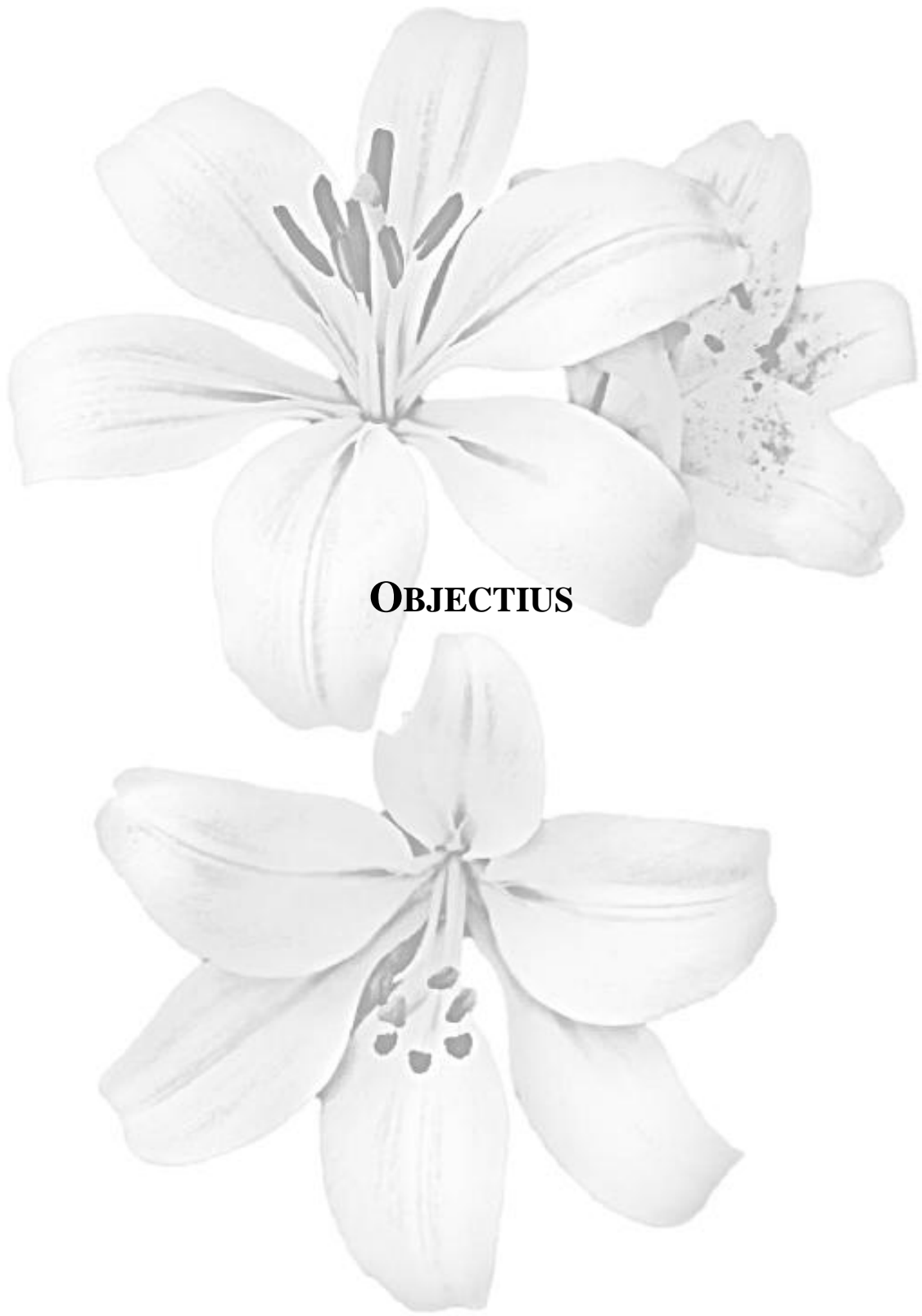
5. Aplicacions exògenes i millora de la qualitat de la flor tallada

L'ús d'aplicacions exògenes és potser una de les tècniques més antigues per determinar els efectes i caracteritzar els possibles factors involucrats en la regulació de la senescència floral, però alhora també representen una tècnica molt pràctica i senzilla per obtenir resultats ràpidament.

En el cas de les aplicacions hormonals, ja hem vist que l'ús de les GAs i les citocinines està tant estès al sector de la floricultura que fins i tot es disposa de solucions comercials (Promalin[®] a Europa i Fascination[®] a Amèrica) que només cal dissoldre i polvoritzar sobre les flors per obtenir un significatiu retard de la senescència floral i foliar. D'altra banda, l'avenç en el coneixement de les vies de regulació hormonal i l'actual tendència a voler aprofundir en l'estudi a nivell molecular han permès descriure molts dels receptors específics de les diferents hormones implicats en la senyalització hormonal. A més, això ha fet possible descriure molècules capaces d'unir-se a aquests receptors (específics per cada hormona), permetent alhora que estudis posteriors guanyin complexitat i determinació gràcies a la inducció o bloqueig de les vies de senyalització hormonal mitjançant aquests nous compostos agonistes i/o antagonistes. En el cas de les flors insensibles a l'etilè, el coneixement a nivell molecular de la regulació de la via de l'etilè no té massa pes, però la descripció d'altres vies, com ara la de la transducció del senyal de l'ABA, poden tenir importants repercussions en l'estudi de la senescència floral insensible a l'etilè. És el cas del Pyrabactin[®], una sulfonamida sintètica inicialment descrita com a agonista selectiva de l'ABA (Park *et al.*, 2009) gràcies a la qual s'han pogut identificar els receptors d'ABA, anomenats PYR/PYL/RCAR (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009) que més tard s'ha revelat que també pot mostrar l'efecte contrari (comportament antagònic) en determinats receptors (PYL2 i PYL4, Melcher *et al.*, 2010; Peterson *et al.*, 2010). L'ús del Pyrabactin, en cas que en la senescència floral del *Lilium*

aquest es comportés com a antagonista de l'ABA, podria revelar noves eines per allargar la longevitat floral en espècies insensibles a l'etilè.

Per contra, degut a l'elevat cost que suposa l'adquisició d'hormones, els possibles problemes relacionats amb la dosi aplicada i/o la manca d'efectivitat dels tractaments fan que la tendència global sigui a anar provant productes molt més econòmics que provoquin els mateixos efectes beneficiosos o inclús millors. L'exemple més conegut és el de l'adició de sucre a la solució del vas, que generalment permet incrementar un cert temps la longevitat floral (revisat per Halevy i Mayak, 1979; Pun i Ichimura, 2003; van Doorn i Woltering, 2008). Aquest efecte, alhora ha incentivat a molts autors a determinar el rol específic dels sucres en l'avenç de la senescència floral, trobant importants diferències entre els mecanismes seguits per les flors sensibles a l'etilè (com el clavell o la rosa) i les insensibles (com el *Lilium*, l'*Iris* o el gladiol) però on a totes l'aportació extra de sucres resulta beneficiosa (revisat per van Doorn i Woltering, 2008). D'altra banda, tot i l'evidència de l'existència de lligams entre les hormones, l'estrès oxidatiu i els sucres, els efectes dels sucres sobre la maquinària hormonal i oxidativa desenvolupats per la planta per tal de controlar i regular el progrés de la senescència no estan ben definits. Per tant, la determinació de les vies per les quals l'aportació extra de sucres és capaç de retardar el deteriorament dels pètals també ajudarà a esclarir els mecanismes de senescència floral.



OBJECTIUS

OBJECTIUS

Els objectius globals del present treball van estar orientats a la millora del coneixement del procés de senescència floral i de la qualitat de la flor tallada del *Lilium*, incloent en aquest últim aspecte la rellevància de la qualitat de les fulles de la vara floral.

Els objectius específics foren:

- Avaluar els canvis dels reguladors endògens més importants relacionats amb la senescència floral (hormones vegetals, estrès oxidatiu i sucres) en els diversos teixits florals al llarg del seu desenvolupament per tal de conèixer millor el procés.
- Avaluar els possibles rols i comportaments dels òrgans florals durant les diverses etapes del desenvolupament de la flor (pre-antesi i senescència).
- Comparar ambdós tipus de desenvolupament, natural (flor no tallada) i artificial (flor tallada), per tal de conèixer millor la fisiologia del desenvolupament floral i així poder millorar la longevitat de la flor tallada.
- Determinar l'efecte de les aplicacions exògenes hormonals sobre la senescència floral i foliar per tal de corroborar les activitats de diversos compostos en *Lilium* i provar de contribuir en les opcions disponibles a l'hora de millorar la qualitat de la flor tallada.



**INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESI SOBRE EL
FACTOR D'IMPACTE DELS ARTICLES PUBLICATS
I LA PARTICIPACIÓ DE LA DOCTORANDA**





Barcelona, 9 de maig de 2012

El Dr. Sergi Munné Bosch, com a director de la Tesi Doctoral titulada “**Senescència floral en *Lilium*: Importància dels reguladors endògens i efectes de les aplicacions exògenes**” presentada per la doctoranda Laia Arrom Mascasas,

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

Capítol 1. Article “**Hormonal changes during flower development in floral tissues of *Lilium***”, publicat a la revista *Planta*, índex d’impacte (2010) de 3.098. En aquest treball es descriu la importància dels canvis hormonal durant el desenvolupament floral en flors de *Lilium*, tant abans com després de l’antesi, amb un èmfasi especial en els processos de senescència floral. Cal destacar l’aproximació experimental original en que s’analitzen els nivells hormonal, no només dels tèpals, sinó també de l’androceu i el gineceu. A més, s’examinen els canvis hormonal que pateixen aquests òrgans florals en la flor tallada i el paper específic de l’àcid abscísic (ABA) i del Pyrabactin en la longevitat floral. La doctoranda ha realitzat tot el mostreig, les anàlisis de les mostres, el tractament estadístic i l’elaboració dels resultats, i a més ha participat en el disseny experimental i discussió dels resultats, constant per tant com a primera autora del treball. La doctoranda ha demostrat una gran capacitat de treball, així com un excel·lent maneig en els mostrejors i una excel·lent predisposició en la introducció a l’ús de l’HPLC-MS/MS per a les anàlisis d’hormones. La doctoranda demostra també una gran capacitat d’anàlisi i interpretació dels resultats.

Capítol 2. Article “**Tocopherol composition in flower organs of *Lilium* and its variations during natural and artificial senescence**”, publicat a la revista *Plant Science*, índex d’impacte (2010) de 2.481. En aquest treball s’avalua la composició i nivells de tocoferols durant el desenvolupament floral en flors de *Lilium*, tant abans com després de l’antesi, amb un èmfasi especial en els processos de senescència floral. En aquest cas s’analitzen també els nivells de tocoferols no només dels tèpals, sinó també de l’androceu i el gineceu. A més, s’examinen els nivells d’aquests antioxidants en diferents parts de l’androceu i com varien en els tèpals de flor tallada respecte al procés natural en la planta en relació a altres marcadors d’estrès oxidatiu. La doctoranda ha realitzat tot el mostreig, les anàlisis de les mostres, el tractament estadístic i l’elaboració dels resultats, i a més ha participat en el disseny experimental i discussió dels resultats, constant per tant com a primera autora del treball. La doctoranda ha demostrat una gran capacitat de treball, així com una excel·lent predisposició a la millora dels experiments realitzats completant un treball molt original. La doctoranda demostra també una gran capacitat d’anàlisi i interpretació dels resultats, així com un alt grau de maduresa.

Capítol 3. Article “**Sucrose accelerates flower opening and delays senescence through a hormonal effect in cut lily flowers**”, publicat a la revista *Plant Science*, índex d’impacte (2010) de 2.481. En aquest treball es descriu l’efecte de l’aplicació de sacarosa en la longevitat floral en *Lilium*, tant abans com després de l’antesi, amb un èmfasi especial en els processos de senescència floral. Cal destacar l’aproximació experimental, molt més aplicada que en els anteriors capítols, original i amb un alt valor científic, ja que es demostra per primera vegada en aquesta espècie que la sacarosa pot tenir un efecte positiu en el retràs de la senescència floral a través d’un efecte hormonal. I, el que és encara més important, amb un efecte diferencial en els diversos òrgans florals. La doctoranda ha realitzat tot el mostreig, les anàlisis de les mostres, el tractament estadístic i l’elaboració dels resultats, i a més ha participat en el disseny experimental i discussió dels resultats, constant per tant com a primera autora del treball. És en aquest treball on la doctoranda participa ja activament en la redacció de l’article. La doctoranda demostra una gran capacitat d’anàlisi i interpretació dels resultats.

Capítol 4. Article “**Hormonal regulation of leaf senescence in *Lilium***”, enviat a la revista *Journal of Plant Physiology*, índex d’impacte (2010) de 2.677. En aquest darrer treball es descriu la importància dels canvis hormonals durant la senescència foliar en vares florals de *Lilium*, un aspecte clau també en la qualitat de la flor en el mercat. En aquest treball es fa un excel·lent seguiment de la senescència foliar en plantes control i en plantes amb fulles tapades, en les quals s’indueix la senescència. S’examinen els canvis hormonals que pateixen les fulles observant-ne un paper específic de l’ABA en el control de la senescència en aquesta espècie. Per tal de confirmar els resultats es fan tractaments amb ABA i Pyrabactin i s’avaluen els seus efectes en la senescència foliar. És en les aplicacions de Pyrabactin on s’obtenen també resultats molt interessants tal i com passava en el capítol 1 en flors, però amb resultats sorprenentment diferents. La doctoranda ha realitzat tot el mostreig, les anàlisis de les mostres, el tractament estadístic i l’elaboració dels resultats, i a més ha participat en el disseny experimental i discussió dels resultats, constant per tant com a primera autora del treball. La doctoranda ha demostrat una gran capacitat de treball i ha participat també activament en la redacció de l’article. La doctoranda demostra un alt grau de maduresa científica.

I, per que així consti als efectes oportuns,

Dr. Sergi Munné Bosch



RESULTATS

CAPÍTOL 1:
VARIACIONS HORMONALS ALS TEIXITS FLORALS
DURANT EL DESENVOLUPAMENT FLORAL EN
LILIUM

CAPÍTOL 1

HORMONAL CHANGES DURING FLOWER DEVELOPMENT IN FLORAL TISSUES OF *LILIUM*

Laia Arrom · Sergi Munné-Bosch

*Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona,
Spain*

Planta,

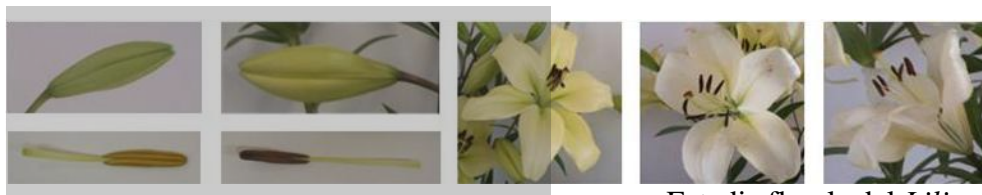
D.O.I. 10.1007/s00425-012-1615-0



Senescència Natural



Senescència Artificial



Estadis florals del *Lilium*

RESUM DEL CAPÍTOL 1

Degut a l'interès que desperta la senescència floral, molts són els esforços realitzats per tal de comprendre'n millor les senyals clau que en regulen el procés. Tot i que en diverses espècies l'etilè és un dels reguladors principals en el control de la senescència floral, les flors de *Lilium* mostren una baixa sensibilitat a aquesta hormona, permetent que la regulació del procés de senescència de la flor estigui modulada per altres hormones. En el present estudi es mostren les variacions (1) hormonals endògenes en diferents teixits florals (tèpals externs i interns, androceu i gineceu) al llarg del desenvolupament natural de la flor, (2) dels nivells endògens en antesi de les hormones dels diversos teixits en flors intactes i de la flor tallada, i (3) de la longevitat floral degudes al tractament en esprai amb àcid abscísic i Pyrabactin[®]. Els resultats mostren un comportament hormonal diferencial entre els diferents teixits florals analitzats durant el desenvolupament floral. Els nivells de citocinines i auxines augmentaven majoritàriament als tèpals abans de l'obertura floral, després de la qual els disminuïen durant la senescència. Per contra, els nivells d'àcid abscísic incrementaven amb el progrés de la senescència, però només als tèpals externs i al gineceu i durant els últims estadis. A més, la flor tallada en antesi mostrava diferències respecte les flors intactes en el mateix estadi en els nivells d'àcid abscísic i auxines dels tèpals externs, d'àcid salicílic als tèpals interns, de citocinines, gibberel·lines i àcid jasmònic de l'androceu i d'àcid abscísic i àcid salicílic del gineceu, demostrant així una clara resposta diferencial entre els teixits florals. A més, l'aplicació en esprai de la combinació d'àcid abscísic i Pyrabactin[®] accelerava les darreres etapes de la senescència dels tèpals, tot i que només quan la senescència era retardada amb Promalin[®]. Es conclou que (1) els teixits florals responen diferencialment en les seves variacions hormonals endògenes al llarg del desenvolupament floral, (2) les flors

tallades mostren dràstics canvis en l'equilibri hormonal no només als tèpals externs i interns sinó també a l'androceu i el gineceu i, (3) l'àcid abscísic podria estar accelerant la progressió de la senescència dels tèpals en *Lilium*.

Hormonal changes during flower development in floral tissues of *Lilium*

L. Arrom · S. Munné-Bosch

Received: 11 October 2011 / Accepted: 7 February 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract Much effort has been focussed on better understanding the key signals that modulate floral senescence. Although ethylene is one of the most important regulators of floral senescence in several species, *Lilium* flowers show low sensitivity to ethylene; thus their senescence may be regulated by other hormones. In this study we have examined how (1) endogenous levels of hormones in various floral tissues (outer and inner tepals, androecium and gynoecium) vary throughout flower development, (2) endogenous levels of hormones in such tissues change in cut versus intact flowers at anthesis, and (3) spray applications of abscisic acid and pyrabactin alter flower longevity. Results show that floral tissues behave differently in their hormonal changes during flower development. Cytokinin and auxin levels mostly increased in tepals prior to anthesis and decreased later during senescence. In contrast, levels of abscisic acid increased during senescence, but only in outer tepals and the gynoecium, and during the latest stages. In addition, cut flowers at anthesis differed from intact flowers in the levels of abscisic acid and auxins in outer tepals, salicylic acid in inner tepals, cytokinins, gibberellins and jasmonic acid in the androecium, and abscisic acid and salicylic acid in the gynoecium, thus showing a clear differential response between floral tissues. Furthermore, spray applications of abscisic acid and pyrabactin in combination accelerated the latest stages of tepal

senescence, yet only when flower senescence was delayed with Promalin. It is concluded that (1) floral tissues differentially respond in their endogenous variations of hormones during flower development, (2) cut flowers have drastic changes in the hormonal balance not only of outer and inner tepals but also of androecium and gynoecium, and (3) abscisic acid may accelerate the progression of tepal senescence in *Lilium*.

Keywords Abscisic acid · Cytokinins · Floral tissues · Flower senescence · Hormones · *Lilium*

Abbreviations

ABA	Abscisic acid
GA ₄	Gibberellin 4
IAA	Indole-3-acetic acid
JA	Jasmonic acid
PYR	Pyrabactin
SA	Salicylic acid
Z	Zeatin
ZR	Zeatin riboside

Introduction

Senescence is the final stage of development and involves the degenerative changes that lead flowers to death. Given its importance in the commercial floriculture, where it obviously is an unwanted, but also inevitable process, numerous efforts have been focussed on studying the regulation of floral senescence by hormones, sugars, and other possible senescence factors to delay it (Stead 1992; Wagstaff et al. 2005; Rogers 2006; Price et al. 2008; van Doorn and Woltering 2008). While in most flowers

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00425-012-1615-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

L. Arrom · S. Munné-Bosch (✉)
Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia,
Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal, 645,
08028 Barcelona, Spain
e-mail: smunne@ub.edu

ethylene has been shown to be a master regulator of petal senescence, there is a small group of flowers with low sensitivity to ethylene (also called ethylene-insensitive flowers) that also undergo senescence. Plants of the genus *Lilium* are within this latter group (Woltering and van Doorn 1988; Elgar et al. 1999; Burchi et al. 2005; van Doorn and Han 2011), and despite being one of the flowers most sold worldwide, hormonal regulation of flower senescence in this species remains largely unknown.

Beyond the regulation of floral senescence by ethylene, little is known about the role of other hormones both in ethylene-sensitive and insensitive flowers. In ethylene-sensitive flowers cytokinins delay, while auxins accelerate petal senescence. Cytokinins delay petal senescence in petunias by reducing ethylene sensitivity (Chang et al. 2003), while auxins appear to accelerate withering in orchid petals due to a stimulation of ethylene production (O'Neill 1997). On the other hand, in ethylene-insensitive flowers, cytokinins and abscisic acid (ABA) appear to be the most important regulators in the initiation of senescence in petals of several species (Panavas et al. 1998; Hunter et al. 2004; reviewed in Rubinstein 2000; Zhou et al. 2005; van Doorn and Woltering 2008). As in the regulation of leaf senescence, cytokinins inhibit the progression of flower senescence while ABA has the opposite effect. Unfortunately, to our knowledge, there is no available information on the hormonal changes in various floral tissues (aside from petals) during flower development, neither in ethylene-sensitive nor in ethylene-insensitive flowers.

Lilium flowers and their individual flower tissues, mainly the gynoecium, produce ethylene, but ethylene production mainly occurs during the initial development stages (Burchi et al. 2005). In addition, ethylene inhibitors do not always increase their vase life, and the effect of other treatments varies with cultivars. Therefore, although ethylene may be involved in the regulation of flower development and senescence processes, it may not play a primary role (Burchi et al. 2005). Furthermore, *Lilium* flowers used in the present study are sterile, so the effects of pollination on the regulation of floral senescence, which have been described for other species (Stead 1992; Woltering et al. 1993), may not apply here. In the

present study, we hypothesized that (1) other hormones, such as cytokinins, auxins, gibberellins, ABA, jasmonic acid (JA) or salicylic acid (SA) may be involved in the regulation of flower development in *Lilium*, and (2) a different hormonal regulation of this process may occur in various floral tissues, including not only outer and inner tepals, but also the androecium and gynoecium. With this aim we examined the endogenous contents of the cytokinins, zeatin (Z) and zeatin riboside (ZR), indole-3-acetic acid (IAA), gibberellin 4 (GA₄), ABA, JA, and SA in floral tissues at six stages of development. In addition, (3) we evaluated the endogenous variations in the levels of hormones in such floral tissues at anthesis in cut flowers. Since ABA levels increased in outer tepals of cut flowers, we hypothesized that (4) ABA could be involved in the acceleration of tepal senescence in cut flowers. To test this hypothesis, we evaluated to what extent flower longevity was altered in cut flowers with and without an application of ABA and pyrabactin (PYR). PYR is a synthetic sulfonamide that was initially described to mimic ABA, but unlike ABA, it activates only a few of the 14 ABA receptors (Nishimura et al. 2009) and acts as an antagonist of some of the ABA receptors (Melcher et al. 2010). However, to our knowledge the effects of PYR on flower longevity have not been explored thus far.

Materials and methods

Plant material, conditions of study, and treatments

Lilies (*Lilium* L.) belonging to the monocot family Liliaceae have flowers with six tepals divided into two whorls (thus allowing us to differentiate between outer and inner tepals), six stamens (forming the whole androecium), and a gynoecium with three fused carpels and a superior ovary (Judd et al. 2008). There are many commercial varieties of *Lilium*, depending on the flower shape, color, size, or fragrance. The variety used in this study, called 'Courier', belongs to the group "L.A." (*L. longiflorum* × Asiatic Hybrid) and has smooth green or white tepals, depending on the developmental stage (Fig. 1).



Fig. 1 Flower developmental stages in *Lilium*. In chronological order; *stage I* (closed flower, with green tepals), *stage II* (flower still closed but less compacted, with fully mature and brown stamens),

stage III (open flower, anthesis stage), *stage IV* (completely white, hydrated tepals), *stage V* (dehydrated tepals, just before tepal abscission) and *stage VI* (naked gynoecium)

Plant material for experiments 1 and 2 was obtained as follows. Bulbs of *Lilium* L.A. 'Courier' (purchased from Mapifloricultura S.L., Madrid, Spain) were directly transferred to the soil (Calcic Luvisol, FAO classification) in a plastic-made greenhouse at the experimental fields of the Faculty of Biology of the University of Barcelona, on 25 November 2008. Plants were grown with a planting density of 45 bulbs m^{-2} and watered with tap water once a week until flowers were obtained for the experiments, which started on 27 March 2009. Plant material for experiment 3 was purchased from a local market.

For the study of natural flower development (intact flowers, experiment 1), the four floral tissues of *Lilium* flowers (outer tepals, inner tepals, androecium and gynoecium) were sampled from flowers found at six developmental stages, which are depicted in Fig. 1. Different developmental stages were arbitrarily defined according to Arrom and Munné-Bosch (2010), as follows: stage I, closed flower bud, green tepals and immature androecium; stage II, closed flower bud with green tepals and brown stamens; stage III, flower at anthesis, with greenish tepals and pollen still contained inside the anthers; stage IV, white, completely hydrated tepals, and pollen already out from anthers; stage V, dehydrated tepals, just before abscission occurs; and stage VI, naked gynoecium (Fig. 1). Samples were taken during 27 March 2009 (stage I), 1 April 2009 (stages II and III) and 8 April 2009 (stages IV, V and VI) from flowers from plants grown in the plastic-made greenhouse, which were exposed to constant climatic conditions, with relative humidity, air temperature, and photon flux density between 50 and 65%, 9–12°C and below 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively. Sampling was always performed between 08:30 and 09:30 a.m. (UTC/GMT + 1). Temperature and relative humidity were monitored by means of a portable thermohygrometer model EB313HGN (Oregon Scientific Ibérica S.A., Alcobendas, Spain), whereas photon flux density was registered with a portable Quantum sensor (Walz, Effeltrich, Germany). Sampling was carried out by cutting the stems, dividing flowers according to their developmental stage and separating (and immediately freezing in liquid nitrogen) floral tissues (outer tepals, inner tepals, androecium and gynoecium) thereby obtaining the four floral tissues at different stages of flower development. Floral tissues from different flowers at the same developmental stage of at least four randomly selected stems were combined for each analysis. Within each stem, flowers were always selected for their development stage irrespective of position on the stem or other criteria. In addition, flower longevity was estimated by monitoring daily the stage of development at which all flowers from four stems were found, counting the days elapsed between developmental stages.

For studies of hormonal changes in cut flowers (experiment 2), stems were collected on 27 March 2009,

when most of the flower buds were at stage I and at least one of them was at stage II. Then, leaves at 15 cm from the base of the stems were removed to minimize the appearance of pathogens, and stems were placed in several vases of 1.3 L capacity with distilled water, which was replenished every 4–5 days. The treatment involved four vases and each vase contained four stems with at least three flowers per stem. All cut flowers were exposed to constant climatic conditions, with a relative humidity of 50%, air temperature of 20°C, and photon flux density below 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Floral longevity was estimated by a daily monitoring of each flower placed in the vases, counting the days elapsed to reach the different developmental stages (I–VI), as it was done for intact flowers. Sampling for biochemical analysis in all cut flowers was performed at anthesis taking the four floral tissues (outer tepals, inner tepals, androecium and gynoecium) as described before.

For experiments 1 and 2, floral tissues (outer tepals, inner tepals, androecium and gynoecium) separated from flowers were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C for phytohormone analyses. At least 50 mg of sample was used for each biochemical analysis.

For studies of spray applications of ABA and PYR (experiment 3), stems were obtained from the local market on 14 July 2011 and immediately exposed to the corresponding hormonal treatment. The following day, stems were placed into various vases of 1.3 L capacity and maintained as described for experiment 2. All treatments started at the same time, with most of the flower buds from each stem were at stage II. Treatments consisted of a single spray application of 15 mL of each solution directly on the flower buds. The spray applications of ABA and PYR were compared with a control with distilled water and a positive control with Promalin® (Kenogard, Barcelona, Spain). Promalin is a commercial product made of a mixture of cytokinins and gibberellins that is effective in delaying flower senescence (Ranwala and Miller 1998). Apart from these four treatments (ABA, PYR, Promalin and control), their combinations were also tested, which resulted in a total of eight treatments: control, Promalin, ABA, PYR, Promalin + ABA, Promalin + PYR, ABA + PYR, and Promalin + ABA + PYR. Promalin was prepared so that the sprayed solution contained 100 mg/L of benzyl adenine and GA_{4+7} , as recommended by the manufacturer. ABA and PYR were sprayed at a concentration of 5×10^{-5} M. All treatments contained 0.1% (v/v) Tween-20 as a surfactant and 0.5% of dimethylsulfoxide (used to dissolve ABA and PYR), including both controls. Flower longevity was estimated by a daily monitoring of all flowers from six stems placed in three vases, counting the days lapsed to reach the different developmental stages (I–VI), as it was done for previous experiments.

Phytohormone analyses

Levels of the phytohormones, Z, ZR, IAA, ABA, GA₄, SA, and JA were determined by HPLC–MS/MS as described previously (Abreu and Munné-Bosch 2009).

Statistical analyses

Differences between treatments were evaluated using the analysis of variance (ANOVA), using the Duncan's post

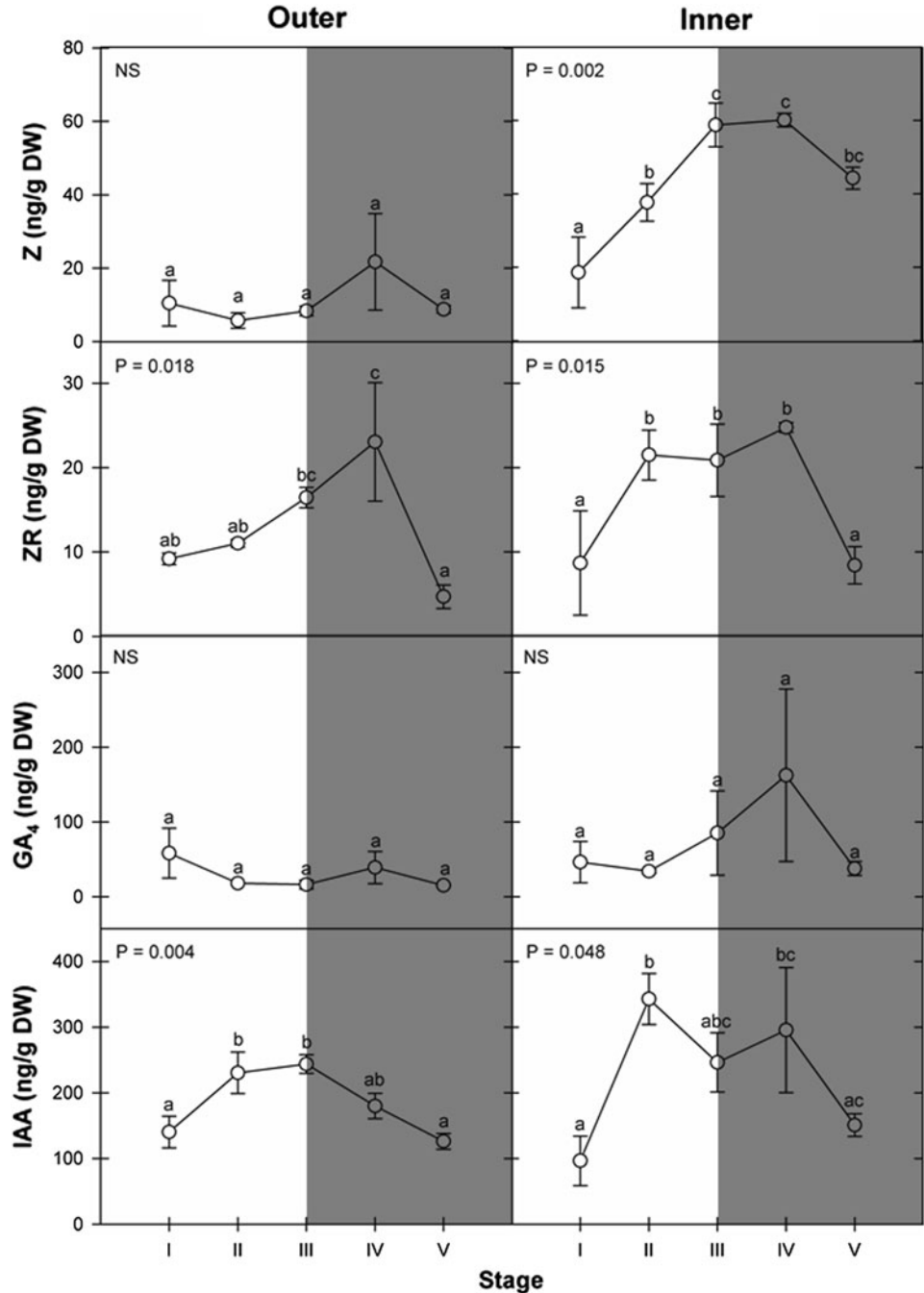
hoc test, or Student's *t* tests, and were considered significant at a probability level of $P < 0.05$.

Results

Endogenous variations of hormones during flower development in several floral tissues

Floral tissues did behave differently from each other in the hormonal changes during flower development. In outer

Fig. 2 Endogenous contents of zeatin (Z), zeatin riboside (ZR), gibberellin 4 (GA₄), and indole-3-acetic acid (IAA) in *outer* and *inner* tepals of *Lilium* flowers at different stages of development. The two-colour division of the graph corresponds to the stages of pre- (*white*) and post-anthesis (*grey*). Data correspond to the mean ± SE, of $n = 4$. Results of statistics are shown in the inlets (ANOVA, $P < 0.05$) and *letters* indicate significant differences between stages (Duncan's test, $P < 0.05$). *NS* not significant. For details of flower developmental stages, see Fig. 1



tepals, Z levels were unaltered during flower development, while ZR levels increased from stage I to IV, to decrease later by 80% from stage IV to V. Similarly, GA₄ contents remained unchanged, while IAA levels increased by 74% from stage I to anthesis to decrease later by 48% during senescence in outer tepals (Fig. 2). ABA levels fell steadily up to 75% from stage I to IV in this tissue, while they increased 2.4-fold from stage IV to V (Fig. 3). JA levels decreased by 88% from stage I to II in outer tepals to keep unaltered later on. SA levels increased 3.5- and 1.7-fold from stage II to anthesis and from stage IV to V, respectively, in outer tepals (Fig. 3).

Z and ZR levels increased 3.2- and 2.4-fold, respectively, from stage I to III in inner tepals. ZR levels decreased by 66% between stages IV and V in this tissue, similarly to what occurred during senescence in outer tepals. While GA₄ levels kept unaltered throughout flower development in inner tepals, IAA levels increased 2.6-fold from stage I to anthesis (Fig. 2). In contrast to outer tepals, ABA levels increased 6.6-fold from stage I to II in inner

tepals to recover initial values at anthesis and to keep then constant during senescence (stages III–V). JA levels did not significantly vary throughout flower development, except for a 48% decrease between stages IV and V. SA contents increased by 17- and 1.5-fold from stage I to anthesis and between stages IV and V, respectively, in inner tepals (Fig. 3).

In the gynoecium, Z levels gradually decreased up to 62% from stage I to VI, while ZR contents decreased by 83%, but only after anthesis. GA₄ levels decreased in this organ by 97% from stage I to anthesis, to keep constant afterwards. On the other hand, IAA levels decreased by 61% from stage I to anthesis (Fig. 4). ABA contents decreased from stage I to anthesis by 87% and then kept constant until tepal abscission (between stages V and VI), when levels recovered to initial values. JA levels decreased by 98% between stages I and II, but then remained constant until stage VI. SA contents increased 2.1-fold from stage III to V, to decrease by 50% afterwards (Fig. 5).

Fig. 3 Endogenous contents of abscisic acid (ABA), jasmonic acid (JA), and salicylic acid (SA) in outer and inner tepals of *Lilium* flowers at different stages of development. The two-colour division of the graph corresponds to the stages of pre- (white) or post-anthesis (grey). Data correspond to the mean ± SE, of n = 4. Results of statistics are shown in the inlets (ANOVA, P < 0.05) and letters indicate significant differences between stages (Duncan's test, P < 0.05). For details of flower developmental stages, see Fig. 1

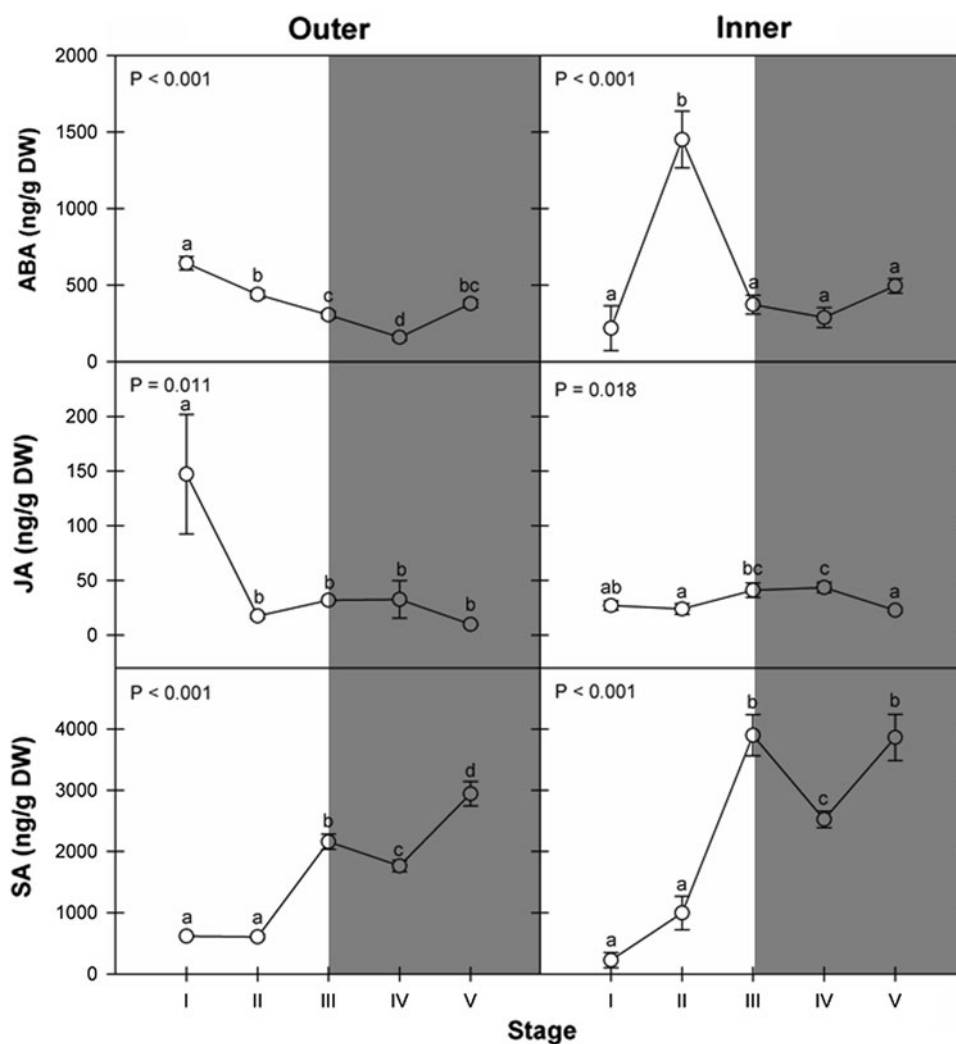
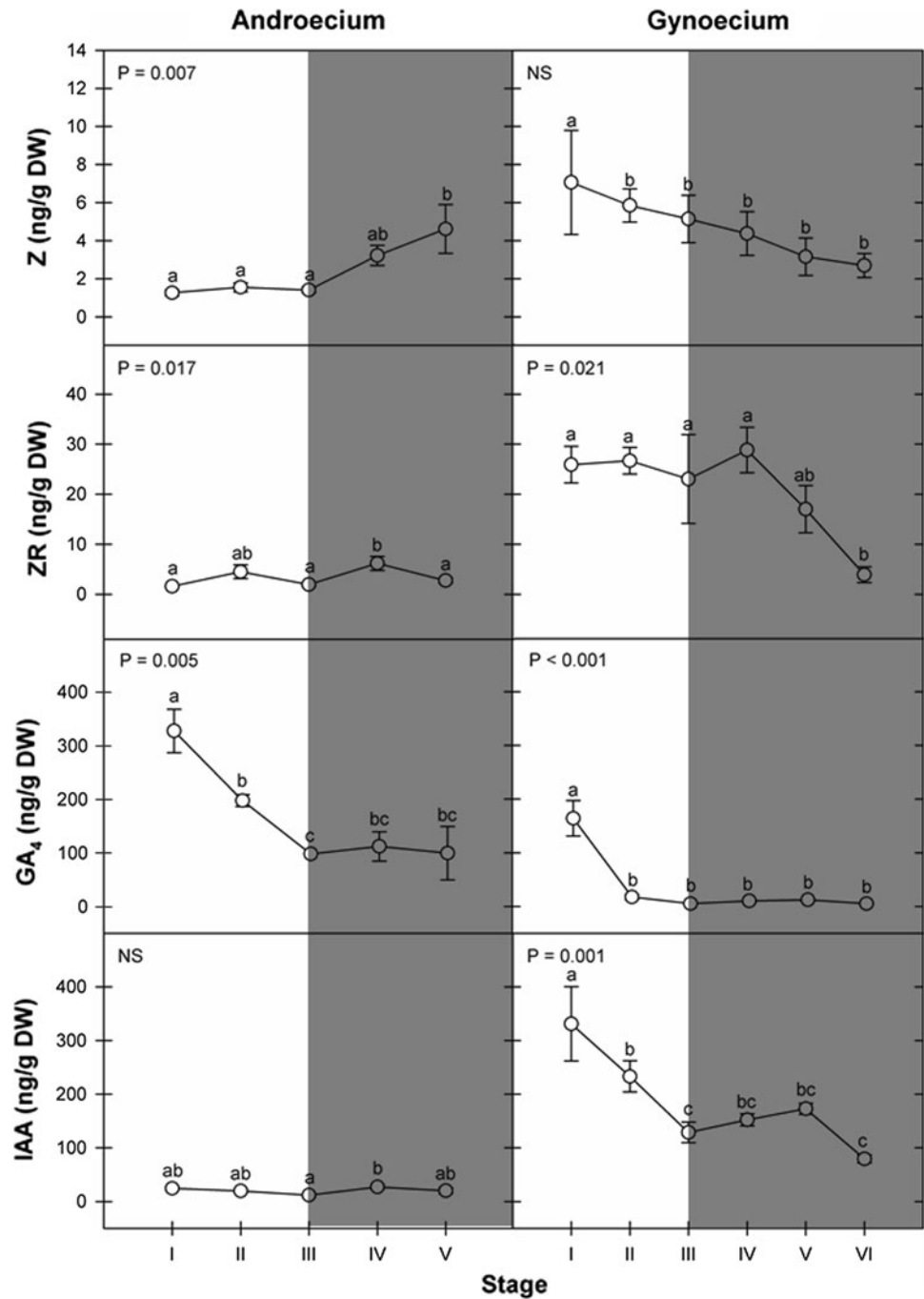


Fig. 4 Endogenous contents of zeatin (Z), zeatin riboside (ZR), gibberellin 4 (GA_4), and indole-3-acetic acid (IAA) in the *androecium* and *gynoecium* of *Lilium* flowers at different stages of development. The two-colour divisions of the graph corresponds to the stages of pre- (white) or post-anthesis (grey). Data correspond to the mean \pm SE, of $n = 4$. Results of statistics are shown in the inlets (ANOVA, $P < 0.05$) and letters indicate significant differences between stages (Duncan's test, $P < 0.05$). NS not significant. For details of flower developmental stages, see Fig. 1



In the androecium, cytokinins and auxin contents kept constant throughout flower development, except for Z levels, which increased by 3.3-fold from anthesis to stage V. As observed in the gynoecium, GA_4 levels decreased by 70% from stage I to anthesis and kept constant afterwards (Fig. 4). ABA and JA levels decreased by 81% and 98%, respectively, from stage I to anthesis, to remain constant later until stage V. SA contents also increased 12.1-fold after anthesis (Fig. 5).

Effects of stem cutting on flower longevity and hormone levels in several floral tissues

Estimation of floral longevity revealed that compared with natural development (intact flowers), cut flowers showed a reduction of total longevity by 7.7 days. This reduction in flower longevity was due to a shortening of 7.0 days from stage III to VI, hence indicating an acceleration of the senescence process (Fig. 6). Cut flowers showed a

Fig. 5 Endogenous contents of abscisic acid (ABA), jasmonic acid (JA) and salicylic acid (SA) in the *androecium* and *gynoecium* of *Lilium* flowers at different stages of development. The two-colour division of the graph corresponds to the stages of pre- (white) or post-anthesis (grey). Data correspond to the mean \pm SE, of $n = 4$. Results of statistics are shown in the inlets (ANOVA, $P < 0.05$) and letters indicate significant differences between stages (Duncan's test, $P < 0.05$). For details of flower developmental stages, see Fig. 1

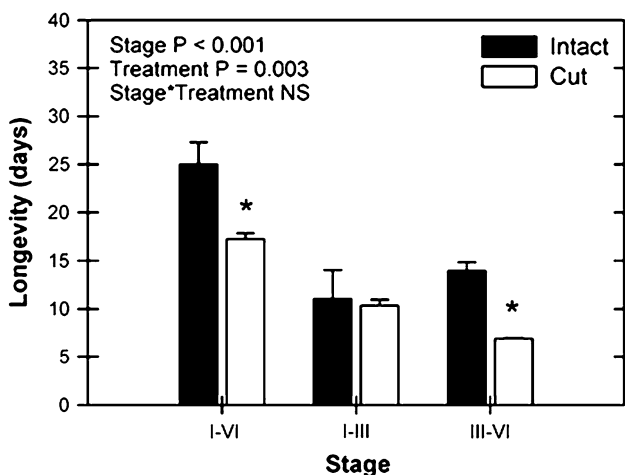
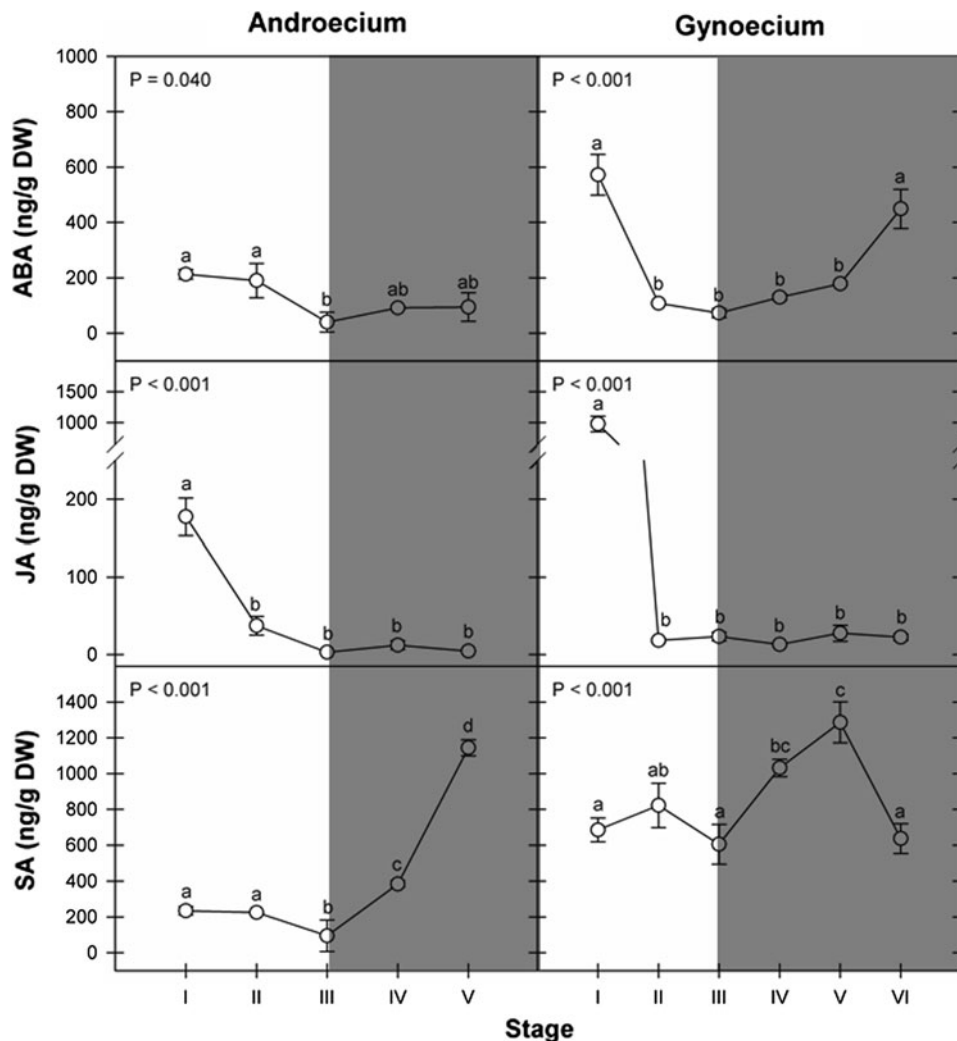


Fig. 6 Flower longevity in intact and cut *Lilium* flowers. Data correspond to the mean \pm SE, of $n = 4$. Results of statistics are shown in the inlets (ANOVA, $P < 0.05$) and asterisks indicate significant differences between treatments (Student's *t* test, $P < 0.05$). For details about flower developmental stages, see Fig. 1. NS not significant

reduction of the time needed to reach stages IV, V, and VI (from the preceding stage) by 5.0, 2.7, and 4.2 days, respectively, while the days required to reach stages II and III (from the preceding stage) kept unaltered (Fig. 7). In other words, cut flowers reached anthesis in the same time as intact flowers, but showed an accelerated senescence (from stage III to V but particularly between III and IV) and tepal abscission (between V and VI).

Compared with intact flowers, cut flowers showed significant alterations in the hormonal balance of several flower tissues at anthesis, including (1) increases of IAA and ABA contents by 2.6- and 2.2-fold, respectively, in outer tepals, (2) a decrease of SA levels by 71% in inner tepals, (3) increases of Z, ZR, and JA contents by 2.8-, 1.8- and 2.4-fold, respectively, in the androecium, accompanied by a sharp decline by 98% in GA₄ contents, and (4) increases of IAA, ABA, and SA contents by 3.5, 3.1, and 2.9-fold, respectively, in the gynoecium (Figs. 8, 9).

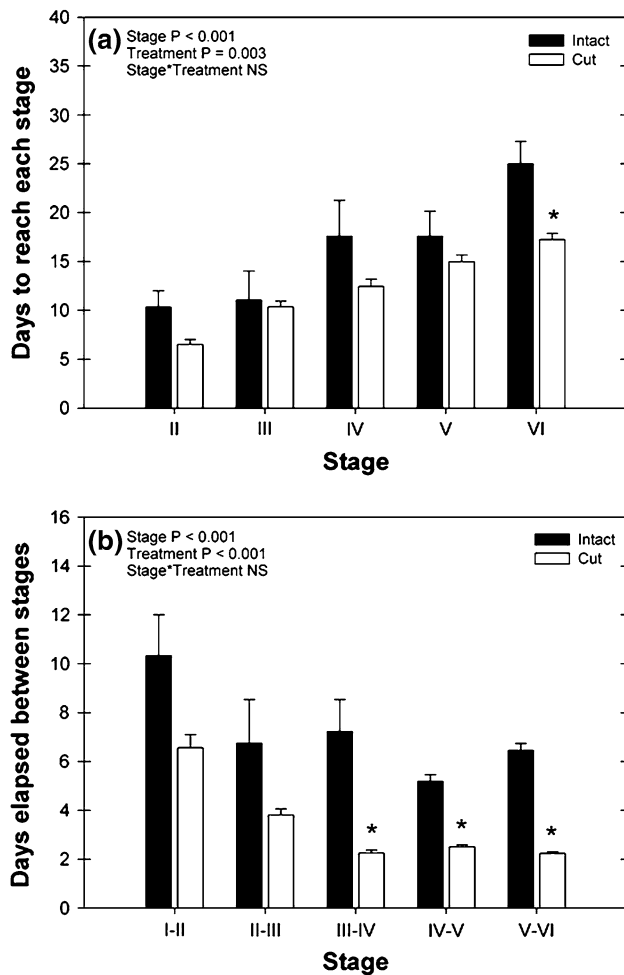


Fig. 7 Details of days elapsed between stage I and different developmental stages (a) and between different developmental stages one by one (b) in intact and cut *Lilium* flowers. Data correspond to the mean \pm SE, of $n = 4$. Results of statistics are shown in the inlets (ANOVA, $P < 0.05$) and asterisks indicate significant differences between treatments (Student's t test, $P < 0.05$). NS not significant. For details of flower developmental stages, see Fig. 1

Effects of ABA and PYR on flower longevity

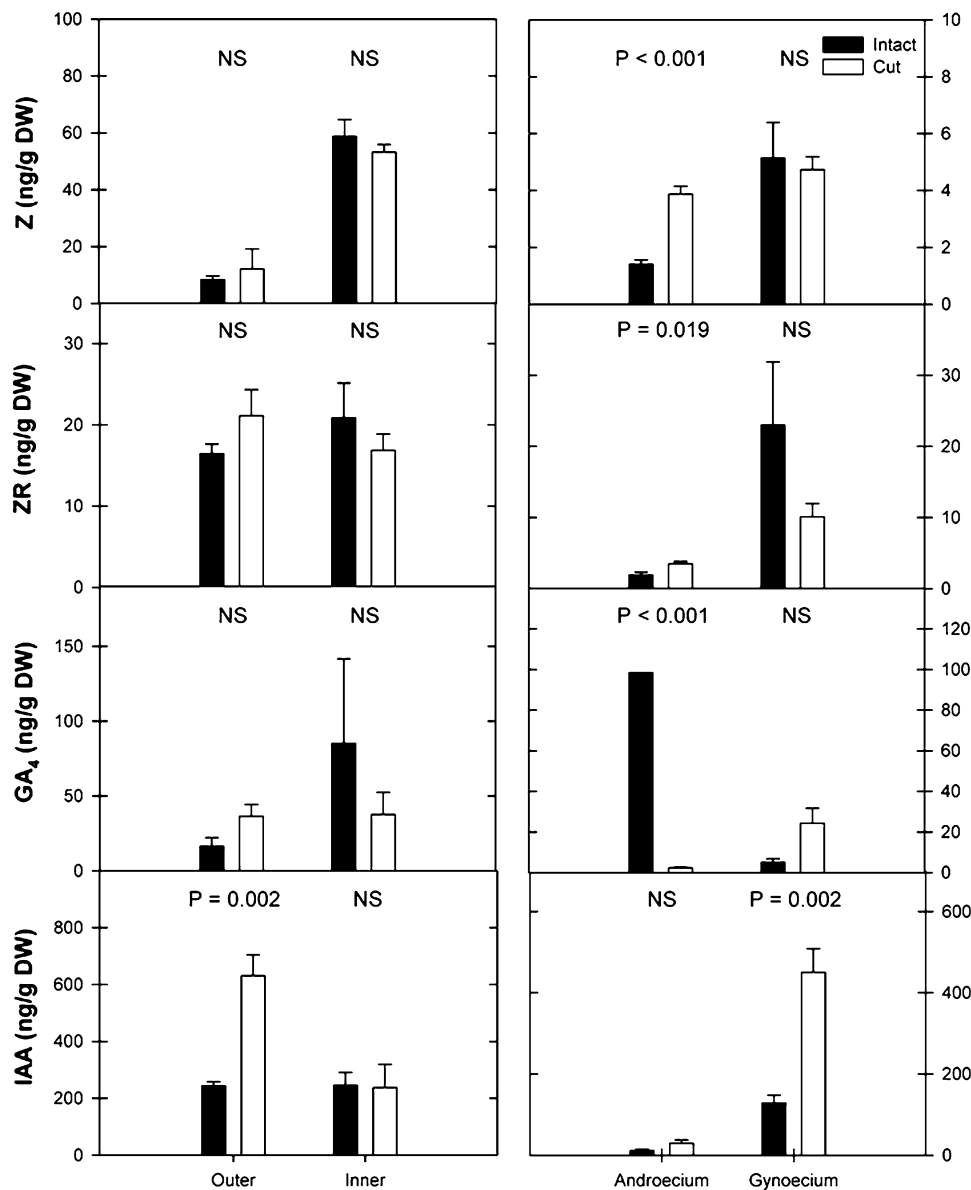
The effects of spray applications of ABA and PYR on flower longevity were compared with a control with distilled water and a positive control with Promalin. Furthermore, combinations of these treatments were also evaluated, which resulted in a total of eight treatments depicted in Suppl. Figs 1 and 2. Spray applications of ABA or PYR alone or in combination had no significant effect on flower longevity, either in total flower longevity, or in floral opening or senescence. However, when ABA and PYR were applied in combination with Promalin, flower longevity was reduced compared with Promalin alone, with a specific effect on tepal abscission, that is, between stages V and VI (Figs. 10, 11).

Discussion

It is well known that phytohormones are involved in the regulation of flower senescence, but their specific activities can vary depending on the species. For the regulation of flower senescence in ethylene-sensitive species, the most important regulator is ethylene and the rest of the hormones act as promoters or inhibitors of its production or activity. However, in ethylene-insensitive species or species with low sensitivity to ethylene, such as lilies, other hormones than ethylene may play a primary role (Burchi et al. 2005; van Doorn and Woltering 2008). Cytokinins and ABA have been proposed as the signals triggering senescence in ethylene-insensitive flowers (Reid and Chen 2007; van Doorn and Woltering 2008). Cytokinins delay leaf senescence and there is evidence that this hormone can delay petal senescence in ethylene-insensitive *Iris* flowers (van der Kop et al. 2003). The role of ABA in petal senescence is considered to be just the opposite. In daylily (*Hemerocallis*, ethylene-insensitive) petals, endogenous ABA content increases as senescence progresses; however, the rise in ABA contents occurs later than the start of senescence-associated gene (SAG) expression, thus suggesting ABA is not triggering the process (Panavas et al. 1998). Auxin has also been shown to be involved in the regulation of flower senescence, but its role seems to vary depending on the plant species. Exogenous auxin delays petal senescence in daylilies (Rubinstein 2000), while it accelerates perianth senescence in several orchid genera (ethylene-sensitive flowers) (O'Neill 1997). In the present study, we show that contents of cytokinins and auxin decrease, while ABA and SA levels increase in tepals during the progression of natural flower senescence (intact flowers), thus confirming that cytokinins and auxin may act as inhibitors, and ABA and SA as promoters of the senescence process in ethylene-insensitive flowers, such as lilies. However, we show here for the first time that outer and inner tepals behave differently in the variations of the hormonal levels during flower development and that the androecium and the gynoecium respond also differently from each other and from tepals in both, pre- and post-anthesis.

The complexity and programming of flower senescence forces us to consider all possible cross-talk relationships between plant regulators, reflecting a network of signals that work together to satisfy the plant's needs at each developmental stage (time) and in each floral organ (space). Results shown here reflect this point. After flower opening, ZR decreased in both outer and inner tepals during senescence (stages III–V), while IAA did also decrease during this period but only in outer tepals. SA increased between stages IV and V in both outer and inner tepals, while ABA contents increased in outer tepals only. The most important differences were, however, observed

Fig. 8 Endogenous contents of zeatin (Z), zeatin riboside (ZR), gibberellin 4 (GA_4), and indole-3-acetic acid (IAA) in floral tissues (outer and inner tepals, androecium and gynoecium) of intact and cut *Lilium* flowers at anthesis. Data correspond to the mean \pm SE, of $n = 4$. Results of statistics are shown in the inlets (ANOVA, $P < 0.05$). NS not significant. For details on flower developmental stages, see Fig. 1



between tepals and reproductive organs, the response in the androecium and gynoecium differing also to each other. In androecium and gynoecium a sharp increase of SA was observed between anthesis and stage V and not only between stages IV and V, as observed in both outer and inner tepals. In addition, Z contents increased from stage III to V in the androecium, while its contents were not altered in the gynoecium during this period. Instead, the gynoecium also showed decreases in ZR from stage III to V. After tepal abscission (between stages V and VI), SA decreased while ABA increased in the gynoecium. It appears therefore that significant metabolic changes occur during flower senescence in the androecium, probably mediated by endogenous accumulation of zeatin, which may increase the “sink” capacity of organs (Gan and Amasino 1995; Zaffari et al. 1998; Haberer and Kieber

2002; Werner et al. 2003). The accumulation of SA does not appear to be a tissue-specific effect, since the gynoecium showed similar increases during the same developmental stages and both, outer and inner tepals, also showed an increase in the levels of this compound between stages IV and V. It is likely that the SA accumulation in all floral tissues reflects a protective role against pathogens, since senescence processes are known to increase sensitivity to biotic stresses (Valdivia et al. 2006). It is known that SA promotes senescence processes (Morris et al. 2000; Buchanan-Wollaston et al. 2005), particularly during latest stages inducing cell death (García-Heredia et al. 2008). Therefore, it seems likely that SA accumulation promotes cell death in several flower organs, since SA levels increased to the highest level at the latest stages of development in tepals and androecium, while SA levels

Fig. 9 Endogenous contents of abscisic acid (ABA), jasmonic acid (JA) and salicylic acid (SA) in floral tissues (outer and inner tepals, androecium and gynoecium) of intact and cut *Lilium* flowers at anthesis. Data correspond to the mean \pm SE, of $n = 4$. Results of statistics are shown in the inlets (ANOVA, $P < 0.05$). NS not significant

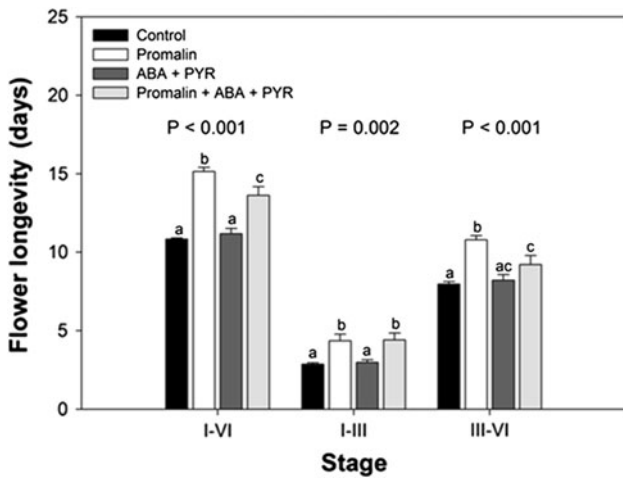
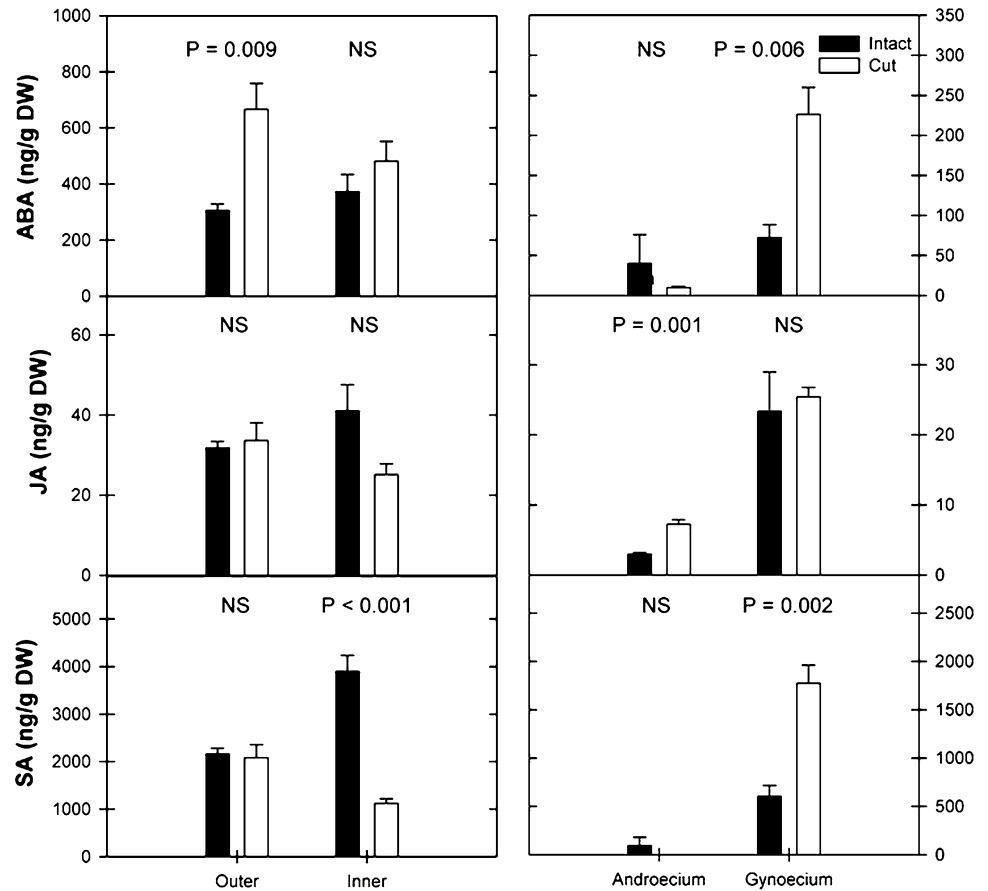


Fig. 10 Flower longevity in cut *Lilium* flowers treated with a combination of abscisic acid (ABA) and pyrabactin (PYR) either with or without Promalin and the respective controls. Data correspond to the mean \pm SE, of $n = 6$. Results of statistics are shown in the inlets (ANOVA, $P < 0.05$) and letters indicate significant differences between treatments (Duncan's test, $P < 0.05$). For details about flower developmental stages, see Fig. 1

decreased in the gynoecium from stage V to VI, when tepal abscission occurred and the only organ remaining in the flower was the gynoecium.

Cutting the inflorescence stems reduced total longevity by 7.7 days. Cut flowers reached anthesis in the same time as intact flowers, but showed an accelerated progression of senescence between stages III and IV and an accelerated tepal abscission. Cut flowers at anthesis differed from intact flowers in the levels of ABA and auxins in outer tepals, SA in inner tepals, cytokinins, gibberellins and JA in the androecium, and ABA and SA in the gynoecium, thus showing a clear differential response between floral tissues, as summarized in Fig. 12. Although ABA levels increased in outer tepals of cut flowers, spray applications of ABA did not accelerate tepal senescence in cut flowers. In contrast, spray applications of ABA and PYR in combination accelerated the final stages of tepal senescence, but only when flowers were treated with Promalin. In the U.S., Promalin (which contains GA_{4+7} plus BA) is a legally approved product (marketed as Fascination, Valent USA, Walnut Creek, CA, USA) for quality improvement of many floricultural crops including lilies, used to enhance flower longevity (Ranwala and Miller 1998, 2005). Promalin was used here as a positive control. On the other hand, PYR is a synthetic sulfonamide that was initially described to mimic ABA, but unlike ABA, it activates only a few of the 14 ABA receptors (Nishimura et al. 2009). PYR has been shown to act as an antagonist of some of the

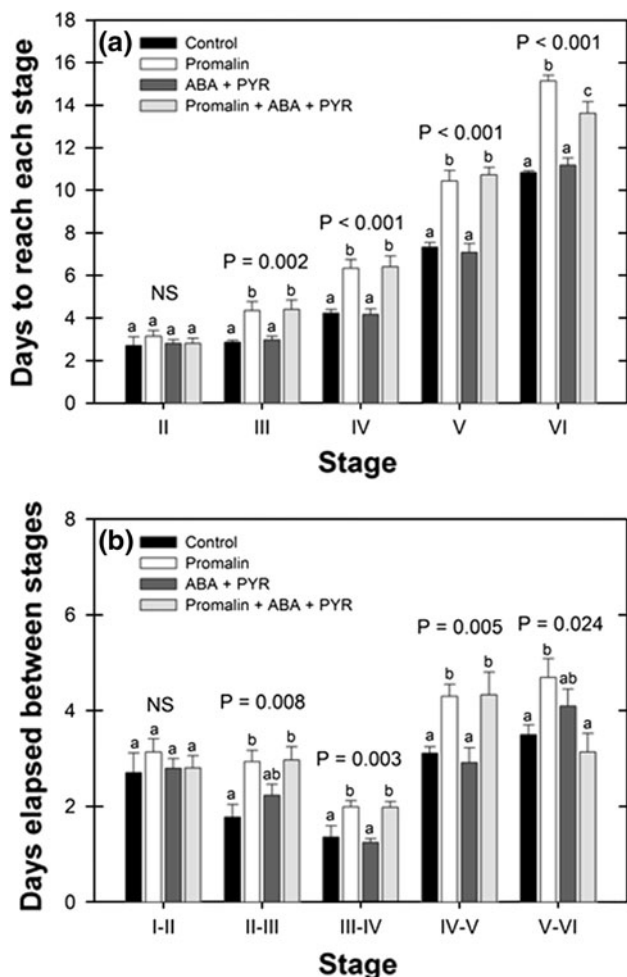


Fig. 11 Details of days elapsed between stage I and different developmental stages (a) and between different developmental stages one by one (b) in cut *Lilium* flowers treated with a combination of abscisic acid (ABA) and pyrabactin (PYR) either with or without Promalin and the respective controls. Data correspond to the mean \pm SE, of $n = 6$. Results of statistics are shown in the inlets (ANOVA, $P < 0.05$) and letters indicate significant differences between treatments (Duncan's test, $P < 0.05$). NS not significant. For details about flower developmental stages, see Fig. 1

ABA receptors (Melcher et al. 2010). Here, it is demonstrated for the first time that PYR may exert an effect on flower longevity, but only when applied in combination with ABA and in flowers additionally treated with Promalin. It appears therefore that PYR and ABA show a synergistic effect reducing flower longevity, but this effect is only observed in flowers with a long lifespan, as those treated with Promalin. It should be noted that cut flowers used for the hormone application experiment were obtained from the local market. Thus, the possibility cannot be excluded that they were already treated to increase their lifespan. Our results suggest that in flowers with a longer lifespan, as those treated with Promalin, the effects of the combination of PYR and ABA are always more visible

	Outer	Inner	Androecium	Gynoecium
Z				
ZR				
GA ₄				
IAA				
ABA				
JA				
SA				

Fig. 12 Summary of the hormonal changes occurring at anthesis in several floral tissues of cut flowers after stem cutting. Any significant increase in a given hormone in cut compared with uncut flowers in a given floral tissue is depicted in green color, while significant decreases are shown in red

than in flowers with a shorter lifespan. It will be important in future studies to test as to how various concentrations of ABA and PYR affect flower longevity and how such applications alter the endogenous levels of hormones in floral tissues. It is also interesting to note that PYR and ABA had synergistic effect on the latest stage of flower development only in tepal abscission, while endogenous ABA levels in outer tepals increased at stage V compared with stage IV, thus suggesting a direct or indirect role of ABA in this process.

It is concluded that (1) floral tissues show a differential response in the endogenous variations of hormones during flower development, (2) not only do cut flowers experience changes in the hormonal balance of both outer and inner tepals, but also the androecium and gynoecium, and (3) ABA may accelerate the progression of tepal senescence in *Lilium*. Further research is needed to better understand the perception and signaling components involved in the response of senescing tepals to ABA and PYR and the mechanisms underlying the differential hormonal response in several floral tissues during flower development in *Lilium* and other ethylene-insensitive flowers.

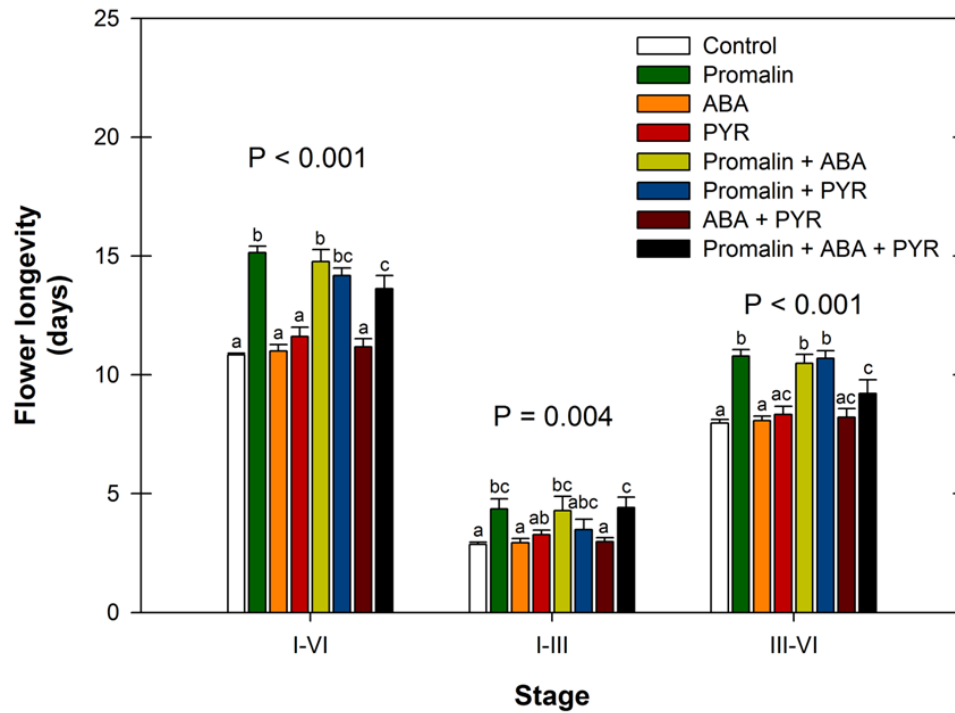
Acknowledgments We are very grateful to the Serveis Científico-Tècnics and Serveis dels Camps Experimentals (Universitat de Barcelona) for technical assistance. Support for the research was received through the prize ICREA Academia given to S.M.-B., funded by the Generalitat de Catalunya.

References

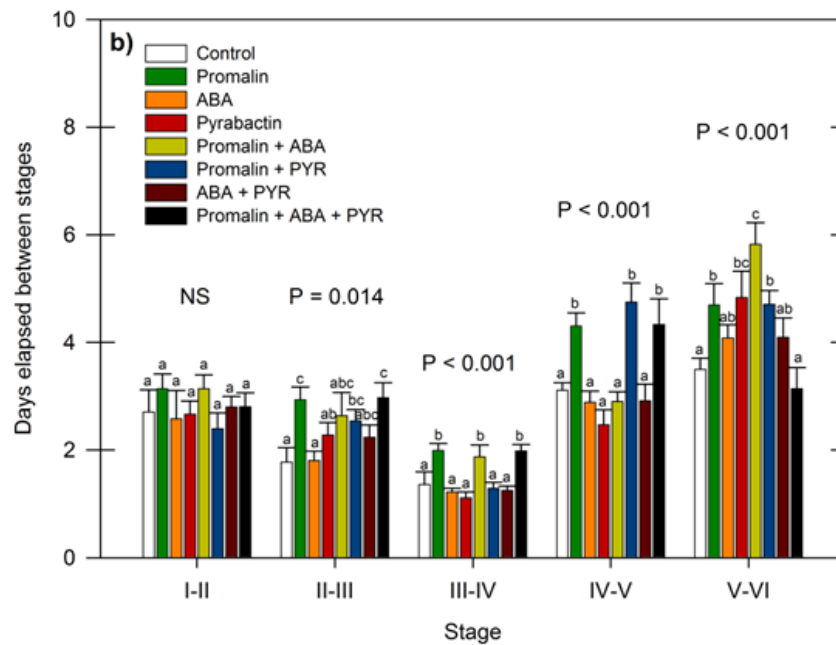
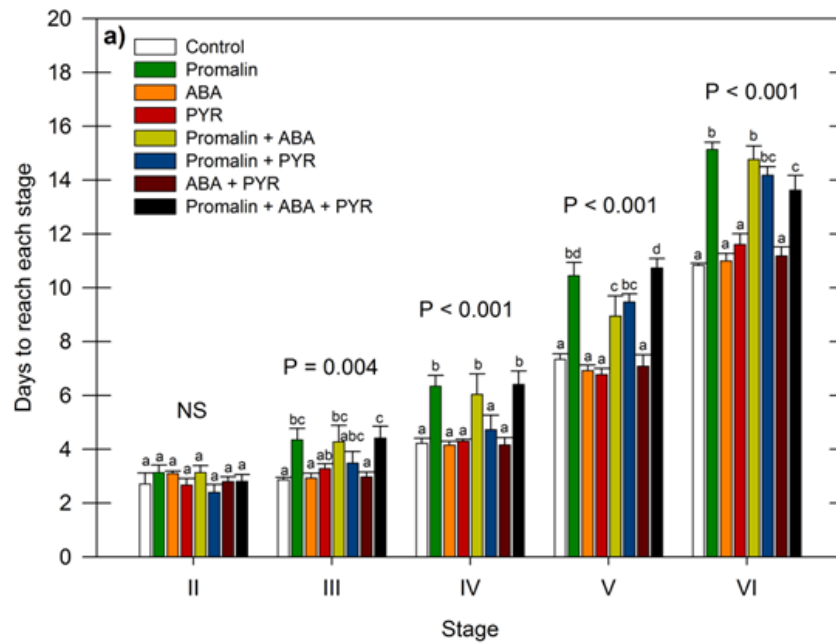
Abreu ME, Munné-Bosch S (2009) Salicylic acid deficiency in *NahG* transgenic lines and *sid2* mutants increases seed yield in the annual plant *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 60:1261–1271
 Arrom L, Munné-Bosch S (2010) Tocopherol composition in flower organs of *Lilium* and its variations during natural and artificial senescence. *Plant Sci* 179:289–295

- Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, Breeze E, Lim PO, Nam HG, Lin JF, Wu SH, Swidzinski J, Ishizaki K, Leaver CJ (2005) Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J* 42:567–585
- Burchi G, Nesi B, Grassotti A, Mensuali-Sodi A, Ferranti A (2005) Longevity, ethylene production during development stages of two cultivars of *Lilium* flowers ageing on plant or in vase. *Acta Hort* 682:813–820
- Chang H, Jones ML, Banowitz GM, Clark DG (2003) Overproduction of cytokinins in *Petunia* flowers transformed with PSAG12-IPT delays corolla senescence, decreases sensitivity to ethylene. *Plant Physiol* 132:2174–2183
- Elgar HG, Woolf AB, Bielecki RL (1999) Ethylene production by three lily species, their response. *Postharvest Biol Technol* 16:257–267
- Gan S, Amasino RM (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* 270:1986–1988
- García-Heredia JM, Hervás M, De la Rosa MA, Navarro JÁ (2008) Acetylsalicylic acid induces programmed cell death in *Arabidopsis* cell cultures. *Planta* 228:89–97
- Haberer G, Kieber JJ (2002) Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. *Plant Physiol* 128:345–362
- Hunter DA, Ferrante A, Vernieri P, Reid MS (2004) Role of abscisic acid in perianth senescence of daffodil. *Physiol Plant* 121:313–321
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ (2008) *Plant systematics: a phylogenetic approach*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA
- Melcher K, Xu Y, Ng LM, Zhou XE, Soon FF, Chinnusamy V, Suino-Powell KM, Kovach A, Tham FS, Cutler SR, Li J, Yong EL, Zhu JK, Xu HE (2010) Identification and mechanism of ABA receptor antagonism. *Nat Struct Mol Biol* 17:1102–1108
- Morris K, Mackerness SAH, Page T, John CF, Murphy AM, Carr JP, Buchanan-Wollaston V (2000) Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *Plant J* 23:677–685
- Nishimura N, Hitomi K, Arvai AS, Rambo RP, Hitomi C, Cutler SR, Schroeder JI, Getzoff ED (2009) Structural mechanism of abscisic acid binding and signaling by dimeric PYR1. *Science* 326:1373–1379
- O'Neill SD (1997) Pollination regulation of flower development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:547–574
- Panavas T, Walker EL, Rubinstein B (1998) Possible involvement of abscisic acid in senescence of daylily petals. *J Exp Bot* 49:1987–1997
- Price AM, Orellana DFA, Salleh FM, Stevens R, Acock R, Buchanan-Wollaston V, Stead AD, Rogers HJ (2008) A comparison of leaf, petal senescence in wallflowers (*Erysimum linifolium*) reveals common, distinct patterns of gene expression, physiology. *Plant Physiol* 147:1898–1912
- Ranwala AP, Miller WB (1998) Gibberellin₄₊₇, benzyladenine, and supplemental light improve postharvest leaf and flower quality of cold-stored 'Star Gazer' hybrid lilies. *J Am Soc Hortic Sci* 123:563–568
- Ranwala AP, Miller WB (2005) Effects of cold storage on postharvest leaf and flower quality of potted Oriental-Asiatic- and LA-hybrid lily cultivars. *Sci Hortic* 105:383–392
- Reid MS, Chen JC (2007) Flower senescence. In: Gan S (ed) *Senescence processes in plants*, vol 26. Blackwell, Oxford
- Rogers HJ (2006) Programmed cell death in floral organs: how, why do flowers die? *Ann Bot* 97:309–315
- Rubinstein B (2000) Regulation of cell death in flower petals. *Plant Mol Biol* 44:303–318
- Stead AD (1992) Pollination-induced cell death in flower senescence: a review. *Plant Growth Regul* 11:13–20
- Valdivia ER, Cosgrove DJ, Stephenson AG (2006) Role of accelerated style senescence in pathogen defense. *Am J Bot* 93:1725–1729
- van der Kop DAM, Ruys G, Dees D, van der Schoot C, de Boer AD, van Doorn WG (2003) Expression of defender against apoptotic death (DAD-1) in *Iris* and *Dianthus* petals. *Physiol Plant* 117:256–263
- van Doorn WG, Han SS (2011) Postharvest quality of cut lily flowers. *Postharvest Biol Technol* 62:1–6
- van Doorn WG, Woltering EJ (2008) Physiology and molecular biology of petal senescence. *J Exp Bot* 58:453–480
- Wagstaff C, Chanasut U, Harren FJM, Laarhoven L-J, Thomas B, Rogers HJ, Stead AD (2005) Ethylene, flower longevity in *Alstroemeria*: relationship between tepal senescence, abscission, ethylene biosynthesis. *J Exp Bot* 56:1007–1016
- Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, Van Onckelen H, Schmülling T (2003) Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot, root meristem activity. *Plant Cell* 15:2532–2550
- Woltering EJ, van Doorn WG (1988) Role of ethylene in senescence of petals—morphological, taxonomical relationships. *J Exp Bot* 39:1605–1616
- Woltering EJ, van Hout M, Somhorst D, Harren F (1993) Roles of pollination and short-chain saturated fatty acids in flower senescence. *Plant Growth Regul* 12:1–10
- Zaffari GR, Peres LEP, Kerbauy GB (1998) Endogenous levels of cytokinins, indoleacetic acid, abscisic acid, pigments in variegated somaclones of micropropagated banana leaves. *J Plant Growth Regul* 17:59–61
- Zhou Y, Wang CH, Ge H, Hoerberichs FA, Visser PB (2005) Programmed cell death in relation to petal senescence in ornamental plants. *Acta Bot Sin* 47:641–650

Supplementary data



Suppl. Fig. 1 Flower longevity in *Lilium* cut flowers exposed to all spray applications of hormonal treatments used in the study. Data correspond to the mean \pm SE of $n=6$. Results of statistics are shown in the inlets (ANOVA, $P < 0,05$) and letters indicate significant differences between stages (Duncan's Test, $P < 0,05$). For details of flower developmental stages, see Fig. 1



Suppl. Fig. 2 Detail of days elapsed between stage I and different developmental stages (a) and between different developmental stages one by one (b) in *Lilium* cut flowers exposed to all spray applications of hormonal treatments used in the study. Data correspond to the mean \pm SE of $n=6$. Results of statistics are shown in the inlets (ANOVA, $P<0,05$) and letters indicate significant differences between stages (Duncan's Test, $P<0,05$). NS, not significant. For details of flower developmental stages, see Fig. 1

CAPÍTOL 2:

**DISTRIBUCIÓ I VARIACIONS DE TOCOFEROL ALS
ÒRGANS FLORALS DE *LILIUM* DURANT LA
SENESCÈNCIA NATURAL I ARTIFICIAL**

CAPÍTOL 2

TOCOPHEROL COMPOSITION IN FLOWER ORGANS OF *LILIUM* AND ITS VARIATIONS DURING NATURAL AND ARTIFICIAL SENESCENCE

Laia Arrom · Sergi Munné-Bosch

*Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona,
Spain*

Plant Science, 179: 289-295



Òrgans florals de *Lilium*, vist des de la lupa

RESUM DEL CAPÍTOL 2

Tot i que tant la biosíntesi com la funció dels tocoferols (vitamina E) han estat àmpliament estudiades en les fulles i les llavors, la seva distribució en altres òrgans i teixits vegetals és encara poc coneguda. Amb la intenció de comprendre millor l'ocurrència i les possibles funcions dels tocoferols en flors es van mesurar les concentracions dels quatre homòlegs de tocoferol en els diferents òrgans florals de *Lilium* (incloent el gineceu, l'androceu, i els tèpals interns i externs) i se'n van avaluar les variacions durant la senescència dels tèpals de la flor tallada (senescència artificial) en comparació amb els controls (senescència natural). Els resultats van mostrar que les flors acumulen quantitats significatives d' α -tocoferol, mentre que el γ -tocoferol és també present però a concentració molt menor. Els majors nivells de tocoferols es van observar en l'androceu, que alhora mostrava una acumulació específica en el pol·len, mentre que al gineceu els tocoferols no hi eren presents. Tant els tèpals interns com els externs també contenien quantitats significatives d'ambdues formes α - i γ -tocoferol, els nivells de les quals augmentaven durant la senescència. L' α -tocoferol augmentava en ambdós tèpals externs i interns abans i fins a un major nivell durant la senescència de les flors tallades que en les control. Les concentracions més baixes de tocoferols es van trobar en les primeres etapes del desenvolupament del tèpal (als tèpals verds), mentre que les majors concentracions estaven als tèpals sense clorofil·les i senescents, especialment en les flors tallades. Es conclou que (i) els tocoferols s'acumulen als tèpals externs i interns i a l'androceu de les flors de *Lilium*, especialment al pol·len, i (ii) els tocoferols augmenten amb el progrés de la senescència del tèpal i particularment en la flor tallada, que mostra una senescència accelerada (longevitat reduïda).



Short communication

Tocopherol composition in flower organs of *Lilium* and its variations during natural and artificial senescence

Laia Arrom, Sergi Munné-Bosch*

Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal, 645, E-08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 February 2010
 Received in revised form 5 May 2010
 Accepted 6 May 2010
 Available online 13 May 2010

Keywords:

Flower senescence
 Pollen
 Tepal senescence
 Tocopherols
 Vitamin E

ABSTRACT

Although the biosynthesis and function of tocopherols (vitamin E) in leaves and seeds have been studied in detail, their occurrence within other plant organs/tissues is still poorly understood. In an attempt to better understand the occurrence and possible functions of tocopherols in flowers, we measured the concentrations of the four tocopherol homologues in floral organs of *Lilium* (including the gynoecium, androecium, and inner and outer tepals), and evaluated their variations in tepals of cut, senescing flowers (artificial senescence) compared to controls (natural senescence). Results showed that flowers accumulated α -tocopherol at significant amounts, while γ -tocopherol was present at much lower concentrations. The androecium was the organ showing the highest amounts of tocopherols, with a specific accumulation in the pollen, while tocopherols were not present in the gynoecium. Inner and outer tepals also contained significant amounts of α - and γ -tocopherol, whose levels increased during senescence. α -Tocopherol increased in both outer and inner tepals earlier and to a higher extent during senescence of cut flowers than in controls. The lowest concentrations of tocopherols were found at the beginning of tepal development (in green tepals), while the highest concentrations were found in chlorophyll-free, senescing tepals, especially in cut flowers. It is concluded that (i) tocopherols accumulate in outer and inner tepals, and in the androecium of *Lilium* flowers, particularly in the pollen, and (ii) tocopherols increase with the progression of tepal senescence, and most particularly in cut flowers, which show advanced senescence (reduced longevity).

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Since Evans and Bishop discovered vitamin E (first called “factor X”), a lipid-soluble compound in the diet obtained from lettuce that was essential for reproduction in rats [1], an enormous body of evidence has been obtained thus far on the role of vitamin E in plants, animals and men. Tocopherols, which are part of the vitamin E group of compounds, can be present in nature in four forms (α , β , γ and δ) differentiated only by the number and position of the methyl radicals in the aromatic ring [2,3]. Despite essential for animals and men, tocopherols can only be synthesized by photosynthetic organisms, including plants, algae and cyanobacteria. In photosynthetic tissues of higher plants, such as leaves, α -tocopherol is the most abundant form of tocopherols, and it is found in chloroplasts, where it plays a major role in preventing oxidative damage in thylakoid membranes, by both (i) quenching and scavenging singlet oxygen and (ii) scavenging lipid peroxy radicals, therefore controlling the extent of lipid peroxidation in photosynthetic membranes

[2]. In non-photosynthetic tissues, such as seeds, the major tocopherol compound present in most species is γ -tocopherol, although other species can preferentially accumulate α -tocopherol. In contrast, flowers seem to preferentially accumulate α -tocopherol over γ -tocopherol [4–6], and in a study in flower organs of tobacco α -tocopherol predominated in sepals and carpels, but not in petals and stamens, where γ -tocopherol was the major form [7]. No additional information is, however, available on the occurrence of tocopherols in different floral organs of other species, and it is therefore unknown if this is the general trend found in higher plants.

Petals determine the commercial longevity of flowers and as a consequence much attention has been given to their molecular biology, biochemistry and physiology during flower development and senescence [8,9]. Most of the work on flower senescence has been focused on flowers whose senescence is sensitive to exogenous ethylene. However, there are a group of ethylene-insensitive flowers, which includes commercially important ones such as *Lilium*, whose tepal senescence is characterized by wilting [8]. *Lilium* (commonly known as lily) is a genus belonging to the monocot family of Liliaceae with bulbous, herbaceous, perennial plants that make large, usually fragrant and bright flowers, and have therefore

* Corresponding author. Tel.: +34 934021463; fax: +34 934112842.
 E-mail address: smunne@ub.edu (S. Munné-Bosch).

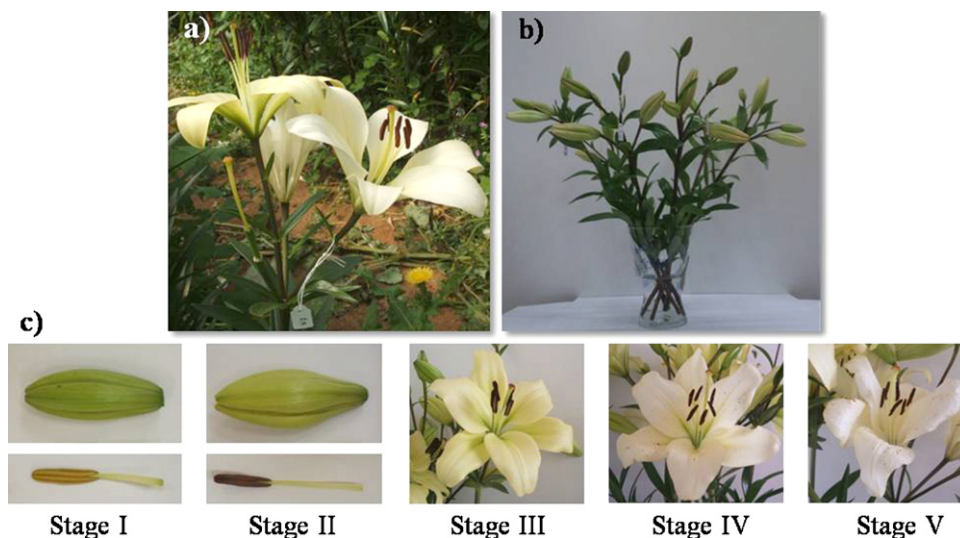


Fig. 1. (a) A detail of flowers from plants grown in the soil in the greenhouse, where natural flower development was studied. (b) Cut flowers in vases of 1.3 L capacity, in which artificial senescence was studied. (c) Stages of flower development examined in *Lilium*. In chronological order; stage I (closed flower, with fully compacted organs and green tepals), stage II (still closed, with fully mature, brown stamens), stage III (flower at anthesis), stage IV (completely white, hydrated tepals) and stage V (dehydrated tepals, just before tepal abscission).

great interest as ornamental plants and, especially, as cut flowers. In the present study we aimed at evaluating the occurrence of tocopherols in different floral organs, and their variations during tepal senescence in *Lilium* L.A. var. 'Courier', a highly appreciated variety with green/white tepals (depending on the stage of floral development).

2. Materials and methods

2.1. Plant material, treatments and sampling

Five-hundred bulbs of *Lilium* L.A. 'Courier' (*longiflorum* × asiatic hybrid), which were purchased in Mapifloricultura S.L. (Madrid, Spain), were directly transferred to the soil (Calcic Luvisol, FAO classification) in a plastic-made greenhouse at the experimental fields of the Faculty of Biology of the University of Barcelona, during 25 November 2008. Plants were covered by a polyvinyl chloride sheet situated at 2 m above the plants allowing ventilation until 0.5 m from the ground. Plants were grown with a density of 45 plants m^{-2} and watered with tap water once a week until flowers were obtained for experiments. The experiments started on 27 March 2009.

Experiments were performed by sampling the different flower organs (androecium, gynoecium and tepals, with a distinction between inner and outer tepals). In our study, all floral organs were differentiated by its physical localisation, in order of appearance in *Lilium*'s floral formula: first, the three outer tepals, then three inner tepals and immediately after the androecium, with its six stamens (separated in two whorls). In turn, each stamen can be split in two parts: the filament and the dorsifixed anther pollen container. Further inside the flower we have the gynoecium, which comprises style, stigma and the ovary, but this was analyzed in its entirety. Sampling was performed at different developmental stages (here arbitrarily called stages I–V) in both cut and attached flowers (artificial vs. natural flower development, respectively). Stage I corresponds to closed flowers, with fully compacted organs and green tepals; at stage II flowers were still closed, with fully mature, brown stamens; at stage III, flowers were at anthesis; stage IV, flowers with completely white, hydrated tepals; and stage V, flowers with dehydrated tepals, just before abscission (Fig. 1).

For experiments in cut flowers, stems were cut during 27 March, when most flowers were at stage I and at least one of them was found at stage II. Then, they were immediately transferred to the laboratory in vases of 1.3 L capacity with distilled water (25–30 stems per vase), all stems devoid of leaves at 15 cm from the base to mimic conditions they are found in the market. Samples were taken at each developmental stage, as described before, in flowers exposed to constant climatic conditions, with a relative humidity of 50%, air temperature of 20 °C and photon flux density below 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. In attached flowers (natural development), samples were taken during 27 March (stage I), 1 April (stages II and III) and 8 April (stages IV and V). During sampling, relative humidity, air temperature and photon flux density were between 50% and 65%, 9–12 °C and below 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively. In both treatments (natural and artificial flower development), flowers were exposed to the same photoperiod and sampling was always performed between 8:30 and 9:30 a.m. (UTC/GMT +1). Temperature and relative humidity were monitored by means of a portable thermohygrometer model EB313HGN (Oregon Scientific Ibérica S.A., Alcobendas, Spain), whereas the photon flux density was registered with a portable Quantum sensor (Walz, Effeltrich, Germany). For biochemical analyses, floral organs (androecium, gynoecium, and outer and inner tepals) were separated, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at –80 °C until analyses. Additionally, in an independent experiment to unravel the distribution of tocopherols within the androecium, the pollen, filaments and anthers of the androecium of flowers obtained from the local market were separated, frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C until analyses.

2.2. Tocopherol and chlorophyll analyses

The extraction and HPLC analyses of tocopherols were essentially carried out as described [10]. In short, samples were ground in liquid nitrogen and repeatedly extracted (twice) with ice-cold methanol using a Branson 2510 ultrasonic cleaner (Branson, Danbury, CT, USA) for 45 min. Then, extracts were vortexed and centrifuged for 15 min at 4 °C, and transferred to vials for HPLC analysis. Tocopherols were separated on a Partisil 10 ODS-3 column (250 mm × 4.6 mm, Scharlau, Barcelona, Spain) at a flow rate of 1 mL min^{-1} . The solvents consisted of (A) methanol:water (95:5, v/v) and (B) methanol. The gradient used was: 0–10 min, 100%

A; 10–15 min, decreasing to 0% A; 15–20 min, 0% A; 20–23 min, increasing to 100% A; and 23–28 min, 100% A. Detection was carried out at 295 nm with a diode array detector (HP1100 Series HPLC System; Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Co-elution and matching spectra with authentic standards obtained from Sigma (Steinheim, Germany) were used for the identification of peaks.

Since this reverse-phase HPLC separation did not allow to resolve β - and γ -tocopherols, the absence of β -tocopherol was confirmed using normal phase separation, as described [11]. In short, tocopherols were separated on an Inertsil 100A column (5 μ m, 30 mm \times 250 mm, GL Sciences Inc., Japan), using hexane and dioxane (95.5; 4.5, v/v) as a mobile phase at a flow rate of 0.7 mL min⁻¹. Detection was carried out at an excitation of 295 nm, and emission at 330 nm using a FP-1520 fluorescence detector (Jasco, Japan) and co-elution with authentic standards obtained from Sigma (Steinheim, Germany) were used for the identification of peaks.

The same extracts obtained from tepals were assayed spectrophotometrically to estimate chlorophyll contents as described [12].

2.3. Oxidative stress markers

Reactive oxygen species (ROS) generation was determined using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) fluorescent probe as described [13]. Ascorbate and its oxidized form, dehydroascorbate, were determined spectrophotometrically as described [14]. Finally, the extent of lipid peroxidation, estimated as malondialdehyde (MDA) levels, was measured by the thiobarbituric acid assay as described [15].

3. Results and discussion

For floral industry, senescence of cut flowers is an inevitable and unwanted process, therefore, understanding the mechanisms underlying flower senescence may help find the keys to postpone the process and prolong the life of flowers. On the other hand, little is known about the biochemistry and physiology of senescence in ethylene-insensitive flowers and, although many studies report the biosynthesis and role played by tocopherols in photosynthetic tissues, particularly in leaves [2,16], very little information is available on their occurrence and possible functions in flowers. As both leaves and petals share the same evolutionary origin, we hypothesized that mechanisms underlying senescence may be similar. We show here for the first time that both α - and γ -tocopherols accumulate in different flower organs of *Lilium*, and that tocopherol contents increase earlier and to a higher extent during tepal senescence of cut flowers compared to that of attached ones in this plant species.

3.1. Occurrence of tocopherols in different floral organs

Previous studies on the tocopherol composition in flowers indicate α -tocopherol is the major tocopherol form, followed by γ -tocopherol [5,6,17] and *Lilium* flowers were not an exception. In the present study, it is shown that α -tocopherol is the major tocopherol form in all floral organs of *Lilium* in which tocopherols were found (the androecium and outer and inner tepals, Fig. 2). Moreover, the androecium was the floral organ accumulating the highest α -tocopherol levels, while no detectable levels were found in the gynoecium (Fig. 2). In contrast, in a previous study [7] both α - and γ -tocopherols were found to occur in carpels of tobacco flowers. Unfortunately, no additional studies are currently available to certainly know the causes of this discrepancy and it is completely

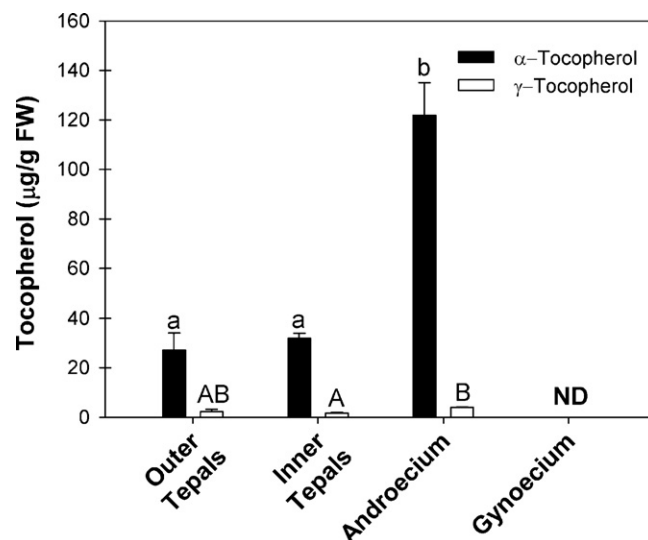


Fig. 2. Tocopherol levels in different flower organs. Data correspond to the mean \pm SE of $n=4$ of cut flowers at anthesis. Letters indicate significant differences between flower organs (Student's t -test, $p < 0.05$). ND, not detected.

unknown the role, if any, of tocopherols in the gynoecium of flowers.

In connection with the high levels of tocopherols found in the androecium of *Lilium* flowers, the presence of α - and γ -tocopherols in different parts of the androecium was evaluated

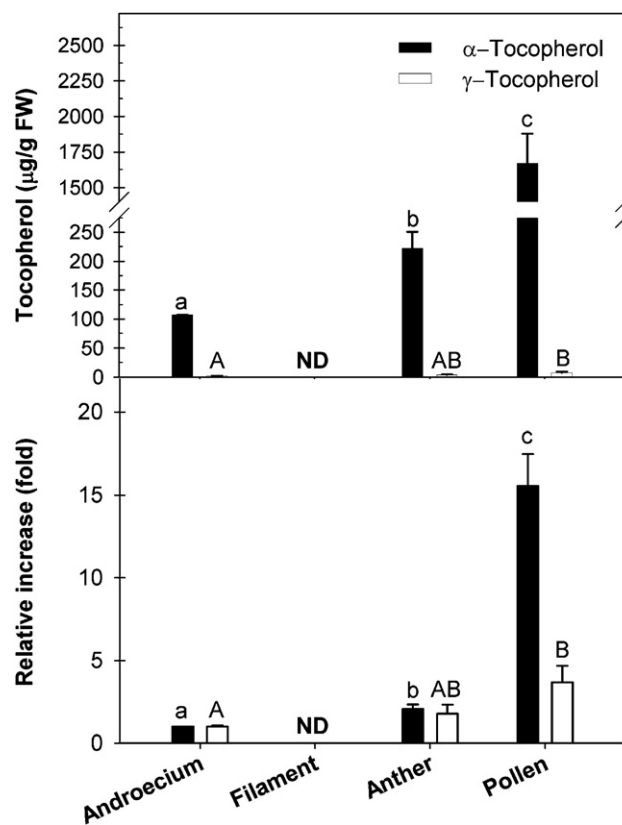


Fig. 3. Tocopherol enrichment in the pollen relative to the androecium. It is shown the levels of tocopherols in the filament, anthers and pollen, all of them isolated from cut flowers at anthesis. Relative increases in levels of α - and γ -tocopherols were calculated relative to their contents in the androecium. Data correspond to the mean \pm SE of $n=4$. Letters indicate significant differences between different parts of the androecium (Student's t -test, $p < 0.05$). ND, not detected.

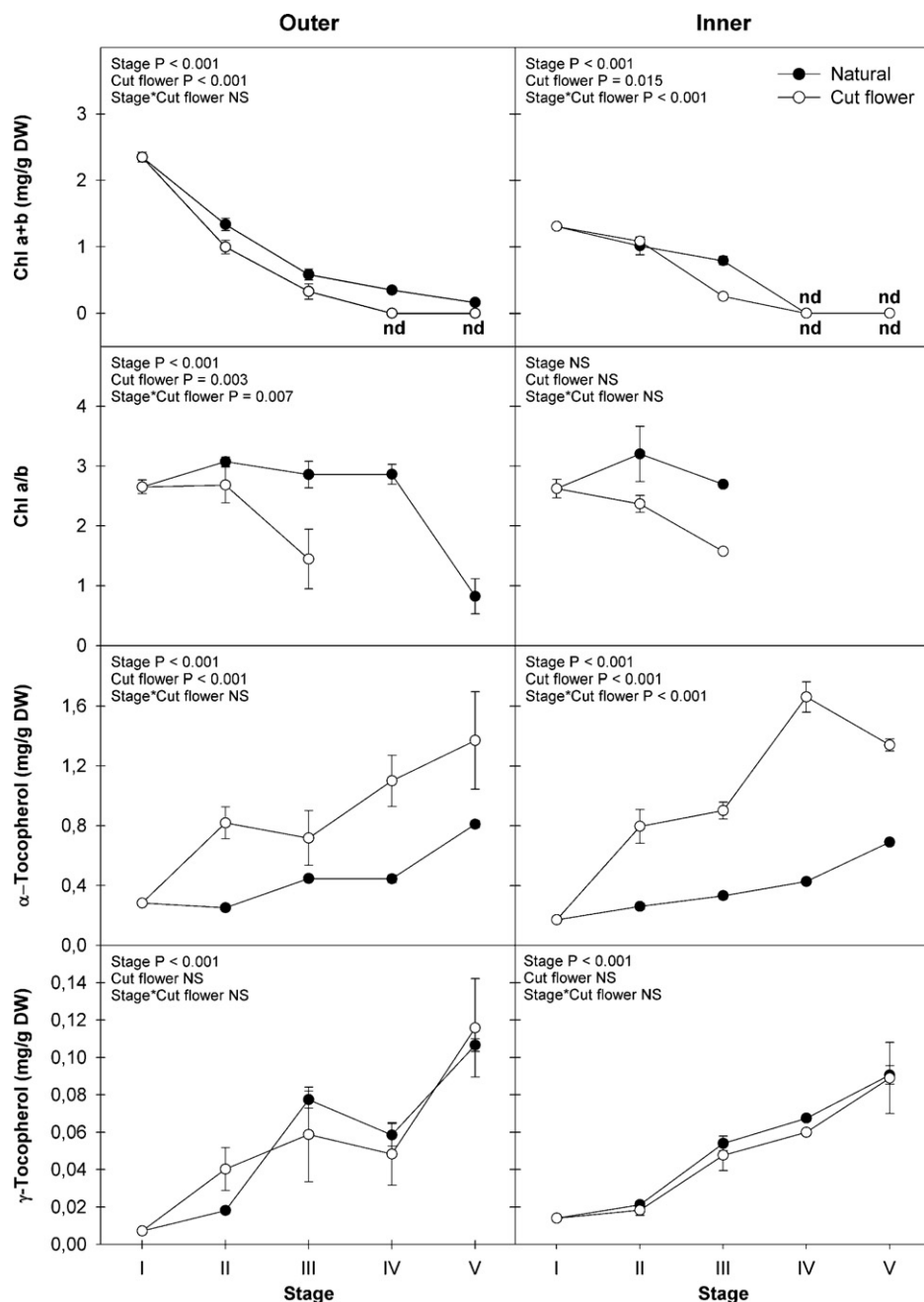


Fig. 4. Chlorophyll *a* + *b* levels, chlorophyll *a/b* ratio, and α - and γ -tocopherol contents in outer and inner tepals at different stages of flower development in cut and attached flowers. Data correspond to the mean \pm SE of $n=4$. The values of chl *a/b* ratios are not shown when chlorophylls were not detected. Results of statistics are shown in the inlets (two-way ANOVA, $p < 0.05$). NS, not significant. For details on flower developmental stages, see Fig. 1.

(Fig. 3). Both α - and γ -tocopherol were present in anthers, with a particular accumulation in the pollen. α -Tocopherol levels increased 2- and 15.5-fold in anthers and pollen, respectively, relative to the androecium, thus indicating that most of the tocopherols found in the androecium accumulate in the pollen, thus suggesting a specific role for tocopherols in the pollen. In this regard, it has been previously shown that exogenous applications of α -tocopherol can promote to some extent pollen tube growth in *Lilium auratum* [18], thus suggesting tocopherols play an essential role in plant reproduction, as they do in mammals. Further research is, however, needed to unravel the possible role(s) of tocopherols in the pollen.

3.2. Variations of tocopherol levels during natural and artificial senescence

Tepals of *Lilium* are green at stage I but lose chlorophylls as flower development progresses, as it is observed visually (Fig. 1) and after determination of endogenous chlorophyll contents (Fig. 4). Estimation of chlorophyll contents showed that chlorophyll degradation started earlier in both outer and inner tepals of cut flowers compared to attached ones (natural development). Major chlorophyll losses were observed from stage I to III, prior to anthesis, with a chlorophyll degradation of 86% and 75% in outer tepals of cut and attached flowers, respectively. Inner tepals showed smaller

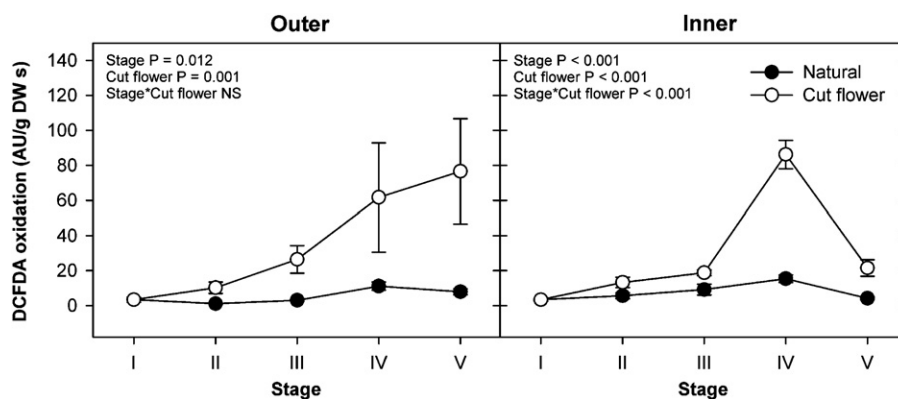


Fig. 5. Oxidation of DCFDA, an indicator of ROS generation, in outer and inner tepals at different stages of flower development in cut and attached flowers. Data correspond to the mean \pm SE of $n=4$. Results of statistics are shown in the inlets (two-way ANOVA, $p < 0.05$). NS, not significant. For details on flower developmental stages, see Fig. 1.

chlorophyll degradation, especially in attached flowers, though constitutive chlorophyll levels were also smaller compared to outer tepals (Fig. 4). After anthesis (stages III–V), attached flowers still maintained some chlorophyll in outer tepals, but not in inner ones. In outer tepals of cut flowers, chlorophylls could not be detected at stage IV, thus indicating accelerated senescence. This is in agreement with measurements of longevity in cut and attached flowers, the former showing a longevity of 17.2 ± 0.6 days ($n=4$ vases, con-

sidering all flowers of 4 stems per vase), 31% less than controls (25.0 ± 2.3 days, $n=4$ plants, estimating longevity of all flowers per plant). The chlorophyll *a/b* ratio also showed a clear distinct time course evolution in cut and attached flowers. This ratio decreased earlier and to a higher extent in cut flowers compared to controls, both in inner and in outer tepals (Fig. 4).

Tocopherol contents (both α and γ homologues) increased progressively from stage I to V in outer and inner tepals of attached

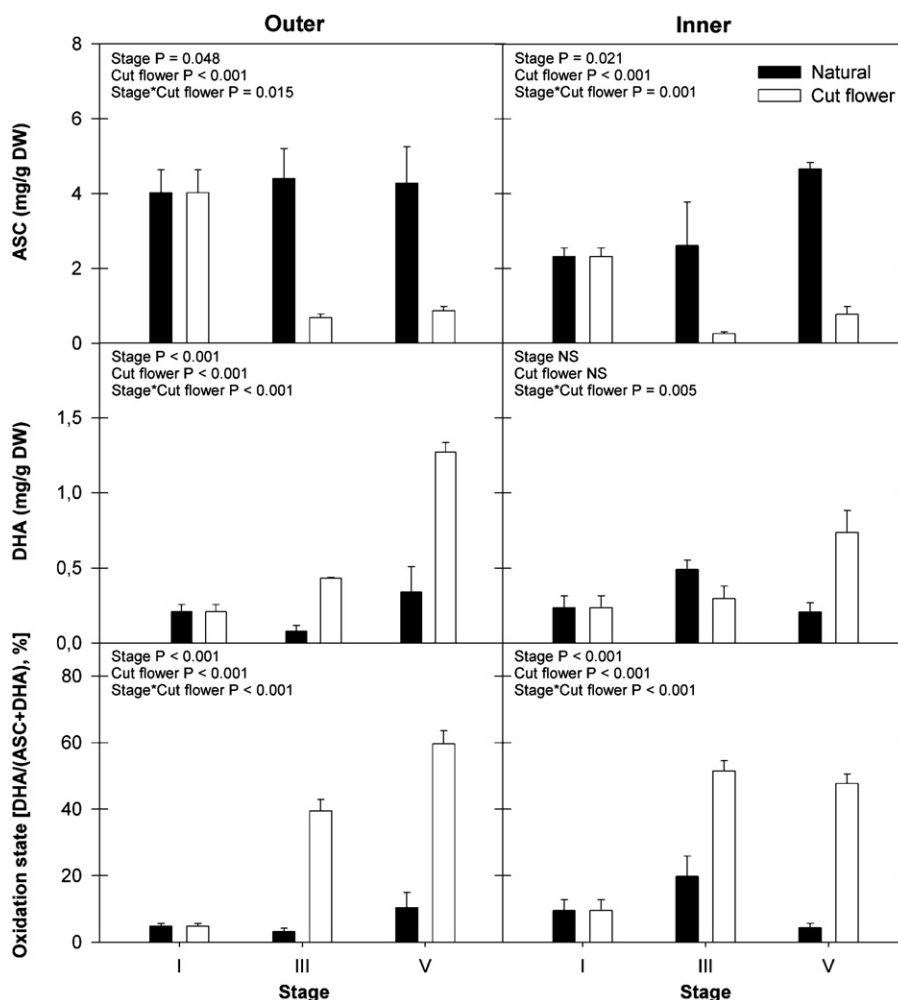


Fig. 6. Levels of ascorbate (ASC), dehydroascorbate (DHA) and oxidation state of ascorbate, given as $DHA/(ASC+DHA)$, in outer and inner tepals at different stages of flower development in cut and attached flowers. Data correspond to the mean \pm SE of $n=4$. Results of statistics are shown in the inlets (two-way ANOVA, $p < 0.05$). NS, not significant. For details on flower developmental stages, see Fig. 1.

flowers, particularly prior to anthesis (from stage II to III) and at the latest stages (from stage IV to V, Fig. 4). Both α - and γ -tocopherols reached their maximum levels at the most advanced development stages in attached flowers, when chlorophylls were completely lost (Fig. 4) and severe symptoms of wilting were apparent (Fig. 1). In cut flowers, the levels of α -tocopherol increased earlier and to a higher extent during flower development both in outer and in inner tepals. The maximum α -tocopherol levels were attained earlier in inner tepals, reaching maximum concentrations of this antioxidant at stage IV, while maximum levels were not attained until stage V in outer tepals. In inner tepals of cut flowers, α -tocopherol decreased from stage IV to V. It is noteworthy that these tepals were the ones showing the earlier and stronger reductions of the chlorophyll *a/b* ratio and degradation of chlorophylls, thus suggesting that this differential behaviour in terms of α -tocopherol accumulation responds to an accelerated senescence. This is in agreement with a previous study [4], which showed increases in α -tocopherol levels during the progression of senescence in chrysanthemum petals of cut flowers, followed by a decline in the levels of this antioxidant during advanced stages. In contrast, levels of γ -tocopherol, which were present at much lower concentrations compared to α -tocopherol, were similar in tepals of cut and attached flowers, thus indicating a specific accumulation of the α homologue during the progression of senescence. The fact that the highest concentrations of tocopherols were present in chlorophyll-free, senescing tepals of cut and attached flowers suggests a specific role for this antioxidant in chromoplasts. Similar increases in α -tocopherol have been observed in senescing leaves of other species [19–21], thus suggesting a similar behaviour in leaves and tepals.

3.3. Possible causes and consequences of α -tocopherol accumulation in cut flowers

The oxidation of DCFDA to a fluorescent compound was used to examine whether tocopherol increases correlate with enhanced ROS generation in tepals of cut flowers. Although not completely specific, this fluorescent probe mainly reacts with hydrogen peroxide, so it is a reliable indicator of ROS generation in plant tissues [13]. Levels of DCFDA oxidation increased progressively in outer and inner tepals of cut flowers compared to controls (attached flowers) reaching maximum ROS generation levels in outer tepals at stage V and in inner tepals at stage IV (Fig. 5), as it occurred with α -tocopherol contents (Fig. 4). Interestingly, α -tocopherol contents increased sharply in response to small increases in DCFDA oxidation (Suppl. Fig. 1), thus oxidative stress may induce tocopherol accumulation in tepals of cut flowers.

To get a deeper insight into the cellular oxidative status of tepals during development of cut and attached flowers, levels of reduced and oxidized ascorbate and the extent of lipid peroxidation were measured at stages I, III and V of flower development. Ascorbate levels decreased significantly in both outer and inner tepals of cut flowers at anthesis compared to stage I, which was associated with an increased oxidation state of ascorbate (Fig. 6). These results are in agreement with previous studies in other species [4,22] and show a different profile for ascorbate and tocopherol accumulation during tepal development. Furthermore, tepal senescence in cut flowers induced a further increase in the oxidation state of ascorbate in outer tepals but not in inner tepals, which was associated with similar DCFDA oxidation at stages III and V in inner tepals. Therefore, results suggest that inner tepals showed smaller levels of ROS generation and therefore of oxidative stress than outer tepals at stage V. However, the extent of lipid peroxidation was not significantly different between outer and inner tepals at stage V (Fig. 7). In addition, the extent of lipid peroxidation was drastically reduced in tepals of cut flowers compared to attached ones at

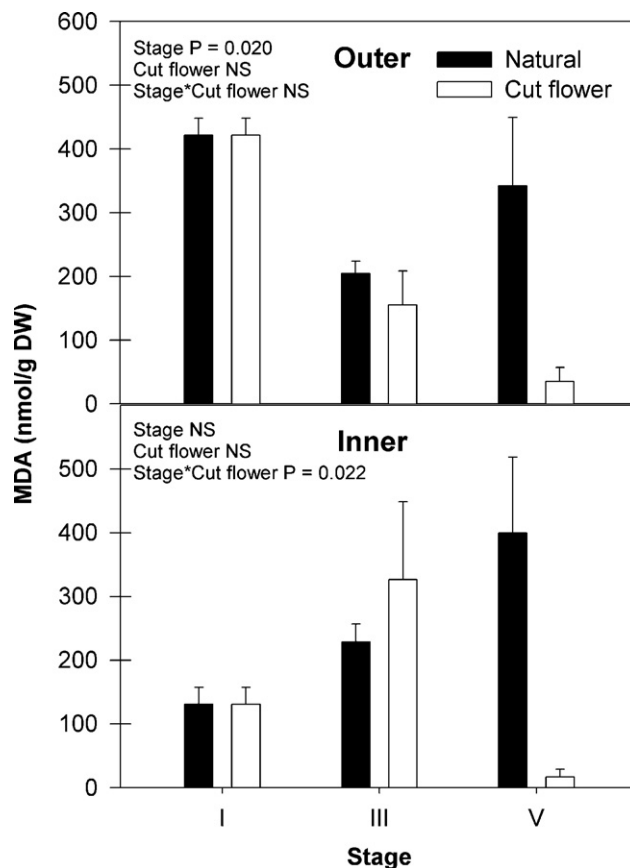


Fig. 7. Levels of malondialdehyde (MDA), an indicator of lipid peroxidation, in outer and inner tepals at different stages of flower development in cut and attached flowers. Data correspond to the mean \pm SE of $n = 4$. Results of statistics are shown in the insets (two-way ANOVA, $p < 0.05$). NS, not significant. For details on flower developmental stages, see Fig. 1.

stage V. Although one can speculate that enhanced α -tocopherol accumulation prevents lipid peroxidation in tepals of cut flowers, bulk malondialdehyde levels (as those measured here) do not necessarily represent lipid peroxidation in chromoplasts (where tocopherols presumably accumulate). Further research is therefore needed to better understand the protective effects of α -tocopherol increases in tepals of cut flowers.

4. Conclusions

All *Lilium* floral organs, with the exception of the gynoecium, accumulated both α - and γ -tocopherol, with a preferential accumulation of the α homologue. In the androecium, α -tocopherol was found to specifically accumulate in the pollen, thus suggesting a specific role in plant reproduction. Chlorophyll variations indicated accelerated senescence in cut flowers, which was confirmed by measurements of flower longevity. Both α - and γ -tocopherols increased with the progression of tepal senescence, the α homologue particularly accumulating in outer and inner tepals of cut flowers, thus suggesting a specific role for α -tocopherol in tepal senescence. Taken together, our results suggest tocopherols, and more particularly α -tocopherol, may play a role in different flower organs, including the pollen and senescing tepals. The amounts of γ -tocopherol in different flower organs and their variations during tepal senescence suggest that the role of this homologue in flowers may be limited to its biosynthetic function, as the immediate precursor of α -tocopherol. Although results suggest tocopherol increases are associated with a pro-

protective effect against oxidative stress in tepals of cut flowers, further research is needed to unravel the specific function(s) of both α - and γ -tocopherol in flower organs of *Lilium* and other species.

Acknowledgements

We are very grateful to the Serveis dels Camps Experimentals and Serveis Científico-tècnics (Universitat de Barcelona) for technical assistance. Support for the research was received through the prize ICREA Academia, funded by the Generalitat de Catalunya.

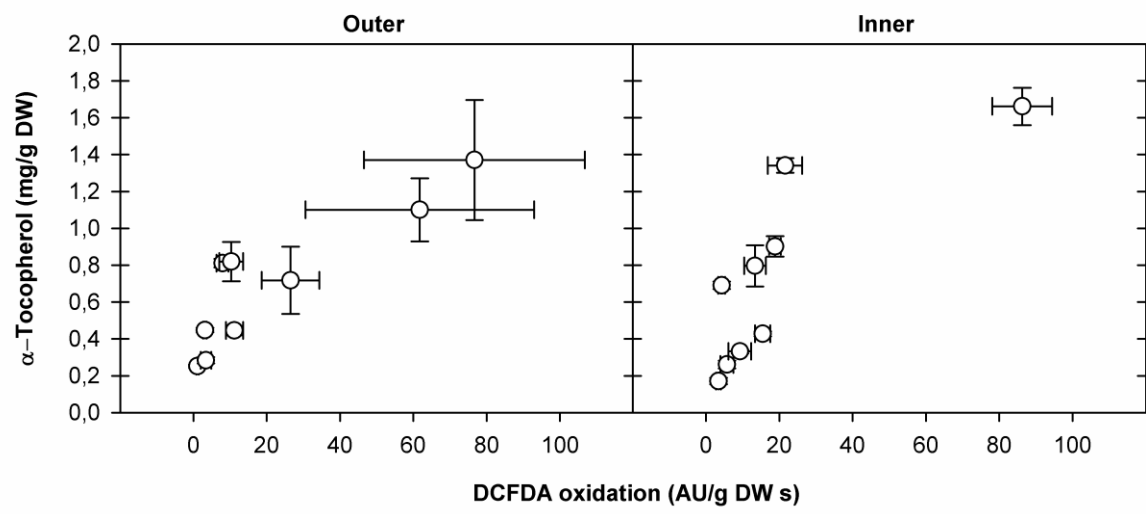
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.plantsci.2010.05.002.

References

- [1] H.M. Evans, K.S. Bishop, On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction, *Science* 56 (1922) 650–651.
- [2] S. Munné-Bosch, L. Alegre, The function of tocopherols and tocotrienols in plants, *Critical Reviews in Plant Sciences* 21 (2002) 31–57.
- [3] C.K. Sen, S. Khanna, S. Roy, Tocotrienols: vitamin E beyond tocopherols, *Life Sciences* 78 (2006) 2088–2098.
- [4] C.G. Bartoli, M. Simonthacchi, E.R. Montaldi, S. Puntarulo, Oxidants and antioxidants during ageing of chrysanthemum petals, *Plant Science* 129 (1997) 157–165.
- [5] L.S. Puckhaber, R.D. Stipanovic, G.A. Bost, Analyses for flavonoid aglycones in fresh and preserved *Hibiscus* flowers, Trends in new crops and new uses, in: Proceedings of the 5th National Symposium, Atlanta, GA, USA, 2002, pp. 556–563.
- [6] N. Tlili, N. Nasri, E. Saadaoui, A. Khaldi, S. Triki, Carotenoid and tocopherol composition of leaves, buds, and flowers of *Capparis spinosa* grown wild in Tunisia, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (2009) 5381–5385.
- [7] A.R. Abbasi, M. Haijirezaei, D. Hofius, U. Sonnewald, L.M. Voll, Specific roles of α - and γ -tocopherol in abiotic stress responses of transgenic tobacco, *Plant Physiology* 143 (2007) 1720–1738.
- [8] E.J. Woltering, W.G. van Doorn, Role of ethylene in senescence of petals—morphological and taxonomical relationships, *Journal of Experimental Botany* 39 (1988) 1605–1616.
- [9] H.J. Rogers, Programmed Cell Death in floral organs: how and why do flowers die? *Annals of Botany* 97 (2006) 309–315.
- [10] S. Munné-Bosch, L. Alegre, Drought-induced changes in the redox state of tocopherol, ascorbate and the diterpene carnosic acid in chloroplasts of Labiatae species differing in carnosic acid contents, *Plant Physiology* 131 (2003) 1816–1825.
- [11] J.S. Amaral, S. Casal, D. Torres, R.M. Seabra, B.P.P. Olivera, Simultaneous determination of tocopherols and tocotrienols in hazelnuts by a normal phase liquid chromatographic method, *Analytical Sciences* 21 (2005) 1545–1548.
- [12] H.K. Lichtenthaler, A.R. Wellburn, Determination of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents, *Biochemical Society Transactions* 603 (1983) 591–592.
- [13] C.G. Bartoli, M. Simonthacchi, E. Tambussi, J. Beltrano, E. Montaldi, S. Puntarulo, Drought and watering-dependent oxidative stress: effect on antioxidant content in *Triticum aestivum* L. leaves, *Journal of Experimental Botany* 50 (1999) 375–383.
- [14] E. Turcsányi, T. Lyons, M. Plöchl, J. Barnes, Does ascorbate in the mesophyll cell walls form the first line of defence against ozone? Testing the concept using broad bean (*Vicia faba* L.), *Journal of Experimental Botany* 50 (2000) 375–383.
- [15] M.D. Hodges, J.M. DeLong, C.F. Forney, R.K. Prange, Improving the thiobarbituric acid-reactive substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds, *Planta* 207 (1999) 604–611.
- [16] D. DellaPenna, Progress in the dissection and manipulation of vitamin E synthesis, *Trends in Plant Science* 10 (2005) 574–579.
- [17] S. Ulusoy, G. Bosgelmez-Tinaz, H. Secilmis-Canbay, Tocopherol, carotene, phenolic contents and antibacterial properties of rose essential oil, hydrosol and absolute, *Current Microbiology* 59 (2009) 554–558.
- [18] T. Ozawa, M. Takeshita, O. Negishi, H. Imagawa, Pollen-tube growth promoters from the style of *Rhododendron mucronatum* G Don, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 57 (1993) 2122–2126.
- [19] B. Chrost, J. Falk, B. Kernebeck, H. Molleken, K. Krupinska, Tocopherol biosynthesis in senescing chloroplasts—a mechanism to protect envelope membranes against oxidative stress and a prerequisite for lipid remobilization? in: J.H. Argyroudi-Akoyunoglou, H. Senger (Eds.), *The Chloroplast: From Molecular Biology to Biotechnology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1999, pp. 171–176.
- [20] M.E. Abreu, S. Munné-Bosch, Photo- and antioxidant protection and salicylic acid accumulation during post-anthesis leaf senescence in *Salvia lanigera* grown under Mediterranean climate, *Physiologia Plantarum* 131 (2007) 590–598.
- [21] M.E. Abreu, M. Müller, L. Alegre, S. Munné-Bosch, Phenolic diterpene and α -tocopherol contents in leaf extracts of 60 *Salvia* species, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88 (2008) 2648–2653.
- [22] R.K. Tewari, P. Kumar, S. Kim, E. Hahn, K. Paek, Nitric oxide retards xanthine oxidase-mediated superoxide anion generation in *Phalaenopsis* flower: an implication of NO in the senescence and oxidative stress regulation, *Plant Cell Reports* 28 (2009) 267–279.

Supplementary data (Suppl. Fig. 1)





Erratum

Tocopherol composition in flower organs of *Lilium* and its variations during natural and artificial senescence [Plant Sci. 179 (2010) 289–295]

Laia Arrom, Sergi Munné-Bosch *

Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal, 645, E-08028 Barcelona, Spain

The authors regret that Fig. 6 was incorrect in the originally published article.

The corrected Fig. 6 is displayed below along with a correction in Section 3.3 on page 294.

“Ascorbate levels decreased significantly in both outer and inner tepals of cut flowers at anthesis compared to ATTACHED FLOWERS, which was associated with an increased oxidation state of ascorbate (Fig. 6).”

DOI of original article: [10.1016/j.plantsci.2010.05.002](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.05.002).

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

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

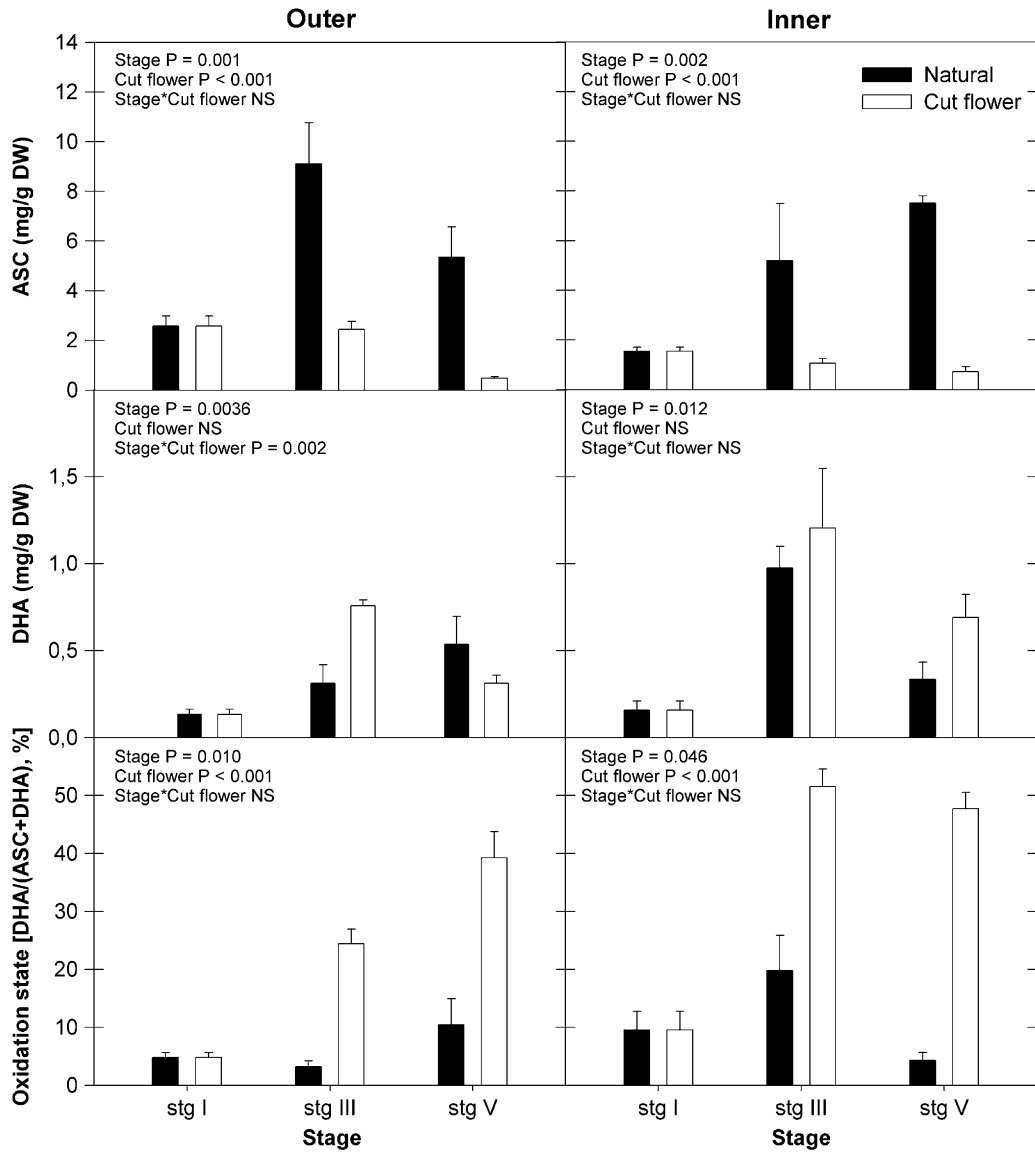


Fig. 6.

CAPÍTOL 3:

LA SACAROSA ACCELERA L'OBERTURA FLORAL I EN RETARDA LA SENESCÈNCIA MITJANÇANT UN EFECTE HORMONAL EN LA FLOR TALLADA DE *LILIUM*

CAPÍTOL 3

SUCROSE ACCELERATES FLOWER OPENING AND DELAYS SENESCENCE THROUGH A HORMONAL EFFECT IN CUT *LILY* FLOWERS

Laia Arrom · Sergi Munné-Bosch

*Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona,
Spain*

Plant Science, 188-189: 41-47



Senescència Artificial; tractaments control i de sacarosa

RESUM DEL CAPÍTOL 3

Els sucres són àmpliament utilitzats per allargar la vida de la flor tallada. Els seus efectes beneficiosos s'han associat a una millora de les relacions hídriques i a l'increment de l'energia disponible per a la respiració dels teixits florals. En el present estudi es va voler avaluar en quina mesura (i) varien els nivells endògens de sucres en tèpals externs i interns, en l'androceu i al gineceu durant l'obertura i la senescència de la flor de *Lilium*, (ii) augmenten els nivells de sucres dels diversos teixits florals després de l'addició de sacarosa a la solució del gerro, i (iii) s'altera el balanç hormonal dels teixits florals després de l'addició de sacarosa exògena. Els resultats mostren que a tots els òrgans florals els nivells endògens de glucosa augmenten durant l'obertura floral i disminueixen al llarg de la senescència, mentre que els nivells de sacarosa augmenten només als tèpals externs i interns i a l'androceu i durant la senescència. El tractament amb sacarosa mostrava una acceleració de l'antesi i un retard de la senescència floral, però sense afectar l'abscisió del tèpal. Aquests efectes semblen ser deguts a l'augment específic dels nivells de sacarosa endògena al gineceu i a l'increment del contingut en glucosa observat en tots els teixits florals. El balanç hormonal es mostrà alterat al gineceu, així com en els altres teixits florals. A part dels increments dels nivells de citocinines i auxines del gineceu; a l'androceu, els nivells de citocinines, gibberel·lines, àcid abscísic i àcid salicílic també augmentaven mentre que als tèpals externs el contingut en l'àcid abscísic disminuïa. Es conclou que l'addició de sacarosa a la solució del vas exerceix un efecte sobre l'obertura i la senescència de les flors mitjançant, entre d'altres factors, l'alteració de l'equilibri hormonal dels diversos teixits florals.



Short communication

Sucrose accelerates flower opening and delays senescence through a hormonal effect in cut lily flowers

Laia Arrom, Sergi Munné-Bosch*

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 January 2012

Received in revised form 22 February 2012

Accepted 23 February 2012

Available online 2 March 2012

Keywords:

Abscisic acid

Cytokinins

Flower senescence

Hormones

Lilium

Sucrose

ABSTRACT

Sugars are generally used to extend the vase life of cut flowers. Such beneficial effects have been associated with an improvement of water relations and an increase in available energy for respiration by floral tissues. In this study we aimed at evaluating to what extent (i) endogenous levels of sugars in outer and inner tepals, androecium and gynoecium are altered during opening and senescence of lily flowers; (ii) sugar levels increase in various floral tissues after sucrose addition to the vase solution; and (iii) sucrose addition alters the hormonal balance of floral tissues. Results showed that endogenous glucose levels increased during flower opening and decreased during senescence in all floral organs, while sucrose levels increased in outer and inner tepals and the androecium during senescence. Sucrose treatment accelerated flower opening, and delayed senescence, but did not affect tepal abscission. Such effects appeared to be exerted through a specific increase in the endogenous levels of sucrose in the gynoecium and of glucose in all floral tissues. The hormonal balance was altered in the gynoecium as well as in other floral tissues. Aside from cytokinin and auxin increases in the gynoecium; cytokinins, gibberellins, abscisic acid and salicylic acid levels increased in the androecium, while abscisic acid decreased in outer tepals. It is concluded that sucrose addition to the vase solution exerts an effect on flower opening and senescence by, among other factors, altering the hormonal balance of several floral tissues.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Since beauty is the main reason why cut flowers are sold, much effort has been put on lengthening (the usually short) flower lifespan, one of the major problems in the floricultural commercial sector. In this way, several studies have been performed to unravel the pathways that lead floral organs to death so that the resulting scientific and technological advances can be used to extend flower longevity. Senescence is a programmed process that does not occur in all floral organs at the same time. According to its specific biological function petals (or tepals) are the first tissues showing signs of senescence, while the gynoecium, particularly the ovary, remains functional throughout all phases of flower development to ensure seed development. In this way, since tepal senescence is the limiting factor for flower longevity, the main objective of

floral senescence studies relies on the maintenance of a viable and visually healthy corolla for a long time.

Many studies have shown how exogenous sugar added to the vase solution delays the onset of visible signs of flower senescence in several cut flowers, although its role in petal senescence seems to be indirect [1]. Changes in sugar contents throughout plant development are common; while some plant organs act as a source (such as mature, non-senescent, leaves), others (such as developing flowers) act as a sink. However, petals can also act as a source during flower senescence [2]. Furthermore, cutting the stems leads to a complete reduction of sucrose import to sink tissues of cut flowers and an altered carbohydrate metabolism. Therefore, depending on the floral tissue and stage of development sucrose on the vase solution may have a complex effect on endogenous levels of sucrose and the physiological status of different floral tissues. Exogenous sugar effects on flower longevity may also differ between ethylene-sensitive and insensitive species. In the former, sugars seem to delay petal senescence by reducing ethylene sensitivity [3–6]. In contrast, it has been suggested that in ethylene-insensitive flowers sugars might prevent a decline in osmotic pressure and delay cell death by providing an energy source [1].

Abbreviations: ABA, abscisic acid; GA₄, gibberellin 4; IAA, indole-3-acetic acid; JA, jasmonic acid; SA, salicylic acid; Z, zeatin; ZR, zeatin riboside.

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

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

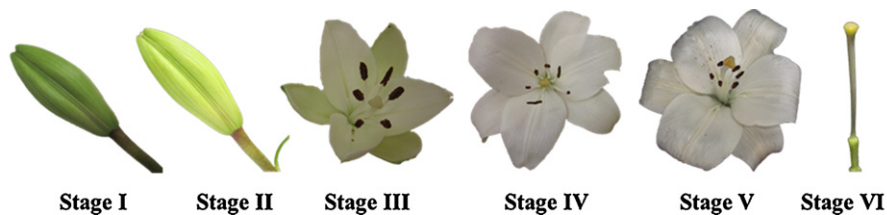


Fig. 1. Detail of floral developmental stages in *Lilium*. In chronological order; stage I (closed bud, green tepals), stage II (still closed but less compacted organs), stage III (anthesis, greenish tepals), stage IV (completely white and hydrated tepals), stage V (dehydrated tepals, wilting before tepal abscission) and stage VI (naked gynoecium after tepal abscission).

In ethylene-insensitive cut lily flowers [7–10] longevity largely depends on the amount of available carbohydrates, which are a limiting factor for bud development, flower growth and opening [11]. Furthermore, closed buds compete with open flowers in the same inflorescence for the amount of available sugars, which threatens the opening and correct formation of organs of the developing closed flowers [10]. Therefore, exogenous applications of sugars might help flower buds to open and to keep opened flowers alive for longer in cut lilies.

It appears that in ethylene-insensitive flowers, the main hormones regulating senescence are cytokinins and more specifically abscisic acid (ABA). As it occurs during leaf senescence, cytokinins delay flower senescence in several species, irrespective of its

sensitivity to ethylene [7,12,13]. In contrast, ABA seems to be a key and specific regulator in ethylene-insensitive species, hastening the process [13,14]. Furthermore, sugars can act as signal molecules during leaf senescence [15,16]; therefore, we hypothesized that an increased sugar supply may extend the longevity of cut lily flowers through an effect on endogenous hormone concentrations in several floral tissues.

In the present study, we aimed at evaluating to what extent endogenous levels of sugars were altered during opening and senescence of cut lily flowers, considering a possible different behaviour between various floral tissues, including outer and inner tepals and both reproductive organs (androecium and gynoecium). Furthermore, we were interested in examining the different

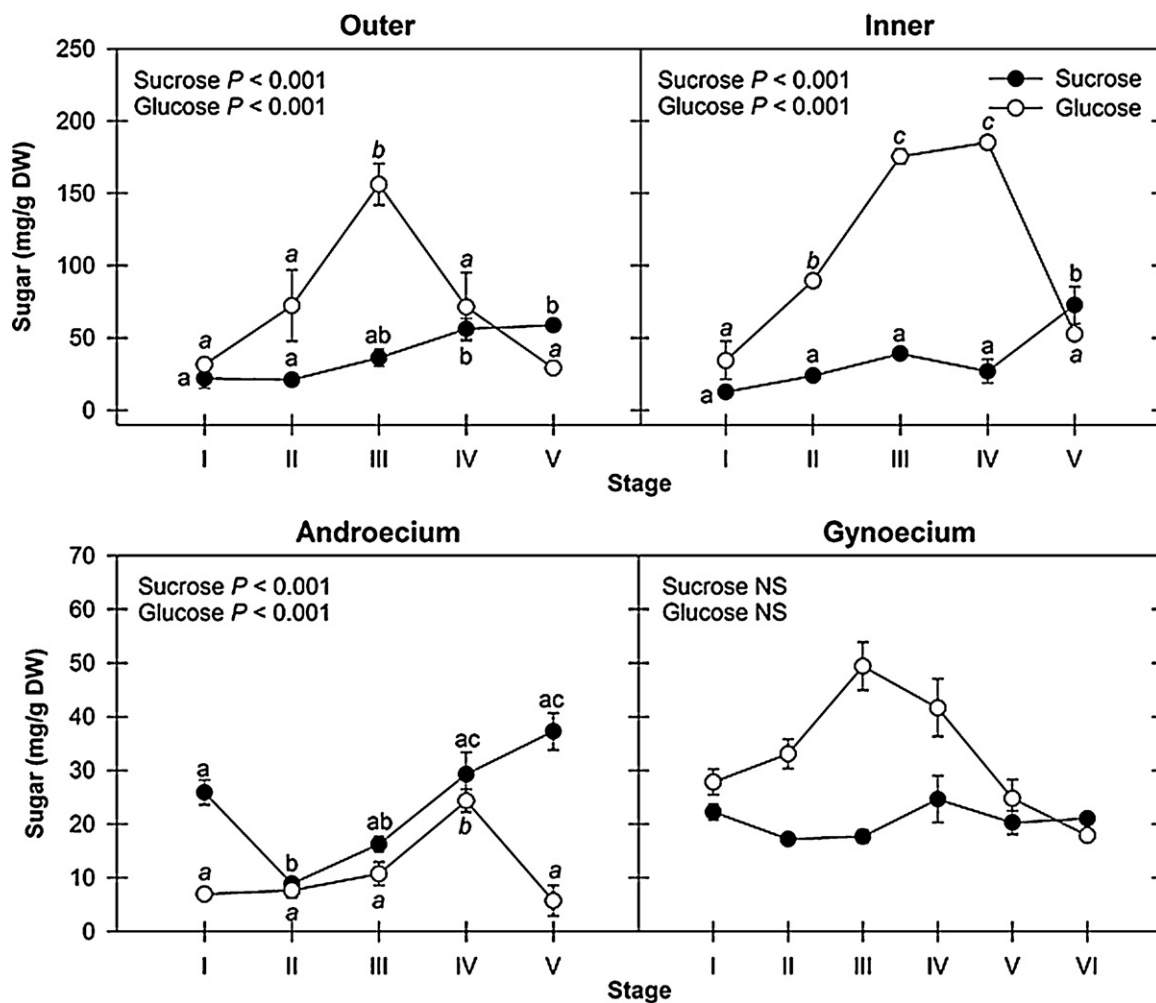


Fig. 2. Sucrose (solid circle) and glucose (empty circle) levels in various floral tissues during natural development of uncut *Lilium* flowers. Data correspond to the mean \pm SE of $n = 4$. Results of statistics are shown in the inlets (ANOVA, $P < 0.05$). NS, not significant. When significant, different letters indicate differences between stages as indicated by the Tuckey post hoc test. For details of flower developmental stages, see Fig. 1.

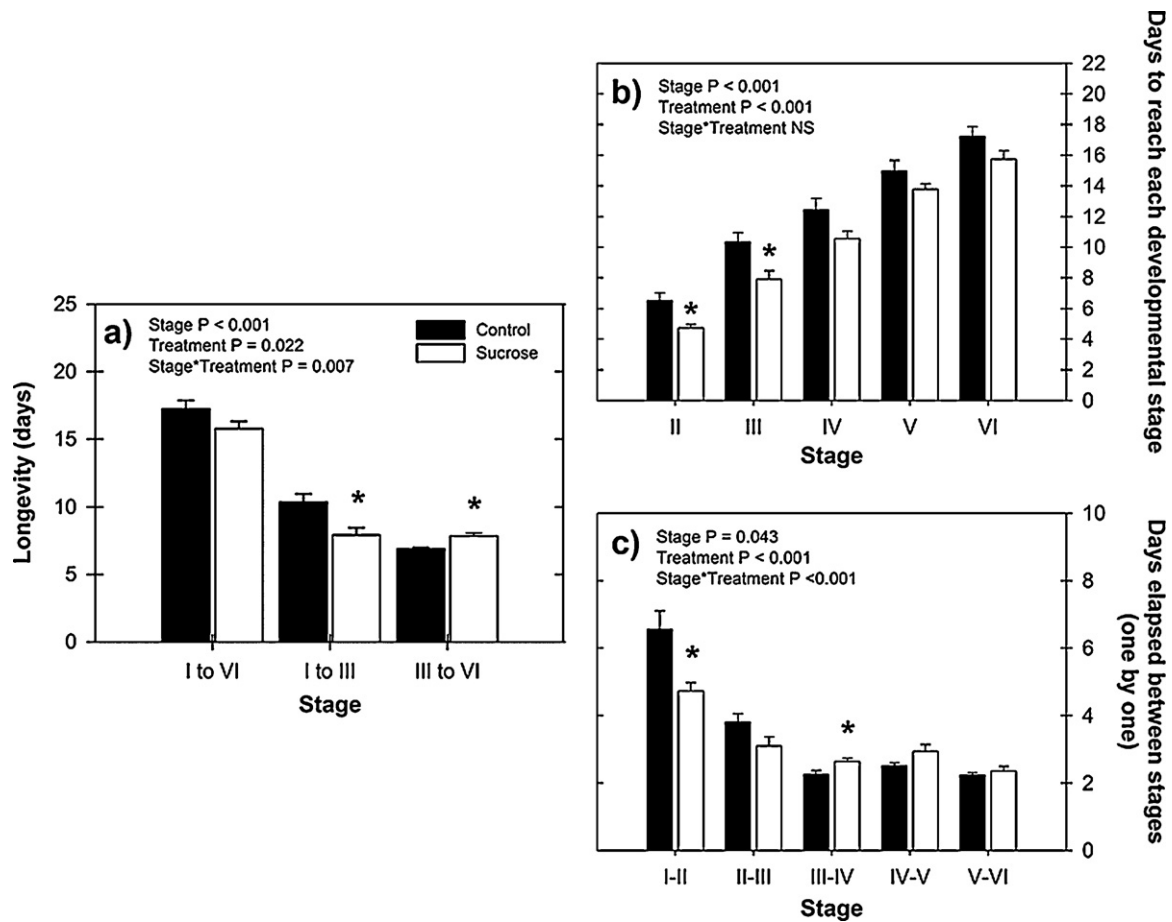


Fig. 3. Flower longevity (a), days to reach each developmental stage (b) and days elapsed between stages (c) in control (solid bars) and sucrose-treated (empty bars) *Lilium* cut flowers. Data correspond to the mean \pm SE of $n=4$. Results of statistics are shown in the inlets (ANOVA, $P < 0.05$) and asterisks indicate significant differences between treatments (Student's t -test, $P < 0.05$). NS, not significant. For details of flower developmental stages, see Fig. 1.

sensitivity of floral tissues to sucrose addition and to what extent sucrose addition in the vase solution could differentially alter the hormonal balance of outer and inner tepals, the androecium and gynoecium.

2. Materials and methods

2.1. Plant material, conditions of study and samplings

Lilium L.A. 'Courier' (*L. longiflorum* \times Asiatic hybrid) plants were obtained from bulbs in a plastic-made greenhouse at the experimental fields of the Faculty of Biology of the University of Barcelona as described previously [17]. Endogenous sugar contents in various floral tissues (including outer and inner tepals, androecium and gynoecium) of uncut flowers were examined at six stages of flower development. The same plants were used to obtain cut flowers to examine the effects of sucrose addition to the vase solution. For this experiment, stems were harvested when most of flower buds were at stage I and at least one of them was at stage II (see Fig. 1 for a description of developmental stages), and immediately exposed to two treatments (sucrose vs. control) in the laboratory (at 20 °C, 50% relative humidity and a photon flux density below $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Stems were placed in vases of 1.3 L of capacity filled either with 250 mL of distilled water (controls) or 1% (w/v) sucrose (Sigma, Steinheim, Germany). Before placing stems into vases, all basal leaves (found between 0 and 15 cm from the cut) were removed to mimic commercial selling conditions. Each treatment comprised four vases with four stems per vase and

vase-filling solutions were replaced every 4 days. All flowers were individually marked at stage I to daily monitoring the time elapsed between stages and to determine their total longevity (stages I–VI). In both treatments, samplings for biochemical analyses were performed at anthesis (stage III). For these analyses, floral tissues (outer and inner tepals, androecium and gynoecium) were individually separated, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analyses.

2.2. Sugar analyses

Sucrose and glucose contents were determined by HPLC as described previously [18], but with slight modifications. In short, samples (100 mg) were ground in liquid nitrogen and extracted with 80% ethanol (v/v) for 30 min at 80 °C. After centrifugation, the supernatant was fully dried under a nitrogen stream and then reconstituted in 1 mL of water. Then, extracts were filtered with the Sep-Pak[®] Vac C18 cartridge (Waters, Milford, MA, USA) and transferred into HPLC vials. Sucrose and glucose were isocratically separated by an Aminex HPX-87P (300 \times 7.8 mm) and an Aminex HPX-87C (300 \times 7.8 mm) column (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in series, using milliQ water as a solvent at a flow rate of 0.6 mL min^{-1} . Injection volume was 100 μL . Detection was carried out using a differential refractometer (Waters, Milford, MA, USA) with cell at 37 °C and a sensitivity of 156 μRIU . Peak identification and quantification were carried out by co-elution with authentic standard obtained from Sigma. We failed to separate fructose from an unidentified compound found in all floral tissues that co-eluted with the

fructose standard, so that glucose was the only hexose that could be reliably quantified (Suppl. Fig. 1).

2.3. Tissue hydration

Water contents of floral organs were measured from 4 individual flowers at anthesis. Hydration was measured by weighing the fresh weigh (FW) and the dry weigh (DW) of each floral tissue, before and after drying to constant weight at 80 °C, and the hydration determined as (FW – DW)/DW.

2.4. Hormone analyses

The levels of cytokinins, including zeatin (Z) and zeatin riboside (ZR), the auxin, indole-3-acetic acid (IAA), gibberellin 4 (GA₄), ABA, salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA) were determined by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) exactly as described previously [19].

2.5. Statistical analyses

Differences between treatments were evaluated by analysis of variance (ANOVA), using the Duncan post hoc test, or the Student's *t*-test, and were considered significant at a probability level of $P < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Endogenous variations of sugars during flower development in various floral tissues

Although flower opening and senescence are key processes determining the vase life of several cut flowers and sugars added to the vase solution are known to increase vase life in several cut flowers, little is known about endogenous variations in sugar levels in several floral tissues, particularly beyond petals, during natural flower development. In uncut flowers, endogenous sucrose contents varied throughout flower development in all floral organs, except in the gynoecium. Sucrose contents increased with flower development reaching 63%, 83% and 31% higher levels at stage V compared to stage I in both outer and inner tepals and in the androecium, respectively. Before anthesis, sucrose increased 3.1-fold in inner tepals and decreased by 37% in the androecium. After anthesis, sucrose increased even further in inner tepals, reaching values 2-fold higher at stage V compared to anthesis. In outer tepals and the androecium, sucrose levels also increased 1.6- and 2.3-fold, respectively, from anthesis to stage V (Fig. 2). This is in agreement with Trivellini et al. [20], which showed that sucrose levels also increased from anthesis to senescence in petals, while they remain constant in the gynoecium in *Hibiscus rosa-sinensis* L. It appears therefore that sucrose accumulates only in those organs that senesce, such as tepals and the androecium, but not in the gynoecium. In contrast, endogenous glucose levels increased during flower opening and decreased during senescence in all floral organs, including the gynoecium; thus suggesting hexoses are consumed during flower senescence in all floral tissues despite the gynoecium does not enter into senescence. It is worthy to note that the major decreases in glucose levels were observed between stages IV and V in all floral organs, except in outer tepals, suggesting glucose consumption is accelerated in the latter. Unfortunately, fructose could not be separated from an unidentified co-eluting compound (Suppl. Fig. 1), which did not allow us to establish possible differences in behaviour between both hexoses and associated metabolic processes, an aspect that warrants further investigations.

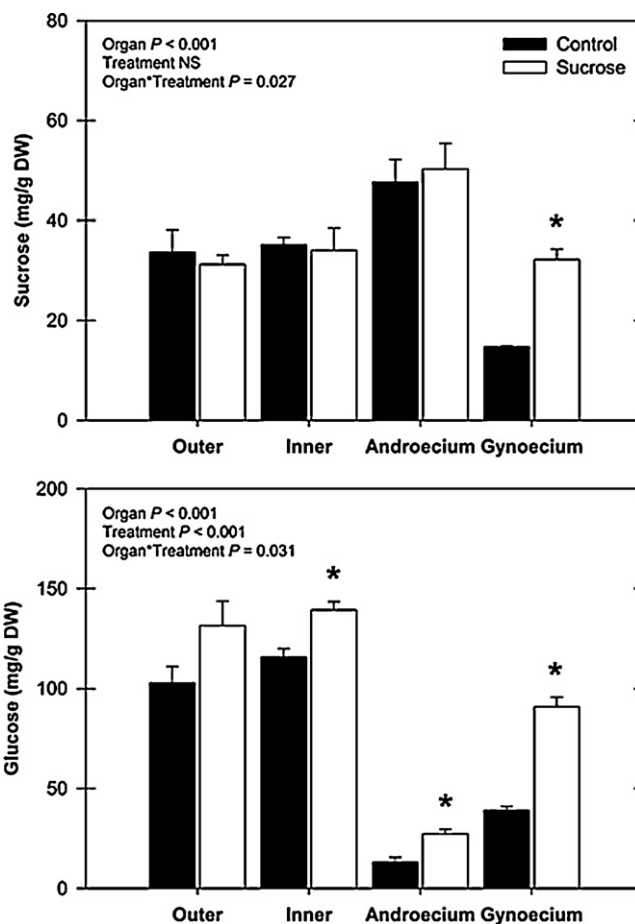


Fig. 4. Sucrose and glucose contents in various floral tissues of control (solid bars) and sucrose-treated (empty bars) *Lilium* cut flowers at anthesis. Data correspond to the mean \pm SE of $n = 4$. Results of statistics are shown in the inlets (ANOVA, $P < 0.05$) and asterisks indicate significant differences between treatments (Student's *t*-test, $P < 0.05$). NS, not significant.

3.2. Sucrose addition accelerates flower opening and delays senescence

It has been shown that sucrose levels increase with flower development in tepals from different cut Asiatic *Lilium* hybrids, reaching higher amounts at anthesis than in bud stage. On the other hand, it seems to be a correlation between tepal carbohydrates content and flower longevity, where buds with less sugar content (which is also a cultivar trait) have a shorter lifespan [11]. Thus, exogenous sucrose might extend vase life of lily cut flowers by counteracting that possible lack of carbohydrates due to stem cutting. Indeed, sugar supply has been shown to enhance vase life not only in several *Lilium* varieties but also in other several species, although effects are not equivalent in all species and major differential responses may occur among cultivars [1,4,10,14]. In our study, flower longevity (from stage I to VI) was not affected by sucrose addition to the vase solution. However, results showed an acceleration of flower opening by 2.4 days and a delay of tepal senescence by 1 day (Fig. 3). Shortening of the time needed to reach anthesis was particularly due to a reduction of the amount of days required to attain stage II, while the delay in tepal senescence was due to a significant increase of the time elapsed between anthesis and stage IV (Fig. 3). According to these results, sucrose addition to the vase solution provides cut lily flowers a new energy supply that flowers appear to use to accelerate anthesis and that apparently leads to a delay in tepal senescence, particularly at the earliest phases of the process.

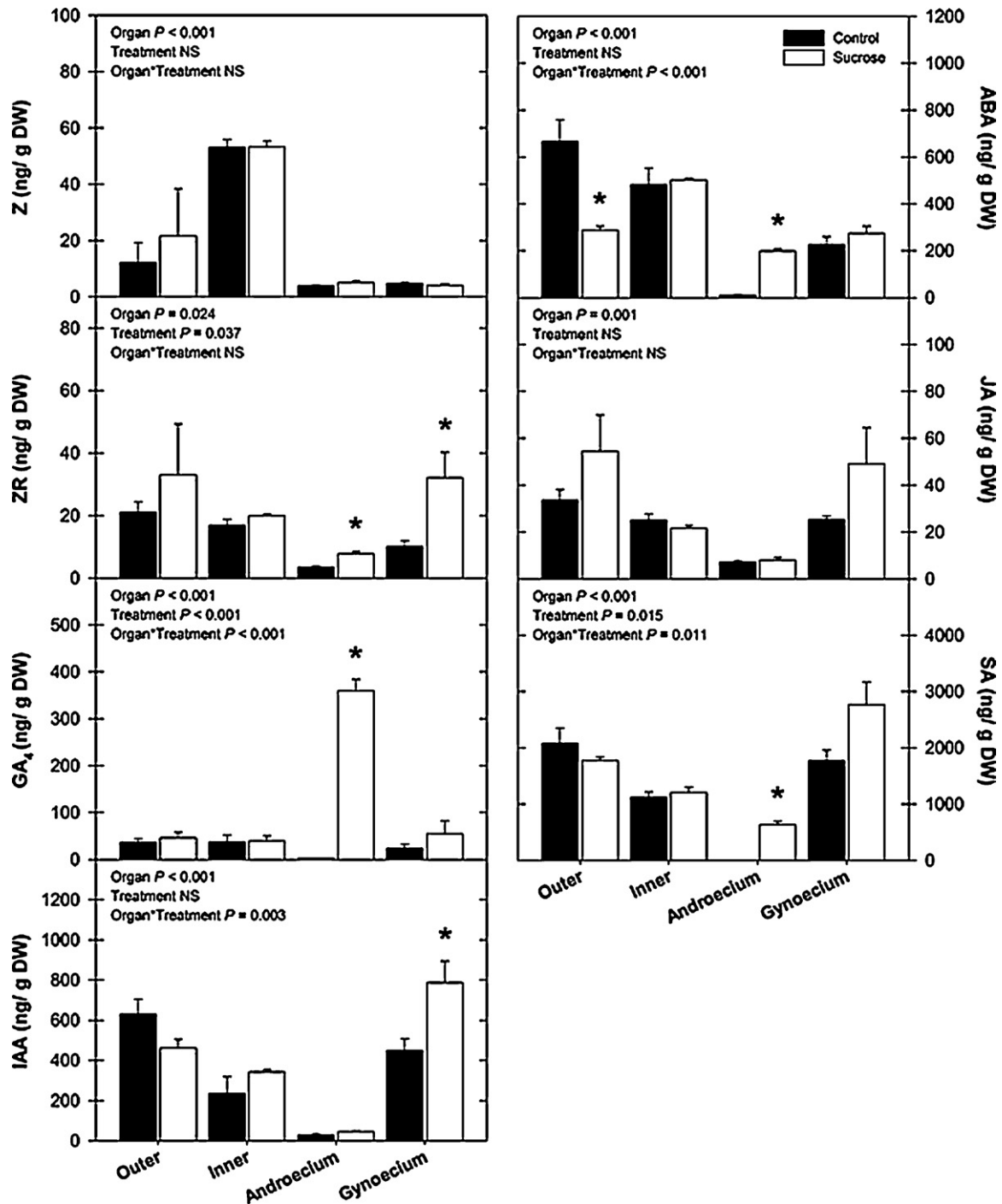


Fig. 5. Hormone levels in various floral tissues of control (solid bars) and sucrose-treated (empty bars) cut *Lilium* flowers at anthesis. Data correspond to the mean \pm SE of $n=4$. Results of statistics are shown in the inlets (ANOVA, $P < 0.05$) and asterisks indicate significant differences between treatments (Student's t -test, $P < 0.05$). NS, not significant.

3.3. Sucrose addition leads to sucrose increases in the gynoecium only

Since each floral organ develops according to its different biological function, the distribution of endogenous sugars after sucrose addition to the vase solution may also vary among them. In cut Easter lily, anthers are the floral organs with the highest amounts of sucrose from bud stage to anthesis, while its content is roughly the same and remains constant until anthesis in tepals and ovary [21]. Similarly, in the L.A. hybrid studied here, the highest amounts of sucrose in cut flowers at anthesis were also found in the

androecium, followed by outer and inner tepals and finally, by the gynoecium. However, the androecium was the floral tissue with the lowest amounts of glucose followed by the gynoecium and tepals. It seems that exogenous sugar supply could favour a correct development of floral organs and delay senescence [22]. Surprisingly, although sucrose addition to the vase solution in our study led to an increase of glucose levels in all floral tissues, the levels of sucrose increased (by 2.2-fold) in the gynoecium only, while the levels of sucrose kept unaltered in the rest of organs at anthesis (Fig. 4). Therefore, exogenous sucrose seemed to be actively taken up and rapidly consumed by all floral tissues, except the gynoecium, which

accumulated high sucrose levels, which might probably be associated with the fact that this is the only organ not entering into a senescing process.

3.4. Sucrose addition leads to an altered hormonal balance in various floral tissues

Sucrose addition to the vase solution did not alter hydration levels in any of the floral tissues of cut lily flowers (Suppl. Fig. 2), but led to significant changes in the endogenous contents of hormones in several tissues at anthesis, including the gynoecium, the androecium and outer tepals (Fig. 5). Enhanced ZR and IAA levels (by 3.2- and 1.8-fold, respectively) were observed in the gynoecium (Fig. 5). Since the gynoecium has been shown to be the key organ in hormonally controlling the onset of tepal senescence [23], it appears that sucrose effects of flower opening and senescence were associated with cytokinin and auxin increases. It is interesting to note that from the two cytokinins analyzed in this study, Z and ZR, the latter was the one showing increases in the gynoecium. Since cytokinin receptors can show different sensitivity to various cytokinins, it will be interesting to study whether or not ZR is more active than Z in inhibiting flower senescence in lilies. In any case, cytokinins are known to delay flower senescence in several species irrespective of their sensitivity to ethylene [13,15], therefore, sucrose-mediated increases in cytokinins may be responsible for the delay of senescence.

The only change observed in tepals was the 57% decrease of ABA levels in outer tepals of sucrose-treated flowers relative to controls (Fig. 5). Since ABA is known to accelerate corolla senescence in ethylene-insensitive flowers [13,14,24,25], it appears that the sucrose effects on flower senescence were also mediated at least in part by a reduction of ABA contents in outer tepals. In ethylene-sensitive flowers, sugar supply delays petal senescence by modulating ethylene signalling pathway [3,5]. Therefore, as it has already been described in the regulation of leaf senescence [26–28], it appears that there is a crosstalk between sugars and hormones in the regulation of tepal senescence both in ethylene-sensitive and -insensitive flowers.

It has been shown that a lack of sugars may stop anther and pollen development in Easter lily [29], therefore it was likely that sugar addition to the vase solution alters also the hormonal balance of the androecium. Indeed, the androecium was the floral organ most affected by sugar addition to the vase solution in terms of the diversity of hormones affected; ZR, GA₄, ABA and SA levels increased by 2, 155, 20 and 635-fold, respectively when exogenous sucrose was added to the vase solution (Fig. 5), thus indicating that the physiology of this organ is one of the most affected, particularly compared to tepals, in sucrose-treated flowers. However, further research is needed to understand what physiological processes within the androecium are being regulated by such sucrose-mediated hormonal effects. Furthermore, it will also be important to establish whether or not other GAs, aside from the active GA₄ measured here, are affected by sucrose addition and what is their role in the androecium.

It is concluded that sucrose addition to the vase solution exerts an effect on flower opening and senescence by, among other factors, altering the hormonal balance of several floral tissues. Increases in cytokinins and auxins in the gynoecium, and ABA decreases in outer tepals explain at least in part the effects of sucrose on flower senescence, while major effects on the androecium are indicative of the sensitivity of this organ to sucrose treatments. Further research is however needed to establish the molecular mechanisms underlying the crosstalk between sugars and hormones in various floral organs of cut lily flowers and understand what target genes are

being regulated by those hormonal changes in sucrose-treated cut lily flowers.

Acknowledgements

We are very grateful to the Serveis Científic-Tècnics and Serveis dels Camps Experimentals (University of Barcelona) for technical assistance. Support for the research was received through the ICREA Academia prize awarded to S.M.-B., funded by the Generalitat de Catalunya.

Appendix A. Supplementary data

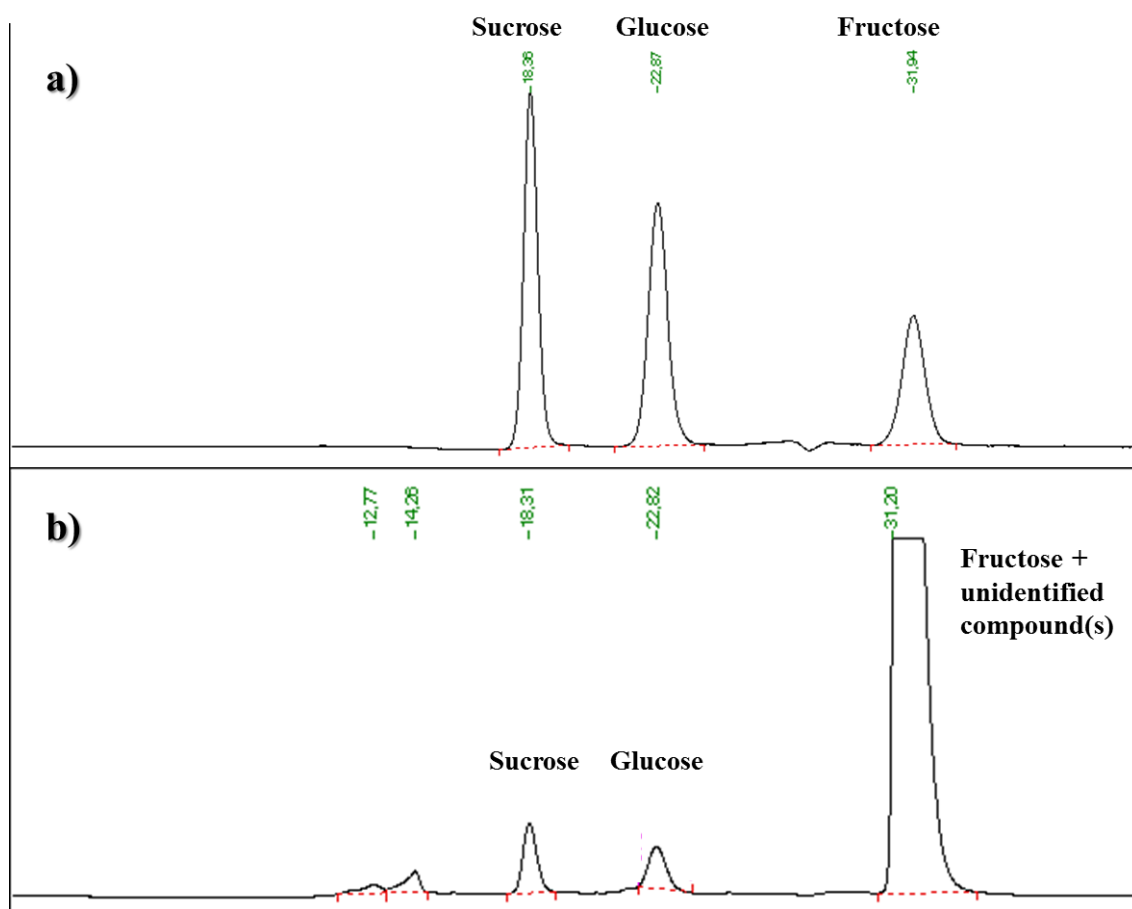
Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.plantsci.2012.02.012.

References

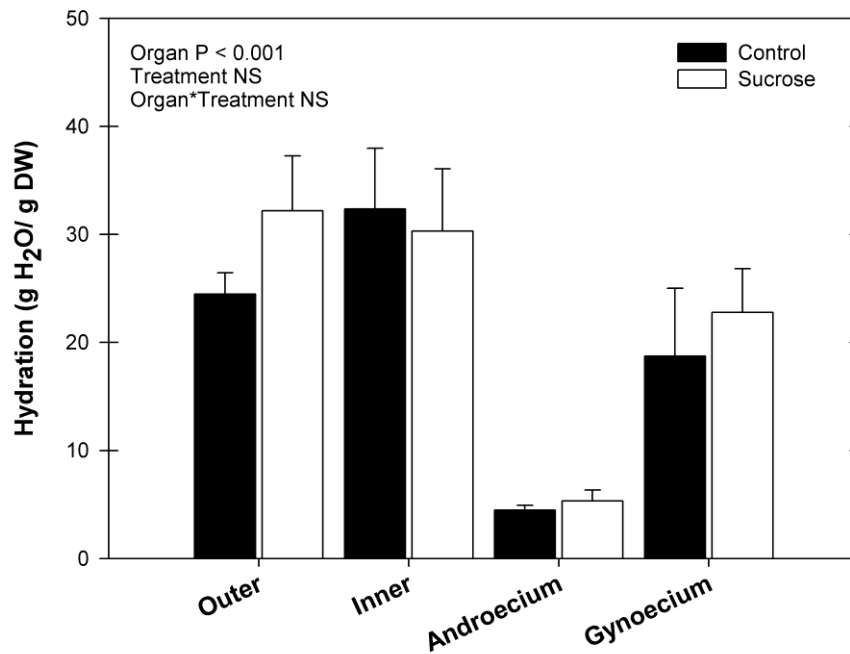
- [1] W. van Doorn, Is petal senescence due to sugar starvation? *Plant Physiol.* 134 (2004) 35–42.
- [2] R.L. Bielecki, The bigger picture – phloem seen through horticultural eyes, *Funct. Plant Biol.* 27 (2000) 615–624.
- [3] U. Pun, K. Ichimura, Role of sugars in senescence and biosynthesis of ethylene in cut flowers, *JARQ – Jpn. Agric. Res. Q.* 37 (2003) 219–224.
- [4] U. Pun, H.T. Shimizu, K. Ichimura, Effect of sucrose on ethylene biosynthesis in cut spray carnation flowers, *Acta Hort.* 669 (2005) 171–174.
- [5] F. Hoeberichts, W. van Doorn, O. Vorst, R. Hall, M. van Wordragen, Sucrose prevents up-regulation of senescence-associated genes in carnation petals, *J. Exp. Bot.* 58 (2007) 2873–2885.
- [6] S. Verlinden, J. Garcia, Sucrose loading decreases ethylene responsiveness in carnation (*Dianthus caryophyllus* cv. White Sim) petals, *Postharvest Biol. Technol.* 31 (2004) 305–312.
- [7] E.J. Woltering, W.G. van Doorn, Role of ethylene in senescence of petals – morphological and taxonomical relationships, *J. Exp. Bot.* 39 (1988) 1605–1616.
- [8] H. Elgar, A. Woolf, R. Bielecki, Ethylene production by three lily species and their response to ethylene exposure, *Postharvest Biol. Technol.* 16 (1999) 257–267.
- [9] G. Burchi, B. Nesi, A. Grassotti, A. Mensuali-Sodi, A. Ferranti, Longevity and ethylene production during development stages of two cultivars of *Lilium* flowers ageing on plant or in vase, *Acta Hort.* 682 (2005) 813–820.
- [10] W. van Doorn, S.S. Han, Postharvest quality of cut lily flowers, *Postharvest Biol. Technol.* 62 (2011) 1–6.
- [11] J.J. van der Meulen-Muisers, J.C. van Oeveren, L.H. van der Plas, J.M. van Tuyl, Postharvest flower development in Asiatic hybrid lilies as related to tepal carbohydrate status, *Postharvest Biol. Technol.* 21 (2001) 201–211.
- [12] D. Goszczyńska, R. Rudnicki, M. Reid, The role of plant hormones in the postharvest life of cut flowers, *Acta Hort.* 167 (1985) 79–94.
- [13] S. Tripathi, N. Tuteja, Integrated signaling in flower senescence: an overview, *Plant Signal. Behav.* 2 (2007) 437–445.
- [14] Y. Zhou, C. Wang, H. Ge, F. Hoeberichts, P. Visser, Programmed cell death in relation to petal senescence in ornamental plants, *Acta Bot. Sin.* 47 (2005) 641–650.
- [15] W.G. van Doorn, E.J. Woltering, Physiology and molecular biology of petal senescence, *J. Exp. Bot.* 58 (2008) 453–480.
- [16] F. Rolland, E. Baena-Gonzalez, J. Sheen, Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms, *Annu. Rev. Plant Biol.* 57 (2006) 675–709.
- [17] L. Arrom, S. Munné-Bosch, Tocopherol composition in flower organs of *Lilium* and its variations during natural and artificial senescence, *Plant Sci.* 179 (2010) 289–295.
- [18] S. Munné-Bosch, P. Lalueza, Age-related changes in oxidative stress markers and abscisic acid levels in a drought-tolerant shrub, *Cistus clusii* grown under Mediterranean field conditions, *Planta* 225 (2007) 1039–1049.
- [19] M.E. Abreu, S. Munné-Bosch, Salicylic acid deficiency in *NahG* transgenic lines and *sid2* mutants increases seed yield in the annual plant *Arabidopsis thaliana*, *J. Exp. Bot.* 60 (2009) 1261–1271.
- [20] A. Trivellini, A. Ferrante, P. Vernieri, G. Carmassi, G. Serra, Spatial and temporal distribution of mineral nutrients and sugars throughout the lifespan of *Hibiscus rosa-sinensis* L. flower, *Cent. Eur. J. Biol.* 6 (2011) 365–375.
- [21] A. Ranwala, W. Miller, Sucrose-cleaving enzymes and carbohydrate pools in *Lilium longiflorum* floral organs, *Physiol. Plant.* 103 (1998) 541–550.
- [22] S. Hwang, P. Lee, J. Lee, Effect of holding solutions on vase life and sugar content during flower senescence of cut *Lilium* oriental hybrid ‘Casa Blanca’, *Korean J. Hort. Sci.* 27 (2009) 263–268.
- [23] K. Shibuya, T. Yoshioka, T. Hashiba, S. Satoh, Role of gynoecium in natural senescence of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flowers, *J. Exp. Bot.* 51 (2000) 2067–2073.

- [24] T. Panavas, E.L. Walker, B. Rubinstein, Possible involvement of abscisic acid in senescence of daylily petals, *J. Exp. Bot.* 49 (1998) 1987–1997.
- [25] D. Hunter, A. Ferrante, P. Vernieri, M. Reid, Role of abscisic acid in perianth senescence of daffodil (*Narcissus pseudonarcissus* 'Dutch Master'), *Physiol. Plant.* 121 (2004) 313–332.
- [26] P. León, J. Sheen, Sugar and hormone connections, *Trends Plant. Sci.* 8 (2003) 110–116.
- [27] J. Sheen, L. Zhou, J.C. Jang, Sugars as signaling molecules, *Curr. Opin. Plant Biol.* 2 (1999) 410–418.
- [28] A. Wingler, A. von Schaewen, R. Leegood, P. Lea, W. Quick, Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars, and light. Effects on NADH-dependent hydroxypyruvate reductase, *Plant Physiol.* 116 (1998) 329–335.
- [29] J. Lee, M. Roh, Carbohydrate changes during flower senescence of Easter lily (*Lilium longiflorum* Thunb.), *Acta Hortic.* 900 (2011) 295–300.

Supplementary data



Supp. Fig. 1 A detail of chromatograms obtained from a mixture of standards (a) and from a sample (b)



Suppl. Fig. 2 Hydration of various floral tissues in control and sucrose-treated cut *Lilium* flowers at anthesis. Data correspond to the mean \pm SE of n=4. Results of statistics are shown in the insets (ANOVA, $P < 0.05$). No significant differences between treatments (Student's *t*-test, $P < 0.05$) were observed. NS, not significant.

CAPÍTOL 4:
REGULACIÓ HORMONAL DE LA SENESCÈNCIA
FOLIAR EN *LILIUM*

CAPÍTOL 4

HORMONAL REGULATION OF LEAF SENESCENCE IN *LILIAM*

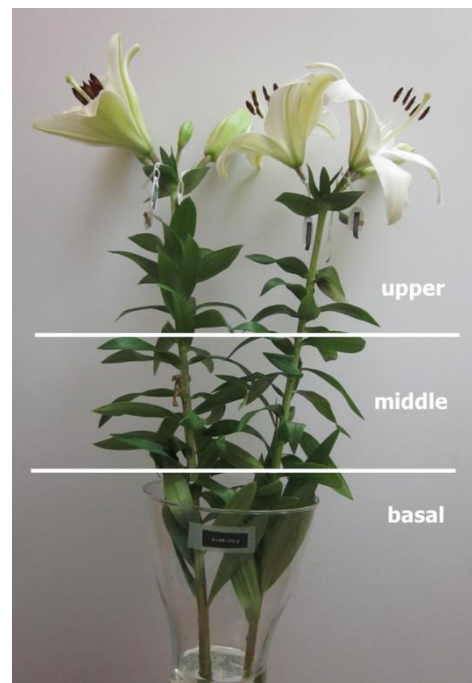
Laia Arrom · Sergi Munné-Bosch

*Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona,
Spain*

Enviat a *Journal of Plant Physiology*



Senescència foliar de *Lilium*
induïda per foscor



Divisió dels nivells foliars de *Lilium*

RESUM DEL CAPÍTOL 4

A part de la senescència i longevitat florals, el control de la senescència foliar esdevé també un factor important en la determinació de la qualitat de la flor tallada de moltes espècies comercials, com ara els *Lilium*. Per tal de comprendre millor el procés fisiològic de la senescència de les fulles d'aquesta espècie, es van avaluar (i) la variació dels nivells hormonals endògens durant la senescència foliar (ii) els efectes de la privació de llum i els canvis hormonals associats a aquesta en el progrés de la senescència, i (iii) els efectes dels tractaments en esprai d'àcid abscísic (ABA) i Pyrabactin en la senescència de les fulles. Els resultats van mostrar que mentre els nivells de gibberel·lina 4 (GA_4) i àcid salicílic (SA) disminuïen, el contingut en ABA incrementava amb l'avenç de la senescència foliar. No obstant, tot i que la senescència induïda per foscor implicava un major augment dels nivells d'ABA, el tractament no afectava els nivells de GA_4 ni de SA, que sembla que es correlacionaven millor amb la temperatura de l'aire i/o fotoperíode que amb la inducció de la senescència foliar. D'altra banda, la polvorització de Pyrabactin retarda la progressió de la senescència foliar en la flor tallada. Per tant, es conclou que (i) l'ABA té un paper important en la regulació de la senescència foliar del *Lilium*, (ii) la foscor promou la senescència foliar i augmenta els nivells d'ABA, i (iii) les aplicacions exògenes de Pyrabactin inhibeixen la senescència foliar en *Lilium*, suggerint-ne un efecte antagònic a l'ABA en fulles senescents de *Lilium*.

Hormonal regulation of leaf senescence in *Lilium*

Laia Arrom, Sergi Munné-Bosch*

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 April 2012

Received in revised form xxxx

Accepted xxxx

Keywords:

Abscisic acid

Leaf senescence

Lilium

Phytohormones

Pyrabactin

SUMMARY

In addition to floral senescence and longevity, the control of leaf senescence is a major factor determining the quality of several cut flowers, including *Lilium*, in the commercial market. To better understand the physiological process underlying leaf senescence in this species, we evaluated (i) endogenous variation in the levels of phytohormones during leaf senescence (ii) the effects of leaf darkening in senescence and associated changes in phytohormones, and (iii) the effects of spray applications of abscisic acid (ABA) and pyrabactin on leaf senescence. Results showed that while gibberellin 4 (GA₄) and salicylic acid (SA) contents decreased, that of ABA increased during the progression of leaf senescence. However, dark-induced senescence increased ABA levels, but did not affect GA₄ and SA levels, which appeared to correlate more with changes in air temperature and/or photoperiod than with the induction of leaf senescence. Furthermore, spray applications of pyrabactin delayed the progression of leaf senescence in cut flowers. Thus, we conclude that (i) ABA plays a major role in the regulation of leaf senescence in *Lilium*, (ii) darkness promotes leaf senescence and increases ABA levels, and (iii) exogenous applications of pyrabactin inhibit leaf senescence in *Lilium*, therefore suggesting that it acts as an antagonist of ABA in senescing leaves of cut lily flowers.

Introduction

Leaf senescence is an endogenously controlled process that occurs during the late stages of development and involves nutrient remobilisation to other plant parts and some degenerative changes leading these organs to death (Munné-Bosch and Alegre, 2004; van Doorn, 2011). Although flower senescence has received the most attention in the commercial sector of floriculture, leaf senescence is also considered an unwanted process that negatively affects the quality and vase life of several cut flowers and therefore, also deserves special attention (Ranwala and Miller, 1998;

van Doorn and Han, 2011). Leaf age is one of the major factors triggering leaf senescence in plants; the oldest leaves at the bottom of a canopy enter senescence earlier than the upper leaves. Shading also initiates leaf senescence in old leaves; thus, reduced photosynthesis associated with nutrient remobilisation in the senescing lower leaves allows the maintenance of high growth rates in the upper youngest leaves of the canopy and can even improve reproductive vigour under some circumstances (Wingler et al., 2006). Furthermore, leaves of cut flowers are usually exposed to shading once obtained from the commercial market and enter senescence very quickly. Studying the hormonal regulation of leaf senescence and how shading affects this process is therefore essential to improve the quality and vase life of several cut flowers, including those of *Lilium*.

Abbreviations: ABA, abscisic acid; GA₄, gibberellin 4; IAA, indole-3-acetic acid; JA, jasmonic acid; LMA, leaf mass area; RWC, relative water content; SA, salicylic acid.

*Corresponding author: smunne@ub.edu Tel.: +34 934 02 14 63; fax: +34 934 11 28 42.

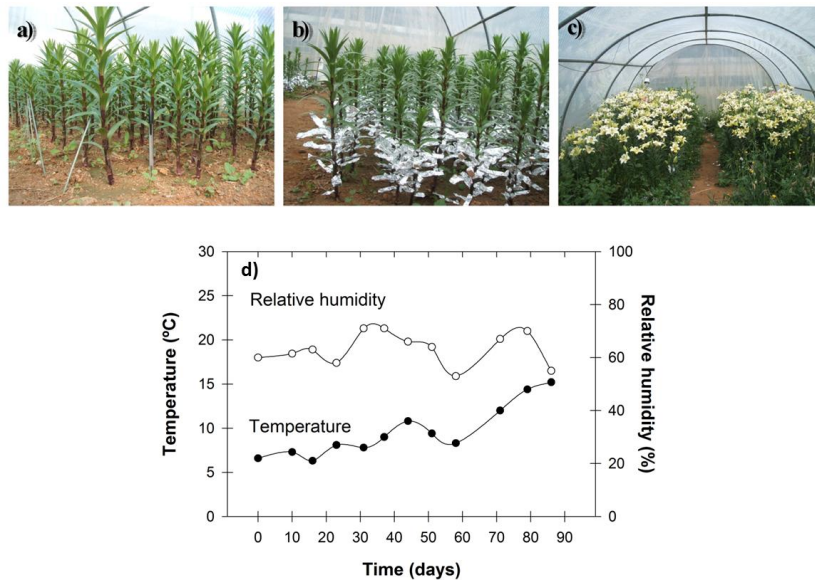


Fig. 1 Detail of control (a) and covered (b) *Lilium* L.A. Courier plants at the start of the experiment. Both plant groups are shown together at the middle of the experimental period during anthesis (c). Pre-dawn air temperature and relative humidity in the greenhouse (d). Anthesis occurred in both plant groups at the same time: 35 days from the start of the experiment.

Lilium is a genus of herbaceous flowering plants that grow from bulbs and includes several plant species. Among them, *L. longiflorum* is one of the most sold worldwide, including some hybrids such as that used in the present study, the Longiflorum-Asiatic (L.A.) hybrid 'Courier'. Despite flowers of *Lilium*, also known as lilies (this is also a term used for other unrelated species), being one of the most economically important species in the floriculture market and leaf senescence being an important quality trait of cut flowers, the hormonal regulation of leaf senescence in this species remains largely unknown. To our knowledge, the only information available to date is that gibberellins and cytokinins, alone or combined in the form of several commercial products such as Promalin (GA_{4+7} + benzyladenine), are very effective in delaying not only flower but also leaf senescence in lilies (Ranwala and Miller, 1998; Whitman et al., 2001). However, while in *Lilium* flowers abscisic acid (ABA) might reduce flower longevity by accelerating flower senescence (Arrom and Munné-Bosch, 2012), nothing is known about the possible role of ABA and other plant growth regulators in the control of leaf senescence in this species, including auxins, jasmonic acid (JA) and salicylic acid (SA), which are known to be generally involved in senescing processes in the leaves of several

other species. While auxins are generally considered inhibitors of senescence together with cytokinins, which seem to play the most important role, ABA, JA and SA are thought to be involved in promoting the process, both in developmentally-regulated and stress-induced leaf senescence (He et al., 2002; Buchanan-Wollaston et al., 2005; Ellis et al., 2005; Abreu and Munné-Bosch, 2009; Lee et al., 2011; see also Schippers et al., 2007 and references therein).

In the present study, we hypothesised that (i) phytohormones, such as cytokinins, auxins, gibberellins and ABA, and other plant growth regulators, such as JA and SA, may be involved in regulating leaf senescence in *Lilium*, (ii) hormonal regulation of this process occurs in shaded leaves, and (iii) leaf shading of the bottom leaves influences anthesis time and reproductive vigour in the cultivation of this species. Since endogenous ABA levels increased during the progression of leaf senescence and particularly during dark-induced leaf senescence, we hypothesised that ABA or pyrabactin applications alter the senescing process. Pyrabactin is a synthetic sulphonamide that was initially described as an agonist molecule of ABA in inhibiting seed germination or hypocotyl growth as well as in promoting ABA-responsive gene expression (Park et al., 2009). Furthermore, the role of

this ABA agonist has also been shown recently in stomatal closure in abaxial epidermis of pea (Puli and Raghavendra, 2012) and in shortening the vase life of *Lilium* flowers (Arrom and Munné-Bosch, 2012). However, apart from mimicking ABA, it has also been shown that pyrabactin can also act as an antagonist of certain ABA receptors (Melcher et al., 2010; Peterson et al., 2010). Nevertheless, to our knowledge, the effects of pyrabactin on leaf senescence have not been explored in any plant species.

Materials and methods

Plant material, growth conditions and sampling

Plants were obtained from bulbs of *Lilium* L.A. 'Courier' (purchased from Mapifloricultura S.L., Madrid, Spain) on 25th November 2008 in the Calcic Luvisol (FAO) of a PVC-made greenhouse on the experimental fields of the Faculty of Biology at the University of Barcelona. The planting density was 45 bulbs m⁻². Plants were watered with tap water once a week throughout the experiment.

For the study of natural and dark-induced leaf senescence (experiment 1), plants were separated into two groups of 200 individuals each. In the first group, 15 basal leaves from each plant, which represented about 15% of the total number of leaves, were covered with aluminium foil on 27th January 2009. In the other plant group, leaves were not covered (Fig. 1). Samplings were performed weekly from 6 randomly selected plants at every sampling time point and before dawn from 26th January to 22nd April. For biochemical analyses, leaves were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. During the study, pre-dawn air temperature and relative humidity ranged from 6.3 to 15.2 °C and 53 to 71 %, respectively (Fig. 1). Temperature and relative humidity were monitored by a portable thermohygrometer model EB313HGN (Oregon Scientific Ibérica S.A., Alcobendas, Spain).

For spray applications on leaves

(experiment 2), lily inflorescences were purchased from a local market on 14th July 2011 and placed in the laboratory in 1.3-L vases filled with distilled water and put in darkness. The following treatments were immediately applied: abscisic acid (ABA) 5·10⁻⁵ M, pyrabactin 5·10⁻⁵ M, distilled water (control) and Promalin® (100mg L⁻¹ gibberellin 4+7 and benzyladenine), which was used as a positive control, and their combinations ABA+pyrabactin, ABA+Promalin, Promalin+pyrabactin, and ABA+Promalin+pyrabactin. All treatment solutions, including controls, contained 0.5% dimethyl sulphoxide (DMSO), which was used to dilute ABA and pyrabactin, and 0.1% Tween-20, which was used as a surfactant. Fifteen mL of each solution was sprayed directly onto inflorescence stems and senescence markers were measured the day after spraying and every 3 to 4 days for 2 weeks. Stems were divided into three vertical thirds, distinguishing between basal, middle and upper leaves for measurements.

Plant growth and hydration

The biomass and water contents of bulbs, leaves, stems (without leaves or flowers) and flowers were measured per plant from 4 individuals at the start, middle and end of experiment 1 on 6th February, 3rd and 27th April. The measurements performed on 3rd April corresponded to the time of anthesis (all plants had at least one flower at anthesis). Biomass and hydration (H) were measured by weighing the samples before and after drying to a constant weight at 80 °C. H was determined as (FW-DW)/DW, where FW is fresh matter and DW dry matter after oven-drying the samples.

Leaf biomass, RWC and LMA

Leaf biomass was measured by weighing the samples before and after drying to a constant weight at 80 °C. The relative water content (RWC) was determined as (FW-DW)/(TW-DW), where FW is fresh matter, TW turgid weight after hydrating the leaves with distilled water for 24h at 4 °C, and DW is dry matter after oven-drying the samples. Leaf

area was estimated by using a flatbed scanner (model CX- 5400; Epson Stylus, Nagano, Japan) and an image-processing program (Leaf area measurement 1.3, Askew, UK). Leaf mass area (LMA) was measured as the ratio of leaf area per DW.

Chlorophyll contents and F_v/F_m ratio

For experiment 1, chlorophyll contents were estimated spectrophotometrically in 80% (v/v) acetone extracts as described previously (Lichtenthaler and Wellburn 1983). For experiment 2, chlorophyll contents were measured with a Chlorophyllmeter SPAD-502 (Minolta, Osaka, Japan). The F_v/F_m ratio was measured in both experiments from chlorophyll fluorescence data obtained from leaves with a chlorophyll fluorometer mini-PAM (Walz, Effeltrich, Germany) following the equations described by van Kooten and Snel (1990).

Phytohormone analysis

Phytohormone levels were determined by UPLC-MS/MS as described earlier (Müller and Munné-Bosch 2011).

Statistical analysis

Differences between treatments were evaluated using the analysis of variance (ANOVA) and Duncan's post hoc test, and were considered significant at a probability level of $P < 0.05$.

Results

Leaf senescence markers

Plants of both groups (covered and uncovered leaves) were not distinguishable at any time point of the experiment in terms of plant growth and hydration of bulbs, stems, leaves and flowers (Fig. 2). The only difference was that darkened basal leaves showed a clear senescing phenotype. Leaf biomass, expressed on a fresh weight basis, decreased during the progression of leaf senescence in control plants, particularly after anthesis, which occurred 35 days after the start of the experiment (Fig. 3). From day 42 and beyond, leaf biomass drastically decreased, attaining very low levels at the end of the experiment. In plants with covered leaves, leaf darkening accelerated biomass loss, which was already observed during the first week of the study and therefore occurred well before anthesis, which was also observed by day 35 as in the controls. Despite the acceleration in biomass loss, both plant groups reached the same very low biomass values by the end of the experiment (Fig. 3). Concomitant reductions in RWC were observed in both plant groups during the progression of leaf senescence. In contrast, LMA was slightly lower throughout the experiment in covered plants than in controls. The chlorophyll a+b levels and the F_v/F_m ratio, which is indicative of photoinhibition of photosystem II, changed mostly in parallel to fresh biomass, with a rapid decline in both parameters at the start of

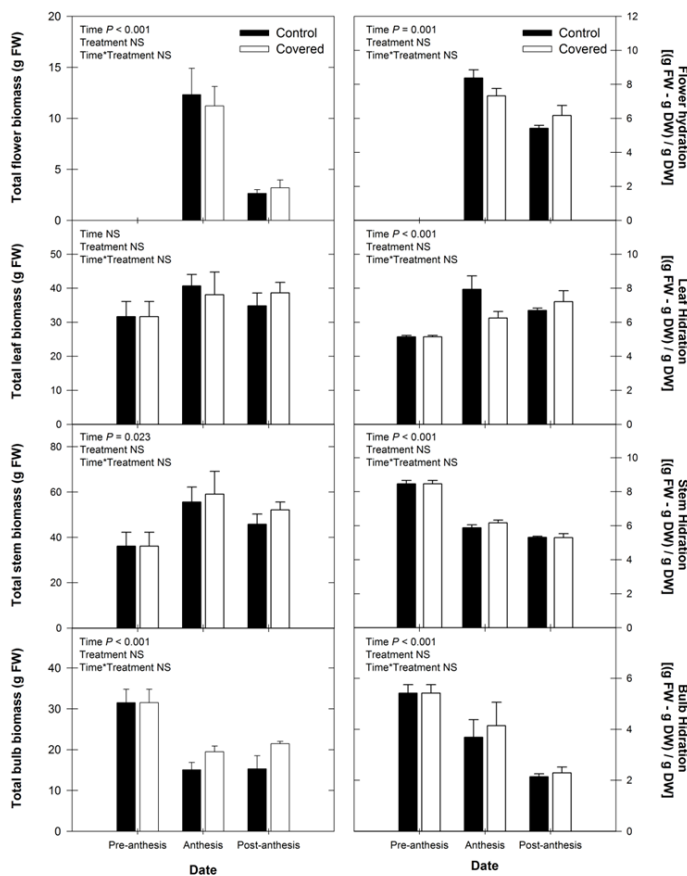


Fig. 2 Total flower, leaf, stem and bulb biomass and hydration of *Lilium* plants at the start, middle (at anthesis) and end of the experiment in control and covered plants. Data correspond to the mean \pm SE of $n=4$. Statistical results are shown in the inlets (two-way ANOVA, $P < 0.05$). NS, not significant.

the dark treatment. However, the chlorophyll a/b ratio was only significantly reduced at the late stages of senescence in control plants (after 60 days) and just after anthesis in covered plants (Fig. 3). Markers of leaf senescence therefore showed that despite both groups opening their flowers at the same time, anthesis marked a decline in leaf biomass, RWC and the F_v/F_m ratio in control plants and a decline in the chlorophyll a/b ratio in covered plants, while in the latter, leaf biomass, RWC and the F_v/F_m ratio drastically decreased just a few days after darkening.

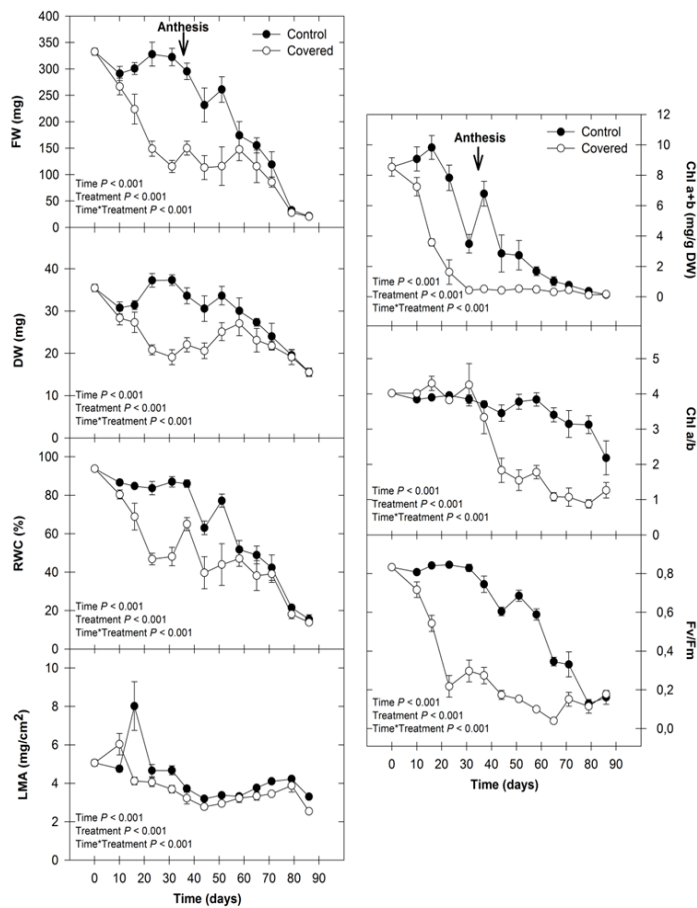


Fig. 3 Total fresh and dry weight, relative water content (RWC), leaf mass area (LMA), chlorophyll (Chl) a+b levels, and the Chl a/b and F_v/F_m ratios in control and covered leaves of *Lilium*. Data correspond to the mean \pm SE of $n=4$ for Chl and of $n=6$ for other parameters. Statistical results are shown in the inlets (two-way ANOVA, $P < 0.05$). The arrow shows the time of anthesis.

Leaf age-induced changes in phytohormones

Among the cytokinins investigated, zeatin riboside was the one present at the highest concentrations in leaves, ranging between 1 and 35 ng/g of dry weight, while others

(including zeatin, 2-isopentenyladenine, isopentenyladenosine, dehydrozeatin and dehydrozeatin riboside) fell below 0.1 ng/g of dry weight in all samples and could not be properly quantified. Zeatin riboside increased significantly in both plant groups during the first 2 weeks of the experiment and then declined slowly but progressively until the end of the experiment. However, neither leaf age nor treatment (covered *vs.* control plants) significantly affected cytokinin levels in leaves during the entire time course (Fig. 4). While cytokinins and auxins did not show any significant variations either with leaf age or treatment, ABA levels increased during the progression of leaf senescence in both treatments, although to a different extent (Fig. 4). ABA levels increased just after anthesis in the leaves of control plants, but started to increase slightly before in covered plants. Furthermore, the maximum ABA levels were 3.7 $\mu\text{g/g}$ of dry weight for control and 7.9 $\mu\text{g/g}$ of dry weight for covered plants. Therefore, leaf darkening led to an earlier and higher ABA accumulation in senescing leaves. It is worth noting, however, that ABA increases (Fig. 4) did not correlate with reductions in chlorophyll levels or the F_v/F_m ratio, which occurred much earlier (Fig. 3).

Among the gibberellins analysed, the active GA_4 and its immediate precursors GA_9 and GA_{24} were found in leaves. GA_{24} showed the largest variations between samples, while GA_4 occurred at the highest amounts at the start of the experiments (Fig. 4). Interestingly, GA_4 was also the only one to show a progressive, but significant decline with leaf age, although differences between treatments were observed in GA_9 only. However, such differences were clearly apparent only on day 30 of treatment, with high variability between individuals of the same group (in this case, control plants) being observed at this sampling time point. A similar trend was observed with JA levels, which differed between treatments but only clearly at a single time point (71 days) and with high variability within the same plant group (Fig. 4). Although SA levels did not differ between plant groups, they decreased progressively during leaf ageing,

similar to that of GA₄ (Fig. 4). Therefore, it appears that both GA₄ and SA decreased with the progression of natural leaf ageing, while ABA increased. Moreover, leaf darkening accelerated the process and induced ABA increases, so that ABA was the only phytohormone whose levels were revealed to be altered both with the progression of leaf senescence in control and darkened leaves.

Spray applications of pyrabactin delay the progression of leaf senescence

The effects of spray applications of ABA and pyrabactin on leaf senescence were compared to distilled water (control) and Promalin (positive control). Furthermore, the effects of several combinations of hormones, including ABA+pyrabactin, ABA+Promalin, Promalin+pyrabactin and ABA+Promalin+pyrabactin, were also evaluated in basal, middle and upper leaves of the canopy (Fig. 5). In basal leaves, an 85% reduction in chlorophyll levels after 14 days was observed in controls. In contrast, Promalin showed a 25% reduction only in chlorophyll levels during the same period. While ABA did not have any effect on chlorophyll levels, pyrabactin maintained higher chlorophyll contents for longer compared to ABA or control treatments, though to a lesser extent than Promalin (Fig. 5). While chlorophyll levels in control and ABA treatments decreased on day 6, chlorophyll levels in leaves sprayed with pyrabactin decreased on day 10. Furthermore, chlorophyll levels on day 14 were 2.8-fold higher with pyrabactin compared to controls, but also 50 % lower than that with Promalin. Hormonal interactions revealed that ABA reverted the positive effect of pyrabactin alone, since spray application of ABA+pyrabactin had the same effect as ABA alone or control. Furthermore, the combination of Promalin and pyrabactin did not have an additive or synergistic effect, but had an effect similar to that of Promalin or pyrabactin alone (Fig. 5). The results obtained for the F_v/F_m ratio were very similar to that of chlorophyll loss in all treatments, except that reductions in this parameter appeared later on in time and were therefore not so apparent between treatments

in several cases (Fig. 5). Differences between treatments were not so evident in the middle leaves, although Promalin prevented chlorophyll loss to the highest extent after two weeks, followed by pyrabactin, but these differences were not significantly different. The same pattern described for chlorophyll loss was observed for the F_v/F_m ratio regarding the different hormonal treatments and combinations, but differences were smaller for F_v/F_m, as they occurred in basal leaves and were not significant. Hormonal treatments had no significant effects when changes in chlorophyll and the F_v/F_m ratio were evaluated in the upper leaves, except for a slight effect of Promalin and ABA on the F_v/F_m ratio on day 12 (Fig. 5).

Discussion

It is well known that phytohormones are involved in regulating leaf senescence, but their specific activities can vary depending on the species. Very little is known about leaf senescence in ornamental plants, despite its high interest as a quality marker of vase life in several cut flowers such as lilies (van Doorn and Han 2011). Cytokinins and ABA have been proposed as the most important signals controlling leaf senescence in several species (Gan and Amasino 1995; Haberer and Kieber 2002). It has also been shown that spray applications of Promalin (GAs+cytokinins) largely improve the vase life of lilies, not only reducing flower abortion and increasing flower longevity, but also increasing leaf lifespan (Ranwala and Miller, 1998). In the present study, we showed that the endogenous contents of GA₄ and SA decreased, while ABA levels increased during the progression of leaf senescence. Furthermore, zeatin riboside levels decreased during the progression of leaf senescence from the first two weeks of the experiment and onwards. However, when leaf senescence was accelerated by darkening, the only phytohormone that significantly changed in a consistent manner was ABA, therefore indicating its major role in regulating the progression of dark-induced senescence in this species. Interestingly, ABA levels increased later on in time compared to reductions in

chlorophyll levels and the F_v/F_m ratio in dark-senescing leaves, suggesting that ABA is not the major factor regulating the dismantling of chloroplasts, which is known to occur during nutrient remobilisation. It is possible that

ABA may act at a late stage in dark-induced senescence, accelerating the process. It is also interesting to note that ABA levels decreased again during the last two sampling time points, when the RWC of both plant groups

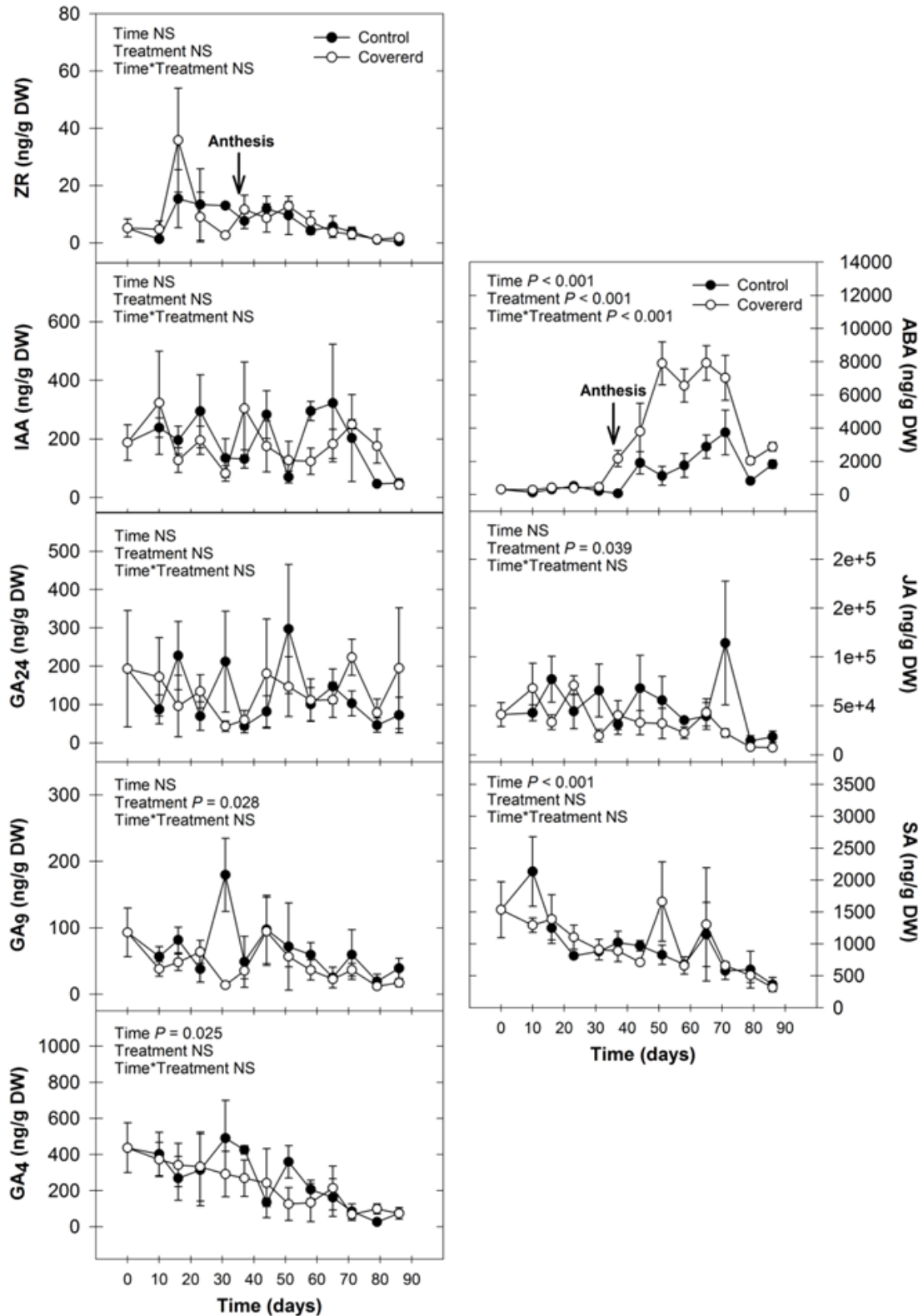


Fig. 4 Endogenous zeatin riboside (ZR), indole-3-acetic acid (IAA), gibberellin 24, 9 and 4 (GA₂₄, GA₉ and GA₄, respectively), abscisic acid (ABA), jasmonic acid (JA) and salicylic acid (SA) levels in control and covered leaves of *Lilium*. Data correspond to the mean \pm SE of $n=4$. Statistical results are shown in the inlets (two-way ANOVA, $P<0.05$). NS, not significant. The arrow shows the time of anthesis.

were at their minimum and below 30%, probably due to cell death processes. ABA levels decreased during this late stage in both plant groups (covered and controls), indicating that ABA is no longer needed or used to protect cells against leaf senescence-induced water loss. This is in agreement with recent findings suggesting that the leaf senescence associated gene *SAG113*, a negative regulator of ABA signalling, is specifically involved in controlling water loss during leaf senescence in *Arabidopsis* (Zhang and Gan 2012; Zhang et al., 2012). Therefore, our results suggest that ABA also plays a major role in regulating leaf senescence in lilies and particularly in dark-induced senescence, with covered leaves suffering a severe reduction in RWC followed by a sharp increase in ABA levels.

Aside from endogenous variations in ABA, the time course evolution experiments revealed that SA levels also significantly altered during the progression of leaf senescence, showing slight reductions with time. This is inconsistent with previous findings that supported SA as a promoter of leaf senescence in several species (Morris et al., 2000; Buchanan-Wollaston et al., 2005; García-Heredia et al., 2008; Abreu and Munné-Bosch 2008, 2009). Apart from its role in protecting against biotic stress (Mur et al., 1996; Halim et al., 2006), SA has been shown to be involved in plant thermotolerance (Dat et al., 1998) and chilling resistance (Kang et al., 2007; Chen et al., 2011). Thus, it is likely that the progressive SA reductions observed here with ageing leaves resulted from a reduction in its biosynthesis due to the progressive increases in temperature during the study. Furthermore, it is possible that SA conjugates followed a different pattern during the progression of leaf senescence, an aspect that warrants further investigation. Variations in other hormones, such as GA₄, that followed a similar pattern to SA could also be due to variations in climatic conditions, such as air temperature and the increased photoperiod during the study progression. Indeed, it has been shown that GA levels are under photoperiod control (Olsen et al., 2006). The present study underlines the complexity of

establishing causal relationships between changes in hormones and leaf senescence by measuring endogenous variations of phytohormones alone.

To better understand the role of phytohormones in regulating leaf senescence and confirm that ABA was indeed involved in the process of leaf senescence in *Lilium*, we evaluated the extent to which spray applications of ABA and pyrabactin altered the chlorophyll loss and reductions of the F_v/F_m ratio associated with leaf senescence. Pyrabactin, first identified as an ABA analogue (Park et al., 2009; Ma et al., 2009), has more recently been described as an antagonist of ABA through its effects on specific ABA receptors, the so-called *PYR1* from pyrabactin (Peterson et al., 2010; Melcher et al., 2010). To our knowledge, this is the first study that explores and demonstrates an effect of pyrabactin on leaf senescence in a plant species. The results suggest that pyrabactin acts as an ABA antagonist in the regulation of leaf senescence by delaying and reducing chlorophyll loss and reductions in the F_v/F_m ratio, particularly in basal leaves, which were the most sensitive to the hormone treatments applied in the present study. *PYR1* seems to, therefore, be specifically involved in ABA signalling, leading to leaf senescence in lilies. However, further research is needed to establish the components of this signalling cascade, starting from the identification of a *PYR1* homologue in lilies. From a commercial point of view, it is also noteworthy that pyrabactin was not as effective as Promalin in inhibiting the progression of leaf senescence in lilies and that they both did not play an additive or synergistic role. Instead, pyrabactin reduced the positive effects of Promalin when applied together, thus suggesting a complex interplay of hormonal effects in regulating leaf senescence in lilies. Furthermore, it is noteworthy that pyrabactin can promote under some circumstances flower senescence in lilies (Arrom and Munné-Bosch, 2012), thus indicating a complete different sensitivity and response to pyrabactin between leaves and flowers in lilies, an aspect that warrants further investigations.

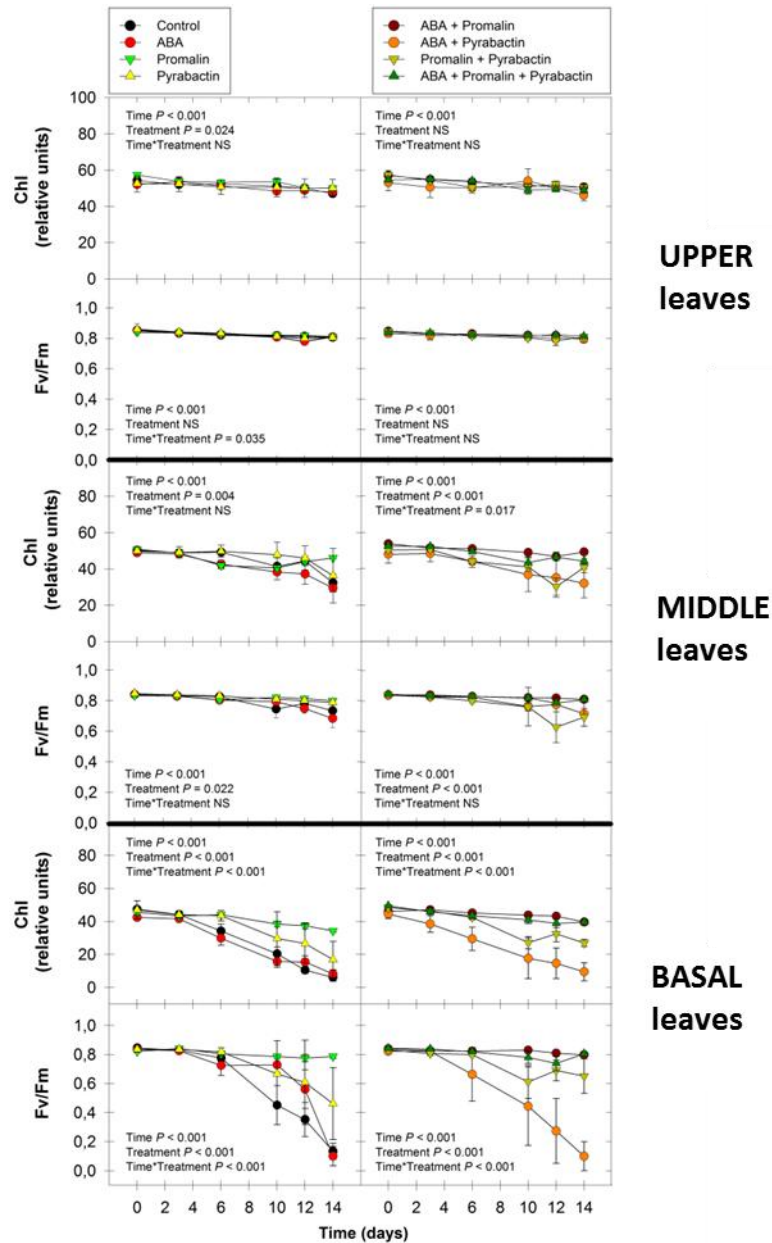


Fig. 5 Chlorophyll contents (expressed in relative units) and the F_v/F_m ratio of upper, middle and basal *Lilium* leaves treated with different hormonal spray applications. Data correspond to the mean \pm SE of $n=6$. Statistical results are shown in the inlets (two-way ANOVA, $P < 0.05$).

Another important aspect considered here was examining the effects of leaf shading of a significant part of the canopy on flowering time and reproductive vigour. Leaf shading can drastically reduce the photosynthetic capacity of leaves, as demonstrated here in the reduction of the F_v/F_m ratio, and simultaneously induce nutrient remobilisation to other plant parts. Thus, other plant parts can benefit from this nutrient remobilisation; however, effects largely depend on the timing of leaf senescence (Wingler et al., 2006). If leaf senescence occurs too early, it can reduce plant vigour in terms of accumulated photosynthetic biomass to sustain reproduction. If it occurs at

early stages or during reproduction, nutrients from senescing leaves can be used for flower, fruit and seed production. Here, covering 15% of the leaves did not significantly influence overall biomass production, flowering time or reproductive vigour (in terms of flower biomass production). A possible explanation of the lack of effect might be that leaf senescence was induced too early. Another possibility is that in lilies and other similar species, most of the vegetative and reproductive growth is sustained by nutrients accumulating in the bulb, which are essential for reproduction (Gandin et al., 2011). Therefore, coverage of 15% of the leaves was too small to see any

significant effects. This appears to be the case since total leaf biomass was not affected, indicating that plants could sustain reproduction equally well despite shading in the most basal leaves. However, the fact that a hybrid was used in the present study did not allow us to explore a possible effect on fruit and seed production.

We therefore conclude that (i) ABA plays a major role in regulating leaf senescence in *Lilium*, (ii) darkness promotes leaf senescence and increases ABA levels, and (iii) exogenous applications of pyrabactin inhibit leaf senescence in *Lilium*, possibly by acting as an ABA antagonist in senescing leaves of cut lily flowers. Further research is needed to examine the possible role of other hormones, such as ethylene and its possible interactions with ABA, in the process of leaf senescence in this species.

Acknowledgements

We are very grateful to the Serveis Científic-Tècnics and Serveis dels Camps Experimentals (Universitat de Barcelona) for technical assistance. Support for the research was received through the ICREA Academia award given to S.M.-B., funded by the Generalitat de Catalunya.

References

- Abreu ME, Munné-Bosch S. Salicylic acid may be involved in the regulation of drought-induced leaf senescence in perennials: A case study in field-grown *Salvia officinalis* L. plants. *Environ Exp Bot* 2008;64:105-12.
- Abreu ME, Munné-Bosch S. Salicylic acid deficiency in *NahG* transgenic lines and *sid2* mutants increases seed yield in the annual plant *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 2009;60:1261-71.
- Arrom L, Munné-Bosch S. Hormonal changes during flower development in floral tissues of *Lilium*. *Planta* 2012;doi: 10.1007/s00425-012-1615-0.
- Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, Breeze E, Lim PO, Nam HG, et al. Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J* 2005;42:567-85.
- Chen S, Zimei L, Cui J, Jiangang D, Xia X, Liu D, Yu J. Alleviation of chilling-induced oxidative damage by salicylic acid pretreatment and related gene expression in eggplant seedlings. *Plant Growth Regul* 2011;65:101-108.
- Dat JF, Foyer CH, Scott IM. Changes in salicylic acid and antioxidants during induced thermotolerance in mustard seedlings. *Plant Physiol* 1998;118:1455-61.
- Ellis CM, Nagpal P, Young JC, Hagen G, Guilfoyle TJ, Reed JW. AUXIN RESPONSE FACTOR1 and AUXIN RESPONSE FACTOR2 regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 2005;132:4563-74.
- Gan S, Amasino RM. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* 1995;270:1986-88.
- Gandin A, Gutjahr S, Dizengremmel P, Lapointe L. Source-sink imbalance increases with growth temperature in the spring geophyte *Erythronium americanum*. *J Exp Bot* 2011;62:3467-79.
- García-Heredia JM, Hervás M, De la Rosa MA, Navarro JÁ. Acetylsalicylic acid induces programmed cell death in *Arabidopsis* cell cultures. *Planta* 2008;228:89-97.
- Haberer G, Kieber JJ. Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. *Plant Physiol* 2002;128:345-62.
- He Y, Fukushige H, Hildebrand DF, Gan S. Evidence supporting a role of jasmonic acid in *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant Physiol* 2002;128:876-84.
- Halim VA, Vess A, Scheel D, Rosahl S. The role of salicylic acid, jasmonic acid in pathogen defense. *Plant Biol* 2006;8:307-13.
- Kang G, Wang Z, Xia K, Sun G. Protection of ultrastructure in chilling-stressed banana leaves by salicylic acid. *J Zhejiang Univ Sci B* 2006;8:277-82.
- Lee IC, Hong SW, Whang SS, Lim PO, Nam HG, Koo JC. Age-dependent action of an ABA-inducible receptor kinase, RPK1, as a positive regulator of senescence in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell Physiol* 2011;52:651-62.
- Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E. Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 2009;324:1064-68.
- Melcher K, Xu Y, Ng LM, Zhou XE, Soon FF, Chinnusamy V, Suino-Powell KM et al. Identification and mechanism of ABA receptor antagonism. *Nat Struct Mol Biol* 2010;17:1102-08.
- Morris K, AH-Mackerness S, Page T, John CF, Murphy AM, Carr JP, Buchanan-Wollaston V. Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *Plant J* 2000;23:677-85.
- Müller M, Munné-Bosch S. Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Plant Meth* 2011;7:37.
- Munné-Bosch S, Alegre L. Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Func Plant Biol* 2004;31:203-16.
- Mur LAJ, Naylor G, Warner SAJ, Sugars JM, White RF, Draper J. Salicylic acid potentiates defence gene expression in tissue exhibiting acquired resistance to pathogen attack. *Plant J* 1996;9:559-71.
- Olsen JE, Jensen E, Junttila O, Moritz T. Photoperiodic control of endogenous gibberellins in seedlings of *Salix pentandra*. *Physiol Plant* 2006;93:639-44.
- Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y et al. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 2009;324:1068-71.
- Peterson FC, Burgie ES, Park SY, Jensen DR, Weiner JJ, Bingman CA et al. Structural basis for selective activation of ABA receptors. *Nat Struct Mol Biol* 2010;17:1109-13.
- Puli MR, Raghavendra AS. Pyrabactin an ABA agonist induced stomatal closure and changes in signalling components of guard cells in abaxial epidermis of *Pisum sativum*. *J Exp Bot* 2012;63:1349-56.

- Ranwala AP, Miller WB. Gibberellin₄₊₇, benzyladenine, and supplemental light improve postharvest leaf and flower quality of cold-stored 'Star Gazer' hybrid lilies. *J Am Soc Hort Sci* 1998;123:563-68.
- Schippers JHM, Jing H, Hille J, Dijkwel PP. Developmental and hormonal control of leaf senescence. In: Gan S, editor. *Senescence Processes in Plants*, vol 26. Oxford: Blackwell Publishing, 2007, p 145-164.
- van Doorn WG. Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. *J Exp Bot* 2011;62:4749-61.
- van Doorn WG, Han SS. Postharvest quality of cut lily flowers. *Postharvest Biol Technol* 2011;62:1-6.
- van Kooten O, Snel JFH. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth Res* 1990;25:147-50.
- Whitman CM, Heins RD, Moe R, Funnell KA. GA₄₊₇ plus benzyladenine reduce foliar chlorosis of *Lilium longiflorum*. *Sci Hort* 2001;89:143-54.
- Wingler A, Purdy S, McLean JA, Pourtau N. The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. *J Exp Bot* 2006;57:391-99.
- Zhang K, Gan S. An ABA-AtNAP transcription factor-SAG113 PP2C regulatory chain for controlling dehydration in senescing *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol* 2012;158:961-69.
- Zhang K, Xia X, Zhang Y, Gan S. An ABA-regulated and Golgi-localized protein phosphatase controls water loss during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant J* 2012;69:667-78.



DISCUSSIÓ



DISCUSSIÓ

Donada la funció biològica de les flors, en la natura aquestes s'han de mantenir obertes fins que els objectius de fertilització de l'ovari i la dispersió del pol·len siguin assolits. Un cop pol·linitzada, l'objectiu principal de la flor passa de ser la recepció i dispersió del pol·len al desenvolupament i dispersió de les llavors produïdes. En aquest sentit, la pol·linització regula un seguit de respostes que modifiquen l'estructura floral, incloent la ràpida maduració de l'ovari (per tal que la fertilització sigui possible) i la pèrdua dels pètals o tèpals, gràcies a la inducció de la producció d'etilè en els diversos òrgans florals (revisat per O'Neill, 1997).

D'altra banda i inclús la flor no és pol·linitzada, la longevitat floral no esdevé il·limitada sinó finita, ja que el manteniment d'aquestes suposa un cost energètic que alhora incrementa amb l'edat. Així, quan la inversió per mantenir la flor viva supera el cost que suposa generar-ne una de nova, la planta es desfà de la flor vella mitjançant el procés de senescència floral. Per tant, la longevitat floral s'entén com una adaptació de l'espècie per a equilibrar els costos que suposen permetre la recepció del pol·len i el manteniment de la flor (revisat per Ashman i Schoen, 1994). D'altra banda, tot i esdevenir un procés inevitable, però, diversos factors (endògens i exògens) poden modular l'avenç de la senescència dels òrgans florals de manera que es permet retardar i/o accelerar el seu inici i progrés.

En aquest sentit i donada la seva importància econòmica en floricultura, nombrosos esforços han estat dirigits a l'intent de prolongar la vida útil de la flor tallada, ja que aquesta és una important característica que pot modificar tant l'èxit com el preu final de les varietats comercialitzades.

Amb la intenció de conèixer millor el procés de senescència en *Lilium*, un dels gèneres més utilitzats en el sector de la floricultura, es van voler determinar en primer lloc els efectes i el control de diferents reguladors endògens (dels quals es coneix que participen en la modulació de la senescència tant a nivell floral com foliar) en el progrés de la senescència natural i artificial (flor no tallada i tallada, respectivament). Amb aquesta informació endògena es pretengué ampliar el coneixement sobre la biologia de l'espècie per així, en el futur, poder manipular el procés i obtenir millores en la longevitat floral.

1. Regulació hormonal del procés de senescència floral

És ben sabut que les hormones vegetals juguen un important paper en el control i/o regulació del procés de senescència, però les funcions específiques o el pes de les seves accions poden variar depenent de diversos factors com ara l'espècie, l'etapa del desenvolupament o fins i tot el tipus d'òrgan vegetal analitzat.

En el cas de les flors, l'etilè pot representar un factor essencial en el control de la senescència o no participar-hi significativament, depenent del tipus de flor. D'altra banda, tot i que aquesta hormona no controli la senescència floral insensible a l'etilè, la regulació hormonal del procés també és important, doncs la resta d'hormones s'encarregaran d'acomplir aquesta funció (Burchi *et al.*, 2005; van Doorn i Woltering, 2008). En aquest sentit, sembla que els reguladors hormonals més importants en senescència floral insensible a l'etilè són les citocinines i l'ABA (revisat per Reid i Chen, 2007; van Doorn i Woltering, 2008), amb funcions inhibidora i inductora del procés, respectivament.

Pel que fa les citocinines, sembla que la inhibició del procés de senescència, àmpliament acceptada en el cas de les fulles (revisat per Gan i Amasino, 1996), és també vàlida per als pètals de la majoria d'espècies (revisat per Goszczyńska *et al.*, 1985;

Tripathi i Tuteja, 2007; van Doorn i Woltering, 2008; Shahri i Tahir, 2011). A més, sembla que el seu efecte és independent de la sensibilitat de les flors a l'etilè. Contràriament, l'efecte de l'ABA sí sembla mostrar diferències segons la sensibilitat de les flors a l'etilè. En les flors sensibles a l'etilè com els clavells, l'efecte de l'ABA sembla estar mediat per la promoció de la producció d'etilè principalment al gineceu (revisat per van Doorn i Woltering, 2008), mentre que en les flors insensibles l'ABA té efecte promotor de la senescència per sí sol. En primer lloc, l'aplicació exògena d'ABA provoca una acceleració de la senescència floral en espècies insensibles com *Iris*, *Hemerocallis* i *Narcissus* i en segon, el contingut endogen augmenta a mida que la senescència avança (revisat per Tripathi i Tuteja, 2007; van Doorn i Woltering, 2008). D'altra banda, però, en *Narcissus* s'ha determinat que els inhibidors de la biosíntesi d'ABA no són efectius a l'hora de prolongar-ne la longevitat floral. A més, l'increment d'ABA observat als pètals senescents de *Narcissus* és previ a la inducció dels SAGs analitzats i per tant, l'ABA no pot ser el responsable de l'inici de la senescència sinó que, més aviat, l'acumulació d'ABA podria ser el resultat de l'estrès cel·lular patit com a conseqüència del procés (Hunter *et al.*, 2004).

Els resultats obtinguts durant la senescència natural de les flors de *Lilium* L.A. 'Courier' mostren disminucions dels nivells endògens de citocinines i IAA i increments dels continguts en ABA i SA, recolzant el rol inhibidor de les citocinines i el paper promotor de l'ABA en la senescència floral d'espècies insensibles a l'etilè. A més, l'estudi també suggereix els rols inductor i inhibidor del SA i les auxines, respectivament. En concordança amb la funció de les auxines, s'ha descrit que l'aplicació exògena permet retardar la senescència dels pètals d'*Hemerocallis* (revisat per Rubinstein, 2000), tot i que en altres espècies poden provocar l'efecte contrari degut al seu paper promotor de la producció d'etilè (revisat per O'Neill, 1997). D'altra banda, en la majoria d'òrgans florals

de *Lilium* (L.A. 'Courier') sembla existir una tendència a la disminució prèvia a l'antesi dels continguts d'ABA i JA. En el cas dels tèpals interns i a diferència del JA (nivells del qual no varien abans de l'antesi), els resultats mostren l'existència d'un pic d'ABA en l'estadi II que posteriorment decau per recuperar els nivells hormonals inicials (de l'estadi I). Per tant, el contingut en ABA disminueix abans de l'antesi en tots els òrgans florals, sent l'única hormona que mostra un patró conjunt per la regulació del desenvolupament floral i per tant, recolzant el seu possible rol principal en la senescència floral del *Lilium*.

De forma similar a l'ABA o el JA, el SA també ha estat descrit com a factor promotor de la senescència (Morris *et al.*, 2000; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005), actuant sobretot en els últims estadis del procés, on indueix la mort cel·lular (García-Heredia *et al.*, 2008). A més, donat que els processos de senescència són sensibles a l'estrès biòtic (Valdivia *et al.*, 2006), els increments de SA al llarg de la senescència també podrien reflectir el paper protector del SA davant l'atac per patògens. Els resultats obtinguts a partir dels teixits florals de *Lilium* mostren una acumulació de SA des de l'antesi i durant tota la senescència que a més, no sembla ser específica de teixit (es dona a tots els òrgans). D'altra banda, les seves variacions també contribueixen a reforçar l'idea que els òrgans florals mantenen comportaments diferencials entre ells. Tot i que els valors de SA de l'últim estadi són superiors als del punt d'antesi en tots els òrgans florals, durant la senescència d'ambdós tèpals (externs i interns) els nivells de SA mostren una disminució (seguida d'un increment només en l'últim estadi) que no es dona als òrgans reproductius. Contràriament, tant a l'androceu com al gineceu, els nivells de SA incrementen progressivament des de l'antesi fins l'estadi V, tot i que en el gineceu es recuperen els valors inicials coincidint amb l'abscisió dels tèpals (estadi VI). Per tant, tots els òrgans florals de *Lilium* experimenten una acumulació de SA durant la seva pròpia senescència, confirmant així el rol inductor del SA en la senescència insensible a l'etilè

de les flors de *Lilium*. A més, donada la capacitat del SA per induir la mort cel·lular (Valdivia *et al.*, 2006) i l'acumulació progressiva de SA observada en tots els òrgans florals de *Lilium*, el SA podria estar regulant el procés de senescència mitjançant la inducció de la mort cel·lular als diferents teixits, contribuint així de manera global a la senescència de la flor (com a unitat estructural) del *Lilium*.

D'altra banda, la disminució final del contingut en SA observada en el gineceu coincideix amb el moment en que aquest és l'únic òrgan viu que roman unit a la planta. En la natura i un cop fertilitzat, cal mantenir l'ovari per tal d'assegurar el bon desenvolupament dels fruits i llavors, mentre que el manteniment de la resta de peces florals suposa un elevat cost energètic (que a partir d'aquest moment esdevenen innecessàries). Per tant, el gineceu podria tenir un paper important en el control de la senescència de la resta d'òrgans florals, sent l'únic òrgan floral que no entra en senescència immediatament després de l'obertura floral i que per tant, l'únic que roman unit a la planta. En altres estudis amb clavell també es recolza aquesta hipòtesi en que es proposa que el gineceu manté un rol principal en el control de la senescència floral (Shibuya *et al.*, 2000). L'eliminació del gineceu de les flors de clavell prolonga la longevitat floral mitjançant la prevenció de la producció d'etilè en l'òrgan. A més, tant l'aplicació d'ABA com la d'IAA exògens estimulen la producció d'etilè (i per tant la senescència dels pètals) en les flors control però no en les flors manipulades sense gineceu. Contràriament, quan aquestes últimes són tractades amb ACC s'indueix la producció auto-catalítica d'etilè als pètals (i el seu ràpid marciment), demostrant que l'etilè generat en el gineceu durant la senescència natural indueix també la producció d'etilè als pètals, on esdevé el responsable de la senescència del teixit (Shibuya *et al.*, 2000). En un altre estudi amb una varietat de clavell més longeva, la quantitat d'etilè emesa pels pètals i el gineceu és ínfima tot i disposar de la maquinària necessària per

produir etilè. L'anàlisi de l'expressió de diversos gens implicats en la síntesi d'etilè tan al gineceu com als pètals demostrà que la manca de producció d'etilè observada en la varietat longeva de clavell era el resultat de la repressió de la producció al gineceu i no als pètals, recolzant així el rol del gineceu en la senescència dels pètals de clavell (Nukui *et al.*, 2004).

Així, però, tot i que les variacions hormonals semblen estar orquestrades en la mateixa direcció, cal remarcar que l'anàlisi dels canvis al llarg del desenvolupament mostra l'existència de diverses diferències en els diferents òrgans florals (Fig. 7). Aquest comportament diferencial és palpable entre ambdós tipus de tèpals (externs i interns) i esdevé encara més evident quan es comparen els resultats dels tèpals amb els dels òrgans reproductius. A més, l'androceu i el gineceu també mostren diferències entre ells, sobretot després de l'antesi.

D'aquesta forma, a part de la regulació temporal de l'avenç de la senescència de la flor com a tal, també cal tenir present l'existència del factor espacial en que cada teixit respondrà variant els nivells dels reguladors endògens segons les pròpies necessitats fisiològiques del propi òrgan i en relació amb el conjunt de la flor. Un exemple clar rau en la variació dels nivells d'ABA observats durant la senescència floral, que només canvien (incrementant) al gineceu i quan la resta d'òrgans ja han estat eliminats de l'estructura floral. A més, respecte el comportament diferencial dels òrgans florals, destaca el paper del gineceu, on es mostren les variacions hormonals típiques de la senescència (disminució de citocinines i increment d'ABA i SA).

D'altra banda, l'androceu és l'únic òrgan floral en que els nivells de citocinines (concretament de zeatina, Z) incrementen durant la senescència, suggerint que l'acumulació de Z pugui tenir un important efecte en la relació òrgan font-embornal (Gan i Amasino, 1995; Zaffari *et al.*, 1998; Haberer i Kieber, 2002; Werner *et al.*, 2003) i per

tant, afectant de forma important el metabolisme de l'androceu. El balanç òrgan-embornal pot influir en la regulació de la senescència dels òrgans vegetals; en el cas de les fulles, a mida que aquestes es van expandint, la maquinària fotosintètica també evoluciona, permetent generar majors quantitats de fotoasimilats. Alhora, aquests fotoasimilats (generalment en forma de sacarosa) poden ser transportats via floema a altres parts de la planta en creixement (òrgans embornals, revisat per Kim *et al.*, 2007), que captaran la sacarosa per seguidament hidrolitzar-la gràcies a l'activitat invertasa (revisat per Dennis i Blakeley, 2000). En aquest sentit, s'ha descrit que l'activitat de l'enzim invertasa extracel·lular de paret esdevé imprescindible en el mecanisme de retard de la senescència induït per citocinines, ja que a l'incrementar l'expressió d'un inhibidor de l'enzim induïble per citocinines, la senescència no es veu retardada. Així, l'atracció de metabòlits induïda per l'efecte embornal causat per les citocinines permet la remobilització de nutrients de l'òrgan senescent a altres parts de la planta (Balibrea Lara *et al.*, 2004).

	Pre-antesi				Post-antesi			
	Externs	Interns	Androceu	Gineceu	Externs	Interns	Androceu	Gineceu
Z		■		■			■	
ZR		■			■	■	■	■
GA ₄			■	■				
IAA	■	■		■	■		■	
ABA	■	■	■	■	■	■		■
JA	■		■	■		■		
SA	■	■	■		■	■	■	■

Fig. 7 Esquema resum de les variacions hormonals al llarg del desenvolupament floral en els diferents òrgans de les flors de *Lilium* L.A. 'Courier'. Els requadres verds mostren increments del contingut endogen de cadascuna de les hormones analitzades, mentre que el color vermell denota disminució dels nivells hormonals entre el primer estadi i l'antesi (estadis I-III, pre-antesi) o l'antesi i l'últim estadi del desenvolupament (III-V per ambdós tèpals i l'androceu i III-VI pel gineceu, post-antesi). Els requadres on apareixen ambdós colors mostren variacions significatives en algun dels estadis intermedis de l'etapa estudiada.

A més, el tall de la vara floral provoca una reducció de la vida de la flor tallada i un major desequilibri hormonal en el moment d'antesi, reforçant la idea del comportament diferencial entre òrgans. Els continguts en ABA i IAA dels tèpals externs incrementen, mentre que els nivells de SA disminueixen als tèpals interns. En l'androceu es mostren increments de les dues citocinines analitzades (Z i ribòsid de zeatina, ZR) i de

JA, mentre que el contingut en GA₄ disminueix, i al gineceu augmenten els nivells d'ABA i SA. La longevitat de la flor tallada es veu reduïda en 7.7 dies degut a una alteració en el progrés de la senescència i a l'acceleració de l'abscisió dels tèpals, que alhora concorden amb els canvis hormonals observats respecte les flors desenvolupades en la planta.

Contràriament al que caldria esperar, donat el possible rol principal de l'ABA en la senescència floral del *Lilium* i als increments d'aquest, observats als tèpals externs de la flor tallada en antesi, les aplicacions exògenes d'ABA no acceleren el procés de deteriorament dels tèpals de la flor tallada. D'altra banda, l'aplicació del producte comercial Promalin (GA₄₊₇ + BA), utilitzat aquí com a control positiu, provoca un retràs de l'obertura i senescència florals, que es tradueixen en una major longevitat floral. A més, a part del *Lilium*, el Promalin és també capaç de prolongar la longevitat floral d'un gran ventall d'espècies comercialitzades com a flor tallada (Ranwala i Miller, 1998a; 2005). A més, per tal de profunditzar en el possible rol de l'ABA en la senescència floral del *Lilium* es va provar també de tractar les flors amb un nou compost del qual se n'han descrit tant efectes agonistes com antagonistes de l'ABA, el Pyrabactin.

El Pyrabactin és un compost sintètic (sulfonamida) gràcies a la qual fou possible identificar i establir els receptors d'ABA (PYR/PYL/RCAR, Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009), ja que és capaç d'unir-se selectivament als 14 receptors d'ABA presents en les plantes. Depenent del receptor específic al que s'uneix el Pyrabactin, el complex esdevindrà actiu (per la majoria dels receptors) ò inactiu/no productiu (PYL2 i PYL4, Nishimura *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2009; Melcher *et al.*, 2010; Peterson *et al.*, 2010), presentant per tant la possibilitat d'actuar tant com a agonista o antagonista de l'ABA. Quan el complex esdevé actiu, la unió del lligand (ABA o Pyrabactin) al receptor provoca un canvi de conformació del receptor (d'obert a tancat), activant-lo i promovent

l'expressió gènica en resposta a l'ABA. Contràriament, en el cas dels receptors PYL2 i PYL4, tot i que la unió del Pyrabactin també provoca un canvi de conformació en el receptor, aquest no és suficient per tancar el complex del tot, esdevenint no productiu o inactiu (revisat a Guo *et al.*, 2011). De tota manera, així com el comportament agonista del Pyrabactin s'ha pogut corroborar en fulles de pèsol, promovent el tancament estomàtic de forma sinèrgica als efectes de l'ABA (Puli i Raghavendra, 2012), la seva capacitat d'actuar com a antagonista no havia estat descrita fins ara. A més, fins ara no es coneixien estudis en que s'avaluïn els efectes d'aquesta sulfonamida sintètica sobre la senescència.

Els resultats del present treball mostraven que com en el cas de l'aplicació d'ABA, el Pyrabactin no provoca cap efecte en la longevitat floral. De tota manera, quan ambdós compostos són combinats en el mateix tractament produeixen una acceleració de la última etapa, tot i que l'efecte només és evident quan la longevitat de les flors és suficientment prolongada, com en les flors tractades amb Promalin. Per tant, es demostra que el Pyrabactin es comporta com a agonista de l'ABA, tot i que només en la l'últim estadi de la longevitat floral del *Lilium*.

D'altra banda, degut a l'efectivitat del Promalin o altres tractaments similars en la perpetuació de la longevitat de la flor tallada de diferents espècies i la implicació que això suposa sobre el preu final al que el comerciant pot vendre el seu producte, cal contemplar la possibilitat que les flors adquirides en la floristeria hagin estat pretractades per tal de prolongar-ne la longevitat, fet que podria afectar els efectes de les hormones aplicades posteriorment al laboratori. D'altra banda, al tractar-se d'un dels tipus de flor tallada més venudes arreu, podem assumir que el florista o el productor només aplicarà un pretractament quan aquest resulti rentable (i per tant probablement es vegi reflectit al preu

final de les flors) o necessari, per exemple quan les flors tenen una longevitat inferior al mínim adequat per poder comercialitzar-les.

2. Paper de l'estrès oxidatiu en senescència floral

A part de la regulació hormonal, el paper de l'estrès oxidatiu en senescència també ha estat ben caracteritzat. A grans trets, la producció de ROS augmenta significativament alhora que els mecanismes de destoxicació perden eficiència, desequilibrant la balança cap a l'increment del dany cel·lular. En el cas de les flors, aquest increment de la producció de ROS durant la senescència sembla ser una característica comú per a totes les espècies, independentment de la sensibilitat a l'etilè que mostri el procés. A més, a nivell molecular s'ha vist que l'increment de ROS durant la senescència dels pètals acostuma a anar associat a un augment de l'expressió gènica de diversos components integrants de la maquinària antioxidant (revisat per Rogers, 2011). D'altra banda, la majoria d'estudis que aborden el possible paper de l'estrès oxidatiu en el procés de senescència floral no contempen el possible rol diferencial dels òrgans florals, que quedava demostrat per les variacions endògenes durant la senescència floral del *Lilium* i focalitzen els esforços en el comportament global de la flor o d'un únic teixit floral.

Donada la seva capacitat antioxidant, les funcions i distribució dels tocoferols en les plantes han estat extensament estudiades, sobretot pel que fa als teixits fotosintètics (revisat per Munné-Bosch i Alegre, 2002; DellaPenna, 2005; DellaPenna i Pogson, 2006; Maeda i DellaPenna, 2007; Falk i Munné-Bosch, 2010), mentre que la informació disponible en l'àmbit de la senescència floral és molt més reduïda. Estudis previs mostren la presència de tocoferol en les flors de diverses espècies. A més, sembla que en flors l'abundància d' α -tocoferol és sempre major a la de γ -tocoferol (Puckhaber *et al.*, 2002; Kalinova *et al.*, 2006; Tlili *et al.*, 2009; Ulusoy *et al.*, 2009).

De forma similar, les flors de la varietat 'Courier' de *Lilium* mostren una clara predominança de l'abundància d' α -tocoferol. A més, s'hi detecten nivells significatius tant d' α - com de γ -tocoferol en la majoria d'òrgans florals de *Lilium* en antesi, incloent els tèpals externs i interns i l'androceu, que a més mostra els continguts màxims d' α -tocoferol. Pel que fa al γ -tocoferol, però, els tres òrgans mostren nivells d'acumulació similars, sent únicament significativament superiors a l'androceu respecte els tèpals interns. Així, un cop més, el gineceu de *Lilium* mostra un comportament marcadament diferencial del de la resta d'òrgans florals. En altres espècies, però, sembla que el gineceu sí que conté α - i γ -tocoferol (carpels de tabac, Abbasi *et al.*, 2007). Malauradament, actualment no podem decidir entre si la tendència de la majoria de les flors és a acumular tocoferols en el gineceu (com en el cas del tabac) i per tant el *Lilium* esdevindria l'excepció, o viceversa, doncs no es coneixen més estudis en que s'hagi determinat el contingut de tocoferol en el gineceu.

D'altra banda i donada la sorprenent abundància d' α -tocoferol a l'androceu, l'anàlisi de la distribució dels tocoferols en aquest òrgan mostrà la localització del tocoferol a l'antera i, més específicament al pol·len del *Lilium*. En aquest sentit, un estudi previ amb grans de pol·len de diferents espècies mostrava la capacitat d'estimulació del creixement per part de l' α -tocoferol, suggerint que aquest antioxidant intervé en l'allargament del tub pol·línic (Ozawa *et al.*, 1993), suggerint doncs un rol del tocoferol en reproducció.

Pel que fa als pètals, els nivells de tocoferol poden variar depenent de l'espècie estudiada. A la flor tallada, l'abundància d' α -tocoferol dels pètals de crisantem incrementa durant les primeres etapes de la senescència (fins l'aparició dels primers signes visibles) i després decau (Bartoli *et al.*, 1997), mentre que al *Lilium* s'observa una

acumulació progressiva d' α -tocoferol al llarg de tot el desenvolupament floral i especialment durant la senescència, que esdevé encara més abrupte durant estadis avançats de senescència. D'altra banda, tot i que l'acumulació no és tan marcada, les flors que romanen unides a la planta també mostren augments més o menys progressius d' α -tocoferol al llarg del desenvolupament, sent sempre superiors als nivells de γ -tocoferol. A més, en ambdós casos, els increments de tocoferol estan associats a la disminució del nivell de clorofil·les, que alhora remarca una evident acceleració de la senescència dels tèpals de la flor tallada respecte les flors que romanen unides a la planta.

L'acceleració de la senescència de la flor tallada observada mitjançant l'estimació del contingut en clorofil·les també es correspon amb la mesura de la longevitat floral, que en el cas de la flor tallada mostrà una reducció del 31% respecte les flors desenvolupades en la planta intacta. A més, tant l'anàlisi del contingut de clorofil·la total com la taxa de clorofil·la a/b recolzen la proposta de l'existència d'un comportament diferencial entre òrgans, tot i que en aquest cas només es contempen els dos tipus de tèpals. Als tèpals interns i especialment pel que fa les flors intactes, la degradació de clorofil·les és més ràpida que als tèpals externs, que al contrari dels primers mantenen nivells mínims (però detectables) de clorofil·la fins l'últim estadi del desenvolupament. Des d'un altre punt de vista, la relació clorofil·la a/b permet corroborar l'existència d'una marcada evolució diferencial entre ambdós tipus de tèpal i de desenvolupament.

A més, els nivells d' α -tocoferol augmenten abans i fins a majors nivells als tèpals interns que als externs, assolint el valor màxim d' α -tocoferol dels tèpals interns en el penúltim estadi (IV) mentre que als externs el nivell més alt d' α -tocoferol s'assoleix en l'últim estadi del desenvolupament (V). De forma similar, en crisantems desenvolupats com a flor tallada també s'observa una davallada final del contingut en α -tocoferol

(Bartoli *et al.*, 1997). Contràriament, l'acumulació del contingut en γ -tocoferol és progressiva en ambdós tèpals externs i interns i els nivells (molt menors que els d' α -tocoferol) de les flors intactes són molt similars als de la flor tallada i, per tant, durant la senescència l'acumulació de tocoferols és específica per la forma α .

Així doncs, els resultats obtinguts en *Lilium* suggereixen que el tall de la vara floral accelera el procés de senescència, procés que a més progressa més ràpidament als tèpals interns que no pas als externs, i que l'acumulació d' α -tocoferol durant la senescència dels tèpals respon a l'acceleració del procés conseqüència del tall de la vara floral. A més, donat que les concentracions màximes de tocoferol als tèpals coincideixen amb els estadis més avançats del desenvolupament (tèpals senescents), quan no queden nivells detectables de clorofil·les, es suggereix també que l'acumulació de l'antioxidant és específica del procés de senescència. En aquest sentit i donat que els augments d' α -tocoferol també s'han descrit en fulles senescents (Chrost *et al.*, 1999; Abreu i Munné-Bosch, 2007; Abreu *et al.*, 2008), es suggereix que el rol de la vitamina E és similar en ambdós tipus d'òrgans vegetals (fulles i flors).

Les variacions dels nivells de ROS als tèpals en diferents estadis del desenvolupament mostraven una clara correlació entre l'avenç de la senescència i l'increment de ROS. Durant la senescència dels tèpals de gladiol, els nivells de H_2O_2 endogen (estimats per espectrofotometria) augmenten progressivament mentre que l'activitat APX disminueix, que alhora sembla ser un prerequisite per l'inici de la senescència del tèpals de gladiol (Hossain *et al.*, 2006). El diacetat de 2',7'-diclorfluoresceïna (DCFDA) permet quantificar de forma ràpida i senzilla els nivells de ROS en resposta al metabolisme oxidatiu, ja que a l'oxidar-se emeten una forta fluorescència. A més, donat que el reactiu reacciona específicament amb el H_2O_2 (tot i que no del tot exclusivament), aquest s'utilitza per quantificar H_2O_2 (Bartoli *et al.*, 1999).

Als tèpals senescents de crisantem, el nivell d'oxidació del DCFDA dobla el valor observat en els estadis més propers a l'antesi, just després del tall de la flor (pètals control). A més, el tractament amb el pro-oxidant paraquat corrobora que la producció de H_2O_2 es dona durant la senescència, doncs mentre el tractament no provoca variacions dels nivells d'oxidació del DCFDA als pètals control, als pètals senescents l'oxidació incrementa tres cops (Bartoli *et al.*, 1997). Als tèpals de *Lilium*, la producció d' H_2O_2 també assoleix els màxims durant la senescència. A més, sembla que aquest increment de l'oxidació del DCFDA estigui relacionat amb l'acumulació d' α -tocoferol mostrada anteriorment als tèpals, doncs ambdós resultats mostren patrons similars. Tal i com s'observa amb l' α -tocoferol, els nivells màxims d'oxidació del DCFDA s'assoleixen en estadis del desenvolupament diferents, segons el tèpal analitzat, sent el màxim en estadi V per als tèpals externs i en estadi IV per als interns. A més, els forts increments del contingut en α -tocoferol mostren una correlació positiva amb petits augments de l'oxidació del DCFDA, suggerint que l'estrès oxidatiu és el responsable de la forta acumulació de tocoferol observada als tèpals de *Lilium*.

Contràriament, l'anàlisi dels nivells d'ascorbat de les flors intactes no sembla tenir relació amb l'acumulació d' α -tocoferol als tèpals, doncs tot i que el contingut d'àcid ascòrbic incrementa durant la primera etapa (fins l'antesi) en ambdós tèpals externs i interns, els nivells analitzats en l'últim estadi del desenvolupament als tèpals externs i interns són lleugerament inferiors o es mantenen iguals als de l'antesi, respectivament. D'altra banda, en comparació amb la flor intacta, la flor tallada redueix significativament el contingut en àcid ascòrbic (tant en antesi com en l'últim estadi del desenvolupament) per oxidació del mateix a DHA, els nivells del qual augmenten fent que l'estat d'oxidació incrementi amb el desenvolupament floral, com també passa en altres espècies (Bartoli *et al.*, 1997; Tewari *et al.*, 2009). De tota manera i un cop més, els tèpals externs i interns

semblen tenir patrons diferents; així com en els tèpals externs l'augment de l'estat d'oxidació de l'ascorbat sembla ser més o menys progressiu al llarg del desenvolupament floral, als tèpals interns aquest augment només esdevé evident en antesi, ja que inclús en la flor tallada (on les diferències fins ara eren molt més marcades) els nivells de l'últim estadi són molt similars als de l'antesi. Alhora, això també podria estar lligat a la major velocitat de progrés de la senescència, descrita prèviament als tèpals interns (respecte els externs); l'acceleració del procés podria implicar una major taxa d'oxidació de l'ascorbat durant les primeres etapes del desenvolupament, arribant al punt final (saturació) abans que als tèpals externs. D'altra banda, els nivells finals (estadi V) d'estat d'oxidació dels tèpals interns de les flors intactes són inferiors dels de l'antesi, mostrant una disminució final similar a la descrita pels nivells d' α -tocoferol i de DCFDA i recolzant el comportament diferencial d'ambdós tipus de tèpals davant el progrés de la senescència.

A un altre nivell d'anàlisi, el grau de peroxidació lipídica permet determinar les variacions o l'existència de dany en les membranes cel·lulars a mida que el procés de senescència avança. El deteriorament de la membrana provoca un increment de la permeabilitat d'aquestes, que alhora provoca la pèrdua de nombrosos components clau per la viabilitat de la cèl·lula. A més, l'increment de ROS generalment provoca, entre d'altres factors, un increment de la peroxidació lipídica (revisat per Rogers, 2011; Shahri i Tahir, 2011). Als tèpals de *Lilium*, l'anàlisi del grau de peroxidació lipídica (estimat com a nivells d'MDA) recolza de nou el comportament diferencial entre tèpals externs i interns, al menys pel que fa la primera etapa del desenvolupament (de l'estadi I a l'antesi), doncs mentre als tèpals externs els nivells d'MDA disminueixen durant la primera etapa, als tèpals interns s'hi observa un increment. En l'últim estadi, però, les flors intactes semblen mantenir el mateix grau de peroxidació lipídica que l'observat en l'antesi, mentre que a la flor tallada es descriu una forta reducció, especialment als tèpals

interns. D'altra banda, les variacions d'MDA presentades aquí no semblen correlacionar-se amb la típica funció preventiva de l' α -tocoferol en front la peroxidació lipídica, ja que tot i que en la flor tallada els nivells d'MDA disminueixen notablement en l'últim estadi respecte l'antesi, als tèpals de les flors intactes incrementen. En aquest sentit, però, cal recordar que els nivells d'MDA totals dels tèpals no necessàriament representen el grau de peroxidació lipídica del cromoplast, on presumptament s'hi acumulen els tocoferols (Arango i Heise, 1998; revisat per Munné-Bosch i Alegre, 2002). A més, donat que s'ha suggerit l'existència de diversos mecanismes per la pèrdua de funció de membrana en senescència floral (Leverentz *et al.*, 2002), és possible que també existeixin diferents mecanismes de protecció, depenent del procés de degradació de les bicapes lipídiques.

3. Implicació dels sucres en la regulació de la senescència floral

Tot i que el rol dels sucres en senescència floral encara roman força obscur, sembla que aquests compostos tenen un important paper regulador. De forma general, l'adició de sucres implica una millora de la longevitat de la flor tallada, suggerint que la manca d'un nivell intracel·lular òptim de carbohidrats podria ser el factor responsable de l'inici de la senescència del pètal. En aquest sentit, s'ha descrit que el principal factor responsable de l'inici de la senescència dels tèpals de tulipa és la manca d'energia intracel·lular, deixant els efectes de l'estrès oxidatiu i/o la producció d'etilè en segon pla (Azad *et al.*, 2008). En *Lilium*, la concentració intracel·lular de sucres disponibles és un important factor limitant del desenvolupament i la longevitat florals (revisat per van Doorn i Han, 2011), on sembla existir una correlació entre la manca de carbohidrats i l'inici de la senescència dels tèpals (revisat per van Doorn i Woltering, 2008). A més, en determinats casos (p. ex. en clavells, rosa, *Hemerocallis* o *Iris*) el contingut en carbohidrats solubles disminueix a mida que la senescència floral avança, on el metabolisme dels sucres en les cèl·lules

senescents encara seria actiu per tal de poder transportar els carbohidrats a fora del pètal (revisat per Shahri i Tahir, 2011).

En el cas d'*Hemerocallis* i rosa, d'altra banda, s'ha proposat que la davallada del contingut en sucres és degut al seu consum en respiració, ja que durant el temps que la flor roman oberta s'observa un increment de la taxa respiratòria (Gulzar *et al.*, 2005). Contràriament, en altres casos sembla que el contingut en carbohidrats augmenta a mida que avança la senescència floral i que per tant, al no mancar els sucres, aquesta no pot ser la causa de l'inici de la senescència (revisat per van Doorn, 2004). Pel que fa al *Lilium*, en diversos cultivars Asiàtics la concentració de sucres solubles (sacarosa, fructosa i glucosa) augmenta com a conseqüència de la hidròlisi del midó. La sacarosa en concret pot arribar a incrementar fins un 15% els seus nivells després de l'obertura floral (van der Meulen-Muisers *et al.*, 2001). Cal recordar, però, que les anàlisis de sucres en teixits vegetals no acostumen a tenir en compte la compartimentalització cel·lular i que per tant, els resultats acostumen a referir-se al contingut total de sacarosa en el teixit i no pas a la concentració intracel·lular disponible per al metabolisme (revisat per van Doorn, 2004).

Als tèpals (externs i interns) dels híbrids L.A. de *Lilium*, l'anàlisi dels nivells de sacarosa mostra una acumulació d'aquest sucre al llarg del desenvolupament, assolint valors superiors (63% i 83% per als tèpals externs i interns, respectivament) al valor inicial (estadi I), mentre que en l'androceu els nivells són lleugerament més alts (31%) i al gineceu no es mostren variacions significatives al llarg del desenvolupament. De forma similar, als pètals d'*Hibiscus rosa-sinensis* L. el contingut en sacarosa també augmenta durant l'etapa de senescència, mentre que al gineceu els nivells es mantenen constants (Trivellini *et al.*, 2011). D'altra banda, el gineceu és l'únic òrgan que roman unit a l'estructura floral després de l'abscisió dels pètals i l'androceu. A més, les variacions hormonals observades al gineceu no mostren una inducció clara del procés de senescència

en aquest òrgan (veure secció 1), pel que podem suggerir que la sacarosa només s'acumula als òrgans florals senescents.

Pel que fa a la glucosa, els nivells finals (estadi V) coincideixen amb l'inicial (estadi I) en tots els òrgans florals. Un cop més i a diferència del gineceu, però, els tèpals i l'androceu mostren variacions significatives del seu contingut al llarg del desenvolupament, recolzant la hipòtesi del rol diferencial del gineceu en el control de la senescència floral. D'altra banda, a diferència de l'observat amb l'anàlisi dels nivells de sacarosa, abans de l'antesi els tèpals (externs i interns) mostren un marcat i progressiu increment de la concentració de glucosa en que els valors màxims coincideixen amb el moment de l'antesi. Un cop superada l'obertura floral, s'observa una forta disminució del contingut en glucosa que afecta a ambdós tèpals externs i interns i a l'androceu, sobretot en l'últim estadi, suggerint que durant l'última etapa de la senescència aquests òrgans consumeixen activament glucosa. A més, tal i com ja s'ha suggerit prèviament, els tèpals interns de *Lilium* L.A. 'Courier' semblen patir una acceleració de la senescència (respecte el procés observat als tèpals externs), mentre que els estudis amb *Lilium longiflorum* s'ha suggerit que la ràpida disminució dels nivells de glucosa (i fructosa) pot comprometre el desenvolupament de l'antera i/o la maduració del pol·len, induint alhora la senescència dels pètals (Lee i Roh, 2011). Per tant, tot i que els nivells de sucres de l'últim estadi són relativament elevats, la marcada disminució de glucosa als tèpals interns i l'androceu podria veure's implicada en el progrés de la senescència floral del *Lilium*.

De tota manera, l'efecte més característic dels sucres en senescència floral rau en la seva capacitat per allargar la longevitat de la flor tallada. En diversos híbrids Asiàtics de *Lilium* s'ha descrit que el contingut en carbohidrats del botó floral és un factor limitant per a l'obertura floral i que, a més, està relacionat amb la longevitat floral (van der Meulen-Muisers *et al.*, 2001). Seguint en la mateixa línia, en un estudi amb un *cv.* de

Lilium Oriental s'ha descrit l'existència d'una forta correlació entre la longevitat de la flor i el subministrament de carbohidrats (Hwang *et al.*, 2009). Així, l'adició de sucre a la solució de manteniment de la flor tallada representa una font externa d'energia que alhora pot reemplaçar la disminució de sucres disponibles que es pateix com a conseqüència del tall de la vara floral.

De fet, l'adició de sucres a la solució del vas acostuma a perllongar la vida de la flor tallada en un gran ventall d'espècies, tot i que les respostes al tractament no són sempre efectives o no sempre tenen la mateixa resposta (revisat per van Doorn, 2004; Pun *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2005; van Doorn i Han, 2011). Al contrari que per les espècies sensibles a l'etilè, el rol dels sucres en senescència insensible a l'etilè no implica variacions de la producció o sensibilitat d'etilè sinó que a primera vista sembla estar més relacionat amb la seva condició de soluts. S'ha proposat que els efectes beneficiosos dels sucres exògens en espècies de senescència floral insensible a l'etilè pot deure's a una millora de la captació d'aigua (i per tant de la hidratació dels teixits florals), i a la seva capacitat de retardar la mort cel·lular (revisat per van Doorn, 2004). En el cas del *Lilium*, l'adició d'un 1% de sacarosa a la solució de manteniment de les vares florals no provoca variacions d'hidratació en cap dels òrgans florals ni en la longevitat floral però sí que afecta el temps necessari per assolir el punt d'antesi (escurçant-lo en 2.4 dies) i la durada de la senescència (perllongant-la 1 dia), respecte les flors control mantingudes en aigua destil·lada. Concretament, la reducció de l'etapa pre-antesi és deguda a una acceleració del temps requerit per assolir l'estadi II, mentre que en l'etapa post-antesi és el temps per assolir l'estadi IV el que es veu incrementat. Per tant, l'adició de sacarosa permet que la flor tallada aprofiti el sucre exogen per modificar el progrés del desenvolupament floral sense repercutir en la longevitat final però alhora mantenint per més temps la flor oberta.

Pel que fa als diversos òrgans florals, en les flors (flor tallada) en antesi de *L. longiflorum* s'ha descrit prèviament que a concentració màxima de sacarosa fou trobada a l'antera, on a més resultà ser molt superior als nivells de glucosa i fructosa, mentre que tant a l'ovari com als tèpals la concentració es veia reduïda quasi a la meitat. D'altra banda, al contrari que als tèpals (on el sucre majoritari en antesi era la fructosa), la concentració de sacarosa de l'ovari era molt superior a les de la glucosa o la fructosa (Ranwala i Miller, 1998 *a*). D'acord amb això, els resultats obtinguts amb l'híbrid L.A. 'Courier' mostren que l'òrgan amb major concentració de sacarosa en antesi és l'androceu, mentre que als tèpals (externs i interns) i al gineceu els nivells disminueixen un 28% i 69%, respectivament. D'altra banda, en el cas de la glucosa l'androceu presenta els nivells més baixos, mentre que els nivells als tèpals (externs i interns) i al gineceu són un 88% i 66% superiors, respectivament.

La manca de carbohidrats disponibles pot posar en compromís el desenvolupament dels òrgans florals, provocant alhora l'abscisió de la flor abans de l'antesi. D'acord amb aquesta idea, als híbrids Asiàtics de *Lilium* l'abscisió dels botons florals podria deure's a l'absència d'hidròlisi de sacarosa en l'antera i la manca de la translocació del sucre des del filament cap a l'antera (Hwang *et al.*, 2011). Per tant, l'aportació de sacarosa exògena pot afavorir el desenvolupament dels òrgans florals i alhora l'antera esdevindria un important regulador del desenvolupament floral.

En la flor tallada de l'híbrid L.A. de *Lilium*, l'adició de sacarosa a la solució del vas provoca diversos efectes en els òrgans florals. Així com la concentració de sacarosa es veu incrementada només al gineceu (50% superior al control), la concentració de glucosa augmenta significativament a tots els òrgans florals excepte als tèpals externs i en major grau al gineceu. Per tant, el gineceu capta activament la sacarosa per acumular-la, mentre que a la resta d'òrgans aquesta és consumida; un cop més, els resultats corroboren el

comportament diferencial del gineceu envers els altres òrgans en el desenvolupament floral. A més, a diferència del gineceu, els tèpals externs, els interns i l'androceu entren en senescència a partir de l'antesi, suggerint una possible relació entre el consum de sacarosa i la senescència dels òrgans florals. A més, sent l'únic teixit floral que no entra en senescència immediatament després de l'antesi, els resultats recolzen la hipòtesi del gineceu com a regulador de la senescència de la resta d'òrgans florals. Contràriament, recentment s'ha suggerit que l'androceu o més concretament la manca de carbohidrats disponibles en l'antera pot resultar un factor inductor de l'inici de la senescència dels pètals de *Lilium* (Hwang *et al.*, 2011; Lee i Roh, 2011).

De tota manera, a part de les funcions específiques dels diferents òrgans florals, molts autors consideren la flor com a òrgan, on els pètals, els sèpals i els òrgans reproductius són parts o peces d'una mateixa estructura que coordinen les seves accions per tal de respondre a les necessitats específiques de la planta en cada moment. Així, un cop ja no siguin necessàries, les peces florals (enteses aquí com a òrgans individuals) han d'anar desapareixent progressivament (entren en senescència). En aquest marc, el rol suggerit per a l'androceu en el control de l'inici de la senescència dels pètals pot ser entès com a una cooperació entre els diferents òrgans per assolir l'estadi final del desenvolupament floral en què el gineceu és l'únic òrgan que roman unit a la vara floral.

Alhora, segons aquest últim raonament, l'adició de sacarosa a la solució del vas també podria modificar les concentracions hormonals dels diferents òrgans florals. A més, sabem que la regulació de la senescència implica la interacció dels senyals hormonals i dels sucres (Wingler *et al.*, 1998; León i Sheen, 2003), fet que en el cas de les flors sensibles a l'etilè resulta evident, doncs l'adició dels sucres permet retardar la senescència dels pètals gràcies a la modulació de les vies de biosíntesi o senyalització de l'etilè (Pun i Ichimura, 2003; Hoerberichts *et al.*, 2007).

En les flors de *Lilium*, els continguts hormonal dels diversos òrgans florals en antesi varien en resposta al tractament de sacarosa. Tant en l'androceu com al gineceu, els nivells de citocinines endògenes incrementen significativament en resposta al tractament de sacarosa. Sabem que les citocinines són capaces de retardar la senescència floral en moltes espècies (revisat per Tripathi i Tuteja, 2007; van Doorn i Woltering, 2008; Shahri i Tahir, 2011). Per tant i donat que el contingut en citocinines incrementa després del tractament amb sacarosa, un dels mecanismes pels quals els sucres són capaços de prolongar la longevitat floral del *Lilium* podria ser mitjançant la producció de citocinines.

Alhora, en ambdós casos (gineceu i androceu) trobem evidències que suggereixen la seva implicació en el control de la senescència floral (Shibuya *et al.*, 2000; Nukui *et al.*, 2004; Hwang *et al.*, 2011; Lee i Roh, 2011). A més, el tractament amb sacarosa també provoca un augment de la concentració endògena d'IAA al gineceu de *Lilium*, suggerint que els efectes del sucre en la longevitat floral (acceleració de l'antesi i retard de la senescència) poden estar vinculats a l'increment dels nivells de citocinines i auxines, recolzant alhora el rol inhibidor de senescència atorgat a les auxines. D'altra banda, com a conseqüència dels efectes inhibidors de senescència d'ambdós tipus d'hormones, la sacarosa també podria estar contribuint al suposat interès de la planta per mantenir el gineceu viu durant més temps que la resta de peces florals. En aquest sentit també, l'abstenció del gineceu d'entrar en senescència es veu també reflectida tant per l'acumulació de sacarosa observada exclusivament al gineceu de les flors en antesi del tractament de sacarosa com per les variacions hormonals al llarg del desenvolupament natural de les flors no tallades.

L'òrgan més afectat pel tractament amb sacarosa, però, no és el gineceu sinó l'androceu, que a part de l'increment de ZR mostra augments dels nivells de GA₄, ABA i SA (155, 20 i 635 vegades, respectivament). D'acord amb l'increment de GA₄, recordar

que l'aplicació de GAs generalment contribueixen a prolongar la longevitat floral (revisat per van Doorn i Woltering, 2008). A més, les anteres de *Lilium* semblen tenir un important rol regulador en l'inici de la senescència dels pètals (Hwang *et al.*, 2011; Lee i Roh, 2011). Per tant, l'efecte retardant de la senescència, observat per l'aportació de sacarosa exògena a les flors de *Lilium* L.A. 'Courier' pot deure's a la inhibició específica de la senescència de l'androceu en la iniciació del procés de deteriorament dels tèpals. D'altra banda, l'augment d'ABA i SA en l'androceu recalquen la necessitat que aquest òrgan entri en senescència. De tota manera, les variacions hormonals analitzades només reflecteixen el punt d'antesi (no en coneixem la tendència) i per tant podrien tant estar reflectint l'etapa final d'una possible senyalització prèvia a l'obertura floral (comportament hormonal durant el desenvolupament pre-antesi) com la resposta a aquesta (comportament durant la senescència). En aquest sentit, donat que l'adició de sacarosa accelera l'obertura de les flors de *Lilium* L.A. 'Courier' alhora que en retarda la senescència dels pètals i, suposant que l'androceu sigui l'òrgan clau en la regulació de la senescència dels tèpals en *Lilium* (Hwang *et al.*, 2011; Lee i Roh, 2011), els augments d'ABA i SA de l'androceu en resposta a l'adició de sacarosa podrien estar reflectint la resposta de la flor durant la primera fase del desenvolupament en què els sucres acceleren l'obertura floral. De tota manera, caldria profunditzar molt més en aquest aspecte per tal de poder suggerir que les concentracions d'ABA i SA incrementen únicament abans de l'antesi, etapa en la que a més caldria corroborar la seva capacitat per induir l'obertura floral.

Finalment, als tèpals externs de *Lilium* L.A. 'Courier' en antesi, l'adició de sacarosa a la solució del gerro provoca la disminució dels nivells d'ABA en un 57%, mentre que als tèpals interns no s'hi observen canvis hormonals significatius en resposta al tractament. De forma general, l'aplicació d'ABA provoca una acceleració de la

senescència floral, efecte que a més podria resultar clau per l'inici del procés en les flors de senescència insensible a l'etilè (Panavas *et al.*, 1998; Hunter *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2005; Tripathi i Tuteja, 2007). A més, segons els resultats de les variacions hormonals durant la senescència de les flors no tallades de *Lilium*, sembla que als tèpals interns el procés de senescència és més ràpid que als externs. En aquest cas, l'adició de sacarosa podria incrementar aquesta diferència de velocitats en el progrés de la senescència, concretament propiciant un retard del procés en els tèpals externs gràcies a la disminució de la concentració d'ABA en resposta a la presència del sucre exogen.

4. Els òrgans florals com a reguladors del procés de senescència en *Lilium*

Gràcies a l'estudi comparatiu del desenvolupament natural i de la flor tallada s'han pogut corroborar moltes de les preguntes que plantegen els resultats del desenvolupament de la flor tallada, doncs les diferències trobades en els estudis del desenvolupament natural acostumen a resultar encara més evidents en la flor tallada. En conjunt, els diferents estudis realitzats amb les flors de la varietat d'híbrids de *Lilium* L.A. 'Courier' suggereixen repetidament el comportament diferencial entre òrgans.

Els tèpals són les primeres peces del periant que inicien el procés de deteriorament i, d'entre els dos tipus de tèpals, sembla que els interns inicien abans la senescència que no pas els externs. D'altra banda, els òrgans reproductius també mostren variacions exclusives o específiques que els diferencien de la resposta dels tèpals davant el progrés de la senescència floral, en el que l'androceu inicia el procés una mica més tard que els tèpals mentre el gineceu no mostra signes de deteriorament ni tant sols un cop s'ha produït l'abscisió de la resta de peces florals.

Per tant, sembla que la diversitat de funcions específiques per cada òrgan floral durant la "vida útil" de la flor també es mantenen durant el procés de senescència, el qual

s'entén com una resposta de la planta davant la innecessària despesa energètica que suposa la flor un cop aquesta ja ha estat pol·linitzada o és massa vella per poder ser-ho.

4.1 Paper dels tèpals en senescència floral

Els tèpals són les peces florals encarregades d'atraure i donar suport físic als pol·linitzadors. Un cop s'ha acomplert la seva funció (o l'edat de la flor és massa avançada), el seu manteniment resulta més costós que profitós. D'altra banda, els pètals són els primers òrgans florals a deteriorar-se, limitant així la longevitat de la flor. Segons els resultats obtinguts gràcies a les anàlisis realitzades amb les flors dels híbrids L.A. 'Courier' de *Lilium* s'ha pogut determinar l'existència de diverses i marcades diferències entre els tèpals i els òrgans reproductius i un comportament lleugerament diferencial entre ambdós tipus de tèpals externs i interns.

A diferència dels òrgans reproductius, abans de l'obertura floral els tèpals (ambdós tipus) de la flor no tallada presenten un increment d'IAA mentre que els nivells de GA₄ es mantenen constants, fet que a més tampoc es veu modificat pel tall de la vara floral. A més, en la flor tallada, els nivells de citocinines tampoc varien ni als tèpals externs ni als interns. D'altra banda, els nivells de glucosa de les flors no tallades mostren un patró d'acumulació progressiva previ a l'antesi, que durant el procés de senescència recupera els nivells inicials de l'estadi I. A més, en la flor tallada, els tèpals són les peces florals on es localitza la concentració màxima de glucosa (tant en les flors control mantingudes en aigua com en les tractades amb un 1% de sacarosa).

D'altra banda, ambdós tèpals externs i interns també mostren diferències de comportament al llarg del seu desenvolupament. Els tèpals interns són els únics que incrementen els nivells de citocinines durant el desenvolupament floral natural (flor no tallada) durant l'etapa prèvia a l'antesi, mentre que el JA no varia abans de l'antesi ni en

contingut total (estadi V respecte estadi I) però sí que mostra una disminució durant la senescència. A més, és l'únic òrgan en què els nivells de SA baixen en resposta al tall de la vara floral.

Pel que fa l'estrès oxidatiu, tots els marcadors analitzats recolzen el comportament diferencial entre ambdós tèpals, alhora que els nivells endògens de sucres en la flor tallada mostren diferents patrons de variació del contingut en glucosa durant l'etapa post-antesi.

D'altra banda, el tractament amb sacarosa de la flor tallada en antesi no provoca cap variació hormonal als tèpals interns, mentre que els externs responen (únicament) disminuint el contingut en ABA. Per tant, tal i com s'ha suggerit prèviament i en diverses ocasions, els tèpals interns semblen presentar un procés de senescència accelerat, respecte els tèpals externs.

4.2 Òrgans reproductius

Pel que fa als òrgans reproductius, les variacions hormonals i dels continguts de vitamina E i sucres durant el desenvolupament floral (tant natural com el de la flor tallada) del gineceu remarquen el comportament diferencial d'aquest òrgan davant el progrés de senescència i respecte la resta d'òrgans, incloent ambdós tèpals externs i interns i l'androceu.

L'androceu, a més, presenta clares mostres de diferenciació de comportament en front dels tèpals; tant les variacions hormonals com dels nivells endògens de sacarosa i glucosa de l'androceu, determinats al llarg del desenvolupament natural i artificial (flor no tallada i tallada, respectivament), reflecteixen una demarcació temporal del progrés de la senescència de l'androceu respecte els tèpals, ja que tant durant l'etapa post-antesi de la flor no tallada com en l'antesi de la flor tallada l'androceu mostra increments dels nivells

de citocinines. D'altra banda, el contingut en α -tocoferol de l'androceu és molt superior al dels tèpals. A més, aquest potent antioxidant podria estar vinculat a la reproducció vegetal, doncs la concentració màxima d' α -tocoferol es troba al pol·len.

5. Senescència foliar

Tot i que en floricultura el factor més important és la longevitat floral, també cal tenir cura que la vara floral (en el seu conjunt) mantingui una bona presència durant la vida en gerro de la flor. Del contrari, el valor del producte disminuiria. En aquest sentit, existeixen diversos tractaments capaços de millorar la qualitat de la flor tallada, tot i que aquests acostumen a ser força cars i per tant incrementen el preu final del producte, posant alhora en compromís la rendibilitat del producte. En aquest sentit, cal arribar a un equilibri entre el que resulta rentable i el resultat del tractament utilitzat per incrementar la qualitat de la flor.

L'adició de sucres a la solució de manteniment de la flor tallada és una solució barata i efectiva que permet prolongar la longevitat d'un gran ventall d'espècies i varietats de flor tallada. En el cas del *Lilium*, l'aportació exògena de sucres permet prevenir l'abscisió dels botons florals i perllongar la vida de les flors, tot i que aquest tractament també implica una acceleració de la senescència foliar, que podem observar mitjançant l'aparició d'un esgrogueïment foliar prematur. De tota manera, aquest efecte negatiu pot ser pal·liat amb l'ús de solucions hormonals en què es barregin gibberel·lines i citocinines (revisat per van Doorn i Han, 2011), remarcant la importància dels reguladors endògens en el control efectiu del procés de senescència. De fet, aquest tractament és tan efectiu que inclús existeix un producte comercial per poder pre-tractar fàcilment el cultiu abans de la seva venda a la floristeria.

Pel que fa la fisiologia de la planta, és ben sabut que la foscor indueix la senescència i, per tant, n'accelera els símptomes. D'altra banda, el procés de senescència induïda per foscor esdevé força similar al procés natural, tot i que existeixen determinades diferències com ara la inducció de determinats SAGs o la inhabilitació de la via de senyalització del SA en condicions de foscor (però no durant la senescència natural, revisat per Lers, 2007). A més, al privar de llum a la fulla, la taxa fotosintètica disminuirà, així com el volum de fotoassimilats generats, implicant la necessitat de captar-los des d'altres fonts (actuant com a òrgan embornal). En el present estudi, al llarg de la senescència el pes (fresc i sec), el contingut hídric relatiu (CHR), els nivells de clorofil·la i l'eficiència màxima del fotosistema II (F_v/F_m) de la fulla disminueixen progressivament. Quan la senescència foliar és induïda per foscor (tapat de les fulles més basals, representant aproximadament un 15% del total de fulles), el patró de disminucions dels diferents marcadors analitzats no tant sols es manté sinó que aquestes resulten ser molt més marcades i primerenques. De tota manera, al final de l'experiment els valors dels paràmetres analitzats en ambdós tractaments (control i tapat) tornen a ser similars. Durant el desenvolupament de la planta, els nivells hormonals endògens també es veuen modificats pel tractament de foscor; els resultats mostren variacions de GA₉, JA i ABA en resposta al tapat de les fulles. En el cas de l'ABA, però, l'efecte del tapat de les fulles és més evident. A més, a diferència dels paràmetres fisiològics analitzats anteriorment (contingut de clorofil·les totals i F_v/F_m), variants des de l'inici de l'experiment, els nivells d'ABA de les fulles de les plantes tractades no canvien notablement fins assolir l'antesi.

Alhora, les variacions de pes fresc (PF), pes sec (PS) i CHR mostren que quatre setmanes després de l'antesi el contingut hídric de les fulles d'ambdós tractaments és similar, implicant que les posteriors pèrdues d'aigua o matèria no són degudes al tractament sinó al procés de senescència en si. D'altra banda, fins aquest punt, el tapat de

les fulles basals implica una important pèrdua d'aigua que alhora pot estar vinculada amb les variacions d'ABA observades a partir de l'antesi. D'aquesta manera, l'augment d'ABA seria una conseqüència de l'efecte del tractament per foscor i per tant, l'ABA no pot ser el factor principal del control del procés de senescència (tot i que sí podria tractar-se d'un regulador tardà). En aquest sentit, el contingut en ABA disminueix al final de l'estudi coincidint amb el moment en què els valors de CHR disminueixen per sota del 20%. A més, en aquest punt la biomassa foliar i els valors de F_v/F_m , així com els nivells de diverses hormones (tot i que les diferències no siguin significativament diferents) també mostren una notable disminució. Tot plegat suggereix que en aquestes fulles s'hi està donant un procés de mort cel·lular i que en aquest punt l'ABA ja no és necessari perquè la pèrdua d'aigua induïda per senescència ja no és el problema principal. D'acord amb això, a nivell molecular s'ha descrit recentment que el SAG d'expressió induïble per ABA *SAG113*, està específicament vinculat al control de la pèrdua d'aigua durant la senescència foliar (Zhang *et al.*, 2012; Zhang i Gan, 2012). Per tant, la relació entre les variacions d'ABA i dels valors de CHR durant el desenvolupament foliar del *Lilium* L.A. 'Courier' suggereixen un paper principal de l'ABA en la regulació de la senescència de la fulla, sobretot quan aquesta és induïda per foscor, fet que alhora implica una ràpida disminució de CHR que dispara la producció d'ABA com a conseqüència.

D'altra banda, donat que es tracta d'una espècie d'interès comercial (flor tallada), també resultava interessant profunditzar sobre l'efecte de l'ABA en la senescència foliar de la vara floral tallada (en gerro) i mantinguda en foscor. En aquest sentit, les aplicacions exògenes d'ABA i del seu anàleg Pyrabactin podien servir com a primeres aproximacions per recolzar o discutir el suposat rol de l'ABA en senescència foliar. A més, l'ús d'un control positiu (Promalin) permet comparar els resultats dels diferents tractaments amb els estàndards acceptats per la comercialització del producte, als que alhora es pretén

arribar per tal que les vares produïdes tinguin sortida al mercat. De forma general i a diferència de la resta de la vara floral on no es mostren massa variacions al llarg de l'estudi, les fulles basals (terç inferior de la vara) mostren una acceleració de la senescència que alhora es correlaciona amb les disminucions dels nivells de clorofil·les i els valors de F_v/F_m al llarg del temps. D'altra banda i contràriament al que caldria esperar, l'aplicació d'ABA no provoca cap efecte sobre la senescència foliar mentre que el seu anàleg Pyrabactin permet millorar lleugerament la qualitat de la fulla, mantenint majors nivells de clorofil·la i F_v/F_m . Per tant, i a diferència del que s'observa en senescència floral, els resultats suggereixen que en el cas de la senescència foliar el Pyrabactin actua com a antagonista de l'ABA.

6. Senescència foliar vs. floral

Donat que les flors i les fulles comparteixen el mateix origen evolutiu (Coen, 2001; Friedman *et al.*, 2004), és lògic pensar en l'existència d'importants similituds en el procés de senescència d'ambdues parts de la planta.

En aquest sentit, diversos estudis han permès caracteritzar similituds i diferències en el procés de senescència dels pètals i les fulles. A nivell estructural, determinats esdeveniments com ara la transformació del cloroplast en cromoplast (als pètals) o gerontoplast (a les fulles) es donen abans als pètals, on la degradació cel·lular és evident ja des de les primeres etapes del desenvolupament del teixit (Wagstaff *et al.*, 2002; 2003). Pel que fa a les hormones, la sobre-expressió de citocinines retarda la senescència tant al pètal (Chang *et al.*, 2003) com en la fulla (Gan i Amasino, 1995), mentre que a nivell molecular, els gens associats a la biosíntesi i resposta de l'ABA semblen compartir el mateix patró d'expressió (regulació a l'alça) tant en pètals com en fulles (Wagstaff *et al.*, 2009). Alhora, els nivells de ROS augmenten tant als pètals com a les fulles amb l'edat,

de la mateixa manera que també ho fa l'expressió gènica de la maquinària antioxidant. D'altra banda, pel que fa al rol dels sucres, trobem evidències que recolzen tant la manca com l'excés de sucres com a factors detonants de la senescència en ambdós pètals i fulles (revisat per van Doorn, 2004; 2008).

A nivell molecular, la majoria de gens expressats durant el procés de deteriorament en la fulla també ho són al pètal, deixant únicament un petit nombre de gens associats al procés que semblen ser específics de teixit (Wagstaff *et al.*, 2009). En pètals i fulles de violer (*Erysimum linifolium*) s'ha determinat l'existència de notables similituds en l'expressió dels gens relacionats amb la remobilització de nutrients (Price *et al.*, 2008). A més, determinats gens com ara el *SAG12* (cisteïna proteïnasa) o diversos gens del domini NAC (implicats en diversos processos del desenvolupament vegetal com la senyalització hormonal o la resposta a l'estrès), inicialment descrits durant la senescència foliar, semblen compartir el mateix patró d'expressió (regulació a l'alça) durant la senescència de diferents teixits d'*Arabidopsis*, entre ells als pètals (Wagstaff *et al.*, 2009). A més, els gens reguladors d'importants processos com la fotosíntesi o l'autofàgia també mostren similituds en els dos teixits, ja que en ambdós pètals i fulles mostren regulacions a la baixa i a l'alça, respectivament, durant la senescència (Wagstaff *et al.*, 2009). Així, a part de compartir origen evolutiu, pètals i fulles també coincideixen en la regulació de molts dels processos cel·lulars més importants (com la degradació i remobilització dels components cel·lulars o la senyalització hormonal) durant la senescència.

D'altra banda, en determinats casos trobem patrons d'expressió diferencials entre ambdós teixits (pètals i fulles), demostrant així l'existència de factors específics de teixit (Wagstaff *et al.*, 2009). Com a exemple, tot i que en general els membres de la família WRKY es regulen a l'alça en els teixits vegetals senescents, els transcrits del gen *WRKY53* (molt implicat en la regulació de la senescència per mitjà de la senyalització per

JA i SA) augmenten durant la senescència en la fulla, però no al pètal. Altres gens implicats en la senyalització hormonal també mostren diferents patrons d'expressió depenent del teixit, com ara els gens associats a les auxines o les citocinines; als pètals, els gens associats a les auxines i a les citocinines oxidases es veuen fortament induïts, mentre que en fulla no (Wagstaff *et al.*, 2009).

A nivell bioquímic, les citocinines i l'ABA han estat proposades repetidament com a importants senyals del control de la senescència foliar en diferents espècies (Gan i Amasino, 1995; Haberer i Kieber, 2002), alhora que l'aplicació de GAs i BA (Promalin) permet incrementar la qualitat de la flor tallada de *Lilium* gràcies a la reducció del nombre d'avortaments i a l'elongació de la longevitat de les flors de la inflorescència (Ranwala i Miller, 1998 *b*).

Pel que fa els nivells hormonals endògens analitzats a partir de les fulles de *Lilium* L.A. 'Courier', destaquen els resultats obtinguts amb l'anàlisi dels nivells d'ABA, sent la única hormona en que tant el tipus de tractament com l'avenç del temps provoquen variacions significatives del seu contingut. En ambdós tractaments (fulles control i tapades), el contingut en ABA incrementa a partir de l'antesi (la majoria de plantes de la població tenen al menys una flor oberta, dia 35) fins el penúltim punt de mostreig (dia 79), en què el contingut d'ABA disminueix significativament. D'altra banda, els nivells de SA també mostren una disminució progressiva a partir del punt d'antesi. Contràriament, pel que fa als òrgans florals (flor no tallada), els patrons de variació hormonal observats esdevenen diferents als de les fulles; el contingut en SA tendeix a incrementar (i no a disminuir) a tots els òrgans florals, mentre que els nivells d'ABA només augmenten durant la senescència dels tèpals externs. A més, mentre els continguts hormonals de les fulles semblen mantenir-se constants fins l'assoliment de l'antesi, als òrgans florals les variacions hormonals s'inicien des del primer estadi del

desenvolupament de la flor. Abans de l'antesi, el contingut d'ABA disminueix notablement a tots els òrgans florals, mentre que el SA incrementa en ambdós tèpals externs i interns i disminueix a l'androceu. Així doncs, tot i que l'origen de la flor rau en les fulles, la regulació hormonal del desenvolupament de les diferents parts de la planta és diferent.

A més, l'ús de les aplicacions exògenes mostra resultats molt diferents segons la part de la planta estudiada. Sorprenentment, l'aplicació d'ABA no mostra cap efecte sobre la longevitat floral ni la senescència foliar de les vares de *Lilium* L.A. 'Courier'. D'altra banda, l'aplicació de Promalin permet millorar ambdós paràmetres gràcies a la prolongació del moment d'antesi i de la senescència floral i al manteniment dels nivells de clorofil·la i F_v/F_m al llarg de la vida de la vara floral, inclús en condicions de senescència induïda per foscor. Per tant, els resultats en *Lilium* L.A. 'Courier' també recolzen l'efecte hormonal inhibidor de la senescència (floral i foliar) de les citocinines i GAs. Sorprenentment, però, el suposat efecte inductor de la senescència de l'ABA no és tant clar. A més, quan es combinen ambdós ABA i Pyrabactin, el tractament tampoc provoca cap efecte. D'altra banda, el Pyrabactin per si sol sí que provoca variacions en les fulles de *Lilium* tractades amb el compost (respecte el control), mantenint valors més alts tant de clorofil·les com de F_v/F_m . Per tant, sembla que el Pyrabactin mostra ambdues condicions d'agonista i antagonista de l'ABA, depenent si aquest és aplicat en flors o fulles, respectivament, remarcant així l'existència de diferències en els processos de senescència dels diferents teixits vegetals.

7. Aplicacions exògenes com a procediment per allargar la longevitat floral

Segons els resultats obtinguts mitjançant les diverses aplicacions exògenes utilitzades en el present treball, sembla que la combinació de l'aplicació en esprai de la solució que combina citocinines i GAs (Promalin) i de sacarosa en la solució del vas són les que millors resultats proporcionen. D'altra banda, cal tenir en compte el cost econòmic que això pot comportar, doncs l'ús de reguladors hormonals acostuma a resultar car.

Pel que fa a les aplicacions exògenes hormonals, quan el tractament implica la presència de Promalin, tant la longevitat floral com la qualitat de les fulles (en termes de nivells de clorofil·la i F_v/F_m) és major, mentre que les aplicacions d'ABA, Pyrabactin o inclús la combinació d'ambdós (ABA + Pyrabactin) no semblen afectar a la longevitat floral, però sí (negativament) a les fulles. A la flor el Pyrabactin sembla jugar un paper agonista de l'ABA, malgrat que l'efecte inductor de la senescència (i per tant de reducció de la longevitat floral) d'ambdós compostos només esdevé palpable quan la durada de la vida de la flor és suficientment llarga (p. ex. quan és tractada amb Promalin). A diferència de la flor, a les fulles (sobretot en les basals) el Pyrabactin actua com a antagonista de l'ABA, contribuint a la millora de la qualitat de la fulla mitjançant el manteniment del nivell de clorofil·les i F_v/F_m per més temps (respecte el control). De tota manera, el resultat obtingut de l'ús del Pyrabactin en les fulles és menor que la millora de la qualitat de les fulles tractades amb Promalin. Per tant, pel que fa al balanç entre el cost del compost i el resultat obtingut, el Promalin esdevé el producte més interessant per al sector de la floricultura, tot i que des del punt de vista acadèmic, l'ús del Pyrabactin, amb intenció d'aprofundir en el coneixement de la funció de l'ABA en la senescència (floral i foliar) del *Lilium* ha resultat ser molt interessant.

En el cas dels sucres, els possibles efectes negatius resultants de l'aportació extra de sacarosa a la solució del vas acostumen a presentar-se quan la concentració aplicada és

molt elevada (>3%), on inclús poden arribar a disminuir la longevitat floral alhora que indueixen la senescència foliar (Nowak i Mynett, 1985) i per tant implicant efectes negatius sobre la qualitat de la flor tallada. D'altra banda, l'ús de baixes concentracions (com la utilitzada aquí, 1%) permeten millorar lleugerament la longevitat floral sense patir una dràstica pèrdua de qualitat foliar del *Lilium*. Contràriament, en determinades varietats l'ús de concentracions superiors a la utilitzada en aquest estudi no provoquen cap influència en la longevitat floral del *Lilium* (Han, 2003), mentre que en altres espècies de la família de les Liliàcies com *Alstroemeria*, l'adició d'un 1% de sacarosa a la solució del vas provoca una prolongació de la longevitat floral (Chanasut *et al.*, 2003). A més, pel que fa al *Lilium*, la millora per efecte de l'1% de sacarosa es veu reflectida en el temps que la flor roman oberta, sense afectar la longevitat.

De tota manera, el temps empleat en assegurar que el tractament aplicat tingui els resultats òptims també és un factor a tenir en compte. A diferència dels tractaments hormonals en esprai, on l'aplicació resulta cara però efectiva i única, els tractaments amb sucres en la solució de manteniment requereixen un seguiment i manteniment de la qualitat de l'aigua per evitar la ràpida formació de poblacions microbianes, que generalment s'associa a l'aparició prematura de la senescència (Luo i Li, 2005). En aquest sentit, però, l'ús de compostos antimicrobians com el citrat d'hidroxiquinolina (8-HQC) o el diòxid de clor (ClO₂) permeten evitar aquest efecte negatiu sense minvar l'efecte de la sacarosa (ni l'esgrogueïment foliar), tot i que al tractar-se de productes antisèptics cal tenir en compte altres factors com ara la legalitat del producte o la facilitat per aconseguir-lo. D'altra banda, l'ús del 8-HQC no implica cap efecte sobre la qualitat de la flor de *Lilium* (Nowak i Mynett, 1985), mentre que l'ús de ClO₂ permet allargar la longevitat d'alguns tipus de flor tallada alhora que depenent de la concentració aplicada

també pot ser el responsable de l'aparició prematura de la senescència foliar (Macnish *et al.*, 2008).

En els estudis del present treball s'han realitzat tant aplicacions exògenes en solució de manteniment com en esprai, obtenint en ambdós casos resultats clars que en demostren l'eficiència, però sense fer ús dels productes antisèptics. L'objectiu principal de la majoria d'experiments fou la determinació de les variacions endògenes dels diversos possibles reguladors de la senescència, tant floral com foliar. Per tant, com major sigui el nombre de productes aplicats, majors són les possibles interaccions entre ells i els efectes sobre l'organisme a tractar. Així, per tal de poder determinar l'efecte d'un determinat compost cal que la solució a aplicar sigui el més senzilla possible però alhora que ens assegurem la factibilitat de que la planta l'absorbeixi.

Un altre factor a tenir en compte és el cost (econòmic i d'esforç) i la rendibilitat esperada del tractament. D'entre els tractaments utilitzats aquí, el tractament de sacarosa és el més econòmic, tot i que l'esforç per mantenir la bona qualitat de les solucions dels gerros pot ser major que la dels tractaments en esprai (on també cal canviar l'aigua de tant en tant). De tota manera, un cop adquirit, la preparació de la solució amb Promalin és fàcil, ràpida i requereix de molt poca concentració de producte, fet que eleva la seva rendibilitat. D'altra banda, si el que pretenem és allargar la longevitat de la flor tallada, l'aplicació de Promalin sembla més eficient que el manteniment en una solució 1% de sacarosa. En aquest cas, el tractament amb sucre no allarga el temps de vida de la flor però manté la flor oberta durant més temps, mentre que l'efecte de les hormones inhibidores de senescència permeten incrementar notablement la longevitat de la flor gràcies tan al retard del temps necessari per assolir l'antesi com l'abscisió dels tèpals.

Alhora, però, ens interessava també determinar els canvis fisiològics associats a les aplicacions exògenes. D'una banda, el Promalin és un producte àmpliament utilitzat en el

sector de la floricultura i l'eficiència de les citocinines en senescència floral ja ha estat descrita (Chang *et al.*, 2003), mentre que de l'altre, el paper dels sucres també acostuma a resultar beneficiós tot i que el seu paper en senescència floral és força més controvertit, pel que l'atractiu dels possibles resultats del tractament de sacarosa és major.

8. Reguladors endògens i nivells d'anàlisi

L'enorme interès despertat per la senescència vegetal (tant foliar com floral) ha permès que avui dia coneguem molts aspectes del procés a diferents nivells (des de la fisiologia fins al nivell molecular). A més, donat que el procés de senescència es pot entendre com un balanç entre la necessitat de mantenir vives les cèl·lules i/o els teixits (maximitzant el reciclatge de nutrients) i el procés de mort cel·lular per remobilitzar els compostos dels òrgans que ja no resulten útils en un punt determinat del cicle biològic de la planta (Wagstaff *et al.*, 2009), l'estudi del procés de deteriorament dels teixits vegetals a diferents nivells (fisiològic, bioquímic i molecular) permet determinar i caracteritzar els esdeveniments més importants del transcurs del procés de senescència vegetal. D'altra banda, cada metodologia d'estudi comporta diversos "pros" i "contres", que també cal tenir en compte a l'hora de decidir-nos per quin nivell d'anàlisi utilitzem en els nostres estudis. A més, cal recordar que si avui dia disposem de la tecnologia i el coneixement necessaris per abordar diversos punts clau de determinats processos biològics a nivell molecular és gràcies al coneixement previ de la fisiologia de les espècies estudiades, que ha permès entreveure els punts claus de regulació dels processos que es volien estudiar. A més, sense el coneixement previ del progrés natural del procés analitzat, els resultats moleculars mancarien de sentit. Per tant, tot i que l'estudi de les variacions de l'expressió de determinats gens pot aclarir molts interrogants o corroborar les sospites i preguntes plantejades a partir dels resultats obtinguts amb l'estudi de l'avenç del progrés a nivell

d'observació, dels canvis o de l'anàlisi de les variacions dels nivells endògens a nivell bioquímic, no haurien d'entendre's com a l'única opció viable per a determinar els canvis ocorreguts durant els processos fisiològics sinó com a resultats complementaris que ajudin a caracteritzar les similituds o diferències del procés estudiat en diverses espècies i per tant en la natura.

En primer lloc, l'observació dels canvis fisiològics ens permet conèixer millor la biologia de la planta objecte d'estudi i per tant dissenyar models experimentals més adients per al nostre organisme. A més, en el cas de les flors i en general dels productes econòmicament importants, les aplicacions exògenes serveixen per fer una primera aproximació dels efectes que un determinat compost/producte/solució té sobre un procés fisiològic determinat, mentre que a nivell acadèmic, la informació obtinguda no és sempre tan rellevant com es desitjaria. A més, quan el que es vol obtenir és un benefici palpable, la utilitat de les aplicacions exògenes es mesurarà depenent de l'efecte final/global en l'organisme i no pas pels canvis que aquest provoqui per tal d'aconseguir el resultat desitjat. D'altra banda, quan es combinen els resultats dels efectes de les aplicacions exògenes amb els obtinguts mitjançant les anàlisis bioquímiques, els canvis donats en un procés determinat resulten millor caracteritzats i per tant l'experiment guanya un considerable grau de robustesa.

D'altra banda resulta força difícil saber quin compost cal aplicar per obtenir un determinat objectiu si no es coneixen ni la fisiologia de l'organisme en condicions normals ni el funcionament natural del procés que es vol modificar. En aquest sentit, les anàlisis bioquímiques permeten determinar els nivells de determinats components endògens, que alhora permeten caracteritzar canvis importants en els processos estudiats. De tota manera, la metodologia per analitzar determinats compostos endògens no és sempre accessible o no ha estat dissenyada per la nostra espècie. Per tant, cal tenir en

compte que generalment és necessari posar prèviament a punt el mètode. A més, les analítiques bioquímiques acostumen a incloure molts passos (des de l'extracció de la mostra fins l'anàlisi final) i per tant els resultats finals són estimacions del que succeeix realment en l'interior de la planta. De tota manera, la tecnologia i el coneixement actuals permeten afinar molt la manipulació de les mostres per tal d'aconseguir exactament el que volem determinar.

Finalment, l'anàlisi molecular dels processos endògens permet caracteritzar a nivell gènic els canvis que succeeixen durant el desenvolupament vegetal, permetent doncs caracteritzar les similituds i/o diferències dels mecanismes pels quals els organismes aconseguen assolir els canvis necessaris per adaptar-se a l'ambient en cada punt del seu cicle vital. En aquest sentit, la senescència dels pètals resulta un bon model per estudiar a nivell gènic, doncs es tracta d'un procés caracteritzat per la variació dels patrons de transcripció en què la majoria de canvis impliquen variacions dels nivells d'expressió dels gens associats a la ja ben descrita remobilització de nutrients associada a la senescència (revisat per Shahri i Tahir, 2011). D'altra banda i a un nivell més pràctic, cal tenir present que quan el genoma del model d'estudi no ha estat prèviament seqüenciat (com ara el *Lilium*) els esforços per aconseguir resultats incrementen de forma exponencial.

Per tal de profunditzar en la caracterització de la senescència floral de les espècies insensibles a l'etilè i donat que els esdeveniments cel·lulars naturals dels tèpals durant aquest procés recolzen l'ús d'estudis moleculars, es va voler complementar els resultats prèviament obtinguts amb l'anàlisi de l'expressió gènica d'una sèrie de gens relacionats amb la regulació hormonal (veure Annex). D'aquesta manera, s'aconseguia d'una banda contribuir a l'estudi molecular de la senescència del *Lilium* i de l'altra complementar les dades obtingudes mitjançant els estudis bioquímics.

De tota manera, i donat que es tracta d'una espècie de la qual se'n desconeix el genoma, per tal d'enfocar l'estudi a la regulació hormonal cal que prèviament es coneguin els gens implicats en les vies de senyalització, funció o biosíntesi de les hormones en espècies el més properes (taxonòmicament parlant) possible. En el cas del *Lilium*, el model a seguir fou el d'*Alstroemeria*, espècie a partir de la qual ja se n'havien descrit les seqüències i funcions de diversos gens, entre ells alguns relacionats amb les hormones vegetals (Wagstaff *et al.*, 2010). De tota manera, finalment només fou possible analitzar l'expressió del gen que codifica per l'aminopeptidasa P1 (ATTPP1) involucrada en el transport polar d'auxines, els transcrits de la qual incrementen a mida que la senescència dels tèpals avança, suggerint la necessitat d'augmentar el transport polar d'auxines amb l'edat del teixit (veure Annex). Alhora, els resultats també recolzen la presència d'un comportament diferencial en ambdós teixits i depenent del tipus de desenvolupament que s'ha tingut (natural o flor tallada). A més, els resultats de l'estudi es correlacionen amb els obtinguts mitjançant les anàlisis bioquímiques, permetent aprofundir així en el coneixement del mecanisme d'acció de les auxines en la senescència dels tèpals de *Lilium*.

De tota manera, l'anàlisi molecular per si sol no té sentit a menys que el procés analitzat ja hagi estat àmpliament estudiat prèviament. Per tant, l'ideal seria poder disposar del temps necessari per observar la biologia de la planta, veure com reacciona de forma "natural" als tractaments que volem aplicar i després analitzar a nivell bioquímic els components endògens clau de la regulació del procés que volem caracteritzar. Finalment, si s'escau i és possible de realitzar, l'anàlisi molecular dels canvis ocorreguts durant el procés poden proporcionar el nivell de robustesa que l'investigador vol assolir per tal de caracteritzar el procés estudiat. Malauradament, però, realitzar un mateix totes les anàlisis bioquímiques o moleculars necessàries (i en diferents espècies per poder

comparar resultats) per caracteritzar en profunditat la senescència floral resulta impossible. D'altra banda, tota aportació contribueix al coneixement de la ciència, que al cap i a la fi el que pretén és conèixer el funcionament dels processos naturals.

Per tant, si el que es vol és millorar o treure benefici d'un procés fisiològic determinat (com ara la prolongació de la vida o la millora de la qualitat de la flor tallada), d'entrada cal conèixer els mecanismes naturals pels quals el procés progressa al llarg del cicle vital de la planta per després intentar manipular-lo al nostre gust per tal d'obtenir el resultat desitjat. En el cas de la senescència floral, aquesta última etapa és quan l'ús combinat de les aplicacions exògenes i l'anàlisi dels canvis bioquímics endògens resulten més útils, mentre que l'estudi a nivell molecular dels canvis produïts durant el procés de senescència requereix un ampli coneixement de la metodologia i dels reguladors gènics que no sempre estan a l'abast de l'investigador o inclús del coneixement científic. Així, tot i que el procés de senescència floral està altament regulat a nivell genètic, les espècies d'interès comercial no acostumen a tenir el genoma seqüenciat i per tant cal partir de la base que l'estudi a nivell molecular acostuma a limitar-se a aproximacions més que a determinacions robustes.



CONCLUSIONS



CONCLUSIONS

1) Els reguladors endògens analitzats (fitohormones, sucres i estrès oxidatiu) mostren variacions significatives al llarg del desenvolupament floral en *Lilium*.

2) Els diversos òrgans florals de *Lilium* tenen comportaments diferencials entre sí al llarg del seu desenvolupament.

3) L'ABA resulta ser un important regulador del procés de senescència floral i foliar en *Lilium*, on la seva acció accelera el progrés del procés en ambdós casos.

4) En flors, el Pyrabactin es comporta com a agonista de l'ABA, accelerant la senescència floral, mentre que en les fulles la seva acció és la contrària.

5) La flor tallada experimenta canvis similars als observats en les flors no tallades, però de manera més accentuada.

6) Els continguts endògens hormonals, de sucres i els marcadors d'estrès oxidatiu varien significativament com a conseqüència del tall de la vara floral, mostrant una acceleració del procés de senescència en la flor tallada i una reducció de la seva longevitat.

7) Tots els òrgans florals, excepte el gineceu, acumulen α - i γ -tocoferol, essent la forma predominant l' α -tocoferol.

8) L' α -tocoferol podria tenir un rol específic en la senescència dels tèpals i l'androceu.

9) L'augment de producció de ROS als tèpals de *Lilium* està correlacionat amb un important increment de la síntesi de tocoferol.

10) L'adició de sacarosa a la flor tallada provoca una acceleració de l'obertura floral alhora que en retarda el procés de senescència, mantenint la flor oberta per més temps.

Conclusions

11) L'aportació de sacarosa exògena provoca una variació del balanç hormonal en diversos òrgans florals, demostrant la capacitat de senyalització dels sucres en el desenvolupament floral.

12) La senescència induïda per foscor de les fulles de *Lilium* no provoca variacions significatives en termes de capacitat reproductiva, però implica una acceleració del procés de senescència foliar que alhora es tradueix en importants variacions dels continguts hormonaals de la fulla.



ANNEX



ANNEX

L'estudi molecular de la senescència dels tèpals de les flors de *Lilium* fou dut a terme al laboratori de la Dra. Hilary J. Rogers, a la Universitat de Cardiff (Regne Unit), sota la co-supervisió del Dr. Tony D. Stead, de la Universitat Royal Holloway de Londres. La durada de l'estudi es realitzà en mig any, durant els mesos d'octubre de 2010 i març de 2011.

1. Objectius de l'estudi

Els objectius principals de l'estudi foren analitzar les variacions dels patrons d'expressió gènica mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) en temps real (qPCR, de l'anglès *quantitative PCR*) d'un lot de gens relacionats amb el metabolisme de les hormones vegetals per tal de completar l'estudi bioquímic a nivell molecular.

2. Antecedents

Els resultats obtinguts prèviament a la Universitat de Barcelona mostraven variacions hormonals significatives dels nivells de citocinines, IAA, ABA i SA al llarg del desenvolupament i senescència dels tèpals de *Lilium*, que alhora representen el factor limitant de la longevitat floral. D'altra banda, pel que fa a l'aproximació molecular, cal tenir en compte que el nombre de seqüències de *Lilium* disponibles (dipositades a les bases de dades) és molt baix.

Al Regne Unit existeix un important grup de recerca cooperativa enfocada a l'estudi de la senescència floral. En aquest cas, es comptava amb una recent publicació dels resultats d'unes anàlisis realitzades per *microarray* de flors d'*Alstroemeria* on es mostraven diversos patrons d'expressió dels gens relacionats amb els reguladors del

creixement vegetal en resposta a l'estrès per fred i deshidratació (Wagstaff *et al.*, 2010), gens dels quals a més se'n coneixia la seqüència de DNA.

L'ús d'aquesta informació, obtinguda pels investigadors del Regne Unit, fou possible gràcies a la proximitat taxonòmica d'ambdues espècies (*Alstroemeria* i *Lilium*, veure Fig. A1), permetent-nos prendre els gens descrits en *Alstroemeria* com a referència per al disseny dels iniciadors (de l'anglès, *primers*) adients per analitzar el material genètic de *Lilium*.

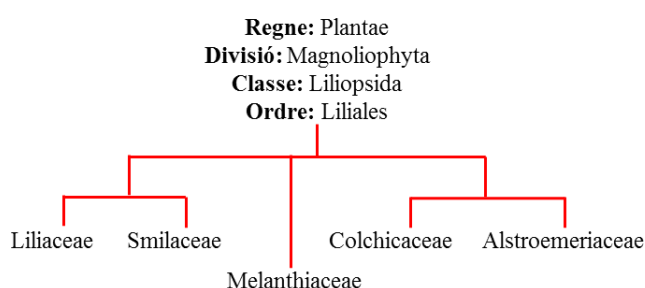


Fig. A1 Cladograma en el que es mostren les hipotètiques relacions entre l'ordre de les Liliales, adaptat de Judd *et al.*, 2008.

3. Pla de treball

El material vegetal utilitzat fou el mateix que l'utilitzat prèviament en l'anàlisi bioquímic de les variacions dels nivells hormonals endògens dels tèpals de les flors de *Lilium* unides a la planta i de la flor tallada (veure capítol 1) durant la senescència floral (Fig. A2). D'aquesta manera s'aconseguia evitar el factor "variabilitat biològica" alhora que es permetia fer una comparativa coherent d'ambdós anàlisis.

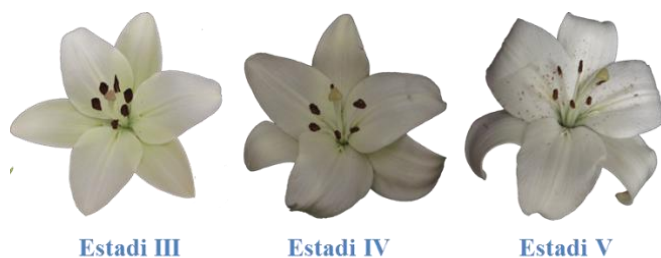


Fig. A2 Estadis del desenvolupament floral en *Lilium*. Es mostren, per ordre cronològic, l'estadi III (flor en antesi, tèpals groguencs), estadi IV (tèpals blancs) i estadi V (tèpals deshidratats).

En primer lloc, calia familiaritzar-se amb les tècniques moleculars bàsiques (extracció d'RNA, PCR i qPCR, l'electroforesi en gel d'agarosa, síntesi de cDNA, etc.) per verificar que el material de partida era apte per l'estudi. Seguidament, calia dissenyar els iniciadors degenerats dels gens d'interès en base a les seqüències de DNA conegudes d'*Alstroemeria*. S'utilitzà la base de dades BLASTx, del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) per tal de poder comparar l'homologia existent entre la nostra seqüència d'aminoàcids més provable, traduïda a partir de la seqüència de DNA coneguda, amb les seqüències proteiques d'altres espècies de monocotiledònies (com *Lilium* i *Alstroemeria*).

Un cop trobades, es procedí a alinear les seqüències per determinar les zones de major homologia, que alhora servirien per dissenyar els iniciadors degenerats. En aquest pas, però, es tingué també en compte que el codi genètic és degenerat i que per tant per a cada aminoàcid de la seqüència (de la zona de major homologia) pot ser codificat per diversos codons. Per tant, l'elecció de les bases nitrogenades no resultà sempre evident, obligant-nos a incloure bases degenerades (segons els codis *IUB*) en les seqüències *consensus* dels iniciadors, implicant la possibilitat d'obtenció de productes inespecífics.

Es dissenyaren 6 lots d'iniciadors degenerats (mínim un iniciador per cada extrem del gen, anomenats iniciadors *forward* (5') i *reverse* (3'), respectivament) en base a 6 seqüències gèniques d'*Alstroemeria* relacionades amb les auxines i l'ABA (Wagstaff *et al.*, 2010, Taules A1 i A2).

Un cop obtinguts, es procedí a provar els iniciadors degenerats en una barreja de cDNAs provinents de diferents mostres dels tètals de *Lilium* per comprovar la seva capacitat d'amplificar per PCR el cDNA de l'espècie objecte d'estudi. Seguidament, els productes de l'amplificació foren separats per electroforesi en gel d'agarosa per tal de poder recuperar-ne el DNA de les bandes de pes molecular corresponent a l'estimat

(segons el nombre de bases inclosos en la seqüència del gen d'interès i encapçalats pels iniciadors). Per tal de poder seqüenciar els productes de l'amplificació amb els iniciadors degenerats, però, calia abans incrementar la concentració de material gènic disponible. Per tal d'aconseguir-ho, el DNA recuperat del gel d'agarosa es clonà primer en el vector pGEM-T i posteriorment s'utilitzà per transformar les cèl·lules competents d'*Escherichia coli*. Seguidament, s'identificaren les colònies que contenien l'insert de DNA d'interès (mitjançant una PCR amb els iniciadors específics M13, que s'uneixen al vector pGEM-T) per tal de seqüenciar únicament els clons que continguessin el DNA amplificat a partir dels iniciadors degenerats dissenyats a partir de les seqüències d'*Alstroemeria*.

Gen d' <i>Alstroemeria</i>	Funció del gen d' <i>Alstroemeria</i>	Nom dels iniciadors degenerats	Pes molecular estimat de l'amplificació	
12.m15	Transport polar d'auxines	12.m15	153bases	
4.b13	Factor de resposta a auxines 4	L2	F ₁ -R: 261bases	F ₂ -R: 162bases
14.c13	Proteïna induïda per auxines	L3	147bases	
10.b17	Proteïna induïble per estrès i ABA	L4	84 bases	
11.l15	Hipersensible a sequera i ABA	L5	153 bases	
8.p19	Proteïna de maduració per estrès i ABA	L6	F ₁ -R: 99bases	F ₂ -R: 183bases

Taula A1 Nomenclatura i funció dels gens d'*Alstroemeria*, nom donat als iniciadors degenerats dissenyats a partir de les mateixes seqüències gèniques i pesos moleculars estimats dels productes d'amplificació resultants de la utilització dels mateixos iniciadors. Wagstaff *et al.*, 2010. *Journal of Experimental Botany*, 61: 2905-2921.

Un cop conegudes les seqüències dels DNA amplificats a partir dels iniciadors degenerats, es tornà a realitzar un anàlisi comparatiu amb l'ajuda de la base de dades BLASTx per tal de corroborar que l'homologia del producte obtingut amb el gen d'interès es mantenia (i no s'havia amplificat qualsevol altre gen). En cas afirmatiu, la seqüència del DNA amplificat a partir dels iniciadors degenerats serviria per dissenyar

els iniciadors del gen d'interès específics per *Lilium*, que posteriorment podrien ser utilitzats en l'anàlisi de l'expressió gènica per qPCR.

Lot d'iniciadors	Forward	Forward ₂	Reverse	T _m
12.m15	CGACATGGTACWGGYCAT	-	CATTCTCCAATCTWATNCCRAA	54°C
L2	ACCTTCGTKAARGTNTA	TTTGGCCTTGARGGNCA	CATCTGCTGNACYTCYTG	52°C
L3	GCGGTGTAYRTNGGNGA	-	TGGGATGGTRAKNCCNCC	52°C
L4	CAGTGGCTCACNTAYTGG	-	CCAAAATGGNARCCAYTC	52°C
L5	GACAAGGARYTNGTNGG	-	AAGAACYARDATNGCDAT	50°C
L6	GCGAAGAARGAYCCNGA	GAGAAGCAYCAYAARCA	GTGGTGCTCRTGRAANGC	52°C

Taula A2 Seqüències de nucleòtids i T_m dels primers degenerats dissenyats en base a les seqüències dels gens d'*Alstroemeria* descrits per Wagstaff *et al.* el 2010.

4. Material i mètodes

4.1 *Material vegetal, condicions de creixement i mostres realitzats*

Les flors de *Lilium* L.A. “Courier” s’obtingueren a partir de bulbs de calibre 14/16, comprats a *Mapifloricultura* S.L. (Madrid, Espanya). El 25 de novembre de 2008 es plantaren els bulbs al sòl càlcic de tipus Luvisol (FAO, 2006) dels Camps Experimentals de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, sota una estructura metàl·lica en arc coberta per un llençol de PVC (a aproximadament 2 m de distància del terra). La densitat de plantació fou de 45 bulbs/m² i el reg (aigua corrent) es realitzava un cop per setmana, tal i com aconsella l'*International Flower Bulb Centre*.

Donades les característiques dels bulbs (de calibre 14/16), totes les plantes generaren entre 3 i 6 botons florals.

A fi de caracteritzar amb més detall el procés de senescència dels tèpals interns i externs de flors de *Lilium*, es volgué comparar l'expressió gènica durant la senescència

floral en condicions naturals i de flor tallada. S'establiren 3 estadis de desenvolupament floral (Fig. A2) incloent, cronològicament, estadi III (flor en antesi, tèpals groguencs), estadi IV (tèpals blancs) i estadi V (tèpals deshidratats).

En ambdós tractaments (senescència natural i flor tallada), els mostrejos es van realitzar a mida que les flors anaven assolint els diferents estadis del desenvolupament.

En el cas de la flor tallada i seguint els consells de l'*International Flower Bulb Centre*, la recol·lecció de cada una de les vares es dugué a terme quan almenys un dels botons florals virava del verd inicial al color més blanquinós de la flor en antesi. S'obtingueren un total d'aproximadament unes 30 vares florals, que es deixaren submergides en aigua destil·lada durant tot el desenvolupament floral fins el moment dels mostrejos.

Per a cada estadi del desenvolupament floral i per ambdós tractaments, al laboratori es separaren i congelaren en nitrogen líquid els tèpals externs dels interns d'un total de 6 flors diferents. Seguidament es desaren les mostres a -80°C fins el moment de les anàlisis.

4.2 Extracció de l'RNA dels tèpals de *Lilium*

L'extracció de l'RNA de les mostres es va fer amb el reactiu "TRI-Reagent[®]" de *Sigma*, segons el protocol descrit per la pròpia companyia. Tot el material de laboratori ha d'estar prèviament esterilitzat.

En resum, amb l'ajuda d'un morter i nitrogen líquid es van triturar 200 mg de teixit congelat, als quals s'hi van afegir 2 mL del reactiu TRI-Reagent[®]. Seguidament es va repartir el volum en dos tubs per centrifugar-los durant 10 minuts (12.000 rpm i a 4°C). Els sobrenedants van ser transferits a nous tubs, als quals s'hi van afegir 200 µL de cloroform. Es tornà a centrifugar 15 minuts més (12.000 rpm i a 4°C) per recuperar

els sobrenedants, als quals s'hi afegí 500 µL d'isopropanol i es tornà a centrifugar 10 minuts (12.000 rpm i a 4°C). Seguidament, s'afegí 1 mL d'etanol 75% als *pellet* i seguidament es tornà a centrifugar 10 minuts (12.000 rpm i 4°C). Els *pellet* resultants van ser assecats (15-30 minuts) a la cabina de flux laminar, re-suspesos en 25 µL d'aigua destil·lada i estèril. Finalment, es van combinar les parelles de tubs corresponents a la mateixa mostra, obtenint un total de 50 mL d'extracció d'RNA per mostra.

Seguidament, per tal de corroborar la presència i qualitat de l'RNA, es mesurà la concentració d'RNA de les extraccions per espectrofotometria (*Nanodrop*) i es van analitzar 200 ng d'RNA en un gel 1% d'agarosa. Finalment, els extractes es desaren a -80°C fins futures anàlisis.

4.3 Tractament DNAsa I

Donat que l'extracció d'RNA a partir del teixit vegetal amb el reactiu TRI-Reagent[®] també pot contenir DNA, la purificació dels extractes esdevé necessària per tal d'eliminar qualsevol resta de DNA en la mostra.

La digestió dels extractes d'RNA dels tèpals de *Lilium* es dugué a terme amb l'enzim DNAsa "RQ1 Rnase-Free DNase" de *Promega*, seguint el protocol de la casa comercial però lleugerament modificat. En resum, es van barrejar 2 µg d'RNA (2-16mL) amb 2 µL del tampó "RQ1 RNase-Free DNase 10X Buffer", 2 µL d'enzim "RQ1 Rnase-Free DNase" (1 unitat d'enzim/µg d'RNA) i finalment s'hi va afegir els µL d'aigua destil·lada estèril necessaris fins assolir un volum final de 20 mL. Seguidament, la barreja s'incubà durant 30 minuts a 37°C, s'hi van afegir 2 µL del reactiu "RQ1 DNase Stop Solution" i s'incubà 10 minuts més a 65°C per aturar la reacció de digestió. Finalment, es determinà la concentració d'RNA de les mostres

digerides amb el *Nanodrop*. Addicionalment, la digestió va ser amplificada per PCR amb iniciadors PUV (gen d'expressió constitutiva) a una temperatura d'hibridació dels iniciadors de 50°C (veure secció 4.6 de l'Annex), per corroborar la manca de DNA en les mostres.

4.4 Síntesi de cDNA

L'obtenció del cDNA a partir de l'RNA extret de les mostres es dugué a terme amb el RETROscript[®] *Kit d'Ambion* (Austin, Texas, USA), segons el protocol facilitat amb el *kit*. El *kit* implica la utilització de l'enzim transcriptasa inversa, que copia l'RNA en la seva seqüència complementària; el cDNA, que més tard es podrà amplificar per PCR per obtenir així cDNA de doble cadena.

Per a totes les mostres, es barrejà la mateixa quantitat d'RNA per tal d'obtenir la mateixa quantitat de cDNA en cada cas. Finalment, per corroborar la presència de cDNA, s'amplificaren les mostres per PCR amb els iniciadors PUV (Fig. A4) i els cDNAs es van desar a -20°C fins noves anàlisis.

4.5 Disseny dels iniciadors degenerats

Els anàlisis per *microarray* i de la seqüenciació dels fragments de seqüència expressada, analitzats en flors d'*Alstroemeria* (Wagstaff *et al.*, 2010) permetien identificar 24 gens relacionats amb la senyalització per reguladors del creixement vegetal (Fig. A3). A partir d'aquesta informació i donada la proximitat taxonòmica d'*Alstroemeria* i *Lilium* (Fig. A1), seria possible dissenyar diversos lots d'iniciadors degenerats a partir de les seqüències d'*Alstroemeria* dels gens relacionats amb les hormones, per tal d'amplificar el cDNA de *Lilium* L.A. 'Courier'.

Donat que prèviament, a la Universitat de Barcelona s'havien analitzat els continguts hormonals endògens dels pètals al llarg del desenvolupament floral del

Lilium, on els resultats mostraven variacions significatives en els continguts d'IAA i ABA, es dissenyaren tants lots de iniciadors degenerats com fou possible per als gens que codifiquen per al metabolisme d'aquestes hormones.

Reguladors del creixement vegetal	Nom del gen/Contig	Funció	Estrès per fred	Estrès hídric
Auxines (AUX)	12.m15	ATAPP1 (aminopeptidasa P1), transport polar d'AUX	B	
	Contig 94	Proteïna lligasa d'unió/ubiquitina (ABF2)	B	
	4.b13	Factor de resposta 4 a AUX	A	
	15.a10	Proteïna induïble per AUX	B	
	14.c13	Proteïna induïble per AUX	B	B
	Contig 229	Proteïna regulada per AUX	A	A
Àcid abscísic (ABA)	Contig 226	Proteïna del tipus "maduració per ABA"	A	
	15.c18	Proteïna de resposta a l'ABA (domini GRAM)	D	
	Contig 1	Proteïna relacionada amb les proteïnes de resposta a l'ABA (domini GRAM)	D	B
	10.b17	Proteïna AthVA22a, induïble per ABA i estrès	A	
	11.115	Hipersensible a ABA i sequera		B
	1.j9	Factor de transcripció, sensible a ABA i sequera	A	B
	8.p19	Proteïna semblant a les proteïnes de maduració per estrès d'ABA	A	A
Etilè	15.h15	EIL2, factor transcripcional d'etilè	B	B
Àcid jasmònic (JA)	Contig 57	SAM: carboxil metiltransferasa de JA	B	B
Citocinines	10.j15	Prolina deshidrogenasa/oxigenasa, induïble per citocinines	A	
Gibberel·lines (GAs)	Contig 122	Proteïna de la família de proteïnes regulades per GAs	B	B
	Contig 119	Proteïna precursora de GASA2 regulada per GAs		B

Fig. A3 Marcadors de seqüència expressada identificats per Wagstaff *et al.* el 2010 on es mostren els patrons d'expressió dels gens relacionats amb els reguladors de la senyalització del creixement vegetal en resposta al tractaments d'estrès per fred i sequera (estrès hídric), a partir dels quals es dissenyaren els primers degenerats per amplificar el cDNA de *Lilium* L.A. 'Courier'. A, regulació a l'alça; B, regulació a la baixa.

El procés del disseny dels iniciadors degenerats començà amb la cerca de seqüències proteiques homòlogues d'altres espècies vegetals (especialment monocotiledònies) i la traducció de la seqüència del gen d'interès d'*Alstroemeria* a proteïna (segons el marc de lectura més provable) gràcies a la utilització de la base de dades BLASTx del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, 2010).

Per a cada un dels gens d'interès, un cop obtingudes les seqüències homòlogues d'aminoàcids es van alinear (amb el programa *Bioedit*) i es van determinar les regions més homòlogues a totes les espècies per dissenyar-ne els iniciadors (Fig. A4).

A l'hora d'escollir les regions d'aminoàcids calia tenir en compte diversos aspectes: en primer lloc, les regions candidates a ser un dels iniciadors han de tenir una longitud mínima de 6 aminoàcids o més. En segon lloc, l'extrem 3' de l'iniciador cal que es mantingui el major grau d'homologia entre totes les espècies alineades, mentre

que en l'extrem 5' podem ser més permissius, sobretot pels dos aminoàcids de l'extrem. D'altra banda, per a un mateix gen, els iniciadors *forward* i *reverse* han d'estar prou allunyats l'un de l'altre per tal de ser capaços de generar un producte de longitud acceptable (si el producte de l'amplificació té un pes molecular massa baix, no es podrà detectar en el gel d'agarosa). A més, cal recordar que el codi genètic és degenerat i que, per tant, per un mateix aminoàcid hi poden haver diferents combinacions de nucleòtids que el codifiquin.



Fig. A4 Alineació de la seqüència d'aminoàcids del gen 12.m15 d'*Alstroemeria* (transport polar d'auxines) amb les seqüències proteiques homòlogues d'altres espècies, proposades per la base de dades BLASTX. Els aminoàcids marcats en negre indiquen coincidència (el mateix aminoàcid) a totes les seqüències (lindar: 80%), els marcats en gris mostren una semblança moderada entre seqüències, podent variar en alguna espècie, i les regions en blanc no mostren similitud entre espècies. Els requadres vermells indiquen les seqüències d'aminoàcids, idèntics a totes les seqüències analitzades, escollides per amplificar el cDNA de *Lilium* (iniciadors).

Un cop escollides les regions "iniciador", es determinà la seqüència de nucleòtids que codifica per seqüència d'aminoàcids escollida; la seqüència *consensus*. Conjuntament amb les seqüències de nucleòtids relatives a les espècies homòlogues escollides, s'alinearen els codons segons la regió de la seqüència d'aminoàcids escollida per tal de decidir els nucleòtids amb més probabilitats de formar part de la seqüència *consensus* (Fig.A5). Quan no fou possible decidir quin nucleòtid era el més provable, s'introduí el codi IUB corresponent en funció de les bases que aquella posició podia contenir (Figs. A5 i A6).

Codi IUB	N	V	B	H	D	K	S	W	M	Y	R
Bases Nitrogenades	A/C/G/T	G/A/C	G/T/C	A/T/C	G/A/T	G/T	G/C	A/T	A/C	C/T	A/G

Fig. A5 Codis IUB per al disseny de primers degenerats. BN, bases nitrogenades

	<i>Forward</i>					
	5'					3'
	R	H	G	T	G	H
<u>Referència</u>	CGA	CAT	GGT	ACT	GGT	CAT
Espècie 1	CGA	CAT	GGT	ACT	GGT	CAT
Espècie 2	CGG	CAT	GGT	ACA	GGC	CAT
Espècie 3	CGA	CAT	GGA	ACT	GGT	CAT
Espècie 4	AGG	CAT	GGT	ACA	GGT	CAT
Espècie 5	CGA	CAT	GGC	ACT	GGT	CAT
Consensus:	MGR	CAT	GGH	ACW	GGY	CAT

Fig. A6 Alineació dels codons que codifiquen per als diferents aminoàcids seleccionats (de la nostra espècie de referència –*Alstroemeria*– i de 5 espècies homòlogues, segons la base de dades BLAST) per dissenyar el primer forward, en relació a cada una de les espècies analitzades. L'ombrejat (gris) correspon a les bases coincidents (idèntiques) a totes les espècies. Les bases diferents a A/T/G/C es corresponen als codis IUB.

D'altra banda, la temperatura d'hibridació (o T_m , de l'anglès *melting temperature*) dels iniciadors és un altre factor a tenir en compte en el disseny dels iniciadors, ja que aquesta varia segons el nombre i les bases que conté en la seva seqüència. Les diverses T_m es calcularen de la següent manera: cada base A ò T fou equivalent a 2°C, mentre que per les bases G i C sumaren 4°C (Sambrook i Rusell, 2001). Pel que fa a les posicions incertes de la seqüència *consensus* (bases degenerades), s'utilitzaren els codis IUB; per exemple, el codi Y representa la possibilitat de que en aquella posició hi hagi tant una C com una T (Fig. A5) i, per tant, en el càlcul de la T_m pot representar +4 o +2°C. En aquest sentit, per a cada iniciador degenerat es calcularen dues T_m diferents; la T_m màxima (interpretant que totes les bases degenerades contien Gs o Cs) i la T_m mínima (considerant que totes les bases degenerades contien As o Ts).

Un cop dissenyats, els iniciadors s'analitzaren mitjançant el programa *Oligo analyzer 3.1*, que permet preveure si els iniciadors són capaços de dimeritzar per sí sols (*forward – forward*) o amb el segon iniciador (*forward – reverse*), fet que impediria

l'amplificació del cDNA. Finalment, s'encarregaren els iniciadors dissenyats a *Sigma-Genosys*.

4.6 Amplificació del material genètic de *Lilium* amb els iniciadors degenerats d'*Alstroemeria*

L'amplificació del DNA de la barreja de cDNAs de *Lilium* es dugué a terme amb el termociclador Gene Amp® PCR System 2700 (*Applied Biosystems*) i els reactius inclosos en el paquet "GoTaq® Flexi DNA Polymerase" de *Promega*.

Per a cada reacció, es barrejaren 5 µL del tampó 5X Green "GoTaq® Flexi Buffer" + 1.5 µL de MgCl₂ 25 mM + 0.5 µL d'una solució de dNTPs 10 mM + 0.125 µL de l'enzim *GoTaq® DNA Polymerase* + 1 µL de l'iniciador *forward* (10µM)+ 1 µL de l'iniciador *reverse* (10µM)+ X µL d'aigua fins assolir un volum final de 25 µL.

El termociclador fou programat per realitzar un pretractament de 2 minuts a 94°C, 40 cicles de 1 minut a 94°C + 1 minut a la T_m òptima per als iniciadors utilitzats en aquell cas + 1 minut a 72°C i una elongació final de 10 minuts a 72°C.

Seguidament, els productes de l'amplificació per PCR s' analitzaren per electroforesi en gel d'agarosa.

4.7 Extracció de DNA de les bandes amplificades amb els iniciadors degenerats

L'extracció del material genètic amplificat per PCR es dugué a terme amb el kit de *Quiagen* anomenat "QIAquick Gel Extraction Kit" i segons el protocol que la pròpia casa comercial descriu.

4.8 Clonació dels productes de l'amplificació per PCR en el vector pGEM-T

La lligació del material genètic extret a partir de les bandes dels gels 1% d'agarosa es dugué a terme amb l'enzim lligasa i el vector "pGEM-T", *Promega*, segons el descrit per la casa comercial.

4.9 Transformació de les lligacions en cèl·lules competents d'*E.coli* DH5a

La transformació en cèl·lules competents d'*E. coli* DH5a es dugué a terme segons el protocol facilitat per la Dra. Rogers. En resum, es descongelà una alíquota de 100 µL cèl·lules competents (emmagatzemades a -80°C) i es transferí en un tub de 14 mL per poder barrejar-les amb 1-2 µL de la lligació en el vector pGEM-T. Es deixaren els tubs en gel durant 20 minuts i seguidament es procedí a realitzar un xoc tèrmic, introduint els tubs durant exactament 45 segons al bany d'aigua, pre-escalfat a 42°C i retornant-los després al gel (durant aproximadament 2 minuts més). S'hi afegiren 900 µL de medi SOC i s'incubà a 37°C amb agitació (100 rpm) durant 1 hora. Un cop superat el temps d'incubació, es plaquejaren 200 µL del cultiu en plaques de medi LB amb ampicil·lina (100 µg/mL) i es deixaren incubant tota la nit a 37°C. A l'endemà, es tregueren les plaques de l'estufa i es desaren a la nevera (4-10°C) fins futures anàlisis.

4.10 Amplificació del material genètic de les colònies per identificar els clons positius després de la transformació amb *E. coli*

Per tal d'identificar quines de les colònies transformades contenen l'insert de DNA d'interès (prèviament lligat al vector pGEM-T) calgué realitzar una PCR amb els iniciadors M13 (que s'unirien als extrems del vector, Fig. A7) per posteriorment poder-ne analitzar els productes d'amplificació mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa.

En el cas dels clons negatius, l'amplificació per PCR generà productes de 236 parells de bases (pb) degut a que el que s'estava amplificant és el DNA del propi vector

(llocs d'unió dels iniciadors i regió de clonació múltiple, Fig. A7). D'altra banda, si el clon incloïa l'insert d'interès, l'amplificació generà productes de pes molecular més elevat (nombre de pb de l'insert + 236 pb del vector).

El protocol seguit per tal de subcultivar en medi líquid LB els clons triats fou el següent: a partir de les plaques obtingudes de la transformació, les colònies s'inoculen en 200 µL de medi LB amb ampicil·lina (100 µg/mL) i s'incuben els tubs durant 4-5 hores a 37°C amb agitació. Passat el temps d'incubació, el cultiu s'utilitza com a plantilla per una PCR amb els iniciadors M13 i la resta es desa a la nevera (4-10°C). Un cop finalitzada, s'analitzen els productes de l'amplificació mitjançant l'electroforesi en gel d'agarosa per diferenciar així els clons positius dels negatius.

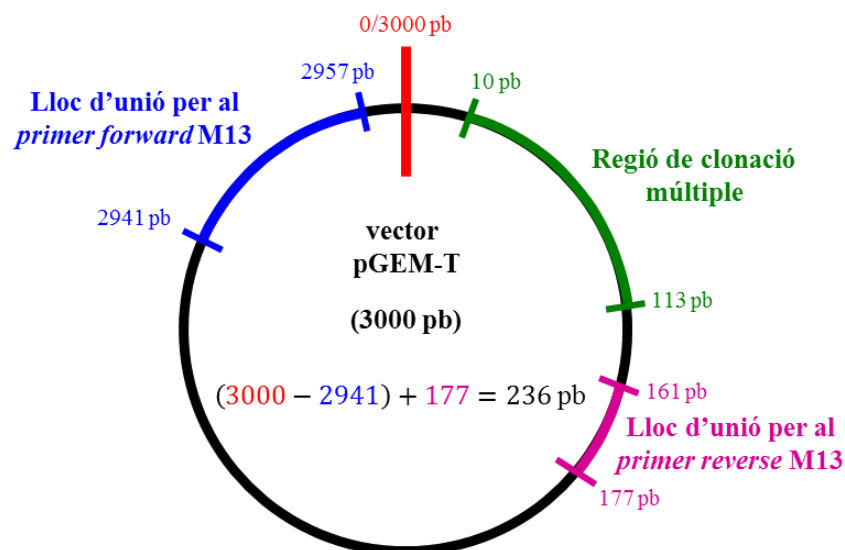


Fig. A7 Esquema del vector pGEM-T de Promega; llocs d'unió als iniciadors M13 (*forward* i *reverse*) i lloc de clonació múltiple. L'equació de l'interior del vector mostra el càlcul del nombre de parells de bases (pb) de les amplificacions obtingudes en els clons negatius (sense insert).

Seguidament, a partir dels clons positius, es generaren nous cultius (50 µL del clon positiu inoculats en 2950 µL de medi LB amb ampicil·lina 100 µg/mL) per tornar a fer créixer les cèl·lules durant tota la nit (37°C amb agitació). A l'endemà, els tubs es desaren a la nevera (4-10°C).

4.11 Stocks de glicerol

Per tal de conservar els clons positius per a possibles futures anàlisis, es procedí a realitzar *stocks* dels cultius en solucions 20% de glicerol, barrejant 400 µL del cultiu positiu amb 100 µL de glicerol 100% i estèril per desar-lo a -80°C.

4.12 Extracció del DNA dels clons positius d'E.coli (Miniprep)

A partir dels cultius re-inoculats dels clons positius, s'extragué seguidament el DNA Miniprep per seqüenciar l'insert. El processament dels cultius es dugué a terme amb el kit d'extracció "QIAprep Spin Miniprep Kit" de *Quiagen*, segons el protocol facilitat per la pròpia casa comercial. Finalment, l'extracte s'analitza amb el *Nanodrop* i se n'analitzen 2 µL en un gel 1% d'agarosa.

4.13 Seqüenciació del DNA dels clons positius

Per a cada clon positiu, es prepara una alíquota de 10-20 ng/µL en un volum final de 20 µL per tal de seqüenciar-los.

4.14 Disseny dels iniciadors específics per *Lilium*

Donat que el producte de la PCR amb els iniciadors M13 inclou part del DNA del vector, un cop conegudes les seqüències dels clons, es separà la part corresponent a l'insert de la seqüència del vector. Els extrems del vector més propers a l'insert corresponen a les seqüències GCCGCGGGATT i ATCACTAGTG (Fig. A8).

Un cop aïllada la seqüència de l'insert, aquesta s'acará amb la base de dades BLASTx per tal de conèixer el marc de lectura més provable a l'hora de traduir la seqüència a la corresponent proteïna i per corroborar l'homologia amb les espècies

4.15 PCR en temps real

L'anàlisi de l'expressió gènica dels tèpals de *Lilium* durant el procés de senescència floral en condicions naturals i de flor tallada es dugué a terme amb el termociclador "DNA Engine Opticon2 Real-Time Cyclor" de *Bio-Rad Laboratories* i els reactius inclosos en el kit "DyNAmo™ HS SYBR® Green qPCR Kit" de *New England Biolabs*, segons el descrit per la casa comercial.

El protocol programat per a l'amplificació del cDNA fou el següent: 1 cicle de 15 minuts a 95°C, 40 cicles de 15 segons a 95°C i 30 segons a la T_m dels iniciadors específics i 30 segons a 72°C. Addicionalment també es va realitzar la corba de fusió, mesurant el grau de fluorescència a cada grau, des de 60°C a 98°C.

4.16 Normalització dels cDNAs amb els iniciadors 18S rRNA:

Donat que l'eficiència del pas de síntesi de cDNA pot variar d'una mostra a l'altra, també calgué normalitzar el contingut de cDNA que més tard amplificaríem per qPCR en relació amb un gen d'expressió constitutiva que representés ser un component bàsic de les cèl·lules eucariotes. S'escollí com a gen de referència el 18S rRNA, del qual els iniciadors relatius utilitzats foren els següents:

Forward: TGA CGG AGA ATT AGG GTT CG

Reverse: CCT CCA ATG GAT CCT CGT TA

La T_m utilitzada en l'amplificació en temps real amb els iniciadors 18S fou de 55°C. La primera anàlisi es realitzà amb dilucions 1/20 dels cDNA. A partir d'aquests resultats i donat que la concentració de DNA de la mostra i el valor del nombre de cicles necessaris per assolir l'eficiència òptima del sistema (C_t , de l'anglès *cycle threshold*) mantenen una correlació inversa, es determinà la mostra més diluïda. Cada cicle de diferència (respecte el valor més elevat, és a dir la mostra més diluïda) representa una

dilució de dues vegades del cDNA per arribar a dissoldre'l tant com la mostra menys concentrada.

Per tal d'obtenir el valor C_t de cada mostra, s'analitzaren 4 rèpliques metodològiques amb els iniciadors 18S, que seguidament s'utilitzaren per calcular la mitja obtenint així el C_t normalitzat de la mostra.

4.17 Càlcul de l'expressió gènica relativa del Lily1:

Es realitzaren 4 rèpliques metodològiques per mostra, obtenint 4 valors de C_t diferents.

A cada valor, s'aplicà la següent fórmula $2^{(C_t \text{ mostra} - C_t \text{ normal})}$, on el paràmetre " C_t mostra" equival al valor C_t de la rèplica, obtingut mitjançant l'amplificació amb els iniciadors del gen d'interès. D'altra banda, el paràmetre " C_t normal" equival a la mitjana de 4 valors obtinguts amb l'amplificació amb els iniciadors 18S de la mostra normalitzada.

5. Resultats

5.1 Extracció de l'RNA dels tèpals senescents de *Lilium*

Les concentracions obtingudes a partir de les extraccions d'RNA dels tèpals senescents de *Lilium* es poden consultar a la taula A4.

Tèpals Interns		Tèpals Externs	
mostra	ng/mL	mostra	ng/mL
St. III, Nat	222.8	St. III, Nat	257.6
St. IV, Nat	451.3	St. IV, Nat	430.1
St. V, Nat	267.8	St. V, Nat	232.8
St. III, FT	292.3	St. III, FT	100
St. IV, FT	415.8	St. IV, FT	519.6
St. V, FT	298.1	St. V, FT	316.5

Taula A4 Concentracions d'RNA de les mostres de *Lilium*, mesurades amb el *Nanodrop*, després del seu processament amb el mètode del TRI-Reagent®. St., estadi; Nat, Senescència natural; FT, flor tallada.

5.2 Síntesi de cDNA a partir de l'RNA extret dels tèpals de *Lilium*

Després de processar les mostres per tal de generar el cDNA, a partir dels RNA digerits amb DNAsa I, se n'analitzà el contingut de DNA (ng/μL) amb el *Nanodrop* (Taula A5) i es realitzà una PCR amb els iniciadors 18S rRNA per corroborar que la síntesi de cDNA havia funcionat (Fig. A9).

Tèpals interns		Tèpals externs	
mostra	ng/mL	mostra	ng/mL
St. III, Nat	66.61	St. III, Nat	49.03
St. IV, Nat	55.09	St. IV, Nat	39.32
St. V, Nat	57.62	St. V, Nat	50.01
St. III, FT	59.05	St. III, FT	175.95
St. IV, FT	59.13	St. IV, FT	226.91
St. V, FT	45.63	St. V, FT	51.52

Taula A5 Concentracions del DNA de les mostres de *Lilium* (mesurades amb el *Nanodrop*) després de la síntesi del cDNA. Nat= Senescència Natural; FT= flor tallada.

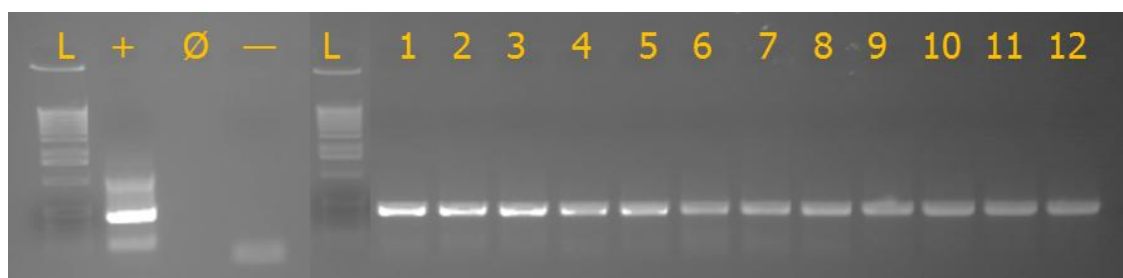


Fig. A9 Productes de l'amplificació dels cDNAs de *Lilium* amb els iniciadors 18S rRNA. +: Control positiu; —: Control negatiu. L, ladder (marcador de pes molecular); 1: Estadi IV, tèpals externs, senescència natural; 2: Estadi IV, tèpals interns, senescència natural; 3: Estadi V, tèpals interns, senescència natural; 4: Estadi V, tèpals externs, senescència natural; 5: Estadi IV, tèpals externs, flor tallada; 6: Estadi IV, tèpals externs, flor tallada; 7: Estadi V, tèpals interns, flor tallada; 8: Estadi V, tèpals externs, flor tallada; 9: Estadi III, tèpals interns, senescència natural; 10: Estadi III, tèpals externs, senescència natural; 11: Estadi III, tèpals interns, flor tallada; 12: Estadi III, tèpals externs, flor tallada.

5.3 Amplificacions obtingudes mitjançant l'ús dels iniciadors degenerats

Un cop dissenyats, una barreja de cDNAs de diferents mostres de tèpals de *Lilium* s'amplificà (amb les T_m indicades a la Taula A2) amb les diferents combinacions de iniciadors degenerats dels 6 lots dissenyats per tal de comprovar si eren capaços d'amplificar el cDNA de *Lilium* (Figs. A10 a A15). D'entrada, semblava que tots els lots de iniciadors degenerats funcionaven bé amb el material gènic del *Lilium*.

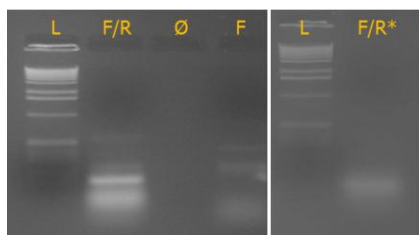


Fig. A10 Productes de l'amplificació (PCR) del cDNA dels tèpals de *Lilium* amb el lot d' iniciadors 12.m15, amb una Tm de 54°C. La fletxa blanca indica la banda que conté el material gènic d'interès. *, en comptes de primer hi ha aigua. L, ladder (marcador de pes molecular); Ø, pouet buit; F, iniciador forward; R, iniciador reverse.



Fig. A13 Productes de l'amplificació (PCR) del cDNA dels tèpals de *Lilium* amb el lot d' iniciadors L4, amb una Tm de 52°C. La fletxa blanca indica la banda que conté el material gènic d'interès. *, en comptes de primer hi ha aigua. L, ladder (marcador de pes molecular); Ø, pouet buit; F, iniciador forward; R, iniciador reverse.



Fig. A11 Productes de l'amplificació (PCR) del cDNA dels tèpals de *Lilium* amb el lot d' iniciadors L2, amb una Tm de 52°C. La fletxa blanca indica la banda que conté el material gènic d'interès. *, en comptes de primer hi ha aigua. L, ladder (marcador de pes molecular); Ø, pouet buit; F, iniciador forward; R, iniciador reverse.



Fig. A14 Productes de l'amplificació (PCR) del cDNA dels tèpals de *Lilium* amb el lot d'iniciadors L5, amb una Tm de 50°C. La fletxa blanca indica la banda que conté el material gènic d'interès. *, en comptes de primer hi ha aigua. L, ladder (marcador de pes molecular); Ø, pouet buit; F, iniciador forward; R, iniciador reverse.



Fig. A12 Productes de l'amplificació (PCR) del cDNA dels tèpals de *Lilium* amb el lot d' iniciadors L3, amb una Tm de 52°C. La fletxa blanca indica la banda que conté el material gènic d'interès. *, en comptes de primer hi ha aigua. L, ladder (marcador de pes molecular); Ø, pouet buit; F, iniciador forward; R, iniciador reverse.



Fig. A15 Productes de l'amplificació (PCR) del cDNA dels tèpals de *Lilium* amb el lot d'iniciadors L6, amb una Tm de 52°C. La fletxa blanca indica la banda que conté el material gènic d'interès. *, en comptes de primer hi ha aigua. L, ladder (marcador de pes molecular); Ø, pouet buit; F, iniciador forward; R, iniciador reverse.

5.4 Amplificació del material genètic lligat al vector pGEM-T i transformat en *E. coli DH5a*

Per tal d'identificar els clons d'*E. coli* DH5α que havien inclòs l'insert de DNA amplificat per PCR amb els iniciadors degenerats es van amplificar diverses colònies mitjançant una PCR amb els iniciadors M13 (Figs. A16 a A19).

Un cop identificats, els clons positius van ser enviats a un laboratori extern per a que en seqüenciessin el DNA contingut.

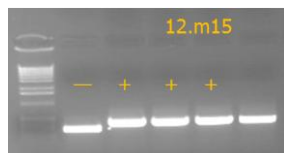


Fig. A16 Productes de l'amplificació amb els iniciadors M13 de 5 clons relatius al producte del lot d'iniciadors degenerats 12.m15. -, clon negatiu; +, clon positiu seleccionat.

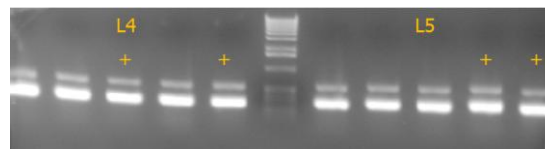


Fig. A18 Productes de l'amplificació amb els iniciadors M13 de 5 clons relatius al producte del lot d'iniciadors degenerats L4 i L5. -, clon negatiu; +, clon positiu seleccionat.

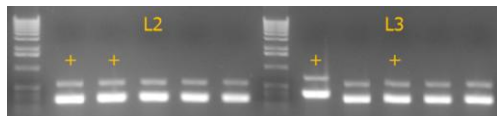


Fig. A17 Productes de l'amplificació amb els iniciadors M13 de 5 clons relatius al producte del lot d'iniciadors degenerats L2 i L3. -, clon negatiu; +, clon positiu seleccionat.



Fig. A19 Productes de l'amplificació amb els iniciadors M13 de 5 clons relatius al producte del lot d'iniciadors degenerats L6. -, clon negatiu; +, clon positiu seleccionat.

5.5 Seqüenciació dels DNA d'interès

Les seqüències obtingudes es van acabar amb la base de dades BLASTx per corroborar que es tractava del gen d'interès correcte. Malauradament, tant sols les seqüències dels clons provinents de l'amplificació amb els iniciadors degenerats 12.m15 i L6 van resultar ser el que esperàvem, mentre que la resta de clons tenien seqüències massa curtes o diferents al que s'esperava. Així, tant sols es van alinear (entre sí) les seqüències dels clons 12.m15 (Fig. A20) i L6 (Fig. A21).

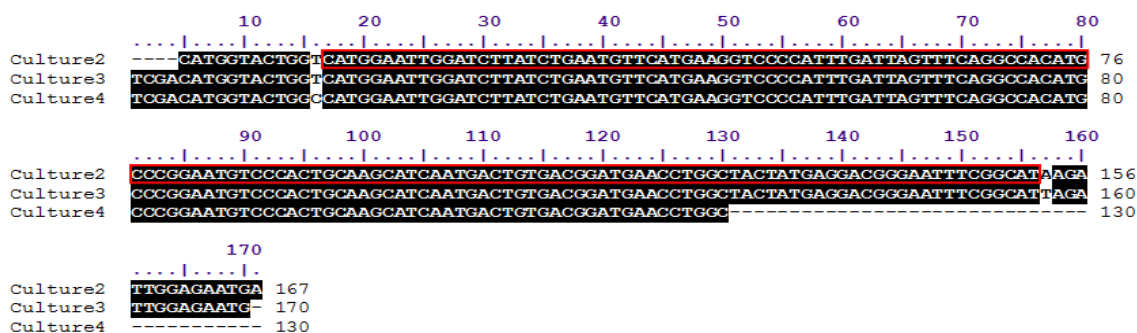


Fig. A20 Alineament de les seqüències obtingudes a partir de 3 clons positius provinents del cDNA de *Lilium* amplificat amb el lot d'iniciadors degenerats 12.m15. Les regions marcades en negre són idèntiques entre si (llindar del 80%). La seqüència marcada en vermell indica la seqüència utilitzada en el disseny dels iniciadors específics per *Lilium*.

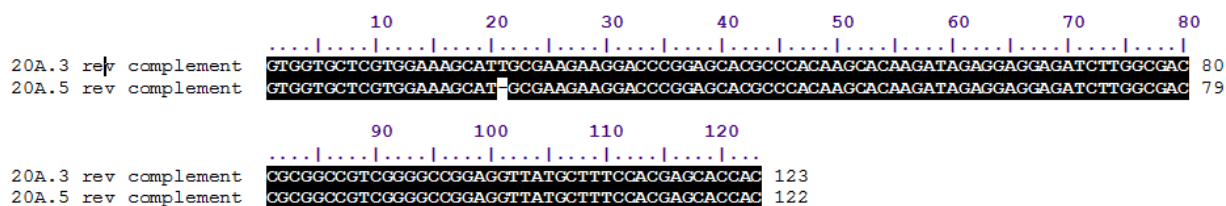


Fig. A21 Alineament de les seqüències obtingudes a partir de 2 clons positius provinents del cDNA de *Lilium* amplificat amb el lot de iniciadors degenerats L6. Les regions marcades en negre són idèntiques entre si (llindar del 80%).

5.6 Contaminacions

Donat que les seqüències obtingudes a partir de les amplificacions amb els iniciadors degenerats L2, L3, L4 i L5 no es corresponien amb la seqüència del gen d'interès (o resultaven ser massa curtes per poder decidir si eren prou homòlogues o no al gen d'interès) es provà de tornar a amplificar noves colònies d'*E. coli* transformades per tal d'identificar nous clons positius que possiblement continguessin la seqüència amplificada correctament.

Gràcies a aquesta comprovació es va poder determinar l'existència d'una contaminació dels clons L2, L3, L4 i L5 amb la seqüència L6 (tots contenien el mateix material genètic que els clons L6). Malauradament, per manca de temps, no es van poder repetir els procediments necessaris per obtenir nous clons i així determinar les seqüències correctes dels clons L2, L3, L4 i L5.

5.7 Disseny dels iniciadors específics per *Lilium* a partir de les seqüències obtingudes amb els iniciadors degenerats "12.m15" i "L6"

Els iniciadors específics dissenyats (Taula A6) a partir del processament de la barreja de cDNAs de *Lilium* amplificades amb els iniciadors degenerats foren 2; Lily1 (a partir dels clons de 12.m15) i Lily2 (a partir dels clons de L6).

Clon d'iniciadors degenerats	Nom	Gen d' <i>Alstroemeria</i>	Seqüència 5'→3'	T _m qPCR
12.m15	Lily1-F	12.m15	TGTTTCATGAAGGT CCCCATT	55°C
	Lily1-R		TTCCCGTCCTCAT AGTAGCC	
L6	Lily2-F	8.p19	GAAGAAGGACCC GGAGCAC	55°C
	Lily2-R		GTGGTGCTCGTGG AAAGC	
	Lily2-F ₂		TGCGAAGAAGGA CCCGGAG	

Taula A6 Seqüències i T_m dels iniciadors específics de *Lilium* utilitzats en l'amplificació per PCR en temps real. qPCR = PCR en temps real.

5.8 Amplificació del cDNA dels tèpals de *Lilium* per qPCR amb els iniciadors específics "Lily1" i "Lily2"

Un cop normalitzades, les mostres dels tèpals interns i externs es van amplificar per PCR en temps real amb els iniciadors específics Lily1 (Figs. A22 i A23).

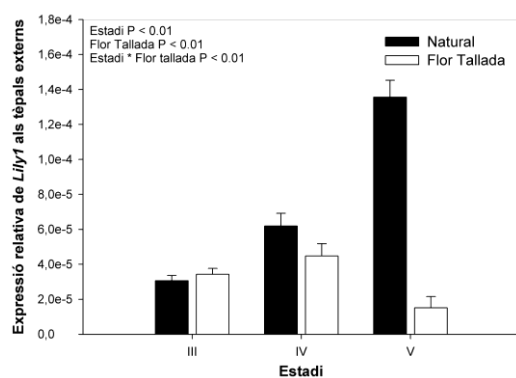


Fig. A22 Expressió relativa de les mostres dels tèpals externs de *Lilium* al llarg del procés de senescència, amplificades per qPCR amb els iniciadors específics Lily1. Al gràfic es mostren també els resultats estadístics (ANOVA de dos factors, $P < 0.05$).

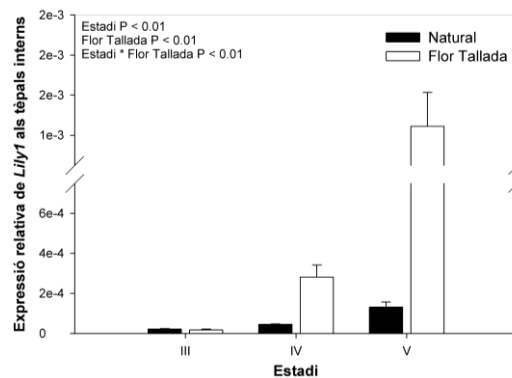


Fig. A23 Expressió relativa de les mostres dels tèpals interns de *Lilium* al llarg del procés de senescència, amplificades per qPCR amb els iniciadors específics Lily1. Al gràfic es mostren també els resultats estadístics (ANOVA de dos factors, $P < 0.05$).

L'expressió del gen *Lily1* de *Lilium* augmenta amb el progrés de la senescència natural en ambdós tipus de tèpals (externs i interns). En la flor tallada, els nivells d'expressió del *Lily1* als tèpals externs són similars o inclús inferiors als nivells d'expressió durant el desenvolupament natural, mentre que als tèpals interns de la flor

tallada l'expressió del *Lily1* és molt superior que en la flor no tallada. A més, a diferència dels tèpals interns, on els nivells d'expressió de la flor tallada incrementen progressivament amb la senescència, en l'últim estadi del desenvolupament dels tèpals externs de la flor tallada es mostra una disminució del nivell d'expressió.

Pel que fa els iniciadors del gen *Lily2*, no es van poder obtenir resultats viables degut a l'existència d'interaccions entre els mateixos iniciadors i la seva pròpia amplificació (amb aigua com a plantilla; el blanc) s'emascarava amb l'amplificació de les mostres, fet que ens impedeix utilitzar aquestes dades.

6. Discussió, conclusions i futures anàlisis

Els iniciadors específics per al gen *Lily1* de *Lilium* foren dissenyats en base a la seqüència del gen *12.m15* d'*Alstroemeria*, que codifica per l'aminopeptidasa P1 (ATAPP1), implicada en el transport polar d'auxines. Els resultats obtinguts mitjançant l'anàlisi per qPCR en *Lilium* suggereixen la necessitat d'incrementar el transport d'auxines a mida que la senescència natural dels tèpals progressa. A més, en resposta al tall de la vara floral, els tèpals interns incrementen significativament l'expressió del *Lily1*, remarcant la importància del transport d'auxines en la senescència floral.

Els resultats obtinguts prèviament a Barcelona mostraren que, a partir de l'antesi, els nivells d'IAA només varien significativament als tèpals externs, disminuint durant la senescència natural (veure capítol 1 de la secció de resultats). Per tant, i donat que l'expressió del gen *Lily1* incrementa al llarg de la senescència natural, les disminucions dels continguts endògens d'IAA determinats podrien respondre a un increment de la taxa de transport d'auxines associat a la senescència. Contràriament, l'increment d'IAA observat en la flor tallada no mostraren estar correlacionats amb la disminució del

transport hormonal, doncs els nivells d'expressió del *Lily1* de la flor tallada en antesi foren similars als de la flor no tallada.

Pel que fa els tèpals interns, els diversos estudis realitzats amb els òrgans florals suggerien un comportament diferencial respecte els tèpals externs, on d'entre altres factors, mostraren una acceleració del procés de senescència. D'altra banda, els nivells endògens d'IAA dels tèpals interns no variaren ni durant la senescència natural ni en resposta al tall de la vara floral. Contràriament, els nivells d'expressió del gen *Lily1* incrementaren progressivament en ambdós tipus de desenvolupament (natural i flor tallada), sent més abrupte en la flor tallada, tot i que en el punt d'antesi els valors d'expressió foren similars en ambdós tipus de desenvolupament floral. Per tant, el tall de la vara floral no provocà cap canvi en la síntesi o el transport d'auxines als tèpals interns, mostrant un cop més un comportament diferencial respecte els tèpals externs. D'altra banda durant el desenvolupament natural el patró d'expressió del gen *Lily1* fou similar a l'observat en els tèpals externs, malgrat que el contingut endogen hormonal d'IAA no semblà correspondre's amb l'increment de transcrits del *Lily1*.

Gràcies a aquestes aproximacions, ha estat possible dissenyar un nou experiment en col·laboració amb els laboratoris de la Dra. Rogers (Cardiff) i de la Dra. Lombardi (Pisa), amb el qual es pretén entendre millor la funció de les auxines en la senescència floral i l'abscisió dels tèpals de dues varietats de *Lilium* (*L. longiflorum* i *Lilium* L.A. 'Courier') mitjançant tant aplicacions exògenes (d'auxines i d'inhibidors d'auxines) com anàlisis bioquímics (nivells hormonals endògens) i moleculars, utilitzant els iniciadors específics pel gen *Lily1*.



BIBLIOGRAFIA

- Abbasi AR, Haijirezaei M, Hofius D, Sonnewald U, Voll LM (2007). Specific roles of α - and γ -tocopherol in abiotic stress responses of transgenic tobacco. *Plant Physiology*, 143: 1720-1738
- Abreu M, Munné-Bosch S (2007). Photo- and antioxidant protection and salicylic acid accumulation during post-anthesis leaf senescence in *Salvia lanigera* grown under Mediterranean climate. *Physiologia Plantarum*, 131: 590-598
- Abreu ME, Müller M, Alegre L, Munné-Bosch S (2008). Phenolic diterpene and α -tocopherol contents in leaf extracts of 60 *Salvia* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88: 2648-2653
- Aneja M, Gianfagna T, Ng E (1999). The roles of abscisic acid and ethylene in the abscission and senescence of cocoa flowers. *Plant Growth Regulation*, 27: 149-155
- Apel K, Hirt H (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Reviews of Plant Biology*, 55: 373-399
- Arango Y, Heise KP (1998). Localization of α -tocopherol synthesis in chromoplast envelope membranes of *Capsicum annuum* L. fruits. *Journal of Experimental Botany*, 49: 1259-1262
- Asami T, Nakano T, Fujioka S (2005). Plant brassinosteroid hormones. *Vitamins and Hormones*, 72: 479-504
- Ashman T, Schoen D (1994). How long should flowers live? *Nature*, 371: 788-791
- Azad A, Ishikawa T, Ishikawa T, Sawa Y, Shibata H (2008). Intracellular energy depletion triggers programmed cell death during petal senescence in tulip. *Journal of Experimental Botany*, 59: 2085-2095
- Bais H, Ravishankar G (2002). Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69: 1-34
- Balibrea Lara ME, Garcia MCG, Fatima T, Ehneß R, Lee TK, Proels R, Tanner W, Roitsch T (2004). Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. *Plant Cell*, 16: 1276-1287
- Bartoli CG, Simontacchi M, Guiamet JJ, Montaldi E, Puntarulo S (1995). Antioxidant enzymes and lipid peroxidation during aging of *Chrysanthemum morifolium* RAM petals. *Plant Science*, 104: 161-168
- Bartoli CG, Simontacchi M, Montaldi E, Puntarulo S (1996). Oxidative stress, antioxidant capacity and ethylene production during ageing of cut carnation (*Dianthus caryophyllus*) petals. *Journal of Experimental Botany*, 47: 595-601

- Bartoli CG, Simontacchi M, Montaldi ER, Puntarulo S (1997). Oxidants and antioxidants during ageing of chrysanthemum petals. *Plant Science*, 129: 157-165
- Bartoli CG, Simontacchi M, Tambussi E, Beltrano J, Montaldi E, Puntarulo S (1999). Drought and watering-dependent oxidative stress: effect on antioxidant content in *Triticum aestivum* L. leaves. *Journal of Experimental Botany*, 50: 375-383
- Benschop M, Kamenetsky R, Le Nard M, Okubo H, De Hertogh A (2010). The global flower bulb industry: Production, utilization, research. A: Janick J (Ed), Horticultural reviews, vol. 36. Hoboken, NJ, EEUU: John Wiley Sons, Inc
- Bolós O, Vigo J, Masalles R, Ninot J (1993). Flora manual dels països catalans (2^a ed). Barcelona, Espanya: Pòrtic SA
- Bolouri-Moghaddam MR, Roy KL, Xiang L, Rolland F, van den Ende W (2010). Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. *FEBS Journal*, 277: 2022-2037
- Bravdo B, Mayak S, Gravrieli Y (1974). Sucrose and water uptake from concentrated sucrose solutions by gladiolus shoots and the effect of these treatments on floret life. *Canadian Journal of Botany*, 52: 1271-1281
- Buchanan-Wollaston V, Earl S, Harrison E, Mathas E, Navabpour S, Page T, Pink D (2003). The molecular analysis of leaf senescence: a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal*, 1: 3-22
- Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, Breeze E, Lim P, Nam H, Leaver C (2005). Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 42: 567-585
- Buchanan-Wollaston, V (2007). Senescence in plants. A: *eLS*. Chichester, Sussex Occidental, Regne Unit: John Wiley Sons Ltd
- Burchi G, Nesi B, Grassotti A, Mensuali-Sodi A, Ferranti A (2005). Longevity and ethylene production during development stages of two cultivars of *Lilium* flowers ageing on plant or in vase. *Acta Horticulturae*, 682: 813-820
- Carrasco P, Carbonell J (1990). Changes in the level of peptidase activities in pea ovaries during senescence and fruit set induced by gibberellic acid. *Plant Physiology*, 92: 1070-1074
- Chakrabarty D, Verma A, Datta S (2009). Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in *Hemerocallis* (day lily) flowers. *Journal of Horticulture and Forestry*, 1: 113-119

- Chanasut C, Rogers H, Leverentz MK, Griffiths G, Thomas B, Wagstaff C, Stead A (2003). Increasing flower longevity in *Alstroemeria*. *Postharvest Biology and Technology*, 29: 324-332
- Chang H, Jones ML, Banowitz G M, Clark DG (2003). Overproduction of cytokinins in *Petunia* flowers transformed with P_{SAG12}-IPT delays corolla senescence and decreases sensitivity to ethylene. *Plant Physiology*, 132: 2174-2183
- Chen Z, Silva H, Klessig DF (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, 262: 1883-1886
- Chrost B, Falk J, Kernebeck B, Molleken H, Krupinska K (1999). Tocopherol biosynthesis in senescing chloroplasts - A mechanism to protect envelope membranes against oxidative stress and a prerequisite for lipid remobilization? A: Argyroudi-Akoyunoglou JH; Senger, H (Eds), *The chloroplast: From molecular biology to biotechnology*, Vol. 64. Dordrecht, Països Baixos: Kluwer Academic Publishers
- Clouse S (2004). Brassinosteroid signal transduction and action. A: Davies PJ (Ed), *Plant hormones: Biosynthesis, signal transduction, action!* Dordrecht, Països Baixos: Kluwer Academic Press
- Clouse S, Sasse J (1998). Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 427-451
- Coen E (2001). Goethe and the ABC model of flower development. *Life Sciences*, 324: 523-530
- Dada O, Threlfall D, Whistance G (1968). Biosynthesis of phytoquinones: Stereospecific biosynthesis of the polyprenyl side chains of teprenoid quinones and chromanols in maize shoots. *European Journal of Biochemistry*, 4: 329-333
- Dangl J, Dietrich R, Thomas H (2000). Senescence and programmed cell death. A: Buchanan BB, Grissem W, Jones R (Eds), *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, MD, EEUU: American Society of Plant Biologists
- Davies PJ (2004). *The plant hormones: Their nature, occurrence, and functions*. A: Davies PJ (Ed), *Plant hormones: Biosynthesis, signal transduction, action!*. Dordrecht, Països Baixos: Kluwer Academic Press
- DellaPenna D (2005). Progress in the dissection and manipulation of vitamin E synthesis. *Trends in Plant Science*, 10: 574-579
- DellaPenna D, Pogson B (2006). Vitamin synthesis in plants: Tocopherols and carotenoids. *Annual Reviews of Plant Biology*, 57: 711-738

- Dennis DT, Blakeley SD (2000). Carbohydrate metabolism. A: Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (Eds), Biochemistry and molecular biology of plants. Rockville, MD, EEUU: American Society of Plant Biologists
- Dhindsa R, Plumb-Dhindsa P, Thorpe T (1981). Leaf senescence: Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*, 32: 93-101
- Eisinger W (1977). Role of cytokinins in carnation flower senescence. *Plant Physiology*, 59: 707-709
- Elgar H, Woolf A, Bieleski R (1999). Ethylene production by three lily species and their response to ethylene exposure. *Postharvest Biology and Technology*, 16: 257-267
- Emerson O, Emerson G, Mohammad A, Evans H (1937). The chemistry of vitamin E; Tocopherols from various sources. *Journal of Biological Chemistry*, 122: 99-107
- Epstein S, Forsyth J, Saporoschetz I, Mantel N (1966). An exploratory investigation on the inhibition of selected photosensitizers by agents of varying antioxidant activity. *Radiation Research*, 28: 322-335
- Evans H, Emerson O, Emerson G (1974). The isolation from wheat germ oil of an alcohol, α -tocopherol, having the properties of vitamin E. *Nutrition Reviews*, 32, 80-82
- Eveland A, Jackson D (2011). Sugars, signalling and plant development. *Journal of Experimental Botany*, <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/err379>
- Fahrenholz S, Doleiden F, Tozzolo A, Lamola A (1974). On the quenching of singlet oxygen by α -tocopherol. *Photochemistry and Photobiology*, 20: 505-509
- Falk J, Munné-Bosch S (2010). Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. *Journal of Experimental Botany*, 61: 1549-1566
- Flower Council of Holland (2007): <http://www.flowercouncil.org/es/>. Consultat el 2010.
- Friedman W, Moore P, Purugganan M (2004). The evolution of plant development *American Journal of Botany*, 91: 1726-1741
- Fukuchi-Mizutani M, Ishiguro K, Nakayama T, Utsunomiya Y, Tanaka Y, Kusumi T, Ueda T (2000). Molecular and functional characterization of a rose lipoxygenase cDNA related to flower senescence. *Plant Science*, 160: 129-137
- Gan S (2003). Mitotic and postmitotic senescence in plants. *Science of Aging Knowledge Environment*, 38: re7

- Gan S (2004). The hormonal regulation of senescence. A: Davies PJ (Ed), Plant hormones: Biosynthesis, signal transduction, action! Dordrecht, Países Baixos: Kluwer Academic Press
- Gan S, Amasino R (1995). Inhibition of leaf senescence by autorregulated production of cytokinin. *Science*, 270: 1986-1988
- Gan S, Amasino R (1996). Cytokinins in plant senescence: from spray and pray to clone and play. *BioEssays*, 18: 557-565
- Gan S, Amasino R (1997). Making sense of senescence. *Plant Physiology*, 113: 313-319
- García-Heredia J, Hervás M, De la Rosa M, Navarro J (2008). Acetylsalicylic acid induces programmed cell death in *Arabidopsis* cell cultures. *Planta*, 228: 89-97
- Girotti, AW (1998). Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of Lipid Research*, 39: 1529-1542
- Goszczyńska D, Rudnicki R, Reid M (1985). The role of plant hormones in the postharvest life of cut flowers. *Acta Horticulturae*, 167: 79-94
- Grbić V, Bleecker A (1995). Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 8: 595-602
- Gulzar S, Tahir I, Amin I, Farooq S, Sultan S (2005). Effect of cytokinins on the senescence and longevity of isolated flowers of day lily (*Emerocallis fulva*) cv. 'Royal Crown' sprayed with cycloheximide. *Acta Horticulturae*, 669: 395-404
- Guo J, Yang X, Weston DJ, Chen JG (2011). Abscisic acid receptors: Past, present and future. *Journal of Integrative Plant Biology*, 53: 469-479
- Haberer G, Kieber J (2002). Cytokinins: New insights into a classic phytohormone. *Plant Physiology*, 128: 345-362
- Halevy AA, Mayak S (1979). Senescence and postharvest physiology of cut flowers - Part 1. A: Janick J (Ed), Horticultural Reviews. Westpoint, CT: AVI Publishing
- Han S (2003). Role of sugar in the vase solution on postharvest flower and leaf quality of Oriental Lily 'Stargazer'. *Postharvest Biology and Technology*, 38: 412-416
- Han S, Miller J (2003). Role of ethylene in postharvest quality of cut oriental lily 'Stargazer'. *Plant Growth Regulation*, 40: 213-222
- Harman D (1956). Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, 11: 298-300
- Hayat S, Ahmad A (2011). Brassinosteroids: A class of plant hormone. Springer

- Hendry G, Houghton J, Brown S (1987). The degradation of chlorophyll - A biological enigma. *New Phytologist*, 107: 255-302
- Hoeberichts F, van Doorn WG, Vorst O, Hall R, van Wordragen M (2007). Sucrose prevents up-regulation of senescence-associated genes in carnation petals. *Journal of Experimental Botany*, 58: 2873-2885
- Hofius D, Sonnewald U (2003). Vitamin E biosynthesis: biochemistry meets cell biology. *Trends in Plant Science*, 8: 6-8
- Hopkins M, McNamara L, Taylor C, Wang T, Thompson J (2007). Membrane dynamics and regulation of subcellular changes during senescence. A: Gan S (Ed), *Senescence processes in plants*, vol. 26. Oxford, Regne Unit: Blackwell Publishing Ltd
- Hossain Z, Mandal A, Datta S, Biswas A (2006). Decline in ascorbate peroxidase activity – A prerequisite factor for tepal senescence in gladiolus. *Journal of Plant Physiology*, 163: 186-194
- Howe, GA (2004). The roles of hormones in defense against insects and disease. A: Davies PJ (Ed), *Plant hormones: Biosynthesis, signal transduction, action!* Dordrecht, Països Baixos: Kluwer Academic Press
- Hunter D, Ferrante A, Vernieri P, Reid M (2004). Role of abscisic acid in perianth senescence of daffodil (*Narcissus pseudonarcissus* 'Dutch Master'). *Physiologia Plantarum*, 121: 313-32
- Hwang S, Lee P, Lee J (2009). Effect of holding solutions on vase life and sugar content during flower senescence of cut *Lilium* oriental hybrid 'Casa Blanca'. *Korean Journal of Horticultural Science Technology*, 27: 263-268
- Hwang S, Lee P, Choi M, Lee H, Lee J, Roh M (2011). Flower bud abscission triggered by the anther in the Asiatic hybrid lilies. *Acta Horticulturae*, 900: 265-271
- International Flower Bulb Centre: <http://www.bulbosdeflor.org/ibc/es/publiek/index.jsf>. Consultat el 2010.
- Jing H, Sturre M, Hille J, Dijkwel P (2002). *Arabidopsis* onset of leaf death mutants identify a regulatory pathway controlling leaf senescence. *Plant Journal*, 32: 51-63
- Kalinova J, Triska J, Vrchotova N (2006). Distribution of vitamin E, squalene, epicatechin, and rutin in common buckwheat plants (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 5330-5335
- Kamal-Eldin A, Appelqvist LA (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31: 671-701

- Kaur-Sawhney R, Tiburcio A, Altabella T, Galston A (2003). Polyamines in plants: An overview. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 2: 1-12
- Kazemi M, Shokri K (2011). Role of salicylic acid in decreases of membrane senescence in cut lisianthus flowers. *World Applied Sciences Journal*, 13: 142-146
- Kazemi M, Hadavi E, Hekmati J (2011). Role of salicylic acid in decreases of membrane senescence in cut carnation flowers. *American Journal of Plant Physiology*, 6: 106-112
- Kim HJ, Lim PO, Nam HG (2007). Molecular regulation of leaf senescence. A: Gan S (Ed), Senescence processes in plants. Oxford: Blackwell Publishing Ltd
- Lee J, Roh M (2011). Carbohydrate changes during flower senescence of easter lily (*Lilium longiflorum* Thunb). *Acta Horticulturae*, 900: 295-300
- León P, Sheen J (2003). Sugar and hormone connections. *Trends in Plant Science*, 8: 110-116
- Lers A (2007). Environmental regulation of leaf senescence. A: Gan S (Ed), Senescence Processes in Plants, vol. 26. Oxford, Regne Unit: Blackwell Publishing Ltd
- Leverentz M, Wagstaff C, Rogers H, Stead A, Chanasut U, Griffiths G (2002). Characterization of a novel lipoxygenase-independent senescence mechanism in *Alstroemeria peruviana* floral tissue. *Plant Physiology*, 130: 273-283
- Lim P, Nam H (2005). The molecular and genetic control of leaf senescence and longevity in *Arabidopsis*. *Current Topics in Developmental Biology*, 67: 49-83
- Lim P, Kim H, Nam H (2007). Leaf senescence. *Annual Reviews of Plant Biology*, 58: 115-136
- Liu S, Han B (2010). Differential expression pattern of an acidic 9/13-lipoxygenase in flower opening and senescence and in leaf response to phloem feeders in the tea plant. *BMC Plant Biology*, 10: 228-243
- Liu J, Li J, Wang H, Fu Z, Liu J, Yu Y (2011). Identification and expression analysis of ERF transcription factor genes in petunia during flower senescence and in response to hormone treatments. *Journal of Experimental Botany*, 62: 825-840
- Luo H, Li J (2005). Effects of pre-treatment solution containing B₉ on senescence of cut flower of lily. *Plant Physiology Communications*, 41: 34-36
- Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science*: 324, 1064-1068

- Macnish A, Leonard R, Nell T (2008). Treatment with chlorine dioxide extends the vase life of selected cut flowers. *Postharvest Biology and Technology*, 50: 197-207
- Maeda H, DellaPenna D (2007). Tocopherol functions in photosynthetic organisms. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 260-265
- Mayak S, Halevy H (1970). Cytokinin activity in rose petals and its relation to senescence. *Plant Physiology*, 46: 497-499
- Melcher K, Xu Y, Ng LM, Zhou X, Soon F, Chinnusamy V, Xu H (2010). Identification and mechanism of ABA receptor antagonism. *Nature Structural and Molecular Biology*, 17: 1102-1108
- Mène-Saffrané L, Dubugnon L, Chételat A, Stolz S, Gouhier-Darimont C (2009). Nonenzymatic oxidation of trienoic fatty acids contributes to ROS management in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 284: 1702-1708
- Miller G (2009). The metamorphosis of plants [Johann Wolfgang Von Goethe; introduction and photography by Gordon L Miller]. Cambridge, MA, EEUU: The Massachusetts Institute of Technology Press
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng W, Hwang I, Sheen J (2003). Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science*, 300: 332-336
- Morris K, Mackerness SH, Page TC, Fred John C, Murphy A, Carr J, Buchanan-Wollaston V (2000). Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *Plant Journal*, 23: 677-685
- Munné-Bosch S, Alegre L (2002). The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21: 31-57
- Munné-Bosch S, Falk J (2004). New insights into the function of tocopherols in plants. *Planta*, 218: 323-326
- Navabpour S, Morris K, Allen R, Harrison E, A-H-Mackerness S, Buchanan-Wollaston V (2003). Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, 54: 2285-2292
- National Center for Biotechnology Information (2010): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Nishimura N, Hitomi K, Arvai A, Rambo R, Hitomi C, Cutler S, Getzoff E (2009). Structural mechanism of abscisic acid binding and signaling by dimeric PYR1. *Science*, 326: 1373-1379
- Noh Y, Amasino R (1999). Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of *SAG12*. *Plant Molecular Biology*, 41: 181-194

- Noodén L, Guiamet J (1996). Genetic control of senescence and aging in plants. A: Schneider E, Rowe J (Eds), Handbook of the biology of aging. San Diego, CA, EEUU: Elsevier
- Nowak J, Mynett K (1985). The effect of sucrose, silver thiosulphate and 8-hydroxyquinoline citrate on the quality of *Lilium* inflorescence cut at bud stage and stored at low temperature. *Scientia Horticulturae*, 25: 299-302
- Nukui H, Kudo S, Yamashita A, Satoh S (2004). Repressed ethylene production in the gynoecium of long-lasting flowers of the carnation "White Candle": Role of the gynoecium in carnation flower senescence. *Journal of Experimental Botany*, 55: 641-650
- Olsen AN, Ernst HA, Leggio LL, Skriver K (2005). NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends in Plant Science*, 10: 79-87
- Omata T, Murata N (1984). Cytochromes and prenylquinones in preparations of cytoplasmic and thylakoid membranes from the cyanobacterium (blue-green alga) *Anacystis nidulans*. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 766: 395-402
- O'Neill, S (1997). Pollination regulation of flower development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48: 547-574
- Ozawa T, Takeshita M, Negishi O, Imagawa H (1993). Pollen-tube growth promoters from the style of *Rhododendron mucronatum* G Don. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 57: 2122-2126
- Panavas T, Rubinstein B (1998). Oxidative events during programmed cell death of daylily (*Hemerocallis* hybrid) petals. *Plant Science*, 133: 125-138
- Panavas T, Walker EL, Rubinstein B (1998). Possible involvement of abscisic acid in senescence of daylily petals. *Journal of Experimental Botany*, 49: 1987-1997
- Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow TFF, Alfred SE, Bonetta D, Finkelstein R, Provart NJ, Desveaus D, Rodriguez PL, McCourt P, Zhu JK, Schroeder JI, Volkman BF, Cutler SR (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science*, 324: 1068-1071
- Parrott D, Yang L, Shama L, Fischer A (2005). Senescence is accelerated, and several proteases are induced by carbon "feast" conditions in barley (*Hordeum vulgare* L) leaves. *Planta*, 222: 989-1000
- Peary J, Prince T (1990). Floral lipoxygenase: Activity during senescence and inhibition by phenidone. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 115: 455-457

- Pérez-Amador M, Carbonell J (1995). Arginine decarboxylase and putrescine oxidase in ovaries of *Pisum sativum* L. *Plant Physiology*, 107: 865-872
- Pérez-Amador M, Carbonell J, Navarro J, Moritz T, Beale M, Lewis M, Hedden P (1996). N₄-Hexanoylspermidine, a new polyamine-related compound that accumulates during ovary and petal senescence in pea. *Plant Physiology*, 110: 1177-1186
- Peterson FC, Burgie ES, Park SY, Jensen DR, Weiner JJ, Bingman CA, Chang CEA, Cutler SR, Phillips Jr GN, Volkman BF (2010). Structural basis for selective activation of ABA receptors. *Nature Structural and Molecular Biology*, 17: 1109-1113
- Porat R, Borochof A, Halevy A (1993). Enhancement of *Petunia* and *Dendrobium* flower senescence by jasmonic acid methyl-ester is via the promotion of ethylene production. *Plant Growth Regulation*, 13: 297-301
- Porat R, Reiss N, Atzorn R, Halevy AH, Borochof A (1995). Examination of the possible involvement of lipoxygenase and jasmonates in pollination-induced senescence of *Phalaenopsis* and *Dendrobium* orchid flowers. *Physiologia Plantarum*, 94: 205-210
- Pourtau N, Jennings R, Pelzer E, Pallas J, Wingler A (2006). Effect of sugar-induced senescence on gene expression and implications for the regulation of senescence in *Arabidopsis*. *Planta*, 224: 556-558
- Price A, Orellana D, Salleh F, Stevens R, Acock R, Buchanan-Wollaston V, Rogers H (2008). A comparison of leaf and petal senescence in wallflower reveals common and distinct patterns of gene expression and physiology. *Plant Physiology*, 147: 1989-1912
- Procházková D, Wilhelmová N (2007). Leaf senescence and activities of the antioxidant enzymes. *Biologia Plantarum*, 51: 104-406
- Puckhaber L, Stipanovic R, Bost G (2002). Analyses for flavonoid aglycones in fresh and preserved *Hibiscus* flowers. A: Janick J i Whipkey A (Eds), Trends in new crops and new uses. Alexandria, VA, EEUU: ASHS Press
- Pun U, Ichimura K (2003). Role of sugars in senescence and biosynthesis of ethylene in cut flowers. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 37: 219-224
- Pun U, Shimizu H, Ichimura K (2005). Effect of sucrose on ethylene biosynthesis in cut spray carnation flowers. *Acta Horticulturae*, 669: 171-174
- Quirino B, Noh Y, Himelblau E, Amasino R (2000). Molecular aspects of leaf senescence. *Trends in Plant Science*, 5: 278-282

- Ranwala A, Miller W (1998a). Sucrose-cleaving enzymes and carbohydrate pools in *Lilium longiflorum* floral organs. *Physiologia Plantarum*, 103: 541-550
- Ranwala A, Miller W (1998b). Gibberellin₄₊₇, benzyladenine, and supplemental light improve postharvest leaf and flower quality of cold-stored 'Stargazer' hybrid lilies. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123: 563-568
- Ranwala A, Miller W (2000). Preventive mechanism of gibberellin₄₊₇ and light on low-temperature-induced leaf senescence in *Lilium* cv. "Stargazer". *Postharvest Biology and Technology*, 19: 85-92
- Ranwala A, Miller W (2002). Using gibberellins to prevent leaf yellowing in cut lilies. *Greenhouse Product News*, 12: 30-34
- Ranwala A, Miller W (2005). Effects of cold storage on postharvest leaf and flower quality of potted Oriental-, Asiatic- and LA-hybrid lily cultivars. *Scientia Horticulturae*, 105: 383-392
- Reid M, Chen J (2007). Flower senescence. A: Gan S (Ed), Senescence processes in plants, vol. 26. Oxford, Regne Unit: Blackwell Publishing Ltd
- Rogers, H (2006). Programmed cell death in floral organs: How and why do flowers die? *Annals of Botany*, 97: 309-315
- Rogers, H (2012). Is there an important role for reactive oxygen species and redox regulation during floral senescence? *Plant, Cell and Environment*, 35: 217-233
- Rolland F, Moore B, Sheen J (2002). Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell*, 14: s185-s205
- Rolland F, Baena-González E, Sheen J (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Reviews of Plant Biology*, 57: 675-709
- Rubinstein B (2000). Regulation of cell death in flower petals. *Plant Molecular Biology*, 44: 303-318
- Sambrook J, Rusell WD (2001). Molecular cloning – A laboratory manual. NY, EEUU: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sandorf I, Holländer-Czytko H (2002). Jasmonate is involved in the induction of tyrosine aminotransferase and tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 216: 173-179
- Schippers J, Jing HC, Hille J, Dijkwel P (2007). Developmental and hormonal control of leaf senescence. A: Gan S (Ed), Senescence processes in plants, vol. 26. Oxford, Regne Unit: Blackwell Publishing Ltd

- Sen C, Khanna S, Roy S (2006). Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols. *Life Sciences*, 78: 2088-2098
- Serek M, Woltering E, Sisler E, Frello S, Sriskandarajah S (2006). Controlling ethylene responses in flowers at the receptor level. *Biotechnology Advances*, 24: 368-381
- Setyadjit, Joyce DC, Irving DE, Simons DH (2004a). Development and senescence of *Grevillea* 'Sylvia' inflorescences, flowers and flower parts. *Plant Growth Regulation*, 44: 133-146
- Setyadjit, Joyce DC, Irving DE, Simons DH (2004b). Effects of 6-benzylaminopurine treatments on the longevity of harvested *Grevillea* 'Sylvia' inflorescences. *Plant Growth Regulation*, 43: 9-14
- Setyadjit, Joyce DC, Simons DH (2006). Vase treatments containing gibberellic acid do not increase longevity of cut *Grevillea* 'Sylvia' inflorescences. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 46: 1535-1539
- Shahri W, Tahir I (2011). Flower senescence - Strategies and some associated events. *Botanical Reviews*, 77: 153-184
- Shibuya K, Yoshioka T, Hashiba T, Saton S (2000). Role of gynoecium in natural senescence of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flowers. *Journal of Experimental Botany*, 51: 2067-2073
- Smirnoff N (1993). The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*, 125: 27-58
- Sohal R, Weindruch R (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*, 273: 59-63
- Srivastava L (2001). Vegetative storage protein, tuberization, senescence and abscission. A: Srivastava L (Ed), Plant growth and development. San Diego, CA, EEUU: Academic Press
- Sponsel V (2006). Topic 20.3: Gibberellin biosynthesis. A: Taiz L, Zeiger E (Eds), Plant Physiology, 5th Edition Online (<http://www.plantphys.net>). Consultat l'abril de 2012
- Taverner E, Letham D, Wang J, Cornish E, Willcocks D (1999). Influence of ethylene on cytokinin metabolism in relation to *Petunia* corolla senescence. *Phytochemistry*, 51: 341-347
- Tewari R, Kumar P, Kim S, Hahn E, Paek K (2009). Nitric oxide retards xanthine oxidase-mediated superoxide anion generation in *Phalaenopsis* flower: an implication of NO in the senescence and oxidative stress regulation. *Plant Cell Reports*, 28: 267-279

- Thomas H, Ougham H, Wagstaff C, Stead A (2003). Defining senescence and death. *Journal of Experimental Botany*, 54: 1127-1132
- Tlili N, Nasri N, Saadaoui E, Khaldi A, Triki S (2009). Carotenoid and tocopherol composition of leaves, buds, and flowers of *Capparis spinosa* grown wild in Tunisia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 5381-5385
- Tripathi S, Tuteja N (2007). Integrated signaling in flower senescence: An overview. *Plant Signalling and Behaviour*, 2: 437-45
- Trivellini A, Ferrante A, Vernieri P, Carmassi G, Serra G (2011). Spatial and temporal distribution of mineral nutrients and sugars throughout the lifespan of *Hibiscus rosa-sinensis* L. flower. *Central European Journal of Biology*, 6: 365-375
- Ueda J, Kato J (1980). Isolation and identification of a senescence-promoting substance from wormwood. *Plant Physiology*, 66: 246-249
- Ulusoy S, Bosgelmez-Tinaz G, Secilmis-Canbay H (2009). Tocopherol, carotene, phenolic contents and antibacterial properties of Rose essential oil, hydrosol and absolute. *Current Microbiology*, 59: 554-558
- Valdivia E, Cosgrove D, Stephenson A (2006). Role of accelerated style senescence in pathogen defense. *American Journal of Botany*, 93: 1725-1729
- van der Kop D, Ruys G, Dees D, van der Schoot C, de Boer A, van Doorn WG (2003). Expression of defender against apoptotic death (DAD-1) in *Iris* and *Dianthus* petals. *Physiologia Plantarum*, 117: 256-263
- van der Meulen-Muisers J, van Oeveren J, Jansen J, van Tuy J (1999). Genetic analysis of postharvest flower longevity in Asiatic hybrid lilies. *Euphytica*, 107: 149-157
- van der Meulen-Muisers JJ, van Oeveren JC, van der Plas LH, van Tuyl JM (2001). Postharvest flower development in Asiatic hybrid lilies as related to tepal carbohydrate status. *Postharvest Biology and Technology*, 21: 201-211
- van Doorn WG (2001). Categories of petal senescence and abscission: A re-evaluation. *Annals of Botany*, 87: 447-456
- van Doorn WG (2004). Is petal senescence due to sugar starvation? *Plant Physiology*, 134: 35-42
- van Doorn WG (2008). Is the onset of senescence in leaf cells of intact plants due to low or high sugar levels? *Journal of Experimental Botany*, 59: 1963-1972
- van Doorn WG, Woltering EJ (2008). Physiology and molecular biology of petal senescence. *Journal of Experimental Botany*, 58: 453-480
- van Doorn WG, Han S (2011). Postharvest quality of cut lily flowers. *Postharvest Biology and Technology*, 62: 1-6

- van Styaden J, Cook E, Noodén L (1988). Cytokinins and senescence. A: Noodén L, Leopold A (Eds), Senescence and aging in plants. San Diego, CA, EEUU: Academic Press
- Verdugo G, Araneda L, Riffo M (2003). Efecto de inhibidores de etileno en postcosecha de flores cortadas de *Lilium*. *Ciencia e Investigación Agraria*, 30: 89-95
- Wagstaff C, Leverentz M, Griffiths G, Thomas B, Chanasut U, Stead A, Rogers H (2002). Protein degradation during senescence of *Alstroemeria* petals. *Journal of Experimental Botany*, 53: 233-240
- Wagstaff C, Malcom P, Rafiq A, Leverentz M, Griffiths G, Thomas B, Rogers H (2003). Programmed cell death (PCD) processes begin extremely early in *Alstroemeria* petal senescence. *New Phytologist*, 160: 49-59
- Wagstaff C, Yang T, Stead A, Buchanan-Wollaston V, Roberts J (2009). A molecular and structural characterization of senescing *Arabidopsis* siliques and comparison of transcriptional profiles with senescing petals and leaves. *Plant Journal*, 57: 690-705
- Wagstaff C, Bramke I, Breeze E, Thornber S, Harrison E, Thomas B, Rogers H (2010). A specific group of genes respond to cold dehydration stress in cut *Alstroemeria* flowers whereas ambient dehydration stress accelerates developmental senescence expression patterns. *Journal of Experimental Botany*, 61: 2905-2921
- Weiser H, Vecchi M, Schlachter M (1986). Stereoisomers of α -tocopheryl acetate IV USP units and α -tocopherol equivalents of all-rac-, 2-ambo- and RRR- α -tocopherol evaluated by simultaneous determination of resorption-gestation, myopathy and liver storage capacity in rats. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 56: 45-56
- Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, Van Onckelen H, Schmülling T (2003). Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell*, 15: 2532-2550
- Wingler A, von Schaewen A, Leegood R, Lea P, Quick W (1998). Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars, and light. *Plant Physiology*, 116: 329-335
- Wingler A, Masclaux-Daubresse C, Fischer A (2009). Sugars, senescence, and ageing in plants and heterotrophic organisms. *Journal of Experimental Botany*, 60: 1063-1066
- Woltering EG, van Doorn WG (1988). Role of ethylene in senescence of petals - Morphological and taxonomical relationships. *Journal of Experimental Botany*, 39: 1605-1616

- Yamada T, Yasumasa T, Manabe T, Kasumi M, Marubashi W (2003). Suppressive effect of trehalose on apoptotic cell death leading to petal senescence in ethylene-insensitive flowers of gladiolus. *Plant Science*, 164: 213-221
- Yin P, Fan H, Hao Q, Yuan X, Wu D, Pang Y, Yan C, Li W, Wang J, Yan N (2009). Structural insights into the mechanism of abscisic acid signalling by PYL proteins. *Nature Structural and Molecular Biology*, 16: 1230-1237
- Zaffari G, Peres L, Kerbauy G (1998). Endogenous levels of cytokinins, indoleacetic acid, abscisic acid and pigments in variegated somaclones of micropropagated banana leaves. *Journal of Plant Growth Regulation*, 17: 59-61
- Zhang K, Gan S (2012). An ABA-AtNAP transcription factor-SAG113 PP2C regulatory chain for controlling dehydration in senescing *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology*, 158: 961-969
- Zhang K, Xia XZ, Gan S (2012). An ABA-regulated and Golgi-localized protein phosphatase controls water loss during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 69: 667-678
- Zhong Y, Ciafré C (2011). Role of ABA in ethylene-independent *Iris* flower senescence. *International Proceedings of Chemical, Biological and Environmental Engineering*, 9: 261-266
- Zhou Y, Wang C, Ge H, Hoerberichts F, Visser P (2005). Programmed cell death in relation to petal senescence in ornamental plants. *Acta Botanica Sinica*, 47: 641-650
- Zimmermann P, Zentgraf U (2005). The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 10: 515-534