



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

"CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL METABOLÓMICO EN BANANOS MUSA AAA cv. 'WILLIAMS' QUE PRESENTAN VARIACIÓN SOMACLONAL"

**Trabajo de titulación previo a la obtención del Título de Doctor en Biociencias
Aplicadas, Mención en Biotecnología**

Presentado por:

FREDY PATRICIO CARRERA GARCÉS

Guayaquil - Ecuador

(2021)

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral no hubiese sido posible, sin la ayuda de varias personas e instituciones a quienes presento mi agradecimiento.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, por su apoyo brindado en el transcurso del programa doctoral.

A la Escuela Superior Politécnica del Litoral en especial al CIBE, por su ayuda para la realización del trabajo experimental.

A los Doctores Juan Manuel Cevallos y Carlos Noceda, un agradecimiento especial y profundo por su acertada dirección en el desarrollo de la tesis, por su calidad humana que nos permitió trabajar en armonía y en equipo, para conseguir la publicación de los artículos. Ahora no sólo los admiro, sen han convertido en un ejemplo a seguir de calidad académica.

Al Gnrd. Roque Moreira Cedeño, por el apoyo incondicional para realizar el doctorado.

A la Dra. Daynet Sosa exdirectora del CIBE, por consentir la realización del trabajo experimental en el CIBE.

A la Dra. Ana Tirape, porque fue la persona que me acercó al proyecto del Dr. Carlos Noceda y Dr. Juan Manuel Cevallos.

A los Sr(s) Profesores del Programa Doctoral, por su entrega y aporte en mi formación académica.

A Gabriela Maridueña, que dedicó tiempo, para capacitarme en la metodología del presente estudio y siempre recibí los materiales y reactivos a tiempo para las labores cotidianas del proyecto.

A María José Molina y Adela Quevedo, por la comprensión y ayuda entregada al momento de cederme el cromatógrafo a pesar que ellas también lo requerían.

A José García por su compromiso y colaboración con el proyecto al entregar las vitroplantas a tiempo para efectuar el presente estudio.

A Iván Choez por su disponibilidad de tiempo, en la programación del cromatógrafo para ejecutar las corridas de las muestras.

Al Dr. Juan Álava, por su ayuda en los trámites exigidos por la coordinación del programa doctoral.

Al Dr. Omar Ruiz por, su contribución oportuna en la parte estadística y por su amistad.

A las Doctoras: Karina Proaño y Patricia Manzano; Doctores: Eduardo Chica, Luis Galarza y Efrén Santos, miembros del tribunal de evaluación de avance de tesis, por sus aportes valiosos para mejorar cada sustentación.

Al Proyecto REDU 2018-PREDU-2016-002 (Ecuador), titulado "Indicadores metabólicos de variación somaclonal en banano (*Musa AAA*) y expresión de genes implicados", por el respaldo económico. Gracias a este patrocinio financiero pude desarrollar la investigación de mi Tesis Doctoral.

DEDICATORIA

A mi hija Doménica, a Mirian Olalla,
a mis padres y hermanos en especial a Raúl
que son fuente inagotable de inspiración

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Julia Nieto PhD.
DECANO O DELEGADO

Patricia Manzano PhD.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL ESPOL

Luis Galarza PhD.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL ESPOL

Efrén Santos PhD.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL ESPOL

Karina Proaño PhD.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL EXTERNO

Eduardo Chica PhD.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL EXTERNO

Juan Manuel Cevallos PhD.
DIRECTOR DE PROYECTO DE TITULACIÓN

Carlos Noceda PhD.
CO-DIRECTOR DE PROYECTO DE TITULACIÓN

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación me corresponde exclusivamente;
y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral

Fredy Patricio Carrera Garcés

GLOSARIO

Metabolómica	Rama fundamental de la biología de sistemas y herramienta poderosa que estudia los metabolitos presentes en un sistema biológico.
Metaboloma	Todos los metabolitos presentes en un sistema biológico.
Metabolitos	Pequeñas moléculas desarrolladas o modificadas durante el metabolismo celular de un organismo y/o de un sistema biológico.
Metabolitos primarios	Compuestos esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta.
Metabolitos secundarios	Compuestos que cumplen funciones específicas en las plantas.
Metabolómica dirigida	Consiste en análisis dirigido que se centra en la identificación y cuantificación de tantos metabolitos pertenecientes a un grupo químico como sean posibles.
Metabolómica no dirigida	Estrategia en el análisis de tantos metabolitos sea posible, con el fin de lograr patrones o huellas dactilares, con o sin identificación de los detectados.
Derivatización	Método utilizado en química analítica, en el que un compuesto químico se transforma en uno o más de sus grupos funcionales para generar un compuesto similar.
Tautomería	Dos isómeros que se diferencian solamente en la posición de un grupo funcional.
Tiempo de retención	Es el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición de la respuesta máxima.
Variación somaclonal	Cambios fenotípicos heredables generados en las plantas debido al manejo y crecimiento <i>in vitro</i> .

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I: FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

1.1.	Introducción	1
1.2.	Análisis de estudios metabolómicos	3
1.2.1	Diseño experimental	3
1.2.2	Replicación y aleatorización	5
1.2.3	Muestreo e inactivación de metabolitos	6
1.2.4	Extracción de metabolitos	8
1.2.5	Derivatización	9
1.2.6	Separación y detección	10
1.3	Tratamiento de datos	15
1.4	Análisis estadístico	19
1.5	Análisis de vías metabólicas	22
1.6	Evaluación metabólica del estrés abiótico en plantas	23
1.7	Escasez de agua y estrés por sequía	26
1.8	Estrés por temperatura	30
1.9	Estrés salino	32
1.10	Estrés oxidativo	37
1.11	Perspectivas futuras	38

CAPÍTULO II: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Caracterización del perfil metabolómico en bananos *Musa* AAA cv. 'Williams' que presentan variación somaclonal

2.1	Introducción	39
2.2	Objetivo general	41
2.3	Objetivo específico 1	41
2.4	Objetivo específico 2	41
2.5	Objetivo específico 3	41

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1	Material vegetal	42
2.2	Establecimiento de cultivo <i>in vitro</i> de plantas de banano	43
2.3	Análisis fenotípico	45
2.4	Perfil de metabolitos	45
2.5	Análisis de datos	46

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	Resultados	48
4.1.1	Herencia fenotípica	48
4.1.2	Perfil general de metabolitos	48
4.1.3	Metabolitos individuales	49
4.2	Discusión	55
4.2.1	Análisis de fenotipos	55
4.2.2	Perfil general de metabolitos	56
4.2.3	Ácidos carboxílicos acumulados diferencialmente	57
4.2.4	Monosacáridos acumulados diferencialmente y componentes de la pared celular de la planta	58
4.2.5	Metabolitos aminados acumulados diferencialmente	60

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1	Conclusiones	62
5.2	Recomendaciones	63
	Bibliografía	64
	Publicaciones	83
	Anexos	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No 1	ventajas y desventajas de las técnicas utilizadas en estudios de metabolómica	13
Tabla No 2	contribuciones a la metabolómica para comprender estrés abiótico en plantas	16
Tabla No 3	metabolitos acumulados diferencialmente en plantas enanas en comparación con plantas normales ($p < 0.05$)	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No 1	síntesis de análisis metabólico	25
Figura No 2	esquema de micropropagación de plantas	44
Figura No 3	gráfico de puntuación de PCA (A) y carga (B) fase proliferación	50
Figura No 4	gráfico de puntuación de PCA (A) y carga (B) fase enraizamiento	51
Figura No 5	gráfico de puntuación de PCA (A) y carga (B) fase adaptación II	52

ABREVIATURAS

GC-MS	cromatografía de gases-espectrometría de masas
LC-MS	cromatografía líquida- espectrometría de masas
CE-MS	electroforesis capilar-espectrometría de masas
NMR	resonancia magnética nuclear
LC-PDA-MS	cromatografía líquida-espectrometría de masas de matriz de fotodiodos
GC-TOF-MS	cromatografía de gases-espectrometría de masas-tiempo de vuelo
UHPLC-MS	cromatografía líquida de ultra alta resolución-espectrometría de masas
LC-Q-MS	cromatografía líquida-espectrometría de masas-cuadrupolo
LC-QQQ-MS	cromatografía líquida-triple cuadrupolo-espectrometría de masas
LC-Q-TOF-MS	cromatografía líquida-espectrometría de masas-cuadrupolo-tiempo de vuelo
MALDI-TOF-MS	espectroscopia de masas de desorción láser asistida por matriz de ionización de tiempo de vuelo
HPTLC	cromatografía en capa fina de alto rendimiento
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
UHPLC	cromatografía líquida de ultra eficacia
HPAEC	cromatógrafo de intercambio aniónico de alto rendimiento
MSTFA	N-metil-trimetilsililtrifluoroacetamida
BSTFA	N, O-bis-trimetilsililtrifluoroacetamida
MeOH	Metanol
EtOH	Etanol
ESI	ionización por electropulverización
APCI	ionización química a presión atmosférica
BE	electroforesis bidimensional
PCA	análisis de componentes principales
PLS	mínimos cuadrados parciales
TDF o FDR	tasa de descubrimiento falso
KEGG	Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto
ABA	ácido absícico
GABA	ácido γ -aminobutírico

RESUMEN

Las técnicas de micropropagación permiten la producción masiva de plantas de banano, pero pueden causar variaciones somaclonales como el enanismo. Sin embargo, no se han descrito cambios en el perfil de metabolitos durante la micropropagación de plantas de bananos normales (PN) y enanas (PE). En este estudio se evaluó el perfil de metabolitos de vitroplantas de ambos tipos (PN y PE) del banano *Musa* AAA cv. Williams en las fases de proliferación (FP) y enraizamiento (FE, así como de la fase II de aclimatación en invernadero (FAII). El diseño experimental contempló la extracción de metabolitos de 10 meristemos de PE y otros 10 de PN en cada una de las fases de micropropagación mencionadas, y los metabolitos se identificaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Para definir si existían agrupamientos de cada tipo de planta sobre la base del perfil metabolómico de sus meristemos, se aplicó un análisis de componentes principales (PCA), que mostró una clara agrupación de las PE separadas de las PN en FE y FAII. Para determinar los metabolitos acumulados de forma diferencial en meristemos de ambos tipos de plantas se realizaron pruebas de significación U de Mann-Whitney. Varios metabolitos resultaron acumulados diferencialmente. Así, se encontró que, en PEs, subacumulaban varios precursores de los componentes moleculares del apoplasto, incluyendo arabinosa y galactosa o deoxigalactosa en FP y FE, o manosa y fucosa en FAII. Los resultados obtenidos sugieren que la composición del apoplasto se ve afectada durante la micropropagación en PEs.

ABSTRACT

Micropropagation techniques allow mass production of banana plants, but can cause somaclonal variations such as dwarfism. However, no changes in metabolite profile have been described during micropropagation of normal (NP) and dwarf (DP) banana plants. In this study, the metabolite profile of vitroplants of both types (NP and DP) of *Musa* AAA cv. 'Williams' banana was evaluated during the proliferation (PP) and rooting (EP) phases, as well as during phase II of greenhouse acclimatization (APII). The experimental design contemplated the extraction of metabolites from 10 DP and 10 NP meristems in each of the aforementioned micropropagation phases, and the metabolites were identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). To define whether there were groupings of each plant type based on the metabolomic profile of their meristems, a principal component analysis (PCA) was applied, which showed a clear grouping of DPs separated from NPs in EP and APII. To determine the differentially accumulated metabolites in meristems of both plant types, Mann-Whitney U significance tests were performed. Several metabolites were found to be differentially accumulated. Thus, it was found that, in DPs, they underaccumulated several precursors of apoplast molecular components, including arabinose and galactose or deoxygalactose in PP and EP, or mannose and fucose in APII. The results obtained suggest that apoplast composition is affected during micropropagation in DPs.

CAPITULO I FUNDAMENTO TEÓRICO

Este capítulo I es producto de un artículo titulado: La metabolómica, una herramienta poderosa para comprender el estrés abiótico de las plantas, publicado en la revista *Agronomy* el 22 de abril del presente año.

1.1 INTRODUCCIÓN

La agricultura a nivel mundial está amenazada por el cambio climático y las variaciones en las precipitaciones, las olas de calor y los niveles de CO₂ son responsables de varios tipos de estrés abiótico que tienen un impacto negativo en la producción de alimentos (Raza *et al.*, 2020). Se han reportado pérdidas de producción de hasta el 50% debido al estrés abiótico en varias plantas (Atkinson and Urwin, 2012) y el estudio de cultivos capaces de resistir el estrés abiótico se considera una prioridad (Newton, Johnson and Gregory, 2011; Abdelrahman *et al.*, 2015). La caracterización de los efectos y respuestas bioquímicas causadas por el estrés abiótico en diferentes cultivos permite comprender los mecanismos de resistencia de las plantas al estrés y favorecer el desarrollo de estrategias adecuadas de mitigación del estrés, incluido el desarrollo de cultivos resistentes al estrés abiótico (Abdelrahman *et al.*, 2015; Costa and Farrant, 2019). Entre varias alternativas, la metabolómica se considera una herramienta clave para evaluar los cambios bioquímicos que ocurren en las plantas afectadas por el estrés abiótico (Obata *et al.*, 2015).

La metabolómica es una rama fundamental de la biología de sistemas (Rosato *et al.*, 2018) y una poderosa herramienta para investigar la respuesta de los organismos a factores externos a nivel de metabolitos (Jorge *et al.*, 2016; Jorge, Mata and António, 2016; Alseekh *et al.*, 2018; Jorge and António, 2018). La metabolómica es esencial para comprender las señales químicas a medida que las plantas crecen y se desarrollan (Sharma *et al.*, 2018). Sin embargo, la importancia total de la metabolómica para evaluar las respuestas de las plantas al estrés es difícil de estimar porque, a diferencia del transcriptoma y el proteoma, el metaboloma no está necesariamente asociado con el genoma de la planta (Alseekh *et al.*, 2018).

Los metabolitos, analizados por metabolómica, se definen como pequeñas moléculas desarrolladas o modificadas durante el metabolismo celular (Jorge *et al.*, 2016). La identificación y cuantificación ordenada de metabolitos puede proporcionar la huella química de un fenotipo (Cambiaghi, Ferrario and Masseroli, 2016) y la respuesta bioquímica de un organismo a condiciones específicas (Chaudhary *et al.*, 2019).

Las plantas procesan una amplia variedad de metabolitos primarios y secundarios con diversas estructuras químicas. Los metabolitos primarios son esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas, pero los metabolitos secundarios tienen propósitos más específicos y ambos tipos de metabolitos son parte de los mecanismos de respuesta al estrés de las plantas (Hong *et al.*, 2016). Los metabolitos primarios, que incluyen aminoácidos, azúcares y lípidos, tienen estructuras muy conservadas, pero los metabolitos secundarios, como alcaloides, polifenoles y terpenoides, son más diversos y pueden variar mucho entre las especies de plantas (Hong *et al.*, 2016; Scossa *et al.*, 2016). Con las herramientas actuales de metabolómica, se pueden identificar alrededor de 14.000 metabolitos de plantas, aunque se esperan más de 200.000 moléculas en muestras de plantas (Alseekh *et al.*, 2018).

Los estudios metabolómicos a gran escala han hecho posible que los investigadores obtengan una gran cantidad de datos globales sobre metabolitos y vías metabólicas relevantes de una manera sin precedentes (Kumar *et al.*, 2017). La metabolómica se ha convertido en una herramienta poderosa en muchas áreas de investigación, como la epidemiología molecular, la toxicología, el descubrimiento y la identificación de biomarcadores (Hong *et al.*, 2016; Patil *et al.*, 2016; Scossa *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2017; Chaudhary *et al.*, 2019) y la investigación de plantas (Kumar *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2018). Actualmente, la metabolómica se ha adentrado en estudios más amplios como la metabolómica funcional, que se encarga de investigar las funciones de metabolitos específicos (Yan and Xu, 2018). La metabolómica también ha sido responsable de mejorar el rendimiento y la calidad de los cultivos (Kumar *et al.*, 2017; Sweetlove, Nielsen and Fernie, 2017; Alseekh *et al.*, 2018); y la fusión de la metabolómica con otras tecnologías relacionadas con la modificación genética, la transcriptómica, la proteómica y la genética cuantitativa han impulsado el fitomejoramiento (Kumar *et al.*, 2017). Además, la metabolómica ha incursionado en la observación de las respuestas morfológicas, fenotípicas y

fisiológicas de las plantas a las perturbaciones ambientales y las interacciones con otros organismos (Peters *et al.*, 2018).

1.2 ANÁLISIS DE ESTUDIOS METABOLÓDICOS

Los análisis metabolómicos se clasifican comúnmente como dirigidos o no dirigidos. La metabolómica dirigida consiste en análisis que se centran en la identificación y cuantificación de tantos metabolitos como sea posible dentro de un grupo químico específico, mientras que la metabolómica no dirigida tiene como objetivo detectar tantos grupos de metabolitos como sea posible para lograr patrones o huellas dactilares, con o sin identificación de los metabolitos detectados.

El estudio de metabolitos requiere el uso de varios procesos que incorporan aspectos de química, bioquímica, bioinformática y estadística (Cambiaghi, Ferrario and Masseroli, 2017). Dependiendo del objetivo de la investigación, los estudios metabolómicos tanto dirigidos como no dirigidos implican varios pasos que incluyen el diseño experimental y la preparación de muestras, así como la extracción, derivatización, separación y detección de metabolitos seguidos del análisis de datos (Rodrigues *et al.*, 2021).

1.2.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental (DoE) es una parte esencial en los estudios metabolómicos. El objetivo del DoE es obtener datos fiables que nos lleven a conclusiones adecuadas y, al mismo tiempo, minimizar los errores (Jacyna, Kordalewska and Markuszewski, 2019). El objetivo del DoE es permitir que los investigadores comprendan el impacto de los factores independientes en las variables estudiadas (Jacyna, Kordalewska and Markuszewski, 2019).

Se pueden encontrar varias fuentes de variación en la metabolómica y estudios relacionados durante la recolección, almacenamiento y preparación de muestras, análisis y tratamiento previo de los datos (Dudzik *et al.*, 2018). Por lo tanto, la esencia de la planificación de la investigación basada en la metabolómica es tener en cuenta todas las posibles fuentes de variación que podrían alterar la evaluación de una hipótesis biológica, como la etapa de desarrollo de la planta,

los tratamientos, la etapa de preparación de la muestra (por ejemplo, el protocolo de recolección, transporte y extracción), plataforma analítica (por ejemplo, LC-MS, GC-MS, resonancia magnética nuclear) y análisis estadístico (Ivanisevic and Want, 2019).

La aplicación del diseño de experimentos (DoE) puede tener en cuenta el efecto combinado de varios factores externos y se ha sugerido como una estrategia para el diseño de nuevos protocolos para estudios metabolómicos (Jacyna, Kordalewska and Markuszewski, 2019). Por tanto, se han utilizado estrategias de DoE para evaluar el efecto sobre el metaboloma de los factores externos implicados en la preparación de la muestra (trituration de la muestra y temperatura), así como la extracción de metabolitos (disolvente de extracción y temperatura) (Jacyna, Kordalewska and Markuszewski, 2019), separación y detección (fases móviles, temperatura y otras condiciones instrumentales) (Gullberg *et al.*, 2004). Como resultado, se pueden seleccionar las condiciones experimentales que maximizan el número y la concentración de metabolitos y minimizan los errores. El DoE más utilizado en el desarrollo de protocolos para metabolómica incluye el diseño Box-Behnken, el diseño compuesto central, el diseño D-óptimo, los diseños factoriales y el diseño Plackett-Birmania, entre otros. En la bibliografía se puede encontrar una revisión exhaustiva de los DoE aplicadas a la metabolómica (Jacyna, Kordalewska and Markuszewski, 2019). El DoE más conocido es el diseño factorial. Este diseño se ha utilizado para evaluar azúcares reductores, lípidos y ácidos clorogénicos en *Coffea arabica* (Delarozza *et al.*, 2017). Si el número de experimentos es muy alto, se puede utilizar un diseño factorial fraccionado. Asimismo, el diseño de Plackett-Burman puede ser más apropiado en ausencia de interacciones entre las variables independientes (Jacyna, Kordalewska and Markuszewski, 2019) y ha permitido mejorar el protocolo de extracción (tamaño de partícula del tejido triturado, tiempo de extracción y contenido de etanol en los disolventes) de metabolitos de *Ginkgo biloba* L.

La mayoría de los estudios metabolómicos que se centran en el estrés abiótico de las plantas han seguido un diseño unidireccional equilibrado, ya que en cada estudio solo se ha evaluado una variable de estrés (Yuan *et al.*, 2018; Tschaplinski *et al.*, 2019; Masouleh and Sassine, 2020; Paupière *et al.*, 2020). En los diseños unidireccionales, la variable de estrés se ha evaluado en dos (control frente a estrés) o varios niveles (control y varios niveles del factor de estrés). Por ejemplo, el efecto del estrés por sequía en el metaboloma del huésped generalmente se ha evaluado usando un diseño de control versus estrés (Gundaraniya *et al.*, 2020; R. Guo *et al.*,

2020; Kang *et al.*, 2019), mientras que se han usado varias concentraciones de sal para evaluar el efecto de la salinidad en el metaboloma de la planta (Borrelli *et al.*, 2018a; Benjamin *et al.*, 2019). En ambos casos, los estudios se han equilibrado ya que se ha evaluado el mismo número de individuos en cada nivel de estrés. Se debe tener especial cuidado para asegurar que todos los individuos se mantengan exactamente en las mismas condiciones ambientales durante el estudio.

1.2.2 REPLICACIÓN Y ALEATORIZACIÓN

La elección del número correcto de réplicas técnicas y biológicas es importante para realizar una prueba estadística potente y ejecutar una interpretación biológica adecuada de los resultados (Rodrigues *et al.*, 2021). Las réplicas técnicas logran evaluar las variaciones instrumentales o de protocolo, mientras que las réplicas biológicas proporcionan información sobre la variación natural de los individuos analizados y son cruciales para inferir diferencias significativas entre tratamientos (Martins *et al.*, 2018). Las réplicas biológicas deben ser específicas para la población de estudio y las condiciones de investigación (Rodrigues *et al.*, 2021). El número mínimo sugerido de réplicas para el análisis metabolómico es seis, pero el poder estadístico debe estimarse antes de realizar una investigación metabolómica con el fin de establecer un tamaño de muestra adecuado (Jorge, Rodrigues, *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2021). En general, la investigación en condiciones controladas suele generar menor variabilidad y requiere un tamaño de muestra menor que los estudios de campo. Sin embargo, el análisis de potencia a menudo se excluye y el tamaño de la muestra suele estar restringido por el número de individuos disponibles o el espacio del invernadero. La estimación de la potencia estadística se puede realizar a través de pruebas preliminares utilizando un pequeño número de muestras o datos (Blaise, Correia, Tin, Young, A.-C. Vergnaud, *et al.*, 2016; Xia and Wishart, 2016). Los métodos para el análisis de potencia y la estimación del tamaño de la muestra se discuten en la siguiente literatura (Blaise, Correia, Tin, Young, A.-C. Vergnaud, *et al.*, 2016) y se han desarrollado varios paquetes como MetSizeR para la estimación del tamaño de la muestra (Nyamundanda *et al.*, 2013). Una estrategia común para reducir la variabilidad biológica y evitar efectos atípicos es la combinación de muestras en un pool (Martins *et al.*, 2018). Por lo general,

se pueden combinar tres o más muestras antes del análisis, evitando las interferencias resultantes de plantas individuales mientras se enfoca en el efecto general causado por el tratamiento o las variables independientes (Hendriks *et al.*, 2011).

La aleatorización es crucial para disminuir el error experimental y la versatilidad biológica, así como para preservar la homogeneidad de la muestra (Martins *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2021). Si se trabaja bajo circunstancias ambientales supervisadas, como en una cámara de crecimiento, las plantas deben rotarse durante el transcurso de la investigación para equilibrar cualquier alteración en la magnitud de la luz o ventilación que pueda modificar su metabolismo y la progresión de los datos (Martins *et al.*, 2018). Para las plantas cultivadas en un invernadero o en un campo, la aleatorización debe tener en cuenta la diversidad ambiental, como las diferencias en el paisaje, la fertilidad del suelo o el drenaje (Martins *et al.*, 2018). Por tanto, es necesario registrar todos los cambios percibidos en el área de estudio e incorporarlos como metadatos para el análisis (Fiehn, Wohlgemuth and Scholz, 2005). Cuando no es posible una aleatorización completa, una estrategia común es organizar las plantas en forma de bloques homogéneos y evaluar las variables independientes dentro de cada bloque (Rodrigues *et al.*, 2021).

1.2.3 MUESTREO E INACTIVACIÓN DE METABOLITOS

Los pasos de muestreo, como la recolección y la congelación rápida, son un paso previo crítico para obtener datos metabolómicos (Rodrigues *et al.*, 2021). Dependiendo de la magnitud del experimento, es importante capacitar a un gran equipo de operadores para disminuir el tiempo de cosecha. La formación debe tener en cuenta el número y ubicación de las muestras, así cómo y cuándo realizar la recolección, teniendo en cuenta que tanto los metabolitos primarios como los secundarios pueden cambiar obedeciendo a ciclos naturales (Bénard *et al.*, 2015). Después de la cosecha, la inhibición del metabolismo de la planta es de suma importancia, particularmente para la evaluación de metabolitos con altas tasas de regeneración, como los intermedios glucolíticos y los fosfatos de azúcar (Kim and Verpoorte, 2010; Allwood *et al.*, 2011). La reducción de la temperatura y el contenido de agua son las estrategias más comunes para detener las reacciones metabólicas. La reducción de temperatura se puede lograr mediante la congelación instantánea de las muestras bajo nitrógeno líquido inmediatamente después de la

cosecha. Alternativamente, se puede usar hielo seco durante el transporte antes de usar nitrógeno líquido. Luego, las muestras pueden almacenarse congeladas a -80°C hasta su análisis (Jorge *et al.*, 2016). Otra estrategia para detener el metabolismo es la reducción de la humedad por liofilización (Glaser *et al.*, 2013). La liofilización, elimina la mayor parte del agua necesaria para el desarrollo de reacciones bioquímicas mientras mantiene la muestra a temperaturas bajo cero. Además, el secado de la muestra reduce la variabilidad causada por las diferencias en el contenido de agua de las plantas (T'Kindt *et al.*, 2009) y podría ser un paso obligatorio antes de evaluar los cambios en el metaboloma de las plantas en condiciones que afectan al agua, como diversos tipos de estrés abiótico (T'Kindt *et al.*, 2009). Se han implementado otras estrategias de secado, como el uso de gel de sílice, para el transporte de muestras donde el nitrógeno líquido y el hielo seco no son accesibles (Duvane *et al.*, 2017). Sin embargo, no se recomienda el secado de muestras en experimentos en los que se espera poca o ninguna variabilidad del contenido de agua, ya que se pueden perder metabolitos volátiles y la eficiencia de extracción puede reducirse debido a la adsorción de metabolitos a las paredes celulares durante la muerte de la célula o planta (T'Kindt *et al.*, 2009).

En general, la mayoría de los estudios metabolómicos en plantas han llevado a cabo la inactivación de los metabolitos mediante nitrógeno líquido para el transporte de muestras a corto plazo y la congelación a -80°C para un almacenamiento prolongado. Las muestras para un perfil dirigido a flavonoides a través de espectrometría de masas de matriz de fotodiodos de cromatografía líquida (LC-PDA-MS) en *Arabidopsis thaliana* se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido después de la recolección y luego se mantuvieron a -80°C , hasta su uso (Nakabayashi *et al.*, 2014). De manera similar, las muestras de hojas de *Brachystegia boehmii* (Miombo) y *Colophospermum mopane* (Mopane) se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su liofilización, luego se analizaron usando GC-TOF-MS (Duvane *et al.*, 2017). En bananos, los perfiles metabólicos de plantas enanas y plantas infectadas con el virus del mosaico del pepino se compararon mediante GC-MS, utilizando hojas recogidas en nitrógeno líquido y analizadas inmediatamente después de su llegada (Cevallos-Cevallos *et al.*, 2018). De manera similar, las muestras de arroz se congelaron con nitrógeno líquido antes del perfil metabólico mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de

ionización de tiempo de vuelo de ionización por impacto electrónico para evaluar los mecanismos de reparación de las plantas después de la sequía y el estrés por calor.

1.2.4 EXTRACCIÓN DE METABOLITOS

La extracción de metabolitos tiene como objetivo maximizar el número y la abundancia de compuestos en una muestra (Cevallos-Cevallos *et al.*, 2009). La extracción debe lograrse sin alterar la estructura química de las moléculas manteniendo los niveles de metabolitos (De Koning and Dam, 1992). Dado que el número de metabolitos en las plantas es muy grande y abarca una diversidad de compuestos, no existe un protocolo único capaz de extraer el metaboloma de muestras vegetales y deben evaluarse varios disolventes y combinaciones. Los metabolitos hidrófilos se extraen con disolventes polares como el metanol o una combinación de metanol y agua, mientras que los disolventes no polares como el cloroformo se utilizan para extraer los metabolitos lipófilos (Fiehn, 2002; Dunn and Ellis, 2005). La combinación de cloroformo, metanol y agua es la opción más utilizada ya que esta combinación de disolventes permite separar metabolitos hidrófilos y lipófilos en una única extracción (Gullberg *et al.*, 2004; Pongsuwan *et al.*, 2008; Maridueña-Zavala *et al.*, 2017). Es valioso realizar estudios previos sobre las características de los disolventes utilizados en la extracción de metabolitos. Las particularidades a tener en cuenta son la relación disolvente/muestra, la duración y la temperatura de extracción (Verpoorte *et al.*, 2008; Kim and Verpoorte, 2010).

La extracción del metabolito de las hojas de vid se llevó a cabo utilizando una solución de metanol, cloroformo y agua en una proporción de 2,5: 1: 1 antes del perfil metabólico mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas (Berini *et al.*, 2018). Se utilizó isopropanol como disolvente de extracción para especies de árboles leñosos en un estudio de perfil de metabolitos no dirigido en LC-MS y cromatografía líquida de alta resolución (Sedio *et al.*, 2017). De manera similar, se utilizó metanol al 90% para estudiar otros árboles mediante cromatografía líquida / espectrometría de masas en tándem y cromatografía líquida de ultra rendimiento (Sedio *et al.*, 2017).

1.2.5 DERIVATIZACIÓN

La derivatización es un método en el que un compuesto químico se transforma en uno o más de sus grupos funcionales por reacción con un reactivo derivado para producir un producto químicamente relacionado (Obata and Fernie, 2012). En la metabolómica de las plantas, la derivatización se suele utilizar antes de la separación de los metabolitos mediante cromatografía de gases (GC) (Cevallos-Cevallos *et al.*, 2009). En este caso, el propósito de la derivatización es disminuir la polaridad, mejorar el equilibrio térmico y la volatilidad, debilitar la adsorción de analitos en el sistema GC y enriquecer la respuesta del detector, obteniendo así una mejor definición de los picos y una mayor eficiencia de detección en comparación con los metabolitos no derivatizados (Jorge *et al.*, 2016). Una de las desventajas de este proceso es la formación de artefactos asociados con el agente de derivatización utilizado (Kopka, 2006; Shinbo *et al.*, 2006).

La derivatización es una operación de dos pasos: (1) cambio del grupo carbonilo (aldehído o cetona) en una oxima o metoxiamina con el propósito de restringir la tautomería de monosacáridos (Gullberg *et al.*, 2004); (2) sililación, para aumentar la volatilidad, consistente en la reacción de grupos funcionales con hidrógenos activos (como H, COOH, NH y SH) con productos $C_3H_{10}Si$ (trimetilsilano), obteniendo así grupos trimetilsililo (TMS) mínimamente polares y más termoestables (Dettmer *et al.*, 2006). Los reactivos más utilizados para el proceso de sililación con muestras vegetales son, N-metil-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) y N, O-bis-trimetilsililtrifluoroacetamida (BSTFA).

MSTFA ha sido la opción más popular para la derivatización. Se utilizó MSTFA para evaluar los perfiles metabólicos de las hojas de maíz, sometidas a sequía, calor y estrés combinado, en GC-MS (Pires *et al.*, 2016). En otro cultivo, se determinó la influencia de las vías respiratorias que utilizan aminoácidos de cadena ramificada después de la escasez de agua en *Arabidopsis thaliana*. determinado utilizando MSTF antes del análisis con GC-MS (Ullah *et al.*, 2017). De manera similar, la derivatización de especies de *Triticeae* y *Citrus* se realizó a 37°C durante dos horas en clorhidrato de metoxiamina seguido de trimetilsililación con MSTFA (Cevallos-Cevallos *et al.*, 2010).

1.2.6 SEPARACIÓN Y DETECCIÓN

Después de la extracción del metabolito, se aplican técnicas como la cromatografía líquida (LC), la cromatografía de gases (GC) o la electroforesis capilar (CE) para separar cada metabolito presente en la matriz de la muestra (Shawky and Selim, 2017). Las técnicas basadas en cromatografía como LC y GC son las más utilizadas para la metabolómica de las plantas y pueden lograr una alta eficiencia de separación de metabolitos con diferentes grados de polaridad y volatilidad. Por otro lado, se ha recomendado la CE para separar los metabolitos según su relación masa/carga (m/z). Entre las técnicas de LC, la cromatografía en capa fina de alto rendimiento (HPTLC) se ha utilizado ampliamente debido a su simplicidad y bajo costo (Shawky and Selim, 2017). Técnicas similares son la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía líquida de ultra eficacia (UHPLC), ambas utilizadas para el análisis de analitos semipolares, polares e hidrófilos (Shawky and Selim, 2017).

Una vez separados los metabolitos, la detección, cuantificación e identificación son los pasos habituales de seguimiento. La resonancia magnética nuclear (NMR) (Liu *et al.*, 2017) y la espectrometría de masas (SM) son las técnicas de detección más utilizadas en metabolómica (Deborde *et al.*, 2017). En particular, los dispositivos de EM se pueden acoplar a equipos de separación LC, GC o CE en un solo sistema, lo que permite la separación y detección de metabolitos en una sola ejecución. Las ventajas y desventajas de las plataformas combinadas se resumen en la Tabla 1. Los fundamentos detallados y las aplicaciones de cada tecnología se describieron en revisiones anteriores (de Raad, Fischer and Northen, 2016; Segers *et al.*, 2019).

La combinación GC-MS ha sido la más utilizada para la metabolómica de las plantas (Jorge *et al.*, 2016; Jorge, Mata and António, 2016) y ha demostrado una separación de metabolitos muy eficiente, así como una alta resolución, sensibilidad y reproducibilidad (Wolfender *et al.*, 2015), parcialmente lograda gracias a la ionización electrónica (EI) de metabolitos en la sección de MS (Kopka, 2006; Jorge, Mata and António, 2016). Aunque la GC-MS se puede aplicar principalmente para el análisis de compuestos volátiles y termoestables, este tipo de metabolitos son muy abundantes en muestras de plantas y pueden proporcionar información relevante sobre el estado fisiológico de las plantas. Por lo tanto, GC-MS se ha utilizado para caracterizar la respuesta de varias especies de plantas a la sequía (Ullah *et al.*, 2017) y el estrés por calor

(Obata *et al.*, 2015), entre otras condiciones abióticas. De manera similar, la metabolómica vegetal basada en cromatografía de gases-espectrometría de masas de tiempo de vuelo (GC-TOF-MS) se ha utilizado en el análisis metabólico de especies forestales sometidas a estrés abiótico y biótico (Rodríguez-Calcerrada *et al.*, 2017), proporcionando una precisión y una resolución de masa impresionantes (Schiffmann *et al.*, 2014). La GC-MS también se ha utilizado para estimar los flujos de metabolitos en las plantas (Antonio *et al.*, 2013; Shih and Morgan, 2020).

La combinación LC-MS puede utilizarse para evaluar los compuestos no detectables por GC-MS, incluidos los metabolitos vegetales termolábiles, polares y de alto peso molecular sin necesidad de derivatización (Jorge, Mata and António, 2016; Fernie and Tohge, 2017). La separación de metabolitos se realiza gracias a una fase estacionaria incorporada a una columna; los tipos de columnas generalmente preferidos son la fase inversa, el carbono de grafito poroso (PGC), el intercambio aniónico (AEC) y la cromatografía de interacción hidrófila (HILIC). Estas columnas permiten la separación de metabolitos vegetales en función de su interacción con la matriz de la columna (Dettmer, Aronov and Hammock, 2007; Dudzik *et al.*, 2018). Las opciones PGC, AEC e HILIC están destinadas al análisis de metabolitos polares característicos del metaboloma de la planta (Jorge, Mata and António, 2016; Jorge and António, 2018). Después de la separación, los metabolitos se ionizan mediante diversas técnicas. La ionización por electropulverización (ESI) es la más aplicada (De Vos *et al.*, 2007; Hanhineva *et al.*, 2008) y se ha utilizado para una amplia gama de metabolitos como aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares y fosfolípidos (Moco *et al.*, 2006; Allwood *et al.*, 2011). Además, la ionización química a presión atmosférica (APCI) también se ha utilizado para metabolitos apolares como carotenoides y ésteres de carotenoides (Schweiggert *et al.*, 2005). A continuación, la EM detecta los metabolitos ionizados. Se llevó a cabo un estudio metabólico dirigido en *Epimedium pubescens* utilizando LC-MS para investigar la composición de los metabolitos de las hojas (Qin *et al.*, 2019). De manera similar, un estudio de perfil de metabolitos no dirigido utilizó LC-MS para evaluar muestras de plantas y raíces de seis gencianas (*G. gelida*, *G. septemfida*, *Gentiana asclepiadea*, *G. cruciata*, *G. paradoxa*, *G. pneumonanthe*) cultivadas en el Cáucaso (Olennikov *et al.*, 2019). El perfil metabólico de varios tipos de cannabis medicinal se evaluó mediante LC-MS para identificar fitocannabinoides (Berman *et al.*, 2018).

La CE es una plataforma no cromatográfica que ha permitido la detección de una mayor variedad de metabolitos, con tiempos de ejecución más cortos, menos volumen de muestra y un uso mínimo o nulo de disolventes en comparación con las estrategias de LC tradicionales (R. Ramautar, 2013; Zhang *et al.*, 2020). Además, CE es capaz de detectar metabolitos que normalmente se disipan en los pasos de derivatización requeridos por GC-MS (Jorge, Mata and António, 2016). Durante una ejecución de CE, la separación de metabolitos se logra mediante su relación m/z y la detección puede realizarse mediante MS. Las enfermedades de las plantas (Cevallos-Cevallos *et al.*, 2009) se han caracterizado por CE. La CE-MS se ha aplicado al estudio de los cambios en el metabolismo primario de las hojas de tabaco según su ubicación geográfica (Berman *et al.*, 2018). Esta tecnología también ha sido empleada para la detección de fosfatos de azúcar y poliaminas en hojas de tabaco (Li, *et al.*, 2016). Del mismo modo, los azúcares más abundantes en las hojas, frutos y raíces maduros y jóvenes de la vid se evaluaron mediante CE (Moreno *et al.*, 2017). Actualmente, la CE-MS es considerada como una técnica analítica sólida para el estudio de metabolitos (altamente) polares y cargados en diferentes muestras de plantas (Ramautar, *et al.*, 2019)

La NMR es una tecnología de huellas dactilares que no destruye a los metabolitos y que logra revelar diferentes clases de metabolitos independientemente de su tamaño, carga, volatilidad o estabilidad (Cevallos-Cevallos *et al.*, 2018). Además, la NMR proporciona información estructural para una identificación incuestionable de metabolitos (Bowne *et al.*, 2012b; Jorge, Mata and António, 2016). La preparación de muestras para NMR es rápida y sencilla, mientras que el instrumento muestra una alta reproducibilidad (Markley *et al.*, 2017; Emwas *et al.*, 2019). Sin embargo, debido a su sensibilidad limitada (Lei, Huhman and Sumner, 2011; Kumar *et al.*, 2017), la metabolómica vegetal apoyada por NMR sólo ha logrado la detección y cuantificación de metabolitos muy abundantes (Kim, Choi and Verpoorte, 2010; Markley *et al.*, 2017). No ha sido así con la utilización de NMR de protones; un estudio metabolómico de *Arabidopsis* y lino ha permitido el mejoramiento en la calidad de los datos, siempre y cuando se empleen métodos estandarizados y automatizados desde la preparación de la muestra (Deborde, *et al.*, 2019).

Tabla No 1: Ventajas y desventajas de las técnicas utilizadas en estudios de metabolómica

Técnica	Ventajas	Desventajas	Referencias
GC-MS	Separación eficaz de los metabolitos. Alta resolución. Detección y cuantificación de metabolitos, incluso en bajas concentraciones. Alta reproducibilidad.	Análisis de metabolitos volátiles y termoestables. Es necesario derivar las muestras.	(M. Chèze and J. M. Gaulier., 2014; Wolfender <i>et al.</i> , 2015)
GC-TOF-MS	Mayor precisión en la medición de la masa. Altos periodos de trabajo. Tiempo de funcionamiento rápido. Mejor beneficio de la muestra.	Costo elevado.	(Cajka, 2013)
LC-MS	Tecnología adicional notable para la GC-MS. Identifica metabolitos específicos. Distingue los metabolitos termolábiles y polares y los compuestos de alto peso molecular sin derivatización. Puede elegir la columna y el mecanismo de retención. Identifica aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares y fosfolípidos.	Cada grupo de estudio establece su propia biblioteca.	(Wu <i>et al.</i> , 2013; Zhu <i>et al.</i> , 2013)
HPLC-MS	Determina muestras complejas gracias a su velocidad, eficiencia, sensibilidad y selectividad. UHPLC de alta resolución mejorada, mayor eficiencia de los picos, separaciones rápidas y menor consumo de disolventes en comparación con la HPLC común.	Largo tiempo de análisis.	(Motilva, Serra and Macià, 2013)
LC-Q-MS	Realiza análisis cualitativos y cuantitativos Al realizar el análisis cualitativo, permite obtener información sobre la estructura de los metabolitos. Cuantifica los compuestos.	Restringido sólo a los iones presentes dentro de un rango exclusivo de unidades de masa nominal.	(Pang <i>et al.</i> , 2016; Zhang <i>et al.</i> , 2018a)
LC-QQQ-MS	Selecciona los iones para colisionar y analizar los fragmentos. Detecta el ion primario y el secundario. Detección de iones preciso, sensible y completo. Presenta una alta reproducibilidad cuantitativa en comparación con la espectrometría de masas en tándem	Aprueba el paso de una categoría específica de iones de masa	(Pang <i>et al.</i> , 2016)

LC-Q-TOF-MS	Resolución de masa y sensibilidad de detección superiores. Mide con precisión la masa. Mayor capacidad cualitativa para los iones de fragmentos.	Los iones de baja abundancia pueden ser difíciles de identificar. Dificultad para crear grandes bibliotecas de espectros de masas.	(Zhu <i>et al.</i> ,2013; Zhou <i>et al.</i> , 2016)
MALDI-TOF-MS	Técnica flexible para el análisis de muestras biológicas que contienen proteínas. Rápida y especialmente económica en cuanto al uso de reactivos y al tiempo necesario para el procesamiento de las muestras Se utiliza para el cultivo de plantas	Dificultad para crear grandes bibliotecas de espectros de masas. Cada grupo de estudio establece su propia biblioteca.	(Reeve, 2019)
CE-MS	No requiere el paso de derivatización como en GC-MS. Analiza los metabolitos importantes desde el punto de vista fisiológico. El análisis es muy rápido, eficiente, con bajo consumo de muestra y reactivos. Requiere una mínima preparación de la muestra.	El análisis cuantitativo por parte de la CE es crítico, depende de varios factores.	(Okazaki,Y.;Saito, K.,2011; Papetti & Colombo, 2019)
NMR	Fácil preparación de la muestra Cuantifica los metabolitos Alta reproducibilidad Técnica no destructiva Selecciona y detecta isótopos	Sensibilidad limitada. Detecta y cuantifica grandes metabolitos.	(Emwas <i>et al.</i> , 2019)

No existe una técnica ideal única que pueda abarcar todo el metaboloma de un sistema biológico. Sin embargo, teniendo en cuenta el objetivo de cada investigación, una combinación de técnicas proporcionaría datos significativos para comprender el comportamiento de un organismo y/o célula. Cocuron *et al.*, (2014) relacionó los usos de GC-MS, LC-MS y GC-QTOF-MS para evaluar las vías metabólicas asociadas a la síntesis de ácidos grasos en *Physaria fendleri*. La combinación de LC y GC ha sido la opción preferida, ya que ambas técnicas se complementan al caracterizar metabolitos no volátiles y volátiles, respectivamente. Se utilizaron LC-MS y GC-MS para estudiar el contenido de metabolitos y hormonas en plantas de arroz sometidas a estrés por sequía (Cao *et al.*, 2017). Además, se estudió el perfil cuantitativo de fitohormonas y otros metabolitos en raíces de cebada sometidas a estrés por salinidad mediante GC-MS y LC-MS (Fukushima *et al.*, 2017). Asimismo, se utilizó la combinación GC-TOF-MS y LC-q-TOF-MS para determinar el perfil metabólico de *Arabidopsis thaliana* afectado por la combinación de glutatión bajo estrés oxidativo leve y bajo contenido de fósforo (Fukushima *et al.*, 2017). La tabla 2 resume las tecnologías y herramientas comúnmente utilizadas para estudiar el estrés abiótico en plantas.

1.3 TRATAMIENTO DE DATOS

Los datos generados durante los estudios metabolómicos suelen integrar tiempos de retención o migración, relaciones m/z y valores de intensidad para cada pico detectado. El ruido de fondo también puede estar presente debido al arrastre de columnas o al ruido electrónico instrumental. De manera similar, los tiempos e intensidades de retención de un metabolito pueden variar de una ejecución a otra y deben corregirse antes del análisis estadístico. Por lo tanto, el análisis de datos metabolómicos implica una serie de pasos que incluyen conversión de datos, reducción de ruido, detección de características, alineación del tiempo de retención, normalización de intensidad, identificación de metabolitos y control de calidad (Sugimoto *et al.*, 2012; Tugizimana, *et al.*, 2013; Barnes, *et al.*, 2016; *et al.*, Cambiaghi, *et al.*, 2017).

Tabla No 2: Contribuciones de la metabolómica para comprender el estrés abiótico en las plantas.

Nombre de la especie	Tipo de estrés abiótico	Solución usada	Separación y detección	Tratamiento de datos	Herramientas	Base de datos	Referencia
<i>Musa</i> spp.	Sin estrés	MeOH-cloroformo-H ₂ O	GC-MS	PCA, PLS-DA	KEGG	NIST, Wiley	(Cevallos-Cevallos <i>et al.</i> , 2018)
<i>Eucalipto globulus</i>	Sequía y estrés por calor	MeOH -cloroformo - agua	GC-MS	ANOVA, PCA, sPLS	R v3.1.2	VSN., Reino Unido	(Correia <i>et al.</i> , 2018)
<i>Triticum</i> spp	Estrés por sequía	MeOH -cloroformo	GC-TOF-MS	PCA, OPLS-DA	KEGG	Librería (EI-MS)	(Guo <i>et al.</i> , 2018)
<i>Triticum turgidum</i> ssp. Durum	Tolerancia a la salinidad	-----	GC-MS, HPLC	ANOVA, PCA, t Student	JMP software; (versión 8.0, SAS)	NIST 2011	(Borrelli <i>et al.</i> , 2018)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tolerancia a la sequía	H ₂ O, acetona	GC-TOF-MS	Welch's prueba-t y FDR	R	GEO	(Kim <i>et al.</i> , 2017)
<i>Oriza sativa</i> cv. Nipponbare	Estrés por sequía	-----	GC-MS; LC-MS	PCA	-----	-----	(Todaka <i>et al.</i> , 2017)
Triticeae	Estrés por sequía	MeOH- H ₂ O	GC-MS	PCA, PLS-DA; HCA	R	NIST, Wiley	(Ullah <i>et al.</i> , 2017)
<i>Hordeum</i> spp.	Estrés por salinidad	-----	GC-MS, HPLC-MS	ANOVA, t Student, FDR	MetaboAnalyst 3.0	No informado	(Cao <i>et al.</i> , 2017)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Estrés oxidativo leve	MeOH- H ₂ O	GC-TOF-MS, LC-q-TOF-MS	PCA, FDR	R and Cytoscape	No informado	(Fukushima <i>et al.</i> , 2017)
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. Cv. Puhong 968	Estrés por alta temperatura	Ácido tricloroacético, acetona.	BE y MS MALDI-TOF / TOF	Duncan	SPS 17.0	NCBI; STRING	(Sang <i>et al.</i> , 2017)

		Urea, ditiotreitolo, CHAPS y Tris. Urea, tiourea, CHAPS.					
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Estrés por escasez de agua	-----	GC-MS	ANOVA, <i>t</i> de Student	TAGFINDER 4.0	ArMet	(Pires <i>et al.</i> , 2016)
<i>T. durum</i> Desf. Cv. Ofanto	Estrés salino y luz alta	MeOH- H ₂ O EtOH- H ₂ O	LC-UV-ESI-MS	ANOVA y Pearson, heat map, PCA, Venn diagrams.	Multibase 2015	No informado	(Woodrow <i>et al.</i> , 2016)
<i>Zea mays</i>	Estrés por calor y sequía	-----	GC-MS	ANOVA, PCA, Tuckey, <i>t</i> de Student, corrección de Bonferroni, heat map.	Table S9; Table S10	ArMet	(Obata <i>et al.</i> , 2015)
<i>Allium cepa</i>	Estrés abiótico	MeOH	LC-MS/MS	PCA, heat map	No informado	No informado	(Abdelrahman <i>et al.</i> , 2015)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tolerancia oxidativa y a la sequía	MeOH	LC-MS/MS; LC-PDA-MS	PCA, <i>t</i> de Student, heat map.	SIMCA-P 11.5	DROP Met in PRIme	(Nakabayashi <i>et al.</i> , 2014)
<i>Vitis vinifera</i> L. cv. Shiraz y Cabernet Sauvignon	Estrés hídrico	MeOH-cloroformo - H ₂ O	LC-MS/ GC-MS	<i>t</i> de Student, PCA, OPLS-DA	R 3.0.1; R. Cytoscape	NIST; librerías RI	(Hochberg, Degu, Fait, <i>et al.</i> , 2013)
<i>Lycopersicon esculentum</i> var cerasiforme	Bajo estrés por oxígeno	MeOH-cloroformo - H ₂ O	GC-MS	<i>t</i> de Student, PLS-DA	Unscrambler (v.10.2, CAMO A/S, Trondheim, Norway)	Metabolomics RTL library	(Ampofo-Asiama <i>et al.</i> , 2013)
<i>Haberlea rhodopensis</i> , <i>Thellungiella halophylla</i> y <i>Arabidopsis thaliana</i>	Estrés por baja temperatura	HCl, MeOH-cloroformo	GC-MS	PCA	Metaboanalyst	MPI Golm Metabolome	(Benina <i>et al.</i> , 2013)
<i>Oryza sativa</i> L.	Sensibilidad a la sal	MeOH	GC-MS	<i>t</i> de Student	Masslab program	NIST; Mass spectra library of the Max-Planck-Institute	(Liu <i>et al.</i> , 2013)

<i>Selaginella lepidophylla</i>	Tolerancia a la desecación	MeOH	GC-MS, UHLC-MS-MS	PCA, PLS-DA, Welch's prueba-t y FDR	JMP; R; SOAP	Golm Metabolome; ArMet	(Yobi <i>et al.</i> , 2013)
<i>Zea mays</i>	Estrés por sequía	Ribitol, cloroformo, H ₂ O	GC – TOF – MS	PCA, ANOVA, Bonferroni test	R-2.13.0	Golm Metabolome; ArMet	(Witt <i>et al.</i> , 2012)
<i>Triticum cultivares</i>	Tolerancia a la sequía	MeOH-ribitol-norleucina	GC-MS	t Student, Bonferroni test.	VANTED	NIST; Mass spectra library of the Max-Planck-Institute	(Bowne <i>et al.</i> , 2012a)
<i>Thellungiella salsuginea</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	-----	EtOH, tolueno	HPAEC, HPLC	Pearson in R statistic	imzML (http://www.maldimsi.org)	N/F	(Lee <i>et al.</i> , 2012)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Varios estreses abióticos	-----	GC-MS	PCA, heat map, ANOVA, FDR, t de Student	R	NIST; Wiley	(Caldana <i>et al.</i> , 2011)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Sin estrés	-----	GC – TOF – MS	PCA, FDR	R, <i>TargetSearch</i>	Leco ChromaTOF; MetAlign	(Espinoza <i>et al.</i> , 2010)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tolerancia al estrés por sal	MeOH, ribitol y cloroformo, H ₂ O	UPLC, GC-MS	PCA	Software v7.1 (StatSoft, Tulsa, OK, USA)	No informado	(Renault <i>et al.</i> , 2010)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tolerancia al frío	-----	GC-MS	PCA, heat map, PLS, FDR	R	Golm Metabolome	(Korn <i>et al.</i> , 2010)

OPLS-DA = proyecciones ortogonales para análisis discriminante de estructura latente; HCA = análisis de conglomerados jerárquicos; BE = electroforesis bidimensional; LC-PDA-MS = Fotodiodo de cromatografía líquida-Espectrometría de masas matricial; HPAEC = cromatógrafo de intercambio aniónico de alto rendimiento.

La transformación de datos consiste en la conversión del formato de archivo del instrumento a formatos más generales que permiten el uso de software de análisis de datos independiente. NetCDF y mzXML son las configuraciones de archivo más ampliamente aplicadas para almacenar datos MS con guiones y el software asociado a la mayoría de los instrumentos MS puede transformar sus datos generados en NetCDF o mzXML (Pedrioli *et al.*, 2004). Después de la conversión, la eliminación de ruido, la detección de metabolitos, la alineación y la cuantificación se suelen llevar a cabo mediante software ad-hoc, como SIEVE (Cambiaghi, Ferrario and Masseroli, 2017) de Thermo Scientific, así como paquetes de software gratuitos como XCMS (Treutler, H., & Neumann, S.2016) o MZmine 2 (Pluskal *et al.*, 2010). Por último, es necesario normalizar la intensidad de los metabolitos. El propósito de la normalización es disminuir la variabilidad causada por la desigualdad en las concentraciones de la muestra, así como los errores analíticos que afectan la intensidad de los picos detectados (Wu and Li, 2016). El método de normalización más aplicado es el uso de un patrón interno agregado a la muestra antes de la extracción del metabolito. Luego, los datos de metabolitos se normalizan matemáticamente para asegurar niveles homogéneos del estándar interno en toda la muestra (Alseekh *et al.*, 2018). Para ello, el patrón interno utilizado debe ser compatible con la plataforma de análisis y no debe interferir con el perfil de metabolitos de las muestras. Si esto no es posible, se pueden aplicar otros métodos de normalización, incluido el uso del área total (Warrack *et al.*, 2009) normalización a un metabolito detectado uniformemente, o la aplicación de métodos probabilísticos (Dieterle, Ross and Senn, 2006), entre otros. Se puede encontrar una revisión detallada de las estrategias de normalización de la metabolómica en otro lugar (Misra, 2020). La normalización al área total permitió el desarrollo de modelos predictivos basados en metabolitos para la detección de variantes somaclonales del banano (Cevallos-Cevallos *et al.*, 2018).

1.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En metabolómica se ha utilizado una amplia variedad de procedimientos o técnicas estadísticas (Cambiaghi, Ferrario and Masseroli, 2017). El enfoque clásico implica análisis multivariados y univariados para evaluar el efecto del tratamiento sobre el perfil de metabolitos general y los metabolitos individuales, respectivamente.

El análisis multivariado tiene como objetivo reducir la dimensionalidad asociada al número de variables (metabolitos) y evaluar las diferencias en el perfil de metabolitos entre los grupos de investigación. De esta forma se pueden obtener los metabolitos que más contribuyen a la separación del grupo (Sas *et al.*, 2015). Las técnicas multivariadas más aplicadas en metabolómica vegetal son Análisis de Componentes Principales (PCA), Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) y Mínimos Cuadrados Parciales con Análisis Discriminante (PLS-DA).

PCA reduce la dimensionalidad de los datos en componentes individuales que explican parte de la varianza total de las muestras. La agrupación de muestras se puede observar en una gráfica de puntuación de dos o tres ejes, mientras que la contribución de los metabolitos individuales a la agrupación generalmente se muestra en una gráfica de carga de dos ejes. Alternativamente, tanto la puntuación como las gráficas de carga se pueden combinar en una única biplot (S. Moncayo Martín, 2017). El PCA se ha utilizado para evaluar los metabolitos potenciales y las vías biológicas implicadas en la respuesta al estrés de Pb y Cd de las raíces de rábano (Wang *et al.*, 2015). El PCA también se utilizó para el análisis del metabolismo de *Arabidopsis thaliana*, bajo el efecto de la combinación de glutatión, estrés oxidativo leve y bajo contenido de fósforo (Correia *et al.*, 2018). De manera similar, el PCA se utilizó para estudiar las respuestas protectoras combinadas de la sequía y la activación por calor en *Eucalyptus globulus* que no se activan cuando se someten a sequía o estrés por calor solo (Correia *et al.*, 2018).

PLS tiene como objetivo reducir la dimensionalidad de los datos al tiempo que maximiza la relación entre los niveles de metabolitos y los tratamientos (Gromski *et al.*, 2015). Para ello, PLS estima la covarianza entre las variables independientes X (datos metabolómicos) y la variable dependiente Y (tratamientos) y produce un modelo predictivo (Gromski *et al.*, 2015; Duarte *et al.*, 2016). El PLS-DA es una extensión del PLS que se aplica cuando la variable de tratamiento es categórica en lugar de continua. PLS-DA se ha utilizado para observar diferencias metabólicas entre plantas exóticas invasoras en hábitats nativos e invadidos, lo que permite la separación estadística de las especies en estudio (Skubel *et al.*, 2020). En otra investigación, PLS-DA se utilizó para el reconocimiento de biomarcadores de grupos naturales de extractos acuosos fermentados de *Viscum album* L. (Peñaloza *et al.*, 2020). En el mismo aspecto, se aplicó PLS-DA para reconocer un patrón distinto de 51 especies, basado en las hojas, tallos y filogenia relativa

en el metaboloma de tres familias de plantas Rosaceae, Asteraceae y Fabaceae (Lee *et al.*, 2020).

Las técnicas univariadas también se han utilizado comúnmente en estudios metabolómicos para evaluar la acumulación significativa de metabolitos después del tratamiento (Bartel, Krumsiek and Theis, 2013). Además, las técnicas univariadas han permitido la reducción de un gran número de analitos manteniendo solo los metabolitos significativamente acumulados en un valor p dado (Razzaq, *et. al.*, 2019). El análisis de varianza (ANOVA) y la prueba t son las técnicas univariadas más utilizadas en metabolómica. Se analizaron los cambios metabólicos y minerales en respuesta al estrés salino en genotipos de *Triticum turgidum* ssp. Durum utilizando ANOVA bidireccional para estimar los efectos de la interacción genotipo, sal y genotipo \times sal en la respuesta del metabolito al estrés salino (Blaise, Correia, Tin, Young, A. C. Vergnaud, *et al.*, 2016). Otra prueba estadística comúnmente utilizada es la prueba t de Student. La prueba t de Student se ha utilizado para determinar diferencias significativas en los niveles de fitohormonas y otros metabolitos entre las raíces de cebada sometidas a estrés por salinidad (Cao *et al.*, 2017) y las raíces normales. Se utilizaron ANOVA y la prueba t de Student para evaluar la influencia de vías respiratorias alternativas utilizando aminoácidos de cadena ramificada después del estrés hídrico en *Arabidopsis thaliana* (Pires *et al.*, 2016). No obstante, los análisis metabolómicos suelen generar una gran cantidad de compuestos, lo que aumenta el número de pruebas paramétricas individuales. Un mayor número de individuos t -pruebas o ANOVAS pueden producir resultados falsos positivos (Bowne *et al.*, 2012b). Para corregir esto, se ha aplicado un método de rectificación de múltiples pruebas como las correcciones de Bonferroni y Benjamini-Hochberg, también conocido como la tasa de descubrimiento falso (TDF o FDR) (Cambiaghi, Ferrario and Masseroli, 2017). Los valores p obtenidos de ANOVA y la prueba t de Student se corrigieron mediante la prueba de Bonferroni para evaluar el metaboloma de los híbridos de maíz (Wu *et al.*, 2020). De manera similar, la respuesta a la sequía de los tejidos de las hojas de trigo se evaluó mediante la prueba t de Student junto con la tasa de falso descubrimiento de Bonferroni (Bowne *et al.*, 2012). Asimismo, la prueba t de Student, los p -valores se corrigieron con el método de Bonferroni para evaluar el perfil de metabolitos de las hojas de maíz sometidas a calor, sequía y estrés combinado (Obata *et al.*, 2015). Sin embargo, los supuestos de normalidad y homocedasticidad (varianzas iguales) deben

probarse antes de usar pruebas paramétricas como ANOVA y pruebas *t*, especialmente en conjuntos de datos pequeños. Si no se cumplen los supuestos, se deben utilizar pruebas no paramétricas como Mann-Whitney y Kruskal-Wallis. Por tanto, el perfil diferencial de metabolitos de *Camellia sinensis* sometida a estrés abiótico se evaluó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Li *et al.*, 2015).

1.5 ANÁLISIS DE VÍAS METABÓLICAS

Los metabolitos acumulados diferencialmente pueden usarse para evaluar las vías significativamente afectadas. Un análisis completo de la vía metabólica suele incluir la observación de interacciones entre genes, proteínas y metabolitos dentro de células, tejidos u órganos sometidos a un tratamiento biológico (Xia and Wishart, 2010). Por lo tanto, los datos metabolómicos adquiridos generalmente se agregan a los datos transcriptómicos y proteómicos para obtener una percepción completa de los procesos biológicos (Cavill *et al.*, 2016). Sin embargo, los metabolitos por sí solos también pueden proporcionar información relacionada con las vías gracias al desarrollo de bases de datos como la Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (KEGG), que es capaz de mapear metabolitos en vías metabólicas (Novak and Busscher, 2013). Las vías metabólicas pueden evaluarse a partir de datos metabolómicos mediante análisis de sobrerrepresentación (ASr). En un ASr, los metabolitos detectados se mapean en vías potenciales y la significación estadística de cada vía se determina incorporando el número de metabolitos acumulados diferencialmente en una prueba exacta de Fisher o una prueba hipergeométrica (Du *et al.*, 2020). Los estudios de vías y enriquecimiento de metabolitos se realizan utilizando software ad-hoc para conectar metabolitos importantes a vías bioquímicas utilizando KEGG u otras bases de datos públicas (Yi *et al.*, 2020). Los diversos métodos y software utilizados para el análisis de vías basado en metabolitos se revisaron en otro lugar (Du *et al.*, 2020). A continuación se citan algunos ejemplos de uso de KEGG: Wu *et al.*, (2020), analizaron el perfil metabolómico de dos citotipos de *Solidago canadensis*, una vez obtenidos los metabolitos diferenciados, utilizaron KEGG para encontrar las vías metabólicas significativas como “biosíntesis de diterpenoides, fenilpropanoides” así como “biosíntesis de flavonas y flavonol y flavonoides”. En el mismo campo (Gu *et al.*, 2017), emplearon KEGG para mapear las vías

metabólicas implicadas en la biosíntesis de rotenoides de *Mirabilis himalaic*; la principal vía metabólica fue la de los aminoácidos, especialmente fenilalanina, metionina y cisteína (Ullah *et al.*, 2017), utilizó la plataforma KEGG para identificar las vías metabólicas relacionadas, con metabolitos diferenciales obtenidos de raíces y hojas, generados por sequía en siete especies de Triticeae, la vía metabólica identificada fue TCA, especialmente succinato. Actualmente, los estudios metabolómicos siguen una secuencia de pasos (Figura 1) para proporcionar explicaciones amplias y profundas de la bioquímica de un organismo.

1.6 EVALUACIÓN METABOLÓMICA DEL ESTRÉS ABIÓTICO EN PLANTAS

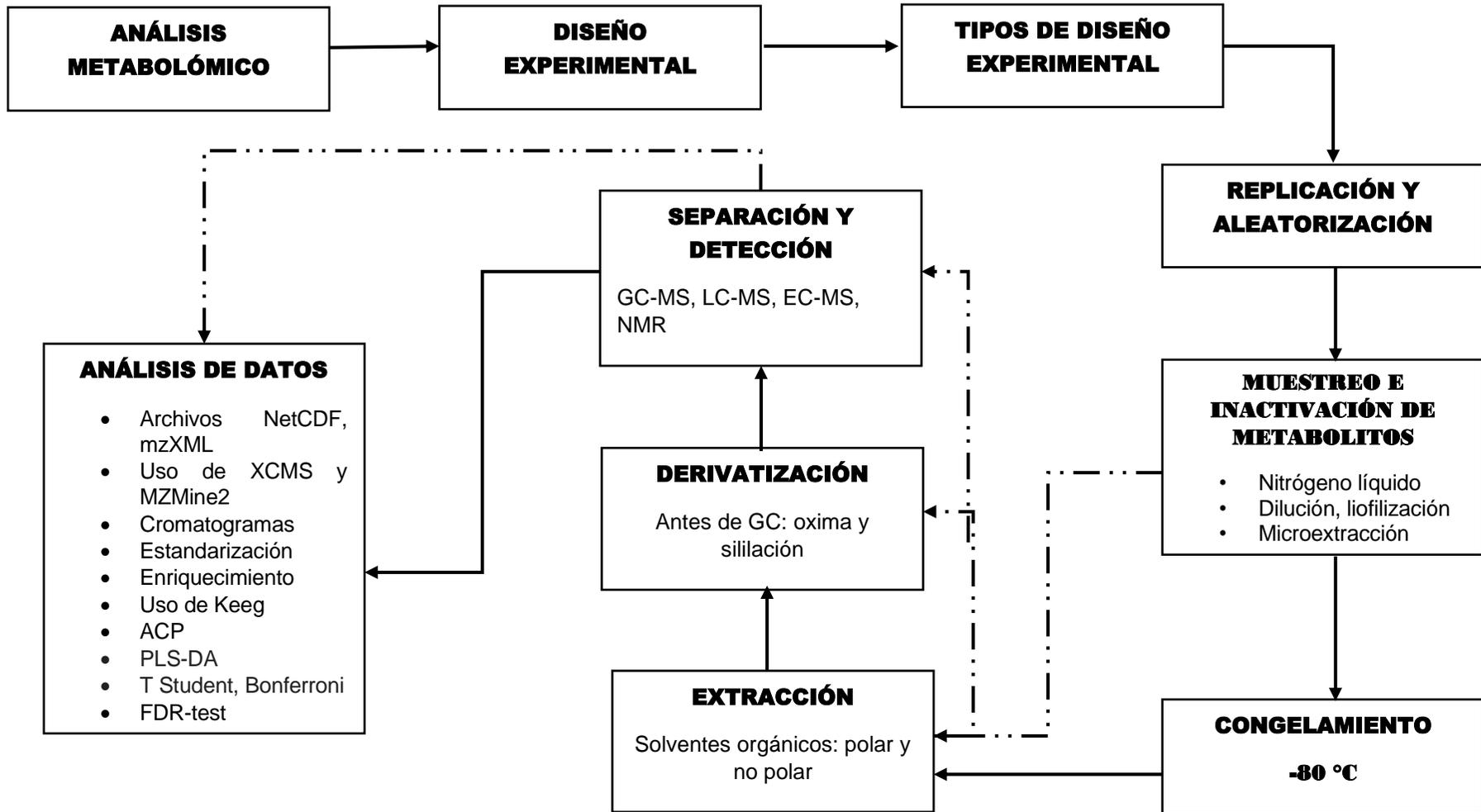
El estrés abiótico causa innumerables transformaciones en el metabolismo de las plantas, como alteraciones en las actividades enzimáticas, alto consumo de varios metabolitos, altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) o una combinación de las anteriores (Krasensky and Jonak, 2012; Gururani, Venkatesh and Tran, 2015). En consecuencia, las tensiones abióticas alteran las estructuras celulares y perjudican funciones clave de la fisiología vegetal (Walter Larcher, 2003). Entre las alteraciones predominantes se encuentran la baja capacidad fotosintética, el desarrollo atenuado, la disminución de la fertilidad y la interrupción de la reproducción, provocando una disminución en el rendimiento del cultivo (Krasensky and Jonak, 2012; Gururani, Venkatesh and Tran, 2015). El estrés influye en cada especie de diferentes maneras, e incluso en algunas circunstancias el estrés puede ser beneficioso para obtener una respuesta deseada en los cultivos (Mohanapriya *et al.*, 2019).

Existe una gran cantidad de mecanismos de respuesta de las plantas contra el estrés ambiental (Krasensky and Jonak, 2012). La metabolómica puede contribuir al análisis de la biología del estrés en las plantas (Hong *et al.*, 2016) y tiene el potencial de dilucidar los mecanismos de tolerancia al estrés abiótico en los cultivos (Parida, Panda and Rangani, 2018). Los estudios cualitativos y cuantitativos de los metabolitos de plantas sometidas a estreses bióticos y abióticos no solo son descriptivos, sino que también pueden revelar profundos mecanismos genéticos y bioquímicos como respuestas de las plantas estresadas, así como distinguir la capacidad de las plantas para resistir y tolerar el estrés (Hong *et al.*, 2016). Las plantas sometidas a factores abióticos estresantes pueden reaccionar con tolerancia o

adaptación. La mayoría de los estudios de metabolómica se han centrado en comparar la respuesta de cultivares susceptibles y tolerantes al estrés. En la mayoría de los estudios, se confirmó el papel de los aminoácidos como osmoprotectores, pero se ha destacado también la importancia de otros metabolitos, incluidos los ácidos orgánicos, azúcares y compuestos fenólicos en el estrés abiótico (Dawid and Hille, 2018; Ghatak, Chaturvedi and Weckwerth, 2018). En general, el estrés parece activar la producción de prolina, mientras que el catabolismo de la prolina mejora cuando la planta se recupera del estrés (Krasensky and Jonak, 2012).

En los próximos párrafos comentamos brevemente temas sobre estudios metabolómicos relacionados con estrés abiótico en plantas (sequía, temperatura, estrés salino y oxidativo) con énfasis en publicaciones de años recientes.

Figura 1: Síntesis de análisis metabolómico



1.7 ESCASEZ DE AGUA Y ESTRÉS POR SEQUÍA

La sequía es uno de los factores de estrés más dañinos para las plantas, particularmente en regiones con suministro de agua altamente dependiente de la lluvia, lo que genera cambios drásticos en el metabolismo. En situaciones de escasez de agua, los ajustes fisiológicos tienden a reducir su pérdida y aumentar su absorción, lo que conduce a respuestas bioquímicas que incluyen la acumulación de osmorreguladores para mantener la turgencia celular (Chaves, Maroco and Pereira, 2003), como son varios azúcares, polialcoholes, poliaminas y aminoácidos, principalmente prolina (Ghatak, Chaturvedi and Weckwerth, 2018). Así, se han realizado varios estudios metabolómicos en tejidos foliares respecto al estrés por sequía y la acumulación de prolina en hojas deshidratadas resultó frecuente (Urano *et al.*, 2009; Skiryicz *et al.*, 2010; Yobi *et al.*, 2013). También se ha informado de la acumulación de prolina en una amplia variedad de plantas sometidas a tensiones que pueden conducir a una baja disponibilidad de agua, como alta salinidad, metales pesados y bajas temperaturas (Urano *et al.*, 2009; Lugan *et al.*, 2010; Krasensky and Jonak, 2012; Hochberg, Degu, Toubiana, *et al.*, 2012).

La deshidratación ha sido bien estudiada a nivel metabolómico en *Arabidopsis thaliana* L. La deshidratación en plantas genera ácido abscísico (ABA), y la parte aérea de esta especie acumula aminoácidos y poliaminas de manera dependiente de ABA, así como rafinosa, que se produce independientemente de dicha hormona (Urano *et al.*, 2009). Junto con esos biomarcadores de estrés por sequía, las partes aéreas de *A. thaliana* también acumularon bajo escasez de agua flavonoides y antocianinas, lo que podría indicar que estas moléculas pueden aliviar dicho estrés (Nakabayashi *et al.*, 2014). La mayoría de los análisis metabolómicos en plantas se han llevado a cabo sobre partes aéreas, principalmente hojas, ya que este órgano se ve más afectado por la sequía que otras partes de la planta. Por ejemplo, la sequía provocó cambios más fuertes en la composición metabólica de las hojas de maíz en comparación con otros órganos (Yobi *et al.*, 2013; Kang *et al.*, 2019). En este cultivo, los metabolitos que más se acumularon en las hojas fueron los aminoácidos anillados (prolina, triptófano, fenilalanina e histidina), mientras que los ácidos pirúvico y quínico disminuyeron.

La afectación del metaboloma bajo estrés hídrico depende del genotipo de la planta. Así, aunque algunos contenidos de metabolitos mostraron alteraciones similares en las hojas de dos

cultivares de vino (Shiraz y Cabernet Sauvignon) (Hochberg, Degu, Toubiana, *et al.*, 2012), más metabolitos se vieron afectados en el cv. Shiraz (Hochberg, Degu, Toubiana, *et al.*, 2012), que mostró una regulación estomática menos ajustada que el cv. Cabernet Sauvignon. El nicotínico fue el único ácido orgánico que aumentó en ambos cultivares, mientras que el glicerato y el galactonato disminuyeron. Además, ambos genotipos experimentaron un marcado aumento en ciertos aminoácidos (prolina asociada al estrés por sequía, y también treonina, triptófano, valina, leucina y fenilalanina) y cambios en la vía de los fenilpropanoides. Sin embargo, la glutamina aumentó en el cv. 'Shiraz' y disminuyó en Cabernet Sauvignon.

Las herramientas metabolómicas han permitido caracterizar la respuesta al estrés de cultivares específicamente susceptibles a la sequía (SS) y tolerantes a la sequía (TS) y han permitido la identificación de posibles biomarcadores relacionados con este tipo de estrés. Así, se utilizó la metabolómica para comparar TS y SS en variedades de trigo. Después del tratamiento del estrés por sequía, la timina, los aminoácidos L-cisteinilglicina y fructoselisina, así como una serie de compuestos fenólicos, se acumularon más en las hojas en la variedad TS que en la SS, mientras que los niveles de prolina aumentaron sólo en la variedad SS (Guo *et al.*, 2020). Otro estudio sobre hojas de cultivares de trigo bajo escasez de agua (Kang *et al.*, 2019) mostró que el triptófano, la valina y los ácidos cítrico, fumárico y málico (que se forman en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos CAT) aparecieron en niveles más altos en el cultivar TS que en el SS. De manera similar, el cultivar TS acumuló significativamente alfa-tocoferol y los ácidos 3-hidroxi-propanoico, glucónico, glicólico, cítrico e isocítrico, mientras que el cultivar SS acumuló alfa- y gamma- tocoferoles, así como ácidos glucónico y málico. En cuanto a los azúcares, las concentraciones de nigerosa o sakebiosa, sedoheptulosa o D-altro-heptulosa y galactosa se incrementaron en SS, mientras que los niveles de glucosa, fructosa y galactosa aumentaron en TS. De manera similar, tanto en las hojas como en las raíces de los cacahuets sometidos a estrés por sequía, el análisis metabolómico mostró que pentitol, fitol, ácido xilónico, d-xilopiranososa, ácido esteárico y D-ribosa eran importantes metabolitos de respuesta a la sequía (Gundaraniya, Ambalam and Tomar, 2020). La agmatina y la cadaverina estuvieron presentes sólo en TS durante la sequía. Además, los polifenoles como el ácido siríngico y el ácido vanílico se acumularon más en el cacahuete TS que en el SS, mientras que la producción de catequina fue mayor en el cultivar SS que en el TS durante la sequía.

Con respecto a las vías metabólicas, un análisis de perfiles de metabolitos en hojas de soja silvestre sugirió que la actividad en el ciclo de CAT aumentó en TS mientras que se inhibió en el SS bajo estrés por sequía (Wang *et al.*, 2019). El ácido γ -aminobutírico (GABA), la asparagina y la metionina aumentaron significativamente en TS, pero no en SS. Los niveles de ciertos ácidos orgánicos, como los ácidos galactónico, glucoheptónico, malónico y glicólico, aumentaron significativamente en TS. Los contenidos de ácidos grasos insaturados, incluidos los ácidos linolénico y linoleico, se acumularon significativamente más en el cultivar TS. Además, metabolitos antioxidantes secundarios, como la 5-metoxitriptamina y el flúor, se acumularon significativamente más en el TS. Además, el aminoácido aromático fenilalanina y los compuestos fenólicos (ácido ferúlico, ácido salicílico y ácido 4-hidroxicinámico) aumentaron significativamente en TS. Otros metabolitos, incluidos glucosa-1-fosfato, D-fructosa 1,6-bisfosfato, ácido pirúvico, ácido D-glicérico, ácido oxálico y 2-metilfumarato, aumentaron significativamente en los cultivares TS y SS. Del mismo modo, los aminoácidos, incluyendo prolina, glicina serina, valina, beta-alanina, treonina e isoleucina, se acumularon significativamente tanto en TS como en la SS.

La dinámica temporal de la reprogramación de metabolitos de cultivares TS y SS bajo estrés por sequía también ha sido estudiada mediante herramientas metabolómicas. En la cebada sin cáscara tibetana, ambos tipos de cultivares respondieron al estrés por sequía acumulando compuestos de flavonoides y glicerofosfolípidos en una hora (Yuan *et al.*, 2018). Sin embargo, el número de metabolitos acumulados diferencialmente disminuyó en el cultivar SS con el tiempo, pero aumentó en el TS. En este cultivar, los metabolitos acumulados diferencialmente después de 8 h de iniciado el estrés fue bastante diferente de los identificados en las horas anteriores, lo que sugiere una reprogramación de metabolitos específica destinada a hacer frente al estrés por sequía.

Bajo estrés osmótico (asociado al estrés por sequía), varias especies de plantas, como la cebada, suelen mostrar un aumento de L-prolina junto con otros metabolitos, incluidos varios osmoprotectores como el manitol (Wu *et al.*, 2017). En los genotipos silvestres SS y TS analizados, hubo una disminución del ácido 2 α -cetoglutárico (del ciclo de CAT), del que procede la prolina, y de xilitol. Curiosamente, un genotipo de cebada SS mostró el mayor aumento en los niveles de la mayoría de los metabolitos, excepto manitol, y niveles disminuidos de maltosa, en comparación con los contenidos estables de otros genotipos.

La naturaleza de la sequía (cíclica frente a la aguda), así como su frecuencia y gravedad, también pueden afectar el grado de ajuste osmótico y la naturaleza de los solutos orgánicos que se acumulan. En llojas de *Populus deltoides* L., la sequía cíclica, indujo mayores respuestas en el metabolismo primario (azúcares solubles, ácidos orgánicos y aminoácidos), mientras que, el inicio agudo de la sequía prolongada indujo un mayor ajuste osmótico y mayores respuestas en el metabolismo secundario, especialmente de populósidos (ácido hidroxicinámicos conjugados con salicina) (Tschaplinski *et al.*, 2019). En el arroz, una combinación de metabolómica con proteómica reveló que, bajo estrés de alternancia abrupta de ciclos sequía-inundación, las vías del metabolismo energético y las especies reactivas de oxígeno (ROS) cambiaron fuertemente, lo que llevó a una reducción del rendimiento de grano (Xiong *et al.*, 2018).

La metabolómica ha sido la base de otros estudios ómicos mixtos. La combinación de metabolómica y proteómica también permitió evaluar la recuperación de *Eucalyptus globulus* L. (Correia *et al.*, 2018) o la respuesta de los cultivares de trigo de primavera TS y SS (Michaletti *et al.*, 2018) al estrés hídrico. En este caso, las llojas del cultivar SS mostraron niveles aumentados de aminoácidos como prolina, metionina, arginina y lisina. Sin embargo, sólo dos vías metabólicas se vieron afectadas en el cultivar TS, una de ellas realcionada con el metabolismo de las purinas. De manera similar, los estudios de transcriptómica y metabolómica revelaron que ABA, aminoácidos y ácidos orgánicos se acumulaban en las llojas de las variedades de sésamo SS y TS, pero la variedad TS mostró niveles más altos de ABA, prolina, arginina, lisina, aminoácidos aromáticos y de cadena ramificada, GABA, sacaropina, 2-aminoadipato y alantoína que el SS en condiciones de estrés (You *et al.*, 2019).

Desde un punto de vista práctico, la sequía favorece la obtención de varios metabolitos secundarios como fenoles complejos, terpenos y alcaloides. Por ejemplo, bajo estrés por sequía, los compuestos fenólicos aumentaron en *Hypericum polyanthemum* (de Matos Nunes *et al.*, 2014), *Oryza sativa* (Quan *et al.*, 2016), *Salvia officinalis* (Bettaieb *et al.*, 2011) y *Hordeum vulgare* (Piasecka *et al.*, 2017), y los monoterpenos o terpenoides aumentaron en estas dos últimas especies, respectivamente (Piasecka *et al.*, 2017; Radwan, Kleinwächter and Selmar, 2017). Sin embargo, el estrés provocó generalmente una reducción de la biomasa vegetal.

El estrés por sequía suele conducir al estrés por calor debido a la disminución del enfriamiento por transpiración. La mayoría de los cambios fisiológicos, bioquímicos y metabólicos

observados bajo estrés por sequía y calor se revirtieron con la recuperación fisiológica en *Eucalyptus globulus* Labill (Correia *et al.*, 2018) y arroz (*Oryza sativa* L.) (Lawas *et al.*, 2019). En las hojas bandera de arroz en la etapa de floración, muchos compuestos con concentración alterada después del estrés alcanzaron niveles originales después de la rehidratación. Así, 60 h después de la rehidratación, aumentaron algunos ácidos orgánicos primarios (como los CAT isocítrico, cítrico y glicérico) y disminuyeron glucosa, rafinosa, glicina, N-carboxiglicina y prolina. La prolina disminuyó más en los cultivares tolerantes a la sequía. El comportamiento de varios metabolitos fue generalmente compartido en las hojas bandera de llenado de grano temprano después del estrés y rehidratación (los CATs isocítrico y cítrico, y la prolina).

La sequía y el estrés por calor afectaron al metaboloma de las hojas de la soja (*Glycine max* L.) (Das, Rushton and Rohila, 2017). Los niveles de intermediarios de la glucólisis (piruvato, glucosa, fosfato de dihidroxiacetona) se redujeron drásticamente, mientras que los de los metabolitos del ciclo del CAT (malato, succinato, alfa-cetoglutarato, citrato) se redujeron significativamente. La disminución de piruvato puede ser la causa de la afectación de la biosíntesis de fenilalanina, triptófano, tirosina, isoleucina y alanina. Sin embargo, el oxalacetato (un metabolito del ciclo de CAT) y sus derivados aminoácidos metionina y lisina también disminuyeron. De manera similar, los niveles de alcoholes de azúcar, como el manitol y el galactitol, se redujeron como resultado del estrés por temperatura. En un estudio en maíz se ensayó la combinación de estrés por sequía y frío, que condujo a una respuesta metabólica multifacética que reveló un mecanismo de aclimatación dependiente de ABA (Guo *et al.*, 2020).

1.8 ESTRÉS POR TEMPERATURA

Las plantas están comprometidas por una amplia variedad de factores, y uno de los principales agentes que constituyen la organización y el destino de las plantas es el estrés por altas o bajas temperaturas, que se considera el principal estrés abiótico para las plántulas (Miura and Furumoto, 2013; Awasthi, Bhandari and Nayyar, 2015). Así mismo, el estrés por temperatura es de interés para los investigadores de plantas debido al cambio climático, que afecta negativamente a la productividad de los cultivos en todo el mundo (Hasanuzzaman *et al.*, 2013;

Hatfield and Prueger, 2015). El aumento de temperatura puede dañar aspectos fisiológicos esenciales como la relación equilibrada entre los metabolitos primarios y secundarios con las hormonas, o la correspondencia entre el agua y la consistencia de las membranas celulares, la respiración y la fotosíntesis (Hemantaranjan, 2014). Las alteraciones generadas perjudican el desarrollo metabólico reduciendo el crecimiento de las plantas y alterando su desarrollo y, en última instancia, resultan en una disminución de beneficios económicos.

Recientemente se han realizado varios estudios sobre las respuestas metabólicas al estrés por frío (tomate, trigo, maíz, *Miscanthus*) (Sun *et al.*, 2016; Le Gall *et al.*, 2017; Paupière *et al.*, 2017, 2020; Wang *et al.*, 2019), incluidas varias plantas medicinales (Ghassemi *et al.*, 2020), pero *Arabidopsis thaliana* es la especie tradicionalmente más estudiada en cuanto a tales aspectos. En esta hierba, el estrés por frío genera aumentos en la mayoría de sus metabolitos, incluidos prolina, azúcares e intermediarios del ciclo de CAT (Cook *et al.*, 2004). Un biomarcador candidato de tolerancia al frío en *Arabidopsis* resultó ser rafinosa (Wienkoop *et al.*, 2008; Korn *et al.*, 2010), aunque la respuesta general depende de los ecotipos. En esta especie, la mayoría de las respuestas metabólicas al choque térmico se compartieron con las provocadas por el frío, como los aumentos de aminoácidos derivados del piruvato y del ciclo de CAT (Kaplan *et al.*, 2004).

El calor es un estrés abiótico importante que afecta continuamente a los cultivos en muchos países, a medida que aumentan las temperaturas en todo el mundo. El estrés por calor en las plantas provoca la sobreproducción de metabolitos fenólicos, fenilpropanoides y flavonoides (Masouleh and Sassine, 2020). En las hojas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), tanto la supresión como la sobreexpresión del factor de estrés térmico B1 (HsfB1) mejoraron la termo tolerancia de la planta por diferentes medios. La sobreexpresión de *HsfB1* provocó la acumulación de productos de las rutas de fenilpropanoides y flavonoides, incluidos varios isómeros del ácido cafeoilquínico (Paupière *et al.*, 2020). Sin embargo, las hojas de tomate con *HsfB1* suprimida mostraron una acumulación de la poliamina putrescina y de los azúcares sacarosa y glucosa. Por lo tanto, la tolerancia al calor no fue específica de un grupo de metabolitos. Así, mediante metabolómica y transcriptómica se detectaron afectaciones en las rutas de la respiración celular a nivel de sustrato, que revelaron la respuesta diferencial de las hojas de *Arabidopsis thaliana* al estrés térmico provocado por el calentamiento prolongado o

por los choques térmicos. El calentamiento prolongado mejoró la vía de la glucólisis pero inhibió el ciclo de CAT, mientras que un choque térmico limitó significativamente la conversión de piruvato en acetil coenzima A (Wang *et al.*, 2020), afectando por tanto negativamente al CAT, pero no, en tal medida, a la glucólisis. Además, en el trigo (*Triticum aestivum* L.) sometido a estrés por alta temperatura, diez días después de la antesis, las hojas banderas mostraron un aumento general en pipercolato y L-triptófano, mientras que antranilato y drummondol disminuyeron. Las vías metabólicas más afectadas por las altas temperaturas fueron la biosíntesis de metabolitos secundarios y la vía aminoacil-tRNA (Thomason *et al.*, 2018).

De manera similar, las herramientas metabolómicas han permitido evaluar la dinámica de los metabolitos de plantas tolerantes y sensibles al calor. Un estudio metabolómico reciente mostró una respuesta en dos pasos de *Pinus radiata* al estrés por calor con el perfil de metabolitos de las hojas cambiando significativamente después de 3 días de la inducción del estrés para activar una respuesta de la planta a largo plazo. Las citoquininas, el metabolismo de los ácidos grasos y la biosíntesis de flavonoides y terpenoides fueron las vías más importantes involucradas en la respuesta al estrés por calor. Además, se identificaron L-fenilalanina, ácido hexadecanoico y dihidromiricetina como posibles biomarcadores para plantas tolerantes al calor.

A pesar de los cambios metabólicos descritos, parece que el polen es más resistente al estrés por calor que los tejidos. En el polen de tomate, el estrés por calor no condujo a la detección de metabolitos diferenciales (Paupière *et al.*, 2017).

El estrés por calor se ha estudiado en combinación con el estrés salino en plántulas de fréjol lablab (*Dolichos lablab*) que fueron pretratadas a 35°C con NaCl 100 mM y luego expuestas a 45°C durante 5 h y restauradas a 25°C. Dicho tratamiento generó niveles más altos de prolina, ascorbato, glutatión, azúcares y de los enzimas ascorbato peroxidasa y glutatión reductasa, (D'souza, M.R.; Devaraj, V.R., 2013).

1.9 ESTRÉS SALINO

La salinidad es uno de los principales factores que causan estrés abiótico en las plantas. Las altas concentraciones de sales en el suelo provocan diversos daños a la planta, evitando la absorción de agua (generando así un estrés secundario por deficiencia de agua) y nutrientes

(por ejemplo, potasio), lo que dificulta el curso de vías anabólicas como la fotosíntesis y la biosíntesis de proteínas (Hauser and Horie, 2010). La metabolómica dirigida ha evaluado la respuesta de las fitohormonas al estrés salino en raíces y brotes de plántulas de *Arabidopsis* (Šimura *et al.*, 2018), mientras que un enfoque no dirigido en maíz (*Zea mays* L.) reveló que los cambios metabolómicos en las raíces eran insignificantes (Richter *et al.*, 2015). De manera similar, la metabolómica permitió comprender la respuesta al estrés salino de las plantas de tabaco transgénicas resistentes a la salinidad (Kissoudis *et al.*, 2015). Estas plantas transgénicas aumentaron los contenidos de prolina, glutatión y trehalosa, mientras que se estimuló la vía de las pentosas fosfato, lo que puede estar asociado a la disminución observada de fructosa.

Los metabolomas en respuesta al estrés salino también se compararon entre especies. Así, el metaboloma de las plántulas de pepino y tomate de un mes bajo estrés fue diferente, ya que el contenido de saponinas y prolina y la capacidad antioxidante total se redujeron más notablemente en el tomate que en el pepino. Sin embargo, los niveles de compuestos fenólicos y flavonoides aumentaron en ambas plantas con un incremento mayor en el tomate en comparación con el pepino (Abdel-Farid *et al.*, 2020).

También se realizó metabolómica comparativa entre dos especies relacionadas, como *Thellungiella halophila* L. (extremophyla) y *Arabidopsis thaliana*, bajo altas concentraciones de sal. Ambas especies mostraron niveles aumentados de prolina y azúcares, pero con concentraciones más altas en la halófito, lo que sugiere su preparación para la tolerancia a la sal (Gong *et al.*, 2005). También se hicieron comparaciones en especies halófitas del mismo género. Así, se observó una respuesta diferencial a la salinidad en raíces de *Salicornia brachiata*, *S. maritima* y *S. portulacastrum*. El nivel de prolina aumentó con la concentración de NaCl en *S. portulacastrum* y *S. maritima*, mientras que en *S. maritima* y *S. brachiata* se acumularon glicina, betaína y polioles. Además, en *S. brachiata*, la cantidad de flavonoides y otros compuestos fenólicos aumentaba en presencia de NaCl, mientras que tales metabolitos resultaron negativamente regulados en *S. portulacastrum*, que acumuló carotenoides (Benjamin *et al.*, 2019).

También se contrastaron genotipos pertenecientes a la misma especie en cuanto a resistencia al calor. Recientemente, Borrelli *et al.*, (2018a) investigaron los cambios

metabolómicos en cinco genotipos de *Triticum durum* Desf. expuestos a diferentes concentraciones de NaCl. Todos los genotipos mostraron en brotes una acumulación de prolina y el agotamiento de ácidos orgánicos, incluidos los intermediarios del ciclo de CAT, a la concentración de sal más alta (200 mM), una situación que se asemeja al agotamiento de oxígeno causado por inundación. Además, hubo una serie de metabolitos que se acumularon dependiendo del genotipo, especialmente GABA, treonina, leucina, ácido glutámico, glicina, manosa y fructosa. Todo ello sugiere una asociación de los metabolitos acumulados con la diferente tolerancia de los genotipos a la salinidad.

Igualmente, la metabolómica ha contribuido a la caracterización de variedades tolerantes a la sal (TSa). Sin embargo, los biomarcadores TSa varían para diferentes cultivares, ya que cada cultivar puede hacer frente de manera diferente en condiciones de estrés. (Sanchez *et al.*, 2007) sometieron a salinidad partes aéreas de plántulas de *Lotus japonicus* L. y observaron una disminución de los contenidos de asparagina y glutamina, que son productos primarios de la asimilación del nitrógeno, y un aumento de los niveles de ácidos glucurónico y gulónico, así como de ononitol, treonina y serina. Los niveles de estos últimos tres analitos, junto con otros, también aumentaron en un experimento posterior (Sanchez *et al.*, 2011), en especies de *Lotus* sensibles (SSa) y tolerantes a alta salinidad bajo estrés salino. Sin embargo, los niveles de ácidos orgánicos, incluido el ácido treónico y los ácidos málico, succínico y cítrico (los tres del ciclo de CAT) disminuyeron con baja salinidad en todos los genotipos. A pesar de las generalidades, los genotipos SSa tenían pocas alteraciones específicas (por ejemplo, el ácido gulónico aumentó y el ácido aspártico disminuyó) y los genotipos tolerantes aumentaron en contenido de asparagina. En un experimento similar en cebada (Patterson, *et al.*, 2009), el cultivar más tolerante mostró concentraciones incrementadas de hexosa fosfato e intermediarios del CAT. En otro estudio en cebada, las raíces del genotipo TSa mostraron un aumento de prolina y carbohidratos (Wu *et al.*, 2013). En las hojas de arroz, el estrés por salinidad aumentó los niveles de serotonina y ácido gentísico de las variedades TSa (Gupta and De, 2017).

También se ha utilizado la metabolómica para caracterizar específicamente la respuesta de la planta al estrés provocado por la presencia de diferentes niveles de sal, mostrando que se produce una acumulación diferencial de metabolitos según los niveles de sal. En un estudio en maíz, los mecanismos de resistencia a la sal en las hojas fueron los más efectivos a niveles bajos

de estrés por sal en un genotipo SSa en comparación con el TSa (Richter *et al.*, 2015). En muestras de flores de *Lonicerae Japonicae* Flos en condiciones de baja sal (NaCl 100 mM) (Cai *et al.*, 2020), los niveles de ácidos quínico, 1,3-O-dicafeoilquínico, 1,4-O-dicafeoilquínico, clorogénico y neoclorogénico aumentaron. De manera similar, los niveles de flavonoides como luteolósido, quercetina, luteolin-5-O- β -D-glucopiranosido, lonicerina y flavoyadorinina-B aumentaron en condiciones de poca sal. Además de los cambios observados en condiciones de baja salinidad, la acumulación de ácido cafeico, ácido 1,3-O-dicafeoilquínico clorogénico, ácido 1,4-O-dicafeoilquínico y flavonoides luteolina-5-O- β -D-glucopiranosido, lonicerina y flavoyadorinina-B, en condiciones de sal media (200 Mm NaCl). Las condiciones de altas concentraciones de sal (NaCl 300 mM) causaron una reducción en niveles de los ácidos quínico, cafeico, ferúlico, isoclorogénico A, isoclorogénico C, y luteolin-5-O- β -D-glucopiranosido, lonicerina, flavoyadorinina-B, isoquercitrina y astragalina. Además, en un estudio reciente en bananos (*Musa acuminata* L. Barangan), los brotes cultivados *in vitro* se sometieron a NaCl 100 mM y los alcoholes desaparecieron (Zubair, *et al.*, 2019). Con NaCl 150 mM, desaparecieron adicionalmente los fenoles. Es posible que tales ausencias fueran ocasionadas por procesos de esterificación producidos en tales condiciones, ya que cuando se aplicaron concentraciones de 0.50, 100, 150 y 200 mM NaCl, los metabolitos que más aumentaron fueron los ésteres.

Con técnicas metabolómicas también se han evaluado los efectos de la duración de la exposición a la sal en las plantas. En general, la reprogramación de metabolitos después de una exposición inicial al estrés salino ha sido la diferencia clave entre variedades de plantas TSa y SSa. Un estudio reciente (Wang *et al.*, 2019) mostró un total de 13 metabolitos relacionados con el estrés (piperidina, L-triptófano, ácido L-glutámico, L-sacaropina, L-fenilalanina, 6-metilcumarina, ácido cinámico, 5'-monofosfato de inosina, ácido aminomalónico, ácido 6-aminocaproico, putrescina, tiramina y ácido abscísico), que fueron los principales metabolitos acumulados diferencialmente en hojas de cebada sin cáscara independientemente del nivel de tolerancia a la sal. Sin embargo, la alta tolerancia del cultivar TS se debió a una reprogramación metabólica en momentos clave de estrés (48 a 72 h de exposición al estrés), y se propusieron nueve biomarcadores de tolerancia a la sal (Muchate *et al.*, 2019): incluidos piridoxina O-glucósido, L-alanina, hesperetina O-malonilhexósido, quinurénico ácido O-hexside, 2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato, 4-hidroxi-7-metoxicumarina-beta-ramnosido y nicotinato

ribonucleósido. En una investigación similar, el contenido de sacarosa disminuyó, mientras que el contenido de ácidos orgánicos como el ácido L-málico y el ácido 2-oxoglutarico aumentó las raíces de plántulas de remolacha azucarera después de un día de estrés salino (L. Liu *et al.*, 2020). Sin embargo, los niveles de betaína, melatonina y ácido (S) -2-aminobutírico aumentaron significativamente después de siete días de estrés salino. Los resultados sugieren una reprogramación de metabolitos de mecanismos a corto y a largo plazo para la tolerancia al estrés salino, de manera parecida a lo que se sucede en plantas como *Pinus radiata* bajo estrés por calor (Escandón *et al.*, 2017, 2018). En un estudio a lo largo de siete días del perfil metabólico de las células de arroz cultivadas en una solución de NaCl 10 mM, los cambios más prominentes en el contenido de metabolitos fueron un rápido aumento de la glucosa y una disminución tardía del ácido 2-aminobutírico (Liu *et al.*, 2013). Los aminoácidos que tuvieron mayor crecimiento fueron la ornitina al inicio y la prolina al final del período estudiado. Con concentración 100 mM, los resultados no fueron los mismos, registrándose aumentos en prolina, cisteína, treonina, metionina, isoleucina, manosa, gentibiosa y fructosa 6-P. En raíces de cultivares de arroz tolerantes hubo un aumento de niveles de aminoácidos y una disminución de los de ácidos orgánicos (incluidos intermediarios del ciclo de CAT (Gupta and De, 2017). En *Spinacia oleracea* L. *in vitro*, a medida que aumentaba el estrés salino, también aumentaba el contenido de iones de sodio, pero no disminuía significativamente el de iones de potasio y calcio. Sin embargo, en los cultivos con mayor concentración de sal, los iones sodio y potasio en los tejidos aumentaron (Muchate *et al.*, 2019). Otros cambios observados en estos cultivos *in vitro* fueron un aumento del ajuste osmótico, debido a niveles elevados de azúcares solubles, y actividad enzimática antioxidante. El metabolito que más se acumuló significativamente fue la 20-hidroxiecdisona, cuando la concentración de sal fue alta.

También se han utilizado técnicas metabólicas para evaluar el efecto de los tratamientos para aumentar la tolerancia a la sal en las plantas. El perfil metabólico de las hojas de tomate permitió identificar la reprogramación de una amplia gama de metabolitos en respuesta al tratamiento con omeprazol (Rouphael *et al.*, 2018). El omeprazol aumentó la tolerancia de la planta al estrés salino y provocó en las hojas cambios hormonales como un aumento del ácido abscísico, disminución de los niveles de auxinas y citoquininas y una reducción de los de ácido giberélico. Además, los conjugados de poliaminas, alcaloides y lactonas sesquiterpénicas se

acumularon en respuesta al omeprazol. Los resultados sugirieron que el omeprazol actuó como una hormona que provocó una mejor tolerancia al estrés por salinidad.

1.10 ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo es un factor latente crítico que puede ser causado secundariamente por estreses abióticos y bióticos y también es un importante agente condicionante del desarrollo de las plantas en el campo (Mittler, 2006). El estrés oxidativo en las plantas se produce por cambios metabólicos debidos a la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que provocan el deterioro oxidativo de estructuras celulares como lípidos, proteínas y ADN (Møller, Jensen and Hansson, 2007). La mayoría de los metabolitos inducidos por estrés abiótico muestran actividad antioxidante *in vitro* (Nakabayashi and Saito, 2015) y se están estudiando sus funciones *in vivo*. El glutatión es un antioxidante importante y protege las células contra las ROS (Noctor *et al.*, 2011). Como consecuencia, el glutatión es un mediador importante en varios tipos de estrés de las plantas (Gullner, Kömives and Rennenberg, 2001; Gomez *et al.*, 2004; Liedschulte *et al.*, 2010). Los genotipos de *Arabidopsis thaliana* que carecen de glutatión y los que lo sobreexpresan, expuestos a estrés oxidativo directo (inducido por violeta de metilo) mostraron el mismo crecimiento que las plantas de control (Fukushima *et al.*, 2017). Los mutantes que carecen de glutatión sobreexpresan, por ejemplo, flavonoides, y los análisis transcriptómicos demostraron una reconfiguración independiente de glutatión de las redes metabólicas de dichos mutantes.

Entre los estreses abióticos que generan un estrés oxidativo secundario se encuentra la radiación UV. Esto genera ROS y las respuestas bioquímicas de la planta incluyen protección tanto contra la radiación como contra la oxidación, como ocurre en *Pinus radiata* (Pascual *et al.*, 2017). En los estudios de estrés oxidativo, las herramientas metabolómicas han permitido evaluar las plantas tolerantes al estrés mineral. Los minerales como el cadmio pueden producir estrés oxidativo en las plantas y provocar la acumulación de especies reactivas de oxígeno que inducen daños en macromoléculas como el ADN (El Rasafi *et al.*, 2020). Especies como *Brassica napus* L. son tolerantes a altas concentraciones de cadmio y pueden usarse para la biorremediación del suelo. Recientemente, estudios metabolómicos demostraron que las plantas

tolerantes al cadmio suelen acumular en las hojas concentraciones más altas de ácidos grasos insaturados y metabolitos de señalización derivados del inositol, en comparación con las variedades sensibles (Mwamba *et al.*, 2020). Un análisis de fitotoxicidad mediante metabolómica también ha permitido identificar plantas que pueden causar daños a la salud humana. Así, la exposición de las plantas de trigo a los típicamente usados ésteres organofosforados clorados provocó la translocación de dichos compuestos a diferentes partes de la planta y un aumento en la respiración y producción de metabolitos antioxidantes (Q. Liu *et al.*, 2020). Igualmente, las hojas de pepino expuestas a iones de plata y nanopartículas mostraron estrés oxidativo y respondieron con producción de antioxidantes y mayor consumo de oxígeno (Zhang *et al.*, 2018).

PERSPECTIVAS FUTURAS DE LA METABOLÓMICA

La integración de bibliotecas de diferentes ómicas para construir fondos sistemáticos ha conducido, por ejemplo, al desarrollo de mapas de *loci* de rasgos cuantitativos metabolómicos (Abdelrahman, Burritt and Tran, 2018). La ingeniería biológica asistida por metabolómica para obtener tolerancias a estreses en las plantas es un campo prometedor (revisado por Sharma *et al.*, 2021). Los estudios de la metabolómica vegetal en estas dos décadas se han desarrollado considerablemente gracias a tecnologías como la espectrometría de masas, que se ha convertido en una poderosa herramienta que contribuye a la explicación de procesos biológicos esenciales relacionados con el mundo vegetal. Las perspectivas futuras de la metabolómica están orientadas a la construcción de megabibliotecas de metabolitos para determinar e interpretar la configuración de compuestos, estableciendo y ajustando las singularidades espectrales de los metabolitos evaluados con espectros curados de patrones de observación. Otra actividad investigativa, en la misma línea de actuación, es la de proporcionar bases de datos que permitan realizar comparaciones funcionales e integración de metabolitos de especies vegetales superiores para mejorar la productividad y adaptabilidad de los cultivos al medio. Por último, pero no menos importante, los investigadores que utilizan esta tecnología ómica deben fortalecer los grupos de investigación dedicados al estudio de los metabolitos vegetales siendo más cuidadosos y estrictos en el proceso completo de análisis e identificación de los metabolitos de plantas.

CAPÍTULO II INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS:

Los capítulos II-V corresponden a la publicación en la revista *horticulturae* titulada: Caracterización del perfil metabolómico en bananos *Musa* AAA cv. 'Williams' que presentan variación somaclonal, que fue aceptada el 22 de febrero del presente año.

2.1 INTRODUCCIÓN

El banano (*Musa* spp.) es un cultivo esencial, se ubica dentro de los productos agrícolas necesarios más apreciados del mundo (Ploetz, R. C., & Evans, E. A. 2015). La producción mundial de banano fue de 119.191,0 millones de toneladas en 2018, y Ecuador fue el primer exportador con una producción de 6.505.000 toneladas (FAO, 2019). Cavendish es el subgrupo de banano más cultivado en el mundo, representando más del 40% de la producción global y más del 15% de las exportaciones (Dale *et al.*, 2017).

La propagación *in vitro* es una herramienta eficaz para la producción (Hamill, 2016; Govindaraju and Indra Arulselvi, 2018), conservación y uso de las plantas (Valledor *et al.*, 2007). La micropropagación organogénica del banano consiste en una fase de proliferación celular (FP) para multiplicar microcormos seguida de una fase de enraizamiento *in vitro* (FE) y dos fases de aclimatación en invernadero (FAI y FAII). Sin embargo, las condiciones de crecimiento y el manejo del material durante las fases *in vitro* pueden causar reordenamientos cromosómicos, pérdida o duplicación de fragmentos de ADN, pequeñas mutaciones y metilación del ADN (Sahijram, Soneji and Bollamma, 2003), que pueden producir los cambios fenotípicos conocidos como variación somaclonal (VS) (Abdellatif *et al.*, 2012). En un sentido amplio, la VS engloba la variabilidad heredable, tanto fenotípica como genotípica (Israeli, Reuveni and Lahav, 1991; Jain, S.M., 2001), que afecta hasta el 88% de las plantas de plátano producidas *in vitro* (Sahijram, Soneji and Bollamma, 2003; Bairu, Fennell and van Staden, 2006). Entre todas las VS, el enanismo es la más común en *Musa* spp., afectando hasta el 80% de las plantas de banano micropropagadas (Côte, *et al.*, 1993).

El tipo y la frecuencia de las VS dependen del genotipo del material de partida utilizado para la micropropagación. El género *Musa* muestra una gran pluralidad con varios niveles de ploidía

y composición genética. Así, se han descrito genotipos de Musa diploides (AA, BB, AB), triploides (AAA, AAB, BBB) y tetraploides (AAAA, AAAB) (De Langhe *et al.*, 2009; Hřibová *et al.*, 2011; Hapsari, Hapsari, L, Azrianingsih and Arumingtyas, 2018). El subgrupo comercial de bananos Cavendish posee un genoma triploide AAA que ha demostrado ser más inestable durante la propagación *in vitro* que los subgrupos AAB y ABB (Côte, *et al.*, 1993; Cote, *et al.*, 1998). Por lo tanto, los bananos Cavendish han mostrado una alta susceptibilidad a varias VS, incluyendo el enanismo, que representa hasta el 90% de las VS en este subgrupo (Israeli, Reuveni and Lahav, 1991). A pesar de la importancia de la VS para la industria del plátano, las causas subyacentes del enanismo no se conocen del todo.

Fenotípicamente, las plantas de plátano enanas muestran escasa altura, pequeña distancia entre peciolos, corta longitud del peciolo y bajo índice foliar. Además, los racimos y los dedos de las plantas enanas son más pequeños que los de los individuos normales (Israeli, Reuveni and Lahav, 1991). La identificación de la VS antes de que la planta llegue al campo puede evitar pérdidas económicas. Sin embargo, el reconocimiento de las características fenotípicas y el diagnóstico del enanismo sólo pueden ser realizados por personal capacitado al final de la fase de aclimatización en el invernadero o ya en el campo (Israeli, Reuveni and Lahav, 1991). Se han propuesto técnicas moleculares como el ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) (Sheidai *et al.*, 2008; Abdellatif *et al.*, 2012; Khatab and Youssef, 2018) los polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) (Noceda *et al.*, 2012) y las repeticiones inter-secuencia simple (ISSRs) (Ray *et al.*, 2006; Aremu *et al.*, 2014; Dhanapal, Sathish and Satheesh, 2014; Choudhary *et al.*, 2015; Nandhakumar *et al.*, 2018) para monitorizar la VS en Musa. Sin embargo, no se ha descrito la relación entre los marcadores moleculares propuestos y los síntomas de VS.

En general, los metabolitos se han asociado más estrechamente con los fenotipos que los genes, y la metabolómica se ha propuesto como el vínculo entre los genotipos y los fenotipos (Harrison *et al.*, 2020). Las técnicas metabolómicas se han utilizado para evaluar las respuestas de las plantas a los estreses bióticos y abióticos, así como a otros tratamientos (Cevallos-Cevallos *et al.*, 2009, 2011; Mohandas and Ravishankar, 2016; Nam *et al.*, 2017; Mais *et al.*, 2018), al tiempo que se obtiene información sobre el estado fisiológico y bioquímico de las plantas en determinadas condiciones (Hong *et al.*, 2016; Abdelrahman, Burritt and Tran, 2018; Mais *et al.*, 2018). La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM)

es la tecnología analítica más utilizada para la elaboración de perfiles de metabolitos (Abdelrahman, Burritt and Tran, 2018) y ha permitido el diagnóstico de la VS de tipo enanismo en plantas de banano en la fase de invernadero (Cevallos-Cevallos *et al.*, 2018). Sin embargo, no se han reportado en la literatura de cambios de metabolitos que ocurren durante las primeras etapas del cultivo *in vitro* de plantas de banano, incluyendo FP y FE, así como la FAIL de invernadero.

2.2 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el perfil metabolómico de plantas de banano *Musa AAA cv. 'Williams'* que presentan variación somaclonal durante la FP, FE y FAIL.

2.3 OBJETIVO ESPECÍFICO 1

Identificar metabolitos en fases *in vitro* e invernadero de plantas de banano *Musa AAA cv. 'Williams'* que presentan variación somaclonal.

2.4 OBJETIVO ESPECÍFICO 2

Proponer indicadores metabólicos de fase *in vitro* de plantas de banano *Musa AAA cv. 'Williams'* que muestran variación somaclonal.

2.5 OBJETIVO ESPECÍFICO 3

Relacionar biomarcadores metabólicos de fases *in vitro* con fase de invernadero de plantas de banano *Musa AAA cv. 'Williams'* que muestran variación somaclonal.

CAPITULO III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

Los meristemas utilizados de *Musa* (AAA) subgrupo Cavendish cv. Williams se obtuvieron de dos plantaciones (plantación 1 y plantación 2) de 5 años de edad que mostraban cada una de ellas homogeneidad genética y que estaban ubicadas en los alrededores de la ciudad de Guayaquil. Se seleccionaron dos plantas madres normales (M1 y M2) de la plantación 1 que se utilizaron como material inicial para la evaluación de las fases de proliferación y enraizamiento, mientras que para el análisis de la fase de aclimatización se utilizaron plantas normales de la plantación 2. Ninguna de las plantas normales utilizadas como plantas madre mostraba signos de deformaciones ni de enfermedades. Para ambas plantaciones, los ápices caulinares de cada planta fueron sometidos a un proceso de multiplicación clonal *in vitro* que incluyó 6 subcultivos de proliferación, seguidos de una fase de enraizamiento y dos de aclimatización, todas ellas llevadas a cabo en las instalaciones de la Sociedad Ecuatoriana de Biotecnología (SEBIOCA) y del CIBE, ambas instituciones de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL).

Para la plantación 1, plantas seleccionadas al final de la FAIL fueron transferidas al campo para permitir su crecimiento hasta que pudieron ser identificadas fácilmente como plantas enanas (PE) o plantas normales (PN). A continuación, se seleccionaron para su posterior propagación un hijuelo normal y uno enano procedentes de la planta madre M1 (y de la misma vitroplántula del sexto subcultivo), así como un hijuelo enano procedente de la planta madre M2. Los hijuelos seleccionados mostraron el mismo fenotipo (PN o PE) que la correspondiente vitroplanta de campo a la que estaban unidas. Los ápices caulinares de los hijuelos seleccionados se sometieron al proceso de micropropagación descrito en la sección 3.2. con sólo 3 subcultivos de proliferación en la FP antes de la FE y las dos fases de aclimatización. Muestras aleatorias de FP y FE se sometieron al protocolo de perfilado de metabolitos descrito en la sección 3.4, mientras que las muestras de FAIL se utilizaron para la evaluación del fenotipo como se describe en la sección 3.3.

Para la plantación 2, las plantas del final de la FAIL se clasificaron como PN o PE según se describe en la sección 3.3. y se sometieron muestras aleatorias al protocolo de perfilado de metabolitos descrito en la sección 3.4. La Figura 2 muestra el proceso seguido para la obtención

de los materiales vegetales. Las figuras en anexos presentan imágenes de las muestras en cada etapa de micropropagación.

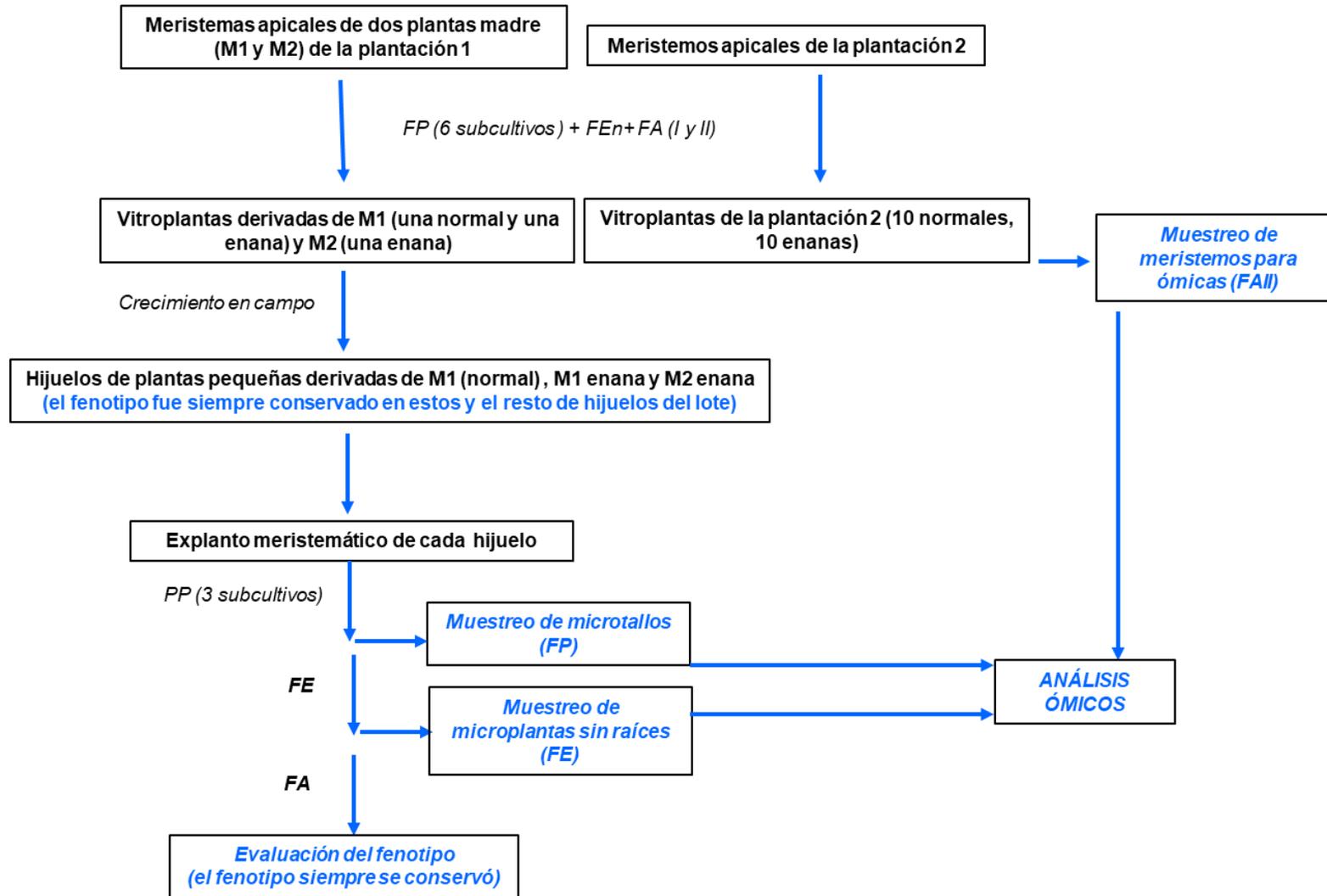
3.2 CULTIVO DE LAS VITROPLANTAS DE BANANO

Todos los ápices caulinares y de hijuelos recolectados fueron lavados con agua y reducidos a un tamaño de 3 cm de alto x 3 cm de diámetro. Los ápices así reducidos se sumergieron en una solución de cloro al 2% durante 20 min y se enjuagaron por inmersión en agua estéril durante 2 min. Este enjuague se repitió 4 veces utilizando agua estéril fresca cada vez. Los meristemas se obtuvieron al reducir los ápices a 1,5 cm de altura x 1,5 cm de diámetro de la base. Las piezas meristemáticas así obtenidas se colocaron en un medio compuesto por sales y vitaminas MS (Murashige and Skoog, 1962), 1,25 mg/L de kinetina, 4,0 mg/L de bencilaminopurina, 3,0 g/L de sacarosa y 2,0 g/L de Phytigel, y se colocaron a 22-25°C durante un mes con fotoperiodos de 12 h/12 h generados mediante tubos de fluorescencia de luz blanca que producían una radiación de luz fotosintética de $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Vuylsteke, 1989).

A continuación, los explantes meristemáticos se sometieron a una FP. Para ello, los domos meristemáticos se dividieron en dos mitades y cada mitad se colocó en el mismo medio de cultivo a base de MS descrito para el establecimiento. Seguidamente, los propágulos se dividieron y se subcultivaron en medios frescos cada 30 días. Se procesaron un total de seis subcultivos de los meristemas de ambas plantaciones. Dado que los cormos de la plantación 1 se sometieron a un segundo ciclo de micropropagación, para éste sólo se realizaron tres subcultivos de proliferación, hasta obtener suficiente material vegetal para el análisis.

Los microtallos obtenidos del sexto subcultivo entraron en la FE. Para ello, los microtallos se enraizaron en frascos con medio semisólido MS (Murashige and Skoog, 1962) suplementado con 1,25 mg/L de kinetina, 0,52 mg/L de ácido 3-indolacético, 30 g/L de sacarosa y 2 g/L de Phytigel. Tras un periodo de 30 días a 22-25°C con fotoperiodos de 12 h/12 h, las vitroplantas se sacaron de los frascos y se colocaron bajo el agua del grifo para lavar los residuos de agar.

Figura No 2: Esquema de micropropagación de las plantas de banano analizadas



A continuación, las plantas enraizadas limpias se sometieron a FAI y FAIL. Para ello, las plantas se colocaron en bandejas de plástico con turba de musgo estéril BERGER (BM2) y se cultivaron en invernadero a 24-35°C, con 75-95% de humedad y 12 h/12 h de fotoperiodo de luz natural (FAI). Después de 4 semanas, las plantas se transfirieron a nuevos recipientes con una mezcla de arena, cáscara de arroz y arcilla (1:2:2), y se cultivaron en el invernadero en las mismas condiciones que en la FAI (FAIL) durante 24 semanas hasta que se alcanzó un tamaño mínimo de unos 50 cm de altura (véanse las figuras en anexos).

3.3 ANÁLISIS DEL FENOTIPO

El fenotipo de todas las plantas regenerantes se analizó al final de FAIL. Como todas las plantas en FAIL tenían la misma edad, se clasificaron como PE o PN inspeccionando su altura, distancia entre peciolo, longitud del peciolo e índice foliar. En general, todas las plantas que al final de la FAIL eran al menos 10 cm más cortas y poseían hojas más redondeadas que el promedio de PN se clasificaron como PE.

3.4 PERFIL DE METABOLITOS

Se tomaron muestras aleatorias de FP, FE y FAIL para el análisis metabolómico. Cada muestra de FP y FE consistió en un pool de dos microbrotes o vitroplantas sin raíz de la plantación 1, respectivamente. Cada pool contenía 0,7 g de las muestras individuales. Se analizaron un total de 30 pools en FP y FE de la siguiente manera 10 pools de plantas normales (PN1-PN10) y 10 pools de plantas enanas (PE1-PE10) procedentes de M1, así como 10 pools adicionales de vitroplantas enanas (PE11-PE20) procedentes de M2. Las muestras de FAIL consistieron en meristemas apicales individuales de 10 plantas normales (PN1-PN10) y 10 plantas enanas (PE1-PE10) procedentes de la plantación 2.

La extracción, detección e identificación de metabolitos se llevó a cabo según lo sugerido por (Juan M. Cevallos-Cevallos et al., 2018). Brevemente, las muestras se congelaron a -80°C antes de molerlas hasta obtener un polvo fino bajo nitrógeno líquido. Se colocaron unos 0,3 g del polvo en un tubo de Eppendorf y se añadió 1 mL de solución de metanol/cloroformo/agua a cada

muestra en una proporción 8:1:1 y se mezcló. A continuación, las muestras se incubaron a 7°C durante 48 horas y se centrifugaron a 15.000 rpm durante 2 minutos. Aproximadamente 650 µL del sobrenadante se colocaron en un baño de agua a 80°C hasta que se secaron, como se sugirió en estudios anteriores (Maridueña-Zavala et al., 2017), y los metabolitos se volvieron a suspender en 150 µL de N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) y se incubaron durante 90 min a 80°C. A continuación, la suspensión se transfirió a insertos de 500 µL colocados en viales cromatográficos de 2 mL y se analizó en un CG-EM (sistema GC 7890A y MSD XL inerte 5975C, Agilent Technologies), con una columna capilar DB-5MS (30 m × 0,25 mm) de fenilmetilpolisiloxano (espesor de película de 0,25 µm) como fase estacionaria. La temperatura del inyector fue de 250°C, la temperatura inicial de la estufa se mantuvo a 80°C durante 1 min, el gradiente de temperatura fue de 7°C/min y la temperatura final fue de 300°C que se mantuvo durante 5 min. Se utilizó helio ultrapuro como gas portador a 1 mL/min. La interfaz CG-EM se ajustó a 280°C y el barrido se registró a una frecuencia de 4 Hz. Los datos se obtuvieron utilizando el software ChemStation E.02.02 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.) y los metabolitos acumulados diferencialmente se identificaron comparando sus espectros de masa utilizando tanto la base de datos de espectros de masas de la Biblioteca del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST) (NIST 11) como el Registro Wiley de bases de datos de espectros de masas (9ª edición, Wiley 9) (McLafferty 2009). La identidad de los metabolitos se confirmó comparando la tasa de retención lineal de cada compuesto con la del estándar puro utilizando nuestra base de datos interna. Todos los metabolitos se cuantificaron estimando su área de pico individual (Cevallos-Cevallos et al., 2018; Maridueña-Zavala et al., 2017).

3.5 ANÁLISIS DE DATOS

Este estudio siguió un diseño observacional-descriptivo para evaluar el proceso de metabolitos de PE y PN. Los niveles de metabolitos se normalizaron con respecto al área total antes de la alineación utilizando el software MZmine2 (Pluskal et al., 2010) y los perfiles de metabolitos entre PN y PE se compararon utilizando métodos estadísticos multivariantes y univariantes. Para FP y FE, se utilizaron 10 regenerantes de PE de M1 y 10 de M2, así como 10

regenerantes de PN de M1. En cuanto a FAIL, se utilizaron 9 regenerantes tanto de PE como de PN. En todos los casos se realizaron comparaciones multivariantes y univariantes.

Para las comparaciones multivariantes, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (ACP) utilizando XLSTAT 2019 (Addinsoft, Boston, MA, EE.UU.) sobre las muestras de PN y PE procedentes de M1 en FP y FE, mientras que las muestras de PE procedentes de M2 se incluyeron como conjunto de evaluación tras los cálculos de ACP en ambas fases. Todas las muestras PN y PE de FAIL se utilizaron para el ACP.

CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESULTADOS

4.1.1 HERENCIA DEL FENOTIPO

Todos los regenerantes del tercer subcultivo derivados de la plantación 1 mostraron el mismo fenotipo de la vitroplanta en campo procedente de FAIL. Para M1, se obtuvieron 13 plantas enanas y una indefinida a partir de la vitroplanta madre de campo enana, mientras que 12 plantas normales y 2 indefinidas se obtuvieron a partir de la vitroplanta madre de campo normal. En el caso de M2, todos los regenerantes eran PE, al igual que la vitroplanta madre de campo.

4.1.2 PERFILES GENERALES DE METABOLITOS

En el análisis mediante CG-MS se detectaron un total de 55, 27 y 40 metabolitos en FP, FE y FAIL, respectivamente. El ACP realizado con las muestras de FP no mostró una agrupación obvia de PN y PE de M1, pero se evidenció una clara separación de PE de M2 de acuerdo al CP2. Además, las PE de M1 resultaron estar más dispersas a lo largo de ambos ejes que las PN (Figura 3A). El CP1 contribuyó con el 20,94% de la varianza global, mientras que el CP2 contribuyó con el 16,18%. Los metabolitos con mayores valores absolutos de carga en CP1 fueron Metil- α -D-Galactopiranosido, Acido 2-keto- D-Glucónico, Acido 2-Pentenodioico, Acido Altrónico, D-Ribofuranosa, D-Glucosa 2-amino-2-desoxi y Acido 2,3,4,5-Tetrahidroxipentanoico, D-Ribofuranosa y D-Glucosa, mientras que el CP2 mostró altos valores absolutos de Metil- α -D-Glucopiranosida, β -D-Galactofuranosa, Acido D-Glucurónico y Acido Sebácico, L-(-) Sorbosa, L-Glutamina, β -L-Arabinopiranosida, Acido Linolénico, Acido Glucónico, Acido Propanoico, L-Metionina y Fenilalanina (Figura 3B).

El ACP obtenido utilizando muestras M1 de FE mostró una clara agrupación de PN separadas de PE en relación al CP2. También se observó una separación más notoria de las PE de M2 a lo largo de ambos CP (Figura 4A). El CP1 contribuyó con un 21,70% de la varianza global mientras que el CP2 contribuyó con un 17,17%. Los metabolitos con las cargas más bajas del CP2 (más abundantes en las PE que en las PN) fueron el Acido 2-Hidroxi 1,2,3-Propanotricarboxílico, Acido 2-Keto-d-Glucónico, Psicofuranosa y Acido Propanoico, mientras que la D-Galactosa 2-Deoxi, D-Fructosa, D-(-)-Fructofuranosa y la β -L-Arabinopiranososa mostraron las cargas más altas en relación al CP2 (más abundantes en las PN que en las PE) (Figura 4B).

El ACP realizado con las muestras de Fall mostró una clara agrupación de PN y PE tanto para el CP1 como para el CP2 (Figura 5A). El CP1 contribuyó con el 19,66% de la variabilidad, mientras que el CP2 contribuyó con 15,16%. El diagrama de carga mostró que los metabolitos del cuadrante superior derecho, como la β -D-Galactofuranosa y el Acido D-(+)-Galacturónico, eran más abundantes en las PE en comparación con las PN, mientras que los metabolitos del cuadrante inferior derecho incluyen L-Galactopiranososa 6 Deoxi, Metil- α -D-Glucopiranososa, Uridina, α -D-Galactopiranososa, Acido Aspártico, 2-Amino-2-Deoxi-D-Galactosa, L-Glutamina y N-Acetilglucosamina, que por tanto resultaron más abundantes en las PN que en las PE (Figura 5B).

4.1.3 METABOLITOS INDIVIDUALES

La prueba U de Mann-Whitney realizada para comparar PE y PN de M1 en FP reveló que los niveles de los ácidos carboxílicos como Sebácico y 2,3,4,5-Tetrahidroxipentanoico-1,4-Lactona, así como los de D-Ribofuranosa, fueron significativamente mayores en las PE en comparación con las PN, mientras que los niveles de los monosacáridos D-Glucosa, L-(-)-Sorbosa, β -L-Arabinopiranososa y α -D-Galactopiranososa fueron significativamente reducidos en las PE (Tabla 1). Del mismo modo, el aminoácido Fenilalanina sólo se detectó en las PN. Cuando se realizó la prueba U de Mann Whitney para comparar los PE de M2 con los PN de M1, dos monosacáridos (β -L-Arabinopiranososa y α -D-Galactopiranososa) también fueron menos abundantes en las PE que en las PN (Tabla 3).

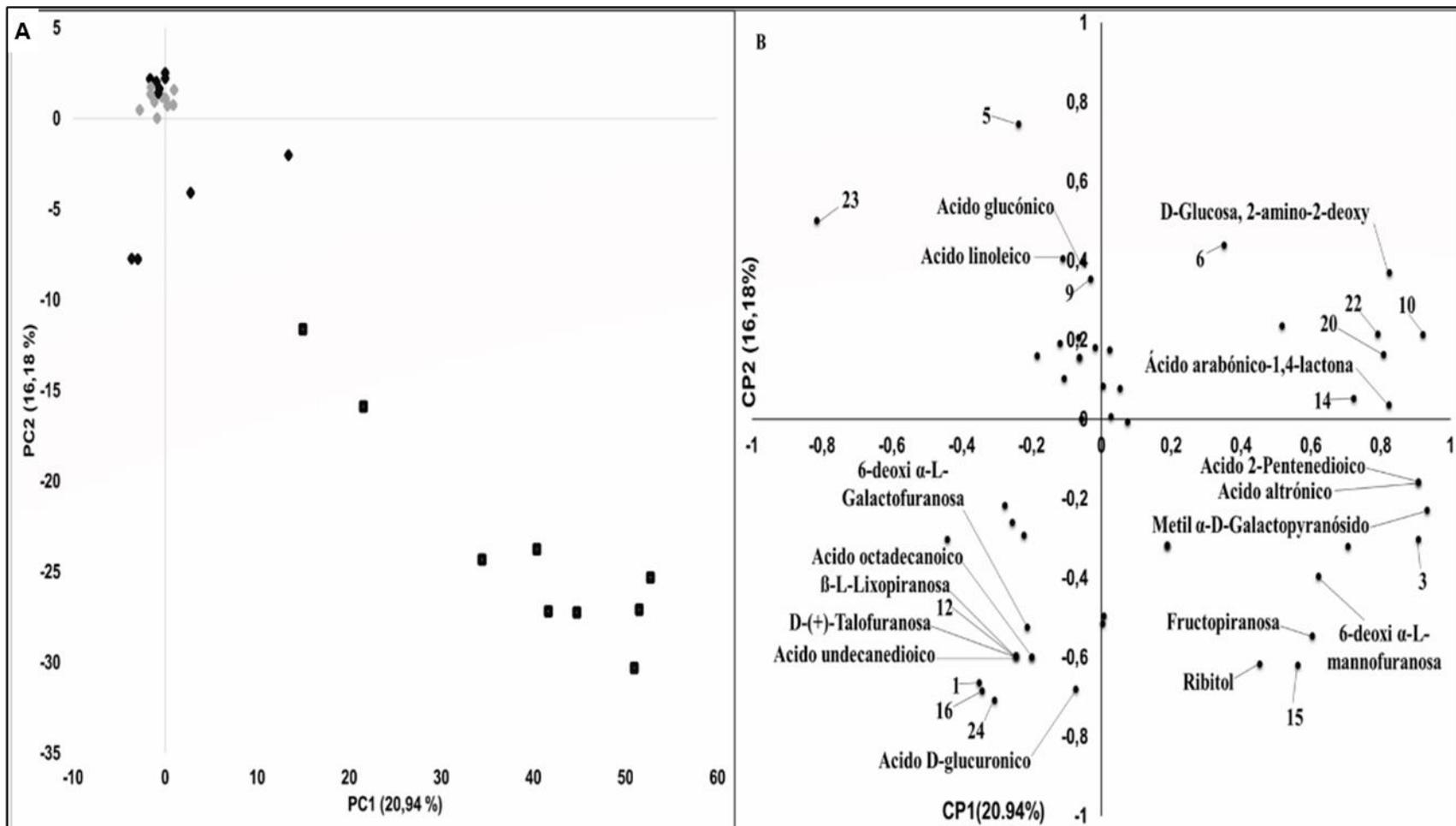


Figura 3: Gráficos de puntuación de ACP (A) y carga (B) del perfil de metabolitos de *Musa* AAA cv. Williams en la fase de enraizamiento (final del 3er subcultivo) provenientes del meristemo M1 (N1-N10: plantas normales= \blacklozenge , D1-D10: plantas enanas= \blacklozenge) para lo cual se realizó el ACP. Además, las plantas enanas de M2= \blacksquare DP (11-20) también se visualizan como un conjunto de evaluación. Los números de metabolitos en la gráfica de carga corresponden a la Tabla 3.

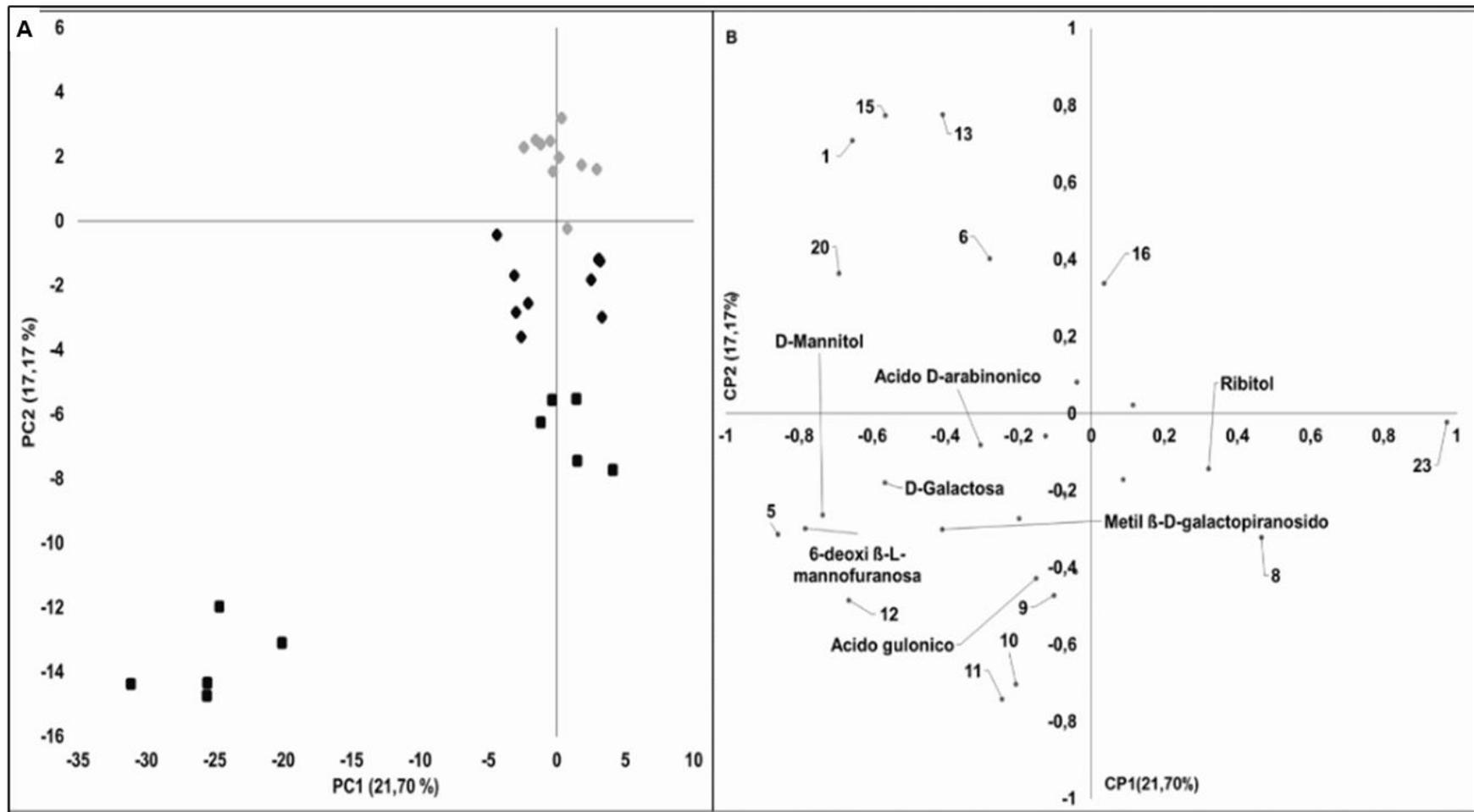


Figura 4: Gráficos de puntuación de ACP (A) y carga (B) del perfil de metabolitos de Musa AAA cv. Williams en la fase de enraizamiento (final del 3er subcultivo) provenientes del meristemo M1 (N1-N10: plantas normales= ◆ ,D1-D10: plantas enanas=◆) para lo cual se realizó el ACP. Además, las plantas enanas de M2= ■ DP (11-19) también se visualizan como un conjunto de evaluación. Los números de metabolitos en la gráfica de carga corresponden a la Tabla 3.

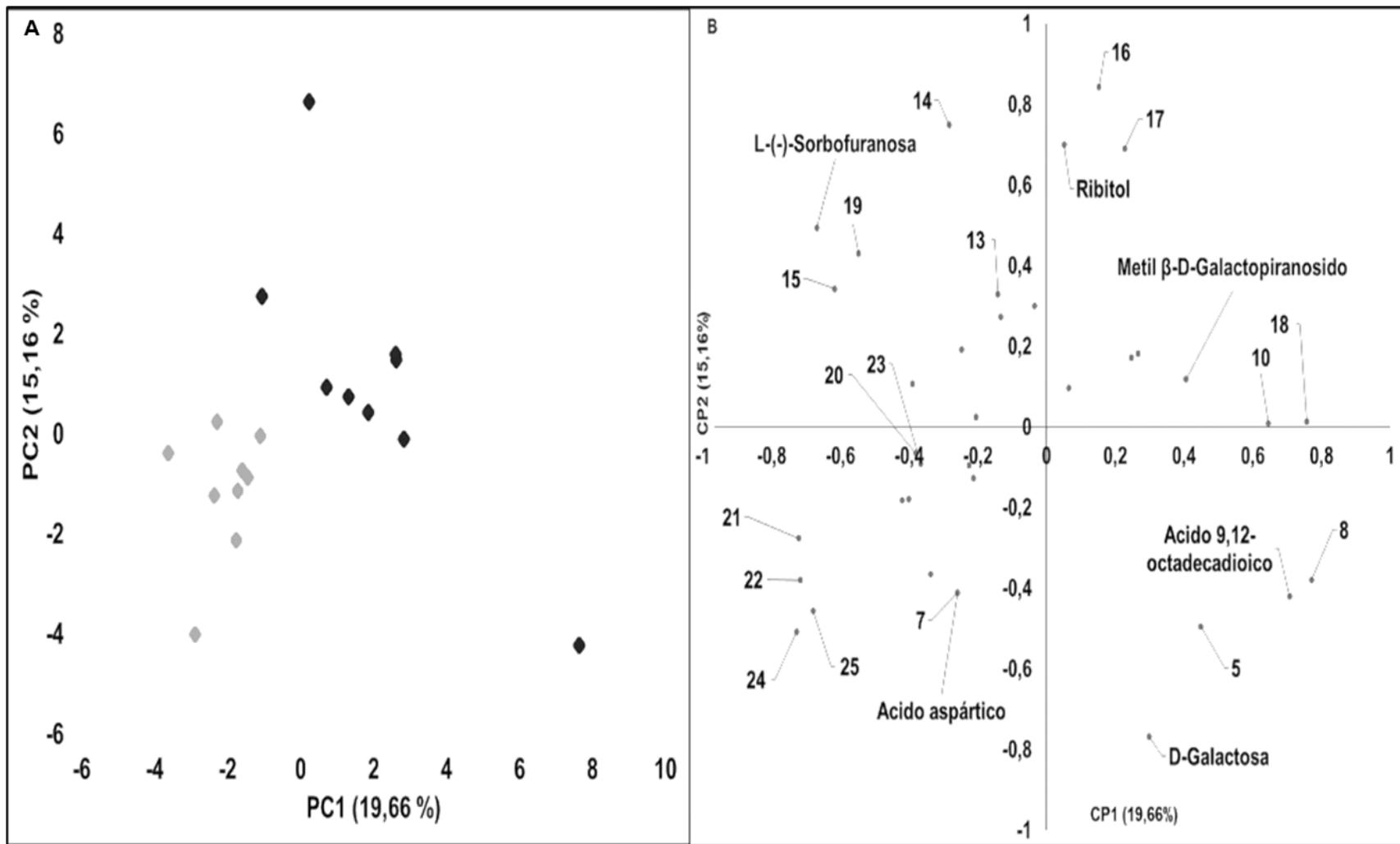


Figura No 5: Gráficos de puntuación de PCA (A) y carga (B) del perfil de metabolitos de Musa AAA cv. Plantas Williams en la Fase de Aclimatación II. PN = plantas normales ◆ PD = plantas enanas ◆. Los números de metabolitos en la gráfica de carga corresponden a la Tabla 3.

Tabla No 3: Metabolitos acumulados diferencialmente en plantas enanas (PE) en comparación con plantas normales (PN) ($p < 0.05$).

No	METABOLITO	CLASE	Log ₂ CC M1PE-M1PN	Log ₂ CC M2PE-M1PN
FASE PROLIFERACIÓN				
1	Ácido Sebácico	Ácido dicarboxílico	3.520	SDS
2	Ácido 2,3,4,5-Tetrahidroxipentanoico-1,4-lactona	Ácido carboxílico	2.304	SDS
3	D-Ribofuranosa	Monosacárido	2.226	SDS
4	D-Glucosa	Monosacárido	-0.995	SDS
5	L-(-)-Sorbosa	Monosacárido	-0.908	SDS
6	β-L-Arabinopiranososa	Monosacárido	-0.918	-6.252
7	α-D-Galactopiranososa	Monosacárido	-1.479	-1.013
8	Fenilalanina	Amino ácido	NDPE	SDS
FASE ENRAIZAMIENTO				
9	Ácido propanoico	Ácido carboxílico	3.666	SDS
10	2-Keto-D-gluconic acid	Ácido carboxílico	2.694	1.898
11	Ácido 1,2,3-Propanotricarboxílico, 2-hidroxi (Citric acid)	Ácido tricarboxílico	0.954	0.944
12	D-Psicofuranosa	Monosacárido	0.907	NDPE
13	2-deoxi, D-Galactosa	Monosacárido	-1.084	-0.620
14	D-Fructosa	Monosacárido	-1.076	-1.510

15	D-(-)-Fructofuranosa	Monosacárido	-1.246	SDS
6	β-L-Arabinopyranose	Monosacárido	-1.264	NDPE

FASE ACLIMATACIÓN II

16	β-D-Galactofuranosa	Monosacárido	NDPN	n.a.
17	Ácido gulónico	Ácido carboxílico	NDPN	n.a.
18	Ácido D-(+)-Galacturónico	Monosacárido	2.852	n.a.
19	N-Acetil glucosamino	Amino azúcar	-0.755	n.a.
20	2-amino-2-deoxi- D-Galactosa, (D-Galactosamina)	Amino azúcar	-0.969	n.a.
21	Mannosa	Monosacárido	-2.307	n.a.
22	L-6 deoxi-Galactopyranosa (L-Fucopiranososa)	Monosacárido	-3.993	n.a.
23	L-Glutamina	Amino ácido	NDPE	n.a.
24	Metil, α-D-Glucopiranosido	Monosacárido	NDPE	n.a.
25	Uridina	Nucleósido	NDPE	n.a.

Log₂ CC M1PE-M1PN= logaritmo en base 2 del cambio completo de las plantas enanas y normales de muestra 1. Log₂ CC M2PE-M1PN= logaritmo en base 2 del cambio completo de las plantas enanas de muestra 2 y plantas normales de muestra 1. Los valores de CC Log₂ positivos corresponden a metabolitos acumulados significativamente en PE mientras que CC Log₂ negativos corresponden a metabolitos acumulados significativamente en PN. La comparación de M2 PE con M1 PN sólo se expresa de manera diferente en metabolitos que coinciden con la comparación principal (M1 PN frente a M1 PE). NDPE: no detectado en plantas enanas. NDPN: no detectado en plantas normales. SDS = Sin diferencia significativa al comparar M2PE con M1PN. n.a.: no aplica.

En la FE, la prueba U de Mann-Whitney utilizada para comparar las PE y las PN de M1 mostró que los niveles de ácidos orgánicos como el Propanoico, el 2-Keto-D-Glucónico y el Acido 1,2,3-Propanotricarboxílico, 2-hidroxi así como los de D-Psicofuranosa, fueron significativamente más elevados en los PE que en las PN, mientras que los niveles de las aldohexosas D-Fructosa (incluida la forma D-(-)-Fructo-furanosa) y 2-Deoxi-D-Galactosa, así como β -L-Arabinopiranosas, fueron significativamente reducidos en los PE (Tabla 3). La comparación entre las PE de M2 y las PN de M1 también mostró un aumento significativo de los niveles de Acido 2-Keto-D-Glucónico y Acido 1,2,3-Propanotricarboxílico 2-hidroxi en las PE y en las PE de M2, pero no se detectó D-Psicofuranosa en este grupo de muestras. Del mismo modo, los niveles de 2-Deoxi-D-Galactosa, D-Fructosa y β -L-Arabinopiranosas se redujeron en las PE de M2 (Tabla 3).

Del mismo modo, la prueba U de Mann-Whitney realizada en FAIL mostró que el Acido Galacturónico estaba sobreacumulado en las PE mientras que los niveles de N-Acetilglucosamina, D-Galactosa, 2-amino-2-deoxi, Manosa y L-Fucopiranosas estaban significativamente reducidos en las PE. Del mismo modo, β -D-Galactofuranosa y Acido Gulónico sólo se detectaron en las PE, mientras que Metil- α -D-Glucopiranosido, Uridina y la L-Glutamina sólo se detectaron en las PN (Tabla 3).

4.2 DISCUSIÓN

4.2.1 ANÁLISIS DE FENOTIPOS

Como el enanismo sólo puede diagnosticarse en FAIL o en plantas de campo, no es posible seleccionar fenotipos enanos para su análisis durante las primeras fases *in vitro* de la micropropagación. En este estudio, el fenotipo del regenerante de campo siempre fue el mismo que el de la planta original. Por lo tanto, las microplantas obtenidas de variantes enanas adultas previamente identificadas se consideraron como PE en las fases de micropropagación *in vitro*. La heredabilidad del fenotipo se verificó en las fases de invernadero, ya que las plantas en FAIL mostraron el mismo fenotipo que su respectiva planta madre (ver Anexos). Los resultados sugieren que varios procesos bioquímicos asociados a la VS se mantuvieron durante las fases de micropropagación. En este estudio, se observó una acumulación diferencial de varios

metabolitos al comparar las PE y las PN en cada fase de micropropagación, lo que sugiere una posible relación entre los metabolitos y el fenotipo, incluso antes de que la morfología de la planta se hiciera evidente.

4.2.2 PERFIL GENERAL DE METABOLITOS

Se detectaron un total de 119 metabolitos en los microtallos y meristemos de FP, FE y FAIL. Se ha informado de un mayor número de metabolitos en las hojas de plátano FAIL (Cevallos-Cevallos *et al.*, 2018). Estos datos sugieren una mayor actividad metabólica en las hojas de banano cuando se comparan con los meristemos o los microbrotes. Sin embargo, como las hojas no son producidas en las etapas tempranas de la micropropagación, en el presente estudio se utilizaron los microtallos derivados de los meristemos. A pesar del bajo número de metabolitos observados, los resultados mostraron que el perfilado de metabolitos de los meristemos y los microtallos también puede utilizarse para caracterizar la VS en las plantas de plátano.

Los ACP fueron capaces de diferenciar claramente las PE de las PN en FE y FAIL, con clusters cada vez más separados a medida que las fases de producción de la planta progresaban. Esta observación sugiere que varias funciones bioquímicas se activan de forma diferencial en la FE a medida que se desarrollaban las vitroplantas. En la FP no se observó ninguna agrupación de PE y PN, pero las PE estaban más dispersas a lo largo del gráfico de puntuación que las PN, lo que indica una alta variabilidad metabólica en las PE en proliferación. Sin embargo, las PE de M2 se agruparon por separado del resto de las muestras tanto en la FP como en la FE, lo que sugiere que la selección de la planta madre afectó al perfil de metabolitos de las plántulas producidas.

Los metabolitos acumulados diferencialmente fueron ácidos carboxílicos, monosacáridos, aminoácidos y aminoazúcares, así como un nucleósido (Tabla 3). En las tres fases de micropropagación estudiadas, todos los ácidos carboxílicos acumulados diferencialmente fueron más abundantes en las PE, mientras que la mayoría de los monosacáridos acumulados diferencialmente, así como todos los aminoácidos y el nucleósido, fueron más abundantes en las PN.

4.2.3 ACIDOS CARBOXILICOS ACUMULADOS DIFERENCIALMENTE

La acumulación de ácidos orgánicos se ha observado en plantas con deficiencias minerales (Neumann and Römheld, 1999), y las elevadas cantidades de este grupo de metabolitos sugieren un desequilibrio mineral en las PE, especialmente en las fases *in vitro*. Entre los ácidos carboxílicos acumulados diferencialmente, las PE de FP mostraron mayores niveles de Acido 2,3,4,5-Tetrahidroxipentanoico-1,4-Lactona y Acido Sebácico que las PN. El Acido 2,3,4,5-Tetrahidroxipentanoico tiene varios estereoisómeros, pero el que se ha reportado en las plantas es el Xilono-1,4-Lactona (Aguiar et al., 2018; Li et al., 2020). Los estereoisómeros no suelen diferenciarse en los análisis metabolómicos no dirigidos y generalmente requieren separaciones quirales adicionales. El Xilono-1,4-Lactona se produce de forma natural en las plantas mediante la deshidrogenación de la xilosa, un monómero de la pectina y la hemicelulosa, por parte de microorganismos (Stephens et al., 2006). Así pues, los altos niveles de la posible xilonolactona en las PE sugieren una oxidación de la xilosa y una afectación de la pared celular. Del mismo modo, el ácido sebácico suele derivarse de la oxidación de los ácidos dicarboxílicos más largos en los mamíferos (Klalvraa and Gregersen, 1986). En las plantas, los ácidos dicarboxílicos largos forman parte de la suberina, que confiere protección en las paredes celulares (Taiz y Zeiger 2015). Por lo tanto, los altos niveles, tanto de xilonolactona como de ácido sebácico, sugieren la oxidación de precursores (xilosa y ácidos dicarboxílicos largos, respectivamente) de componentes de la pared celular en las PE, potencialmente causada por el estrés oxidativo comúnmente observado durante la micropropagación (Krishna *et al.*, 2016). Así pues, los resultados sugieren una respuesta diferencial al estrés oxidativo en las PE, que afectaría a las paredes celulares. No obstante, a las hipótesis emergentes mencionadas, se necesitan más investigaciones para evaluar el papel global del ácido sebácico en el desarrollo de la planta y su influencia en la VS. Adicionalmente, en la parte aérea de las vitroplantas de la FE, los ácidos carboxílicos Cítrico y 2-keto-D-Glucónico se sobreacumularon en todas las PE independientemente de la planta madre, lo que sugiere que ambos metabolitos podrían ser biomarcadores de enanismo en esta fase.

4.2.4 MONOSACÁRIDOS ACUMULADOS DIFERENCIALMENTE Y COMPONENTES DE LA PARED CELULAR DE LA PLANTA

Entre los monosacáridos acumulados de forma diferencial, sólo las formas D-Furanosa, D-Ribosa y D-Psicosa se acumularon de forma significativa en las PE de FP y FE, respectivamente. La acumulación de ambos azúcares se ha asociado a un desarrollo deficiente de la planta, y la acumulación de ribosa se ha relacionado con la inhibición del crecimiento de la planta causada por la ausencia de riboquinasas vegetales (Riggs *et al.*, 2016). Se necesitan más investigaciones para evaluar la actividad de las riboquinasas en las PE. Del mismo modo, D-Psicosa puede inducir la resistencia de las plantas al estrés (Ishida *et al.*, 2012), el cual puede generar VS (Vázquez and Linacero, 2010). Además, la psicosa puede inhibir varias enzimas relacionadas con la hidrólisis de sacáridos superiores (Hossain *et al.*, 2015) y se ha asociado con el crecimiento de las plantas (Ishida *et al.*, 2012).

En todas las fases estudiadas, varios precursores o monómeros de los polisacáridos del apoplasto (pared celular y lámina media) (hemicelulosas y pectina) fueron sub-acumulados en la FP. En esta fase, los monómeros de las hemicelulosas y pectina, Glucosa, Sorbosa, Arabinopiranososa y Galactopiranososa, resultaron estar subacumulados en las PE. En las plantas, la glucosa puede actuar como una molécula de señalización para estimular el crecimiento celular y se ha demostrado que los cambios en los niveles de este monosacárido afectan al desarrollo vegetal (Ciereszko, 2018). Del mismo modo, la D-Glucosa es el monómero único de la celulosa, presente en la pared celular vegetal, y los bajos niveles de este monosacárido sugieren una menor síntesis de celulosa y una mala construcción de la pared celular. Además, la glucosa se encarga habitualmente del transporte de monolignoles derivados de Fenilalanina, también infra-acumulada en PE de la FP, a través de la ruta de los fenilpropanoides, para construir la lignina en el apoplasto (Mazelis, 1980). Por lo tanto, los bajos niveles de Glucosa y Fenilalanina en la FP sugieren un contenido reducido de lignina en el apoplasto.

En la FP, las aldosas galactosa y arabinosa en forma de piranosas (α -D-Galactopiranososa y β -L-Arabinopiranososa, respectivamente), se encontraron en niveles reducidos en las PE independientemente de la planta madre y pueden proponerse por tanto como biomarcadores de las PE en esta fase. Las formas cicladas piranososa o furanososa pueden formarse aleatoriamente a

partir del monosacárido original durante la preparación de la muestra para el análisis metabolómico (Sasaki & de Souza, 2013). Tanto la galactosa como la arabinosa son monómeros de los polisacáridos del apoplasto hemicelulosa y pectina (Buchanan, 2000; Scheller and Ulvskov, 2010), y los bajos niveles de estos metabolitos sugieren una mala construcción del apoplasto en las PE. Del mismo modo, β -L-Arabinopiranososa, 2-deoxi-D-Galactosa y Fructosa se encontraron también subacumuladas en las PE de M1 y M2 en la FE, lo que muestra el potencial de estos metabolitos como biomarcadores del enanismo en banano en la FE. Además, los datos sugieren que la L-Arabinosa es un biomarcador potencial para las FP y FE. Se observaron deficiencias en otros componentes del apoplasto, incluyendo los precursores de hemicelulosa manosa y fucosa (Cohen and Merzendorfer, 2019; Scheller and Ulvskov, 2010) en los meristemas de PE de FAIL.

Además, no se detectó Uridina en las PE de FAIL. La uridina suele participar en el metabolismo glucídico y el bifosfato de glucosa-uridina contribuye a la biosíntesis de sacarosa, en la respiración y el suministro de energía en la planta mediante la transferencia de glucosa a fructosa en las células fotosintéticas (S. Mathews, 2013). Este nucleótido también participa en el suministro de monosacáridos a varios componentes de la planta, incluyendo el apoplasto (Bindschedler *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2020). La ausencia de uridina en las PE sugiere una baja provisión de energía y probablemente contribuye a una reducida biosíntesis de los componentes del apoplasto en este grupo de muestras.

Aunque los componentes de la hemicelulosa estaban infra-acumulados en las PE de FAIL, los componentes de la pectina β -D-Galactosa y Acido D-Galacturónico resultaron más abundantes en las PE que en los PN de esta fase, lo que sugiere alteraciones en la estructura de la pectina de este grupo de muestras. Los cambios en la estructura de la pectina pueden influir en el crecimiento, el tamaño final y la robustez de los tejidos vegetales (Xiao and Anderson, 2013). Los resultados están de acuerdo con informes anteriores que muestran que otro componente de la hemicelulosa y la pectina (ramnosa) puede sobreacumularse en las hojas PE en el FAIL, contribuyendo potencialmente al grueso pseudotallo observado en este grupo de muestras (Cevallos-Cevallos *et al.*, 2018).

En conjunto, los datos sugieren una construcción anormal del apoplasto en las PE en cada fase de la micropropagación. La construcción de la pared celular es crítica para el crecimiento

de la célula vegetal (Cosgrove, 2005), y una formación incompleta de los componentes de la pared celular se ha asociado a la VS después de la micropropagación por cultivos de protoplastos (Karp, 1993). Las alteraciones observadas en la constitución del apoplasto probablemente afectan a la formación de la célula (Mathur, 2004) y contribuyen al desarrollo de las características fenotípicas observadas en las PE. En consecuencia, en el presente estudio se infiere una posible relación entre la estructura del apoplasto y los diferentes rasgos morfológicos de los fenotipos enanos.

4.2.5 METABOLITOS AMINADOS ACUMULADOS DIFERENCIALMENTE

Los aminoácidos fenilalanina y glutamina resultaron ausentes en las PE de las FP y FAIL, respectivamente. La fenilalanina puede producir fenilpropanoides para cooperar en respuestas de las plantas a los factores bióticos y abióticos (Vogt, 2010) y favorecer la adaptación a nuevos hábitats (Bais *et al.*, 2003), incluyendo los aplicados durante el cultivo *in vitro*. La ausencia de este aminoácido en las PE sugiere una respuesta reducida al estrés oxidativo causado por la micropropagación y una contribución al crecimiento limitado propio de las PE, ya que el estrés abiótico puede afectar al desarrollo de las plantas (He *et al.*, 2018). Del mismo modo, la glutamina suele actuar como intermediario de las reacciones de asimilación del nitrógeno en las plantas (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006). La asimilación de nitrógeno está asociada al desarrollo vegetal y la ausencia de glutamina podría haber contribuido al escaso crecimiento que se observa en las PE.

La D-Galactosamina y la N-Acetilglucosamina se han encontrado en proteínas asociadas a la pared celular de las plantas (Van Hengel *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2010), así como en la pared celular microbiana (Bull, 1970; Freeze, 1976; Niemetz *et al.*, 1997). Ambos metabolitos no se acumularon de forma diferencial en FP y FE. Por tanto, la acumulación diferencial de ambos monosacáridos aminados exclusivamente en FAIL puede estar asociada a la presencia de hongos vegetales en esta fase no estéril. Los bajos niveles de ambos metabolitos en las PE de FAIL sugieren una respuesta diferencial a los microorganismos en este grupo de muestras.

En el presente trabajo se reporta la acumulación diferencial de metabolitos comúnmente asociados con el estrés oxidativo y/o la biosíntesis de la pared celular de la planta, así como de

azúcares aminados normalmente generados a partir de la degradación de las paredes celulares de los hongos. Los resultados se correlacionan con informes anteriores que muestran alteraciones en los genes asociados a la síntesis de glucosa, la transferencia de galactosa y la formación de lignina en plantas de *Musa* spp. cultivadas en campo e *in vitro* (Vroh-Bi *et al.*, 2011). Se necesitan más estudios para evaluar todas las asociaciones fisiológicas de las PE con el perfil metabolómico de la planta.

CAPITULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

Mediante CG-MS se identificaron 55 metabolitos en FP, 27 en FE y 40 en FAIL. Atendiendo sólo a la comparación entre plantas normales y enanas procedentes de la misma planta madre, se obtuvieron 8 metabolitos significativamente diferenciales para cada una de las dos fases *in vitro*. Para la fase de aclimatización II, se detectaron 10 metbolitos diferenciales. En la fase de proliferación, las plantas enanas resultaron ser menos uniformes metabólicamente que las normales, al dispersarse alrededor de éstas en el ACP. En cambio, sí se observó una evidente discriminación grupal entre ambos fenotipos en las dos fases subsiguientes.

Atendiendo a metablitos que resultaron significatvamente diferenciales para ambas variantes independientemente de las plantas madre utilizadas, se proponen los siguientes indicadores metabolómicos de enanismo en banano 'Williams': para la fase de proliferación, la subacumulación de las aldosas galactosa y arabinosa, en forma de piranosas (α -D-Galactopiranososa y β -L-Arabinopiranososa, respectivamente); para la fase de enraizamiento, la sobreacumulación de ácidos carboxílicos Cítrico y 2-keto-D-Glucónico, y la subacumulación de los monosacáridos β -L-Arabinopiranososa, 2-deoxi-D-Galactosa y Fructosa.

La acumulación diferencial de metabolitos entre los dos fenotipos estudiados indica una respuesta distinta para ambas variantes a los procesos de estrés abiótico ocurridos durante la micropropagación. Los resultados sugieren que en plantas enanas ocurre un mayor estrés oxidativo y se produce una afectación de la biosíntesis de los componentes del apoplasto. Así, los bajos niveles de arabinosa, un componente de varios polisacáridos tanto de la pared celular de la planta como de la lámina media, caracterizan el fenotipo enano en las fases *in vitro*. Las consecuentes alteraciones estructurales del apoplasto pueden afectar a la forma de la célula y contribuir a las características macromorfológicas observadas en los fenotipos enanos.

5.2 RECOMENDACIONES

Uno de los aspectos importantes en investigación científica es la validación experimental. Se propone corroborar los resultados obtenidos en este estudio con un trabajo experimental de campo, en el que se seleccionen de manera aleatoria y en número adecuado plantas de banano enanas y normales en fase de aclimatación II y se utilice la metodología analítica propuesta en este estudio, con el fin de confirmar los metabolitos diferenciales discriminados en esta investigación, que marcan las diferencias entre plantas enanas y normales de banano. De esta manera, se apoyaría con una base experimental más amplia la propuesta de dichas moléculas como biomarcadores de enanismo en banano. Además, la caracterización microscópica de apoplastos de fenotipos normal y enano permitirían contrastar la hipótesis aquí sugerida en cuanto a la conformación diferencial de las paredes celulares en ambos fenotipos.

BIBLIOGRAFÍA

- Raza, A.; Zahra, N.; Hafeez, M.B.; Ahmad, M.; Iqbal, S.; Shaukat, K.; Ahmad, G. Nitrogen Fixation of Legumes: Biology and Physiology. In *The Plant Family Fabaceae*; Springer: Singapore, **2020**.
- Atkinson, N.J.; Urwin, P.E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: From genes to the field. *J. Exp. Bot.* **2012**, *63*, 3523–3543.
- Newton, A.C.; Johnson, S.N.; Gregory, P.J. Implications of climate change for diseases, crop yields and food security. *Euphytica* **2011**, *179*, 3–18.
- Abdelrahman, M.; Sawada, Y.; Nakabayashi, R.; Sato, S.; Hirakawa, H.; El-Sayed, M.; Hirai, M.Y.; Saito, K.; Yamauchi, N.; Shigyo, M. Integrating transcriptome and target metabolome variability in doubled haploids of *Allium cepa* for abiotic stress protection. *Mol. Breed.* **2015**, *35*, 1–11.
- Costa, M.C.D.; Farrant, J.M. Plant Resistance to Abiotic Stresses. *Plants* **2019**, *8*, 553.
- Obata, T.; Witt, S.; Lisec, J.; Palacios-Rojas, N.; Florez-Sarasa, I.; Yousfi, S.; Fernie, A.R. Metabolite profiles of maize leaves in drought, heat and combined stress field trials reveal the relationship between metabolism and grain yield. *Plant Physiol.* **2015**, *169*, 2665–2683.
- Rosato, A.; Tenori, L.; Cascante, M.; Carulla, P.R.D.A.; Dos Santos, V.A.P.M.; Saccenti, E. From correlation to causation: Analysis of metabolomics data using systems biology approaches. *Metabolomics* **2018**, *14*, 1–20.
- Jorge, T.F.; Rodrigues, J.A.; Caldana, C.; Schmidt, R.; van Dongen, J.T.; Thomas-Oates, J.; António, C. Mass spectrometry-based plant metabolomics: Metabolite responses to abiotic stress. *Mass Spectrom. Rev.* **2016**, *35*, 620–649.
- Jorge, T.F.; Mata, A.T.; António, C. Mass spectrometry as a quantitative tool in plant metabolomics. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **2016**, *374*, 20150370.
- Alseekh, S.; Bermudez, L.; De Haro, L.A.; Fernie, A.R.; Carrari, F. Crop metabolomics: From diagnostics to assisted breeding. *Metabolomics* **2018**, *14*, 148.
- Jorge, T.F.; António, C. Plant Metabolomics in a Changing World: Metabolite Responses to Abiotic Stress Combinations. In *Plant, Abiotic Stress and Responses to Climate Change*; IntechOpen: London, UK, **2018**.
- Sharma, K.; Sarma, S.; Bohra, A.; Mitra, A.; Sharma, N.K.; Kumar, A. Plant Metabolomics: An Emerging Technology for Crop Improvement. *New Vis. Plant Sci.* **2018**.
- Cambiaghi, A.; Ferrario, M.; Masseroli, M. Analysis of metabolomic data: Tools, current strategies and future challenges for omics data integration. *Briefings Bioinform.* **2017**, *18*, 498–510.
- Hong, J.; Yang, L.; Zhang, D.; Shi, J. Plant Metabolomics: An Indispensable System Biology Tool for Plant Science. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 767.
- Scossa, F.; Brotman, Y.; Lima, F.D.A.; Willmitzer, L.; Nikoloski, Z.; Tohge, T.; Fernie, A.R. Genomics-based strategies for the use of natural variation in the improvement of crop metabolism. *Plant Sci.* **2016**, *242*, 47–64.
- Kumar, R.; Bohra, A.; Pandey, A.K.; Pandey, M.K.; Kumar, A. Metabolomics for Plant Improvement: Status and Prospects. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1302.

- Patil, G.; Jeong-Dong, L.; Vuong, T.D.; Valliyodan, B.; Lee, J.-D.; Chaudhary, J.; Shannon, J.G.; Nguyen, H.T. Genomic-assisted haplotype analysis and the development of high-throughput SNP markers for salinity tolerance in soybean. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 19199.
- Chaudhary, J.; Khatri, P.; Singla, P.; Kumawat, S.; Kumari, A.; Vikram, A.; Jindal, S.K.; Kardile, H.; Kumar, R.; Sonah, H.; et al. Advances in Omics Approaches for Abiotic Stress Tolerance in Tomato. *Biology* **2019**, *8*, 90.
- Yan, M.; Xu, G. Current and future perspectives of functional metabolomics in disease studies—A review. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1037*, 41–54.
- Sweetlove, L.J.; Nielsen, J.; Fernie, A.R. Engineering central metabolism—A grand challenge for plant biologists. *Plant J.* **2017**, *90*, 749–763.
- Peters, K.; Worrlich, A.; Weinhold, A.; Alka, O.; Balcke, G.; Birkemeyer, C.; Bruelheide, H.; Calf, O.W.; Dietz, S.; Dührkop, K.; et al. Current Challenges in Plant Eco-Metabolomics. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1385.
- Rodrigues, A.M.; Miguel, C.; Chaves, I.; António, C. Mass spectrometry-based forest tree metabolomics. *Mass Spectrom. Rev.* **2021**, *40*, 126–157.
- Jacyna, J.; Kordalewska, M.; Markuszewski, M.J. Design of Experiments in metabolomics-related studies: An overview. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2019**, *164*, 598–606.
- Dudzik, D.; Barbas-Bernardos, C.; García, A.; Barbas, C. Quality assurance procedures for mass spectrometry untargeted metabolomics. a review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, *147*, 149–173.
- Ivanisevic, J.; Want, E.J. From Samples to Insights into Metabolism: Uncovering Biologically Relevant Information in LC-HRMS Metabolomics Data. *Metabolites* **2019**, *9*, 308.
- Gullberg, J.; Jonsson, P.; Nordström, A.; Sjöström, M.; Moritz, T. Design of experiments: An efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **2004**, *331*, 283–295.
- Delarozza, F.; Rakocevic, M.; Malta, G.B.; Sanchez, P.M.; Bruns, R.E.; Scarminio, I.S. Factorial design effects of plant density, pattern and light availability on the caffeine, chlorogenic acids, lipids, reducing sugars and ash contents of *Coffea arabica* L. beans and leaves. *Anal. Methods* **2017**, *9*, 3612–3618.
- Yuan, H.; Zeng, X.; Shi, J.; Xu, Q.; Wang, Y.; Jabu, D.; Sang, Z.; Nyima, T. Time-Course Comparative Metabolite Profiling under Osmotic Stress in Tolerant and Sensitive Tibetan Hulless Barley. *BioMed Res. Int.* **2018**, *2018*, 1–12.
- Tschaplinski, T.J.; Abraham, P.; Jawdy, S.S.; Gunter, L.; Martin, M.Z.; Engle, N.L.; Yang, X.; Tuskan, G. The nature of the progression of drought stress drives differential metabolomic responses in *Populus deltoides*. *Ann. Bot.* **2019**, *124*, 617–626.
- Masouleh, S.S.S.; Sassine, Y.N. Molecular and biochemical responses of horticultural plants and crops to heat stress. *Ornam. Hortic.* **2020**, *26*, 148–158.
- Paupière, M.J.; Tikunov, Y.; Schleiff, E.; Bovy, A.; Fragkostefanakis, S. Reprogramming of Tomato Leaf Metabolome by the Activity of Heat Stress Transcription Factor HsfB. *Front Plant Sci.* **2020**, *11*, 1–10.
- Gundaraniya, S.A.; Ambalam, P.S.; Tomar, R.S. Metabolomic Profiling of Drought-Tolerant and Susceptible Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Genotypes in Response to Drought Stress. *ACS Omega* **2020**, *5*, 31209–31219.

Guo, X.; Xin, Z.; Yang, T.; Ma, X.; Zhang, Y.; Wang, Z.; Ren, Y.; Lin, T. Metabolomics Response for Drought Stress Tolerance in Chinese Wheat Genotypes (*Triticum aestivum*). *Plants* **2020**, *9*, 520.

Kang, Z.; Babar, A.; Khan, N.; Guo, J.; Khan, J.; Islam, S.; Shrestha, S.; Shahi, D. Comparative metabolomic profiling in the roots and leaves in contrasting genotypes reveals complex mechanisms involved in post-anthesis drought tolerance in wheat. *PLoS ONE*; **2019**, *14*, e0213502.

Borrelli, G.M.; Fragasso, M.; Nigro, F.; Platani, C.; Papa, R.; Beleggia, R.; Trono, D. Analysis of metabolic and mineral changes in response to salt stress in durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. durum) genotypes, which differ in salinity tolerance. *Plant Physiol. Biochem.* **2018**, *133*, 57–70.

Benjamin, J.J.; Lucini, L.; Jothiramshekar, S.; Parida, A. Metabolomic insights into the mechanisms underlying tolerance to salinity in different halophytes. *Plant Physiol. Biochem.* **2019**, *135*, 528–545.

Martins, M.C.M.; Caldana, C.; Wolf, L.D.; De Abreu, L.G.F. The Importance of Experimental Design, Quality Assurance, and Control in Plant Metabolomics Experiments. *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1778*, 3–17.

Blaise, B.J.; Correia, G.; Tin, A.; Young, J.H.; Vergnaud, A.-C.; Lewis, M.; Pearce, J.T.M.; Elliott, P.; Nicholson, J.K.; Holmes, E.; et al. Power Analysis and Sample Size Determination in Metabolic Phenotyping. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 5179–5188.

Xia, J.; Wishart, D.S. Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis. *Curr. Protoc. Bioinform.* **2016**, *55*, 14.10.1–14.10.91.

Nyamundanda, G.; Gormley, I.C.; Fan, Y.; Gallagher, W.M.; Brennan, L. MetSizeR: Selecting the optimal sample size for metabolomic studies using an analysis-based approach. *BMC Bioinform.* **2013**, *14*, 338.

Hendriks, M.M.; Eeuwijk, F.A.; Jellema, R.H.; Westerhuis, J.A.; Reijmers, T.H.; Hoefsloot, H.C.; Smilde, A.K. Data-processing strategies for metabolomics studies. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2011**, *30*, 1685–1698.

Fiehn, O.; Wohlgemuth, G.; Scholz, M. Setup and Annotation of Metabolomic Experiments by Integrating Biological and Mass Spectrometric Metadata. *Trans. Petri Nets Other Models Concurr. XV* **2005**, *3615*, 224–239.

Bénard, C.; Bernillon, S.; Biais, B.; Osorio, S.; Maucourt, M.; Ballias, P.; Deborde, C.; Colombié, S.; Cabasson, C.; Jacob, D.; et al. Metabolomic profiling in tomato reveals diel compositional changes in fruit affected by source–sink relationships. *J. Exp. Bot.* **2015**, *66*, 3391–3404.

Kim, H.K.; Choi, Y.H.; Verpoorte, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 536–549.

Allwood, J.W.; Ric, C.H.; De Vos, A.M.; Deborde, C.; Erban, A.; Kopka, J.; Goodacre, R.; Robert, D.H. Plant Metabolomics and Its Potential for Systems Biology Research. In *Methods in Enzymology*, 1st ed.; Jameson, D., Verma, M., Hans, V.W., Eds.; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, **2011**; Volume 500.

Glauser, G.; Boccard, J.; Wolfender, J.-L.; Rudaz, S. Metabolomics: Application in Plant Sciences. *Metab. Pract.* **2013**, 313–343.

T'Kindt, R.; Morreel, K.; Deforce, D.; Boerjan, W.; Van Bocxlaer, J. Joint GC–MS and LC–MS platforms for comprehensive plant metabolomics: Repeatability and sample pre-treatment. *J. Chromatogr. B* **2009**, *877*, 3572–3580.

- Duvane, J.A.; Jorge, T.F.; Maquia, I.; Ribeiro, N.; Ribeiro-Barros, A.I.F.; António, C. Characterization of the Primary Metabolome of *Brachystegia boehmii* and *Colophospermum mopane* under Different Fire Regimes in Miombo and Mopane African Woodlands. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1–12.
- Nakabayashi, R.; Yonekura-Sakakibara, K.; Urano, K.; Suzuki, M.; Yamada, Y.; Nishizawa, T.; Matsuda, F.; Kojima, M.; Sakakibara, H.; Shinozaki, K.; et al. Enhancement of oxidative and drought tolerance in *Arabidopsis* by overaccumulation of antioxidant flavonoids. *Plant J.* **2014**, *77*, 367–379.
- Cevallos-Cevallos, J.M.; Jines, C.; Maridueña-Zavala, M.G.; Molina-Miranda, M.J.; Ochoa, D.E.; Flores-Cedeno, J.A. GC-MS metabolite profiling for specific detection of dwarf somaclonal variation in banana plants. *Appl. Plant Sci.* **2018**, *6*, e01194, doi:10.1002/aps3.1194.
- Cevallos-Cevallos, J.M.; Reyes-De-Corcuera, J.I.; Etxeberria, E.; Danyluk, M.D.; Rodrick, G.E. Metabolomic analysis in food science: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **2009**, *20*, 557–566.
- De Koning, W.; van Dam, K.; de Koning, W. A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH. *Anal. Biochem.* **1992**, *204*, 118–123.
- Fiehn, O. Metabolomics—The link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.* **2002**, *48*, 155–171.
- Dunn, W.B.; Ellis, D.I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2005**, *24*, 285–294.
- Pongsuwan, W.; Bamba, T.; Harada, K.; Yonetani, T.; Kobayashi, A.; Fukusaki, E. High-Throughput Technique for Comprehensive Analysis of Japanese Green Tea Quality Assessment Using Ultra-performance Liquid Chromatography with Time-of-Flight Mass Spectrometry (UPLC/TOF MS). *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 10705–10708.
- Maridueña-Zavala, M.G.; Freire-Peñaherrera, A.; Cevallos-Cevallos, J.M.; Peralta, E.L. GC-MS metabolite profiling of *Phytophthora infestans* resistant to metalaxyl. *Eur. J. Plant Pathol.* **2017**, *149*, 563–574, doi:10.1007/s10658-017-1204-y.
- Verpoorte, R.; Choi, Y.H.; Mustafa, N.R.; Kim, H.K. Metabolomics: Back to basics. *Phytochem. Rev.* **2008**, *7*, 525–537.
- Kim, H.K.; Verpoorte, R. Sample preparation for plant metabolomics. *Phytochem. Anal.* **2009**, *21*, 4–13.
- Berini, J.L.; Brockman, S.A.; Hegeman, A.D.; Reich, P.B.; Muthukrishnan, R.; Montgomery, R.A.; Forester, J.D. Combinations of Abiotic Factors Differentially Alter Production of Plant Secondary Metabolites in Five Woody Plant Species in the Boreal-Temperate Transition Zone. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 1257.
- Sedio, B.E.; Echeverri, J.C.R.; Boya, C.; Wright, S.J.S.J.; Boya, C.A.P. Sources of variation in foliar secondary chemistry in a tropical forest tree community. *Ecology* **2017**, *98*, 616–623.
- Obata, T.; Fernie, A.R. The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. *Cell. Mol. Life Sci.* **2012**, *69*, 3225–3243.
- Kopka, J. Current challenges and developments in GC-MS based metabolite profiling technology. *J. Biotechnol.* **2006**, *124*, 312–322.
- Shinbo, Y.; Nakamura, Y.; Altaf-Ul-Amin, M.; Asahi, H.; Kurokawa, K.; Arita, M.; Saito, K.; Ohta, D.; Shibata, D.; Kanaya, S. KNApSAcK: A Comprehensive Species-Metabolite

- Relationship Database. *Biotechnol. Agric. For.* **2006**, *57*, 165–181.
- Dettmer, K.; Aronov, P.A.; Hammock, B.D. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom. Rev.* **2006**, *26*, 51–78.
- Pires, M.V.; Júnior, A.A.P.; Medeiros, D.B.; Daloso, D.M.; Pham, P.A.; Barros, K.A.; Engqvist, M.K.M.; Florian, A.; Krahnert, I.; Maurino, V.G.; et al. The influence of alternative pathways of respiration that utilize branched-chain amino acids following water shortage in Arabidopsis. *Plant Cell Environ.* **2016**, *39*, 1304–1319.
- Ullah, N.; Yüce, M.; Gökçe, Z.N.Ö.; Budak, H. Comparative metabolite profiling of drought stress in roots and leaves of seven Triticeae species. *BMC Genom.* **2017**, *18*, 969.
- Cevallos-Cevallos, J.M.; García-Torres, R.; Etxeberria, E.; Reyes-De-Corcuera, J.I. GC-MS Analysis of Headspace and Liquid Extracts for Metabolomic Differentiation of Citrus Huanglongbing and Zinc Deficiency in Leaves of 'Valencia' Sweet Orange from Commercial Groves. *Phytochem. Anal.* **2010**, *22*, 236–246.
- Shawky, E.; Selim, D.A. Evaluation of the effect of extraction solvent and organ selection on the chemical profile of Astragalus spinosus using HPTLC- multivariate image analysis. *J. Chromatogr. B* **2017**, *1061–1062*, 134–138.
- Liu, Y.; Fan, G.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Li, J.; Xiong, C.; Zhang, Q.; Li, X.; Lai, X. Metabolic discrimination of sea buckthorn from different Hippophaë species by ¹H NMR based metabolomics. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1585.
- Deborde, C.; Moing, A.; Roch, L.; Jacob, D.; Rolin, D.; Giraudeau, P. Plant metabolism as studied by NMR spectroscopy. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2017**, *102–103*, 61–97.
- De Raad, M.; Fischer, C.R.; Northen, T.R. High-throughput platforms for metabolomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2016**, *30*, 7–13.
- Segers, K.; Declerck, S.; Mangelings, D.; Heyden, Y.V.; Van Eeckhaut, A. Analytical techniques for metabolomic studies: A review. *Bioanalysis* **2019**, *11*, 2297–2318.
- Wolfender, J.-L.; Marti, G.; Thomas, A.; Bertrand, S. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1382*, 136–164.
- Rodríguez-Calcerrada, J.; Rodrigues, A.M.; Perdiguero, P.; António, C.; Atkin, O.K.; Li, M.; Collada, C.; Gil, L. A molecular approach to drought-induced reduction in leaf CO₂ exchange in drought-resistant Quercus ilex. *Physiol. Plant.* **2017**, *162*, 394–408.
- Schiffmann, C.; Hansen, R.; Baumann, S.; Kublik, A.; Nielsen, P.H.; Adrian, L.; von Bergen, M.; Jehmlich, N.; Seifert, J. Comparison of targeted peptide quantification assays for reductive dehalogenases by selective reaction monitoring (SRM) and precursor reaction monitoring (PRM). *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 283–291.
- Antonio, C.; Mustafa, N.R.; Osorio, S.; Tohge, T.; Giavalisco, P.; Willmitzer, L.; Rischer, H.; Oksman-Caldentey, K.-M.; Verpoorte, R.; Fernie, A.R. Analysis of the Interface between Primary and Secondary Metabolism in Catharanthus roseus Cell Cultures Using ¹³C-Stable Isotope Feeding and Coupled Mass Spectrometry. *Mol. Plant* **2013**, *6*, 581–584.
- Shih, M.-L.; Morgan, J.A. Metabolic flux analysis of secondary metabolism in plants. *Metab. Eng. Commun.* **2020**, *10*, e00123.
- Fernie, A.R.; Tohge, T. The Genetics of Plant Metabolism. *Annu. Rev. Genet.* **2017**, *51*, 287–310.
- De Vos, R.C.H.; Moco, S.; Lommen, A.; Keurentjes, J.J.B.; Bino, R.J.; Hall, R.D. Untargeted

large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 778–791.

Hanhineva, K.; Rogachev, I.; Kokko, H.; Mintz-Oron, S.; Venger, I.; Kärenlampi, S.; Aharoni, A. Non-targeted analysis of spatial metabolite composition in strawberry (*Fragaria ananassa*) flowers. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 2463–2481.

Moco, S.; Bino, R.J.; Vorst, O.; Verhoeven, H.A.; De Groot, J.; Van Beek, T.A.; Vervoort, J.; De Vos, C.R. A Liquid Chromatography- Mass Spectrometry-Based Metabolome Database for Tomato. *Plant Physiol.* **2006**, *141*, 1205–1218.

Schweiggert, U.; Kammerer, D.R.; Carle, R.; Schieber, A. Characterization of carotenoids and carotenoid esters in red pepper pods (*Capsicum annuum* L.) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 2617–2628.

Qin, Z.; Liao, D.; Chen, Y.; Zhang, C.; An, R.; Zeng, Q.; Li, X. A Widely Metabolomic Analysis Revealed Metabolic Alterations of *Epimedium Pubescens* Leaves at Different Growth Stages. *Molecules* **2019**, *25*, 137.

Olennikov, D.N.; Gadimli, A.I.; Isaev, J.I.; Kashchenko, N.I.; Prokopyev, A.S.; Kataeva, T.N.; Chirikova, N.K.; Vennos, C. Caucasian *Gentiana* Species: Untargeted LC-MS Metabolic Profiling, Antioxidant and Digestive Enzyme Inhibiting Activity of Six Plants. *Metabolites* **2019**, *9*, 271.

Berman, P.; Futoran, K.; Lewitus, G.M.; Mukha, D.; Benami, M.; Shlomi, T.; Meiri, D. A new ESI-LC/MS approach for comprehensive metabolic profiling of phytocannabinoids in *Cannabis*. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–15.

Ramautar, R.; Somsen, G.W.; De Jong, G.J. The Role of CE-MS in Metabolomics. *Metab. Pract.* **2013**, 177–208.

Zhang W., Guled F., Hankemeier T., Ramautar R. Perfilado de nucleótidos en un número reducido de células de mamíferos mediante CE-MS sin vaina en modo de iones positivos: evitando la descarga de corona. *Electroforesis.* **2020**; *41*: 360–369.

Li, L., Zhao, J., Zhao, Y., Lu, X., Zhou, Z., Zhao, C., & Xu, G. Comprehensive investigation of tobacco leaves during natural early senescence via multi-platform metabolomics analyses. *Scientific reports.* **2016**, *6*(1), 1-10.

Moreno, D.; Berli, F.; Bottini, R.; Piccoli, P.N.; Silva, M.F. Grapevine tissues and phenology differentially affect soluble carbohydrates determination by capillary electrophoresis. *Plant Physiol. Biochem.* **2017**, *118*, 394–399.

Ramautar, R., Somsen, G. W., & de Jong, G. J. CE-MS for metabolomics: Developments and applications in the period 2016–2018. *Electrophoresis.* **2019**, *40*(1), 165-179.

Bowne, J.B.; Erwin, T.A.; Juttner, J.; Schnurbusch, T.; Langridge, P.; Bacic, A.; Roessner, U. Drought Responses of Leaf Tissues from Wheat Cultivars of Differing Drought Tolerance at the Metabolite Level. *Mol. Plant* **2012**, *5*, 418–429.

Markley, J.L.; Brüschweiler, R.; Edison, A.S.; Eghbalnia, H.R.; Powers, R.; Raftery, D.; Wishart, D.S. The future of NMR-based metabolomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2017**, *43*, 34–40.

Emwas, A.-H.; Roy, R.; McKay, R.T.; Tenori, L.; Saccenti, E.; Gowda, G.A.N.; Raftery, D.; AlAhmari, F.; Jaremko, L.; Jaremko, M.; et al. NMR Spectroscopy for Metabolomics Research. *Metabolites* **2019**, *9*, 123.

Lei, Z.; Huhman, D.V.; Sumner, L.W. Mass Spectrometry Strategies in Metabolomics. *J.*

Biol. Chem. **2011**, *286*, 25435–25442.

Markley, J.L.; Brüschweiler, R.; Edison, A.S.; Eghbalnia, H.R.; Powers, R.; Raftery, D.; Wishart, D.S. The future of NMR-based metabolomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2017**, *43*, 34–40.

Deborde, C., Fontaine, J. X., Jacob, D., Botana, A., Nicaise, V., Richard-Forget, F., ... & Molinié, R. Optimizing 1D ¹H-NMR profiling of plant samples for high throughput analysis: Extract preparation, standardization, automation and spectra processing. *Metabolomics*. **2019**, *15*(3), 1-12.

Chèze, M.; Gaulier, J.-M. Drugs Involved in Drug-Facilitated Crimes (DFC). *Toxicol. Aspects Drug Facil. Crimes* **2014**, 181–222.

Cajka, T. *Gas Chromatography–Time-of-Flight Mass Spectrometry in Food and Environmental Analysis*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, **2013**; Volume 61, pp. 271–302.

Wu, H.; Guo, J.; Chen, S.; Liu, X.; Zhou, Y.; Zhang, X.; Xu, X. Recent developments in qualitative and quantitative analysis of phytochemical constituents and their metabolites using liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, *72*, 267–291.

Zhu, Z.-J.; Schultz, A.W.; Wang, J.; Johnson, C.H.; Yannone, S.M.; Patti, G.J.; Siuzdak, G. Liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry characterization of metabolites guided by the METLIN database. *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 451–460.

Motilva, M.-J.; Serra, A.; Macià, A. Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: An overview. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1292*, 66–82.

Pang, B.; Zhu, Y.; Lu, L.; Gu, F.; Chen, H. The Applications and Features of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Analysis of Traditional Chinese Medicine. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2016**; *2016*, 1–7.

Zhang, H.; Du, W.; Peralta-Videa, J.R.; Gardea-Torresdey, J.L.; White, J.C.; Keller, A.A.; Guo, H.; Ji, R.; Zhao, L. Metabolomics Reveals How Cucumber (*Cucumis sativus*) Reprograms Metabolites To Cope with Silver Ions and Silver Nanoparticle-Induced Oxidative Stress. *Environ. Sci. Technol.* **2018**, *52*, 8016–8026.

Zhou, G.; Wang, M.; Li, Y.; Xu, R.; Li, X. Comprehensive analysis of 61 characteristic constituents from *Siraitiae fructus* using ultrahigh-pressure liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *125*, 1–14.

Reeve, M. MALDI-TOF MS-Based Analysis of Seed Proteins from Catalogue Varieties of *Solanum lycopersicum*/*Lycopersicon esculentum*. *Horticulturae* **2019**, *5*, 48.

Okazaki, Y.; Saito, K. Recent advances of metabolomics in plant biotechnology. *Plant Biotechnol. Rep.* **2011**, *6*, 1–15.

Papetti, A.; Colombo, R. *High-Performance Capillary Electrophoresis for Food Quality Evaluation*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, **2019**; pp. 301–377.

Cocuron, J.-C.; Anderson, B.; Boyd, A.; Alonso, A.P. Targeted Metabolomics of *Physaria fendleri*, an Industrial Crop Producing Hydroxy Fatty Acids. *Plant Cell Physiol.* **2014**, *55*, 620–633.

Cao, D.; Lutz, A.; Hill, C.B.; Callahan, D.L.; Roessner, U. A Quantitative Profiling Method of Phytohormones and Other Metabolites Applied to Barley Roots Subjected to Salinity Stress. *Front. Plant Sci.* **2017**, *7*, 2070.

- Fukushima, A.; Iwasa, M.; Nakabayashi, R.; Kobayashi, M.; Nishizawa, T.; Okazaki, Y.; Saito, K.; Kusano, M. Effects of Combined Low Glutathione with Mild Oxidative and Low Phosphorus Stress on the Metabolism of *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*.
- Sugimoto, M.; Kawakami, M.; Robert, M.; Soga, T. Bioinformatics Tools for Mass Spectroscopy-Based Metabolomic Data Processing and Analysis. *Curr. Bioinform.* **2012**, *7*.
- Tugizimana, F., Piater, L., & Dubery, I. Plant metabolomics: A new frontier in phytochemical analysis. *South African Journal of Science.* **2013**, *109*(5-6), 01-11.
- Barnes, S., Benton, H. P., Casazza, K., Cooper, S. J., Cui, X., Du, X., ... & Tiwari, H. K. Training in metabolomics research. II. Processing and statistical analysis of metabolomics data, metabolite identification, pathway analysis, applications of metabolomics and its future. *Journal of mass spectrometry.* **2016**, *51*(8), 535-548.
- Correia, B.; Hancock, R.D.; Amaral, J.; Gomez-Cadenas, A.; Valledor, L.; Pinto, G. Combined Drought and Heat Activates Protective Responses in *Eucalyptus globulus* That Are Not Activated When Subjected to Drought or Heat Stress Alone. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 819.
- Guo, R.; Shi, L.; Jiao, Y.; Li, M.; Zhong, X.; Gu, F.; Liu, Q.; Xia, X.; Li, H. Metabolic responses to drought stress in the tissues of drought-tolerant and drought-sensitive wheat genotype seedlings. *AoB Plants* **2018**, *10*, ply016.
- Todaka, D.; Zhao, Y.; Yoshida, T.; Kudo, M.; Kidokoro, S.; Mizoi, J.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K.; Fernie, A.R.; Sato, M.; et al. Temporal and spatial changes in gene expression, metabolite accumulation and phytohormone content in rice seedlings grown under drought stress conditions. *Plant J.* **2016**, *90*, 61–78.
- Woodrow, P.; Ciarmiello, L.F.; Annunziata, M.G.; Pacifico, S.; Iannuzzi, F.; Mirto, A.; D'Amelia, L.; Dell'Aversana, E.; Piccolella, S.; Fuggi, A.; et al. Durum wheat seedling responses to simultaneous high light and salinity involve a fine reconfiguration of amino acids and carbohydrate metabolism. *Physiol. Plant.* **2016**, *159*, 290–312.
- Sang, Q.; Shan, X.; An, Y.; Shu, S.; Sun, J.; Guo, S. Proteomic Analysis Reveals the Positive Effect of Exogenous Spermidine in Tomato Seedlings' Response to High-Temperature Stress. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 120.
- Ampofo-Asiama, J.; Baiye, V.M.M.; Hertog, M.L.A.T.M.; Waelkens, E.; Geeraerd, A.; Nicolai, B.M. The metabolic response of cultured tomato cells to low oxygen stress. *Plant Biol.* **2013**, *16*, 594–606.
- Hochberg, U.; Degu, A.; Toubiana, D.; Gendler, T.; Nikoloski, Z.; Rachmilevitch, S.; Fait, A. Metabolite profiling and network analysis reveal coordinated changes in grapevine water stress response. *BMC Plant Biol.* **2013**, *13*, 184.
- Benina, M.; Obata, T.; Mehterov, N.; Ivanov, I.; Petrov, V.; Toneva, V.; Fernie, A.R.; Gechev, T.S. Comparative metabolic profiling of *Haberlea rhodopensis*, *Thellungiella halophylla*, and *Arabidopsis thaliana* exposed to low temperature. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4*, 499.
- Liu, D.; Ford, K.L.; Roessner, U.; Natera, S.; Cassin, A.M.; Patterson, J.H.; Bacic, A. Rice suspension cultured cells are evaluated as a model system to study salt responsive networks in plants using a combined proteomic and metabolomic profiling approach. *Proteomics* **2013**, *13*, 2046–2062.
- Yobi, A.; Wone, B.W.; Xu, W.; Alexander, D.C.; Guo, L.; Ryals, J.A.; Oliver, M.J.; Cushman, J.C. Metabolomic Profiling in *Selaginella lepidophylla* at Various Hydration States Provides New Insights into the Mechanistic Basis of Desiccation Tolerance. *Mol. Plant*; **2013**, *6*, 369–385.
- Witt, S.; Galicia, L.; Lisec, J.; Cairns, J.; Tiessen, A.; Araus, J.L.; Palacios-Rojas, N.; Fernie, A.R. Metabolic and Phenotypic Responses of Greenhouse-Grown Maize Hybrids to

- Experimentally Controlled Drought Stress. *Mol. Plant* **2012**, *5*, 401–417.
- Lee, Y.J.; Perdian, D.C.; Song, Z.; Yeung, E.S.; Nikolau, B.J. Use of mass spectrometry for imaging metabolites in plants. *Plant J.* **2012**, *70*, 81–95.
- Caldana, C.; Degenkolbe, T.; Cuadros-Inostroza, A.; Klie, S.; Sulpice, R.; Leisse, A.; Steinhauser, D.; Fernie, A.R.; Willmitzer, L.; Hannah, M.A. High-density kinetic analysis of the metabolomic and transcriptomic response of *Arabidopsis* to eight environmental conditions. *Plant J.* **2011**, *67*, 869–884.
- Espinoza, C.; Degenkolbe, T.; Caldana, C.; Zuther, E.; Leisse, A.; Willmitzer, L.; Hinch, D.K.; Hannah, M.A. Interaction with Diurnal and Circadian Regulation Results in Dynamic Metabolic and Transcriptional Changes during Cold Acclimation in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e14101.
- Renault, H.; Roussel, V.; El Amrani, A.; Arzel, M.; Renault, D.; Bouchereau, A.; Deleu, C. The *Arabidopsis* pop2-1 mutant reveals the involvement of GABA transaminase in salt stress tolerance. *BMC Plant Biol.* **2010**, *10*, 20.
- Korn, M.; Gärtner, T.; Erban, A.; Kopka, J.; Selbig, J.; Hinch, D.K. Predicting *Arabidopsis* Freezing Tolerance and Heterosis in Freezing Tolerance from Metabolite Composition. *Mol. Plant* **2010**, *3*, 224–235.
- Pedrioli, P.G.; Eng, J.K.; Hubley, R.; Vogelzang, M.; Deutsch, E.W.; Raught, B.; Pratt, B.; Nilsson, E.; Angeletti, R.H.; Apweiler, R.; et al. A common open representation of mass spectrometry data and its application to proteomics research. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1459–1466.
- Treutler, H., & Neumann, S. Prediction, detection, and validation of isotope clusters in mass spectrometry data. *Metabolites.* **2016**, *6*(4), 37.
- Pluskal, T.; Castillo, S.; Villar-Briones, A.; Orešič, M. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinform.* **2010**, *11*, 395, doi:10.1186/1471-2105-11-395.
- Wu, Y.; Li, L. Sample normalization methods in quantitative metabolomics. *J. Chromatogr. A.* **2016**, *1430*, 80–95.
- Warrack, B.M.; Hnatyshyn, S.; Ott, K.-H.; Reily, M.D.; Sanders, M.; Zhang, H.; Drexler, D.M. Normalization strategies for metabolomic analysis of urine samples. *J. Chromatogr. B* **2009**, *877*, 547–552.
- Dieterle, F.; Ross, A.; Senn, H. Probabilistic Quotient Normalization as Robust method to account for dilution of complex biological mixtures. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4281–4290.
- Misra, B.B. Data normalization strategies in metabolomics: Current challenges, approaches, and tools. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2020**, *26*, 165–174.
- Sas, K.M.; Karnovsky, A.; Michailidis, G.; Pennathur, S. Metabolomics and Diabetes: Analytical and Computational Approaches. *Diabetes* **2015**, *64*, 718–732.
- Moncayo Martín, S. Desarrollo y aplicación de métodos quimiométricos para el estudio de muestras mediante Espectroscopia de Ablación Láser (LIBS). Ph.D. Thesis, Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Química Analítica, Madrid, Spain, **2017**; pp. 40–58.
- Wang, Y.; Xu, L.; Shen, H.; Wang, J.; Liu, W.; Zhu, X.; Wang, R.; Sun, X.; Liu, L. Metabolomic analysis with GC-MS to reveal potential metabolites and biological pathways involved in Pb & Cd stress response of radish roots. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 18296.

- Gromski, P.S.; Muhamadali, H.; Ellis, D.I.; Xu, Y.; Correa, E.; Turner, M.L.; Goodacre, R. A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis—A marriage of convenience or a shotgun wedding. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *879*, 10–23.
- Duarte, L.M.; Filgueiras, P.R.; Silva, S.R.; Dias, J.C.; Oliveira, L.M.; Castro, E.V.; De Oliveira, M.A. Determination of some physicochemical properties in Brazilian crude oil by ¹H NMR spectroscopy associated to chemometric approach. *Fuel* **2016**, *181*, 660–669.
- Skubel, S.A.; Su, X.; Poulev, A.; Foxcroft, L.C.; Dushenkov, V.; Raskin, I. Metabolomic differences between invasive alien plants from native and invaded habitats. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 9749.
- Peñaloza, E.; Holandino, C.; Scherr, C.; De Araujo, P.I.P.; Borges, R.M.; Urech, K.; Baumgartner, S.; Garrett, R. Comprehensive Metabolome Analysis of Fermented Aqueous Extracts of *Viscum album* L. by Liquid Chromatography High Resolution Tandem Mass Spectrometry. *Molecules* **2020**, *25*, 4006.
- Lee, S.; Oh, D.-G.; Singh, D.; Lee, J.S.; Lee, S.; Lee, C.H. Exploring the metabolomic diversity of plant species across spatial (leaf and stem) components and phylogenetic groups. *BMC Plant Biol.* **2020**, *20*, 1–10.
- Bartel, J.; Krumsiek, J.; Theis, F.J. Statistical methods for the analysis of high-throughput metabolomics data. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2013**, *4*, e201301009.
- Razzaq, A., Sadia, B., Raza, A., Khalid Hameed, M., & Saleem, F. Metabolomics: A way forward for crop improvement. *Metabolites*. **2019**, *9*(12), 303.
- Wu, M.; Ge, Y.; Xu, C.; Wang, J. Metabolome and Transcriptome Analysis of Hexaploid *Solidago canadensis* Roots Reveals its Invasive Capacity Related to Polyploidy. *Genes* **2020**, *11*, 187.
- Li, C.-F.; Yao, M.-Z.; Ma, C.-L.; Ma, J.-Q.; Jin, J.-Q.; Chen, L. Differential Metabolic Profiles during the Albescence Stages of 'Anji Baicha' (*Camellia sinensis*). *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0139996.
- Xia, J.; Wishart, D.S. MSEA: A web-based tool to identify biologically meaningful patterns in quantitative metabolomic data. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, W71–W77.
- Cavill, R.; Jennen, D.G.J.; Kleinjans, J.C.S.; Briedé, J.J. Transcriptomic and metabolomic data integration. *Briefings Bioinform.* **2016**, *17*, 891–901.
- Novak, J.M.; Busscher, W.J. Selection and Use of Designer Biochars to Improve Characteristics of Southeastern USA Coastal Plain Degraded Soils. In *Advanced Biofuels and Bioproducts*; Springer: New York, NY, USA, **2013**; pp. 69–96.
- Du, X.; Smirnov, A.; Pluskal, T.; Jia, W.; Sumner, S. Metabolomics Data Preprocessing Using ADAP and MZmine. *Methods Mol. Biol.* **2020**, *2104*, 25–48.
- Yi, Y.; Fang, Y.; Wu, K.; Liu, Y.; Zhang, W. Comprehensive gene and pathway analysis of cervical cancer progression. *Oncol. Lett.* **2020**, *19*, 3316–3332.
- Gu, L.; Zhang, Z.-Y.; Quan, H.; Li, M.-J.; Zhao, F.-Y.; Xu, Y.-J.; Liu, J.; Sai, M.; Zheng, W.-L.; Lan, X.-Z. Integrated analysis of transcriptomic and metabolomic data reveals critical metabolic pathways involved in rotenoid biosynthesis in the medicinal plant *Mirabilis himalaica*. *Mol. Genet. Genom.* **2017**, *293*, 635–647.
- Krasensky, J.; Jonak, C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *J. Exp. Bot.* **2012**, *63*, 1593–1608.
- Gururani, M.A.; Venkatesh, J.; Tran, L.S.P. Regulation of Photosynthesis during Abiotic

- Stress-Induced Photoinhibition. *Mol. Plant* **2015**, *8*, 1304–1320.
- Larcher, W. *Physiological Plant Ecology*, 4th ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, **2003**.
- Mohanapriya, G.; Bharadwaj, R.; Noceda, C.; Costa, J.H.; Kumar, S.R.; Sathishkumar, R.; Thiers, K.L.L.; Macedo, E.S.; Silva, S.; Annicchiarico, P.; et al. Alternative Oxidase (AOX) Senses Stress Levels to Coordinate Auxin-Induced Reprogramming From Seed Germination to Somatic Embryogenesis—A Role Relevant for Seed Vigor Prediction and Plant Robustness. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*.
- Parida, A.K.; Panda, A.; Rangani, J. Metabolomics-Guided Elucidation of Abiotic Stress Tolerance Mechanisms in Plants. In *Plant Metabolites and Regulation under Environmental Stress*; Elsevier BV: Amsterdam, The Netherlands, **2018**; pp. 89–131.
- Dawid, C.; Hille, K. Functional Metabolomics—A Useful Tool to Characterize Stress-Induced Metabolome Alterations Opening New Avenues towards Tailoring Food Crop Quality. *Agronomy* **2018**, *8*, 138.
- Ghatak, A.; Chaturvedi, P.; Weckwerth, W. Metabolomics in Plant Stress Physiology. *Plant Genet. Mol. Biol.* **2018**, *164*, 187–236.
- Chaves, M.M.; Maroco, J.P.; Pereira, J.S. Understanding plant responses to drought—From genes to the whole plant. *Funct. Plant Biol.* **2003**, *30*, 239–264.
- Urano, K.; Maruyama, K.; Ogata, Y.; Morishita, Y.; Takeda, M.; Sakurai, N.; Suzuki, H.; Saito, K.; Shibata, D.; Kobayashi, M.; et al. Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in Arabidopsis by metabolomics. *Plant J.* **2009**, *57*, 1065–1078.
- Skirycz, A.; De Bodt, S.; Obata, T.; De Clercq, I.; Claeys, H.; De Rycke, R.; Andriankaja, M.; Van Aken, O.; Van Breusegem, F.; Fernie, A.R.; et al. Developmental Stage Specificity and the Role of Mitochondrial Metabolism in the Response of Arabidopsis Leaves to Prolonged Mild Osmotic Stress. *Plant Physiol.* **2010**, *152*, 226–244.
- Lugan, R.; Niogret, M.-F.; Lepoint, L.; Guégan, J.-P.; Larher, F.R.; Savoure, A.; Kopka, J.; Bouchereau, A. Metabolome and water homeostasis analysis of *Thellungiella salsuginea* suggests that dehydration tolerance is a key response to osmotic stress in this halophyte. *Plant J.* **2010**, *64*, 215–229.
- Hochberg, U.; Degu, A.; Toubiana, D.; Gendler, T.; Nikoloski, Z.; Rachmilevitch, S.; Fait, A. Near isohydric grapevine cultivar displays higher photosynthetic efficiency and photorespiration rates under drought stress as compared with near anisohydric grapevine cultivar. *Physiol. Plant.* **2012**, *147*, 443–452.
- Wang, X.; Guo, R.; Li, M.; Liu, Y.; Zhao, M.; Fu, H.; Liu, X.; Wang, S.; Shi, L. Metabolomics reveals the drought-tolerance mechanism in wild soybean (*Glycine soja*). *Acta Physiol. Plant.* **2019**, *41*, 1–11.
- Wu, X.; Cai, K.; Zhang, G.; Zeng, F. Metabolite Profiling of Barley Grains Subjected to Water Stress: To Explain the Genotypic Difference in Drought-Induced Impacts on Malting Quality. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1547.
- Xiong, Q.-Q.; Shen, T.-H.; Zhong, L.; Zhu, C.-L.; Peng, X.-S.; He, X.-P.; Fu, J.-R.; Ouyang, L.-J.; Bian, J.-M.; Hu, L.-F.; et al. Comprehensive metabolomic, proteomic and physiological analyses of grain yield reduction in rice under abrupt drought–flood alternation stress. *Physiol. Plant.* **2018**, *167*, 564–584.
- Michaletti, A.; Naghavi, M.R.; Toorchi, M.; Zolla, L.; Rinalducci, S. Metabolomics and proteomics reveal drought-stress responses of leaf tissues from spring-wheat. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–18.
- You, J.; Zhang, Y.; Liu, A.; Li, D.; Wang, X.; Dossa, K.; Zhou, R.; Yu, J.; Zhang, Y.; Wang, L.; et al. Transcriptomic and metabolomic profiling of drought-tolerant and susceptible sesame

- genotypes in response to drought stress. *BMC Plant Biol.* **2019**, *19*, 1–16.
- Nunes, J.D.M.; Bertodo, L.; Da Rosa, L.; Von Poser, G.; Rech, S.B. Stress induction of valuable secondary metabolites in *Hypericum polyanthemum* acclimatized plants. *South Afr. J. Bot.* **2014**, *94*, 182–189.
- Quan, N.T.; Anh, L.H.; Khang, D.T.; Tuyen, P.T.; Toan, N.P.; Minh, T.N.; Minh, L.T.; Bach, D.T.; Ha, P.T.T.; Elzaawely, A.A.; et al. Involvement of Secondary Metabolites in Response to Drought Stress of Rice (*Oryza sativa* L.). *Agriculture* **2016**, *6*, 23.
- Bettaieb, I.; Hamrouni-Sellami, I.; Bourgou, S.; Limam, F.; Marzouk, B. Drought effects on polyphenol composition and antioxidant activities in aerial parts of *Salvia officinalis* L. *Acta Physiol. Plant.* **2011**, *33*, 1103–1111.
- Piasecka, A.; Sawikowska, A.; Kuczyńska, A.; Ogrodowicz, P.; Mikołajczak, K.; Krystkowiak, K.; Gudyś, K.; Guzy-Wróbelska, J.; Krajewski, P.; Kachlicki, P. Drought-related secondary metabolites of barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves and their metabolomic quantitative trait loci. *Plant J.* **2017**, *89*, 898–913.
- Radwan, A.; Kleinwächter, M.; Selmar, D. Impact of drought stress on specialised metabolism: Biosynthesis and the expression of monoterpene synthases in sage (*Salvia officinalis*). *Phytochemistry* **2017**, *141*, 20–26.
- Lawas, L.M.F.; Erban, A.; Kopka, J.; Jagadish, S.V.K.; Zuther, E.; Hinch, D.K. Metabolic responses of rice source and sink organs during recovery from combined drought and heat stress in the field. *GigaScience* **2019**, *8*, 1–15.
- Das, A.; Rushton, P.J.; Rohila, J.S. Metabolomic Profiling of Soybeans (*Glycine max* L.) Reveals the Importance of Sugar and Nitrogen Metabolism under Drought and Heat Stress. *Plants* **2017**, *6*, 21.
- Miura, K.; Furumoto, T. Cold Signaling and Cold Response in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 5312–5337.
- Awasthi, R.; Bhandari, K.; Nayyar, H. Temperature stress and redox homeostasis in agricultural crops. *Front. Environ. Sci.* **2015**, *3*, 1–24.
- Hasanuzzaman, M.; Nahar, K.; Alam, M.; Roychowdhury, R.; Fujita, M. Physiological, Biochemical, and Molecular Mechanisms of Heat Stress Tolerance in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 9643–9684.
- Hatfield, J.L.; Prueger, J.H. Temperature extremes: Effect on plant growth and development. *Weather. Clim. Extremes* **2015**, *10*, 4–10.
- Hemantaranjan, A. Heat Stress Responses and Thermotolerance. *Adv. Plants Agric. Res.* **2014**, *1*, 1–10.
- Sun, C.X.; Gao, X.X.; Li, M.Q.; Fu, J.Q.; Zhang, Y.L. Plastic responses in the metabolome and functional traits of maize plants to temperature variations. *Plant Biol.* **2016**, *18*, 249–261.
- Le Gall, H.; Fontaine, J.-X.; Molinié, R.; Pelloux, J.; Mesnard, F.; Gillet, F.; Fliniaux, O. NMR-based Metabolomics to Study the Cold-acclimation Strategy of Two *Miscanthus* Genotypes. *Phytochem. Anal.* **2017**, *28*, 58–67.
- Paupière, M.J.; Müller, F.; Li, H.; Rieu, I.; Tikunov, Y.M.; Visser, R.G.F.; Bovy, A.G. Untargeted metabolomic analysis of tomato pollen development and heat stress response. *Plant Reprod.* **2017**, *30*, 81–94.
- Wang, Y.; Zeng, X.; Xu, Q.; Mei, X.; Yuan, H.; Jiabu, D.; Nyima, T. Metabolite profiling in two

contrasting Tibetan hullless barley cultivars revealed the core salt-responsive metabolome and key salt-tolerance biomarkers. *AoB Plants* **2019**, *11*, plz021.

Ghassemi, S.; Delangiz, N.; Lajayer, B.A.; Saghafi, D.; Maggi, F. Review and future prospects on the mechanisms related to cold stress resistance and tolerance in medicinal plants. *Acta Ecol. Sin.* **2020**.

Cook, D.; Fowler, S.; Fiehn, O.; Thomashow, M.F. From the Cover: A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 15243–15248.

Wienkoop, S.; Morgenthal, K.; Wolschin, F.; Scholz, M.; Selbig, J.; Weckwerth, W. Integration of Metabolomic and Proteomic Phenotypes. *Mol. Cell. Proteom.* **2008**, *7*, 1725–1736.

Kaplan, F.; Kopka, J.; Haskell, D.W.; Zhao, W.; Schiller, K.C.; Gatzke, N.; Guy, C.L. Exploring the Temperature-Stress Metabolome of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **2004**, *136*, 4.

Wang, L.; Ma, K.B.; Lu, Z.G.; Ren, S.X.; Jiang, H.R.; Cui, J.W.; Jin, B. Differential physiological, transcriptomic and metabolomic responses of *Arabidopsis* leaves under prolonged warming and heat shock. *BMC Plant Biol.* **2020**, *20*, 1–86.

Thomason, K.; Babar, A.; Erickson, J.E.; Mulvaney, M.; Beecher, C.; Macdonald, G. Comparative physiological and metabolomics analysis of wheat (*Triticum aestivum* L.) following post-anthesis heat stress. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0197919.

D'souza, M.R.; Devaraj, V.R. Induction of thermotolerance through heat acclimation in lablab bean (*Dolichos lablab*). *Afr. J. Biotechnol.* **2013**, *12*, 5695–5704.

Hauser, F.; Horie, T. A conserved primary salt tolerance mechanism mediated by HKT transporters: A mechanism for sodium exclusion and maintenance of high K⁺/Na⁺ ratio in leaves during salinity stress. *Plant, Cell Environ.* **2010**, *33*, 552–565.

Šimura, J.; Antoniadi, I.; Široká, J.; Tarkowská, D.; Strnad, M.; Ljung, K.; Novák, O. Plant Hormonomics: Multiple Phytohormone Profiling by Targeted Metabolomics. *Plant Physiol.* **2018**, *177*, 476–489.

Richter, J.A.; Erban, A.; Kopka, J.; Zörb, C. Metabolic contribution to salt stress in two maize hybrids with contrasting resistance. *Plant Sci.* **2015**, *233*, 107–115.

Kissoudis, C.; Kalloniati, C.; Flietakis, E.; Madesis, P.; Labrou, N.E.; Tsiftaris, A.; Naniou-Obeidat, I. Stress-inducible GmGSTU4 shapes transgenic tobacco plants metabolome towards increased salinity tolerance. *Acta Physiol. Plant.* **2015**, *37*, 1–11.

Abdel-Farid, I.B.; Marghany, M.R.; Rowezek, M.M.; Sheded, M.G. Effect of Salinity Stress on Growth and Metabolomic Profiling of *Cucumis sativus* and *Solanum lycopersicum*. *Plants* **2020**, *9*, 1626.

Gong, Q.; Li, P.; Ma, S.; Rupassara, S.I.; Bohnert, H.J. Salinity stress adaptation competence in the extremophile *Thellungiella halophila* in comparison with its relative *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **2005**, *44*, 826–839.

Sanchez, D.H.; Lippold, F.; Redestig, H.; Hannah, M.A.; Erban, A.; Krämer, U.; Udvardi, M.K. Integrative functional genomics of salt acclimatization in the model legume *Lotus japonicus*. *Plant J.* **2007**, *53*, 973–987.

Sanchez, D.H.; Lippold, F.; Redestig, H.; Hannah, M.A.; Erban, A.; Krämer, U.; Kopka, J.; Udvardi, M.K. Comparative Functional Genomics of Salt Stress in Related Model and Cultivated Plants Identifies and Overcomes Limitations to Translational Genomics. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e17094.

Patterson, J.H.; Newbigin, E.; Tester, M.; Bacic, A.; Roessner, U. Metabolic responses to salt

stress of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars, Sahara and Clipper, which differ in salinity tolerance. *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, 4089–4103.

Gupta, P.; De, B. Metabolomics analysis of rice responses to salinity stress revealed elevation of serotonin, and gentisic acid levels in leaves of tolerant varieties. *Plant Signal. Behav.* **2017**, *12*, e1335845.

Richter, J.A.; Erban, A.; Kopka, J.; Zörb, C. Metabolic contribution to salt stress in two maize hybrids with contrasting resistance. *Plant Sci.* **2015**, *233*, 107–115.

Cai, Z.; Chen, H.; Chen, J.; Yang, R.; Zou, L.; Wang, C.; Chen, J.; Tan, M.; Mei, Y.; Wei, L.; et al. Metabolomics characterizes the metabolic changes of *Lonicerae Japonicae Flos* under different salt stresses. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0243111.

Zubair, A.; Nuraini, A.; Qosim, W.A. Effect of salinity stress on shoot *musa acuminata* L. Barangan cultivar in vitro culture. *Pakistan J. Biol. Sci.* **2019**, *22*, 201–205.

Liu, L.; Wang, B.; Liu, D.; Zou, C.; Wu, P.; Wang, Z.; Li, C. Transcriptomic and metabolomic analyses reveal mechanisms of adaptation to salinity in which carbon and nitrogen metabolism is altered in sugar beet roots. *BMC Plant Biol.* **2020**, *20*, 1–21.

Escandón, M.; Valledor, L.; Pascual, J.; Pinto, G.; Cañal, M.J.; Meijón, M. System-wide analysis of short-term response to high temperature in *Pinus radiata*. *J. Exp. Bot.* **2017**, *68*, 3629–3641.

Escandón, M.; Meijon, M.; Valledor, L.; Pascual, J.; Pinto, G.; Cañal, M.J. Metabolome Integrated Analysis of High-Temperature Response in *Pinus radiata*. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 1–15.

Muchate, N.S.; Rajurkar, N.S.; Suprasanna, P.; Nikam, T.D. NaCl induced salt adaptive changes and enhanced accumulation of 20-hydroxyecdysone in the in vitro shoot cultures of *Spinacia oleracea* (L.). *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–10.

Rouphael, Y.; Raimondi, G.; Lucini, L.; Carillo, P.; Kyriacou, M.C.; Colla, G.; Cirillo, V.; Pannico, A.; El-Nakhel, C.; De Pascale, S. Physiological and Metabolic Responses Triggered by Omeprazole Improve Tomato Plant Tolerance to NaCl Stress. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 249.

Mittler, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci.* **2006**, *11*, 15–19.

Møller, I.M.; Jensen, P.E.; Hansson, A. Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2007**, *58*, 459–481.

Nakabayashi, R.; Saito, K. Integrated metabolomics for abiotic stress responses in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2015**, *24*, 10–16.

Noctor, G.; Mhamdi, A.; Chaouch, S.; Han, Y.; Neukermans, J.; Marquez-Garcia, B.; Queval, G.; Foyer, C.H. Glutathione in plants: An integrated overview. *Plant Cell Environ.* **2011**, *35*, 454–484.

Gullner, G.; Kömives, T.; Rennenberg, H. Enhanced tolerance of transgenic poplar plants overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase towards chloroacetanilide herbicides. *J. Exp. Bot.* **2001**, *52*, 971–979.

Gomez, L.D. Regulation of calcium signalling and gene expression by glutathione. *J. Exp. Bot.* **2004**, *55*, 404.

Liedschulte, V.; Wachter, A.; Zhigang, A.; Rausch, T. Exploiting plants for glutathione (GSH)

production: Uncoupling GSH synthesis from cellular controls results in unprecedented GSH accumulation. *Plant Biotechnol. J.* **2010**, *8*, 807–820.

Pascual, J.; Cañal, M.J.; Escandón, M.; Meijón, M.; Weckwerth, W.; Valledor, L. Integrated Physiological, Proteomic, and Metabolomic Analysis of Ultra Violet (UV) Stress Responses and Adaptation Mechanisms in *Pinus radiata*. *Mol. Cell. Proteom.* **2017**, *16*, 485–501.

El Rasafi, T.; Oukarroum, A.; Haddioui, A.; Song, H.; Kwon, E.E.; Bolan, N.; Tack, F.M.G.; Sebastian, A.; Prasad, M.N.V.; Rinklebe, J. Cadmium stress in plants: A critical review of the effects, mechanisms, and tolerance strategies. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **2020**, 1–52.

Mwamba, T.; Islam, F.; Ali, B.; Lwalaba, J.; Gill, R.; Zhang, F.; Farooq, M.; Ali, S.; Ulhassan, Z.; Huang, Q.; et al. Comparative metabolomic responses of low- and high-cadmium accumulating genotypes reveal the cadmium adaptive mechanism in *Brassica napus*. *Chemosphere* **2020**, *250*, 126308.

Liu, Q.; Liu, M.; Wu, S.; Xiao, B.; Wang, X.; Sun, B.; Zhu, L. Metabolomics Reveals Antioxidant Stress Responses of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Exposed to Chlorinated Organophosphate Esters. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 6520–6529.

Ploetz, R. C., & Evans, E. A. The future of global banana production. *Horticultural reviews.* **2015**, *43*, 311-352.

Dale, J.; James, A.; Paul, J.-Y.; Khanna, H.; Smith, M.; Peraza-Echeverria, S.; Garcia-Bastidas, F.; Kema, G.; Waterhouse, P.; Mengersen, K.; et al. Transgenic Cavendish bananas with resistance to *Fusarium wilt* tropical race 4. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1– 8, doi:10.1038/s41467-017-01670-6.

Hamill, S. Processes, costs and traits of plants produced in tissue culture must be considered to develop effective crop production systems. *Acta Horticulturae* **2016**, *1113*, 85–92, doi:10.17660/actahortic.2016.1113.12.

Govindaraju, S.; Arulselvi, P.I. Effect of cytokinin combined elicitors (L-phenylalanine, salicylic acid and chitosan) on in vitro propagation, secondary metabolites and molecular characterization of medicinal herb – *Coleus aromaticus* Benth (L). *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* **2018**, *17*, 435–444, doi:10.1016/j.jssas.2016.11.001.

Valledor, L.; Hasbun, R.; Meijón, M.; Rodríguez, J.L.; Santamaría, E.; Viejo, M.; Berdasco, M.; Feito, I.; Fraga, M.F.; Canal, M.J.; et al. Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Cult. (PCTOC)* **2007**, *91*, 75–86, doi:10.1007/s11240-007-9262-z.

Sahijram, L.; Soneji, J.R.; Bollamma, K.T. Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). *Vitr. Cell. Dev. Biol. Anim.* **2003**, *39*, 551–556, doi:10.1079/ivp2003467.

Abdellatif, K.F.; Hegazy, A.E.; Aboshama, H.M.; Emara, H.A.; El-Shahed, A.A. Morphological and molecular characterization of somaclonal variations in tissue culture-derived banana plants. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* **2012**, *10*, 47–53, doi:10.1016/j.jgeb.2012.05.002.

Israeli, Y.; Reuveni, O.; Lahav, E. Qualitative aspects of somaclonal variations in banana propagated by in vitro techniques. *Sci. Hortic.* **1991**, *48*, 71–88, doi:10.1016/0304-4238(91)90154-q.

Jain, S.M. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* **2001**, *118*, 153–166, doi:10.1023/a:1004124519479.

Bairu, M.W.; Fennell, C.W.; Van Staden, J. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa* AAA cv. 'Zelig'). *Sci. Hortic.* **2006**, *108*, 347–351, doi:10.1016/j.scienta.2006.01.039.

Côte, F.X.; Sandoval-Fernández, J.A.; Marie, P.; Erik, A. Variations in micropropagated bananas and plantains: Literature survey. *Fruits* **1993**, *48*, 15–23.

De Langhe, E.; Vrydaghs, L.; de Maret, P.; Perrier, X.; Denham, T. Why Bananas Matter: An introduction to the history of banana domestication. *Ethnobot. Res. Appl.* **2009**, *7*, 165–177.

De Langhe, E.; Vrydaghs, L.; de Maret, P.; Perrier, X.; Denham, T. Why Bananas Matter: An introduction to the history of banana domestication. *Ethnobot. Res. Appl.* **2009**, *7*, 165–177.

Hapsari, L.; Azrianingsih, R.; Arumingtyas, E.L. Genetic variability and relationship of banana cultivars (Musa l.) from East Java, Indonesia based on the internal transcribed spacer region rDNA sequences. *J. Trop. Biol. Conserv.* **2018**, *15*, 101–120.

Sheidai, M.; Aminpoor, H.; Noormohammadi, Z.; Farahani, F. RAPD analysis of somaclonal variation in banana (*Musa acuminata* L.) cultivar Valery. *Acta Biologica Szegediensis* **2008**, *52*, 307–311.

Khatab, I.; Youssef, M. Micropropagation and Assessment of Genetic Stability of *Musa* sp. cv. Williams using RAPD and SRAP Markers. *Egypt. J. Bot.* **2018**, doi:10.21608/ejbo.2018.3199.1161.

Noceda, C.; Vargas, A.; Roels, S.; Cejas, I.; Santamaría, E.; Escalona, M.; DeBergh, P.; Rodríguez, R.; Sandoval, J.; Canal, M.J.; et al. Field performance and (epi)genetic profile of plantain (*Musa AAB*) clone 'CEMSA 3/4' plants micropropagated by temporary immersion systems. *Sci. Hortic.* **2012**, *146*, 65–75, doi:10.1016/j.scienta.2012.08.007.

Ray, T.; Dutta, I.; Saha, P.; Das, S.; Roy, S. Genetic stability of three economically important micropropagated banana (*Musa* spp.) cultivars of lower Indo-Gangetic plains, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell Tissue Organ Cult. (PCTOC)* **2006**, *85*, 11–21, doi:10.1007/s11240-005-9044-4.

Aremu, A.O.; Plačková, L.; Bairu, M.W.; Novák, O.; Szűčová, L.; Doležal, K.; Finnie, J.F.; Van Staden, J. Endogenous cytokinin profiles of tissue-cultured and acclimatized 'Williams' bananas subjected to different aromatic cytokinin treatments. *Plant Sci.* **2014**, *214*, 88–98, doi:10.1016/j.plantsci.2013.09.012.

Dhanapal, S.; Sathish, D.; Satheesh, P.M. Efficiency of RAPD, SSR and ISSR Markers in Evaluating the Genetic Fidelity for Micro-propagated *Musa Accuminata* Plant Exposed To Coal Extracted Humic Acid and Commercially Available Products. *Int. J. Agric. Sci. Res.* **2014**, *4*, 77–86.

Choudhary, D.; Kajla, S.; Poonia, A.K.; Brar, B.; Surekha; Duhan, J.S. Molecular assessment of genetic stability using ISSR and RAPD markers in in vitro multiplied copies of commercial banana cv. Robusta. *Indian J. Biotechnol.* **2015**, *14*, 420–424.

Nandhakumar, N.; Kumar, K.; Sudhakar, D.; Soorianathasundaram, K. Plant regeneration, developmental pattern and genetic fidelity of somatic embryogenesis derived *Musa* spp. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* **2018**, *16*, 587–598, doi:10.1016/j.jgeb.2018.10.001.

Harrison, B.R.; Wang, L.; Gajda, E.; Hoffman, E.V.; Chung, B.Y.; Pletcher, S.D.; Raftery, D.; Promislow, D.E.L. The metabolome as a link in the genotype-phenotype map for peroxide resistance in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *BMC Genom.* **2020**, *21*, 341–22, doi:10.1186/s12864-020-6739-1.

Mohandas, S.; Ravishankar, K.V. *Banana: Genomics and Transgenic Approaches for Genetic Improvement*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, **2016**; pp. 1–346, doi:10.1007/978-981-10-1585-4.

Nam, K.-H.; Kim, Y.-J.; Moon, Y.S.; Park, I.-S.; Kim, C.-G. Salinity affects metabolomic

profiles of different trophic levels in a food chain. *Sci. Total. Environ.* **2017**, 599–600, 198–206, doi:10.1016/j.scitotenv.2017.05.003.

Mais, E.; Alolga, R.N.; Wang, S.-L.; Linus, L.O.; Yin, X.; Qi, L.-W. A comparative UPLC-Q/TOF-MS-based metabolomics approach for distinguishing *Zingiber officinale* Roscoe of two geographical origins. *Food Chem.* **2018**, 240, 239–244, doi:10.1016/j.foodchem.2017.07.106.

Abdelrahman, M.; Burritt, D.J.; Tran, L.-S.P.; Abdelrahman, M. The use of metabolomic quantitative trait locus mapping and osmotic adjustment traits for the improvement of crop yields under environmental stresses. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2018**, 83, 86–94.

Murashige, T.; Skoog, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* **1962**, 15, 473–497, doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

Vuylsteke, D.R. *Shoot-Tip Culture for the Propagation, Conservation and Exchange of Musa Germplasm*; International Institute of Tropical Agriculture: Ibadan, Nigeria, **1989**.

Neumann, G.; Römheld, V. Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant Soil* **1999**, 211, 121–130, doi:10.1023/a:1004380832118.

Aguiar, N.O.; Olivares, F.L.; Novotny, E.H.; Canellas, L.P. Changes in metabolic profiling of sugarcane leaves induced by endophytic diazotrophic bacteria and humic acids. *PeerJ* **2018**, 6, e5445, doi:10.7717/peerj.5445.

Li, P.; Wang, A.; Du, W.; Mao, L.; Wei, Z.; Wang, S.; Yuan, H.; Ji, R.; Zhao, L. Insight into the interaction between Fe-based nanomaterials and maize (*Zea mays*) plants at metabolic level. *Sci. Total. Environ.* **2020**, 738, 139795, doi:10.1016/j.scitotenv.2020.139795.

Stephens, C.; Christen, B.; Fuchs, T.; Sundaram, V.; Watanabe, K.; Jenal, U. Genetic Analysis of a Novel Pathway for d-Xylose Metabolism in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* **2006**, 189, 2181–2185, doi:10.1128/jb.01438-06.

Klalvraa, S.; Gregersen, N. In vitro studies on the oxidation of medium-chain dicarboxylic acids in rat liver. *ScienceDirect* **1986**, 876, 515–525.

Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2015). *Plant physiology and development* (No. Ed. 6). Sinauer Associates Incorporated.

Krishna, H.; Alizadeh, M.; Singh, D.; Singh, U.; Chauhan, N.; Eftekhari, M.; Sath, R.K. Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *3 Biotech* **2016**, 6, 1–18, doi:10.1007/s13205-016-0389-7.

Riggs, J.W.; Rockwell, N.C.; Cavales, P.C.; Callis, J. Identification of the plant ribokinase and discovery of a role for Arabidopsis Ribokinase in nucleoside metabolism. *J. Biol. Chem.* **2016**, 291, 22572–22582, doi:10.1074/jbc.M116.754689.

Ishida, Y.; Kakibuchi, K.; Kudo, R.; Izumori, K.; Tajima, S.; Akimitsu, K.; Tanaka, K. Effects of rare sugars on growth and disease occurrence in head lettuce. *Acta Hort.* **2012**, 927: 929–934, doi:10.17660/ActaHortic.2012.927.114.

Vázquez, A.M.; Linacero, R. Stress and Somaclonal Variation. In *Plant Developmental Biology—Biotechnological Perspectives*; Springer International Publishing: Berlin/Heidelberg, Germany, **2010**; Volume 2; pp. 45–64.

Hossain, A.; Yamaguchi, F.; Matsuo, T.; Tsukamoto, I.; Toyoda, Y.; Ogawa, M.; Nagata, Y.; Tokuda, M. Rare sugar d-allulose: Potential role and therapeutic monitoring in maintaining obesity and type 2 diabetes mellitus. *Pharmacol. Ther.* **2015**, 155: 49–59, doi:10.1016/j.pharmthera.2015.08.004.

- Ciereszko, I. Regulatory roles of sugars in plant growth and development. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **2018**, *87*, 1–13, doi:10.5586/asbp.3583.
- Mazelis, M. Amino Acid Catabolism. In *Amino Acids and Derivatives*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, **1980**; pp. 541–567.
- Sasaki, G.L.; de Souza, L.M. Mass Spectrometry Strategies for Structural Analysis of Carbohydrates and Glycoconjugates. In *Tandem Mass Spectrometry—Molecular Characterization*; InTech: London, UK, **2013**.
- Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*; John Wiley & Sons: Hoboken, NY, USA, **2000**.
- Scheller, H.V.; Ulvskov, P. Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2010**, *61*, 263–289, doi:10.1146/annurev-arplant-042809-112315.
- Cohen, E., & Merzendorfer, H. (Eds.). *Extracellular sugar-based biopolymers matrices* (Vol. 12). Springer. **2019**.
- Mathews, C.K.; Holde, K.E.; Appling, D.R. *Biochemistry*; Pearson; London, UK, **2013**.
- Bindschedler, L.V.; Tuerck, J.; Maunders, M.; Ruel, K.; Petit-Conil, M.; Danoun, S.; Boudet, A.-M.; Joseleau, J.-P.; Bolwell, G.P. Modification of hemicellulose content by antisense down-regulation of UDP-glucuronate decarboxylase in tobacco and its consequences for cellulose extractability. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 2635–2648, doi:10.1016/j.phytochem.2007.08.029.
- Yang, Y.; Kang, L.; Wu, R.; Chen, Y.; Lu, C. Genome-wide identification and characterization of UDP-glucose dehydrogenase family genes in moso bamboo and functional analysis of PeUGDH4 in hemicellulose synthesis. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–13, doi:10.1038/s41598-020-67227-8.
- Xiao, C.; Anderson, C.T. Roles of pectin in biomass yield and processing for biofuels. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4*, 67, doi:10.3389/fpls.2013.00067.
- Cosgrove, D.J. Growth of the plant cell wall. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 850–861, doi:10.1038/nrm1746.
- Karp, A. Mechanisms of Somaclonal Variation. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **1993**, *7*, 20–25, doi:10.1080/13102818.1993.10818686.
- Mathur, J. Cell shape development in plants. *Trends Plant Sci.* **2004**, *9*: 583–590, doi:10.1016/j.tplants.2004.10.006.
- Vogt, T. Phenylpropanoid Biosynthesis. *Mol. Plant* **2010**, *3*, 2–20, doi:10.1093/mp/ssp106.
- Bais, H.P.; Vepachedu, R.; Gilroy, S.; Callaway, R.M.; Vivanco, J.M. Allelopathy and Exotic Plant Invasion: From Molecules and Genes to Species Interactions. *Science* **2003**, *301*, 1377–1380, doi:10.1126/science.1083245.
- He, M.; He, C.-Q.; Ding, N.-Z. Abiotic Stresses: General Defenses of Land Plants and Chances for Engineering Multistress Tolerance. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 1771, doi:10.3389/fpls.2018.01771.
- Masclaux-Daubresse, C.; Reisdorf-Cren, M.; Pageau, K.; Lelandais, M.; Grandjean, O.; Kronenberger, J.; Valadier, M.H.; Feraud, M.; Jougllet, T.; Suzuki, A. Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco. *Plant Physiol.* **2006**, *140*, 444–456, doi:10.1104/pp.105.071910.
- Van Hengel, A.J.; Tadesse, Z.; Immerzeel, P.; Schols, H.; Van Kammen, A.; De Vries, S.C.

N-Acetylglucosamine and Glucosamine-Containing Arabinogalactan Proteins Control Somatic Embryogenesis. *Plant Physiol.* **2001**, *125*, 1880–1890, doi:10.1104/pp.125.4.1880.

Bull, A.T. Chemical Composition of Wild-type and Mutant *Aspergillus nidulans* Cell Walls. The Nature of Polysaccharide and Melanin Constituents. *J. Gen. Microbiol.* **1970**, *63*, 75–94, doi:10.1099/00221287-63-1-75.

Vroh-Bi, I.; Anagbogu, C.; Nnadi, S.; Tenkouano, A. Genomic characterization of natural and somaclonal variations in bananas (*Musa* spp.). *Plant Mol. Biol. Rep.* **2011**, *29*, 440–448, doi:10.1007/s11105-010-0250-9.

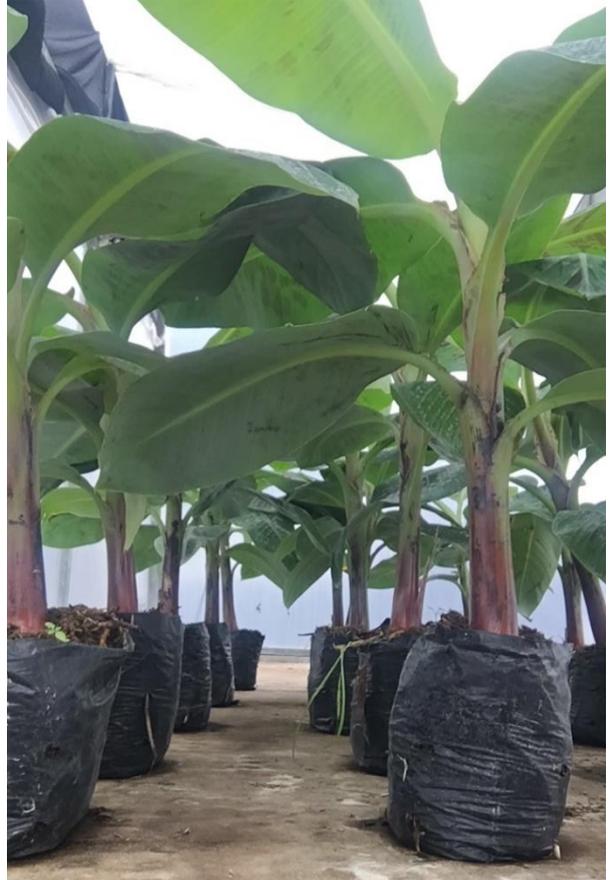
NOTA SOBRE PUBLICACIONES

El desarrollo de la tesis ha generado las siguientes publicaciones en revistas, en las que se basa la presente Memoria:

1. Carrera, FP, Noceda, C., Maridueña-Zavala, MG, García, JA, Ruiz, OH y Cevallos-Cevallos, JM (2021). Cambios en el perfil de metabolitos durante la micropropagación de variantes normales y somaclonales de Banana Musa AAA cv. Williams. *Horticulturae*, 7 (3), 39. doi: <https://doi.org/10.3390/horticulturae7030039>
2. Carrera, FP, Noceda, C., Maridueña-Zavala, MG y Cevallos-Cevallos, JM (2021). La metabolómica, una herramienta poderosa para comprender el estrés abiótico de las plantas. *Agronomía* , 11 (5), 824. doi: <https://doi.org/10.3390/agronomy11050824>

ANEXOS

Plantas normales provenientes de M1



Plantas enanas provenientes de M1



FASE DE ENRAIZAMIENTO



FASE PROLIFERACIÓN



Tabla N° 1 Metabolitos de fase proliferación, subrayados son significativos

Tiempo retención	NOMBRE COMPUESTO	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N10
10,726	Glutamic acid	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,002019593	0	0	0	0
10,864	L-Galactopyranose, 6-deoxy	0,009011193	0	0,007574183	0,011575332	0,008765611	0,008140591	0,019968467	0,008072296	0,006331012	0,009169221	0,009211519	0,009497837	0,008996844	0,006934753	0,008665565	0,008328578	0,007493415	0,009318839	0,005204182	0,008398084
11,067	D-Ribofuranose	0,012556176	0,020269482	0,045433156	0,017553819	0,01372132	0,013864779	0,129945356	0,015688762	0,012169366	0,011680618	0,005075521	0,005339484	0,004755352	0,00298816	0,005358063	0,009276346	0,008812891	0,010564184	0,003680368	0,006747968
11,078	β-DL-Lyxopyranose	0,003599577	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11,488	α-L-Galactofuranose, 6-deoxy	0	0,013687023	0	0,004696597	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11,604	α-L-Mannofuranose, 6-deoxy	0	0,009270481	0	0,006117761	0	0	0,014283493	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12,389	1,4-Piperidinedicarboxylic acid	0	0	0,016852484	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12,578	Ribitol	0,052507481	0,052280817	0,043462021	0	0	0,008516504	0,06704339	0,02909241	0,029803011	0,00621873	0,04411192	0,041470262	0,041213685	0,039021662	0,028172607	0,027000255	0,006781513	0,007287451	0	0,024922834
13,08	L-Glutamine	0,509840637	0,424136419	0,415839982	0,662424524	0,780019758	0,552165904	0	0,618316952	0,651824841	0,678043247	0,519057282	0,451928944	0,548267431	0,616973063	0,559526097	0,632699613	0,704285541	0,644952675	0,678334472	0,699251198
13,234	L-(+)-Rhamnopyranose	0	0	0,007128227	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13,713	2-Pentenedioic acid	0	0	0	0	0	0	0,010637082	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13,725	β-D-Fructopyranose	0	0	0	0,012776743	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13,726	α-D-Galactopyranuronic acid	0,013102092	0	0,017350212	0	0	0	0	0	0	0	0,006797596	0,005452785	0,005177532	0,00605147	0,003324681	0,002908304	0	0	0	0
13,731	D-Psicofuranose	0,013555486	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13,948	Arabinonic acid, 1,4-lactone	0	0	0,007650233	0	0,009393309	0,01006286	0,026148719	0,006703068	0,007063896	0,009562592	0	0	0,004659645	0,004220295	0	0	0	0	0	0,006624873
13,959	Sebacic acid	0,012599286	0,016912837	0	0,006311039	0,005581197	0,004207659	0	0,005651365	0,003786427	0	0,004798238	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14,131	D-(-)-Fructofuranose	0,024845698	0,06812916	0,039176193	0,019145716	0,011796574	0,004980184	0,076767658	0,018836743	0,012746668	0,022970022	0,024149193	0,041630107	0,024765827	0,016804112	0,017177215	0,016530876	0,011285968	0,02286867	0,030221027	0,009659252
14,453	Fructopyranose	0,053683099	0,11340304	0,066253325	0,026844126	0,015661845	0,107309469	0,14296733	0,036248058	0,01712261	0,039684264	0,043165337	0,05822584	0,042889683	0,029871057	0,023970688	0,028674149	0,026577503	0,042574167	0,050990238	0,015876559
14,752	1,2,3-Propanetricarboxylic acid	0,032475023	0,06484505	0,044639684	0	0	0,044673245	0,106343803	0,048331143	0,031927263	0,039349155	0,035895848	0,066388079	0,050546737	0,027691793	0,061272612	0,034382588	0,025751738	0,033863179	0,010869128	0,027835018
15,64	Gulonic acid	0,018951802	0,03856986	0	0,01657395	0,013675622	0,015746127	0	0	0	0	0,015955461	0,024477156	0,016840831	0,015817389	0,015274517	0,017567238	0,015751278	0,020523523	0,005882848	0,017006856
15,827	β-D-Galactofuranose	0,016657015	0,054766807	0	0	0	0	0	0,003675601	0,00209419	0,003544736	0,001994605	0,003182467	0	0	0,003210033	0,002824726	0	0,00377598	0,012555157	0,013159438
16,189	Undecanedioic acid	0,014337607	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16,351	Propanoic acid	0	0	0	0,03249231	0,020638006	0	0	0	0	0	0,044593913	0,02907279	0,037616365	0,022943028	0,040982668	0	0	0	0	0
17,273	D-Mannitol	0	0,008525378	0,007493277	0	0	0	0	0	0	0,00550154	0,004183036	0	0	0	0	0	0,002933585	0	0	0
17,639	Glucosufuranoside, methyl	0	0	0,011632631	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17,836	α-D-Glucopyranoside, methyl	0,029174188	0,043708345	0,021515329	0	0,002464449	0	0	0,028690349	0,009993291	0	0,011271044	0,010497176	0,008657246	0,002965513	0,009689587	0,01687142	0,018203226	0,019805925	0	0
18,129	Phenylalanine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00218164	0,002136553	0	0,00232546	0	0	0	0,003444929
18,277	Heptadecane, 2-methyl	0	0,04944344	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18,472	Dihydroxyacetone	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,007790675	0	0	0	0	0	0	0
18,5	D-Glucose, 2-amino-2-deoxy	0,012670813	0	0,046683178	0,037627556	0,026999725	0,036813303	0,077394684	0,029316801	0,025829906	0,044845021	0,044107874	0,051158521	0,043291399	0,042008511	0,04641189	0,041987073	0,030957941	0,035985642	0,017651239	0,028032332
18,563	α-D-Galactopyranoside, methyl	0	0	0,004010571	0	0	0,010985013	0	0	0	0	0	0	0	0	0,001840498	0	0	0	0	0
18,574	D-Galactose, 2-deoxy	0,012449912	0	0,050874342	0,042473909	0,026703168	0,043352566	0,097141667	0,035621052	0,150328947	0,040148444	0,048079231	0,056482848	0,043117216	0,039025606	0,045101374	0,038311689	0,03234576	0,005626462	0,009519042	0,030203683
19,34	L-phenylalanine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,004513719	0,002623149	0,007427467
19,343	L-Methionine	0	0	0,005512205	0	0	0	0	0	0	0,007049494	0	0	0	0	0	0,005627595	0	0	0	0
19,479	α-D-Mannopyranoside	0	0	0,004087894	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20,249	β-D-Galactopyranoside	0	0	0,00293945	0	0	0	0	0	0	0	0,003074709	0,00285267	0	0	0	0	0	0,004569544	0	0,002520596
20,429	D-Galactose, 2-amino-2-deoxy	0,027205064	0,054667178	0,040555572	0,032590348	0,05015856	0,104274676	0,047975376	0	0,045330533	0,047651882	0,053590273	0,047961601	0,041582096	0,038749194	0,049484827	0,044125341	0,053457787	0,014342283	0,036918326	0,004400817
21,531	D-Fructose	0,003204867	0	0,020125974	0,016234114	0,005554166	0,066803252	0,057445235	0,012077935	0,008925427	0,004249172	0,014838324	0,015617934	0,00954332	0,007420235	0,011257666	0,009193744	0,006447747	0,004455469	0,001655961	0,004400817
21,538	D-Glucose	0,060767963	0,016282949	0,003464572	0,002850922	0,002589698	0	0,009814341	0,018077077	0,007837512	0,007422988	0,019291183	0,018997825	0,018578816	0,012842465	0,011006017	0,010359322	0,009494507	0,016846333	0,134619897	0,00531201
21,812	L-(-)-Sorbosose	0	0	0	0,00641815	0,004856061	0,009318104	0	0,006993976	0,007223389	0,009722592	0,006957214	0,009834395	0,004173925	0,010327964	0,01308805	0	0,010783993	0,011158891	0,006191006	0,011099814
21,823	Mucic acid	0,009744655	0	0,016568122	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,011767939	0	0	0	0
22,213	Altronic acid	0	0	0	0	0	0	0,011346081	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

22,216	β-D-Galactofuranoside	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,003635243	0	0	0	0
22,222	D-(+)-Talofuranose	0,004034401	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22,446	Gluconic acid	0	0	0	0,003147447	0,002972373	0	0,00362423	0,002695762	0,00274525	0	0	0	0	0	0,003163658	0	0	0	0	0	0	0
22,454	D-Gluconic acid	0,003429224	0	0,003965078	0,002424554	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,002633636	0,003145878	0,003029236	0,001317375	0,002799105	0	0
24,958	N,N,O,O'-normetanephine	0	0	0	0	0	0	0	0,006799394	0	0	0	0	0	0	0,004072247	0	0	0	0	0	0	0
25,474	β-L-Arabinopyranose	0,003553779	0	0,005641709	0,003872768	0,004219216	0,003554987	0,010224462	0,005301288	0,005269391	0,005344573	0,009884633	0,008892457	0,008993568	0,011476058	0,015663022	0,005573316	0,006315228	0,00847798	0,003067142	0,010472271	0	0
26,118	2-Keto-d-gluconic acid	0	0	0,012057233	0,009233019	0,00534328	0,008787076	0,027268543	0,009097167	0,005701043	0,007417808	0,011791672	0,011775415	0,005417862	0,009023526	0,009388835	0,008032796	0,009313153	0,01004559	0,001913624	0,007393634	0	0
26,128	D-Gluconic acid	0,005025834	0	0,004060428	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28,559	D-(+)-Galacturonic acid	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,004649401	0,00354293	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33,254	D-Galactose	0	0	0	0	0,00336577	0,008572459	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
51,136	Linolenic acid	0	0	0	0,004704144	0,002912627	0	0	0,003958582	0	0	0	0,002733045	0,002172548	0,002067526	0,004245468	0	0	0	0,001332932	0	0	0
52,405	α-D-Galactopyranose	0,041017128	0	0,021909124	0	0	0	0,001850374	0,001326046	0	0,019413365	0,017358761	0,01239025	0,029807163	0,019372149	0,015618917	0,01555855	0,026298756	0,00802893	0,020492935	0	0	0
52,742	Octadecanoic acid	0	0,01429429	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla Nº 2 Metabolitos de fase enraizamiento, subrayados son significativos

Tiempo retención	NOMBRE COMPUESTO	D 1	D 2	D 3	D 4	D 5	D 6	D 7	D 8	D 9	D 10	N 1	N 2	N 3	N 4	N 5	N 6	N 7	N 8	N 9	N 10
11,494	β-L-Mannofuranose, 6-deoxy	0,014051299	0	0	0,017929897	0,018569976	0,02729707	0	0,02590598	0,01147983	0	0	0,009226373	0,008852693	0,010538332	0,009394292	0	0,011325579	0,010939793	0,009696516	0,010087262
12,536	Ribitol	0,010679954	0	0,015487673	0	0	0	0	0	0,025046482	0,008924852	0	0,010241758	0,017065634	0	0,013657744	0	0,008789678	0,012244035	0	0
12,979	L-Glutamine	0,142677858	0,543263645	0,450376048	0	0	0	0,501623721	0	0,476471228	0,501135066	0,564219651	0,140276467	0,252233319	0,022530607	0,169030995	0,15169863	0,236781296	0,415511171	0,221739962	0
13,112	D-Psicofuranose	0,035096713	0,012305547	0,015458476	0,043043561	0,02403459	0,046248416	0,021450484	0,066801097	0,032159781	0,01873381	0,002424468	0,016997797	0,015405695	0,020807444	0,018796698	0,029986785	0,021465697	0,014016377	0,013981462	0,014228996
13,182	L-(+)-Rhamnopyranose	0,010583874	0	0,006048812	0	0	0	0	0	0	0	0	0,005911389	0	0	0	0	0	0,007672666	0	0,006150591
13,759	D-Arabinonic acid	0	0	0	0	0,006143404	0	0	0	0	0	0	0,001308041	0,00148801	0	0	0	0	0	0	0
14,074	D-(-)-Fructofuranose	0,037115166	0,012582934	0,011362695	0,047370225	0,055132799	0,025506129	0,03209072	0,061454128	0	0,018847766	0,039168745	0,092909163	0,065905202	0,099529849	0,039698143	0,095312461	0,099485116	0,069051161	0,046443789	0,067448657
14,392	D-Fructose	0,080943135	0,021481616	0,010824545	0,084157154	0,097320295	0,047159556	0,045438617	0,109936687	0,005673939	0,030001533	0,06373898	0,136172346	0,121187126	0,161157441	0,061541998	0,148073639	0,152484219	0,094996064	0,074574574	0,109586355
14,674	1,2,3-Propanetricarboxylic acid	0,057782054	0,049797634	0,052873595	0,056309424	0,058056257	0,070443871	0,044128602	0,09271837	0,089983148	0,042582943	0,02144152	0,036832046	0,038264252	0,024615548	0,04309374	0,02851572	0,035470289	0,046965171	0,019891568	0,022006439
15,573	Gulonic acid	0,018030016	0,012768269	0,020425532	0,020429869	0,018254783	0,042496751	0	0	0,026428488	0,014187399	0,007035449	0,00992706	0,015763625	0,016393958	0,026029621	0,019453439	0,013441886	0,013820064	0,01273479	0,014994889
15,662	β-D-Galactofuranose	0,011813657	0,01082603	0,010578434	0,013229931	0,015714274	0,012657213	0	0	0,014698815	0,019826655	0,006773847	0,015181188	0,015052777	0,005508961	0,005875171	0,009767354	0,017376364	0,026785237	0,004762018	0,126216748
16,138	Propanoic acid	0	0,021236317	0,085686053	0,101865352	0,101541347	0	0	0	0,046721729	0	0	0	0	0,028117804	0	0	0	0	0	0
17,207	D-Mannitol	0,030972335	0,011903836	0,019620209	0,035374798	0,023054652	0,028469024	0,014475336	0,037040664	0	0	0,01031224	0,016321213	0,025173704	0,029054365	0,02987301	0,024426319	0,019632782	0	0	0
17,396	L-(-)-Sorbitose	0,270844754	0,086826922	0,107087407	0,205534033	0,17988235	0,181257049	0,103309716	0,248633905	0,094483305	0,085510535	0,077957125	0,103603962	0,141273758	0,180705361	0,134144906	0,143622985	0,142868441	0,120672101	0,098678964	0,102738606
13,793	α-D-Galactopyranuronic acid	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,005112614	0	0	0	0,001303032	0
18,512	D-Galactose, 2-deoxy	0,046254958	0,031858722	0,037050328	0,060209125	0,08778107	0,080275847	0,040572989	0,076088716	0,030372628	0,030104239	0,064895702	0,126274237	0,091092809	0,136711682	0,085875531	0,103418017	0,1085697	0,119698012	0,137840607	0,129083207
19,257	L-phenylalanine	0	0,006339243	0	0	0	0	0,009020773	0	0,014865812	0	0	0	0	0	0,014491598	0	0	0	0	0
19,408	β-D-Galactopyranoside, methyl	0,034965792	0,014191024	0,00925809	0,044055723	0,014438869	0	0	0,023012943	0,025979429	0	0,003765403	0,010227647	0,021171201	0,012478905	0,013584576	0,013097573	0,006426655	0,010773856	0,010343677	0,012674458
20,356	D-Galactose, 2-amino-2-deoxy	0,052233137	0,050681537	0,046759841	0,074762769	0,090102661	0,106639386	0	0,100537877	0	0,02770811	0,068207594	0,103703888	0,096068116	0,111472312	0,097753656	0,086485383	0,082190709	0,093182966	0	0,103847645
21,045	D-Ribofuranose	0,014769692	0,023366035	0,014096294	0,021621254	0	0,021730692	0,024098688	0,014402751	0,027630211	0,003819162	0,011041011	0,015422315	0,0209799	0,060804725	0,011520665	0	0	0	0	0
21,472	D-Galactose	0,014725173	0,008914241	0,007845771	0,025647935	0,052781095	0,022582902	0	0,025217899	0	0,017878735	0,006745881	0	0	0	0,012758583	0,018727543	0,044346066	0,018333035	0	0,008362618
25,406	β-L-Arabinopyranose	0	0	0	0	0	0	0	0,102907596	0,058079948	0	0,008258308	0,038545815	0,032283298	0,048734088	0,041392623	0,065958659	0,051779459	0,045028334	0,054742005	0
25,416	2-Keto-d-gluconic acid	0,068550753	0,049445517	0,03713096	0,079092242	0,097671976	0,120158464	0,069740693	0	0,008349798	0,054025453	0,014352418	0,006923606	0	0,02721621	0	0	0	0,02143346	0	0,020341478
25,603	N,N,O'-normetanephine	0,005743793	0,004910768	0	0,011355333	0,012296158	0,032415899	0,022260884	0	0	0,006331139	0	0,01065986	0,006503735	0,015144448	0,007019527	0	0,011426185	0,008447071	0,032761389	0,008879245
35,368	α-D-Galactopyranose	0,017700918	0,014264412	0,00898795	0,019159916	0,012699654	0,046280497	0,013947888	0	0,039180734	0,016465989	0,029661657	0,071467791	0,014235145	0,009908735	0,005656407	0	0,008327622	0,006214698	0,008383717	0,010488637
		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla Nº 3 Metabolitos de fase aclimatación II, subrayados son significativos

UI	Nombre Metabolito	D 1	D 2	D 3	D 4	D 5	D 6	D 7	D 8	D 9	N 1	N 2	N 3	N 4	N 5	N 6	N 7	N 8	N 9
10,667	<u>α-D-Galactopyranose</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,003947386	0	0	0	0	0	0	0	0
10,87	<u>L-Galactopyranose, 6-deoxy</u>	0	0	0	0	0	0,001431099	0	0	0	0,002070199	0,003685303	0,002888992	0,003602084	0,001842	0,001876617	0,002376976	0,002282853	0,002163116
11,248	<u>β-D-Galactopyranoside</u>	0,004952417	0,041249177	0,023684581	0,030065226	0,090166928	0,009431405	0,017662399	0,004724959	0,034568495	0,007488099	0,023977384	0,029738528	0,023996113	0,006890148	0,02147174	0,019870354	0,010476915	0,015628074
11,544	<u>D-Galactose, 2-deoxy</u>	0,004576997	0,057822051	0,042876499	0	0	0,053052244	0,032992694	0,040696658	0,157893021	0	0,376530614	0,05676195	0,043636935	0,014682732	0,028641212	0,042307283	0,01569887	0,056692687
12,399	<u>2-Dimethyl</u>	0,000402771	0	0	0	0	0	0	0	0	0,000458507	0,001253419	0	0,001712646	0,000747437	0	0	0	0
12,595	<u>Ribitol</u>	0,005800977	0,035579906	0,028801331	0	0	0,011279529	0	0,008083483	0,060081045	0,007004924	0,035716336	0,00814851	0,007643322	0,005034669	0,005362436	0,00624263	0,005042146	0,006173964
12,82	<u>L-(+)-Rhamnopyranose</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,000358231	0	0	0	0	0,000454646	0	0	0
13,044	<u>L-Glutamine</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,035716336	0,054279309	0	0	0,021718527	0	0,014383742	0,054780821
13,083	<u>D-(-)-Tagatofuranose</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00271466	0	0	0,007611759	0	0	0	0	0
13,244	<u>L(-)-Sorbosose</u>	0,001496756	0,005504512	0,002016518	0,027198509	0,002404056	0,001529086	0,017175712	0	0,005626671	0,007033269	0,009366195	0,009259882	0,003113648	0,006996486	0,008174227	0,009148104	0,007251149	0,008955199
13,65	<u>L(-)-Sorbofuranose</u>	0,151786958	0,098305062	0,093993346	0	0	0,07372867	0,085371935	0,181339983	0,219372445	0,127125965	0,078428537	0,115950003	0,136574332	0,135343432	0,143585587	0,134188378	0,145337529	0,132272422
13,733	<u>2-Keto-d-gluconic acid</u>	0,014948797	0,058517215	0,04790637	0,18843467	0,033751461	0,003986746	0,197313206	0,018683485	0,104427644	0,014064327	0,029235833	0,023781348	0,038491222	0,012891077	0,025404092	0,033415539	0,017006497	0,025554559
14,469	<u>D-(-)-Fructofuranose</u>	0,538589679	0,435514847	0,578083499	0	0,758773659	0,686191427	0,345949162	0,473529093	0	0,47209463	0,291677447	0,39262717	0,472265558	0,444373211	0,449958084	0,44158066	0,493086421	0,396200858
15,646	<u>Gulonic acid</u>	0,002649271	0	0,023637812	0	0	0,007933165	0,008113672	0	0,0309906	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15,733	<u>β-D-Galactofuranose</u>	0,02857923	0,011774216	0,013985112	0	0	0,012566467	0,017244493	0,03309276	0,056790649	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17,189	<u>D-Fructose</u>	0,020002241	0,081102608	0,037758317	0	0,035821835	0,057631886	0,070581873	0,066046683	0,188753626	0,030822521	0,043363624	0,073444465	0,073551065	0,038309531	0,07791774	0,042933806	0,068590018	0,079911813
17,556	<u>Mannose</u>	0,003089493	0	0	0	0	0,007092472	0,006224429	0,030978755	0,059406941	0,118426165	0,033689839	0,040607427	0,046233064	0,089531283	0,048441647	0,054436721	0,057152463	0,04008552
18,723	<u>Aspartic acid</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,001649248	0	0	0	0	0	0	0	0
19,365	<u>L-phenylalanine</u>	0,001397518	0,02722402	0,024529943	0,148741085	0	0,022562798	0,00659739	0	0	0	0,006008707	0,01144461	0,003378065	0,001264907	0,004986209	0	0	0
19,485	<u>α-D-Galactopyranoside</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,001868348
19,555	<u>D-Galactose, 2-amino-2-deoxy</u>	0,024299597	0	0	0	0	0,140728503	0,056408826	0	0,011218869	0,002809667	0,082486786	0,073871466	0,035494498	0,047976079	0,070200726	0,032208477	0,077149968	
19,784	<u>Glycoside</u>	0	0	0	0	0	0,002317234	0,057612805	0	0	0,000967084	0,002732051	0,003321795	0,00050784	0,001608646	0,001133555	0,000955204	0,000897407	
20,784	<u>D-Ribofuranose</u>	0	0,002365266	0	0	0,011661738	0,002589849	0	0,0022886	0,005667605	0,000528416	0,004296627	0,000938285	0,004137835	0,000416043	0,003184279	0,003410486	0,000833777	0,003908883
21,543	<u>D-Galactose</u>	0,074714151	0,026778346	0,038532031	0,26354919	0,053087738	0,033445532	0,031366285	0	0,164652464	0	0,053228546	0	0,180120535	0,072617472	0,104174322	0,095744744	0,055236534	
23,142	<u>D-Allofuranose</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,000352892	0	0	0
23,789	<u>Hexopyranose</u>	0,000329435	0	0	0	0	0	0	0,001097266	0	0	0	0	0,000460776	0,000248476	0,000539609	0,000394182	0,000211789	0,000568898
24,603	<u>D-(-)-Fructofuranose</u>	0,007358375	0	0	0	0	0,010214945	0,011260161	0,02717378	0,012774573	0,011583271	0,01130697	0,025034305	0,007294282	0,007350796	0,009952829	0,010281279	0,011294936	
26,301	<u>α-D-Glucopyranoside, methyl</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,000847166	0,000687648	0,000594957	0,000719556	0,001331847	0,000771317	0,000833707	0,000895003	0,000783097
28,127	<u>D-(+)-Galacturonic acid</u>	0,000536518	0,007024079	0,003826548	0,030214597	0,012195014	0,001930915	0,003276137	0,016433165	0	0,001997726	0,004520078	0,000723571	0	0	0	0	0	0,003205897
30,414	<u>L-Tryptophan</u>	0	0	0,010824841	0	0	0,007954164	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30,781	<u>9,12-Octadecadienoic acid</u>	0	0	0,024714097	0,311796723	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31,036	<u>11-cis-Octadecenoic acid</u>	0,025025792	0,10634962	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32,806	<u>Glucopyranoside</u>	0	0	0	0	0	0	0	0,004355556	0	0	0	0	0,001248741	0,000680428	0	0,001609588	0	0
37,619	<u>Adipic acid</u>	0,080851719	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38,968	<u>d-Glucitol</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,001561242
39,82	<u>Uridine</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,006595897	0,005395956	0,009214221	0,010217442	0,006938972	0,00792694	0,006614232	0,010217618	0
41,066	<u>N-Acetyl glucosamine</u>	0,008611306	0,004889075	0,004829155	0	0,002137572	0,00759346	0,008215153	0,00653079	0,032814312	0,008124483	0,003612445	0,015585137	0,018915476	0,009060167	0,019679203	0,015195922	0,012343508	0,025105756
		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1