

ESTEQUIOMETRIA I METABOLÒMICA D'ALOPECURUS PRATENSIS I HOLCUS LANATUS EN CONDICIONS DE SEQUERA

Anna Bosquet Muncunill*; Josep Peñuelas Reixach**; Jordi Sardans Galobart**

**Autora del projecte de fi de carrera; Quart de la llicenciatura de Ciències Ambientals a la UAB*

***Directors del projecte; Unitat d'Ecologia Global CREAM-CEAB-CSIC*

Universitat Autònoma de Barcelona

RESUM

La variabilitat de l'estequiometria elemental dels organismes a causa de l'ontogènia i dels canvis en les condicions ambientals està relacionada amb la variabilitat metabòlica. Això és degut a que els elements operen majoritàriament com a parts de compostos moleculars. Així doncs, la hipòtesi realitzada per Rivas-Ubach *et al.*, (2012), la qual postula que els estudis estequiomètrics i metabòlics d'un conjunt d'espècies vegetals exposades a condicions ambientals diferents han de mostrar la flexibilitat que posseeix un organisme a l'hora de modular la seva estequiometria i el seu metaboloma per tal de mantenir la forma òptima sota condicions variants, esdevé la base que sustenta l'experiment EVENT II. A partir de l'estudi de les relacions estequiomètriques, -principalment C:N:P- i del metabolisme d'*Alopecurus pratensis* i *Holcus lanatus* en situacions simulades de sequera, s'han obtingut resultats que evidencien una clara diferenciació a nivell d'espècie, de part de la planta i de tractament. El metabolisme i l'estequiometria diferencial que presenten ambdues gramínies dona suport a la hipòtesi del nínxol biogeoquímic. A nivell de parts de la planta, s'observa un clar augment de la relació C:nutrients a la part aèria, mentre que a les arrels, aquesta relació disminueix. La part aèria doncs, necessita més C per invertir en funcions estructurals, mentre que l'elevada concentració de nutrients i metabòlits a les arrels donen indicis de la presència de mecanismes osmòtics per a facilitar l'entrada d'aigua, i de creixement, per a la recerca de noves fonts d'aigua, observant-se una disminució de la relació part aèria:arrels. Un altre factor que demostra aquest creixement radicular són les baixes relacions N:P trobades, fet que dona suport a la hipòtesi de la velocitat de creixement.

Paraules clau: estequiometria, metabòlica, C:N:P, sequera, EVENT II, *Alopecurus pratensis*, *Holcus lanatus*, hipòtesi nínxol biogeoquímic, hipòtesi de la velocitat de creixement.

RESUMEN

La variabilidad de la estequiometria elemental de los organismos debida a la ontogenia y a los cambios en las condiciones ambientales está relacionada con la variabilidad metabólica. Esto se debe a que los elementos operan mayoritariamente como partes de compuestos moleculares. De esta forma, la hipótesis realizada por Rivas-Ubach *et al.*, (2012), la cual postula que los estudios estequiométricos y

metabolómicos de un conjunto de especies vegetales expuestas a condiciones ambientales diferentes han de mostrar la flexibilidad que posee un organismo a la hora de modular su estequiometría i su metaboloma para poder mantener la forma óptima en condiciones variantes, es la base que sustenta el experimento EVENT II. A través del estudio de las relaciones estequiométricas, -principalmente C:N:P- y del metabolismo de *Alopecurus pratensis* y *Holcus lanatus* en situaciones simuladas de sequía, se han obtenido resultados que evidencian una clara diferenciación a nivel de especie, de parte de la planta y de tratamiento. El metabolismo y la estequiometría diferencial que presentan ambas gramíneas da soporte a la hipótesis del nicho biogeoquímico. A nivel de partes de la planta, se observa un claro aumento de la relación C:nutrientes a la parte aérea, mientras que en las raíces, esta relación disminuye. La parte aérea, pues, necesita más C para invertir en funciones estructurales, mientras que la elevada concentración de nutrientes i metabolitos en las raíces da indicios de la presencia de mecanismos osmóticos para facilitar la entrada de agua en la planta, y de crecimiento, para la búsqueda de nuevas fuentes de agua, observándose una disminución de la relación parte aérea: raíz. Otro factor que demuestra este crecimiento radicular son las bajas relaciones N:P encontradas, hecho que da soporte a la hipótesis de la velocidad de crecimiento.

Palabras clave: estequiometría, metabolómica, C:N:P, sequía, EVENT II, *Alopecurus pratensis*, *Holcus lanatus*, hipótesis nicho biogeoquímico, hipótesis de la velocidad de crecimiento.

ABSTRACT

The elemental stoichiometry variability of organisms caused for ontogeny and the changes in environmental conditions is linked with metabonomics variability. This is due that elements operate as a piece of molecular components. Thus, the hypothesis realized by Rivas-Ubach *et al.*, (2012), which posits that the stoichiometrics and metabonomics studies of a set of vegetal species exposed to different environmental conditions show the flexibility that organism has when have to modulate his stoichiometry and his metabonomic for to maintain the optimal form in variables conditions, is the base of EVENT II experiment. Through to study of stoichiometrics relations – mainly C:N:P- and metabolism of *Alopecurus pratensis* and *Holcus lanatus* in drought simulated situations, the results obtained show a clear differentiation at specie level, part of plant level and treatment level. The differential metabolism and stoichiometry that present both grasses supports the biogeochemical niche hypothesis. At level of part of plant, there is a clear increase of C: nutrients relation in aerial part, whereas in the roots, this relation decreases. The aerial part, thereby, needs more C to invest in structural functions, whereas the high concentration of nutrients and metabolites in the roots is due to presence of osmotic mechanisms for improve water uptake, and growth for the research of new sources of water, showing a decrease of the relation aerial part: roots. Another factor that demonstrates this root growth are the low N:P relations observed. This result allows apply the growth rate hypothesis.

Keywords: stoichiometry, metabonomics, C:N:P, drought, EVENT II, *Alopecurus pratensis*, *Holcus lanatus*, biogeochemical niche hypothesis, growth rate hypothesis.

1. INTRODUCCIÓ

Estequiometria

L'estequiometria ecològica fa referència al balanç entre els diversos elements que constitueixen els organismes i els processos i interaccions ecològiques, (Sternner i Elser, 2002; Elser i Hamilton, 2007).

Els organismes estan constituïts principalment per C, N i P. D'aquesta manera, canvis en la limitació d'aquests nutrients a l'ambient, condueixen a canvis en la composició de les espècies vegetals, així com en la seva diversitat (Koeselman i Meuleman, 1996; Verhoeven et al., 1996a; Roem i Berendse, 2000). És per això que relació C:N:P de la biomassa és important en molts processos ecològics, com són la descomposició de la fullaraca (d'Annunzio et al., 2008; Güsewell i Gessner, 2009), la capacitat de fixació de N₂ (Sañudo-Wilhelmy et al., 2001), les relacions entre planta-herbívor-depredador (Ngai i Jefferies, 2004; Tibbets i Molles, 2005; Kagata i Ohgushi, 2006), la composició i diversitat de les espècies dels ecosistemes (Roem i Berendse, 2000; Olde Venterink et al., 2003; Güsewell et al., 2005) i la capacitat d'adaptació als estressos ambientals (Woods et al., 2003; Sardans i Peñuelas, 2007; Sardans et al., 2008).

Una de les referències més conegudes en l'estudi de les relacions C:N:P és la que va realitzar Alfred C. Redfield, amb el descobriment de la "relació de Redfield".

Aquesta postula que la relació C:N:P esdevé constant en àrees interiors i profundes dels oceans i pren valors de 106:16:1, en base molar. Tot i que la majoria d'estudis suporten la relació de Redfield i estan d'acord que la causa d'aquesta estequiometria constant de C:N:P és resultat de límits biogeoquímics, encara hi ha moltes qüestions que no queden clares.

En els ecosistemes terrestres, les dinàmiques de la relació C:N:P són força diferents de les trobades als ecosistemes aquàtics. El tret distintiu que diferencia contundentment ambdós ecosistemes és l'aigua. Aquesta dissemblança implica respostes i adaptacions fisiològiques molt diferents entre plantes que afecten, molt probablement, l'assignació dels elements en la relació de C:N:P (Sternner i Elser, 2002). A més, els ecosistemes terrestres estan subjectes a una àmplia variabilitat en el clima i el sòl de la roca mare, la qual influeix fortament l'estequiometria elemental dels ecosistemes i dels organismes. És per això que els organismes terrestres posseeixen una alta capacitat d'adaptació estequiomètrica davant d'estressos ambientals (Woods et al., 2003; Sardans i Peñuelas, 2007; Sardans et al., 2008) inclosos aquells estressos propiciats pels humans (veure Elser et al., 2000; Sardans et al., 2012b; Hessen et al., 2004; Elser et al., 2010; Rivas-Ubach et al., 2012).

La hipòtesi de la velocitat de creixement (GRH)

A través de l'estudi de l'estequiometria ecològica i els diversos vincles entre certs elements, Elser i Sternner van desenvolupar la "hipòtesi de la velocitat de creixement" (GRH) (Elser et al., 2000; Sternner i Elser, 2002). El que postula aquesta hipòtesi és que relacions baixes de N:P estan relacionades amb creixements ràpids dels organismes. Això és degut a que aquestes baixes relacions afavoreixen l'existència d'elevades concentracions d'ARN ribosòmic i de transferència, ambdós indispensables per mantenir unes taxes de creixement ràpid.

Aquesta hipòtesi és contrastada per un gran nombre de resultats experimentals efectuats en comunitats planctòniques, on se n'ha comprovat la correlació negativa entre el creixement i la relació N:P (Elser i George, 1993; Elser i Urabe, 1999; Elser et al., 2000; Hessen et al., 2007), en estudis fets amb tàxons d'invertebrats aquàtics (Sutcliffe, 1970), com certs microorganismes (Maaløe i Kjeldgaard, 1966), *Daphnia magna* (McKee i Knowles, 1987), zooplàncton (Main et al., 1997), *Mixodiatomus laciniatus* (Carrillo et al., 2001) i *Daphnia pulex* (Elser et al., 2000a).

Tanmateix, a l'investigar l'aplicabilitat d'aquesta teoria a ecosistemes terrestres, els resultats són més diversos i sovint contradictoris (veure Sardans et al., *biogeochemistry* i les referències de dins).

La major complexitat estructural i funcional de les plantes terrestres respecte al fitoplàncton fan que la totalitat de N i P no sigui assignada exclusivament a funcions relacionades amb el creixement, sinó que altres funcions com la defensa, l'emmagatzematge, els mecanismes anti-estrès, la captura d'aigua o el transport intern poden ser grans embornals de N i P.

La hipòtesi del nínxol biogeoquímic

La teoria clàssica prediu que les espècies que competeixen per un sol recurs limitant no poden coexistir de manera estable a no ser que hi hagi un criteri addicional conegut, com pot ser l'ocupació de diferents nínxols ecològics o la competició per la llum que els hi ho permeti.

El nínxol biogeoquímic proposa, doncs, que les plantes que competeixen en una mateixa comunitat, tendeixen a utilitzar nutrients en quantitats i proporcions diferents, la qual cosa fa disminuir la competició pels recursos entre elles (Peñuelas et al., 2008). Aquesta alta flexibilitat estequiomètrica (Sistla i Schimal, 2012; Sardans et al., 2012a) per modificar el seu nínxol biogeoquímic davant de situacions competitives és deguda a l'alta capacitat d'assignació i translocació de nutrients cap als diferents òrgans del seu organisme (Sistla i Schimal, 2012).

Metabolòmica

L'assignació de N i P, així com també d'altres nutrients que realitzen funcions que no estan estrictament relacionades amb el creixement (funcions de reserva, defensa i mecanismes d'evitació d'estrès) pot ser estudiada a través de la realització d'estudis estequiòmètrics juntament amb estudis de metabolòmica. És d'especial rellevància, però, considerar les respostes fenotípiques dels organismes en aquestes altres funcions bàsiques, complementàries al creixement, quan s'avaluï l'estequiometria de C:N:P amb el metaboloma de l'organisme i el seu estil de vida i amb l'estructura i funció dels ecosistemes (Sardans *et al.*, 2011; Peñuelas *et al.*, 2009).

Els metabòlits són els productes finals de processos cel·lulars. Així doncs, davant de canvis de caire genètic o ambiental, els seus nivells determinen la resposta del sistema biològic. Les plantes destinen una quantitat significativa del carboni assimilat i de l'energia a la síntesi d'una àmplia varietat de metabòlits que no sembla que tinguin una funció tan directa en els processos de desenvolupament fisiològic com els metabòlits primaris (Taiz i Zeiger, 1991). Són els metabòlits secundaris, sintetitzats a partir del metabolisme primari. El conjunt de metabòlits, tant primaris com secundaris, sintetitzats per un sistema biològic en constitueix el seu "metaboloma" (Fienh, 2002). Per tant, el metaboloma és definit com el conjunt, a nivell tant qualitatiu com quantitatiu, de tots els metabòlits presents en un organisme i que juguen un paper rellevant en les reaccions metabòliques generals, les quals són requerides pel manteniment, creixement i funcionament adequat d'una cèl·lula (Dunn *et al.*, 2005). Aquest conjunt de molècules conformen l'expressió final del genotip de l'organisme (Fienh, 2002) i es pot considerar com el fenotip químic de l'organisme (Peñuelas *et al.*, 2009).

La metabolòmica esdevé una eina relativament nova i molt poderosa de cara al futur destinada a millorar el nostre coneixement de les xarxes metabòliques, així com la composició bioquímica de les plantes i d'altres organismes biològics.

Fruit de la metabolòmica, apareix l'ecometabolòmica, l'objectiu de la qual és discernir la resposta global d'un organisme davant de canvis de caire exclusivament ambiental (Sardans *et al.*, 2011). L'ecometabolòmica pren un paper rellevant a l'hora de supervisar la variabilitat fenotípica d'un genotip concret en resposta a un bon grapat de canvis ambientals, com són la sequera (Fumagalli *et al.* 2009), la disponibilitat de nutrients (Hirai *et al.*, 2005), la presència de contaminants (Jones *et al.* 2007; Bundy *et al.*, 2008), la salinitat (Fumagalli *et al.*, 2009), la temperatura (Michaud i Delinger, 2007) i les interaccions biòtiques (Choi *et al.*, 2006), entre altres factors ecològics. Això ens permet avaluar els estatus fisiològics i les funcions dels organismes: de creixement, de defensa, de reserva i de reproducció i també mecanismes

d'evitació d'estrès i salut (Shulaev *et al.*, 2008; Sardans *et al.*, 2011; Weckwerth, 2003; Graham *et al.*, 2009).

D'aquesta manera, la metabolòmica ens permetrà relacionar les respostes dels organismes a nivell metabòlic – assignació de recursos pel creixement, funcions de reserva, de defensa- amb variables estequiòmètriques com són les relacions C:N:P, la GRH, la mida de l'individu, entre d'altres.

Objectius

Aquest projecte s'ha realitzat en el marc de l'experiment EVENT II que realitza la Universitat de Bayreuth (Alemanya).

La contribució d'aquest en l'experiment EVENT II ha estat l'anàlisi de l'estequiometria i metabolòmica de diverses plantes amb la finalitat de:

- (i) Conèixer les respostes a nivell metabòlic i estequiomètric de plantes herbàcies sotmeses a condicions extremes (sequera i escalfament).
- (ii) Investigar si els possibles canvis en el metaboloma van associats a canvis en la composició elemental.
- (iii) Observar si els trets particulars de cada espècie n'influencien el seu metabolisme i estequiometria.
- (iv) Estudiar aquestes respostes en el marc de l'estequiometria i la metabolòmica tant a nivell aeri com subterrani per tal de tenir un coneixement global de la resposta integral de la planta.

2. ÀMBIT D'ESTUDI

La zona d'estudi de l'EVENT II està ubicada al Jardí Botànic Ecològic de la Universitat de Bayreuth, situat al centre-est d'Alemanya. La situació geogràfica pren les següents coordenades: 49°55'19"N, 11°34'55"E, a 365 metres sobre el nivell del mar.

En els experiments EVENT es simulen futures condicions climàtiques esperades a l'Europa Central incloent esdeveniments climàtics extrems al llarg d'un gradient que va des de plots estandarditzats i replicats a través de la manipulació de les comunitats vegetals artificials fortament controlades (amb número definit de mostres i amb substrat estandarditzat) fins la manipulació de comunitats de prats semi naturals establerts en sòls vells, limitats per N.

L'EVENT II, que és en el que es basa aquest projecte, té com a objectiu central testar les respostes de les comunitats vegetals davant de tres fenòmens fixats: la sequera, l'escalfament i la biodiversitat entre comunitats.

Disseny experimental de l'estudi

Per tal de testar els efectes de la sequera, l'escalfament i la biodiversitat sobre l'estequiometria i la metabolòmica de l'*Alopecurus pratensis* i l'*Holcus lanatus*, s'apliquen els següents tres tractaments, cada un, en una parcel·la de cada rèplica. Per tant, de les 5 parcel·les que conté cada rèplica, hi ha dues parcel·les que aquest projecte no considera.

Sequera durant els mesos de primavera (D1)

- **Control Ambient (CA)** (sense cap mena de manipulació)
- **Precipitació constant setmanal (CM)**. Es tracta d'afegir la quantitat que falti d'aigua per a que la precipitació mitjana sigui igual a la precipitació mitjana de la mateixa setmana a llarg termini.

Com hem comentat, l'EVENT II consta de 5 parcel·les, cada una de les quals està formada per 6 plots (d'1,5 m² d'àrea).

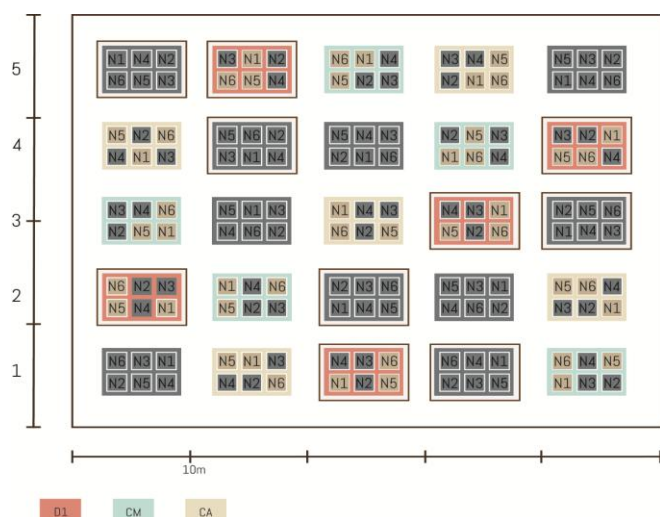


Figura 1: esquema gràfic del disseny experimental de l'EVENT II.

Manipulacions

- Tractament de sequera

Per tal de simular les condicions de sequera extrema sobre les mostres, cada parcel·la del tractament de sequera va ser regada el 18 de maig de 2012 amb 28, 3L. Posteriorment, aquestes mostres no van tenir cap mena de subministrament d'aigua durant 42 dies. La primera setmana de juliol es va dur a terme la seva recol·lecció.

- Composició de la comunitat

Dins de cada tractament (D1, CA i CM), cada plot té una comunitat vegetal determinada. Les dues espècies dominants, *Alopecurus pratensis* i *Holcus lanatus*, són presents en tots els plots de totes les parcel·les.

4. MATERIALS I MÈTODES

La part metodològica d'aquest projecte s'inicia amb la recollida de les mostres al seu lloc d'origen. La posterior adequació de cada una d'elles per a ser sotmeses tant a la metodologia d'estequiometria com a la de metabolòmica esdevé imprescindible.

La metodologia d'estequiometria té com a finalitat la determinació quantitativa d'elements com el Mg, el Mn, el K, el Na, el P i el Fe per un banda, i el C i el N per l'altra. Mentre que la quantificació elemental del primer grup d'àtoms s'aconsegueix a través de l'ICP/EOS, la concentració del C i el N es realitza a través d'anàlisis elementals amb CG.

La metodologia aplicada per a l'anàlisi metabolòmic de les mostres, no només té com a objectiu quantificar els diferents metabòlits presents a la mostra sinó, que la finalitat principal és identificar la totalitat de metabòlits continguts a la mostra. L'espectroscòpia de RMN és la tècnica emprada per a les determinacions pertinents. El protocol d'adequació de les mostres que s'ha dut a terme és l'elaborat per Rivas-Ubach. 1.S'afegeix 150 mg de "pols" de cada mostra en un tub de centrífuga de 50 mL. 2.Seguidament s'afegeix 6mL d'una mescla d'aigua i metanol (1/1). 3.Es procedeix a barrejar amb el vòrtex durant 15 segons per tal d'homogeneïtzar-la. 4.A continuació, es sonica la mostra durant 5 minuts. 5.Un cop sonicada, la mostra es centrifuga a 15000 rpm durant 15 minuts. 6.Transcorreguts els 15 minuts, es recull 4mL de la fracció aquosa dels tubs de centrífuga. Arribat a aquest punt, es repeteixen de nou els passos de 2 a 6 als mateixos tubs dues vegades més. 7.Un cop acabades les repeticions, és necessari afegir 25 mL d'aigua destil·lada per tal de reduir el percentatge de metanol fins a un 20%. D'aquesta manera, serà factible el procés de liofilització. 8.Es procedeix a la congelació les mostres a -80°C (un mínim de 3 hores) abans de realitzar-se el procés de liofilització. 9.És necessari liofilitzar les mostres amb el tap del tub de centrífuga lleugerament aflluixat durant 3-5 dies. 10.Un cop la mostra ha estat liofilitzada totalment i, per tant, deshidratada, cal afegir 5mL d'aigua destil·lada al tub de centrífuga.11.Seguidament, es barreja amb el vòrtex durant 15 segons.12.Es centrifuga un altre cop a 15000 rpm durant 5 minuts. 13.Els 4mL destinats a RMN es congelen a -80°C un mínim de 3 hores.14.Un cop transcorregut aquest temps, es du a terme a liofilització amb el tap del tub de la centrífuga lleugerament aflluixat durant uns 3-5 dies.15.A continuació, s'hi afegeix 1mL de la solució tamponada (Na₂PO₄·D₂O en D₂O +0,01%TMS), per tal que la mostra assoleixi un pH final de 6 i es deixa reposar 6 minuts. 16.Es transfereix el contingut en eppendorf's i es congela (un mínim de 3 hores). 17.Per tal que les mostres siguin vàlides per a la RMN, se centrifuguen a 15000 rpm durant 15 minuts. 18.Finalment, es transfereix 0,6 mL del sobrenedant en tubs especials per RMN degudament etiquetats.

Un cop obtinguts els resultats corresponents a cada una de les metodologies, es procedeix a fer una anàlisi univariant de les dades, la qual consisteix en determinar els efectes dels factors experimentals (en el nostre cas les dues espècies, les parts de la planta i els diferents tractaments aplicats) sobre les variables analitzades una a una a través d'un anàlisi de variància (ANOVA); i una anàlisi multivariant per tal de determinar la contribució de diverses variables alhora en funció d'una variable independent. Aquesta anàlisi es realitza a través d'un Anàlisi de Components Principals (PCA).

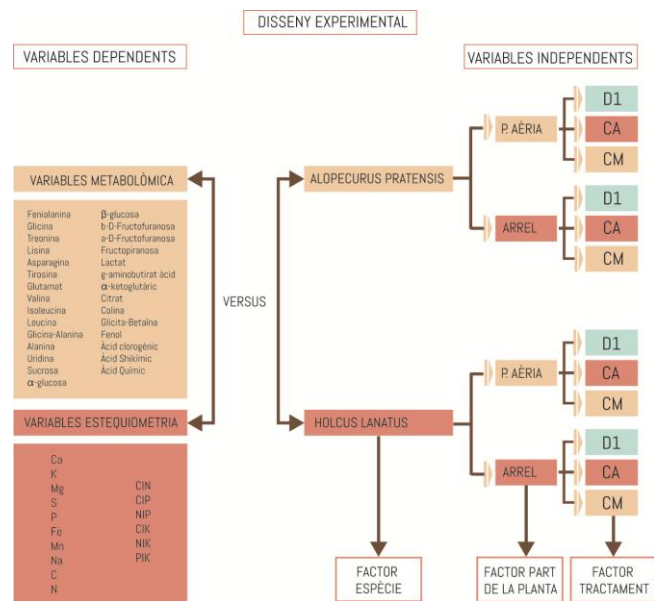


Figura 2: Relacions establertes entre les variables.

5. RESULTATS

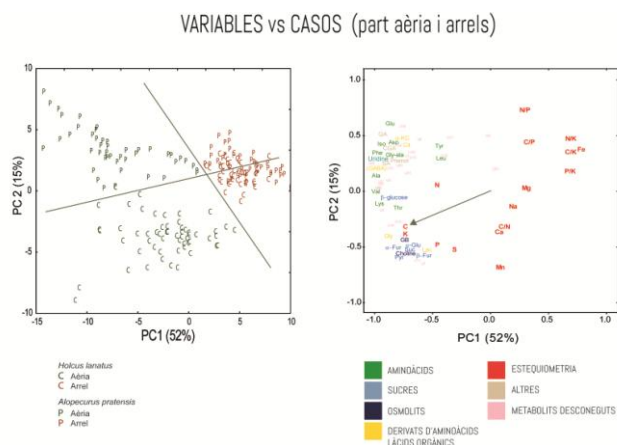


Figura 3: variables vs casos. Tots els tractaments. Part aèria i arrels.

En la representació dels dos primers eixos del PCA, en analitzar els casos respecte les variables observem que la part aèria d'ambdues espècies té una composició química tant a nivell de metabolisme com de composició elemental completament

diferent que les arrels. La concentració de tots els metabòlits elucidats és significativament més alta que la de les arrels, mentre que les relacions C:nutrients són significativament més baixes. Si considerem les variables en funció dels casos, podem veure, carregant sobre l'eix 1, que el metabolisme que duen a terme ambdues espècies es desenvolupa a la part aèria de cadascuna.

Aplicant un zoom a la figura anterior amb la finalitat d'analitzar la part aèria de la part subterrània, obtenim la següent figura:

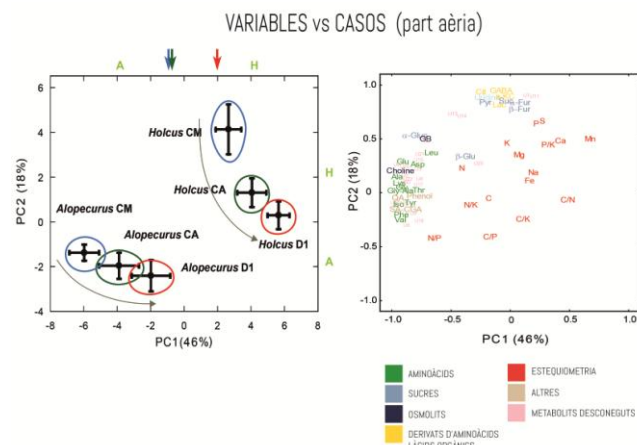


Figura 4: variables vs casos. Efectes dels tres tractaments. Part aèria.

Quan realitzem un PCA només amb les dades de les concentracions dels metabòlits, dels diferents elements i de les relacions estequiomètriques a nivell de part aèria, observem com els individus d'ambdues espècies que han crescut sota condicions de sequera presenten una concentració més elevada de tots els metabòlits, així com una relació C:nutrient també més alta.

El segon eix del PCA separa clarament la composició del metabolisme i les concentracions d'elements i relacions estequiomètriques entre les dues espècies, amb un grup de metabòlits on hi ha la tirosina, serina, aspiragina, fenols, leucina, entre d'altres, que es troben en major concentració en *A. pratensis* que en *H. lanatus*, i un segon grup de metabòlits com l'uridina, la fructosapiranososa, la β -D-fructofuranosa i l' α -D-fructofuranosa, entre d'altres, que presenten una concentració més elevada en *H. lanatus* que no pas en *A. pratensis*. Per tant, combinant els casos amb les variables estequiomètriques i metabòliques, observem, en primer lloc, que hi ha una clara relació entre els tractaments i aquestes variables, és a dir, que els tractaments promouen canvis a nivell atòmic i molecular; i en segon lloc, que tot i la distribució diferenciada entre les dues espècies, hi ha una tendència general en quant a que els tractaments de manipulació de la disponibilitat hídrica afecten de manera similar a ambdues espècies. Això és degut a que aquestes van canviant la seva composició elemental i molecular en la mateixa direcció. Altrament, *H. lanatus* presenta una

concentració més elevada de sucres (carregant molt fort sobre l'eix 2) que no pas *A.pratensis* i, que en el cas dels aminoàcids, osmòlits, fenols, àcid clorogènic, àcid shikímic i àcid quínic és l'*A.pratensis* qui en posseeix les concentracions més elevades.

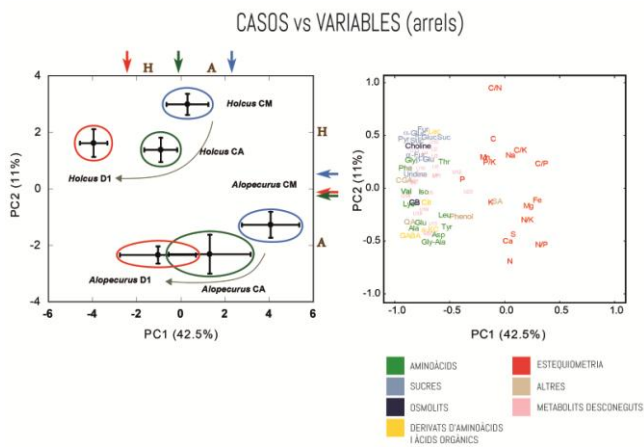


Figura 5: variables vs casos. Efectes dels tres tractaments. Arrels.

Quan efectuem els anàlisis multivariants només en les arrels observem com se segueix manifestant una clara separació entre les espècies i els tractaments (en ambdós eixos), amb una direccionalitat representada per les fletxes de color gris. Les conseqüències del tractament de sequera en les arrels té uns efectes diametralment oposats als que té a la part aèria .

Explicat per un 11% de la variabilitat total, l'eix 2 continua separant les dues espècies. Podem observar, doncs, que en les plantes sotmeses a estrès hídric, els derivats d'aminoàcids es troben en concentracions més elevades en *A. pratensis* que no pas en *H.lanatus*. En canvi, *H.lanatus* té les concentracions de sucres més elevades que *A.pratensis*. Aquestes diferències dels sucres i aminoàcids entre les espècies, són molt semblants a les que es donen a la part aèria en condicions de reg setmanal.

A nivell estequiomètric, s'observa una alta concentració de P en condicions de dèficit hídric i una baixa relació N:P. Per tant, en condicions de menor disponibilitat hídrica una concentració més elevada de tots els metabòlits a les arrels a través de la part aèria suggereix un augment de la activitat i del creixement de les arrels. Tot això coincideix amb un increment de les concentracions de P i una disminució de les concentracions de N i, per tant, la consegüent disminució de la relació N:P en les arrels, sent tot plegat consistent amb la GRH.

6. CONCLUSIONS

Les conclusions que hem arribat a través de la realització d'aquest projecte han estat les següents:

1. Tot i que les dues espècies estudiades siguin molt properes taxonòmicament, tenen una estructura del metaboloma i una composició elemental diferent. Per tant, malgrat els canvis que provoca la sequera, les dues espècies sempre presenten - tant en la part aèria com en les arrels- diferent composició metabòlica i estequiomètrica, donant suport a la hipòtesi del nínxol biogeoquímic.
2. Hi ha una clara diferenciació entre part aèria i arrels tant a nivell metabòlic com estequiomètric en ambdues espècies de gramínies.
3. El tractament de sequera origina impactes diametralment oposats a la part aèria que a les arrels en les dues espècies. Mentre que en condicions d'estrès hídric, a la part aèria hi ha una disminució de l'activitat metabòlica (metabòlits en concentració més baixa) i un clar augment de la relació C:nutrients, a les arrels succeeix justament el contrari: hi ha un augment del metabolisme i una disminució de la relació C:nutrients. Per tant, es pot observar, a nivell molecular, el que altres estudis han observat a nivell macroscòpic a través de la disminució de la relació part aèria: arrels.
4. La baixa relació N:P a les arrels conjuntament amb concentracions baixes de N i altes de P i l'alta concentració de metabòlits en les arrels sotmeses a menor disponibilitat hídrica dona suport a la GRH.
5. Les dades permeten assolir una visió conjunta de la resposta de la planta a la sequera a nivell global. En situacions de sequera s'assignen més recursos cap a les arrels disminuint la concentració de metabòlits i augmentant les relacions C:nutrients a la part aèria. La pèrdua de la capacitat de retenció hídrica que es podria donar a la part aèria com a conseqüència de la menor concentració de metabòlits pot ser compensada per un augment d'esclerofil·lia com suggereix l'augment de la relació C:nutrients. Tanmateix la transferència de recursos a les arrels de manera que presenten un concentració de metabòlits més gran en condicions de dèficit hídric suggereix una estratègia per augmentar l'absorció d'aigua donat que això pot fàcilment estar relacionat amb un major creixement de les arrels i, a l'hora, la major concentració de metabòlits augmenta la capacitat del potencial osmòtic de les arrels, proporcionant, d'aquesta manera, una major facilitat per absorbir aigua del sòl.

7. REFERÈNCIES

Libres:

STERNER, R. W. and ELSER J.J. (2002) *Ecological Stoichiometry: The Biology of Elements from Molecules to the Biosphere*. Princeton University Press

Articles:

- AERTS, R. (1999). "Interspecific competition in natural plant communities: mechanisms, trade-offs and plant-soil feedbacks". *Journal of Experimental Botany* **50**, p. 29–37.
- ÅGREN, G. I. (2004). "The C:N:P stoichiometry of autotrophs - theory and observations". *Ecology Letters* **7**, p. 185–191.
- ANDERSEN, T. et al. (2004). "Stoichiometry and population dynamics". *Ecology Letters* **7**, p. 884–900.
- BEIER, C. et al. (2012). "Precipitation manipulation experiments - challenges and recommendations for the future". *Ecology Letters* **15**, p. 899–911.
- BILLBERGER, M. F. K. (2006) Plant Growth – Stoichiometry and Competition Theory Development in Ecosystem Ecology. (2006). BOWNE, J. B. et al. (2012). "Drought responses of leaf tissues from wheat cultivars of differing drought tolerance at the metabolite level". *Molecular plant* **5**, p. 418–29.
- CARDINALE, B. J. et al. (2000). "Linking species diversity to the functioning of ecosystems: on the importance of environmental context". *Oikos* **91**, 175–183.
- DELAUNEY, A. J. and VERMA, D. P. S. (1993). "Proline biosynthesis and osmoregulation in plants". *The Plant Journal* **4**, p. 215–223.
- ESTIARTE, M. & PEÑUELAS, J. (1999). "Excess carbon: the relationship with phenotypical plasticity in storage and defense functions of plants". *Orsis organismes i sistemes revista de botànica zoologia i ecologia* **14**, p. 159–203.
- FIEHN, O. (2002). "Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes". *Plant Molecular Biology* **48**, p. 155–171.
- FRECKLETON, R. P. & WATKINSON, R. (2001). "Asymmetric competition between plant species". *Functional Ecology* **15**, p. 615–623.
- GESSNER, M. O. et al. (2001). "Species diversity, functional diversity, and ecosystem functioning".
- GONG, X. Y. et al. (2010). "Nitrogen, phosphorus and potassium nutritional status of semiarid steppe grassland in Inner Mongolia". *Plant and Soil* **340**, p. 265–278.
- GÜSEWELL, S. (2004). "N: P ratios in terrestrial plants: variation and functional significance". *New Phytologist* **164**, p. 243–266.
- HAGHIGHI, Z. et al. (2012). "Enhancement of compatible solute and secondary metabolites production in *Plantago ovata* Forsk. by salinity stress". *Journal of Medicinal Plants Research* **6**, p. 3495–3500.
- HE, J.-S. et al. (2008). "Leaf nitrogen:phosphorus stoichiometry across Chinese grassland biomes". *Oecologia* **155**, p. 301–310.
- HOPPER, D.U and VITOUSEK, D. (1997). "The effects of plant composition and diversity on ecosystem processes". *Science* **277**, p. 1302-1305 .
- HOU, X. & JONES, B. T. (2000). "Inductively Coupled Plasma / Optical Emission Spectrometry". *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. p. 9468–9485.
- KRÁLOVÁ, K. et al. (2012). Metabolomics - Useful Tool for Study of Plant Responses to Abiotic Stresses". *Ecological Chemistry and Engineering S* **19**, p. 133–161.
- LEHOUEOU, H. (1996) "Climate change, drought and desertification". *Journal of Arid Environments* **34**, p. 133–185.
- MCGRADY-STEED, J. et al. (1997). "Biodiversity regulates ecosystem predictability". *Nature* **390**, p.162-165
- METLEN, K. L. et al. (2009). Plant behavioural ecology: dynamic plasticity in secondary metabolites". *Plant, cell & environment* **32**, p. 641–53.
- MIRZAEI, H. et al. (2008). A single drought event of 100-year recurrence enhances subsequent carbon uptake and changes carbon allocation in experimental grassland communities". *Journal Of Plant Nutrition And Soil Science* **171**, p. 681–689.
- MOE, S. J. et al. (2005). "Recent advances in ecological stoichiometry: insights for population and community ecology". *Oikos*, **109**, p. 29–39.
- MOLINA-MONTENEGRO, M. et al. (2011). "Higher plasticity in ecophysiological traits enhances the performance and invasion success of *Taraxacum officinale* (dandelion) in alpine environments". *Biological Invasions* **14**, p. 21–33.
- NIINEMETS, Ü. et al. (1999). "Responses of foliar photosynthetic electron transport, pigment stoichiometry, and stomatal conductance to interacting environmental factors in a mixed species forest canopy". *Tree Physiology* **19**, p. 839–852.
- NIINEMETS, U. & KULL, O. (1998). "Stoichiometry of foliar carbon constituents varies along light gradients in temperate woody canopies: implications for foliage morphological plasticity". *Tree Physiology* **18**, p. 467–479.
- NIKLAS, K. J. (2006). "Plant allometry, leaf nitrogen and phosphorus stoichiometry, and interspecific trends in annual growth rates". *Annals of Botany* **97**, p. 155–163.
- PARMESAN, C. & YOHE, G. A. (2003). "Globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems". *Nature* **421**, p. 37–42.
- PEÑUELAS, J. & SARDANS, J. "Elementary factors". *Nature* **46**, p. 803-804.

- PEÑUELAS, *et al.* (2008). "Nutrient stoichiometric relations and biogeochemical niche in coexisting plant species: effect of simulated climate change". *Polish Journal of Ecology*. 613-622.
- PEÑUELAS, J. *et al.* (1997). "Trends in plant carbon concentration and plant demand for N throughout this century". *Oecologia* **109**, p. 69–73.
- RASTETTER, E. B. *et al.* (1991). "A general biogeochemical model describing the responses of the C and N cycles in terrestrial ecosystems to changes in CO₂, climate, and N deposition". *Tree physiology* **9**, p. 101–126.
- REDDY, A. R. *et al.* (2004). "Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants". *Journal of Plant Physiology* **161**, p. 1189–1202.
- RIVAS-UBACH, A. *et al.* (2012). "Strong relationship between elemental stoichiometry and metabolome in plants". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, p. 4181–4186.
- RODRÍGUEZ-PÉREZ, L. (2006). "Implicaciones fisiológicas de la osmorregulación en plantas Physiological implications of osmoregulation in plants". *Agron. Colomb* **24**, p. 28–37.
- RONTEIN, D. *et al.* (2002). "Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants". *Metabolic engineering* **4**, p. 49–56.
- ROSCHER, C. *et al.* (2008). "Complementary nitrogen use among potentially dominant species in a biodiversity experiment varies between two years". *Journal of Ecology* **96**, p. 477–488.
- RUSSELL, B. L. *et al.* (1998). "Osmotic stress induces expression of choline monoxygenase in sugar beet and amaranth". *Plant physiology* **116**, p. 859–65.
- S. S. SUNG, S.S. *et al.* (1989). "Sucrose metabolic pathways in sweetgum and pecan seedlings". *Tree physiology*. Vol. 5, nº 1, **52**, p. 39–52.
- SARDANS, J. & PEÑUELAS, J. (2007). "Drought changes phosphorus and potassium accumulation patterns in an evergreen Mediterranean forest". *Functional Ecology* **21**, p. 191–201.
- SARDANS, J. & PEÑUELAS, J. (2012). "The role of plants in the effects of global change on nutrient availability and stoichiometry in the plant-soil system". *Plant physiology* **160**, p. 1741–61.
- SARDANS, J. *et al.* (2011). "Ecological metabolomics: overview of current developments and future challenges". *Chemoecology* **21**, p. 191–225.
- SARDANS, J. *et al.* (2008). "Warming and drought alter C and N concentration, allocation and accumulation in a Mediterranean shrubland". *Global Change Biology* **14**, p. 2304–2316.
- SCHMIDT, I. K. *et al.* (2004). "Soil solution chemistry and element fluxes in three European heathlands and their responses to warming and drought". *Ecosystems* **7**, p. 638–649.
- SEETA A. *et al.* (2012). "Stoichiometric flexibility as a regulator of carbon and nutrient cycling in terrestrial ecosystems under change". *The New phytologist* **196**, p. 68–78.
- SHIRASAWA, K. *et al.* (2006). "Accumulation of glycinebetaine in rice plants that overexpress choline monoxygenase from spinach and evaluation of their tolerance to abiotic stress". *Annals of botany* **98**, p. 565–71.
- SHULAEV, V. *et al.* (2008). "Metabolomics for plant stress response". *Physiologia plantarum* **132**, p. 199–208.
- SHVALEVA, L. *Et al.* (2006). "Metabolic responses to water deficit in two Eucalyptus globulus clones with contrasting drought sensitivity". *Tree Physiology* **26**, p. 239–248.
- SILVERTOWN, J. (2004). "Plant coexistence and the niche". *Trends in Ecology & Evolution* **19**, p. 605–611.
- SISTLA, S. & SCHIMMEL, J. P. (2012). "Stoichiometric flexibility as a regulator of carbon and nutrient cycling in terrestrial ecosystems under change". *The New phytologist* **196**, p. 68–78.
- STERNER, R.W. *et al.* (1998). "Carbon:phosphorus stoichiometry and food chain production". *Ecology Letters* **1**, p. 146–150.
- SWEETLOVE, L. J. & FERNIE, A. R. (2005). "Regulation of metabolic networks: understanding metabolic complexity in the systems biology era". *New Phytologist* **168**, p. 9–24.
- TENHUNEN, J. (1999) "Responses of foliar photosynthetic electron transport, pigment stoichiometry, and stomatal conductance to interacting environmental factors in a mixed species forest canopy". *Tree Physiology* **19**, p. 839–852.
- TIAN, H. *et al.* (2009). "Pattern and variation of C:N:P ratios in China's soils: a synthesis of observational data". *Biogeochemistry*, **98**, p. 139–151.
- TILMAN, D. *et al.* (1997). "The influence of functional diversity and composition on ecosystem processes". *Science*, **277**, p. 1300–1302.
- URANO, K. *et al.* (2009). "Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in Arabidopsis by metabolomics". *The Plant journal: for cell and molecular biology* **57**, p. 1065–78.
- VENEKLAAS, E. J. *et al.* (2012). "Opportunities for improving phosphorus-use efficiency in crop plants". *New Phytologist* **195**, p. 306–320.
- VISSER, M. E. (2008). "Keeping up with a warming world; assessing the rate of adaptation to climate change". *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **275**, p. 649–59.

- WALKER, B. *et al.* (1999). "Plant attribute diversity , resilience , and ecosystem function: the nature and significance of dominant and minor species". *Ecosystems* **2**, p. 95–113.
- WALTER, J. *et al.* (2011). "Do plants remember drought? Hints towards a drought-memory in grasses". *Environmental and Experimental Botany* **71**, p. 34–40.
- WALTER, J. *et al.* (2011). "How do extreme drought and plant community composition affect host plant metabolites and herbivore performance?". *Arthropod Plant Interactions* **6**, p. 15–25.
- WALTHER, G.R. *et al.* (2002). "Ecological responses to recent climate change". *Nature* **416**, p. 389–395.
- WARREN, C. R. (2011). "How does P affect photosynthesis and metabolite profiles of *Eucalyptus globulus*?". *Tree Physiology* **31**, p. 727–739.
- WEINER, J. (1990). "Asymmetric competition in plant populations". *Trends in ecology & evolution* **5**, p. 360–4.
- WENT, F. W. (1973). "Competition among plants". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **70**, p. 585–90.
- WILLIG, M. R. (2011). "Ecology. Biodiversity and productivity". *Science (New York, N. Y.)*, **333**, p. 1709–10.