



Universidad
de Alcalá

Departamento de Ciencias de la Vida
Unidad Docente de Ecología

**ESTUDIO DEL EFECTO DEL PORTAINJERTO EN LA
RESPUESTA DE *PINUS PINASTER* AIT. A LA SEQUÍA
EMPLEANDO UN ENFOQUE MULTIDISCIPLINAR**

Miriam López Hinojosa
Tesis Doctoral
2021

DANI. S. MÍNGUEZ.



ÍNDICE

Listado de abreviaturas.....	7
RESUMEN.....	12
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	16
• Cambio climático: sequía en la región mediterránea y adaptación de las especies forestales.....	17
• <i>Pinus pinaster</i> : conífera de alto interés ecológico, económico y científico.....	19
• Mecanismos adaptativos de respuesta a sequía en especies forestales.....	23
• Estudio multidisciplinar de respuesta a sequía: respuesta (epi) genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica.....	25
• Percepción del déficit hídrico y mecanismos de respuesta a nivel transcripcional.....	28
• Respuesta a déficit hídrico desde el punto de vista de la metabolómica.....	31
• Sistemas de propagación vegetativa en especies forestales.....	34
• El injerto como estrategia para mejorar la tolerancia a sequía.....	36
• Hipótesis de la tesis, objetivos y estructura.....	38
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
• Material vegetal.....	43
○ Obtención de râmets.....	43
○ Genotipos seleccionados para los diseños experimentales.....	44
• Diseños experimentales.....	46
• Extracción de ARNs, preparación de las bibliotecas de ADNc y análisis ARN-Seq.....	48
• Procesamiento de secuencias y análisis de expresión diferencial.....	50
• Validación de los datos de expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).....	53
• Extracción de metabolitos.....	55
• Análisis de metabolitos por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), cromatografía de líquidos-detector de diodo array (HPLC-DAD) y análisis estadístico.....	57
CAPÍTULO III: RESULTADOS.....	60
• Estudio de los genes expresados diferencialmente en plantas de <i>Pinus pinaster</i> sometidas a estrés hídrico: análisis del transcriptoma de acículas, tallos y raíces de genotipos que muestran distinto grado de tolerancia a sequía.....	61
○ Secuenciación y generación de un transcriptoma de referencia mejorado de <i>Pinus pinaster</i> (PpDR).....	62
○ Mapeo e identificación de genes con expresión diferencial	65

- Clasificación funcional de los genes expresados diferencialmente en raíces, tallos y acículas de pinos sometidos a déficit hídrico.....68
- Análisis funcional de los genes expresados constitutivamente en raíces, tallos y acículas de plantas control.....72
- Validación de los resultados obtenidos en el análisis ARN-Seq mediante RT-qPCR.....74
- Estudio del efecto del portainjerto en la expresión genética de la púa en injertos de *Pinus pinaster* sometidos a estrés hídrico.....76
 - Análisis funcional de los genes expresados diferencialmente en acículas de púas injertadas en portainjertos sensibles y tolerantes a la sequía en condiciones control.....78
 - Genes expresados diferencialmente entre acículas de las púas de cada progenitor injertadas en los portainjertos sensibles y tolerantes a la sequía: análisis del efecto del portainjertos en los injertos de *Pinus pinaster* en condiciones control.....80
 - Genes expresados diferencialmente entre acículas de las púas de ambos progenitores injertadas sobre portainjertos sensibles o tolerantes: análisis del efecto de la púa en los injertos de *Pinus pinaster* en condiciones control.....85
 - Validación del análisis ARN-Seq empleando RT-qPCR.....93
 - Análisis funcional de los genes expresados diferencialmente en acículas de plantas injertadas sometidas a déficit hídrico.....94
 - Genes expresados diferencialmente en acículas de las púas de cada progenitor injertadas en los portainjertos sensibles y tolerantes a la sequía: análisis del efecto de los portainjertos en la respuesta de los injertos de *Pinus pinaster* al estrés hídrico.....96
 - Genes expresados diferencialmente entre acículas de las púas de ambos progenitores injertadas sobre portainjertos sensibles o tolerantes a la sequía: análisis del efecto de la púa en la respuesta de los injertos de *Pinus pinaster* al estrés hídrico.....103
 - Genes expresados diferencialmente entre acículas de las púas de los progenitores injertados sobre portainjertos sensibles o tolerantes a la sequía al comparar injertos control frente a injertos sometidos a estrés hídrico.....110
 - Identificación de genes expresados constitutivamente en acículas de injertos de *Pinus pinaster*.....119
- Efecto del portainjerto sobre los patrones metabólicos de plantas injertadas de *Pinus pinaster* en respuesta a estrés hídrico.....123
 - Distribución de terpenos en plantas injertadas control.....124
 - Distribución de terpenos en acícula, raíz y tallo plantas injertadas sometidas a déficit hídrico.....128
 - Análisis del metaboloma en acícula de plantas injertadas en condiciones control.....131
 - Cambios en el metaboloma de acículas de plantas injertadas sometidas a déficit hídrico133

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN.....	142
• Análisis de la acumulación diferencial de transcritos en genotipos tolerantes y sensibles de <i>Pinus pinaster</i> en respuesta a estrés hídrico a nivel de órgano.....	143
• Análisis del efecto del portainjerto sobre la expresión génica de la púa en plantas injertadas de <i>Pinus pinaster</i> en respuesta a déficit hídrico.....	152
○ Estudio de los transcriptomas de las acículas de los injertos en condiciones control.....	152
○ Estudio de los transcriptomas de las acículas de los injertos en respuesta a estrés hídrico	159
• Análisis del efecto del portainjerto sobre el perfil metabólico de la púa en plantas injertadas de <i>Pinus pinaster</i> en respuesta a déficit hídrico.....	175
• Análisis integrado de la respuesta de los injertos de <i>Pinus pinaster</i> al déficit hídrico	186
CAPITULO V: CONCLUSIONES.....	192
CAPITULO VI : REFERENCIAS.....	197
CAPITULO VII: AGRADECIMIENTOS.....	242

ABREVIATURAS

ABA: Ácido abscisico (del inglés *Abscisic Acid*).

ADN: Ácido desoxiribonucleico.

ADNc: ADN complementario.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNr: ARN ribosómico.

ARN-seq: Secuenciación de ARN (*RNA sequencing*).

BR: Brasinosteroides.

ChIP-seq: Secuenciación de cromatina inmunoprecipitada (del inglés *Chromatin Immunoprecipitation Sequencing*).

CK: Citoquina (del inglés *Cytokine*).

Ct: Ciclo de umbral

CV: Validación cruzada.

DRAs: Ácidos resínicos (del inglés *Diterpene Resin Acids*).

DSN: Nucleasa específica de heterodúplex (del inglés *Duplex-Specific Nuclease*).

DTs: Diterpenos neutros (del inglés *Diterpene*),

EC: Comisión de enzimas (del inglés *Enzyme Commission*).

ET: Etileno.

F1: Primera generación filial (del inglés *First filial generation*).

FC: Tasa de cambio de la expresión diferencia (del inglés *Fold Change*).

FT: Factores de Transcripción.

FDR: Tasa de descubrimientos falsos (del inglés *False Discovery Rate*).

GA: Giberelinas.

GC: Cromatografía de gases (del inglés *Gas Chromatography*).

GED: Gen Expresado Diferencialmente.

GO: Ontología genética (del inglés *Gene Ontology*).

Gpb/C: Giga pares de bases/ copia del genoma haploide

GSEA: Análisis funcional de enriquecimiento de conjuntos de genes (del inglés *Gene Set Enrichment Analysis*).

GWAS: Estudios de asociación de genoma completo (del inglés *Genome Wide Association Studies*).

HPLC-DAD: Cromatografía de líquidos-detector de diodo array (del inglés *High Pressure Liquid Chromatography- Diode Array Detector*).

IAA: ácido 3-indolacético (del inglés *3-Indolacetic acid*).

InDels: Inserciones- delecciones (Insertions–Deletions).

JA: Ácido jasmónico (del inglés *Jasmonic acid*).

KEGG: Enciclopedia Kyoto de genes y genomas (del inglés *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)

Kmers: Subcadenas de secuencias de nucleótidos de longitud k (del inglés *substrings of length K*).

Kpb: Kilo pares de bases.

LC: Cromatografía de líquidos (del inglés *Liquid Chromatography*).

LEA: Proteína de embriogénesis tardía (del inglés *Late Embryogenesis Abundant*).

lncARNs: ARN largo no codificante (del inglés *Long noncoding RNAs*).

MeDIP-seq: Secuenciación de ADN metilado inmunoprecipitado (del inglés *Methylated DNA Immunoprecipitation Sequencing*).

MS: Espectrometría de masas (del inglés *Mass Spectrometry*).

MSTFA: N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamida.

MTs: Monoterpenos (del inglés *Monoterpenes*).

m/z: relación masa-carga (del inglés *mass divided by charge number*).

ncARNs: ARN no codificante (del inglés *noncoding RNAs*).

NGS: Secuenciación de nueva generación (del inglés *Next Generation Sequencing*).

NMR: Resonancia magnética nuclear (del inglés *Nuclear Magnetic Resonance Imaging*).

OPLS-DA: Análisis discriminantes de mínimos cuadrados parciales ortogonales (del inglés *Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis*).

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *Polymerase Chain Reaction*).

PoliA: Poli-adenina.

PPFD: Densidad de flujo de fotones fotosintéticamente activos (del inglés *Photosynthetic Photon Flux Density*).

PLS-DA: Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (del inglés *Partial least squares-discriminant analysis*).

PS-II: Fotosistema II (del inglés *Photosystem II*).

p/v: peso /volumen

Q: Factor de calidad (del inglés *Quality factor*).

-QQQ: Triple cuadrupolo (del inglés *Triple quadrupole*).

qPCR: PCR cuantitativa (del inglés *quantitative Polymerase Chain Reaction*).

QTL: Loci de caracteres cuantitativos (del inglés *Quantitative Trait Loci*).

QTOF: Cuadrupolo-tiempo de vuelo (del inglés *Quadrupole Time-of-Flight*).

RIN: Número de integridad de ARN (del inglés *RNA Integrity Number*).

ROS: Especie reactiva de oxígeno (del inglés *Reactive Oxygen Species*).

RQ: Cuantificación relativa.

RTlock: Modo de bloqueo del tiempo de retención (del inglés *Retention Time Locking*).

RT-qPCR: PCR cuantitativa con transcriptasa inversa (del inglés *quantitative Reverse Transcription PCR*).

SA: Ácido salicílico (del inglés *Salicylic Acid*).

SL: Estringolactonas.

SNPs: Polimorfismos de nucleótido único (del inglés *Single Nucleotide Polymorphisms*).

sPLS-DA: Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales escasos (del inglés *Sparse Partial Least Square Discriminant Analysis*).

sARN: pequeños ARNs (del inglés *small RNA*)

ssARN: ARN monocatenario (del inglés *single-stranded RNA*).

STs: Sesquiterpenos (del inglés *Sesquiterpenes*).

TGS: Secuenciación de tercera generación (del inglés *Third Generation Sequencing*).

UV/Vis: Espectrofotometría ultravioleta-visible.

v/v: volumen/volumen.

VWCs: Contenido de humedad relativa del sustrato (del inglés *soil Volumetric Water Content*).

WD: Déficit hídrico (del inglés *Water Deficit*).

WGS: Secuenciación de genomas completos (del inglés *Whole Genome Sequencing*).

WW: Tratamiento control (del inglés *Well Watered*).

RESUMEN

Pinus pinaster Aiton es una conífera de alto valor ecológico y socio-económico, relevante en la región mediterránea por formar parte de bosques y plantaciones en diversos ecosistemas, debido en gran medida, a su plasticidad para crecer en regiones con condiciones climáticas muy diversas y por su aprovechamiento para el abastecimiento de recursos madereros y no-madereros a la industria, entre otros muchos servicios ecosistémicos. La respuesta de *Pinus pinaster* al déficit hídrico es un proceso complejo que requiere la integración de múltiples mecanismos moleculares, fisiológicos y morfológicos, que dependen de la variabilidad genética del individuo y de su interacción con su entorno (relación con otros seres vivos, con el suelo y con las condiciones climáticas y perturbaciones asociadas). Teniendo en cuenta las sequías recurrentes que soporta el área mediterránea, asociadas con el cambio climático, el objetivo de la tesis doctoral es profundizar en el estudio de la tolerancia de *Pinus pinaster* a la sequía y explorar estrategias alternativas que permitan modular su respuesta, evaluando el uso de portainjertos tolerantes al déficit hídrico para regular la respuesta a estrés hídrico de las púas injertadas. Para ello, empleamos aproximaciones transcriptómicas y metabólicas para estudiar genotipos procedentes de una familia de referencia, procedente del cruce controlado Gal 1056 x Oria 6, dos progenitores de las regiones de procedencia Noreste Costera (Pontevedra) y Sierra de Oria (Almería), respectivamente, que muestran respuestas contrastadas en crecimiento, producción de biomasa y respuesta a sequía. Se emplearon dos diseños experimentales, en condiciones controladas, para comparar la respuesta de los pinos sometidos a un estrés hídrico moderado. Inicialmente se estudió la expresión génica de mezclas de individuos de la progenie Gal 1056 x Oria 6 sensibles (4, 147) o tolerantes (132, 144) a nivel de órgano y, en un segundo experimento, el estudio transcriptómico y metabólico del efecto del portainjerto sobre la respuesta a sequía de púas de *Pinus pinaster*, combinando como púas los progenitores y como portas individuos progenie con respuesta contrastada a sequía. Entre los resultados obtenidos destaca la expresión constitutiva de genes relacionados con respuesta a estrés en los individuos progenie tolerantes a sequía, a diferencia de los genotipos sensibles, que parece conferirles un cierto grado de pre-adaptación a la sequía. Estos resultados se confirman al analizar los cuatro injertos diseñados en base a estudios previos: Gal 1056 / R1S, Gal 1056 / R18T, Oria 6 / R1S y Oria 6 / R18T. El estudio de las réplicas de estos injertos en condiciones control frente a déficit hídrico reveló un efecto significativo del genotipo del portainjerto en la respuesta transcriptómica de las acículas de las púas. En condiciones control, las púas injertadas sobre los portainjertos tolerantes están enriquecidas en genes sobreexpresados asociados con respuesta a estrés en ambos progenitores, aunque con un mayor efecto en púas Gal 1056. Además, en los injertos sometidos a déficit hídrico este efecto del portainjerto tolerante se acentúa, especialmente en relación con genes que codifican factores de transcripción y proteínas implicadas en señalización mediada por ABA y biosíntesis de flavonoides. Asimismo, se han detectado procesos cuyo control está asociado con el genotipo de las púas. La respuesta al estrés moderado por parte de las acículas de cada injerto sería así el resultado de la comunicación entre púas e injertos y de la integración de los procesos por ellos controlados. El análisis del perfil metabólico de estos injertos revela que los genotipos de las púas y de los portainjertos también afectan al contenido de diversos metabolitos, entre ellos el contenido cuantitativo y cualitativo de terpenos constitutivos y acumulados diferencialmente en respuesta a déficit hídrico en distintos órganos, constituyendo sistemas de defensa compartimentados. Se observa la existencia

de una comunicación específica entre tejidos aéreos y subterráneos en respuesta a sequía a nivel metabólico, con la distribución diferencial de terpenos específicos. Asimismo, se identifican cambios significativos en el perfil de metabolitos primarios y de otros metabolitos secundarios como ciclitoles en acículas, con una elevada acumulación en condiciones de déficit hídrico. Estos compuestos podrían estar implicados en mecanismos de tolerancia a sequía como el ajuste osmótico y el control del estrés oxidativo. Los resultados observados en la presente tesis doctoral proporcionan nueva información sobre la respuesta a sequía y muestran el interés del empleo de injertos para diseccionar la comunicación entre órganos y el control que ejercen en la respuesta a nivel de distintos procesos biológicos. Asimismo, los resultados obtenidos permitirán diseñar nuevos estudios dirigidos a validar el empleo de portainjertos seleccionados y mejorados para implementar la propagación de individuos élite de *Pinus pinaster* de diversos programas de mejora, que en muchos casos son sensibles a estrés hídrico.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

CAMBIO CLIMÁTICO: SEQUÍA EN LA REGIÓN MEDITERRÁNEA Y ADAPTACIÓN DE LAS ESPECIES FORESTALES

El impacto de la sequía en los bosques mediterráneos es un tema cada vez más relevante en el panorama europeo ya que, junto con otras áreas forestales, cubren una superficie estimada de 159 millones de hectáreas, que ha supuesto un aumento de aproximadamente un 10% desde 1990, colocando a España en segundo lugar tras Irlanda en términos de incremento forestal (34%) en Europa.

Los últimos informes del IPCC, “Fifth Assessment Report” (*WGII AR5*, 2014; <http://www.ipcc.ch/report/ars/wg21>), recogen la situación de cambio climático global causado principalmente por las emisiones antropógenas de gases de efecto invernadero, como dióxido de carbono, metano y óxido nitroso, y por inadecuados planes de gestión y uso del suelo, que han desencadenado procesos de deforestación. Este proceso de cambio climático provoca un aumento del calentamiento global y fenómenos climatológicos extremos, irreversibles y generalizados. Así, la región mediterránea sufre frecuentes olas de temperaturas muy elevadas, con un descenso generalizado de las precipitaciones anuales, periodos recurrentes de sequía no sólo estival y un mayor número de episodios de precipitaciones torrenciales. Estas condiciones climáticas extremas provocan la alteración de los ciclos biológicos del microbioma, las plagas y los patógenos, así como un incremento en la tasa de incendios forestales.

Este cambio medioambiental intenso en un periodo de tiempo corto pone a prueba la capacidad de adaptación de las especies forestales. En concreto, la sequía es un factor abiótico que condiciona la distribución, crecimiento y supervivencia de numerosas especies vegetales (Klos *et al.*, 2009), siendo determinantes los mecanismos de adaptación a situaciones de baja disponibilidad hídrica de las especies autóctona de la región mediterránea. Para entender cómo influirá el cambio climático en la distribución y supervivencia de las especies forestales, es importante conocer su capacidad migratoria y potencial adaptativo (Aitken *et al.*, 2008).

Los árboles, organismos sésiles con largos ciclos vitales, han desarrollado mecanismos adaptativos de respuesta a sequía que son complejos y que dependen de su intensidad y duración. La respuesta a sequía está constituida por un conjunto de mecanismos fisiológicos asociados con cambios moleculares que tienen como principal objetivo reducir su impacto. Para poder adquirir un conocimiento más holístico de esta respuesta debemos llevar a cabo una aproximación interdisciplinar combinando información procedente de estudios (epi) genómicos, transcriptómicos metabolómicos y fenotípicos empleando una visión global de biología de sistemas (Krishnan y Pereira, 2008).

En coníferas, los mecanismos de respuesta fisiológica desempeñan un papel fundamental en el proceso de adaptación a sequía. Por un lado, la disminución de disponibilidad de agua en el suelo y el aumento en las tasas de evaporación, producen la cavitación de los conductos del xilema, el desacople de los flujos de agua a los tejidos aéreos, y el desarrollo de resistencia hidráulica a sequía, que en situaciones extremas puede llevar a la desecación completa de los tejidos.

Además, se producen cambios en los sistemas de control de pérdida de agua a través del cierre de estomas, resistencia cuticular, reajustes osmóticos, y cambios en la inversión en biomasa como consecuencia de la disminución de los niveles de asimilación de carbono (Corcuera *et al.*, 2012; de Miguel *et al.*, 2012).

Las alteraciones de las condiciones climáticas provocan cambios en los fenotipos de muchas especies forestales. Además del componente genético, esta plasticidad fenotípica y el potencial adaptativo de dichas especies también están mediados por cambios epigenéticos implicados en el control de la expresión génica, que son reversibles, que pueden llegar a ser hereditarios (Kvaalen y Johnsen, 2008; Chinnusamy y Zhu, 2009; Jablonka y Raz, 2009; Whittle *et al.*, 2009). Estos cambios epigenéticos abarcan desde modificación de los patrones de metilación del ADN, hasta diversas modificaciones postraduccionales de histonas, variación en las frecuencias de recombinación homóloga, reordenamientos genómicos y distintas clases de ARNs no codificantes (ncARNs) (Bräutigam *et al.*, 2013).

Profundizar en el conocimiento de los cambios en los procesos de reprogramación molecular que inducen la activación de numerosos genes implicados en la percepción de estrés y en la traducción de señales (Osakabe *et al.* 2014), y los cambios metabólicos que modifican las dinámicas de síntesis de metabolitos (Sardans *et al.* 2011), permite formular modelos de respuesta a sequía. La comprensión de los mecanismos moleculares que controlan la respuesta a sequía permitirá implementar programas de conservación y restauración de bosques, así como establecer programas de mejora para diseñar plantaciones forestales mejor adaptadas a su entorno.

Análisis integrados han mostrado asociaciones entre niveles de expresión génica y perfiles metabólicos asociados con procesos dependientes de ABA en plantas sometidas a estrés hídrico (Urano *et al.*, 2009). Sin embargo, este tipo de estudios son muy escasos en coníferas (de Miguel *et al.* 2016). En general el objetivo de este trabajo de doctorado es profundizar en el conocimiento de las dinámicas transcriptómicas y metabólicas de respuesta a sequía en coníferas, para ayudar a la adquisición de una visión holística de los mecanismos moleculares que modulan los procesos de adaptación a estrés hídrico de esta especie forestal.

PINUS PINASTER: CONÍFERA DE ALTO INTERÉS ECOLÓGICO, ECONÓMICO Y CIENTÍFICO

Las coníferas dominan gran parte de los bosques boreales y, en forma de masas puras y mixtas, los templados, colonizando gran número de ecosistemas al desarrollar una gran variedad de estrategias adaptativas. *Pinus pinaster* Aiton (pino negral, resinero o rodeno) es una conífera de alto valor ecológico y socio-económico, muy relevante en España al haber sido empleada frecuentemente en procesos de reforestación de grandes superficies. Es una especie de crecimiento rápido y tamaño mediano, con una altura media de 15 a 25 m (35 a 40 m en condiciones favorables) y una vida media de 200 a 300 años (Alia *et al.*, 2009). Es originaria de zonas mediterráneas occidentales y atlánticas, y su distribución natural actual se concentra principalmente en zonas del suroeste europeo, encontrando poblaciones fragmentadas en el noroeste de África. En España ocupa una superficie aproximada de 600.000 ha distribuidas de forma dispersa (Alia *et al.*, 1996). Su presencia en la Península incluye bosques formados por masas puras y mixtas principalmente en las regiones noroeste costera e interior de Galicia, la meseta Castellano Leonesa, Cuenca, Teruel y Jaén (Alia *et al.*, 2009a). Las repoblaciones forestales de *Pinus pinaster* se encuentran distribuidas por gran parte de los países del sur y centro de Europa, con mayor relevancia en Reino Unido, Italia, Francia, Portugal y España (Figura 1.1).

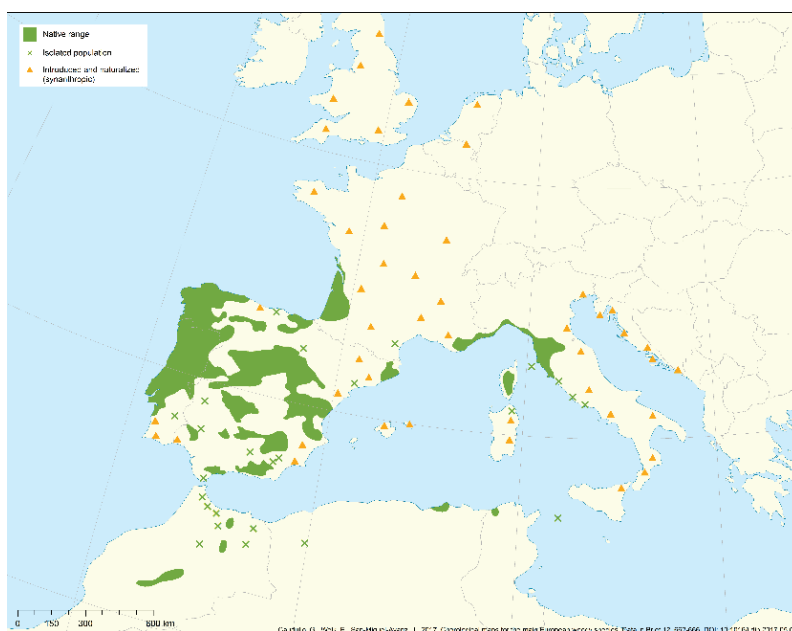


Figura 1.1. Mapa de distribución de Pino marítimo (*Pinus pinaster*), 2016. Realizado por Caudullo *et al.*, 2017.

Pinus pinaster es una especie de gran plasticidad ecológica que se desarrolla frecuentemente sobre suelos pobres en nutrientes, en terrenos sueltos y arenosos (Blanco *et al.*, 2005), de regiones con condiciones climáticas muy diversas, mostrando una gran capacidad de adaptación a la sequía. Esta versatilidad para crecer en suelos pobres y arenosos la convierte en una especie importante en procesos de reforestación, para la protección del suelo en sistemas dunares costeros (David, 1974). Esta especie es capaz de soportar climas de altas y bajas precipitaciones, estando presentes tanto en zonas del centro peninsular, con temperaturas más extremas, como en zonas costeras caracterizadas por sus temperaturas templadas (Blanco, 1997). *Pinus pinaster* muestra una relevante diversidad genética (Pot *et al.*, 2005) con una marcada estructura poblacional dentro del área de distribución natural de la especie (Eveno *et al.*, 2008; de Lucas *et al.*, 2009). Se pueden identificar tres regiones con diferencias génicas significativas: 1) la zona suroriental que cubre la región sureste de Francia, Italia, las islas de Córcega, Cerdeña y Pantelaria y el norte de África, 2) la zona Atlántica, que cubre la vertiente occidental de la Península Ibérica y suroeste de Francia, y 3) la zona central que abarca el sureste de la Península Ibérica (Bucci *et al.*, 2007).

Esta especie se ha empleado tradicionalmente para la obtención de resina, dando lugar a uno de sus nombres comunes, pino resinero, y la obtención de pasta de papel y madera (Sanz *et al.*, 2006). La industria de la resina en la Península ha experimentado un auge desde la segunda mitad del siglo XX debido a la implementación de nuevos métodos y maquinaria de extracción de resina y al desarrollo de programas de mejora (Calama *et al.*, 2010), como posible alternativa a los productos derivados del petróleo, usándose como base para gran variedad de productos manufacturados como barnices, ceras, plásticos y aceite de trementina. En la actualidad se está estudiando su aprovechamiento para la producción de biomasa, bioenergía y otros bioproductos, incluso a partir de residuos y subproductos (Ferreira-Santos *et al.*, 2020). Debido a la importancia de sus aprovechamientos forestales, el conocimiento de los mecanismos que modulan la respuesta de la especie a sequía es de gran importancia para lograr la explotación y aprovechamiento sostenible de este recurso.

Debido a su gran capacidad adaptativa, variabilidad genética (Eveno *et al.*, 2008), e importancia ecológica y socio-económica, *Pinus pinaster* Ait. se ha empleado como especie modelo para el estudio adaptativo en coníferas.

Es importante tener en cuenta que la mayoría de estudios relacionados con las dinámicas de respuesta a estrés causadas por factores bióticos y abióticos en plantas se han llevado a cabo en angiospermas, y en muchos casos no son capaces de explicar las peculiaridades moleculares y funcionales de las especies gimnospermas (Nystedt *et al.*, 2013). Angiospermas y gimnospermas divergieron hace aproximadamente 300 millones de años, experimentando diferentes procesos de radiación adaptativa masiva que han posicionado a las angiospermas como el grupo dominante con más de 250.000 especies frente a las 1.000 especies de gimnospermas (Mackay *et al.*, 2012). Dentro de las gimnospermas, los bosques de coníferas pueblan gran parte de la superficie terrestre, con árboles de gran tamaño y longevidad, dominando algunos ecosistemas de condiciones extremas. Las coníferas han desarrollado mecanismos de adaptación específicos entre los que destaca la modificación de sus hojas en acículas. En condiciones de sequía, la baja relación superficie/volumen de las acículas, su gruesa

cutícula e hipodermis lignificada, estomas hundidos y recubiertos por cera, un parénquima fotosintetizador localizado alrededor de la estructura vascular formada por los haces conductores que están rodeados por un tejido de transfusión formado por traqueidas y un parénquima capaz de almacenar agua, hacen de las acículas órganos con una elevada capacidad para disipar calor, muy impermeables y firmes, que reducen los efectos producidos por el marchitamiento, así como efectivos a nivel de control estomático en condiciones de altas temperaturas que incrementa su eficiencia fotosintetizadora e hidráulica (Gil y Prada 1993; Brodribb *et al.*, 2010). Asimismo, el xilema de las coníferas está constituido principalmente por traqueidas conectadas por pares de punteaduras areoladas, que aumenta su resistencia frente a la cavitación en situaciones de estrés hídrico (Sperry *et al.*, 2006). Desde un punto de vista molecular, las coníferas presentan genomas de elevado tamaño y complejidad, que pueden alcanzar 28,322 Gpb/C para algunas especies como *Pinus pinaster*, suponiendo unas 200 veces el tamaño de especies angiospermas como *Arabidopsis thaliana* (Zonneveld, 2012). El genoma de coníferas se caracteriza por una baja tasa de mutación en regiones codificantes mientras que las regiones no codificantes están constituidas por un alto porcentaje de elementos repetitivos como retrotransposones, largos intrones que, aunque de media cuentan con unos 2,7 Kpb, pueden llegar a alcanzar más de 100.000 Kpb (Neale *et al.*, 2014), pseudogenes, secuencias que codifican lncARNs y sARN. A pesar del gran tamaño de su genoma, el número de genes es similar al identificado en especies de angiospermas, habiendo identificado, por ejemplo, unos 56.000 modelos génicos en *Pinus taeda* (Acosta *et al.*, 2019). En los últimos 10 años se han iniciado numerosos estudios de secuenciación masiva del genoma y transcriptoma de distintas especies de coníferas, cuyos resultados se han incorporado a bases de datos públicas como Gymno

PLAZA (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/versions/gymnoplaza/organism/view/Pinus+pinaster>), TreeGenes (<https://treegenesdb.org/>), Congenie (<https://congenie.org/>) y SustainPineDB (<http://www.scbi.uma.es/sustainpinedb/>). Un consorcio de grupos españoles están trabajando en la secuenciación y análisis del genoma de *Pinus pinaster* en el marco de proyectos nacionales (BIO2007-29814-E y Pinegenseq-BIO2010-12302E), e internacionales (ProCoGen-FP7- 289841 y 824110-EASI-Genomics-PID 7825-ImPiONT), en el marco de una plataforma internacional en la que participan otros grupos europeos y americanos, liderada por el equipo de investigación en el que he desarrollado este trabajo de doctorado. La secuencia del genoma de *Pinus pinaster*, su comparación con la de otras especies, su caracterización funcional y su integración con la información transcriptómica, epigenética, metabolómica y fenotípica permitirá ir descubriendo, progresivamente, las dinámicas moleculares implicadas en su desarrollo y en la respuesta adaptativa de esta especie. Asimismo, el rápido desarrollo de nuevas técnicas de análisis masivo, desde tecnologías de secuenciación de segunda generación NGS como 454 GS FLX, Illumina y Solexa SOLiD (Liu *et al.*, 2012) hasta tecnologías de secuenciación de tercera generación TGS, como PacBio y Oxford Nanopore (Jain *et al.*, 2016) y metodologías de andamiaje, HI-C y Bionano (Paajanen *et al.*, 2019), cada vez más potentes e informativas, están permitiendo aumentar la capacidad de análisis reduciendo notablemente el tiempo de trabajo y el esfuerzo económico, suponiendo una revolución en el estudio holístico de las coníferas.

Pese a estos avances, y en comparación con las angiospermas, el conocimiento sobre los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo y en la adaptación de coníferas es todavía escaso, como también lo es su empleo en los programas de mejora.

MECANISMOS ADAPTATIVOS DE RESPUESTA A SEQUÍA EN ESPECIES FORESTALES

Las plantas pueden emplear tres tipos de mecanismos adaptativos de respuesta a estrés hídrico: escape, evitación y tolerancia a sequía (Figura 1.2). Los mecanismos de escape tienen una gran relevancia agronómica y ecológica sobre todo en cultivos de ciclo corto (Kooyers *et al.*, 2015) que poseen la capacidad de adecuar su fenología a la disponibilidad de agua del entorno, de modo que no resulten afectados en épocas de escasez hídrica. Estos mecanismos sin embargo son de escasa relevancia en especies forestales que cuentan con largos ciclos de vida, a pesar de que han desarrollado procesos de adaptación a nivel evolutivo para simultanear sus periodos de máximo crecimiento vegetativo con condiciones climáticas favorables.

Las especies forestales emplean estrategias de evitación de la deshidratación desencadenando mecanismos de respuesta que permiten minimizar el impacto de la sequía en el estado hídrico de la planta. Para ello, las especies forestales desarrollan mecanismos que limitan la pérdida de agua por transpiración mediante el control del cierre estomático combinado con hojas modificadas morfológicamente, aumento de la profundidad y extensión del sistema radical e implementación de las dinámicas de acumulación de agua (Aranda *et al.*, 2015). Un sistema radical más extenso y profundo asegura un mayor aporte de agua que evita que los árboles se sequen a medida que el suelo disminuye su contenido hídrico (Cano *et al.*, 2013), permitiendo la movilización del agua desde horizontes más profundos hasta zonas más superficiales del suelo (Querejeta *et al.*, 2007). Cuando la demanda evaporativa de la atmósfera es alta y la disponibilidad de agua en el suelo baja, la columna de agua que discurre por el xilema se puede llegar a detener, produciéndose situaciones de cavitación (Tyree y Zimmermann 2002). En situación de estrés hídrico, al aumentar la tensión del xilema, los toros, engrosamientos impermeables de la pared primaria de las punteaduras que separan traqueidas funcionales de traqueidas embolizadas, cierran la comunicación entre traqueidas (Torres Ruiz, 2018); asimismo, el cierre de estomas ayuda a reducir la tensión de la columna de agua en el xilema, para evitar los procesos de cavitación. Otra de las adaptaciones que permite reducir la pérdida de agua en algunas especies forestales, como se describió previamente, es el desarrollo de hojas con morfologías caracterizadas por una relación superficie/peso baja y cutículas gruesas. *Pinus pinaster* es una especie isohídrica, con un estricto control estomático de la transpiración, que se diferencia de especies típicamente anisohídricas, como el roble, en las que la limitación de la pérdida de agua en procesos de transpiración está directamente dirigida al mantenimiento del estatus hídrico en niveles aceptables (Forner *et al.*, 2014).

De manera simultánea, los árboles han desarrollado mecanismos de respuesta rápida enfocados a tolerar distintos niveles de estrés hídrico, basados en una buena coordinación entre la demanda y el aporte de agua a los órganos aéreos (Maherali *et al.*, 2006). Estos mecanismos combinan, entre otros, sistemas hidráulicos resistentes a cavitación con un aumento de la síntesis en las hojas de compuestos osmoprotectores, altamente solubles e inocuos a concentraciones elevadas, consiguiendo mantener la turgencia celular en situaciones de déficit hídrico (Turner *et al.*, 2018; Aranda *et al.* 2021). La acumulación de moléculas osmoprotectoras de bajo peso molecular como

prolina y otros aminoácidos, compuestos de amonio cuaternario como glicina-betaina, ciertos azúcares como glucosa, fructosa y sacarosa, ácidos orgánicos como quínico, y polialcoholes, como pinitol (Aranda *et al.*, 2021), incrementa la viscosidad del líquido intracelular (Gebre y Tschaplinski 2002) y promueve la retención de agua en el citoplasma y la estabilización de las membranas celulares. Mediante este ajuste osmótico, en el que también intervienen iones, los árboles mantienen la turgencia a potenciales hídricos bajos. Otros mecanismos de protección inducidos son la síntesis de proteínas protectoras de otras proteínas, y enzimas y péptidos antioxidantes, implicados en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que minimizan el daño oxidativo que se produce en las células cuando las tasas de transpiración, respiración y fotosíntesis se ven mermadas por el déficit hídrico (Nogués *et al.*, 2014).

El estudio de los procesos de adaptación y eficiencia en el uso del agua es fundamental en ambientes áridos debido al valor adaptativo que supone producir biomasa en condiciones limitantes de agua (Chaves y Davies, 2010). En algunas especies adaptadas se han demostrado tasas mayores de eficiencia en el uso de agua (Aranda *et al.*, 2010), sin embargo, esto puede variar en función de la especie y el genotipo (Corcuera *et al.*, 2010), pudiendo estar condicionado también por factores ambientales relacionados con la intensidad y duración de la sequía, por otros factores bióticos o abióticos y por el estado de desarrollo del individuo.

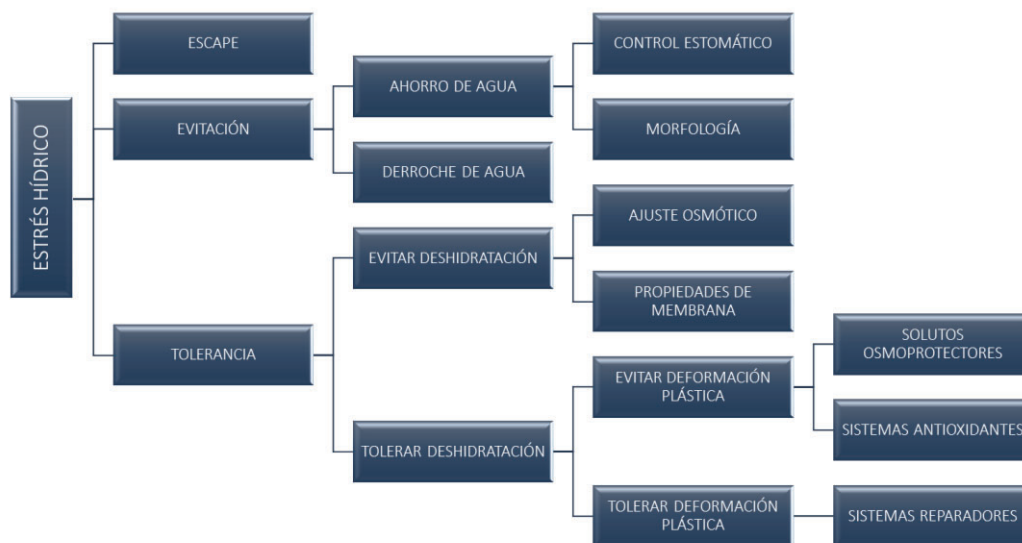


Figura 1.2. Esquema de respuestas adaptativas a estrés hídrico. Adaptado de Valladares *et al.*, 2014.

ESTUDIO MULTIDISCIPLINAR DE RESPUESTA A SEQUÍA: RESPUESTA (EPI) GENÓMICA, TRANSCRIPTÓMICA, PROTEÓMICA Y METABOLÓMICA

La biología de sistemas es una rama multidisciplinaria de la ciencia centrada en el estudio holístico de los organismos vivos para mejorar la comprensión de sus propiedades fisiológicas y morfológicas, y de las interacciones moleculares que las propician, posibilitando la predicción de su comportamiento ante condiciones ambientales determinadas (Fundación Instituto Roche, 2018). Los estudios basados en la biología de sistemas se han visto impulsados con la aparición de las tecnologías ómicas, que permiten abordar estados biológicos desde el análisis integrado de datos procedentes de sus perfiles (epi) genómicos, transcriptómicos, proteómicos y metabolómicos.

Como se ha mencionado en apartados anteriores, la respuesta de las especies forestales a sequía es un proceso complejo cuyo estudio multidisciplinar permite integrar la respuesta molecular estableciendo modelos que describan el interactoma que tiene lugar en la planta, y que se traduce en la respuesta funcional que da lugar a un determinado fenotipo en respuesta a déficit hídrico (Figura 1.3).

El tamaño del genoma de las coníferas y su complejidad han condicionado su estudio, aunque el desarrollo de técnicas de secuenciación y análisis masivo han permitido abordar la secuenciación de genomas completos (WGS) empleando distintas tecnologías NGS (Mackay *et al.*, 2012; Cervera *et al.*, 2019), el análisis de la expresión génica de miles de genes de forma simultánea, por ejemplo empleando microordenamientos o ARN-Seq (de Miguel *et al.*, 2014; Cañas *et al.*, 2015a; de María *et al.*, 2020; Perdiguero *et al.*, 2021; López-Hinojosa *et al.*, 2021), así como el desarrollo de técnicas de genotipado masivo (SNPlex o secuenciación de exomas) han permitido estudiar la variabilidad genética de los genomas, revelando la importancia de la variabilidad inter-específica a la hora de determinar el grado de tolerancia a sequía de una especie o población (González Martínez *et al.*, 2006; Eveno *et al.*, 2008; Eckert *et al.*, 2010).

La técnica de secuenciación ARN o ARN-Seq es de especial relevancia en el desarrollo de este trabajo al hacer posible la identificación de miles de genes cuyos patrones de expresión se ven modificados en respuesta a déficit hídrico. Esta técnica utiliza tecnologías NGS para determinar la presencia y cantidad de ARN en muestras biológicas, permitiendo el análisis de los transcritos resultantes e identificando de este modo no sólo cambios en la expresión de genes, sino también variaciones en la secuencia (como SNPs e InDels), modificaciones postranscripcionales y variantes obtenidas por splicing alternativo, entre otras (Chu *et al.*, 2012). La aplicación de estas herramientas dado lugar a un salto cuantitativo y cualitativo en la identificación de genes cuya expresión se ve alterada bajo condiciones de sequía, permitiendo el seguimiento de las dinámicas transcriptómicas de genes de interés.

Las técnicas de secuenciación masiva han proporcionado, a su vez, ventajas en el estudio de la variabilidad epigenética en especies forestales, ayudando a desvelar patrones de metilación de citosinas del ADN (MeDIP-seq) y de modificación de histonas (ChIP-seq), así como el estudio de ARNs cortos (sARNs) y largos (lncARNs) en respuesta a cambios en el ambiente, como por ejemplo déficit hídrico (Zhang *et al.*,

2013). Esta variabilidad epigenética, que es independiente de la variabilidad genética (Vaughn *et al.*, 2007), supone un potencial adaptativo al proporcionar estrategias de respuesta rápida ante cambios ambientales, pudiendo incluso conferir una memoria transgeneracional (Brütigam *et al.*, 2013) por lo que su estudio, hasta la fecha sólo incipiente, es necesario para comprender las bases moleculares de la respuesta adaptativa a sequía de las especies forestales (Gourcilleau *et al.*, 2010; Raj *et al.*, 2011).

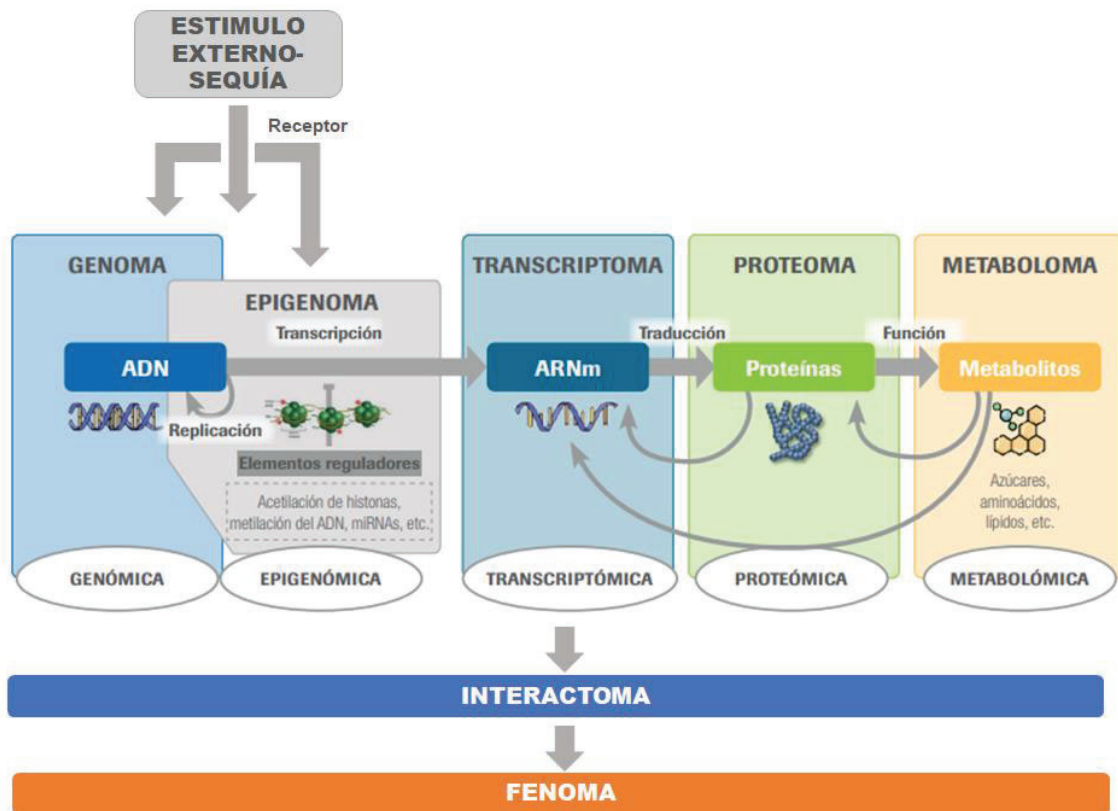


Figura 1.3. Esquema de la relación de las ciencias ómicas. Figura adaptada Aranda *et al.* 2012.

Los estudios de proteómica basados en técnicas de microsecuenciación de polipéptidos en especies forestales han permitido identificar y caracterizar proteínas específicas de respuesta a sequía (Plomion *et al.*, 2006), y asignarles un rol dentro de la cascada de respuesta al estímulo. Diversos estudios han demostrado que no existe una correlación completa entre los perfiles transcriptómicos y las proteínas inducidas en respuesta a sequía, lo que hace patente la necesidad de utilizar aproximaciones proteómicas para determinar la regulación postraduccional de la respuesta a estrés hídrico.

Conjuntamente, el análisis del perfil metabolómico de muestras vegetales estresadas ofrece una gran cantidad de información sobre los perfiles de los productos finales en procesos de regulación de respuesta a sequía (Král'ová *et al.*, 2012) y se ha convertido

en una herramienta fundamental en programas de mejora vegetal mediante técnicas de selección genómica (Ruan y Teixeira da Silva, 2011).

Como consecuencia del estudio integrado de todas las aproximaciones ómicas, se pueden establecer modelos que expliquen las interrelaciones moleculares que dan lugar a la respuesta funcional de la planta a una determinada situación medioambiental (Aizat *et al.*, 2018). Estos estudios permiten comprender los procesos de respuesta a sequía a nivel de planta completa en especies forestales tan complejas como *Pinus pinaster* (Sardans *et al.*, 2011).

PERCEPCIÓN DEL DÉFICIT HÍDRICO Y MECANISMOS DE RESPUESTA A NIVEL TRANSCRIPCIONAL

La transcriptómica es la ciencia que estudia los patrones de expresión génica celular de un tejido o de un órgano en un momento determinado, bajo unas condiciones de crecimiento concretas, mediante el análisis del conjunto de ARN mensajeros y no codificantes a nivel 1) cuantitativo, mediante el estudio de los niveles de expresión génica, y 2) cualitativo, caracterizando las variantes de los distintos transcritos (Fox *et al.*, 2018). De esta manera, cambios en la cantidad de un determinado producto génico puede dar lugar a diferentes respuestas fenotípicas, aunque la secuencia genética permanezca invariable (Moran *et al.*, 2017).

Los estudios de expresión génica involucran una gran variedad de técnicas entre las que destacan, en estudios masivos, el uso de microordenamientos de oligonucleótidos de ADN (Lorenz *et al.*, 2011) o las técnicas basadas en la secuenciación de librerías de ADN complementario (ADNc), como ARN-Seq (Behringer *et al.*, 2015), que permiten el estudio de nuevos transcriptomas (Wang *et al.*, 2009). Asimismo, se puede emplear secuenciación cuantitativa a tiempo real (qPCR), de elevada sensibilidad, para la determinación de los niveles de expresión de genes específicos; una variación de esa técnica, RT-qPCR que suele aplicarse en la validación de los patrones de expresión de un conjunto de los genes identificados por las técnicas de análisis masivo antes indicadas (Perdiguero *et al.*, 2012).

En *Pinus pinaster* se ha obtenido un transcriptoma de referencia con un catálogo de genes candidatos asociados a distintos genotipos y tratamientos (Canales *et al.*, 2014), que se ha empleado en el ensamblaje del genoma de la especie y en estudios de variabilidad genética asociada con secuencias codificantes (Durán *et al.*, 2019). Los estudios de genotipado masivo de genes así como de genes candidatos han permitido analizar, en base a dichas secuencias, la estructura genética de diversas poblaciones naturales y buscar asociaciones entre variantes alélicas y caracteres de interés (Eveno *et al.*, 2008; Grivet *et al.*, 2013; Cabezas *et al.*, 2015; Plomion *et al.*, 2016).

Con carácter general, la percepción de señal de déficit hídrico es captada a través de sensores que se encuentran principalmente en las membranas celulares, activando las señales intracelulares, mensajeros secundarios que desencadenan un amplio abanico de rutas de señalización. En primer lugar, se producen cambios estructurales y de composición en las membranas plasmáticas que conducen a la acumulación de Ca^{+2} , IP_3 (Inositol-1,4,5-trifosfato), DAG (diacilglicerol) y otros mensajeros secundarios a nivel citoplasmático (Zhu, 2002), junto a especies reactivas de oxígeno que pueden, simultáneamente, iniciar cascadas de señalización (Takahasji *et al.*, 2001; Foyer y Noctor, 2003). La consiguiente transducción de señales está mediada por rutas dependientes de Ca^{+2} a través de CDPKs o CIPKs (de sus siglas en inglés *Ca⁺²-dependent protein kinases* y *CBL-interacting protein kinases*, respectivamente) e independientes de Ca^{+2} a través de cascadas de MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) que activan diferentes factores de transcripción (FT) que modifican las dinámicas de control transcripcional, regulando la expresión de genes de respuesta a sequía (Huang *et al.*, 2012; Estravis-Barcala *et al.*, 2020).

Un gran número de genes relacionados con la señalización y la regulación de la transcripción están inducidos en plantas estresadas por déficit hídrico. ABA es una fitohormona que juega un papel fundamental en la respuesta a sequía (Yang *et al.*, 2011), tanto en el mantenimiento del balance hídrico mediante la regulación del cierre estomático, como en la inducción de tolerancia mediante la expresión de genes que codifican proteínas de protección. Además de ABA, otras fitohormonas como ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y etileno (ET) participan activamente en la respuesta a estrés mientras que citoquininas (CK) o auxinas (IAA), giberelinas (GA), brasinoesteroides (BR) y estrigonolactonas (SL) también interactúan para mantener un desarrollo equilibrado en condiciones de estrés (Tiwari *et al.*, 2017). Se han descrito dos vías de control transcripcional en respuesta a déficit hídrico, la vía independiente de ABA, de respuesta rápida, y la dependiente de ABA, que requiere su síntesis (Hamanishi *et al.*, 2015; Yoshida *et al.*, 2014; Todaka *et al.*, 2015). En la regulación de la red independiente de ABA intervienen FT tipo DREB (*Dehydration Responsive Element*), miembros de la familia de FT ERF/AP2 que participan en la respuesta a estrés hídrico y CBF (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006). Los genes regulados por ABA contienen el elemento de respuesta ABRE (*Abscisic acid Responsive Element*) reconocido por los FT AREB/ABF. Estos FT se activan mediante procesos de fosforilación catalizados por quinasas tipo SnRK2 (*SNF1-related protein kinase, subfamily 2*) (Yoshida *et al.*, 2015) y CDPK (*Calcium-Dependent Protein Kinases*) (Muñiz García *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2011). En la respuesta también intervienen FT tipo MYC/MYB (Wang *et al.*, 2014; Baldoni *et al.*, 2015) que se unen a elementos de respuesta MYCR y MYBR respectivamente (*MYC* o *MYB Recognition Sites*). Otros FT que intervienen en la señalización en respuesta a déficit hídrico incluyen miembros de las familias PHD-finger (Sun *et al.*, 2017), WRKY (Chen *et al.*, 2019), NAC y ZF-HD (Yoshida *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2020).

Como resultado de estos procesos de control transcripcional se desencadenan procesos de respuesta múltiple que conllevan la expresión de un gran número de genes. Por un lado, se produce la síntesis de proteínas de protección, como proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant) que actúan como estabilizadores proteicos y de membrana, y previenen la agregación de proteínas (Behringer *et al.*, 2015). Entre las proteínas LEA, cabe destacar el subgrupo de las dehidrinas, muy activas en procesos de protección frente a sequía y otros estreses abióticos (Velasco-Conde *et al.*, 2012). Conjuntamente, y como se indicó anteriormente, se produce la síntesis de otras proteínas con propiedades protectoras como HSP, chaperonas, enzimas de detoxificación y proteínas implicadas en la síntesis y transporte de carbohidratos y aminoácidos osmoprotectores (Lorenz *et al.*, 2011; Behringer *et al.*, 2015).

Los genes implicados en la respuesta a estrés provocado por factores bióticos como las defensinas, que median la respuesta inmune específica (Do *et al.*, 2004), y los genes de resistencia sistémica adquirida (SAR) (La *et al.*, 2019), también intervienen en respuesta a sequía. Por el contrario, los genes que participan en procesos de desarrollo y crecimiento, tales como división celular y biosíntesis y síntesis de paredes celulares, están inhibidos (Behringer *et al.*, 2015). Asimismo, la sequía induce, por ejemplo, modificaciones en los patrones de expresión de genes vinculados a la fotosíntesis, al metabolismo de carbohidratos y lípidos, de genes asociados a homeostasis de proteínas (Liu *et al.*, 2017a), de genes implicados en procesos de transporte, como las

acuoporinas, que participan en el mantenimiento de la permeabilidad al agua en la membrana (Lorenz *et al.*, 2011; Behringer *et al.*, 2015), y de proteínas asociadas a moléculas señalizadoras como calmodulinas (Rahman *et al.*, 2016).

Sin embargo, los mecanismos de señalización celular que se desencadenan tras la percepción de estímulos de estrés abiótico en especies leñosas perennes, como las coníferas, son muy complejos, y muchos de ellos todavía no han podido ser identificados debido en gran parte, al elevado porcentaje de genes que no muestran homología con genes anotados, y por tanto su función se desconoce. Asimismo, se trata de un carácter muy complejo que integra diferentes procesos, y por consiguiente de carácter multigénico, y muy sensible a otros cambios en su entorno (Corcuera *et al.*, 2010). En este trabajo de doctorado buscamos profundizar en el conocimiento de los patrones de expresión génica vinculados a las respuestas a sequía de individuos de *Pinus pinaster* que muestran distintos grados de tolerancia.

RESPUESTA A DÉFICIT HÍDRICO DESDE EL PUNTO DE VISTA DE LA METABOLÓMICA

La eco-metabolómica es la ciencia que analiza el metaboloma, los niveles del mayor número posible de metabolitos, y sus variaciones en respuesta a cambios ambientales, presentado una gran sensibilidad para detectar mecanismos de respuesta a estrés abiótico e interacciones con factores bióticos, ya que nos proporciona la respuesta fenotípica a nivel metabólico en una particular circunstancia medioambiental (Sardans *et al.*, 2011). En especies forestales la metabolómica es la aproximación ómica más reciente (hasta 2010 no puede hablarse de metabolómica forestal), siendo *Populus* el género más estudiado, seguido de *Pinus*, *Quercus*, *Eucalyptus*, *Picea* y *Fagus* (Rodríguez *et al.*, 2019). Dos son las tecnologías analíticas principalmente ligadas a la ciencia metabolómica, la resonancia magnética nuclear (NMR), de gran poder de elucidación estructural, y la espectrometría de masas (MS), tecnología más utilizada por su mayor sensibilidad. El acoplamiento de la MS a sistemas analíticos como los cromatográficos, tanto de líquidos (LC) como de gases (GC), con cuadrupolo simple (LC-MS y GC-MS), triple cuadrupolo (-QQQ) y cuadrupolo-tiempo de vuelo (-QTOF), incluso en sistemas bidimensionales de cromatografía de gases (GCxGC-QTOF), junto a la implementación de los soportes bioinformáticos de forma generalizada (Van den Berg *et al.*, 2006; Piasecka *et al.*, 2019), han supuesto un gran avance en el conocimiento de los cambios metabólicos, y han permitido profundizar rápida y significativamente en la identificación de moléculas de señalización o metabolitos que contribuyen al proceso de adaptación de la planta a déficit hídrico (Brunetti *et al.*, 2013; Ruan *et al.*, 2013). Aun así, la alta diversidad química, el amplio rango dinámico de concentraciones detectadas y la específica compartimentación celular de los metabolitos dificultan el comprensivo conocimiento de todas las vías bioquímicas implicadas en esta respuesta adaptativa.

Los primeros mecanismos de respuesta a sequía que se desencadenan a nivel celular conllevan alteraciones en las reservas de carbono, como consecuencia del desajuste que se produce entre las tasas de fijación de carbono y el uso de fotoasimilados (Pinheiro *et al.*, 2001). En función de la capacidad de adaptación a sequía, la planta puede modular procesos respiratorios que ayuden a mantener estable el balance de reservas de carbono, aumentarlas o disminuirlas (Gimeno *et al.*, 2012). Esto desencadena toda una serie de modificaciones a nivel de metabolismo primario y secundario que condicionan la capacidad de respuesta de la planta a sequía. En *Pinus pinaster* la sequía produce un incremento importante en la acícula de la biosíntesis de aminoácidos y compuestos nitrogenados, especialmente L-alanina, L-valina, ácido aspártico, ácido piroglutámico, betaina, putrescina o urea; de ciclitoles como pinitol; de azúcares solubles como ribosa y arabinosa; y polioles como arabitol o eritritol (de Miguel *et al.*, 2016; Fernández de Simón *et al.*, 2017). Cambios en los niveles de carbohidratos (Koch, 2004) y la acumulación de determinados aminoácidos, juegan un papel importante en la regulación del balance del carbono y el mantenimiento de las tasas respiratorias (Araújo *et al.*, 2011). Conjuntamente, estos osmolitos de carácter polar se concentran intracelularmente modificando sustancialmente el potencial osmótico celular. Desempeñan funciones de ajuste osmótico como la protección de estructuras

subcelulares, la desactivación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la exclusión de iones tóxicos al exterior celular (Hare *et al.*, 1998; Merchant *et al.*, 2006).

En la respuesta de *Pinus pinaster* a sequía es importante el papel jugado por el ciclitol pinitol en la osmorregulación (Nguyen y Lamant, 1988; de Miguel *et al.*, 2016) en contraste con el bajo efecto que produce sobre otros carbohidratos osmorreguladores cuantitativamente más importantes como son la fructosa, glucosa, galactosa o sacarosa (Fernández de Simón *et al.*, 2017), a pesar de que la mayoría de ellos, aumentan en respuesta a la sequía en otras especies forestales (Aranda *et al.*, 2017; Barchet *et al.*, 2014; Hamanishi *et al.*, 2015; Krasensky y Jonak, 2012; Warren *et al.*, 2011), jugando un papel importante en el ajuste osmótico. La relevancia de los azúcares solubles frente a los ciclitoles como principales osmorreguladores en respuesta a sequía, se ha relacionado con las características de aridez del origen de la especie: aquellas especies procedentes de ecosistemas xéricos dependerían principalmente de la acumulación de ciclitoles, mientras que aquellas de hábitats méxicos, utilizarían azúcares solubles como osmolitos. Estas diferencias también muestran un control genético (Barchet *et al.*, 2014; Merchant *et al.*, 2006; Warren *et al.*, 2011), pero no se ha establecido a nivel intraespecífico al considerar genotipos de poblaciones ecológicamente diferentes de *Pinus pinaster* (Meijon *et al.*, 2016).

Un incremento en los requerimientos de energía para el crecimiento de las plantas y la síntesis de metabolitos fundamentales a través del ciclo de la glucólisis-TCA (Ferne *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016) se ha asociado a la tolerancia a sequía, y los metabolitos involucrados (ácidos málico, fumárico, succínico y cítrico, y los aminoácidos conectados a través de la derivación GABA, ácido glutámico y GABA) muestran aumentos pronunciados y consistentes en respuesta al déficit de agua, lo que sugiere claramente que su tasa metabólica está influida por la sequía (de Miguel *et al.*, 2016; Fernández de Simón *et al.*, 2017).

Cabe destacar, que la producción de ROS aumenta drásticamente en condiciones de déficit hídrico (Cruz de Carvalho, 2008) alterando el equilibrio oxidación-reducción celular, y produciendo daño oxidativo en componentes celulares imprescindibles para la supervivencia de la misma como membranas celulares, complejos proteicos y enzimáticos, ácidos nucleicos y pigmentos fotosintéticos. En acículas de *Pinus* la activación de los mecanismos de eliminación de ROS conlleva la sobreproducción de compuestos antioxidantes, regulando positivamente las vías metabólicas del ascorbato, shikimato/fenilalanina y fenilpropanoides, así como el catabolismo de ácidos diterpénicos o su movilización hacia otros tejidos (de Miguel *et al.*, 2016; Fernández de Simón *et al.*, 2017). En general, los cambios desencadenados por el déficit hídrico dependen de la síntesis y acumulación de aquellos compuestos fenólicos con mayor actividad antioxidante, como los flavonoles y los dihidroxicinamatos, así como el precursor 4-hidroxicinámico, probablemente para mejorar la tolerancia a estrés (Nakabayashi *et al.*, 2014; Tattini *et al.*, 2004). Al mostrar una correlación temporal entre la biosíntesis de flavonoides y los eventos de estrés oxidativo, los flavonoides podrían constituir un sistema antioxidante secundario (Agati *et al.*, 2012), mejorando la tolerancia oxidativa y a la sequía por sobreacumulación de flavonoides (Meijon *et al.*, 2016; Nakabayashi *et al.*, 2014). En cuanto a los hidroxicinamatos, la escasez de agua favorece la acumulación de derivados del cafeoil (dihidroxiado) frente al cumarilo

(monohidroxilado), mejorando la tolerancia a estrés (Nakabayashi *et al.*, 2014; Tattini *et al.*, 2004).

Los metabolitos secundarios constituyen un grupo muy heterogéneo estructural y funcionalmente, y muchos de sus miembros están implicados en protección contra estrés biótico y abiótico (Hamanishi *et al.*, 2015). Diversas peroxidasas, lacasas, transferasas, isomerasas y polifenol oxidasas están además implicadas en las rutas de metabolización de estos compuestos. A pesar de los avances en el conocimiento de la respuesta metabolómica a sequía, existe todavía un gran número de compuestos no identificados o de función indeterminada sobre todo teniendo en cuenta la variabilidad inter-específica (Warren *et al.*, 2012) e intra-específica que existe a nivel de metaboloma (Davey *et al.*, 2008).

Uno de los objetivos de la Tesis consiste en profundizar en las dinámicas metabolómicas que modulan la respuesta de *Pinus pinaster* a sequía, así como en las conexiones a nivel de interactoma con la respuesta transcriptómica celular desencadenada, con el fin de conseguir una visión holística de los procesos adaptativos a déficit hídrico en la especie.

SISTEMAS DE PROPAGACIÓN VEGETATIVA EN ESPECIES FORESTALES

El injerto es la unión de dos genotipos, una púa o parte aérea que contiene las hojas/acículas y parte del tallo de uno de los genotipos, y un portainjerto, que contiene parte del tallo y raíces del otro genotipo, a través de su tallo, que crecen de manera conjunta y generan una planta única (Iglesias *et al.*, 1999; Gautier *et al.*, 2019). Las primeras evidencias documentadas del uso de técnicas de injerto se remontan a más de 2.000 años en China, principalmente en especies de importancia para la producción de frutos, aplicándose en la actualidad tanto a especies angiospermas como gimnospermas (Pérez- Luna *et al.*, 2020). El uso generalizado de injertos ha hecho necesaria la optimización de los protocolos a los distintos materiales (Mencuccini *et al.*, 2007), identificando las variables que afectan la adecuada supervivencia de plantas injertadas como son la calidad del portainjerto, las condiciones hormonales de ambos órganos, la afinidad taxonómica y anatómica entre la púa y el portainjerto y las condiciones ambientales en las que se lleva a cabo el injerto (Pérez-Luna *et al.*, 2020).

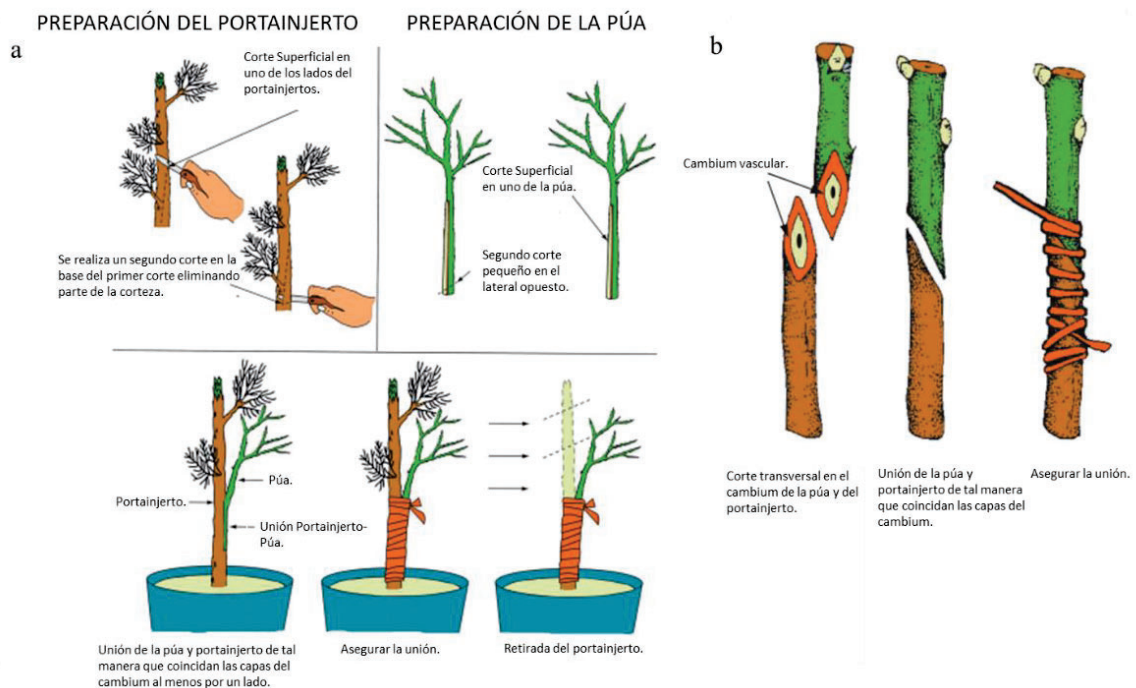


Figura 1.4. Principales técnicas de injerto utilizadas en coníferas. (a) Técnica de hendidura lateral, (b) técnica de fisura terminal. Imagen adaptada de Aggie-horticulture ®.

Las técnicas de injerto más utilizadas en coníferas son la hendidura lateral (*lateral plating*) y la fisura terminal (*terminal fissuring*) (Figura 1.4; Muñoz *et al.*, 2013). La técnica de hendidura lateral consiste en realizar cortes longitudinales en el portainjerto y en la púa de entre 3-5 cm por los extremos que se injertan. En el portainjerto se realiza un segundo corte más pequeño en la base del primero de unos 0,5 cm retirando parte de la corteza, y en la púa se realiza un segundo corte en el extremo opuesto al primer corte. Hay que hacer coincidir la longitud del corte del portainjerto con el de la púa que se va a injertar. Por último, se unen ambos cortes, de tal manera que la púa quede firmemente unida al portainjerto, y se sella la zona con fungicida, mezclado con pintura vinílica y cera de cicatrización (Muñoz *et al.*, 2013). La técnica de fisura terminal consiste en realizar un corte transversal en el cambium de la púa, eliminando la parte inferior del tallo, y un corte transversal de unos 3-4 cm en el extremo superior del tallo del portainjerto, haciendo coincidir la longitud y ángulos de corte. Nuevamente, se asegura la unión del injerto y se sella con fungicida para evitar la contaminación de hongos en la zona injertada. Si la púa es más pequeña que el portainjerto, debe colocarse en un lado del portainjerto para que las capas del cambium vascular coincidan a lo largo de ese lado. Numerosos estudios han demostrado el buen funcionamiento de ambas técnicas en injertos de especies del género *Pinus* (De-li *et al.*, 2007; Vanderklein *et al.*, 2007; Ávila y Pompa, 2008). Recientemente, se han comenzado a utilizar técnicas de injerto con yemas adventicias que permiten injertar múltiples púas en un único portainjerto (Mahunu *et al.*, 2009), reduciendo así el tiempo de producción de semillas en huertos clonales (Pomper *et al.*, 2009).

La mayoría de especies de coníferas, como *Pinus pinaster*, se injertan con altas tasas de éxito en portainjertos intra-específicos (Cuevas-Cruz *et al.*, 2015). Esta especie aumenta su recalcitrancia a la propagación vegetativa hasta los 3 - 5 años (Medina *et al.*, 2007), limitando su capacidad de propagación clonal. Es por ello, que los programas de mejora genética y de conservación de los recursos genéticos forestales se basan en el diseño de huertos clonales para la producción de semillas formados por genotipos seleccionados cuyas púas están injertadas en portainjertos no seleccionados (https://www.mapa.gob.es/es/desarrollo-rural/temas/politica-forestal/recursos-geneticos-forestales/rgf_red_centros.aspx). Consecuentemente, el estudio y comprensión de los mecanismos moleculares que regulan la relación injerto-portainjerto es de gran importancia para la mejora de los sistemas de propagación, y para la implementación de los mismos mediante la selección de patrones más adaptados a las condiciones ambientales adversas, como por ejemplo una mayor tolerancia a sequía.

EL INJERTO COMO ESTRATEGIA PARA MEJORAR LA TOLERANCIA A SEQUÍA

El injerto sobre patrones tolerantes comenzó a usarse de forma generalizada en el cultivo de frutales durante la segunda mitad del siglo XX para contrarrestar el efecto de plagas y patógenos del suelo (Ke y Saltveit, 1988). En las últimas décadas esta técnica se ha comenzado a utilizar para mejorar la tolerancia a estrés abiótico y la absorción de nutrientes tanto en especies leñosas como no leñosas (Liu *et al.*, 2014). En especies no leñosas se ha demostrado, por ejemplo, que el empleo de portainjertos de tomate (*Solanum lycopersicum*) tolerantes a distintos estreses bióticos o abióticos protege a las plantas injertadas frente a dichos estreses (Rivero *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2017; Spanò *et al.*, 2020), o que el uso de portainjertos de pepino (*Cucumis sativus*) tolerantes a heladas, incrementa la tolerancia a estrés oxidativo y bajas temperaturas de las plantas injertadas (Zhou *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2014). Conjuntamente, se han realizado numerosos estudios que confirman la viabilidad del uso de portainjertos tolerantes para la mejora de la tolerancia a estrés salino en tomate, melón (*Cucumis melo*) y pepino (Romero *et al.*, 1997; Santa-Cruz *et al.*, 2002; Fernandez-Garcia *et al.*, 2002; Estan *et al.*, 2005; Ruiz *et al.*, 2006; Martínez-Rodríguez *et al.*, 2008), y su uso para inducir resistencia frente a la toxicidad de metales pesados, mejorar la absorción de nutrientes y aumentar la síntesis de hormonas endógenas (Ahmed *et al.*, 2007; Dong *et al.*, 2008; Roupheal *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2013). Asimismo, el injerto se ha extendido, empleándose para mejorar la calidad y el valor nutritivo de los cultivos (Kyriacou *et al.*, 2017).

Respecto a la tolerancia a déficit hídrico, el injerto sobre portainjertos tolerantes a sequía mejora la respuesta de la planta, en parte debido a la modificación del diámetro y densidad de los vasos del xilema, que aumenta la conductividad hidráulica y reduce los procesos de cavitación (Tombesi *et al.*, 2010, Alsina *et al.*, 2011, Bauerle *et al.*, 2011), pudiendomodificar la extensión horizontal y lateral del sistema radicular (Alsina *et al.*, 2011, Albacete *et al.*, 2015, Ulas *et al.*, 2019). Portainjertos tolerantes mejoran la respuesta de las púas al déficit hídrico aumentando el almacenamiento de carbohidratos no estructurales en las hojas, así como alterando las tasas fotosintéticas y la conductancia estomática no sólo a través de modificaciones en la conductancia hidráulica sino de compuestos moleculares, por ejemplo hormonas transportadas desde la raíz (Dodd *et al.*, 2009, Alsina *et al.*, 2011, de Ollas *et al.*, 2018, Han *et al.*, 2018). Estos estudios se han realizado principalmente en árboles frutales y plantas herbáceas (Erismann *et al.*, 2008; Marguerit *et al.*, 2012; Tramontini *et al.*, 2013), mientras que los estudios realizados en especies forestales, en su mayoría angiospermas, son escasos, por lo que las incipientes conclusiones podrían no ser aplicables en gimnospermas. Estudios en chopo han demostrado que las púas injertadas en portainjertos tolerantes a sequía muestran mayores tasas de crecimiento y biomasa en comparación con los injertados en genotipos sensibles a déficit hídrico, tanto de manera constitutiva como en condiciones de estrés (Han *et al.*, 2019), detectando una influencia recíproca púa-portainjerto en la mediación de la respuesta (Chen *et al.*, 2019). Resultados similares se han observado en estudios realizados en pecán (Cao *et al.*, 2019), observándose diferencias en la capacidad de ahorro de agua, modulación de la osmosis y sensibilidad a la respuesta estomática de la planta injertada en función del genotipo del portainjerto utilizado,

mientras que los injertos de vides en portainjertos específicos afectaban los perfiles metabólicos globales de la planta (Cheng *et al.*, 2020). A pesar de que los estudios de los efectos de los portainjertos tolerantes a sequía en las púas sensibles de coníferas son casi inexistentes, los resultados obtenidos en angiospermas sugieren que podrían mejorar la respuesta al déficit hídrico de púas de coníferas elite, pudiendo emplearse como estrategia para implementar los programas de mejora y conservación de estas especies. Este trabajo pretende aportar información sobre el efecto de los portainjertos de *Pinus pinaster* tolerantes al estrés hídrico en la respuesta de púas genotipos elite, sensibles a sequía, en situaciones de limitación del aporte hídrico.

HIPÓTESIS DE LA TESIS, OBJETIVOS Y ESTRUCTURA

Esta Tesis persigue contribuir al conocimiento de los mecanismos moleculares y funcionales que controlan la adaptación a sequía empleando una estrategia multidisciplinar que combina estudios moleculares masivos de transcriptómica y metabolómica. Para ello, se diseñaron dos tipos de experimentos, empleando plantas con distinta sensibilidad al estrés hídrico e injertos homoblásticos de *Pinus pinaster* comparando y combinando púas y portainjertos sensibles y tolerantes a estrés hídrico, según el siguiente plan de trabajo.

En primer lugar, se analizó la respuesta a sequía de cuatro genotipos F₁ procedentes del cruce controlado Gal 1056 x Oria 6, familia de referencia diseñada para estudiar la tolerancia a sequía en *Pinus pinaster* (de Miguel *et al.* 2012). El progenitor femenino, Gal 1056, era un pino elite del programa de mejora de Galicia, sensible a la sequía (Pontevedra, 42°10'N 8°30'W), y el progenitor masculino, Oria 6, era un árbol de la población natural de la Sierra de Oria (Almería, 37°31'N 2°21'W), tolerante a la sequía. La selección de los cuatro individuos progenie analizados en el primer diseño experimental se llevó a cabo en base a su respuesta a sequía: dos genotipos tolerantes y dos sensibles. Este estudio se planificó para identificar genes específicos de órgano expresados de forma constitutiva y diferencial al comparar ramets (copias clonales) de los genotipos crecidos en condiciones control frente a las réplicas sometidas a un déficit hídrico moderado.

En segundo lugar, se seleccionaron dos genotipos progenie, uno tolerante y otro sensible a la sequía, cuyos ramets se emplearon como portainjertos sobre los que se injertaron púas de ambos progenitores, Gal 1056 y Oria 6. Este diseño permitía analizar el efecto del portainjerto en los mecanismos de respuesta transcriptómica y metabolómica a sequía moderada de las acículas de las púas injertadas.

La **hipótesis** de partida se centra en la existencia de estrategias moleculares diferenciales que originan el rango de tolerancia al estrés hídrico observado en *Pinus pinaster*. Esta diversidad puede ser resultado de diferencias funcionales, tanto a nivel constitutivo como inducidas por dicho estrés, mostradas por genotipos tolerantes y sensibles. El estudio de las distintas estrategias de respuesta a sequía supone una ventaja adaptativa que podía utilizarse no sólo para la selección de genotipos tolerantes sino para su empleo como portainjertos con los que modular la respuesta a sequía de púas de árboles elite injertados. Existen 4 grandes factores que impulsan la hipótesis de trabajo:

1. La amenaza real que suponen las condiciones de sequía en el área mediterránea.
2. La diversidad de respuestas a estrés hídrico que muestra *Pinus pinaster*.
3. El hecho de que la mayoría de especies de coníferas mediterráneas, incluida *Pinus pinaster*, sean recalcitrantes a la propagación vegetativa limitando el desarrollo de programas de mejora basados en la selección de genotipos de elite, generalmente para caracteres productivos.
4. Diferentes estudios que demuestran que injertos sobre portainjertos tolerantes al

déficit hídrico incrementan la tolerancia a sequía de las púas injertadas.

Con el fin de contrastar esta hipótesis abordamos el estudio de mecanismos responsables de la sensibilidad/tolerancia a estrés hídrico mostrados en la especie, persiguiendo dos amplios **objetivos**:

1. Ampliar la comprensión de los mecanismos moleculares que controlan la tolerancia a sequía en distintos órganos, raíz, tallo y acícula, de genotipos seleccionados de *Pinus pinaster*, tanto a nivel constitutivo, como en respuesta a condiciones de estrés hídrico moderado.
2. Analizar el empleo de genotipos seleccionados tolerantes a sequía como portainjertos, como estrategia para modular la respuesta a estrés hídrico de las púas injertadas desde un punto de vista transcriptómico y metabolómico, identificando cambios en los perfiles de inducción/represión de genes y síntesis de metabolitos.

La Tesis está **estructurada** en 7 capítulos precedidos de una sección de Resumen inicial. El capítulo Introductorio (Capítulo 1), va seguido de un capítulo de Materiales y métodos (Capítulo 2), y un capítulo de Investigación (Capítulos 3). Este Capítulo 3 se subdivide a su vez en tres apartados estructurados como “Análisis funcional de los genes expresados de manera constitutiva y diferencial en genotipos tolerantes de *Pinus pinaster* en respuesta a estrés hídrico”, “Estudio del efecto del portainjerto sobre la expresión génica en acículas de injertos de *Pinus pinaster* en respuesta a estrés hídrico” y “Efecto del portainjerto sobre los patrones metabolómicos de plantas injertadas de *Pinus pinaster* en respuesta a estrés hídrico”. El desglose detallado de objetivos e hipótesis específicos de cada estudio, se presenta al comienzo de cada capítulo de investigación. En el capítulo de Discusión general (Capítulo 4) se analizan e integran los resultados obtenidos de los tres apartados de investigación, a la luz del conocimiento existente. Esta memoria finaliza con el capítulo de Conclusiones (Capítulo 5) resultantes del trabajo de investigación, y un capítulo de Referencias (Capítulo 6) y de Agradecimientos (Capítulo 7).

El presente trabajo de Tesis ha dado lugar a distintas publicaciones de divulgación científica como se describe en la tabla 1.1, entre las que se encuentran 1 capítulo de libro (“Maritime pine genomics in focus”) en colaboración con grupos nacionales, europeos y norteamericanos; un artículo de primer autor en prensa (“Rootstock effects on scion gene expression in maritime pine”); y dos artículos publicados (“Molecular study of drought response (*Pinus pinaster*)”; “Scion-rootstock interaction and drought systemic effect modulate the organ-specific terpene profiles in grafted *Pinus pinaster* Ait”).

Tabla 1.1 Resumen de los capítulos y publicaciones relacionadas presentadas en la Tesis. *Para otros resultados derivados de los trabajos desarrollados durante la Tesis, consultar el *curriculum vitae* adjuntado a la Tesis.

TÍTULO	OBJETIVOS	PROCESOS	PUBLICACIONES*
<p>CAPÍTULO 1</p> <p>Introducción</p>	<p>Descripción del estado del arte del objeto del estudio, así como la definición de hipótesis, objetivos y estructura perseguidos durante el mismo.</p>	<p>Comprensión de la importancia del cambio climático en regiones mediterráneas y los procesos de adaptación a sequía de las especies forestales endémicas de estos ecosistemas. Análisis desde el punto de vista ecológico, económico y científico de la especie modelo <i>Pinus pinaster</i>. Estudio multidisciplinar de los procesos de respuesta a sequía, desde el punto de vista transcriptómico y metabolómico, principalmente. Análisis del uso de portainjertos como estrategia para modular la respuesta a sequía de coníferas injertadas.</p>	<p>Capítulo de libro Cervera <i>et al.</i> (2021). En prensa.</p>
<p>CAPÍTULO 2</p> <p>Materiales y Métodos</p>	<p>Descripción de las principales metodologías utilizadas en el desarrollo del trabajo de Tesis.</p>	<p>Material vegetal. Diseños experimentales. Extracción de ARN, preparación de bibliotecas de ADN y análisis de RNASeq. Análisis de Expresión diferencial. Extracción de metabolitos. Análisis de perfiles metabólicos: terpenos y metabolitos primarios.</p>	<p>Capítulo de libro Cervera <i>et al.</i> (2021). En prensa.</p>
<p>CAPÍTULO 3</p> <p>Análisis funcional de los genes expresados de manera constitutiva y diferencial en genotipos tolerantes de <i>Pinus pinaster</i> en respuesta a estrés hídrico.</p> <p>Efecto del portainjerto sobre la expresión génica del injerto de <i>Pinus pinaster</i> en respuesta a estrés hídrico.</p> <p>Efecto del portainjerto sobre los patrones metabolómicos de plantas injertadas de <i>Pinus pinaster</i> en respuesta a estrés hídrico.</p>	<p>Comprensión de los mecanismos moleculares que controlan la respuesta a estrés hídrico en genotipos tolerantes de <i>Pinus pinaster</i>.</p> <p>Evaluación del uso de portainjertos tolerantes a sequía de <i>Pinus pinaster</i> para modular la respuesta a estrés hídrico del árbol injertado desde un punto de vista transcriptómico.</p> <p>Evaluación del uso de portainjertos tolerantes a sequía de <i>Pinus pinaster</i> para modular la respuesta a estrés hídrico del árbol injertado desde un punto de vista metabolómico.</p>	<p>Análisis de RNA-Seq: mapeo y análisis de expresión diferencial de genes.</p> <p>Análisis de RNA-Seq: mapeo y análisis de expresión diferencial de genes.</p> <p>Análisis de perfiles metabolómicos: GC-MS y HPLC-DAD análisis estadísticos PLS-DA o OPLS-DA.</p>	<p>de María. N. <i>et al.</i> (2020). Ecology and Evolution.</p> <p>López-Hinojosa. M. <i>et al.</i> (2021). Scientific Reports. En prensa.</p> <p>Fernández de Simón. B. <i>et al.</i> (2021). Environmental and Experimental Botany.</p> <p>López-Hinojosa <i>et al.</i> (2021). En preparación.</p>
<p>CAPÍTULOS 4-7</p> <p>Discusión, Conclusiones, Referencias y Agradecimientos</p>	<p>Análisis integrado de los resultados desarrollados en los capítulos anteriores. Referencias y agradecimientos.</p>	<p>Discusión integrada de los datos procedentes del análisis transcriptómico y metabolómico de respuesta a sequía. Conclusión final. Referencias conjuntas y agradecimientos.</p>	

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Los dos diseños experimentales empleados contemplan el análisis de los progenitores y/o individuos de la progenie resultante del cruzamiento controlado de dos genotipos de *Pinus pinaster*: un progenitor femenino, Gal 1056, un árbol élite para la producción de madera procedente del programa de mejora de Galicia, del Centro de Investigación Forestal (CIF) de Lourizán (Pontevedra, 42° 10' N 8° 30' W), adaptado a clima costero atlántico de suaves temperaturas y elevada pluviometría, y un progenitor masculino, Oria 6, procedente de la población natural de la Sierra de Oria (Almería, 37° 31' N 2° 21' W; Figura 2.1), de escaso tamaño, adaptado a un clima mediterráneo seco de temperaturas elevadas y escasa pluviometría, con buena respuesta a la sequía (Aranda *et al.*, 2010 y Sánchez-Gómez *et al.*, 2010). La caracterización fenotípica, molecular y fisiológica de la respuesta a estrés hídrico de 162 individuos progenie permitió determinar el rango de variabilidad de tolerancia a sequía de la progenie mediante la caracterización del comportamiento de cada uno de los genotipos. El genotipado de progenitores y progenie con más de 2.000 marcadores SNPs y microsatélites nucleares permitió no sólo construir los mapas genéticos de los progenitores, en base al análisis de su segregación en los distintos individuos F₁, sino llevar a cabo un análisis de QTLs y determinar las regiones del genoma que controlan los distintos parámetros analizados en los tres/cuatro ramets (réplicas clonales) de cada genotipo progenie (de Miguel *et al.*, 2012a; 2014). En esta memoria denominamos “clon” a cada genotipo de la progenie y “ramet” a cada réplica obtenida a partir de un genotipo mediante propagación vegetativa.

Obtención de ramets

Los genotipos de la progenie fueron propagados vegetativamente durante sus primeros cinco años, realizando cada año tres o cuatro rondas de propagación. En cada ronda de propagación, las plantas se mantuvieron en condiciones de buen riego, manteniendo seis esquejes por planta madre en cama caliente para su enraizamiento durante 7 meses. La temperatura en el medio de enraizamiento fue de 20 °C, y la humedad relativa superior al 70 %. Posteriormente, las plantas enraizadas se transplantaron a macetas de 1,5 L con una mezcla 3:1 v:v de turba:arena, fertilizándolas regularmente con Abofol 1,5 g/ L de N:P:K 24:16:12 y Sequestrene 1,5 g/ L de Fe (Syngenta, Basilea, Suiza), y se dispusieron en cuatro bloques en un invernadero del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, INIA-Madrid (40°27'N 3°44'W), siguiendo un diseño de bloques incompletos, con una distribución aleatoria de un ramet por clon en cada bloque (de Miguel *et al.*, 2012).

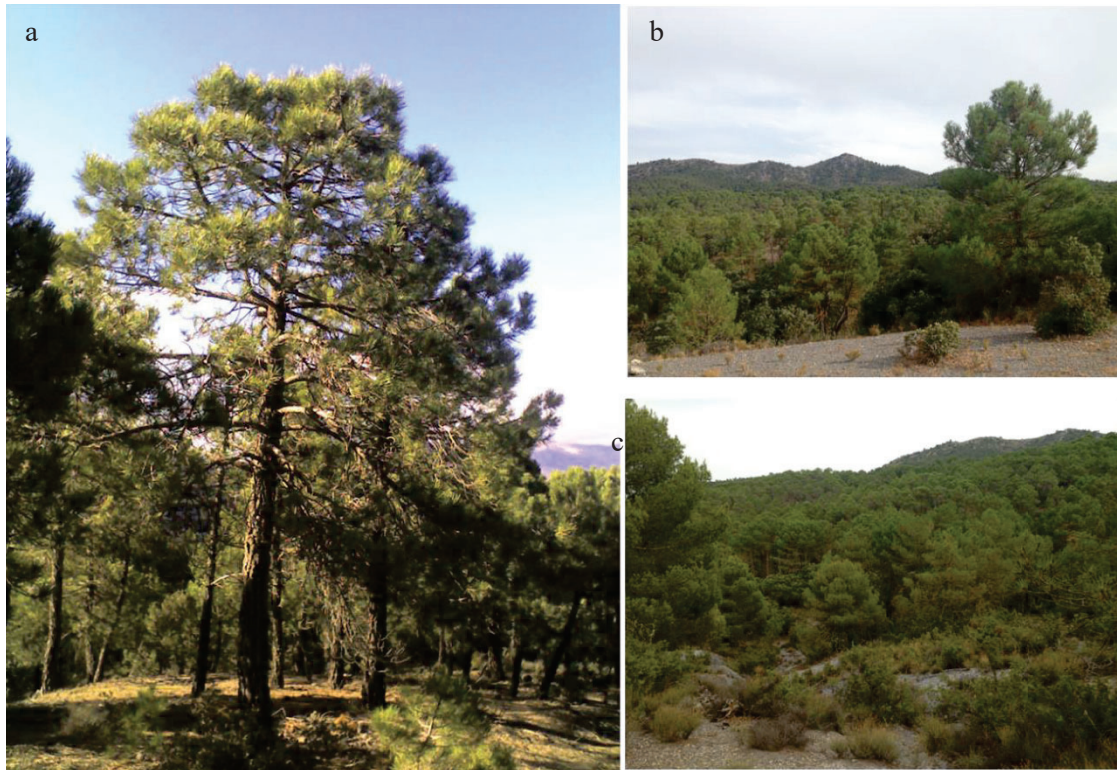


Figura 2.1. Población de *Pinus pinaster* de la Sierra de Oria (Almería). (a) Progenitor masculino Oria 6. (b) y (c) Panorámicas de la población natural de la Sierra de Oria. Fotografías tomadas en junio de 2018.

Genotipos seleccionados para los diseños experimentales

Para abordar el estudio de los genes expresados diferencialmente entre genotipos de *Pinus pinaster* sometidos a estrés hídrico se seleccionaron seis ramets de dos años de cuatro clones de la progenie, dos sensibles (4, 147) y dos tolerantes (132, 144) a sequía. Para su aclimatación, los 24 ramets se mantuvieron en una cámara de crecimiento (Fitoclima 10000EHHF, Aralab Ltd) durante dos meses bajo condiciones control: riego a capacidad de campo, 70% de humedad relativa, 20-25 °C de temperatura, un fotoperiodo de 16/8 y 13h de intensidad lumínica máxima a 800 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

El estudio transcriptómico y metabolómico del efecto del portainjerto sobre la respuesta a estrés hídrico de púas de *Pinus pinaster* se llevó a cabo analizando seis plantas de cada una de las cuatro construcciones diseñadas combinando genotipos con diferente grado de tolerancia a la sequía. Los injertos homoblásticos (púa y porta pertenecientes a una misma especie) estaban constituidos por dos individuos progenie, uno sensible (1) y otro tolerante (18) a la sequía, (de Miguel *et al.*, 2012 y 2014), empleados como portainjertos R1S y R18T, sobre los que se injertaron púas de los progenitores, Gal 1056 y Oria 6, pinos sensible y tolerante a la sequía, respectivamente.

Los injertos se llevaron a cabo en marzo de 2016 por un especialista del MAGRAMA en el Centro de Mejora Genética Forestal de Valsain (Segovia, España). Para ello, se utilizaron ramets de dos años de edad de los genotipos seleccionados como portainjertos. En diciembre de 2016, los injertos se trasplantaron a contenedores de 6 L y se trasladaron al invernadero del INIA-CIFOR durante dos meses. Posteriormente, los pinos injertados se aclimataron durante otros dos meses adicionales en cámaras de crecimiento (Fitoclima 10000EHHF, Aralab Ltd) con condiciones ambientales controladas de 14/10 h de fotoperiodo, 25-20 °C de temperatura media en los periodos de luz ($400 \text{ mmol de fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y oscuridad respectivamente, y 65-60 % de humedad relativa (Figura 2.2).



Figura 2.2. Injertos de *P. pinaster* establecidos para el estudio del efecto del portainjerto sobre el transcriptoma y metaboloma de la púa injertada en respuesta a sequía. (a) Progenitor femenino (Gal 1056) injertado sobre el portainjerto tolerante (R18T), y (b) sensible (R1S); (c) progenitor masculino (Oria 6) injertado sobre el portainjerto tolerante (R18T), y (d) sensible (R1S). Fotografías tomadas en junio del 2017.

DISEÑOS EXPERIMENTALES

En este estudio se llevaron a cabo dos diseños experimentales. Es importante señalar que debido a que el comportamiento estomático y, en general, el intercambio de gases en las hojas sigue un ritmo circadiano, y por tanto la respuesta fisiológica a sequía también varía a lo largo del día, la cosecha de las muestras tras los experimentos de simulación de sequía se llevó a cabo, en ambos casos, entre las 10 y las 15 h, cuando la conductancia estomática y las tasas fotosintéticas se encontraban en su punto más alto.

En el estudio de los genes expresados diferencialmente entre genotipos de *Pinus pinaster* sometidos a estrés hídrico, basado en el análisis de 24 ramets pertenecientes a cuatro genotipos, se empleó un estrés hídrico moderado. En el experimento, tres ramets de cada uno de los cuatro genotipos se sometieron a déficit hídrico, mientras que los tres ramets restantes, 12 en total, se mantuvieron en condiciones control, que fueron las mismas que las empleadas en la aclimatación. Las plantas control bien regadas (WW), se mantuvieron con un contenido volumétrico de agua en el suelo (VWC) superior al 20%, mientras que, en las plantas sometidas a estrés hídrico (WD), el VWC se redujo progresivamente a lo largo de 19 días hasta alcanzar el 5%, manteniendo estas condiciones durante 43 días adicionales (Sánchez-Gómez *et al.*, 2017). Al final del periodo de sequía, se recolectaron raíces, tallos y acículas de cada ramet y se almacenaron a -80°C (Figura 2.3).

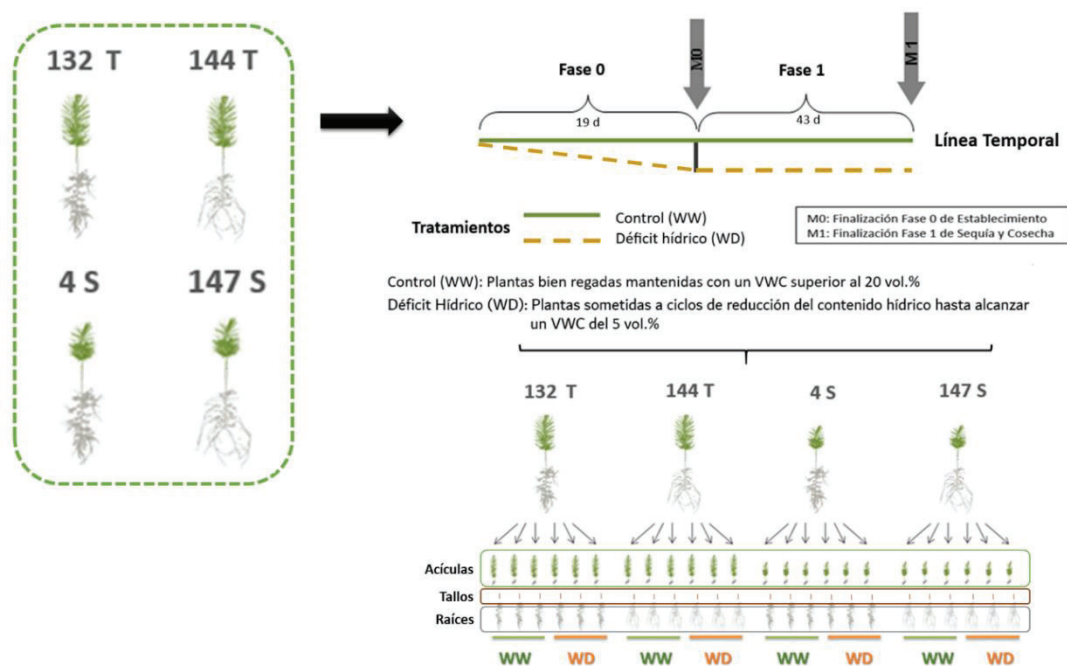


Figura 2.3. Esquema del experimento para estudiar los genes expresados diferencialmente entre genotipos de *Pinus pinaster* sometidos a estrés hídrico.

El estudio transcriptómico y metabólico del efecto del portainjerto sobre la respuesta a estrés hídrico de las púas de *Pinus pinaster* se llevó a cabo sometiendo tres de las 6 copias de cada tipo de injerto a estrés hídrico, manteniendo las otras tres en condiciones control. Las plantas, distribuidas aleatoriamente en dos cámaras de crecimiento, se sometieron, tras los dos meses de aclimatación, a patrones de riego distintos. Las plantas control (WW) se mantuvieron con las mismas condiciones de crecimiento que en la fase de aclimatación, descritas en el experimento anterior, con valores de VWC superiores al 20 vol.%, mientras que los injertos restantes se sometieron a un estrés hídrico moderado, reduciendo progresivamente el contenido hídrico del suelo hasta alcanzar el 5 vol.% durante 51 días, manteniéndolas en esta fase durante 13 días adicionales. Las acículas, los tallos de las púas, los tallos de los portainjertos, y las raíces, se cosecharon, congelaron en nitrógeno líquido y almacenaron a -80°C (Figura 2.4).

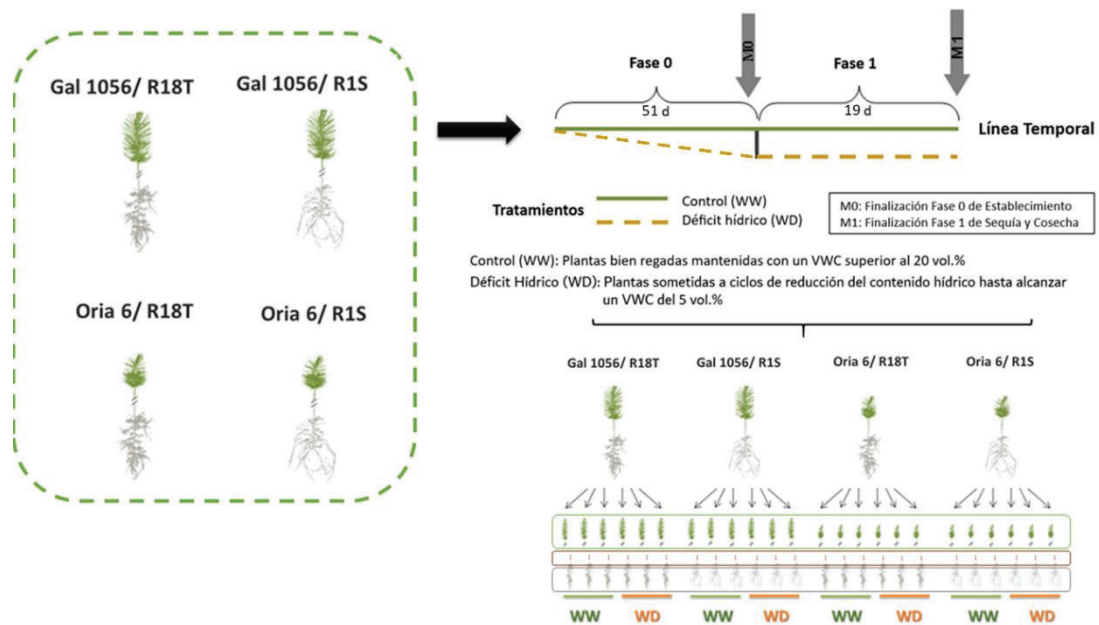


Figura 2.4. Esquema del experimento para estudiar el efecto del portainjerto sobre la respuesta de las púas de *Pinus pinaster* a estrés hídrico. A la izquierda se muestran las construcciones, en el panel superior derecho el esquema del experimento de sequía y en el panel inferior la distribución de los ramets en los distintos tratamientos así como la recolección individualizada de cada órgano.

EXTRACCIÓN DE ARNs, PREPARACIÓN DE LAS BIBLIOTECAS DE ADNc Y ANÁLISIS ARN-Seq

Cada muestra de cada órgano congelado, se trituró individualmente usando un molino CryoMill (Retsch), refrigerado con nitrógeno líquido. La extracción del ARN total de cada muestra para el estudio de los genes expresados diferencialmente entre genotipos de *Pinus pinaster* sometidos a estrés hídrico se llevó a cabo empleando el *kit PureLink Plant RNA Reagent Kit* (Invitrogen). Una vez extraídos, 100 µg de ARN total de cada muestra se digirieron con *RQ1 RNase-free DNase I* (Promega, Madison, EEUU) durante 30 min a 37 °C, y se purificaron utilizando el *Amicon Ultra 0,5 mL* (Millipore Corporation, Billerica, EEUU). La concentración de cada extracto de ARN total se realizó utilizando el *kit RNA MinElute CleanUp* (Qiagen). Para el estudio transcriptómico del efecto del portainjerto, la extracción del ARN total de cada muestra de acículas se llevó a cabo empleando el *kit Plant/Fungi Total RNA Purification®* (Norgen Biotek Corp., Thorold, ON, Canadá). La concentración de ARN se determinó midiendo el valor de absorbancia obtenido a una longitud de onda de 260 nm (Thermo Scientific, Nanodrop 1000). La pureza de los ARNs extraídos se estimó analizando las relaciones de absorbancias A260/A280 y A260/A230 nm para cada muestra, mientras que su integridad se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v). Finalmente, se analizaron utilizando el Bioanalizador 2100 y el *kit RNA 6000 Nano* (Agilent). Aquellas muestras con un Número de Integridad de ARN (RIN) superior a 7 se utilizaron para la preparación de las librerías de ADNc.

El estudio de los genes expresados diferencialmente entre genotipos de *Pinus pinaster* sometidos a estrés hídrico se llevó a cabo mediante un análisis de mezclas de ARN. Se prepararon 12 mezclas con cantidades equimolares de ARNs procedente de cada órgano (raíz, tallo y acículas), tanto de las muestras control WW (mezclas 1-3), como sometidas a déficit hídrico, WD (mezclas 4-6), de los ramets de los genotipos sensibles a la sequía, como en las muestras respectivas WW (mezclas 7-9) y WD (mezclas 10-12) de los ramets tolerantes a la sequía (Figura 2.5). Estas mezclas se emplearon como molde para la construcción de las 12 librerías de ADNc. La retrotranscripción de los ARNs a ADNc se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Mint-2 (Biocat), empleando posteriormente una nucleasa específica de heterodúplex (DSN) para la normalización siguiendo el protocolo de Trimmer (Biocat). Una vez obtenidos los diferentes ADNc se procedió a la eliminación de las colas poliA, que interfieren en la secuenciación, mediante el tratamiento con el enzima GSU I. Los ADNc se emplearon para la construcción de las librerías de secuenciación siguiendo el protocolo *Rapid Library Preparation Method Manual*. Se emplearon adaptadores de secuenciación que incluían MIDs (código de secuencias para identificación de las muestras) lo que permitió secuenciar conjuntamente varias muestras en una misma carrera. La secuenciación de las 12 librerías ADNc se llevó a cabo empleando el protocolo *Sequencing Method Manual - GS FLX+ /XLR70* en la plataforma GS-FLX 454 de Roche de ADM Lifesequencing S.L. (Valencia, España).

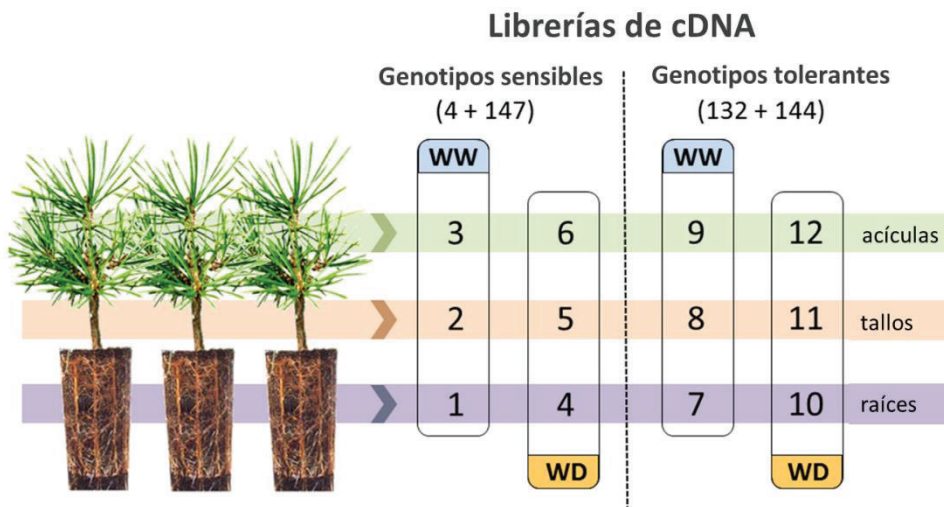


Figura 2.5. Resumen de las 12 muestras analizadas que corresponden a las 12 mezclas de genotipos sensibles o tolerantes, tratamiento (WW o WD) y órgano. Figura de Nuria *et al.*, (2020).

Para el estudio transcriptómico del efecto del portainjerto sobre la respuesta a estrés hídrico de las acículas de púas de *Pinus pinaster* se construyeron 24 librerías ADNc utilizando el kit *Illumina TruSeq RNA library Prep v2*. La secuenciación de las 24 librerías se llevó a cabo en la plataforma Illumina NextSeq 500 de ADM Lifesequencing S.L. (Paterna, Valencia, España).

PROCESAMIENTO DE SECUENCIAS Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL

Las lecturas GS-FLX 454 e Illumina asociadas a los dos estudios llevados a cabo se procesaron empleando dos estrategias de análisis diferentes:

1. El estudio de los genes expresados diferencialmente comparando genotipos de *Pinus pinaster* con distinto grado de tolerancia a sequía sometidos a estrés hídrico, empleando mezclas de ARNs, se llevó a cabo mediante un mapeo inicial de las lecturas filtradas contra el transcriptoma de referencia de *Pinus pinaster*, seguido del ensamblaje *de novo* de las lecturas no mapeadas para la identificación de nuevos transcritos, generando así un nuevo transcriptoma resultante de la suma de ambos.

El análisis bioinformático se inició con un estudio de la calidad de las lecturas tanto antes como durante el procesamiento de las secuencias usando el software FastQC (Andrews, 2010). El procesamiento de las lecturas se llevó a cabo en varias fases. Primero se eliminaron secuencias con un factor de calidad ($Q \leq 20$), secuencias que presentaban alto grado de similitud con microorganismos o plástidos, y/o de baja complejidad, empleando el software SeqTrimNext (Falgueras *et al.*, 2010). El segundo filtrado eliminaba lecturas procesadas que mostraban secuencias sobreexpresadas o con una proporción alta de contenido Kmer; también se eliminaron los 50 pb de los extremos finales utilizando el kit FastX. Los análisis posteriores se llevaron a cabo empleando el software CLC Genomics Workbench 10 (CLC Bio, Aarhus, Dinamarca). Las lecturas se mapearon contra todos los transcritos contenidos en el transcriptoma de referencia de *Pinus pinaster* disponible en la web PLAZA (Proost *et al.*, 2009). Las lecturas no mapeadas se recuperaron y se ensamblaron *de novo* para la identificación de potenciales nuevos transcritos de más de 200 pb, que serían añadidos al transcriptoma para su uso en los siguientes pasos (Figura 2.6).

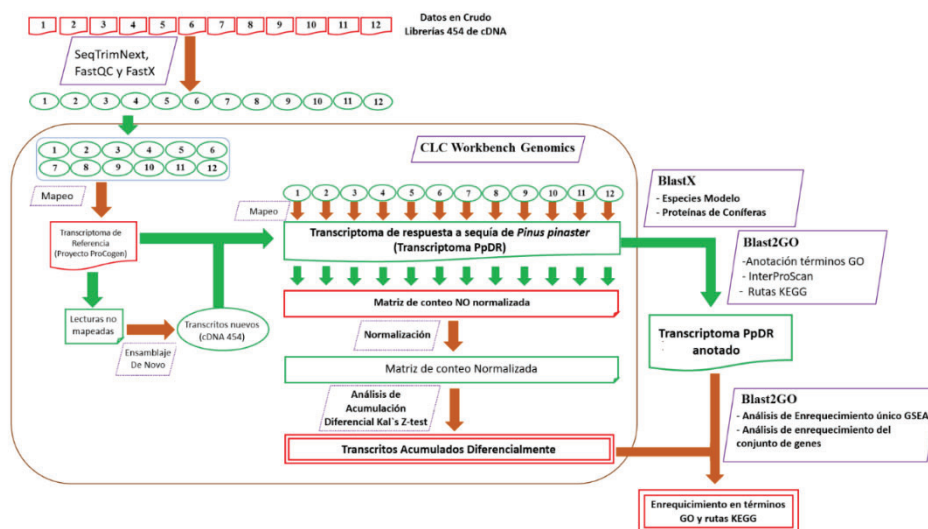


Figura 2.6. Diagrama de flujo del procesamiento de secuencias y del análisis de expresión diferencial. Figura adaptada de Nuria *et al.*, 2020.

El nuevo transcriptoma generado se reanotó utilizando la base de datos de proteínas RefSeq y un subconjunto de especies vegetales modelo ricas en anotaciones funcionales, así como la base de datos de PineRefSeq (<http://congenie.org/>), que contiene proteínas codificadas procedentes de genomas de coníferas secuenciados, utilizando para ambas bases de datos un umbral de valor e de 10^{-5} . El transcriptoma anotado fue importado al software Blast2GO de OmicsBox v1.2.4 (Conesa *et al.*, 2005) para determinar la Ontología Genética (GO) de las diferentes ontologías GO (proceso biológico, función molecular y componente celular) asociadas a los genes homólogos en especies modelo. Se realizaron anotaciones adicionales según la similitud con familias, dominios y sitios funcionales proteicos utilizando el Software InterProScan, también se analizaron las vías KEGG activas (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; Kanehisa, 2000), y se filtraron las anotaciones GO según el software Plant GO-Slim implementado en OmicsBox v1.2.4 (Figura 2.6). Las lecturas de cada biblioteca se mapearon contra el transcriptoma generado, descartando aquellas con múltiples posiciones de mapeo. Se utilizó la prueba Kal's Z test implementada en el software CLC Genomics Workbench v.10 (CLC Bio, Aarhus, Dinamarca) para el análisis estadístico de los genes expresados diferencialmente (GEDs). Se determinó que para la detección de un GED se debían cumplir tres condiciones: valor $p < 0,005$; valor de Fold Change (FC) $< -1,5$ ó $> 1,5$; y diferencia en los valores de recuento superior a 5.

Este estudio permitió la identificación de genes expresados diferencialmente, así como de genes expresados constitutivamente al comparar plantas WW y WD a nivel de los órganos de los genotipos tanto sensibles como tolerantes. Este análisis posibilitó la identificación de genes específicos de órgano, agrupando los datos de raíz, tallos y acículas utilizando el paquete Limma (Ritchie *et al.*, 2015) del software Babelomics 5.0 (Alonso *et al.*, 2015) con un valor p corregido de False Discovery Rate (FDR) $< 0,001$. El enriquecimiento de los términos GO se analizó utilizando el software FatiGO implementado en OmicsBox (Al-Shahrour *et al.*, 2007), considerando valores $p < 0,05$. Los diagramas de Venn se obtuvieron utilizando el software Venny 2.1 (Oliveris, 2015). El análisis de enriquecimiento de las vías KEGG se llevó a cabo utilizando el software GSEA (Subramanian *et al.*, 2005) incluyendo todos los genes expresados diferencialmente según la prueba estadística de Kal's Z. Los análisis se realizaron con 1.000 permutaciones de conjunto de genes y las rutas con valores $p < 0,05$ se consideraron correlaciones positivas o negativas.

2. El estudio transcriptómico del efecto de los portainjertos sobre la respuesta a estrés hídrico de acículas de púas de *Pinus pinaster* se llevó a empleando un ensamblaje *de novo* de las lecturas filtradas seguido de un mapeo frente al transcriptoma de referencia de esta especie. El análisis bioinformático se inició con un estudio de las lecturas sin procesar procedentes de la secuenciación de las 24 bibliotecas de ADNc de las acículas de los injertos analizados empleando el software FastQC, para descartar las secuencias flanqueantes y las lecturas de baja calidad ($Q < 20$), así como las secuencias cortas < 30 pb utilizando el software reformat.sh (Bushnell, 2014). También se llevó a cabo la eliminación del ARN ribosómico con el software Sortmerna (Kopylova *et al.*, 2012). Las lecturas filtradas se mapearon contra el transcriptoma de referencia de *Pinus pinaster* descrito en el apartado anterior, aplicando un método de quasi-mapeo con un tamaño kmer > 31 pb mediante el uso

del software Salmon (Patro *et al.*, 2017). Los genes se anotaron funcionalmente utilizando la herramienta BlastX implementada en el software OmicsBox v1.2.488 contra las siguientes bases de datos: secuencias de proteínas no redundantes del NCBI (nr) (O'Leary *et al.*, 2016), SwissProt (Bairoch y Apweiler, 2000) e Interprot (Hunter *et al.*, 2009), con un porcentaje de identidad superior al 55% y un valor e de corte (cutoff e-value) de 10^{-6} .

Si la alineación de las lecturas con las diferentes bases de datos mostraba resultados no coincidentes, se priorizó aquellos obtenidos con SwissProt, nr e InterPro, por ese orden. Además, se utilizó la herramienta KEGG Ortholog para la identificación de redes de interacción molecular, y los softwares de anotación de Ontología Genética (GO) y Plant GO-Slim, implementados en OmicsBox v1.2.488 para determinar las diferentes ontologías GO. Por último, las funciones de los genes identificados se evaluaron comparándolas con Sustainpine, la base de datos de *Pinus pinaster* (<http://www.scbi.uma.es/sustainpine/>).

Para la estimación de los niveles de expresión diferencial, se llevó a cabo un análisis cuantitativo utilizando el software Salmon y el paquete en R, DESeq2, según los procedimientos descritos en Love *et al.*, (2014). Las cuantificaciones se modelaron para cada gen, calculando los factores de tamaño y dispersión, con el fin de obtener estimaciones más precisas. Los factores de corrección de los tamaños de las librerías se calcularon utilizando el método de normalización de las medias de ratios (Anders y Huber, 2010) implementado en el paquete DESeq2, y aquellos genes que presentaban un valor p corregido de $FDR \leq 0,05$, valores de $\text{Log}_2 \text{FC} \leq -1,5$ ó $\geq 1,5$, y un recuento de genes ≥ 5 , se consideraron como GEDs. La clasificación funcional de los GEDs identificados se visualizó gracias a herramientas implementadas en el software MapMan (Usadel *et al.*, 2009). El análisis de expresión génica diferencial perseguía dos objetivos principales: (1) la identificación de GEDs en las acículas de las púas de cada planta, en función del portainjerto sobre el que se injertaron, en condiciones control, y (2) en respuesta a sequía.

VALIDACIÓN DE LOS DATOS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (RT-qPCR)

Para validar tanto el estudio transcriptómico realizado con genotipos sensibles y tolerantes de la progenie de *Pinus pinaster*, como el estudio transcriptómico del efecto de los portainjertos sobre la respuesta a estrés hídrico de acículas de púas de *Pinus pinaster*, se analizó la expresión de un conjunto de GEDs mediante RT-qPCR (Tabla 2.1 y Tabla 2.2). La RT-qPCR es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa que emplea transcriptasa inversa para retrotranscribir el ARN en ADNc antes de ser amplificado mediante PCR cuantitativa, permitiendo cuantificar el producto. Los cebadores específicos de los genes analizados en ambos estudios se diseñaron utilizando la herramienta NCBI Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), empleando el transcrito 18S rARN como control interno, para estimar la acumulación de transcritos. La síntesis de ADNc se llevó a cabo a partir de 500 ng de ARN total utilizando el sistema de síntesis de primera cadena SuperScript III (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La qPCR se llevó a cabo en un termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR, utilizando FastStart Universal SYBR Green Master (Rox; Roche). Se analizaron tres réplicas biológicas de cada ramet y genotipo, y se realizaron tres réplicas técnicas de cada réplica biológica. La qPCR se llevó a cabo con 12,5 ó 25 ng de ADNc, 500 nM de cebador directo, 500 nM de cebador inverso y 1x SYBR Green Master, con un programa que contaba con un paso inicial de 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 60 s a 60 °C. Se incluyó un análisis de curva de fusión para verificar la especificidad de cada cebador. La expresión relativa se calculó mediante el método $\Delta\Delta C_t$ ($C_t = \text{ciclo de umbral}$) utilizando el software 7500 (Life Technologies).

Tabla 2.1. Validación RT-qPCR de la expresión de GEDs resultante del estudio ARN-Seq de los genes expresados diferencialmente comparando genotipos de *Pinus pinaster* con distinto grado de tolerancia a sequía, sometidos a estrés hídrico. GEDs analizados y secuencias de los cebadores directos y reversos utilizados. Figura adaptada de Nuria *et al.*, (2020).

Nombre del Gen	Código del Gen	ID del transcrito	Cebador directo	Cebador reverso
Glutathione S-transferase	GST	isotig52506	TCCGGACCCCTTAAGGTT	ATGGCTACGCTGATGCAAGT
Two pore calcium channel protein 1-like	TPCN1	isotig42200	TTGCTGAAACAGAGCTTGCG	GACCTTTTACGCTTTGGGGG
Transcription factor BTF3 homolog 4-like	BTF3L4	Ppter_PINCOSEQ_WS_contig_2062	TCGCAGCAGAGGAATATCGG	AACTGCACCAGCCATCTTCA
Heat shock 70 kDa mitochondrial-like	HSP68	unigene9725	GTGGATCTCAAGGGGAGAC	AGATAACCTCAGATTGACCTCA
Ras-related protein RABC1	RABC1	unigene9128	CTCGAGGCAATGACCCATGT	AGTGATTTCATACCCCTCAAGGA
D-tyrosyl-tRNA deacylase	DTD	unigene27014	TGATGGCAGTGCAAGTAGAGG	TGCACCTGAATTTGGATGGGA
R18S			GCGAAAGCATTGCCAAGG	ATTCTGTGTCGGCATCGTTTA

Tabla 2.2. Validación RT-qPCR de la expresión de GEDs resultante del estudio ARN-Seq del efecto del portainjerto sobre la respuesta a estrés hídrico de acículas de púas de *Pinus pinaster*. GEDs y secuencias de los cebadores directos y reversos utilizados.

Gene	Code	Transcript ID	Forward primer	Reverse primer
DREB transcription factor	DREB	unigene20075	CTCATCCAGAAAACGTCGG	TACCAATACTTCCGGGGTGG
pre-mRNA-processing protein	LUC7	isotig26861	TTTTGACATGGGCAGTTGCG	TGAGCAGAAGTGGACGAGAG
Outer mitochondrion membrane TOM translocation system	TOM	isotig128281	TGAGGAGCGTACTTCCGAAT	TCGATTGAGCAAGGGATTGCC
C2H2-ZF transcription factor	C2H2-ZF	unigene16552	GCCCAACTTCAGGTAAGGCA	CTTTCCTCCCCTCTGCTTG
Macrophage migration inhibitory factor	MIF	unigene209604	TGTGACTACAACAACCTAGTTCA	ATGTCAAGTGGCACCACATTTT
Ri18S			GCGAAAGCATTGCCAAGG	ATTCCTGGTCGGCATCGTTTA

EXTRACCIÓN DE METABOLITOS

Las mismas muestras de acículas molidas que habían sido utilizado para la extracción de ARN en los estudios transcriptómicos, junto con las moliendas de las muestras de tallos de púas, tallos de portainjertos y de raíces, se emplearon para la extracción de metabolitos en el análisis de las variaciones de los perfiles metabolómicos inducidos por las púas o por los portainjertos en respuesta a sequía (Figura 2.8).

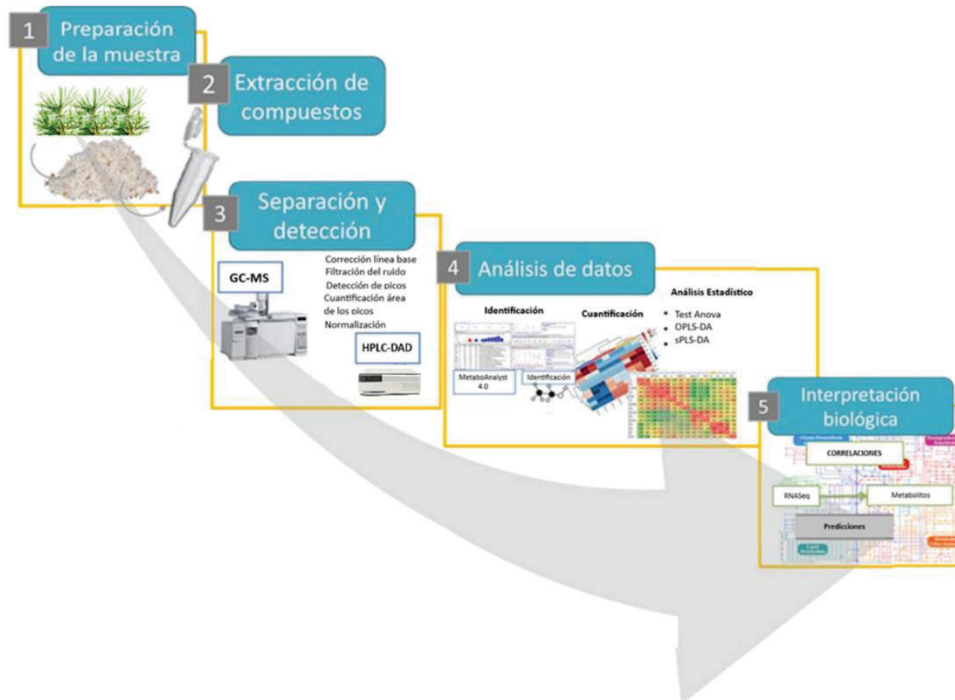


Figura 2.8. Flujo de trabajo en el análisis metabolómico de las muestras de acículas, tallos de púas, tallos de portainjertos y raíces de los injertos de *Pinus pinaster* en respuesta a sequía. Figura adaptada de Alonso *et al.*, 2015.

La extracción de metabolitos se realizó en dos etapas. Primero se extrajeron los terpenos y ácidos grasos mediante solventes no polares, siguiendo el procedimiento que se describe en Fernández de Simón *et al.* (2001), utilizando 1 mL de éter de petróleo/éter dietílico (1:1 v/v) con isobutilbenceno, heptadecano y ácido heptadecanoico (concentración 0,025 mg mL⁻¹) como patrones internos, para extraer aproximadamente 250 mg de muestra. El extracto se utilizó directamente para el análisis de terpenos volátiles neutros por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS). Para el análisis de los ésteres metílicos de ácidos grasos y resínicos, se tuvo que llevar a cabo la eliminación previa del disolvente, la redisolución del residuo obtenido en 1 mL de metanol, y la adición de 50 µL de reactivo de metilación (hidróxido de tetrametil amonio). El resto de metabolitos se extrajeron a continuación como se describe en Fernández de Simón *et al.* (2017), utilizando 200 µL de cloroformo en baño de

ultrasonidos durante 15 min a temperatura ambiente, y 800 μL de agua/metanol (1:3 v/v) con el estándar interno (metil- β -D- galactopiranosido a 2 mg mL⁻¹) en baño de ultrasonido durante otros 20 min, para extraer 5 mg de muestra. El extracto se centrifugó y se tomaron dos alícuotas de 300 μL de sobrenadante, que se secaron mediante una corriente de nitrógeno. En una de las alícuotas ya seca se obtuvieron los derivados trimetilsililados de sus componentes previamente al análisis por GC-MS. Para ello se añadieron 30 μL de una solución de 20 mg/mL de clorhidrato de metoxiamina en piridina, calentándolo a 60 °C durante 4 h, y añadiendo 30 μL de MSTFA (N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide), manteniéndolo durante 1 h a temperatura ambiente. La otra alícuota seca se redisolvió con una mezcla de agua-metanol (1:1), y 10 μl se analizaron mediante HPLC-DAD. Cada extracción se llevó a cabo por duplicado.

ANÁLISIS DE METABOLITOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS), CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS-DETECTOR DE DIODO ARRAY (HPLC-DAD) Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los extractos se analizaron utilizando un sistema GC Agilent 6890N (Palo Alto, California, EEUU) equipado con un espectrómetro de masas de cuadrupolo simple Agilent 5973N, como se describe en Fernández de Simón *et al.* (2017), trabajando siempre en modo de bloqueo del tiempo de retención (RTlock) para reducir la variación del tiempo de retención de una carrera a otra. Se utilizó una columna capilar Agilent HP-5 (30 m x 0,25 mm i. d., espesor de película de 0,25 μm) con helio como gas portador. Las condiciones cromatográficas para el análisis de terpenoides y ácidos grasos libres se describen en Arrabal *et al.* (2014): temperatura del inyector, 260 °C; temperatura de la columna, 60 °C durante el split (2 min, 5:1) calentando después a 4 °C min^{-1} , hasta 272 °C (manteniéndolo 10 min); flujo constante 1 mL min^{-1} ; línea de transferencia del detector de MS, 290 °C (fuente 230 °C y cuadrupolo 150 °C); detección en modo de impacto electrónico con una energía de ionización de 70 eV, en un rango de m/z 35-400. Para el extracto trimetilsililado se utilizó el método Fiehn preprogramado suministrado en el software Agilent G1676AA Fiehn GC/MS Metabolomics RTL Library (2013). Las condiciones cromatográficas fueron: temperatura del inyector, 250 °C; temperatura de la columna, 60 °C durante el split (1 min, 10:1), calentando después a 10 °C min^{-1} , hasta 325 °C (manteniéndolo 10 min); flujo constante 0.8 mL min^{-1} ; línea de transferencia del detector de MS, 290 °C (fuente 230 °C y cuadrupolo 150 °C); detección en modo de impacto electrónico con una energía de ionización de 70 eV, en un rango de m/z 50-600. La identificación de los compuestos se realizó comparando sus índices de retención (usando los hidrocarburos C8-C40 como patrones internos) y los patrones de fragmentación de los espectros de masas con los de: i) una biblioteca de referencia interna construida con unos 300 patrones comerciales que fueron analizados en las mismas condiciones, ii) bibliotecas comerciales de espectros de masas (Agilent Fiehn GC-MS Metabolomics RTL Library, Wiley7/Nist05 GC/MS Library y Adams, 1989) con una coincidencia mayor al 95%, y iii) datos publicados en la literatura científica. Para la determinación cuantitativa de cada compuesto, se utilizó el método de patrón interno, empleando las áreas de los picos obtenidas mediante la monitorización de iones seleccionados. Las calibraciones realizadas con compuestos puros de referencia, analizados en las mismas condiciones, se utilizaron para calcular las concentraciones de cada compuesto cuando el estándar de referencia puro no estaba disponible o cuando los compuestos no estaban totalmente identificados.

El análisis de compuestos polifenólicos se llevó a cabo empleando un sistema de cromatografía líquida (LC) Agilent 1100 L equipado con un detector de diode array (DAD), y software Chemstation for LC 3D systems Rev B.03.02 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Columna Hypersil ODS C18 (200 mm x 4 mm i.d., tamaño de partícula de 5 μm), mantenida a 30 °C y protegida con una pre-columna del mismo material (4 mm x 4 mm i.d.) (Agilent Technologies). La detección se realizó a 325 \pm 150 nm, obteniéndose también los espectros UV/Vis (190-400 nm). Las condiciones de elución fueron: flujo, 1 mL min^{-1} ; temperatura, 30 °C; solvente A = agua/ácido fosfórico (999/1, v/v), solvente B = metanol/ácido fosfórico (999/1, v/v); gradiente, 0–20 min,

100–85% A, 20–30 min, 85–75% A, 30–50 min, 75–50% A, 50–70 min 50–0% A, 70–75 min 0% A. La identificación de los compuestos se basó en un análisis anterior mediante LC-DAD-QTOF (Liquid Chromatography-Diode Array Detector-Quadrupole Time-of-flight) (Fernández de Simón *et al.*, 2017). La cuantificación de compuestos se llevó a cabo mediante el método de patrón externo. La concentración de cada sustancia se midió comparándola con una calibración realizada con el compuesto estándar puro analizado en las mismas condiciones. Se utilizó la calibración de un compuesto estructuralmente similar cuando no se disponía del estándar de referencia puro. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software de código abierto MetaboAnalyst 4.0 (Chong *et al.*, 2018). Los datos brutos se transformaron logarítmicamente, se escalaron en Pareto y se sometieron a un análisis univariante y multivariante. Se realizó una prueba univariante (ANOVA) para cada compuesto con el fin de evaluar los cambios significativos con respecto a las muestras utilizadas como control. Para analizar las diferencias significativas se aplicaron las pruebas de Tukey-HSD y FDR, obteniendo los valores ajustados de p (q-values), considerando significativos los inferiores a 0,05. Con el fin de identificar compuestos clave que pudieran discriminar entre las acículas según el genotipo de la púa (Gal 1056 vs Oria 6) o del portainjerto (R1S vs R18T), se realizó un análisis multivariante en las muestras control mediante análisis discriminantes de mínimos cuadrados parciales ortogonales, OPLS-DA. También se realizó otro análisis OPLS-DA utilizando la sequía como variable dependiente, para intentar detectar aquellos compuestos que sufren cambios cuantitativos intensos provocados por la sequía. En los análisis OPLS-DA, se tuvieron en cuenta aquellos valores de correlación con $p > 0,5$ respecto al componente predictivo para la identificación de metabolitos con mayor carga en el modelo. Además, la capacidad predictiva (Q^2) del modelo se utilizó como criterio de calidad. Por último, se llevó a cabo un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales escasos (sPLS-DA) considerando conjuntamente los factores de sequía (WW vs WD) y genotipo de la púa (Gal 1056 vs Oria 6) y portainjerto (R1S vs R18T). El análisis sPLS-DA clasifica las muestras seleccionando las características más predictivas o discriminativas de entre todos los datos (Lê Cao *et al.*, 2011). La bondad estadística de los modelos multivariantes sPLS-DA, se evaluó utilizando una validación cruzada (CV) de cinco veces con un número creciente de cinco componentes (5) creados utilizando un número específico de variables (50).

CAPÍTULO III. RESULTADOS

ESTUDIO DE LOS GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN PLANTAS DE *PINUS PINASTER* SOMETIDAS A ESTRÉS HÍDRICO: ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE ACÍCULAS, TALLOS Y RAÍCES DE GENOTIPOS QUE MUESTRAN DISTINTO GRADO DE TOLERANCIA A SEQUÍA

Basado en el artículo: Nuria de María, María Ángeles Guevara, Pedro Perdiguero, María Dolores Vélez, José Antonio Cabezas, Miriam López-Hinojosa, Zhen Li, Luis Manuel Díaz, Alberto Pizarro, José Antonio Mancha, Lieven Sterck, David Sánchez-Gómez, Célia Miguel, Carmen Collada, María Carmen Díaz-Sala and María Teresa Cervera (2020) Molecular study of drought response in the Mediterranean conifer Pinus Pinaster Ait.: differential transcriptomic profiling reveals constitutive water deficit-independent drought tolerance mechanisms. Ecology and Evolution. 10(18): 9788-9807.

El objetivo de este estudio fue profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la respuesta a sequía de acículas, tallos y raíces de genotipos de *Pinus pinaster* que muestran distinto grado de tolerancia a sequía. Este trabajo se centra en la disección de la respuesta a estrés hídrico, a nivel transcriptómico, de genotipos seleccionados procedentes de una familia que segrega para la tolerancia/sensibilidad a dicho estrés, caracterizada previamente (de Miguel *et al.*, 2012a, 2014, 2016). En concreto, y de acuerdo con lo previamente descrito en materiales y métodos, el estudio se centró en cuatro genotipos, los individuos de la progenie 4 y 147 sensibles y 132, 144, tolerantes a la sequía, cada uno representado por 6 ramets. Tras someter a la mitad de las plantas de cada clon a estrés hídrico, mientras que las restantes se mantenían en condiciones control, y recoger las muestras de los distintos órganos, conservándolos a -80 °C, se procedió a la extracción del ARN con los que se construyeron 12 librerías ADNc, que representaban ARN de los genotipos sensibles o tolerantes en condiciones control o sequía, para cada uno de los tres órganos analizados (acículas, tallos y raíces) (Figura 2.3). Las lecturas resultantes de la secuenciación GS-FLX 454 de las librerías ADNc se analizaron siguiendo el flujo de trabajo desarrollado en la Figura 3.1.

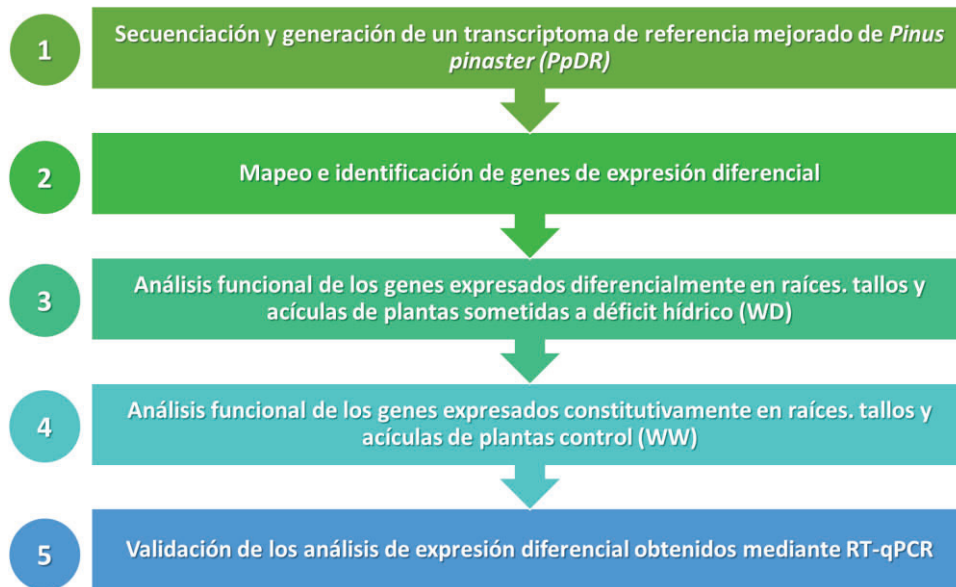


Figura 3.1. Flujo de trabajo aplicado en el estudio del transcriptoma para la identificación de genes expresados de manera constitutiva y diferencial en genotipos de *Pinus pinaster* tolerantes y sensibles a sequía, en respuesta a estrés hídrico.

Secuenciación y generación de un transcriptoma de referencia mejorado de Pinus pinaster (PpDR)

La secuenciación de las 12 librerías dio lugar a un total de 2.416.362 lecturas, con una longitud media de 352 nucleótidos, de las que, aproximadamente el 85% fueron mapeadas contra el transcriptoma de referencia de ProCoGen, integrado por 191.544 transcritos. Las lecturas restantes que no habían sido mapeadas, se utilizaron para realizar un ensamblaje *de novo*, que permitió identificar 8.700 nuevos transcritos con una longitud media > 200 pb. Estos transcritos se incorporaron al transcriptoma de referencia, obteniendo el transcriptoma de respuesta a sequía de *Pinus pinaster* (PpDR), integrado por 200.244 transcritos. El número total de transcritos incluidos en el transcriptoma PpDR es muy superior al observado en transcriptomas ensamblados de otras especies de coníferas como los obtenidos para *Pinus taeda* 2.0 con 50.172 secuencias (Neale *et al.*, 2014, Zimin *et al.*, 2017), *Pinus lambertiana* 1.5 con 71.117 secuencias (Stevens *et al.*, 2016; Crepeau *et al.*, 2017), *Picea Abies* 1.0 con 58.587 secuencias (Nystedt *et al.*, 2013), o *Picea glauca* 3.0 con 102.915 secuencias (Warren *et al.*, 2015).

Este resultado indica la existencia de un importante grado de redundancia en el transcriptoma generado. Esta redundancia podía atribuirse tanto a errores técnicos asociados a las diferentes tecnologías de secuenciación masiva empleadas (Luo *et al.*, 2012), a variantes en los procesos biológicos (Ahuja y Neale, 2005), y a la alta diversidad genética observada en *Pinus pinaster* (Mariette *et al.*, 2001). Es por ello, que

en los sucesivos análisis se evitó realizar mapeos múltiples, y se consideró únicamente la mejor coincidencia como aquella más probable en los análisis de expresión diferencial. Los datos obtenidos de los procesos de secuenciación, filtrado y mapeo se detallan en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Resumen del número de transcritos obtenidos para cada genotipo, tratamiento y órgano tras los procesos de secuenciación, procesamiento y mapeo de las lecturas de cada biblioteca. Figura adaptada de de María *et al.*, (2020).

GENOTIPO	GENOTIPOS SENSIBLES A SEQUÍA (4 Y 147)						GENOTIPOS TOLERANTES A SEQUÍA (132 Y 144)					
	CONTROL (WW)			DÉFICIT HÍDRICO (WD)			CONTROL (WW)			DÉFICIT HÍDRICO (WD)		
TEJIDO	RAÍCES	TALLOS	ACÍCULAS	RAÍCES	TALLOS	ACÍCULAS	RAÍCES	TALLOS	ACÍCULAS	RAÍCES	TALLOS	ACÍCULAS
NÚMERO DE BIBLIOTECA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
LECTURAS SIN PROCESAR	194.839	130.159	191.484	219.310	150.111	181.699	243.036	179.117	175.323	253.378	228.029	269.877
RECHAZADO POR SEQTRIMNEXT	17.885	26.510	38.202	25.248	29.895	35.773	28.793	29.053	32.293	38.837	38.592	54.587
BAJA COMPLEJIDAD	6.336	2.506	2.921	6.888	2.801	2.899	7.265	3.034	3.011	7.420	4.038	4.180
CONTAMINACIÓN	1.480	2.506	2.626	1.341	1.920	4.069	1.485	1.334	3.745	1.849	1.538	6.375
TAMAÑO	9.145	15.884	25.173	14.836	19.075	22.499	16.701	19.120	19.661	23.316	25.187	34.047
INSERTO VACÍO	924	5.614	7.482	2.183	6.099	6.306	3.342	5.565	5.876	6.252	7.829	9.985
LECTURAS TRAS EL PROCESAMIENTO CON SEQTRIMNEXT	176.954	103.649	153.282	194.062	120.216	145.926	214.243	150.064	143.030	214.541	189.437	215.290
NÚMERO DE LECTURAS MAPEADAS	138.318	88.050	128.626	161.454	101.633	122.008	172.558	126.278	120.325	176.117	158.795	180.636
LECTURAS NO REDUNDANTES	26.588	18.697	20.071	27.690	21.808	19.421	30.570	22.310	18.208	33.672	23.758	21.662

La anotación del transcriptoma PpDR se llevó a cabo empleando las bases de datos RefSeq y PineRefSeq, que contienen información codificante de proteínas de especies vegetales modelo y de coníferas, obteniendo 79.290 y 29.539 secuencias anotadas en cada una de ellas, respectivamente (Figura 3.2a). Un total de 91.415 transcritos no pudieron ser anotados, lo que podría explicarse, en gran medida, por el elevado número de secuencias no codificantes (lncARNs) y potenciales pseudogenes que se observan en estos genomas (Buschiazzi *et al.*, 2012). Se observó una similitud significativa con dominios conocidos en 92.499 transcritos, y 62.714 de ellos fueron anotados con 456.783 términos GO. La mayoría de las asignaciones ontológicas pertenecían a la categoría “Procesos biológicos” (53,1%), mientras que el 27,5% y el 19,4% estaban relacionados con las categorías “Componente celular” y “Función molecular”, respectivamente (Figura 3.2b). Además, 13.283 transcritos fueron anotados con 1.001 números de la Comisión de Enzimas (EC) y asignados a 145 rutas KEGG.

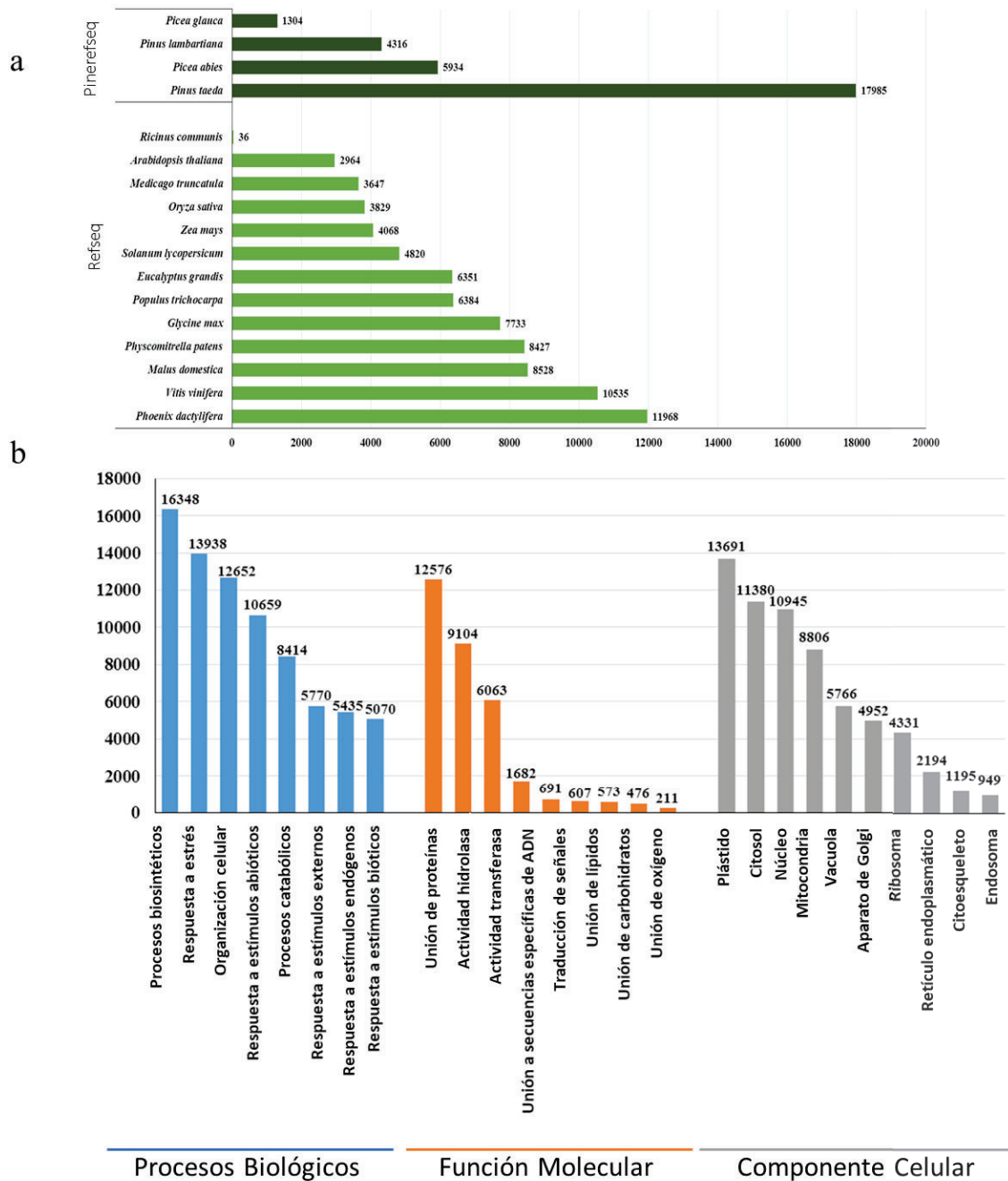


Figura 3.2. Resultados de BlastX en las bases de datos RefSeq y PineRefSeq (a), y de la anotación ontológica (b). Figura adaptada de de María *et al.*, (2020).

Mapeo e identificación de genes con expresión diferencial

Las lecturas filtradas de cada librería fueron mapeadas de manera independiente contra el transcriptoma PpDR ensamblado. Se detectaron un total de 73.246 transcritos que presentaban al menos una lectura en cualquiera de las bibliotecas de ADNc. Además, al analizar los tres órganos de manera aislada, se observó que las raíces contenían el mayor número de transcritos (> 25.000), seguidas de tallos y acículas, y que existían grupos de genes cuya expresión diferencial estaba muy relacionada con el órgano analizado. En acículas, se detectó el mayor número de genes específicos (53), seguido de raíces (25) y tallos (8). Más del 50% de los genes identificados en acículas estaban asociados con proteínas cloroplásticas. Además, el análisis de enriquecimiento de los genes específicos de las muestras de acículas, mostró un número significativo de términos GO relacionados con procesos biosintéticos, lipídicos, fotosintéticos y relacionados con metabolismo (Figura 3.3).

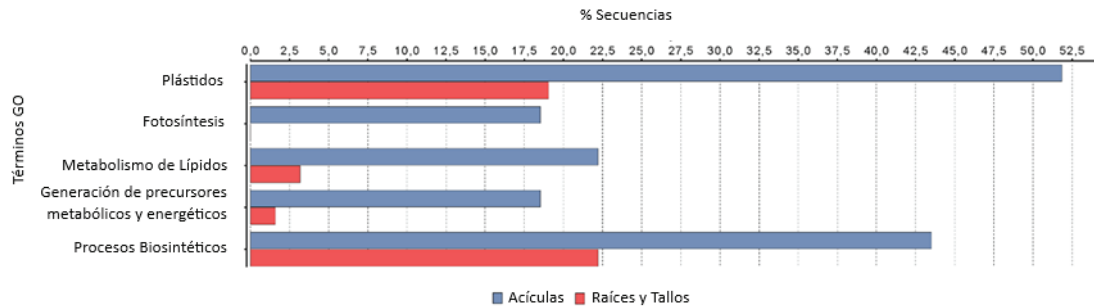


Figura 3.3. Acumulación de transcritos en los órganos estudiados. Análisis de enriquecimiento simple de los transcritos acumulados específicamente en acículas (azul) con respecto a los transcritos acumulados exclusivamente en raíces y tallos (rojo). Figura adaptada de de María *et al.*, (2020).

El análisis de expresión diferencial realizado mediante el test de Kal's Z ($P < 0,005$), permitió identificar un total de 6.215 GEDs asociados con la respuesta a estrés hídrico. Los diagramas de Venn (Figura 3.4) ilustran los genes expresados que son compartidos o son únicos al comparar los transcriptomas de los genotipos con distinto grado de tolerancia a sequía, a nivel de órgano, tanto en plantas control como en plantas sometidas a estrés hídrico. El número de genes expresados exclusivamente en plantas sensibles frente a tolerantes difería según el órgano analizado: raíces y acículas mostraban un menor número de genes en plantas sensibles (222 y 177, respectivamente) frente a tolerantes (231 y 199, respectivamente), mientras que en tallo se observó la tendencia contraria (241 y 157 genes en plantas sensibles frente a tolerantes, respectivamente).

El porcentaje de genes específicos de respuesta a sequía observado en tallos y acículas fue similar en plantas sensibles y tolerantes sometidas a déficit hídrico (79% en tallos de ambos tipos de plantas, y 63% y 64% en acículas de plantas sensibles y tolerantes, respectivamente), mientras que difería en las muestras de raíz, observando un porcentaje significativamente superior de genes sólo detectados en los genotipos plantas tolerantes, 71%, frente al 49% observado en genotipos sensibles.

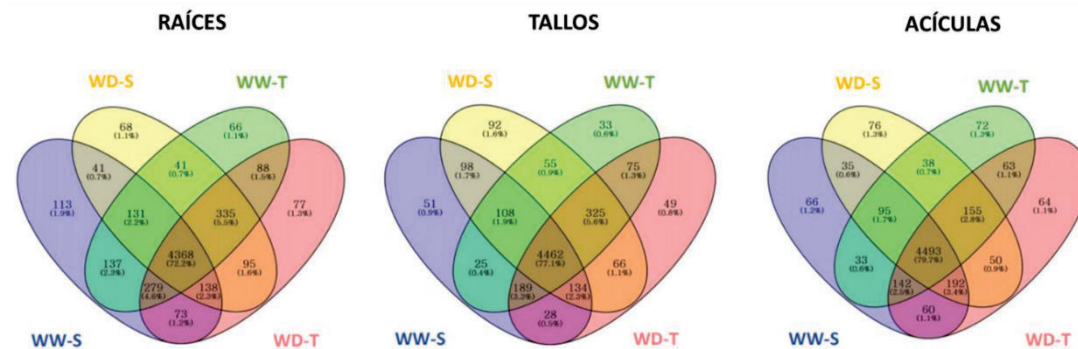


Figura 3.4. Diagramas de Venn de 6.215 genes expresados diferencialmente en raíces, tallos y acículas bajo diferentes regímenes hídricos. WW-S: plantas sensibles control. WD-S: plantas sensibles sometidas a déficit hídrico. WW-T: plantas tolerantes control. WD-T: plantas tolerantes sometidas a déficit hídrico. Figura adaptada de de María *et al.*, (2020).

La comparación de los resultados obtenidos para cada órgano, también permitió identificar tendencias de expresión comunes entre plantas sensibles y tolerantes: 1) sobreexpresión, 2) represión, y 3) variación no significativa en respuesta al déficit hídrico (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Patrones de expresión observados al comparar los transcritos acumulados diferencialmente en genotipos sensibles o tolerantes en respuesta a estrés hídrico (WW vs WD) y entre genotipos sensibles y tolerantes en condiciones control (WW vs WW). En rojo se indican los genes sobreexpresados, en verde los reprimidos, y en blanco los que muestran variación no significativa, en la comparación correspondiente. *Nr. trans.* indica el número de transcritos que muestran cada tendencia. Figura adaptada de de María *et al.*, (2020).

Genotipos Órgano Biblioteca	Genotipos Sensibles (4 y 147)				Genotipos Tolerantes (132 y 144)				Genotipos Sensibles frente a Tolerantes			
	Raíces	Tallos	Acículas	Nr. trans.	Raíces	Tallos	Acículas	Nr. trans.	Raíces	Tallos	Acículas	Nr. trans.
	1vs4	2vs5	3vs6		7vs10	8vs11	9vs12		1vs7	2vs8	3vs9	
				2				0				2
				34				7				32
				12				6				6
				11				1				10
				752				483				529
				759				252				597
				204				127				227
				1				0				0
				36				6				50
				7				5				7
				6				4				9
				788				462				559
				589				228				648
				182				114				239
				24				8				28
				8				8				4
				2				0				0
				20				6				8
				15				1				11
				3				0				1
				13				4				8
				1				0				0
				4				0				2
				9				0				16
				0				1				0

La tendencia común más observada, fue la presencia de genes sobreexpresados o reprimidos en un órgano en todas las plantas estudiadas (Tabla 3.2). Al analizar plantas sensibles control (4+147 WW) frente a las sometidas a sequía (4+147 WD), solo se encontraron dos genes sobreexpresados en todos los órganos, que codificaban una proteína RING-H2 (isotig37224) y un factor de transcripción NAC (unigene10311), mientras que un único gen, que codificaba un transportador de nitrato de alta afinidad (unigene30176), estaba reprimido. Por el contrario, el análisis de las plantas tolerantes control (132+144 WW) frente a las sometidas a sequía (132+144 WD) no mostró ningún GED que compartiera la misma tendencia de expresión en todos los órganos. Sí se encontraron dos genes sobreexpresados en todos los órganos al comparar plantas sensibles frente a plantas tolerantes en condiciones control (4+147 WW vs 132+144 WW), que codificaban una proteína supresora SRp40 (isotig43193) y una D-tirosil-ARNt deacilasa (unigene27014).

Clasificación funcional de los genes expresados diferencialmente en raíces, tallos y acículas de pinos sometidos a déficit hídrico

El análisis funcional de GEDs en raíces, tallos y acículas, de genotipos sensibles y tolerantes a sequía, permitió la identificación de GEDs que participan en la respuesta a estrés hídrico. Se detectó un número mayor de GEDs en todos los órganos de plantas sensibles frente a los identificados en órganos de plantas tolerantes. En plantas sensibles, se encontraron 834, 839 y 264 genes sobreexpresados, y 875, 675 y 216 genes reprimidos en raíces, tallos y acículas, respectivamente, según el conteo de lecturas normalizadas. En plantas tolerantes, se observaron 513, 266 y 140 genes sobreexpresados, y 480, 251 y 131 genes reprimidos en cada uno de los tres órganos, respectivamente. La anotación de términos GO permitió realizar el análisis de enriquecimiento funcional de los genes sobreexpresados y reprimidos, identificar las rutas KEGG en las que están implicados, e identificar procesos en los que participan, a nivel de órgano.

El análisis pormenorizado de GEDs en respuesta a sequía en cada uno de los órganos, desveló qué, las raíces de genotipos sensibles contaban con un gran número de genes sobreexpresados implicados, principalmente, en procesos de transporte y unión de ácidos nucleicos. Por el contrario, había un número mayor de genes reprimidos asociados con procesos de crecimiento, traducción y actividad de moléculas estructurales. En genotipos tolerantes, el número de términos GO significativamente enriquecidos era menor. La mayoría de los GEDs sobreexpresados en genotipos tolerantes correspondían a genes implicados en respuesta a estímulo abiótico y unión a ácidos nucleicos mientras que los reprimidos estaban implicados en actividades catalíticas y comunicación celular (Figura 3.5). El análisis de rutas KEGG en las que estaban implicados desveló que las vías enriquecidas con un mayor número de genes sobreexpresados en raíces de genotipos sensibles, estaban relacionadas con las rutas de biosíntesis de pantotenato y CoA, de biosíntesis de alcaloides de isoquinolina, y de degradación de estireno, mientras que las vías enriquecidas con un mayor número de genes reprimidos estaban relacionadas con la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides, el metabolismo del glutatión y del metano. Por otro lado, en genotipos tolerantes se observó que las rutas más significativamente enriquecidas con genes sobreexpresados fueron la biosíntesis de flavonas y flavonoides, la biosíntesis de carotenoides, y el metabolismo del piruvato, mientras que las vías que incluían un mayor número de genes reprimidos estaban relacionadas con el metabolismo de azúcares aminados y nucleótidos y el metabolismo de la pirimidina.

En tallos, el análisis de genotipos sensibles reveló la sobreexpresión de genes implicados en generación y organización de estructuras anatómicas, morfogénesis y en actividad de proteínas quinasas, mientras GEDs reprimidos asociados con traducción y unión de ARN. En genotipos tolerantes se observó un número mayor de términos GO significativamente enriquecidos con GEDs sobreexpresados principalmente en procesos biosintéticos, respuesta a estrés, respuesta a estímulo abiótico, metabolismo de lípidos y traducción de señal. La única función ontológica enriquecida en genes reprimidos estaba implicada en tropismo (Figura 3.5). El análisis GSEA, puso de manifiesto un número

significativo de genes que codificaban enzimas de la ruta de las pentosas fosfato tanto en genotipos sensibles como tolerantes. Además, en genotipos sensibles, se observó un mayor número de genes sobreexpresados, asociados al metabolismo del almidón y la sacarosa, mientras que el metabolismo de la fructosa y la manosa, y el metabolismo de aminoácidos como la glicina y la alanina eran las rutas enriquecidas con un mayor número de genes reprimidos. En genotipos tolerantes, metabolismo de la glicina y de la fenilalanina incluían un mayor número de genes sobreexpresados, mientras que el metabolismo del ácido araquidónico y de biosíntesis de N-glicanos incluían el mayor número de genes reprimidos.

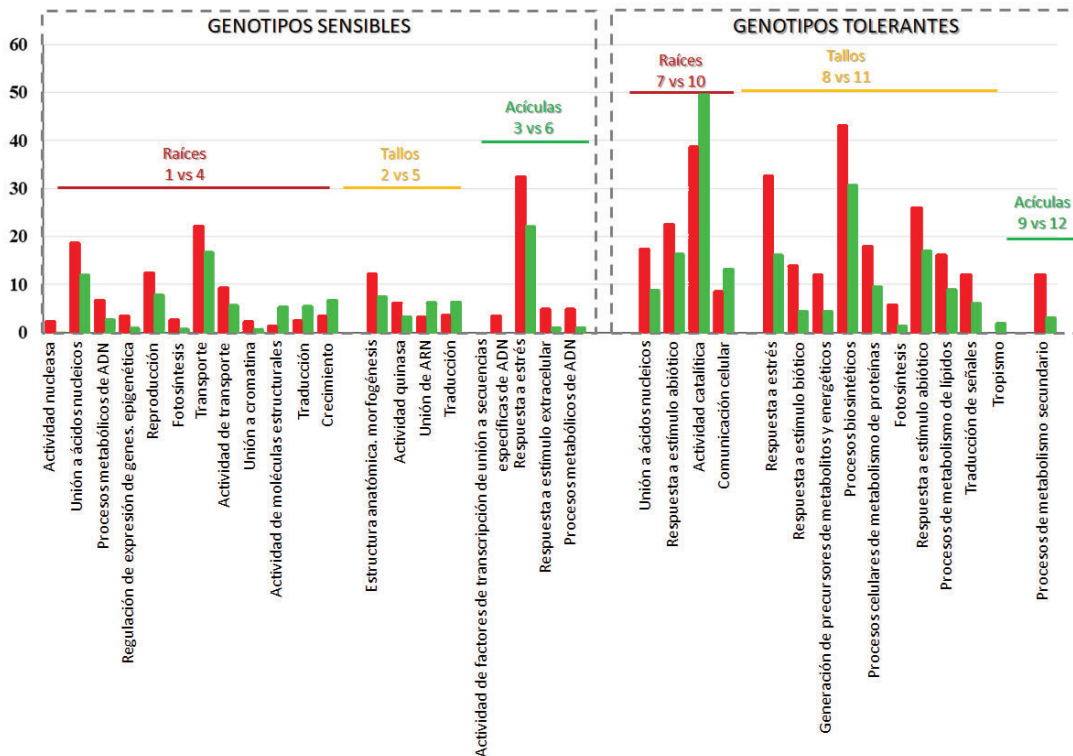


Figura 3.5. Histograma de las categorías GO enriquecidas para cada órgano y genotipo en respuesta a estrés hídrico. En rojo, se representa el conjunto de genes sobreexpresados para una determinada categoría, y en verde, los genes reprimidos. Para cada órgano, se indica el código correspondiente a las bibliotecas comparadas. Figura adaptada de de María *et al.*, (2020).

Por último, el análisis de GEDs en acículas, desveló que este órgano presentaba un número menor de términos GO significativamente enriquecidos en comparación con los otros dos órganos analizados. Los genotipos sensibles, mostraron sobreexpresión de genes implicados en respuesta a estrés y respuesta a estímulo extracelular, y factores de transcripción. Por otro lado, en los genotipos tolerantes sólo se observó una única categoría GO enriquecida, metabolismo secundario, que englobaba la mayoría de genes sobreexpresados (Figura 3.5). El análisis de rutas KEGG mostró varias rutas inducidas. En los genotipos sensibles, las rutas de biosíntesis de arginina, metabolismo del

glioxilato y dicarboxilato, y metabolismo de alanina, fueron las más enriquecidas en genes sobreexpresados; y las vías de metabolismo de aminoazúcares y azúcares nucleótidos, biosíntesis de estreptomicina, y metabolismo del butanoato fueron las más enriquecidas en genes reprimidos. Los genotipos tolerantes, contaban con numerosas rutas enriquecidas en genes sobreexpresados, como las de biosíntesis de pantotenato, CoA y cutina, y la ruta de metabolismo de la cisteína y metionina, sin embargo, no se identificaron rutas enriquecidas significativamente en genes reprimidos.

El análisis del conjunto de genes co-expresados en genotipos sensibles y tolerantes, permitió identificar grupos de GEDs que compartían patrones de expresión en los diferentes órganos analizados. En raíces, se identificaron 624 y 370 genes sobreexpresados, y 439 y 270 genes reprimidos; en tallo, 709 y 192 genes sobreexpresados, y 441 y 115 genes reprimidos; y en acículas, 238 y 110 genes sobreexpresados y 146 y 74 genes reprimidos, en plantas sensibles y tolerantes, respectivamente. La clasificación de los 30 genes más sobreexpresados o reprimidos, permitió desvelar grupos funcionales enriquecidos para cada órgano analizado (Figura 3.6). En raíces, se contabilizó un número similar de genes sobreexpresados implicados en transporte y señalización tanto en genotipos tolerantes y sensibles, mientras que aquellos implicados en regulación post-transcripcional predominaban en genotipos sensibles, y aquellos asociados con respuesta hormonal estaban incrementados en genotipos tolerantes. En tallos, los genes sobreexpresados estaban principalmente implicados en detoxificación, respuesta hormonal, señalización y regulación del crecimiento, mientras que en plantas tolerantes estaban principalmente asociados al metabolismo de lípidos. El análisis de acículas mostró un número mayor de genes sobreexpresados en plantas sensibles que en tolerantes, implicados principalmente en actividades de detoxificación, protección estructural y metabólica, fotosíntesis, señalización, remodelación de la pared celular y transporte. En plantas tolerantes, por el contrario, sólo se identificaron cinco genes sobreexpresados relacionados con respuesta a sequía, implicados principalmente en protección estructural y metabólica.

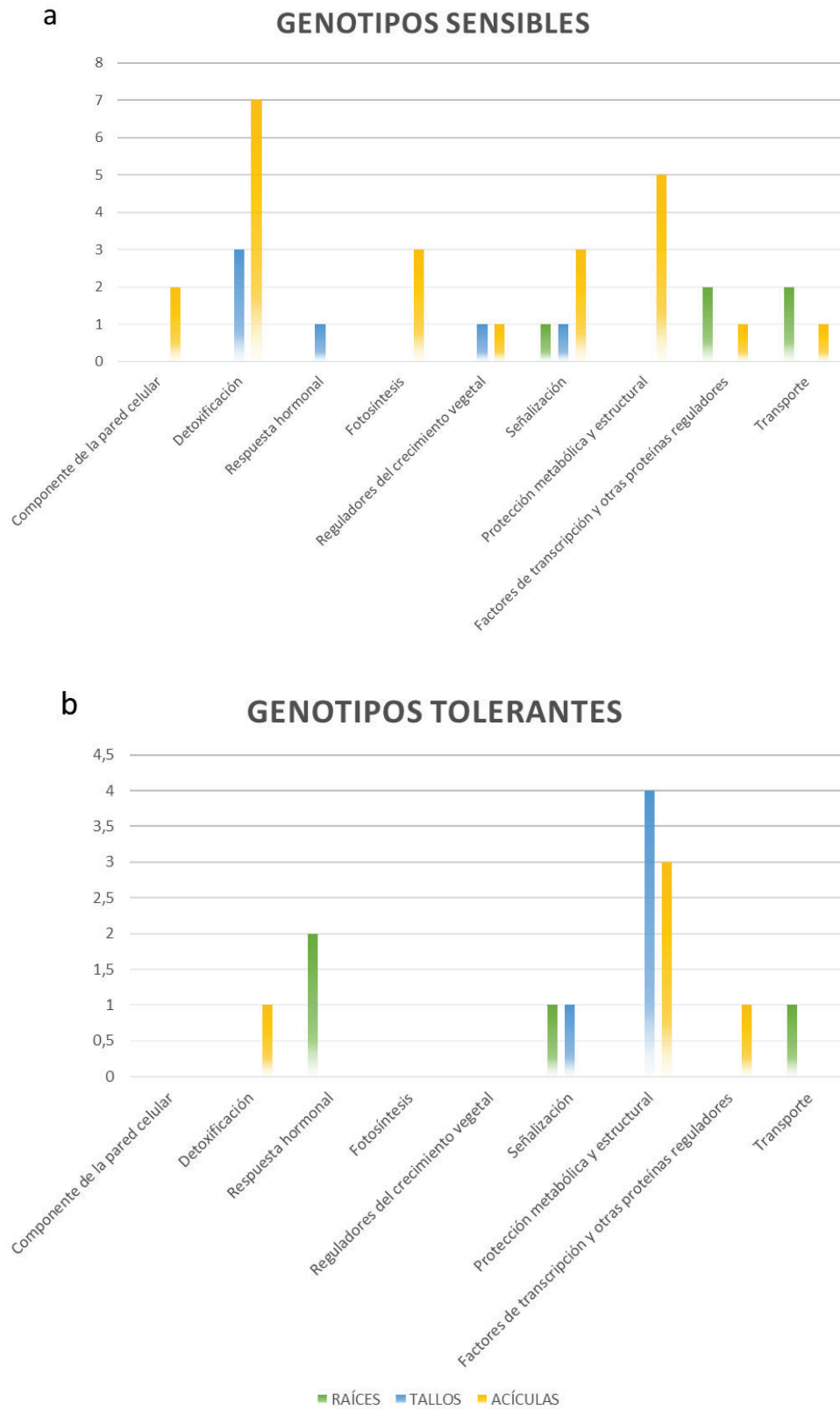


Figura 3.6. Histograma de los 30 genes más expresados diferencialmente en respuesta a sequía en raíces, tallos y acículas de genotipos (a) sensibles y (b) tolerantes. En el histograma se representan el nº de GEDs (eje de ordenadas) y grupos funcionales (eje de abscisas) enriquecidos para cada órgano analizado.

Análisis funcional de los genes expresados constitutivamente en raíces, tallos y acículas de plantas control

Asimismo, se llevó a cabo el estudio de la respuesta constitutiva de los genotipos sensibles y tolerantes a sequía, mediante el análisis funcional de aquellos genes relacionados con la respuesta a sequía, expresados diferencialmente entre las plantas control (WW) de ambos grupos de genotipos, no detectados como GEDs en las comparativas entre plantas WW vs WD de los individuos sensibles o tolerantes a la sequía. La comparación de los recuentos de lecturas normalizadas permitió la identificación de GEDs asociados a cada órgano al comparar plantas WW-sensibles frente a las WW-tolerantes. Se identificaron 601, 666 y 267 genes sobreexpresados, y 638, 745 y 275 genes reprimidos en raíces, tallos y acículas, respectivamente. El análisis de ontología mostró, que, al comparar genotipos sensibles y tolerantes, cambiaban las categorías funcionales a las que pertenecían los genes sobre expresados en cada órgano.

En raíces, se observó que los procesos de diferenciación celular, metabolismo secundario, crecimiento celular, y morfogénesis, generación y organización de estructura anatómica, estaban enriquecidos con genes sobreexpresados en plantas sensibles; mientras que los procesos de metabolismo celular y actividad enzimática de quinasas e hidrolasas, lo estaban en plantas tolerantes. En tallos de plantas sensibles, se observó un enriquecimiento en genes sobreexpresados relacionados con procesos del metabolismo secundario y generación de metabolitos precursores y energéticos, mientras que, en plantas tolerantes, estaban relacionados con la actividad enzimática de quinasas e hidrolasas, crecimiento celular y unión a nucleótidos. Por último, el análisis de acículas reveló que, en plantas sensibles, se apreciaba un enriquecimiento de genes sobreexpresados asociados a unión a nucleótidos, actividad transferasa y metabolismo de lípidos; mientras que, en acículas de plantas tolerantes, estaban asociados con regulación, traducción y con la estructura molecular, preservación de la integridad estructural.

El análisis GSEA de raíces y tallos de genotipos sensibles, mostró un patrón común de vías significativamente inducidas relacionadas con el metabolismo secundario, entre las que destacaban la biosíntesis de flavonoides, el metabolismo del glioxilato y del dicarboxilato y la biosíntesis de fenilpropanoides en raíces; y la fosforilación oxidativa, el metabolismo del metano, y la vía de los estilbenoides en tallos. En plantas tolerantes las rutas indicadas estaban relacionadas con la biosíntesis de pantotenato y CoA, la biosíntesis de pirimidina, y el metabolismo de la galactosa en raíces; y con la biosíntesis de N-glicanos y lisina, y el metabolismo de la galactosa en tallos. Analizando las tendencias de expresión, 231, 482 y 187 genes estaban constitutivamente sobreexpresados en raíces, tallos y acículas de plantas sensibles, respectivamente, mientras que 333, 453 y 197 genes lo estaban en dichos órganos de plantas tolerantes (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Patrones de expresión observados al comparar, a nivel de órgano, los transcritos acumulados diferencialmente en genotipos sensibles y tolerantes a la sequía, en respuesta a estrés hídrico y entre genotipos sensibles y tolerantes a la sequía en condiciones control. Los colores rojo y verde indican los genes sobreexpresados y reprimidos, respectivamente, y en blanco variación no significativa, en la comparación correspondiente. *Nr. trans.* indica el número total de transcritos que muestran cada tendencia. Figura adaptada de de María *et al.*, (2020).

Órganos		Raíces				Tallos				Acículas			
Bibliotecas	1vs4	7vs10	1vs7	Nr. trans.	2vs5	8vs11	2vs8	Nr. trans.	3vs6	9vs12	3vs9	Nr. trans.	
				6				0				0	
				68				13				5	
				117				91				16	
				1				0				0	
				624				709				238	
				370				192				110	
				333				453				197	
				1				1				0	
				62				13				3	
				340				200				65	
				0				0				0	
				439				441				146	
				270				115				74	
				231				482				187	
				5				2				0	
				1				5				0	
				0				0				0	
				3				4				2	
				2				2				0	
				0				0				0	
				125				100				49	
				24				13				0	
				4				1				0	
				41				44				23	
				13				19				5	

Entre los 30 genes que mostraban constitutivamente mayores diferencias en su expresión se identificaron 7 genes relacionados con respuesta a sequía en raíces de plantas sensibles, implicados en protección estructural y metabólica, detoxificación, transporte y regulación mientras que en raíces de plantas tolerantes se detectaron 12 genes relacionados con respuesta a sequía, asociados con procesos de remodelación de pared celular, transporte, detoxificación, protección estructural y metabólica, respuesta hormonal, señalización y regulación transcripcional. En tallos, sólo tres de los 30 genes constitutivamente más diferenciados estaban relacionados con respuesta a sequía en los genotipos sensibles, todos ellos relacionados con señalización y protección estructural y metabólica. En los genotipos tolerantes se identificaron 12 genes asociados con respuesta a sequía implicados en protección estructural y metabólica, remodelación de pared celular, transporte a través de membranas y regulación de crecimiento vegetal. En acículas de plantas sensibles no se observaron genes relacionados con respuesta a sequía entre los 30 constitutivamente más diferenciados, mientras que en plantas tolerantes se identificaron 15 genes asociados con respuesta a sequía, que fueron clasificados

funcionalmente en procesos de transporte, protección estructural y metabólica, reorganización de la pared celular, señalización, respuesta hormonal y regulación.

Es importante destacar que 6 genes sobreexpresados constitutivamente en raíces de genotipos tolerantes, se encontraron también sobre-expresados en raíces de genotipos sensibles sometidos a déficit hídrico. Entre ellos, los genes codificantes de una proteína LHY isoforma X1 (unigene28840); una chaperona 6 isoforma X2 (unigene796); una proteína putativa de unión a calcio CML25 (isotig33124); dos transcritos (isotig42238 e isotig75236) que mostraban homología con transposones de tipo TNT 1-94; y, finalmente, un gen codificante de función desconocida (isotig31114), que también ha sido identificado en *Pinus taeda* (de María *et al.*, 2020).

Validación de los resultados obtenidos en el análisis ARN-Seq mediante RT-qPCR

Para validar los resultados obtenidos en el estudio ARN-Seq, se analizó la expresión de 6 GEDs, mediante RT-qPCR, utilizando como molde el ARN total utilizado para la construcción de las 12 bibliotecas de ADNc caracterizadas en el estudio transcriptómico. Los resultados obtenidos se detallan en la Figura 3.7. Se seleccionaron GEDs que codifican la proteína glutatión S-transferasa (GST), la proteína del canal de calcio de dos poros (TPCN1), el FT BTF3 homólogo-4 (BTF3L4), la proteína de choque térmico 70 kDa de tipo mitocondrial (HSP68), la proteína RABC1 (RABC1), y la D-tirosil-ARNt deacilasa (DTD). Los niveles de expresión de los GEDs analizados mostraron patrones similares a los obtenidos mediante ARN-Seq.

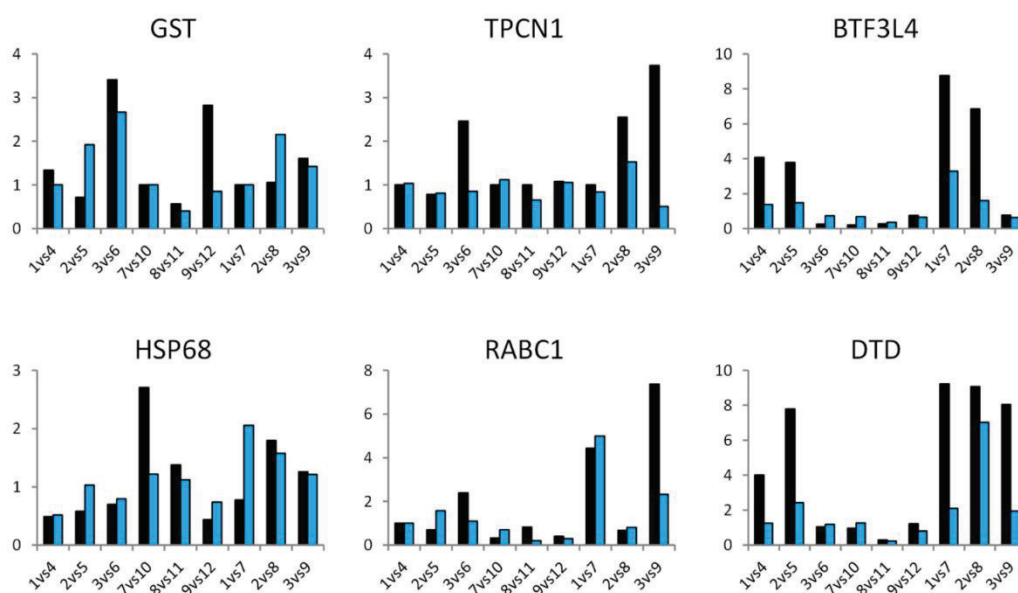


Figura 3.7. Validación del análisis ARN-Seq mediante RT-qPCR. En los histogramas se representa los FC de 6 GEDs identificados en el análisis ARN-Seq (barra negra) y RT-qPCR (barra azul). Figura adaptada de de María *et al.*, (2020).

ESTUDIO DEL EFECTO DEL PORTAINJERTO EN LA EXPRESIÓN GENÉTICA DE LA PÚA EN INJERTOS DE *PINUS PINASTER* SOMETIDOS A ESTRÉS HÍDRICO

Basado en el artículo: Miriam López-Hinojosa, Nuria de María, María Ángeles Guevara, María Dolores Vélez, José Antonio Cabezas, Luís Díaz, José Antonio Mancha, Alberto Pizarro, Lorenzo Manjarrez, Carmen Collada, Carmen Díaz-Sala y María Teresa Cervera (2021) Rootstock effects on scion gene expression in maritime pine. Scientific Reports 11, 11582. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90672-y>.

Miriam López-Hinojosa, Nuria de María, Ángeles Guevara, María Dolores Vélez, José Antonio Cabezas, Luís Díaz, José Antonio Mancha, Alberto Pizarro, Lorenzo Manjarrez, Carmen Collada, Carmen Díaz-Sala y María Teresa Cervera. Rootstock effect on needle transcriptional responses of grafted maritime pine under drought. (En preparación)

Una vez analizados los mecanismos moleculares y funcionales que median la respuesta adaptativa a sequía de la progenie generada del cruce controlado Gal 1056 x Oria 6, el siguiente objetivo de la Tesis se centraba en el estudio de la comunicación entre órganos que perciben el estímulo y lo transmiten a toda la planta dando lugar a dicha respuesta. Este estudio se llevó a cabo empleando injertos que combinan genotipos con distintos grados de tolerancia a la sequía que permitan explorar estrategias alternativas para modular la respuesta a sequía, evaluando así el uso de portainjertos para modificar la respuesta a estrés hídrico de las púas del árbol injertado.

Para ello, se analizaron seis plantas de cada una de las cuatro construcciones que se diseñaron combinando genotipos con respuestas contrastadas a sequía, que habían sido sometidas a un experimento de déficit hídrico frente a injertos control: Gal 1056 / R1S, Gal 1056 / R18T, Oria 6 / R1S y Oria 6 / R18T, donde Gal 1056 y Oria 6 son las púas injertadas de los progenitores femenino y masculino, sensible y tolerante a sequía, respectivamente, y R1S y R18T, dos individuos de la misma progenie de referencia analizada previamente, sensible y tolerante a la sequía, respectivamente, que fueron utilizados como portainjertos.

Se desarrollaron dos aproximaciones que buscaban identificar genes acumulados diferencialmente en acículas de las púas de los injertos control y sometidos a estrés hídrico, en función de la combinación púa-portainjerto analizada. Los resultados descritos en el Capítulo 3, demostraron la existencia de diferentes estrategias de respuesta entre genotipos sensibles y tolerantes, presentando estos últimos una preadaptación para hacer frente a la sequía mediante la expresión de genes relacionados con la respuesta a estrés hídrico, asociados con funciones que sólo se detectan en etapas posteriores en los individuos sensibles sometidos a estrés hídrico.

El flujo de trabajo seguido se esquematiza en la figura 4.1.

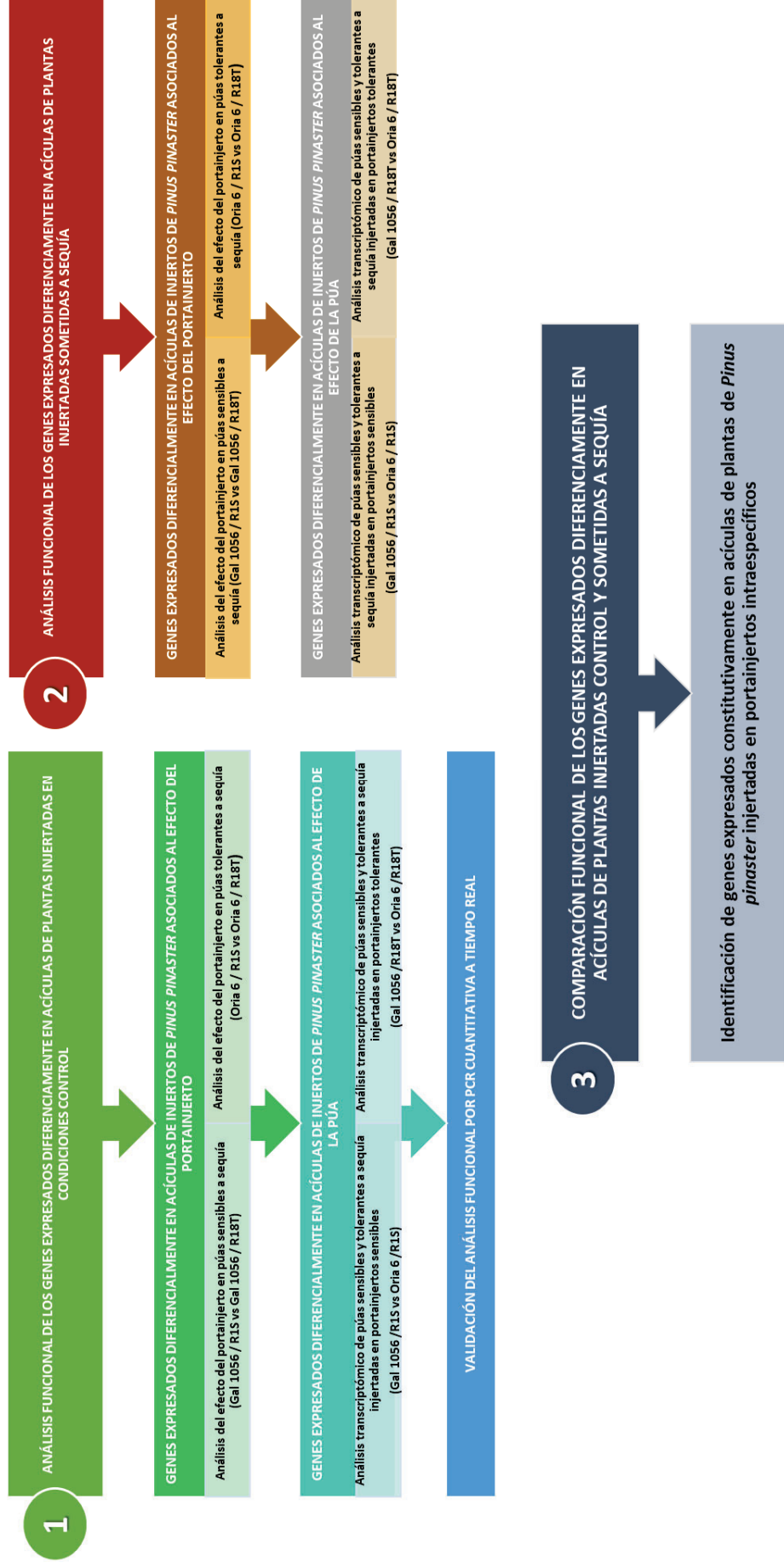


Figura 4.1. Flujo de trabajo diseñado para analizar el efecto del portainjerto sobre la expresión génica de las acículas de las púas de los injertos de *Pinus pinaster* en respuesta a estrés hídrico.

Análisis funcional de los genes expresados diferencialmente en acículas de las púas injertadas en portainjertos sensibles y tolerantes a la sequía en condiciones control

Para llevar a cabo este análisis transcriptómico se secuenciaron 12 librerías de ADNc generadas a partir del ARN total extraído de las muestras de acículas recolectadas de plantas crecidas en condiciones control. Se analizaron tres réplicas biológicas de cada una de las cuatro construcciones estudiadas, Gal 1056 / R1S, Gal 1056 / R18T, Oria 6 / R1S y Oria 6 / R18T. Como resultado de la secuenciación, se obtuvo un total de 206.978 M de lecturas, con una longitud media de 75 nucleótidos, y un número inicial de lecturas por librería que oscilaba entre 12,6 M y 28,3 M, y entre 4,9 y 24,1 M de secuencias de alta calidad tras los procesos de filtrado y procesamiento (entre el 38,7% y el 85% de las secuencias iniciales) (Tabla 4.1). Las lecturas procesadas de alta calidad se mapearon de forma independiente contra el transcriptoma de referencia de *Pinus pinaster* ProCoGen integrado por 206.575 transcritos, obteniendo una tasa media de mapeo del 91% con una media de 12.042.168 lecturas mapeadas (Tabla 4.1). Un total de 75.507 secuencias se anotaron empleando BLASTX contra las bases de datos de especies modelo UniProtKB/Swiss-Prot y RefSeq, de las cuales 64.263 fueron anotadas con 681.099 términos de ontología génica (GO) y 41.560 mostraron una similitud significativa con dominios conocidos utilizando el software InterProScan implementado en el software OmicsBox 13.1.11.

Tabla 4.1. Resumen de los datos de secuenciación ARN-Seq, procesamiento y mapeo de las acículas de los injertos de *Pinus pinaster* en condiciones control.

Genotipo	Gal 1056 / R1S			Gal 1056 / R18T			Oria 6 / R1S			Oria 6 / R18T		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Lecturas sin procesar (M)	15,99188	12,89687	16,95577	22,64033	12,658531	16,14964	13,232159	12,65581	13,00199	16,05427	26,35359	28,38755
Longitud media (pb)	75,52	75,52	75,53	75,52	75,56	75,55	75,51	75,52	75,54	75,53	75,52	75,53
Total (Mb)	1207,71	974,01	1280,65	1709,76	956,47	1220,17	999,16	955,73	982,22	1212,64	1990,15	2144,06
Calidad Media	34,27	34,52	34,45	34,45	34,33	34,31	33,89	34,45	34,4	34,36	34,42	34,45
Lecturas tras el procesamiento con reformat.sh y Sortmerna (M)	12,50118	13,120246	10,90749	19,520822	4,909254	7,622971	11,778584	11,62967	7,172278	11,48367	24,15501	22,23719
Longitud media tras procesamiento (pb)	73	73	73	73	73	73	73	73	73	73	73	73
Número de lecturas mapeadas (M)	11,37022	12,340444	10,11667	17,874689	4,19261582	6,836189	10,92487223	10,68927	6,512493	10,56037	22,596	20,49219

Para explorar si estos portainjertos, que están relacionados genéticamente y que muestran respuestas contrastadas a sequía, podían modificar los perfiles transcriptómicos de las acículas de las púas injertadas en condiciones control, se analizaron los GEDs entre las púas de las distintas construcciones. Se realizaron dos tipos de análisis de expresión génica diferencial.

La primera comparación se diseñó para analizar si los portainjertos tolerantes o sensibles a sequía podían asociarse con la modificación de los perfiles transcriptómicos tanto de las púas procedentes de los genotipos sensibles (Gal 1056 / R1S vs Gal 1056 / R18T) y / o de los genotipos tolerantes (Oria 6 / R1S vs Oria 6 / R18T). El segundo estudio diferencial se diseñó para comparar los transcriptomas de las púas sensibles y tolerantes a la sequía injertadas en portainjertos sensibles (Gal 1056 / R1S vs Oria 6 / R1S) o tolerantes (Gal 1056 / R18T vs Oria 6 / R18T) al déficit hídrico. El análisis inicial de los componentes principales (PCA) del conjunto de datos de expresión, reveló una agrupación de las muestras analizadas, donde el primer componente principal (PC1), que estaba asociado al genotipo de la púa, explicaba el 84% de la varianza, y donde los genotipos de los portainjertos sobre los que se injertó cada púa (PC2) explicaban el 8% de la varianza (Figura 4.2). Los GEDs se analizaron mediante la categorización funcional Mapman, anotación de términos GO en cada ontología, y analizando las rutas KEGG enriquecidas.

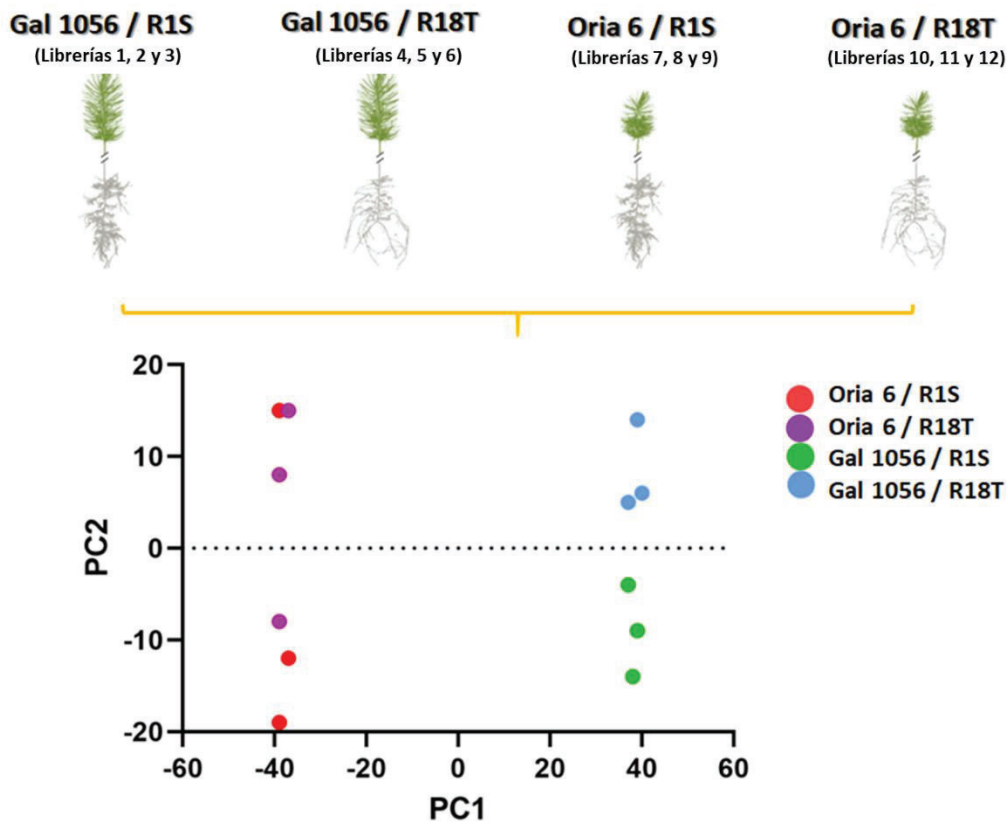


Figura 4.2. Injertos analizados combinando portainjertos sensibles (R1S) y tolerantes (R18T) a la sequía, con púas de los progenitores, sensibles (Gal 1056) y tolerantes (Oria 6) a sequía, crecidas en condiciones control. Gráfico PCA del FPKM log₂-normalizado de las muestras de ARN-Seq analizadas.

Genes expresados diferencialmente entre acículas de las púas de cada progenitor injertadas en los portainjertos sensibles y tolerantes a la sequía: análisis del efecto de los portainjertos en los injertos de Pinus pinaster en condiciones control

El primer estudio comparativo permitía analizar si los portainjertos sensibles o tolerantes a sequía podían modificar el perfil transcriptómico de las acículas de las púas injertadas, mediante la identificación de GEDs en cada una de las construcciones. El análisis funcional del efecto del portainjerto sobre el transcriptoma de las acículas de las púas del progenitor sensible a la sequía (Gal 1056 / R1S vs Gal 1056 / R18T) permitió detectar 257 GEDs, con 158 y 99 genes sobreexpresados en Gal 1056 / R1S y Gal 1056 / R18T respectivamente (Figura 4.3a). El análisis de la distribución de términos GO, reveló que la categoría más informativa era “procesos biológicos”, con GEDs sobreexpresados en Gal 1056 / R18T asociados a “proceso biosintético” (14%), “proceso metabólico primario” (8%), “proceso metabólico de sustancias orgánicas” (8%) y “proceso metabólico de moléculas pequeñas” (8%); y GEDs sobreexpresados en Gal 1056 / R1S asociados a “respuesta a estrés” (14%), “proceso metabólico primario” (10%), y “proceso metabólico de sustancias orgánicas” (10%) (Figura 4.3b).

El análisis MapMan mostró que las categorías “metabolismo secundario” y “metabolismo de lípidos”, y dentro de ellas, las subcategorías “biosíntesis de flavonoides” y “biosíntesis de ácidos grasos”, estaban enriquecidas en GEDs sobreexpresados en Gal 1056 / R18T; mientras que las categorías “organización de la pared celular”, “respuesta a estímulos externos”, “respiración celular”, “transporte de solutos”, “fotosíntesis”, “homeostasis de proteínas”, “biosíntesis de proteínas”, “homeostasis redox”, así como las subcategorías “oxidoreductasas” y “transferasas” dentro de “clasificación de enzimas”, estaban enriquecidos en GEDs sobre-expresados en Gal 1056 / R1S. Dentro de la categoría “acción de fitohormonas”, tanto la subcategoría “auxinas” como “ácido abscísico” incluían GEDs sobreexpresados en ambos tipos de injerto, que estaban implicados en biosíntesis, percepción y señalización de dichas hormonas. Entre los GEDs pertenecientes a la categoría “biosíntesis de ARN” que codificaban FTs, se observaba un enriquecimiento de genes MYB en el genotipo tolerante (Gal 1056 / R18T), y de genes CAMTA en el genotipo sensible (Gal 1056 / R1S). El análisis de rutas KEGG reveló que las 30 rutas enriquecidas con un mayor número de genes sobreexpresados en Gal 1056 / R1S, estaban relacionadas con el metabolismo del almidón y la sacarosa, biosíntesis de fenilpropanoides, glucólisis / gluconeogénesis, metabolismo de la galactosa y metabolismo de aminoazúcares y nucleótidos (Figura 4.4a); mientras que las rutas asociadas a la biosíntesis de flavonoides, biosíntesis de fenilpropanoides, biosíntesis de estilbenoides, diarilheptanoides y gingerol, biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptófano, y metabolismo del almidón y la sacarosa eran las enriquecidas con un mayor número de GEDs sobreexpresados en Gal 1056 / R18T (Figura 4.4b).

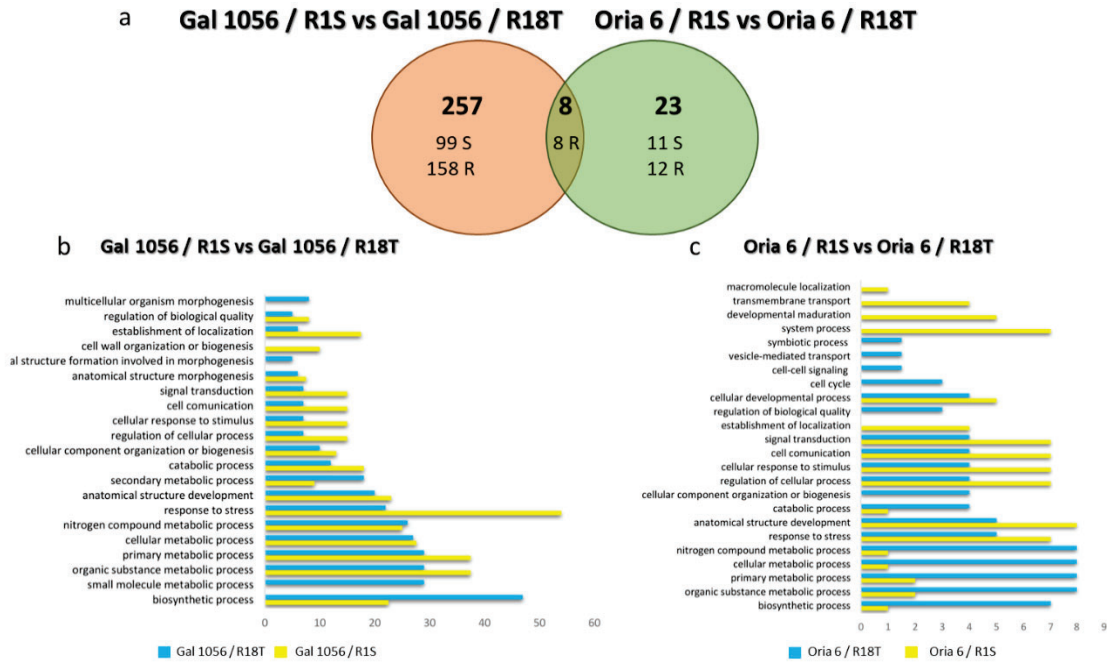


Figura 4.3. GEDs identificados en acículas de púas sensibles (Gal 1056) o tolerantes (Oria 6) a la sequía injertadas en portainjertos sensibles (R1S) vs tolerantes (R18T) a la sequía. (a) Diagrama de Venn mostrando los GEDs [$\text{Log}_2\text{FC} \geq 1,5$ y $\text{Log}_2\text{FC} \leq -1,5$; $p \leq 0,05$] sobreexpresados (S) y reprimidos (R) en cada comparativa. (b-c) Histogramas de términos GO enriquecidos con GEDs sobreexpresados.

Entre los GEDs sobreexpresados en Gal 1056 / R18T, el gen que codifica al FT MYB (unigene15769) mostró el mayor valor de Log_2FC (7,6). Asimismo, se identificaron GEDs sobreexpresados en Gal 1056 / R18T, que codifican antocianina sintasa, antocianina reductasa, chalcona sintasa y flavonona 3' 5'-hidroxilasa (isotig30374, isotig56235, isotig49498, isotig29064, unigene2224, unigene147194), todas ellas implicadas en el metabolismo secundario de flavonoides y otros compuestos fenólicos; también GEDs que codifican la deshidratasa aerogénica (isotig46467) implicada en la biosíntesis de compuestos derivados del shikimato, la proteína fosfatasa 2C (PP2C; unigene9541), uno de los componentes de la vía de transducción de señales de ABA; la proteína de resistencia a pirabactina 1 (PYL); y el módulo de la proteína quinasa 2 relacionada con el complejo quinasa SNF1 (SnRK2).

Por el contrario, los GEDs más sobreexpresados en Gal 1056 / R1S codifican la subunidad reguladora del proetosoma 26S RPN2a (unigene34964), un componente regulador del sistema ubiquitina-proteosoma implicado en homeostasis de proteínas; la proteína AGP- beta -1,3- galactosiltransferasa (isotig17822), implicada en la organización de la pared celular, la proteína RD22 relacionada con procesos de respuesta a la deshidratación (unigene26968); la proteína taumatina relacionada con patogénesis (isotig57101); y la proteína defensina -1 (unigene35374) implicada en mecanismos de defensa y en las vías de señalización de sensibilidad a salinidad (SOS) (Figura 4.5a).

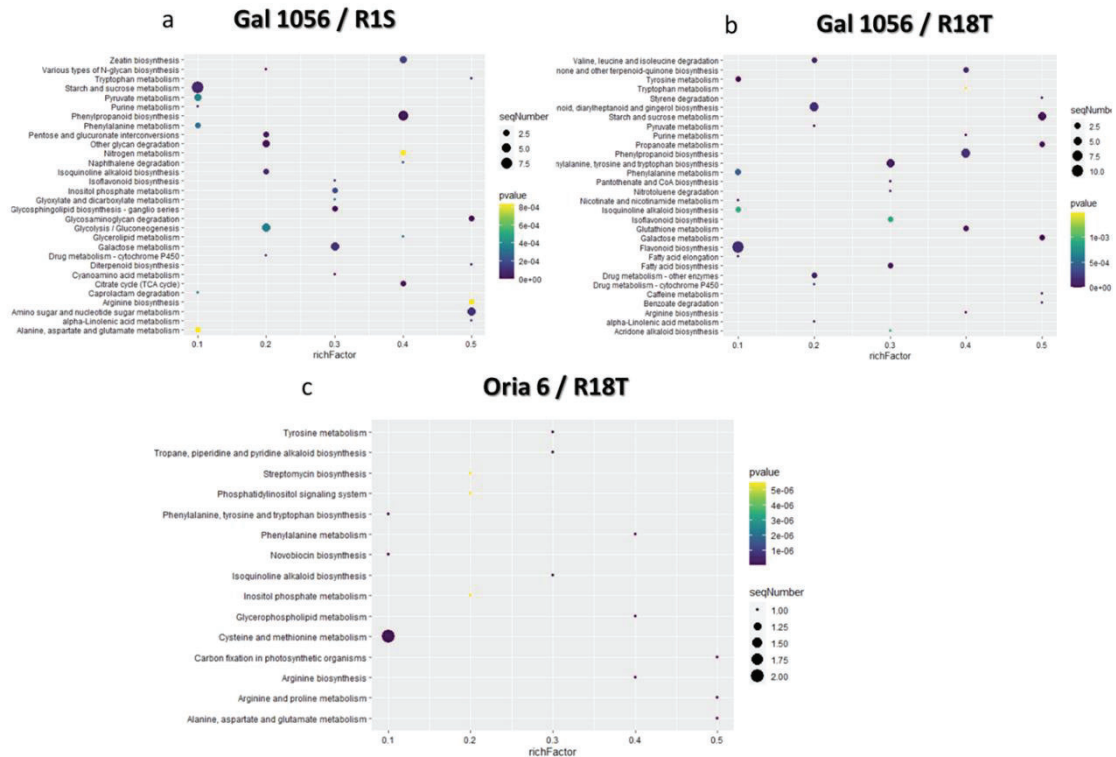


Figura 4.4. Análisis de las 30 rutas KEGG más enriquecidas en genes significativamente sobreexpresados ($\geq 1,5 \text{ Log2FC}$; $p \leq 0,05$) en (a) Gal 1056 / R1S, (b) Gal 1056 / R18T, y (c) Oria 6 / R18T. El factor de riqueza (*richFactor*) representa la relación entre el número de GEDs y el número de todos los genes de la ruta.

En segundo lugar, se llevó a cabo el análisis de la expresión génica de las acículas de las púas del progenitor masculino, Oria 6, injertadas en portainjertos sensibles frente a las injertadas en portainjertos tolerantes a sequía (Oria 6 /R1S vs Oria 6 / R18T). Se observaron 23 GEDs específicos, 12 y 11 genes sobreexpresados en los injertos sobre el genotipo sensible (Oria 6 / R1S) y sobre el genotipo tolerante (Oria 6 / R18T), respectivamente (Figura 4.3a). El análisis de la distribución de términos GO reveló que las categorías "desarrollo de la estructura anatómica" (10%), "respuesta a estrés" (9%), "regulación del proceso celular" (9%), "respuesta celular a estímulo" (9%), "comunicación celular" (9%), "transducción de señales" (9%) y "proceso del sistema" (9%) fueron los procesos más significativamente enriquecidos en GEDs sobreexpresados en Oria 6 / R1S; mientras que las categorías "proceso metabólico de sustancias orgánicas" (9%), "proceso metabólico primario" (9%), "proceso metabólico celular" (9%) y "proceso metabólico de compuestos de nitrógeno" (9%) eran los procesos más enriquecidos con GEDs sobreexpresados en Oria 6 / R18T (Figura 4.3c).

Pese al reducido número de GEDs, su análisis de categorización MapMan, mostró que “biosíntesis de ARN”, “fotosíntesis”, “modificación y biosíntesis de proteínas”, “organización del ciclo celular y metabolismo de aminoácidos”, eran los procesos más enriquecidos en GEDs sobreexpresados sobre el portainjertos tolerante, y aquellos relacionados con “biosíntesis de ARN” y “organización del ciclo celular”, los más enriquecidos en GEDs sobreexpresados sobre el portainjertos sensible. Dentro de los GEDs englobados en la categoría “biosíntesis de ARN” los FTs bZIP y C2H2-ZF estaban sobreexpresados en Oria 6 / R18T, mientras que CAMTA estaba sobreexpresado en Oria 6 / R1S. El análisis KEGG reveló que las rutas enriquecidas con un mayor número de GEDs sobreexpresados en Oria 6 / R18T, estaban relacionados con metabolismo de la cisteína y la metionina, y en menor medida con el metabolismo de la fenilalanina, del fosfato de inositol, y de la tirosina, la fijación del carbono, la biosíntesis de la novobiocina, de la arginina, de la estreptomina, de los alcaloides derivados del tropano, piperidina y piridina, la alanina, aspartato y glutamato, biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptófano, metabolismo de glicerofosfolípidos, sistema de señalización de fosfatidilinositol, biosíntesis de alcaloides de isoquinolina y metabolismo de arginina y prolina (Figura 4.4c). Por otro lado, el análisis de rutas KEGG no revelaron ninguna vía significativamente enriquecida en GEDs sobreexpresados en Oria 6 / R1S.

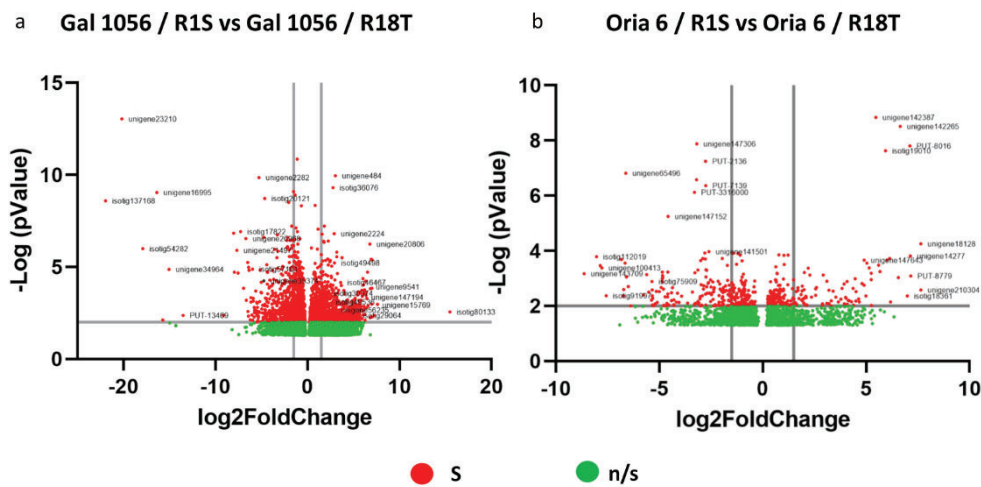


Figura 4.5. Diagramas volcano (volcano plots) en los que se representan los GEDs en (a) Gal 1056 / R1S vs Gal 1056 / R18T y (b) Oria 6 / R1S vs Oria 6 / R18T (S: sobreexpresados [$\text{Log}_2\text{FC} \leq -1,5$ y $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1,5$; $p \leq 0,05$]; n/s: no significativos).

Entre los GEDs significativamente sobreexpresados en Oria 6 / R18T, el que codifica la mio-inositol-1-fosfato fosfatasa (unigene18128), mostró el mayor valor de Log2FC (7,6). Además, se encontraron sobreexpresados dos FTs, C2H2-ZF (PUT-8016) y bZIP (unigene142265), ambos implicados en crecimiento, desarrollo y transducción de señales de estrés; la proteína ribosómica L25 / L23 (isotig19010), asociada a biogénesis de ribosomas, y la proteína pefenato aminotransferasa (PPA-AT; unigene142387), implicada en biosíntesis de compuestos basados en el shikimato (Figura 4.5b). Entre los GEDs significativamente sobreexpresados en Oria 6 / R1S se encontraron los que codifican la proteína de membrana peroxisomal (unigene65496), el factor de fisión de peroxisomas implicado en la división de mitocondrias y peroxisomas durante la organización del ciclo celular, así como los genes que codifican los FTs GRAS (isotig113077) y CAMTA (unigene147152, PUT-3316000, unigene147128, unigene147306, PUT-2136, PUT-7139), que pueden actuar como elementos integrales de la vía de señalización de estrés por sequía mediada por Ca-CaM (Noman *et al.*, 2019) (Figura 4.5 b).

Cabe destacar, que se detectaron un total de 8 GEDs que se expresaron conjuntamente en ambos genotipos, Gal 1056 y Oria 6, injertados en portainjertos sensibles frente a portainjertos tolerantes a la sequía. El análisis de términos GO reveló que los procesos biológicos "transducción de señal" (14%) y "respuesta a estrés" (14%), estaban asociados con genes sobreexpresados en plantas injertadas en portainjertos sensibles (Gal 1056 / R1S y Oria 6 / R1S), independientemente de la púa analizada. Adicionalmente, el análisis MapMan reveló que la categoría asociada a biosíntesis de ARN era la más significativamente enriquecida en GEDs, con genes también sobreexpresados en injertos con portainjertos sensibles, que codifican principalmente FTs CAMTA (unigene33819, PUT-9211, unigene20892).

Genes expresados diferencialmente entre acículas de las púas de ambos progenitores injertadas sobre portainjertos sensibles o tolerantes: análisis del efecto de la púa en los injertos de *Pinus pinaster* en condiciones control

En un primer análisis analizamos los GEDs comparando acículas de púas sensibles y tolerantes a la sequía injertadas sobre portainjertos sensibles a déficit hídrico (Gal 1056 /R1S vs Oria 6 / R1S), para analizar cómo el genotipo de la púa injertada influía en el perfil transcriptómico en las construcciones estudiadas. Se identificaron un total de 1.925 GEDs específicos de acículas de púas injertadas sobre portainjertos sensibles, con 1.397 genes sobreexpresados en Oria 6 / R1S y 528 genes sobreexpresados en Gal 1056 / R1S (Figura 4.6 a).

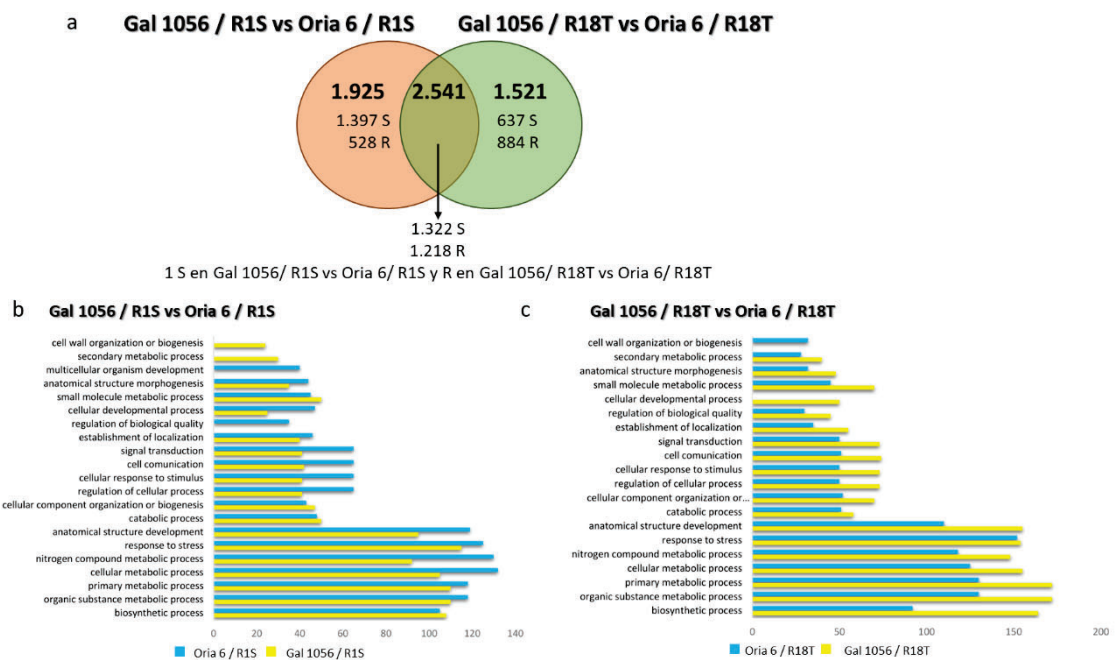


Figura 4.6. GEDs identificados al comparar acículas de púas de los progenitores, Gal 1056 (sensible) vs Oria 6 (tolerante) injertados sobre portainjertos sensibles (R1S) o tolerantes (R18T) a la sequía. (a) Diagrama de Venn mostrando los GEDs [$\text{Log}_2\text{FC} \geq 1,5$ y $\text{Log}_2\text{FC} \leq -1,5$; $p \leq 0,05$] sobreexpresados (S) y reprimidos (R) en cada comparativa. (b-c) Histogramas de términos GO enriquecidos con GEDs sobreexpresados.

El análisis de los términos GO más significativos reveló que los procesos "proceso metabólico celular" (9%), "proceso metabólico de compuestos de nitrógeno" (9%), "respuesta a estrés" (8%), "desarrollo de estructuras anatómicas" (8%), "proceso metabólico primario" (8%) y "proceso metabólico de sustancias orgánicas" (8%) estaban enriquecidos con un mayor número de GEDs sobreexpresados en Oria 6 / R1S; mientras que los procesos "respuesta a estrés" (9%), "proceso metabólico de sustancias orgánicas" (9%), "proceso metabólico primario" (9%), "proceso biosintético" (8%) y "desarrollo de estructuras anatómicas" (7%), estaban enriquecidos con GEDs sobreexpresados en Gal 1056 / R1S (Figura 4.6b).

El análisis MapMan mostró que las categorías asociadas con "biosíntesis de ARN", "acción de fitohormonas", "respuesta a estímulos externos", "modificación de proteínas" y "metabolismo secundario" eran las más significativamente enriquecidas con genes sobreexpresados en Oria 6 / R1S; mientras que las categorías asociadas con "biosíntesis de ARN", "metabolismo secundario" y "metabolismo de fitohormonas" fueron las más significativamente enriquecidas con genes sobreexpresados en Gal 1056 / R1S. Entre los GEDs asociados con "biosíntesis de ARN" que codifican los FTs, NAC, DREB, PHD, CAMTA, MYB, ERF, C2H2-ZF y MADS/AGL estaban sobreexpresados tanto en Gal 1056 / R1S como en Oria 6 / R1S; mientras que los factores E2F/DP (isotig19813), TPL/TPR (unigen49652), BZR (unigen208422), AS2-LOB (unigen14309), varios FTs WRKY (unigen94602, isotig32262, unigen115217, unigen757, unigen45155, isotig33128, isotig47577, PUT-14265), bHLH (isotig35098), NF-Y (unigene11211), y GRF-GIF (isotig52746), estaban sobreexpresados exclusivamente en Oria 6 / R1S; frente a los FTs BBX-CO (unigene76050) y gran parte de los FTs HSF (isotig11756, unigene38095, PUT-14542) que lo estaban en Gal 1056 / R1S. Dentro de los procesos asociados con la "acción de fitohormonas", aquellos relacionados con "auxinas", "ácido abscísico", "ácido jasmónico" y con "péptidos de señalización", contaban con GEDs sobreexpresados en ambos genotipos, mientras que aquellos relacionados con "citoquininas" (unigene111578, isotig42918) y "estringolactonas" (unigene64742), incluían GEDs exclusivamente sobreexpresados en Oria 6 / R1S, y GEDs relacionados con "brasinosteroides" (unigene4455) y "giberelinas" (isotig43808), estaban sobreexpresados exclusivamente en Gal 1056 / R1S. El análisis también reveló que los GEDs asociados con el "metabolismo de poliaminas", que participaban en la "degradación de poliaminas" y en la "biosíntesis de espermidina", estaban sobreexpresados significativamente en ambos genotipos.

El análisis de las 30 rutas KEGG más enriquecidas en GEDs sobreexpresados reveló que glucólisis y gluconeogénesis, metabolismo de la galactosa, metabolismo del almidón y la sacarosa, biosíntesis de flavonoides, metabolismo del fosfato de inositol, metabolismo de la arginina y la prolina, biosíntesis de fenilpropanoides, metabolismo de purinas, y en el metabolismo de glicerolípidos, lo estaban en Oria 6 / R1S (Figura 4.7a); mientras que biosíntesis de fenilpropanoides, metabolismo de aminoácidos y azúcares nucleótidos, metabolismo del almidón y la sacarosa, y glucólisis y gluconeogénesis, incluían el mayor número de GEDs significativamente sobreexpresados en Gal 1056 / R1S (Figura 4.7 b).

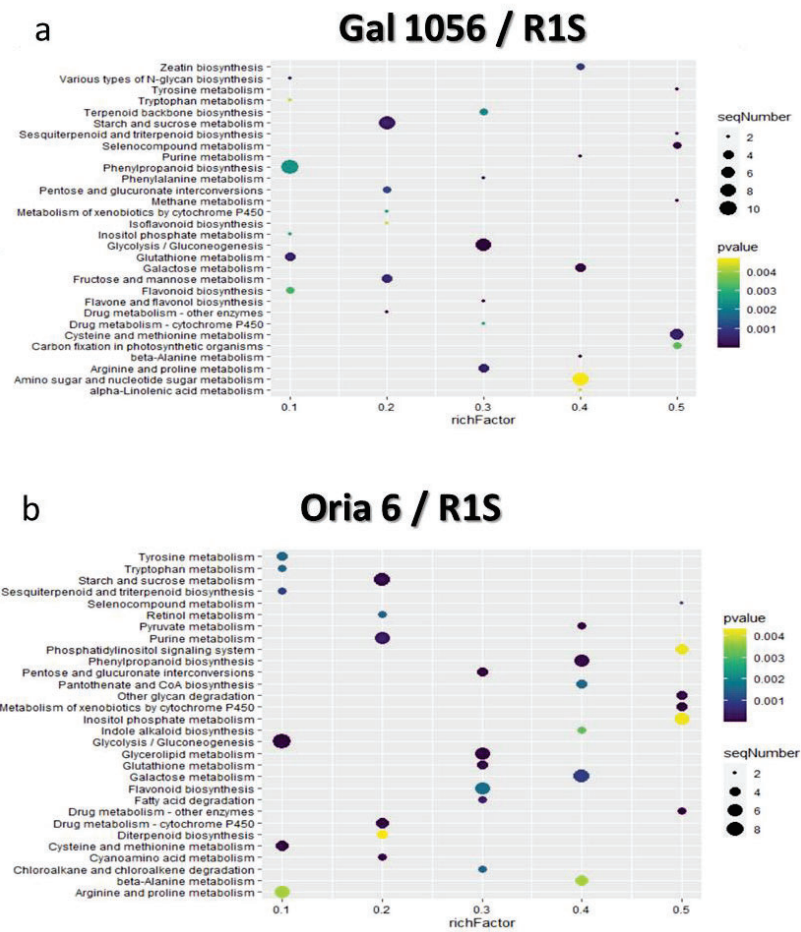


Figura 4.7. Análisis de las 30 rutas KEGG más enriquecidas en genes significativamente sobreexpresados ($\geq 1,5 \text{ Log}_2\text{FC}$; $p \leq 0,05$) en Gal 1056 / R1S (a) y Oria 6 / R1S (b). El factor de riqueza (*richFactor*) representa la relación entre el número de GEDs y el número de todos los genes de la ruta.

Profundizando en el análisis funcional de los GEDs enriquecidos en cada genotipo, en Oria 6 / R1S se observó un aumento significativo de los niveles de expresión de la proteína fosfatasa 2C (isotig80133), componente de la fosfatasa reguladora del receptor PYR/PYL que participa en la señalización mediada por ácido abscísico; el componente CPFS6/CFIm68 (isotig94227), componente del complejo del factor de corte I (CG-Im), que actúa en el procesamiento del extremo 3' del ARN; la proteína leucoantocianidina dioxigenasa (unigene143857), antocianidina sintasa implicada en la biosíntesis de flavonoides; y la ubiquitina carboxilo-terminal hidrolasa (unigene95897), ubiquitina proteasa que actúa en los mecanismos de respuesta a daño celular NER (reparación de escisión de nucleótidos). En Oria 6 / R1S, también se detectaron genes sobreexpresados que codifican la proteína histona deacetilasa 15 (unigene107858), implicada en la metilación del ADN y la deacetilación de histonas, y los FTs MYB (unigene15769) y ERF (unigene53624) (Figura 4.8a).

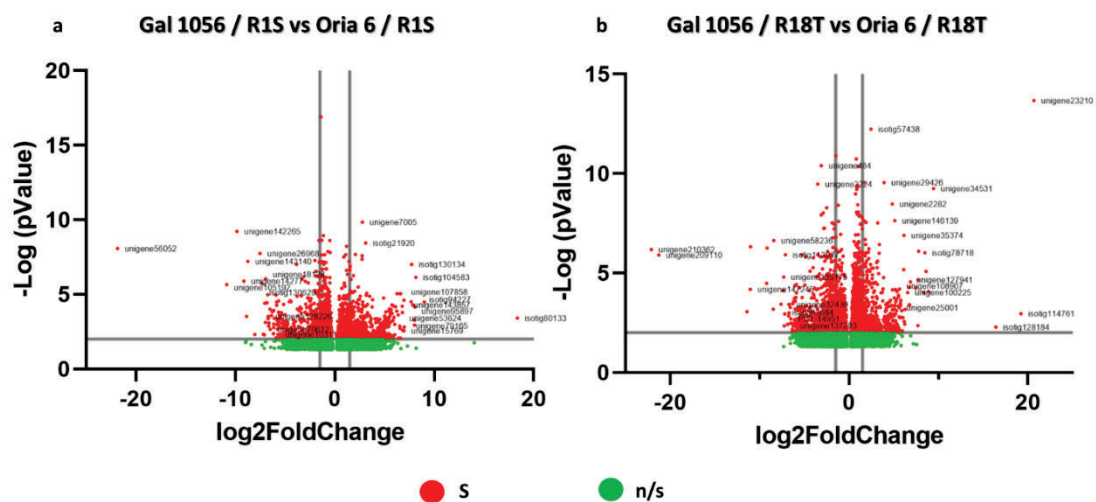


Figura 4.8. Diagramas volcano (volcano plots) en los que se representan los GEDs en (a) Gal 1056 / R1S vs Oria 6 / R1S y (b) Gal 1056 / R18T vs Oria 6 / R18T (S: sobreexpresados [$\text{Log}_2\text{FC} \leq -1,5$ y $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1,5$; $p < 0,05$]; n/s: no significativos).

En el genotipo sensible, Gal 1056 / R1S, se detectó que el gen que codifica la proteína de unión a clorofila a-b tipo II 2 (unigene56052), componente del fotosistema II implicado en fotofosforilación, mostraba el mayor valor de Log_2FC (21,8). Además, los componentes RPL21 (unigene105192, isotig130629) y el factor de procesamiento del ARNr (IRP1) (unigene143140), implicados en la biogénesis de los ribosomas; la 2-isopropilmalato sintasa (unigene14277), implicada en la biosíntesis de aminoácidos derivados del piruvato; la proteína de respuesta a deshidratación RD22 (unigene26968), implicada en la vía de señalización en respuesta al estrés; los FTs bZIP

(unigene142265), C2H2 (PUT-8016) y NAC (unigene10311); la proteína de conjugación de ubiquitina E2 (unigene128226), componente del sistema ubiquitina-proteasoma que podría desempeñar papeles clave en otras vías de señalización (Liu *et al.*, 2020); el componente PAP1/TAC3 (unigene70612), componente del complejo ARN polimerasa (PEP) codificado en el plásmido, y la mio-inositol-1-fosfato fosfatasa (unigene18128), implicada en la biosíntesis del azúcar de los nucleótidos, se encontraban sobreexpresados en esta construcción (Figura 4.8a).

El análisis de la expresión genética diferencial entre las acículas de las púas sensibles y tolerantes a la sequía, injertadas sobre los portainjertos tolerantes (Gal 1056 / R18T vs Oria 6 / R18T) permitió la identificación de 1.521 GEDs identificados exclusivamente en estas construcciones, con 637 y 884 genes sobreexpresados en Oria 6 / R18T y Gal 1056 / R18T, respectivamente (Figura 4.6a). El análisis de distribución de términos GO, reveló que las categorías "respuesta a estrés" (11%), "proceso metabólico primario" (9%), "proceso metabólico de sustancias orgánicas" (9%) y "proceso metabólico celular" (9%), estaban enriquecidas con GEDs sobreexpresados en Oria 6 / R18T; mientras que las categorías "proceso metabólico primario" (9%), "proceso metabólico de sustancias orgánicas" (9%) y "proceso biosintético" (8%), estaban enriquecidas con GEDs sobreexpresados en Gal 1056 / R18T (Figura 4.6c). El análisis de categorización MapMan, reveló que los procesos relacionados con "biosíntesis de ARN", "acción de fitohormonas", "homeostasis de proteínas", "respiración celular" y "fotosíntesis" estaban enriquecidos en GEDs sobreexpresados en Oria 6 / R18T; mientras que aquellos relacionados con "metabolismo secundario", "biosíntesis de ARN", "metabolismo de lípidos", "metabolismo de carbohidratos", "respiración celular" y "acción de fitohormonas" estaban enriquecidos con GEDs sobreexpresados en Gal 1056 / R18T. Entre los GEDs implicados en "biosíntesis de ARN", los FTs bZIP (isotig11280), HSF (isotig33130), DBP (isotig47450), C2H2-ZF (unigene18337), C3H-ZF (isotig44603) y varios FTs NAC (isotig49335, unigene1204, unigene81066) y MADS/AGL (unigene35107, isotig63561, isotig106922) estaban sobreexpresados en Oria 6 / R18T; mientras que FTs WRKY (isotig49133, isotig62188, unigene756, isotig43559, unigene204340), bHLH (unigene22611), GRAS (isotig113077) y TPL/TPR (unigene158988, unigene40634) estaban sobreexpresados en Gal 1056 / R18T. Entre los GEDs implicados en la regulación de fitohormonas, aquellos relacionados con la biosíntesis de "auxinas", "ácido abscísico", "giberelinas", "ácido jasmónico" y "péptidos de señalización" incluían GEDs sobreexpresados en ambos genotipos, mientras que los relacionados con "brasinosteroides" (isotig25758, isotig28748, unigene73725), "etileno" (isotig57349) y "estringolactonas" (unigene52421) solo se identificaron sobreexpresados en Oria 6 / R18T, y aquellos relacionados con "citoquininas" (isotig48547) lo estaban en Gal 1056 / R18T. Entre los GEDs implicados en metabolismo secundario, los genes relacionados con la biosíntesis de "betaínas" y "glucosinolatos" estaban sobreexpresados en Oria 6 / R18T, mientras gran parte de los genes asociados con la biosíntesis de "fenoles" y "terpenoides" lo estaban en Gal1056 / R18T.

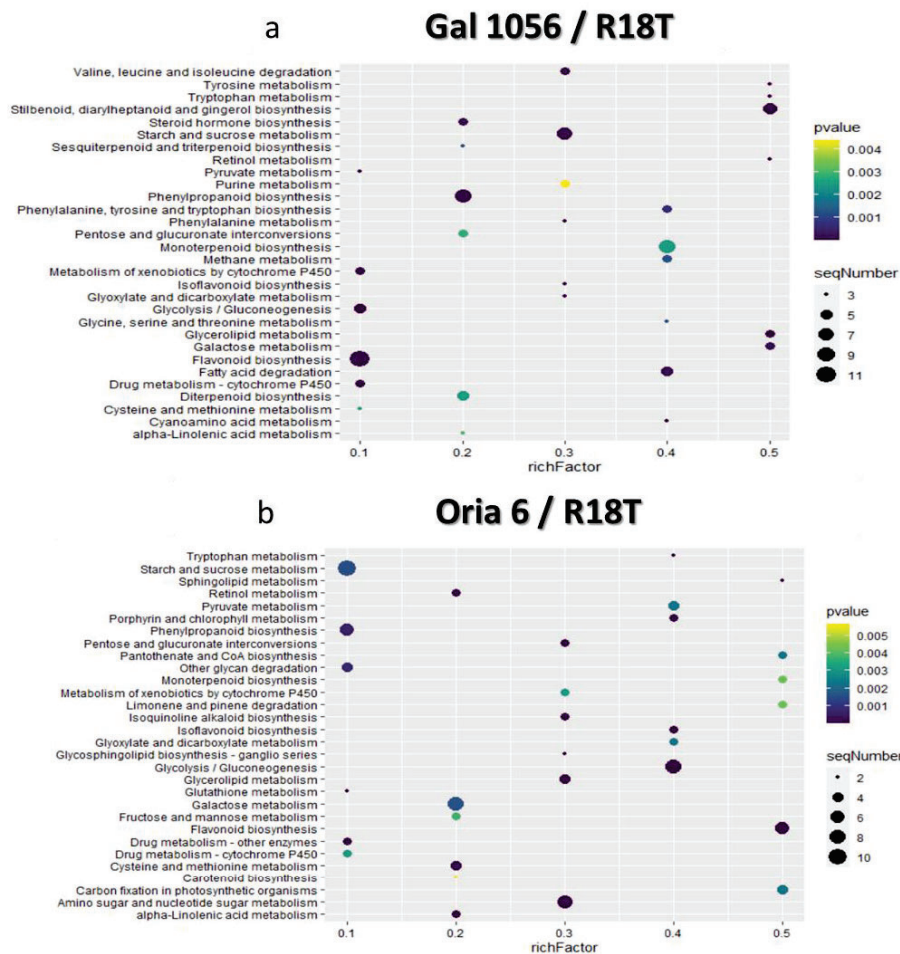


Figura 4.9. Análisis de las 30 rutas KEGG más enriquecidas en genes sobreexpresados significativamente ($\geq 1,5 \text{ Log}_2\text{FC}$; $p \leq 0,05$) en Gal 1056 / R18T (a) y Oria 6 / R18T (b). El factor de riqueza (*richFactor*) representa la relación entre el número de GEDs y el número de todos los genes de la ruta.

El análisis de las 30 rutas KEGG con mayor número de GEDs sobreexpresados reveló enriquecimiento de genes asociados con el metabolismo del almidón y la sacarosa, la glucólisis y gluconeogénesis, el metabolismo de la galactosa, el metabolismo de aminoácidos y azúcares nucleótidos, la biosíntesis de flavonoides y la biosíntesis de fenilpropanoides en Oria 6 / R18T (Figura 4.9a); mientras que con la biosíntesis de flavonoides, la biosíntesis de monoterpénoides, la biosíntesis de fenilpropanoides, el metabolismo del almidón y la sacarosa y la biosíntesis de estilbenos, diarilheptanoides y gingerol en Gal 1056 / R18T (Figura 4.9 b).

El análisis de los genes expresados diferencialmente en Oria 6 / R18T, reveló que el factor de elongación 1-alfa (isotig114761), implicado en la elongación de la transcripción dependiente de la ARN polimerasa II, mostraba el mayor valor de Log2FC (19,2). Asimismo, dos proteínas implicadas en ubiquitinación (UBQ, isotig128184, isotig78718), implicadas en el sistema ubiquitina-proteasoma; un factor de edición del ARN (unigene127941); dos proteínas receptoras (GID1) (unigene108907, unigene25001) que actúan en la percepción y transducción de señales, y la proteína D-lactato deshidrogenasa (unigene 100225), que participa en la degradación del metilglioxal, también estaban significativamente sobreexpresadas en Oria 6 / R18T (Figura 4.8b). En Gal 1056 / R18T el gen que mostraba el mayor valor de Log2FC (11,04) codifica la proteína chalcona sintasa (CHS) (unigene147245), implicada en el metabolismo secundario de flavonoides. Otros genes, como la serina hidroximetiltransferasa (SHM) (isotig83684) y el componente PetG/V (unigene58236), implicados en fotorrespiración y fotofosforilación; los FTs GRAS (isotig113077) y MYB (unigene32436); la cadena de tubulina beta-1/beta-2 (unigene137293), implicada en el ensamblaje y el mantenimiento de los centrómeros durante la mitosis y la meiosis; y la proteína SNARE de 27 kDa (PUT-14951), que actúa en el tráfico de vesículas guiadas por complejos SNARE, también estaban sobreexpresados en esta construcción (Figura 4.8b).

El análisis funcional de los perfiles transcriptómicos de los genes expresados en acículas de púas sensibles y tolerantes a la sequía injertadas en portainjertos sensibles (Gal 1056 / R1S vs Oria 6 / R1S) y tolerantes (Gal 1056 / R18T vs Oria 6 / R18T), reveló la presencia de un conjunto de GEDs detectados en ambos análisis. Un total de 2.541 GEDs comunes, de los que 1.322 genes estaban sobreexpresados en injertos de Oria 6, mientras que 1.218 estaban sobreexpresados en injertos de Gal 1056, independientemente del genotipo del portainjerto (Figura 4.6a). Únicamente se observó un gen sobreexpresado en Oria 6 / R1S y reprimido en Gal 1056 / R18T. El análisis de los términos GO más significativos mostró que, con independencia del portainjerto, las categorías "respuesta a estrés" (9%), "proceso metabólico celular" (8%), "proceso metabólico de sustancias orgánicas" (8%), y "proceso metabólico primario" (8%) eran los procesos biológicos enriquecidos en GEDs sobreexpresados en Oria 6, mientras que en Gal 1056 los procesos biológicos "proceso metabólico celular" (9%), "proceso metabólico de sustancias orgánicas" (9%), "proceso metabólico primario" (9%), "proceso biosintético" (8%) y "proceso metabólico de compuestos de nitrógeno" (8%) estaban enriquecidos en GEDs sobreexpresados. El estudio integrado de los genes compartidos entre ambos análisis reveló que las categorías "localización de macromoléculas" (2%) y "desarrollo de organismos multicelulares" (1%) sólo contaban con GEDs sobreexpresados en Oria 6, independientemente del portainjerto analizado. Asimismo, las categorías "proceso metabólico secundario" (2%) y "ciclo celular" (2%) sólo contaban con GEDs sobreexpresados en Gal 1056 (Figura 4.10).

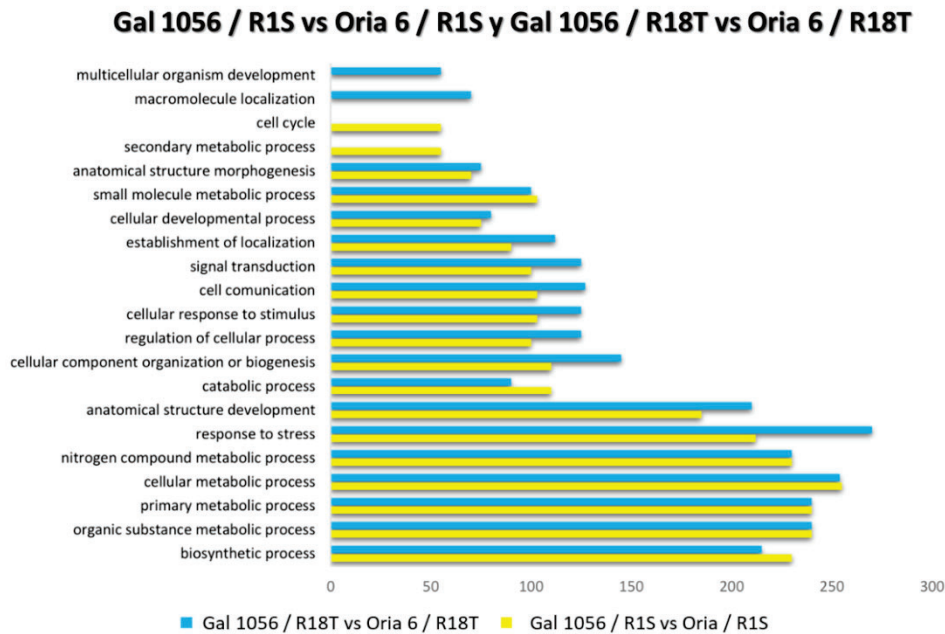


Figura 4.10. Histograma de las categorías GO enriquecidas en GEDs sobreexpresados en la comparativa Gal 1056 / R1S vs Oria 6 / R1S (amarillo) y la comparativa Gal 1056 / R18T vs Oria 6 / R18T (azul).

El análisis funcional de los GEDs sobreexpresados en Oria 6 / R1S y Oria 6 / R18T permitió la identificación de genes que codifican FTs bZIP (unigene128170), DREB (unigene20075) y HSFs (isotig85377, unigene31301, unigene146137, isotig63123, unigene52857, unigene129711, unigene33094, isotig58263); la proteína de unión a clorofila a-b tipo 2 miembro 1A y el componente PsbR (unigene207985, unigene146225) que participa en la fotofosforilación asociada al fotosistema II; las reductasas de S-nitrostiol (TRX5) (PUT-13308, isotig85683); la proteína de procesamiento de pre-mRNA (LUC7) (isotig26861); y el componente SKP2 y Cullin-1 (isotig49845, unigene133439), complejos de ubiquitilación basados en la cullina que participan en la conjugación de proteínas con ubiquitina. Entre los GEDs sobreexpresados en Gal 1056 / R1S y Gal 1056 / R18T destacaron los que codifican proteínas implicadas en la biogénesis de ribosomas (isotig79958, unigene129248); la histona H2A (H2A) (isotig10673); los dedos de zinc del homeodominio vegetal (PHD) (PUT-12952, unigene129455), implicados en epigenética y regulación transcripcional mediada por cromatina; los factores de transcripción C2H2 (unigene16552), ERF (unigene20499) y HSF (isotig104905); la subunidad reguladora compartida Pol I-V (unigene18172), componente del complejo de la ARN polimerasa dependiente del ADN (Pol); y la proteína 1 de maduración por estrés abscísico (unigene146238), implicada en la señalización del ácido abscísico. El único GED sobreexpresado en Oria 6 / R1S y Gal 1056 / R18T no pudo ser anotado.

Validación del análisis ARN-Seq empleando RT-qPCR

Los resultados del análisis transcriptómico basado en ARN-Seq se validó mediante el análisis de expresión de cinco GEDs empleando tres réplicas biológicas de las acículas procedentes de las cuatro construcciones mediante RT-qPCR. Los genes analizados y los resultados del análisis de validación se detallan en la Figura 4.11. Los GEDs analizados fueron: el FT DREB, la proteína implicada en el procesamiento de pre-ARN^m (LUC7), el sistema de translocación TOM de la membrana externa de la mitocondria (TOM), el FT C2H2-ZF y el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF). La cuantificación relativa de todos los GEDs mostró resultados que validaban el análisis transcriptómico (Figura 4.11).

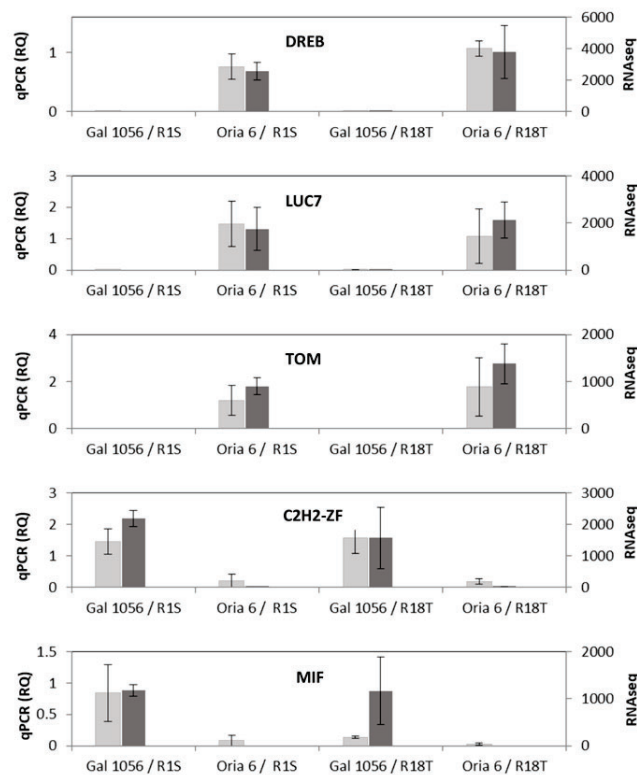


Figura 4.11. Validación de los datos de ARN-Seq mediante RT-qPCR. Cuantificación relativa (RQ) por RT-qPCR (barras grises) y valores de expresión normalizados por ARN-Seq (barras negras).

Análisis funcional de los genes expresados diferencialmente en acículas de plantas injertadas sometidas a déficit hídrico

El análisis transcriptómico de los genes expresados diferencialmente en las acículas de las púas de los progenitores de *Pinus pinaster* injertadas en portainjertos intraespecíficos sometidos a un estrés hídrico moderado, también se llevó a cabo mediante ARN-Seq para poder comparar los resultados con los obtenidos a partir del análisis de los injertos control. La secuenciación de las 12 librerías de ADNc de las acículas de los injertos sometidos a sequía permitió analizar un total de 191.913 M de lecturas, con una longitud media de 75,52 nucleótidos, y un número de lecturas por librería que oscilaba entre 9,9 M y 27,6 M de secuencias sin procesar, y entre 8,7 y 23,1 M de secuencias de alta calidad tras los procesos de filtrado (entre el 87,8% y el 83,6%) (Tabla 8). Las lecturas filtradas fueron mapeadas de forma independiente contra el transcriptoma de referencia de *Pinus pinaster* ProCoGen, obteniendo una tasa media de mapeo del 92,7% con una media de 11.979.357 lecturas mapeadas (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Resumen de los datos de secuenciación ARN-Seq, procesamiento y mapeo de las acículas de los injertos de *Pinus pinaster* sometidos a déficit hídrico.

Genotipo	Gal 1056/ R1S			Gal 1056/ R18T			Oria 6/ R1S			Oria 6/ R18T		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Número de Librería												
Lecturas sin procesar (M)	15,081707	15,081143	20,193934	16,09368	17,650766	27,685738	12,516632	9,999245	14,086148	13,931221	14,292949	15,29992
Longitud media (pb)	75,53	75,51	75,54	75,54	75,54	75,52	75,52	75,51	75,52	75,52	75,52	75,52
Total (Mb)	1139,06	1138,83	1525,44	1215,66	1333,26	2090,81	945,19	755,08	1063,83	1052,03	1079,36	1155,42
Calidad Media	34,42	34,53	34,44	34,38	34,38	34,5	34,19	34,55	34,35	34,41	34,49	34,42
Lecturas tras el procesamiento con reformat.sh y Sortmerna (M)	12,352142	13,835075	12,325121	11,099271	12,379746	23,109096	11,220784	8,769282	10,696896	12,271816	12,981956	13,915165
Longitud media tras procesamiento (pb)	73	73	73	73	73	73	73	73	73	73	73	73
Número de lecturas mapeadas (M)	11,578650	13,009757	11,133959	10,090691	11,4426858	21,5037071	10,47968488	8,1700857	9,8891840	11,30598727	12,1644303	12,98346121

Para explorar si los portainjertos genéticamente relacionados, con respuestas contrastadas a sequía, podían modificar las dinámicas transcriptómicas de las acículas de las púas injertadas sometidas a sequía, se analizaron los genes expresados diferencialmente en cada una de las 12 librerías secuenciadas. Se realizaron dos tipos de análisis de expresión génica diferencial, siguiendo una dinámica de trabajo similar a la abordada en el análisis de los injertos control. La primera comparación se llevó a cabo para evaluar si los portainjertos tolerantes o sensibles a la sequía estaban asociados con la modificación de los perfiles transcriptómicos tanto de las púas injertadas del progenitor sensible (Gal 1056 / R1S vs Gal 1056 / R18T) como del tolerante (Oria 6 /

R1S vs Oria 6 / R18T) al déficit hídrico. La segunda comparación se llevó a cabo entre los transcriptomas de las púas sensibles y tolerantes a la sequía para analizar cómo variaban cuando se injertaban en portainjertos sensibles (Gal 1056 / R1S vs Oria 6 / R1S) o tolerantes (Gal 1056 / R18T vs Oria 6 / R18T) al déficit hídrico. Los genes expresados diferencialmente fueron analizados empleando categorización funcional de Mapman, anotación de términos GO en cada ontología, y mediante el estudio de rutas KEGG enriquecidas.

Genes expresados diferencialmente en acículas de las púas de cada progenitor injertadas en los portainjertos sensibles y tolerantes a la sequía: análisis del efecto de los portainjertos en la respuesta de los injertos de *Pinus pinaster* al estrés hídrico

Siguiendo un flujo de estudio similar al descrito para plantas control, se analizó si los portainjertos sensibles o tolerantes a la sequía modificaban el perfil transcriptómico de las púas injertadas sometidas a déficit hídrico. Para ello, se procedió a la identificación de GEDs en cada una de las construcciones, comparando las que compartían el genotipo de la púa. El análisis funcional del efecto del portainjerto sobre el transcriptoma de púas sensibles a sequía (Gal 1056 / R1S vs Gal 1056 / R18T) permitió la detección de 847 GEDs expresados exclusivamente en acículas del progenitor femenino injertado sobre portainjertos sensibles y tolerantes, con 487 y 360 genes sobreexpresados en Gal 1056 / R18T y Gal 1056 / R1S, respectivamente (Figura 4.12a).

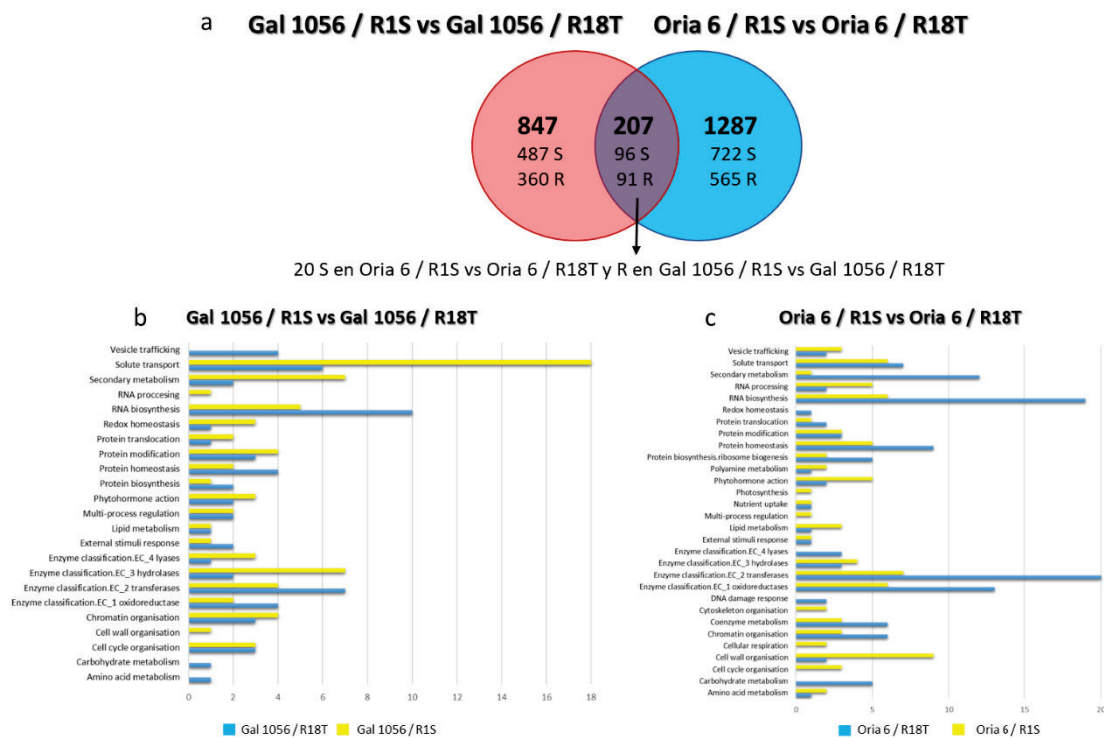


Figura 4.12. GEDs identificados en acículas de púas sensibles (Gal 1056) o tolerantes (Oria 6) a la sequía injertadas en portainjertos sensibles (R1S) vs tolerantes (R18T) a la sequía, en condiciones de estrés hídrico. (a) Diagrama de Venn mostrando los GEDs [$\text{Log}_2\text{FC} \geq 1,5$ y $\text{Log}_2\text{FC} \leq -1,5$; $p \leq 0,05$], sobreexpresados (S) y reprimidos (R) en cada comparativa. (b-c). Histogramas de las categorías MapMan enriquecidas con GEDs sobreexpresados.

El análisis MapMan mostró que las categorías asociadas con “transporte de solutos”, “metabolismo secundario”, “biosíntesis de ARN”, “modificación de proteínas”, “organización de cromatina”, y las subcategorías de enzimas asociadas con “hidrolasas” y “transferasas”, estaban enriquecidas en GEDs sobreexpresados en Gal 1056 / R1S; mientras que las categorías asociadas a procesos de “biosíntesis de ARN”, “transporte de solutos”, “tráfico vesicular”, “homeostasis de proteínas”, y las subcategorías de enzimas relacionadas con “acción de transferasas” y “oxidoreductasas”, estaban enriquecidos en GEDs sobreexpresados en Gal 1056 / R18T (Figura 4.12b). La categoría “acción de fitohormonas”, y más concretamente, la subcategoría asociada a “péptidos de señalización”, incluía GEDs sobreexpresados en ambos genotipos; mientras que la subcategoría relacionada con “citoquininas”, incluía GEDs sobreexpresados en Gal 1056 / R18T implicados en biosíntesis y las subcategorías asociadas con “auxina” y “giberelinas”, incluían GEDs sobreexpresados en Gal 1056 / R1S, implicados en conjugación y degradación, y biosíntesis. Entre los GEDs asociados a “biosíntesis de ARN” que codificaban FTs, se observó un enriquecimiento de genes WRKY, C2H2-ZF, NAC y AS2/LOB en las construcciones sobre el portainjerto tolerante (Gal 1056 / R18T), y de genes MYB, bZIP, YABBY y bHLH sobre el sensible (Gal 1056 / R1S). Entre los procesos implicados en “metabolismo secundario”, se detectó un enriquecimiento de genes asociados a la biosíntesis de “terpenos” en ambas construcciones, y un enriquecimiento de genes asociados a la biosíntesis de “flavonoides” únicamente en Gal 1056 / R18T. El análisis de GEDs asociados a “transporte de solutos”, reveló un enriquecimiento de genes asociados a las superfamilias de transportadores APC y MFS sobreexpresados en ambas construcciones; mientras que aquellos relacionados con la superfamilia TOC, y más concretamente las proteínas SWEET, y genes implicados en transporte por canales, GLR y MICU, estaban sobreexpresados en Gal 1056 / R18T; frente a los asociados a las superfamilias CDF y DMT, las familias VIT y ZIP, el transporte de aniones QUAC/ALMT y el complejo de la ATPasa-V, que estaban sobreexpresados en Gal 1056 / R1S.

El análisis de distribución de términos GO, reveló que la categoría más informativa era “procesos biológicos”, con GEDs sobreexpresados asociados con “procesos celulares” (8%), “procesos metabólicos” (7%), “respuesta a estímulos” (6%), “proceso metabólico de sustancias orgánicas” (5%) y “proceso metabólico primario” (5%) en Gal 1056 / R1S; mientras que las categorías enriquecidas en GEDs sobreexpresados en Gal 1056 / R18T estaban asociadas con “procesos celulares” (9%), “procesos metabólicos” (9%), “respuesta a estímulos” (7%), “respuesta a estrés” (6%), “desarrollo” (5%) y “desarrollo de la estructura anatómica” (5%). En la figura 4.13 se representan los 30 términos GO más enriquecidos en GEDs en la comparativa Gal 1056 / R1S vs Gal 1056 / R18T (Figura 4.13a y b, respectivamente).

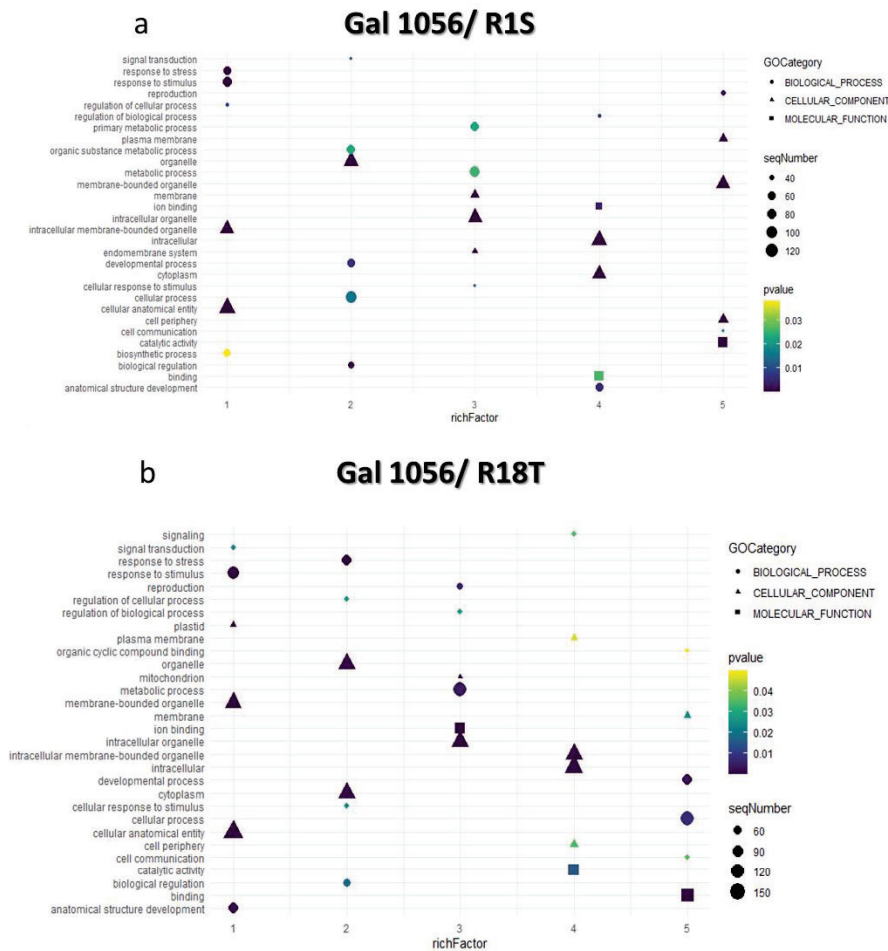


Figura 4.13. Categorías de los 30 términos GO más enriquecidos en GEDs significativamente sobreexpresados [$\text{Log}_2\text{FC} \leq -1,5$ y $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1,5$; $p \leq 0,05$] en (a) Gal 1056 / R1S y (b) Gal 1056 / R18T sometidos a estrés hídrico. El círculo, triángulo y cuadrado representan las categorías procesos biológicos, componentes celulares y función molecular, respectivamente.

El análisis de rutas KEGG desveló que las 30 principales vías enriquecidas con un mayor número de GEDs sobreexpresados en Gal 1056 / R1S fueron glicolisis y gluconeogénesis, metabolismo de piruvato, metabolismo del almidón y metabolismo de la sacarosa, metabolismo de inositol fosfato, biosíntesis de fenilpropanoides, metabolismo de purina, biosíntesis de diterpenoides y fijación del carbono en organismos fotosintéticos (Figura 4.14a); mientras que las rutas del citocromo P450, metabolismo de aminoazúcares y nucleótidos, metabolismo de xenobióticos, metabolismo de cisteína y metionina, y metabolismo de glicerolípidos estaban enriquecidas con un mayor número de GEDs sobreexpresados en Gal 1056 / R18T (Figura 4.14b).

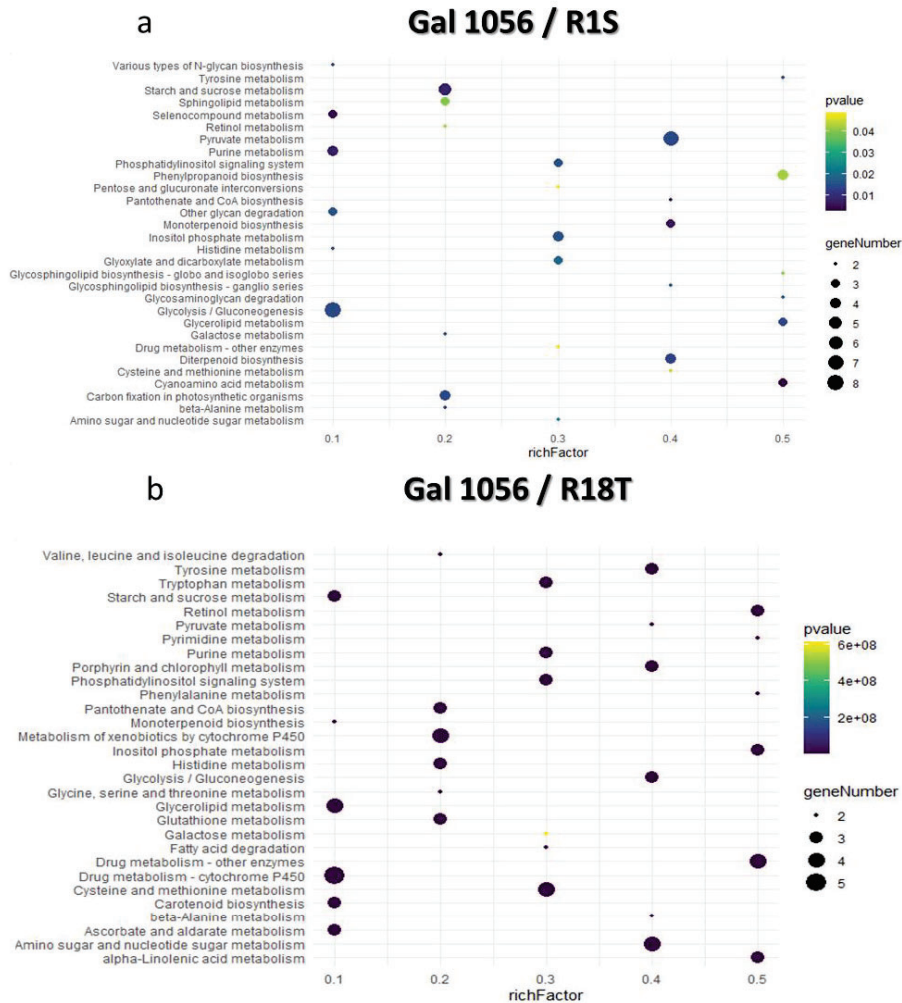


Figura 4.14. Análisis de las 30 rutas KEGG más enriquecidas en genes significativamente sobreexpresados ($\geq 1,5$ Log2FC; $p \leq 0,05$) en (a) Gal 1056 / R1S y Gal 1056 / R18T (b) sometidas a estrés hídrico. El factor de riqueza (*richFactor*) representa la relación entre el número de GEDs y el número de todos los genes de la ruta.

El análisis de acículas del progenitor masculino Oria 6 injertadas en portainjertos sensibles frente a tolerantes a sequía (Oria 6 / R1S vs Oria 6 / R18T) permitió identificar 1.296 GEDs exclusivos, 722 y 565 genes sobreexpresados en el genotipo tolerante (Oria 6 / R18T) y el genotipo sensible (Oria 6 / R1S), respectivamente (Figura 4.12a). El análisis de categorización MapMan, mostró que los procesos relacionados con “organización de la pared celular”, “acción de fitohormonas”, “transporte de solutos”, “procesamiento de ARN”, “biosíntesis de ARN”, “homeostasis de proteínas” y, nuevamente, las subcategorías “transferasas” y “oxidorreductasas”, estaban más enriquecidos en GEDs sobreexpresados en el genotipo sensible, Oria 6 / R1S, mientras que aquellos implicados en “biosíntesis de ARN”, “metabolismo secundario”, “homeostasis de proteínas”, “transporte de solutos”, y las subcategorías “transferasas” y “oxidorreductasas” englobadas en la categoría clasificación de enzimas, estaban más enriquecidos en GEDs sobreexpresados en Oria 6 / R18T (Figura 4.12c).

Entre los genes asociados a “biosíntesis de ARN” que codificaban FTs, se observó un enriquecimiento de GEDs sobreexpresados DREB, GARP, BOP y LIM en Oria 6 / R1S, mientras que GEDs GRAS, WRKY, MYB, ERF, AS2/LOB, mTERF, C2H2-ZF, NAC y bHLH sobreexpresados en Oria 6 / R18T. Entre los GEDs englobados en la categoría “acción de fitohormonas”, observamos un enriquecimiento de genes sobreexpresados en Oria 6 / R1S asociados con la percepción y transducción de las hormonas “citoquinas”, “etileno” y “estrícolactona”, mientras que no se detectaron genes sobreexpresados en Oria 6 / R18T. En “metabolismo secundario”, se detectó GEDs asociados con la biosíntesis de “terpenos” tanto en Oria 6 / R1S como Oria 6 / R18T, mientras que los genes asociados con la biosíntesis de “flavonoides”, más concretamente, de “antocianinas”, “chalconas” y “dihidroflavonoides”, y la “vía del metileritritol fosfato” (MEP), estaban únicamente sobreexpresados en Oria 6 / R18T.

En el análisis de GEDs asociados con “transporte de solutos”, observamos en ambas construcciones un enriquecimiento de genes que codifican proteínas transportadoras NRT1/PTR, dentro de la superfamilia de transportadores MFS, ; mientras que aquellos relacionados con proteínas transportadoras UnamiT y LHT de las superfamilias DMT y APC, respectivamente, estaban sobreexpresados en Oria 6 / R1S, y los GEDs que codifican proteínas PUP y PHT4, asociados a las superfamilias de transportadores DMT y MFS respectivamente, complejos MCU de transporte de calcio y los canales MRS/MGT estaban sobreexpresados en Oria 6 /R18T.

El análisis de la distribución de términos GO reveló que las categorías “proceso celular” (8%), “proceso metabólico” (7%), “respuesta a estímulos”(6%), “desarrollo de la estructura anatómica” (6%), “proceso de desarrollo” (6%), “metabolismo de sustancias orgánicas” (5%) y “proceso de metabolismo primario” (5%), fueron los procesos más enriquecidos en GEDs sobreexpresados en Oria 6 / R1S; mientras que las categorías “procesos metabólicos” (7%), “proceso celular” (7%), “respuesta a estímulos” (5%), “metabolismo de sustancias orgánicas” (5%), “proceso metabólico primario” (5%), “respuesta a estrés” (5%) y “proceso metabólico celular” (5%), lo eran en Oria 6 / R18T. En la Figura 4.15 se representan los 30 términos GO más enriquecidos en GEDs en Oria 6 / R1S y en Oria 6 / R18T (Figura 4.15a y b, respectivamente).

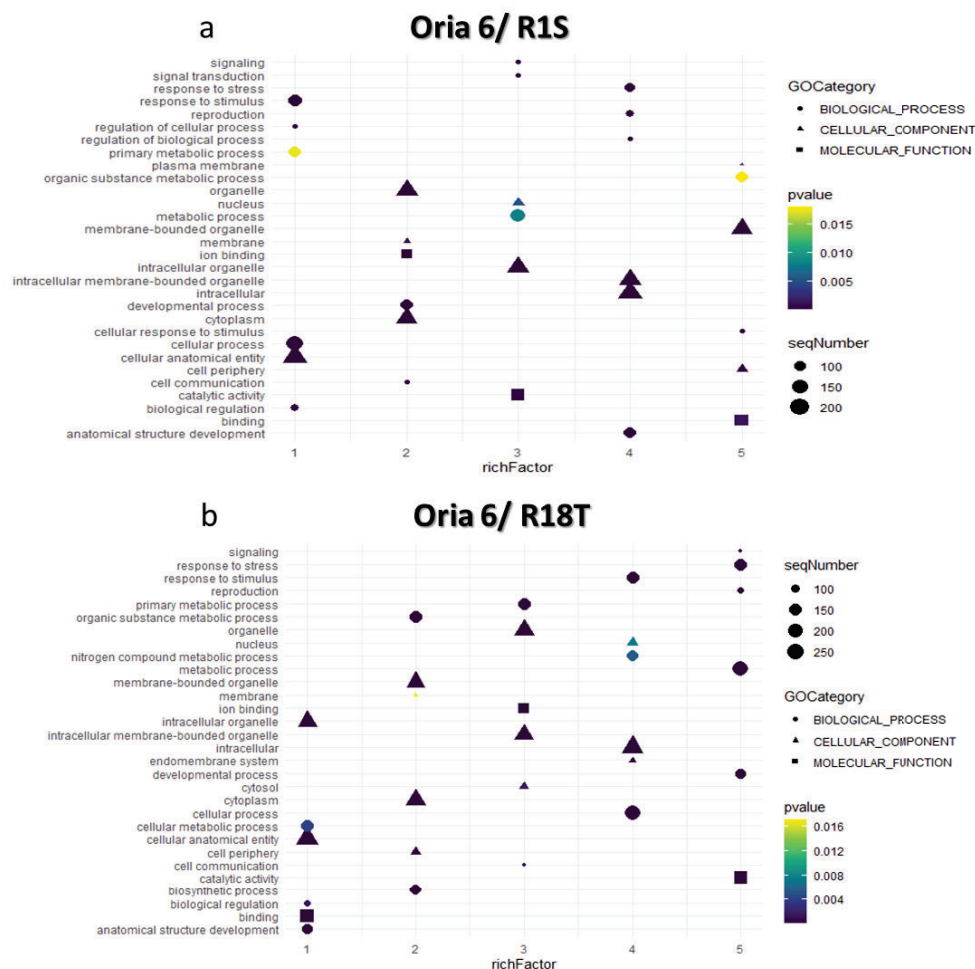


Figura 4.15. Categorías de los 30 términos GO más enriquecidos en GEDs significativamente sobreexpresados [$\text{Log}_2\text{FC} \leq -1,5$ y $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1,5$; $p \leq 0,05$] en (a) Oria 6 / R1S y (b) Oria 6 / R18T sometidas a estrés hídrico. El círculo, triángulo y cuadrado representan las categorías procesos biológicos, componentes celulares y función molecular, respectivamente.

El análisis KEGG reveló que entre las 30 principales rutas enriquecidas con un mayor número de GEDs sobreexpresados en Oria 6 / R1S se identificaron las relacionadas con metabolismo de purina, glicólisis y gluconeogénesis, metabolismo de aminoazúcares y nucleótidos, biosíntesis de monoterpénos, sistema de señalización fosfatidilinositol, metabolismo de cisteína y metionina, y metabolismo de glicerofosfolípidos (Figura 4.16a); mientras que las vías asociadas con metabolismo de aminoazúcares y nucleótidos, biosíntesis de flavonoides, metabolismo de almidón y metabolismo de sacarosa, biosíntesis de fenilpropanoides, y metabolismo de cisteína y metionina estaban enriquecidas en GEDs sobreexpresados en Oria 6 / R18T (Figura 4.16b).

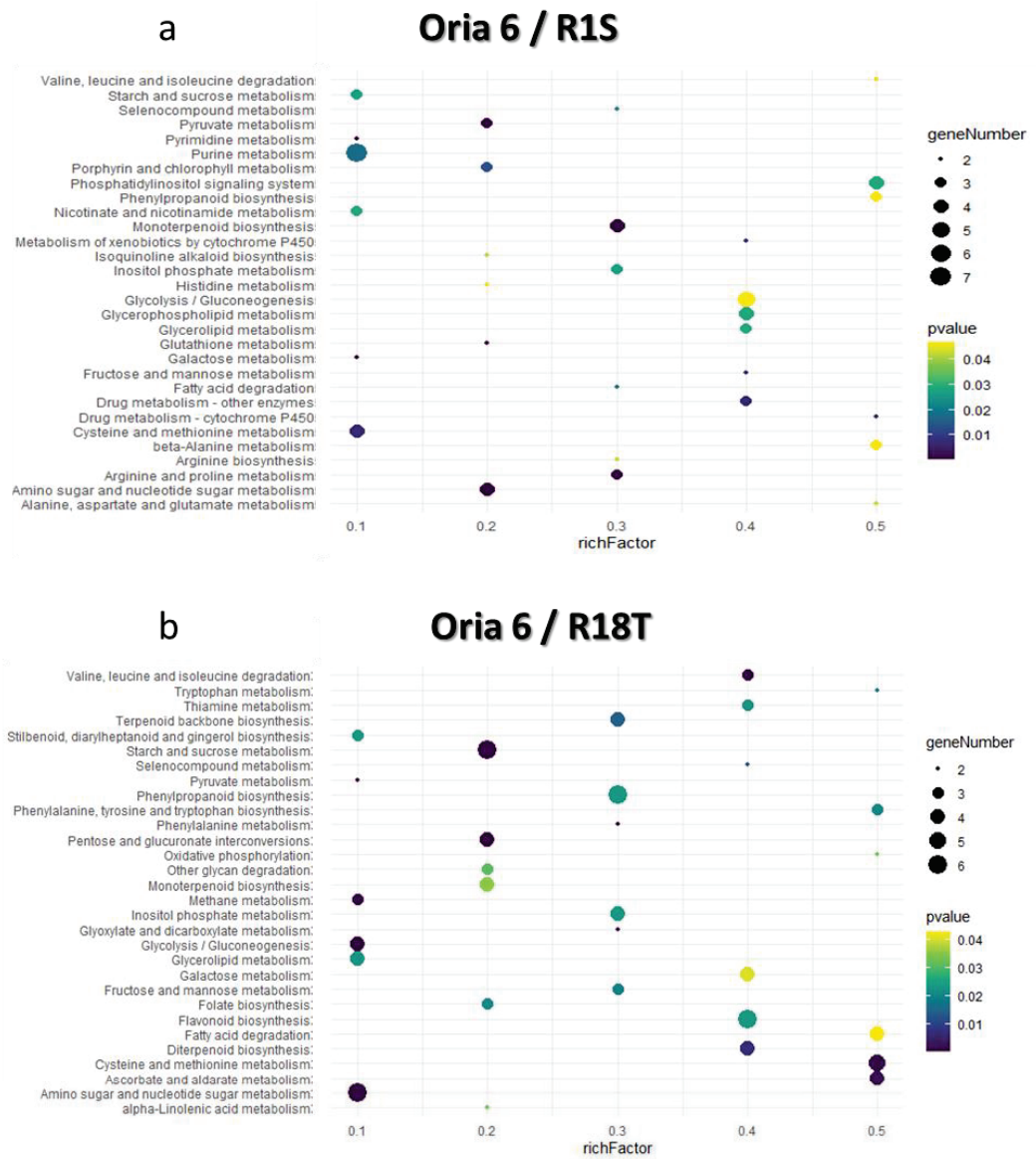


Figura 4.16. Análisis de las 30 rutas KEGG más enriquecidas en genes significativamente sobreexpresados ($\geq 1,5$ Log2FC; $p \leq 0,05$) en (a) Oria 6 / R1S y (b) Oria 6 / R18T sometidas a estrés hídrico. El factor de riqueza (*richFactor*) representa la relación entre el número de GEDs y el número de todos los genes de la ruta.

Genes expresados diferencialmente entre acículas de las púas de ambos progenitores injertadas sobre portainjertos sensibles o tolerantes a la sequía: análisis del efecto de la púa en la respuesta de los injertos de *Pinus pinaster* al estrés hídrico

El análisis comparativo de los genes expresados diferencialmente entre acículas de púas sensibles y tolerantes a la sequía injertadas sobre portainjertos sensibles a déficit hídrico (Gal 1056 /R1S vs Oria 6 / R1S) frente a los injertados sobre portainjertos tolerantes (Gal 1056 /R18T vs Oria 6 / R18T), sometidos a sequía permitió identificar un total de 2.336 GEDs sólo expresados en las injertadas sobre portainjertos sensibles, con 1.057 genes sobreexpresados en Oria 6 / R1S y 1.279 genes sobreexpresados en Gal 1056 / R1S (Figura 4.17a).

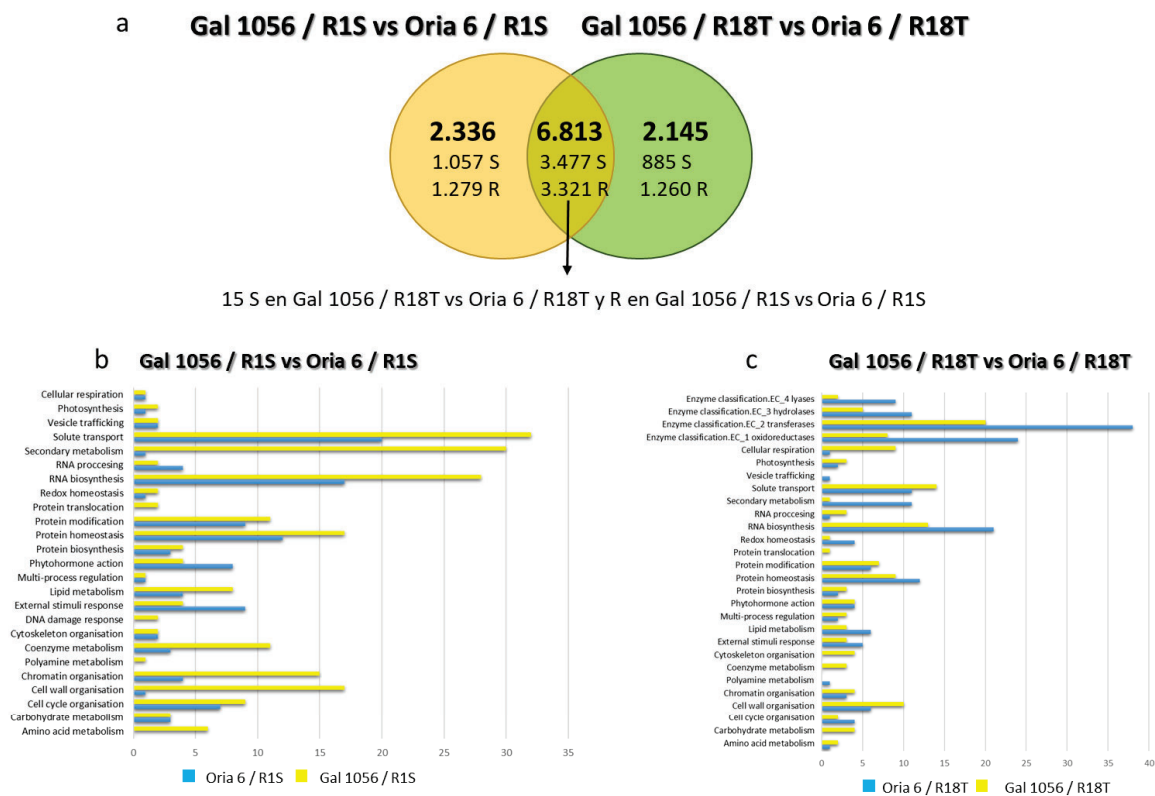


Figura 4.17. GEDs identificados al comparar acículas de las púas de los progenitores, Gal 1056 (sensible) vs Oria 6 (tolerante) injertadas sobre portainjertos sensibles (R1S) o tolerantes (R18T) a la sequía, sometidas a estrés hídrico. (a) Diagrama de Venn mostrando los GEDs [$\text{Log}_2\text{FC} \geq 1,5$ y $\text{Log}_2\text{FC} \leq -1,5$; $p \leq 0,05$] sobreexpresados (S) y reprimidos (R) en cada comparativa. (b-c). Histogramas de las categorías MapMan enriquecidas con GEDs sobreexpresados.

El análisis MapMan mostró que las categorías asociadas con “transporte de solutos”, “metabolismo secundario”, “biosíntesis de ARN”, “homeostasis de proteínas”, “modificación de proteínas”, “organización de la pared celular”, “organización de la cromatina”, “organización del ciclo celular”, y “metabolismo de lípidos”, estaban significativamente enriquecidas con GEDs sobreexpresados en Gal 1056 / R1S; mientras que las categorías asociadas con “transporte de solutos”, “biosíntesis de ARN”, “homeostasis de proteínas”, “modificación de proteínas”, “respuesta a estímulo externo”, y “acción de fitohormonas”, lo estaban en Oria 6 / R1S sometidos a sequía. Cabe destacar que únicamente se encontraron genes sobreexpresados en las categorías “metabolismo de aminoácidos”, “metabolismo de poliaminas”, “respuesta a daño de ADN”, y “traslocación de proteínas”, en Gal 1056 / R1S (Figura 4.17b).

Entre los GEDs implicados en “biosíntesis de ARN” que codifican FTs, AS2/LOB, C2H2-ZF, DREB, MADS/AGL, NAC y WRKY, estaban sobreexpresados tanto en Gal 1056 / R1S como en Oria 6 / R1S; mientras que GARP, mTERF, TCP y ULT, estaban sobreexpresados exclusivamente en Oria 6 / R1S; y los FTs AP2/ERF, bHLH, ERF, MYB, NF-YA, NF-YB, TIFY y WOX sólo en Gal 1056 /R1S. Entre los procesos asociados a la “acción de fitohormonas”, aquellos relacionados con “péptidos de señalización” incluían genes sobreexpresados en ambas construcciones; mientras que aquellos implicados en la biosíntesis de “ácido jasmónico”, y percepción y señalización de “giberelinas” y “etileno”, incluían GEDs exclusivamente sobreexpresados en Oria 6 / R1S, y aquellos relacionados con la percepción y señalización mediada por “brassinosteroides”, y la biosíntesis de “ácido abscísico” y “giberelinas”, incluían GEDs sobreexpresados en Gal 1056 / R1S. El análisis MapMan también reveló, que “metabolismo secundario” estaba enriquecido con genes asociados con la biosíntesis de “flavonoles” tanto en Gal 1056 / R1S como en Oria 6 / R1S, mientras que con biosíntesis de “antocianinas”, “chalconas”, “dihidroflavonoides” y “glicósidos de flavonoides”, “vía del metileritritol fosfato” (MEP), biosíntesis de “terpenos”, y biosíntesis de compuestos fenólicos como “p-coumaroil-CoA”, en Gal 1056 / R1S. El análisis de GEDs asociados a “transporte de solutos”, reveló un enriquecimiento de genes que codifican proteínas transportadoras AAP, BOR, UmamiT, NRT1/PTR, SWEET y ZIP, englobadas dentro de las superfamilias de transportadores APC, APC, DMT, MFS, TOC y a la familia de transportadores ZIP, respectivamente, y a los canales de transporte FEX y PIP, que estaban sobreexpresados en ambos tipos de injertos; mientras que aquellos relacionados con las proteínas transportadoras LAT, ProT, KEA, y PUP, englobadas dentro de las superfamilias de proteínas APC, APC, CPA y DMT, respectivamente, las proteínas Fabaceae-N70, PHT1, UNE2, ERD6 y PLT de la superfamilia MFS, las proteínas DTX y OPT de las superfamilias MOP y OPT, respectivamente, transportadores de sodio/potasio HKT, canales NIP y TIP, y transportadores ABCG, estaban sobreexpresados en Gal 1056 / R1S; y aquellos asociados a las proteínas CAX, G3P y BT1 asociadas con las superfamilias de transportadores CDF, MFS y MFS, respectivamente, la proteína transportadora MTCC, canales GLR y MICU, y el complejo ATPasa V, estaban sobreexpresadas en Oria 6 / R1S. El análisis de los GEDs implicados en “organización de la pared celular” permitió identificar un enriquecimiento de genes asociados con proteínas de la pared celular AGP, proteínas COB implicadas en el ensamblaje de redes de celulosa y hemicelulosa, con el componente Cyt-b5 implicado en la formación de la cutícula lipídica,

galacturonosiltransferasas y xylosiltransferasas asociadas con la biosíntesis de xilanos, CCoA-OMT implicadas en la biosíntesis de ligninas, y proteínas asociadas con la modificación y degradación de pectinas, sobreexpresados en Gal 1056 / R1S; mientras que genes asociados con el regulador CFL implicado en la biosíntesis de cutina y suberina estaban sobreexpresados en Oria 6 / R1S.

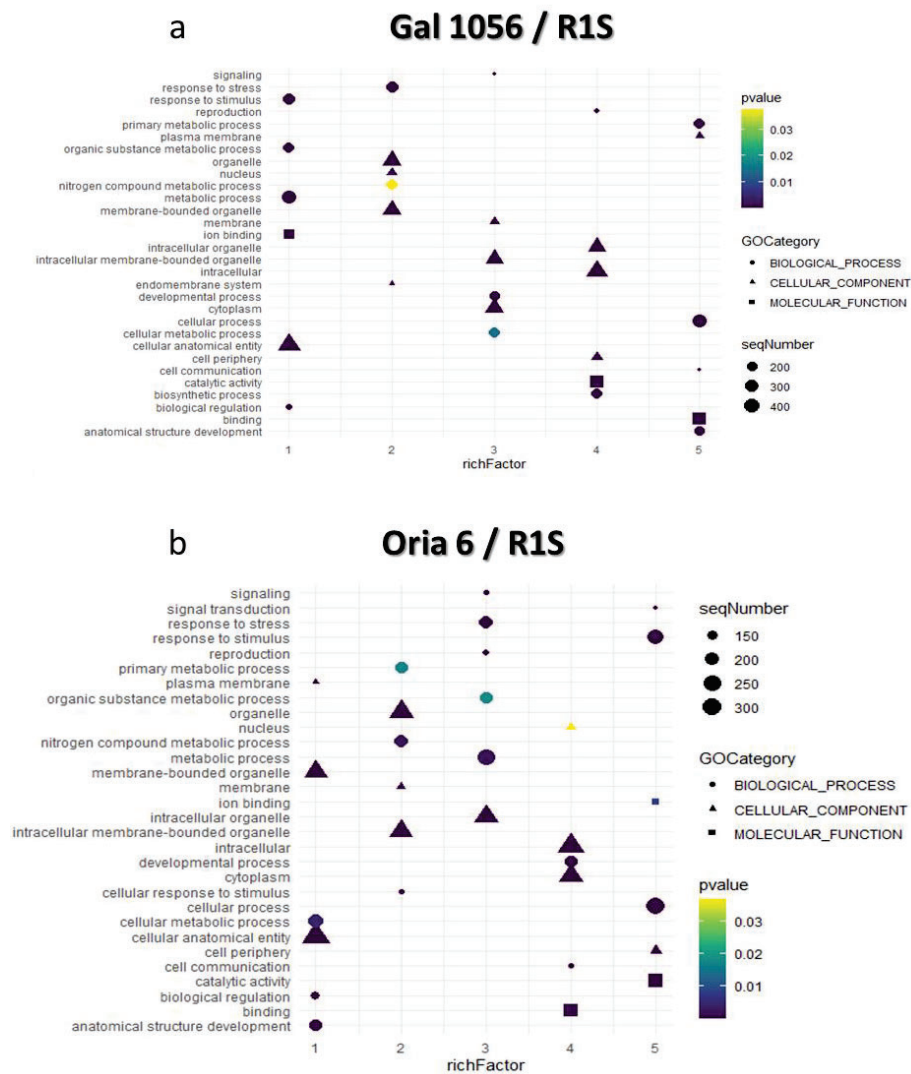


Figura 4.18. Categorías de los 30 términos GO enriquecidas en GEDs significativamente sobreexpresados [$\text{Log}_2\text{FC} \leq -1,5$ y $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1,5$; $p \leq 0,05$] en los injertos (a) Gal 1056 / R1S y (b) Oria 6 / R1S sometidos a estrés hídrico. El círculo, triángulo y cuadrado representan las categorías procesos biológicos, componentes celulares y función molecular, respectivamente.

El análisis de la distribución de términos los 30 términos GO más enriquecidos reveló que “proceso celular” (7%), “proceso metabólico” (7%), “respuesta a estímulos” (5%), “respuesta a estrés” (5%) y “proceso metabólico celular” (5%), estaban más enriquecidos con GEDs sobreexpresados en Gal 1056 / R1S (Figura 4.18a); mientras que “proceso celular” (6%), “proceso metabólico” (5%) y “respuesta a estímulo” (5%), lo estaban en Oria 6 / R1S (Figura 4.18b). El análisis de las 30 rutas KEGG con mayor número de GEDs permitió identificar que el metabolismo de almidón y de sacarosa, glicólisis y gluconeogénesis, biosíntesis de flavonoides, biosíntesis de fenilpropanoides, metabolismo de glicerolípidos, metabolismo de aminoazúcares y nucleótidos, biosíntesis de monoterpenos, interconversiones pentosa y glucuronato, y metabolismo del ascorbato y aldarato, incluían el mayor número de genes sobreexpresados en Gal 1056 /R1S (Figura 4.19a); mientras que glucólisis y gluconeogénesis, metabolismo de la galactosa, metabolismo de purina, metabolismo de piruvato, metabolismo de inositol fosfato, y metabolismo de almidón y de sacarosa, en Oria 6 / R1S (Figura 4.19b).

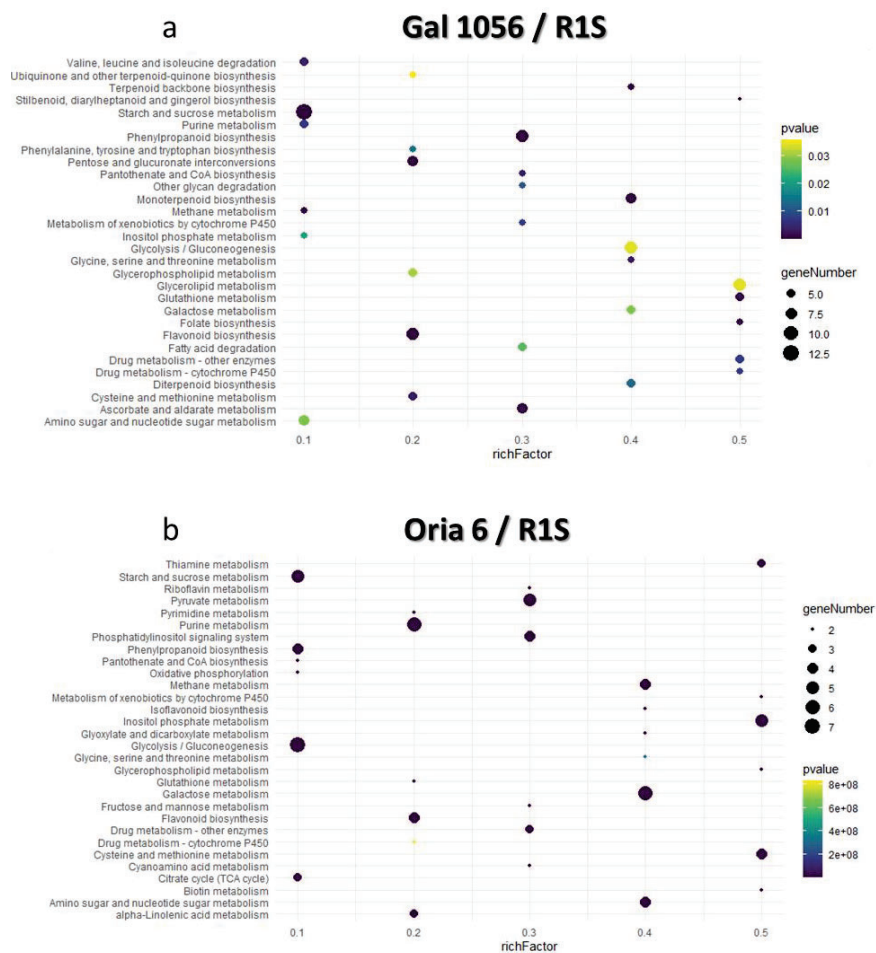


Figura 4.19. Análisis de las 30 principales rutas KEGG más enriquecidas en genes significativamente sobreexpresados ($\geq 1,5 \text{ Log}_2\text{FC}$; $p \leq 0,05$) en injertos (a) Gal 1056 / R1S y (b) Oria 6 / R1S sometidos a sequía. El factor de riqueza (*richFactor*) representa la relación entre el número de GEDs y el número de todos los genes de la ruta.

El análisis de la expresión génica diferencial entre las púas sensibles y tolerantes a sequía, injertadas sobre portainjertos tolerantes (Gal 1056 / R18T vs Oria 6 / R18T) sometidos a sequía permitió identificar 2.145 GEDs identificados exclusivamente, con 1.260 y 885 genes sobreexpresados en Gal 1056 / R18T y Oria 6 / R18T, respectivamente (Figura 4.17a).

El análisis de categorización MapMan reveló que, los procesos relacionados con la acción de “transferasas”, “transporte de solutos”, “biosíntesis de ARN” y “organización de la pared celular”, estaban enriquecidos con GEDs sobreexpresados en Gal 1056 / R18T; mientras que aquellos relacionados con la acción de “transferasas”, “oxidorreductasas” e “hidrolasas”, subcategorías de la categoría “clasificación de enzimas”, “biosíntesis de ARN”, “homeostasis de proteínas”, “metabolismo secundario” y “transporte de solutos”, estaban enriquecidos en GEDs sobreexpresados en Oria 6 / R18T. El análisis también detectó que las categorías “metabolismo de carbohidratos”, “metabolismo de coenzimas”, “organización del citoesqueleto” y “traslocación de proteínas”, incluían GEDs únicamente sobreexpresados en el genotipo sensible; mientras que las categorías “metabolismo de poliaminas” y “tráfico vesicular”, incluían GEDs únicamente sobreexpresados en el progenitor tolerante.

Entre los GEDs implicados en “biosíntesis de ARN” que codificaban FTs, ERF, GRAS y NAC estaban sobreexpresados en ambas construcciones; mientras que los factores de transcripción AS2/LOB, C2H2-ZF, DOF, DREB, GATA, TUB y WRKY, estaban sobreexpresados en Gal 1056 / R18T; y los BBX-CO, bHLH, bZIP, GARP, MYB, TUB y zf-HD estaban enriquecidos en genes sobreexpresados exclusivamente en Oria 6 / R18T. Entre los GEDs implicados en la “acción de fitohormonas”, aquellos relacionados con la biosíntesis de “ácido jasmónico” y “péptidos de señalización” incluían GEDs sobreexpresados en ambos genotipos, mientras que aquellos relacionado con la biosíntesis de “auxinas”, incluían GEDs sobreexpresados en Gal 1056 / R18T; y los relacionados con la percepción y señalización mediada por “brasinosteroides”, lo estaban en Oria 6 / R18T. Entre los GEDs implicados en “metabolismo secundario”, los genes relacionados con la biosíntesis de “fenoles”, “p-coumaroil-CoA”, estaban sobreexpresados en Gal 1056 / R18T, mientras los genes asociados a la biosíntesis de “antocianinas”, “terpenos” y la “vía MEP”, lo estaban en Oria 6 / R18T. El análisis de GEDs asociados a “transporte de solutos”, reveló un enriquecimiento de genes sobreexpresados que codifican proteínas transportadoras NRT1/PTR y OPT en ambos progenitores; mientras que aquellos relacionados con las proteínas transportadoras LHT y HAK/KIP/KT de la superfamilia de proteínas APC, las proteínas NCL/EF-CAX de la superfamilia CDF, las proteínas Fabaceae-N70 y PHT4 de la superfamilia MFS, proteínas SWEET, y los canales QUAC/ALMT, GLR y PIP, estaban sobreexpresados en Gal 1056 / R18T; y aquellos asociados con las proteínas DTX, FEX, MTCC, NGT, UAfT de la superfamilia DMT, VTL de la familia VIT y las proteínas transportadoras ABCG, estaban sobreexpresados en Oria 6 / R18T. El análisis de GEDs implicados en “organización celular” permitió identificar un enriquecimiento de genes asociados con “modificación y degradación de pectinas”, sobreexpresados en ambos progenitores, mientras que aquellos asociados con la “biosíntesis de ligninas y cutina”, el “ensamblaje de la red celulosa-hemicelulosa”, y “proteínas AGP de la pared celular”, estaban sobreexpresados en Gal 1056 / R18T; y los implicados en la “formación de lípidos cuticulares de cutina y suberina”, lo estaban en Oria 6 / R18T.

El análisis de la distribución de términos GO reveló que las categorías “respuesta a estímulos” (23%), “desarrollo” (21%), “desarrollo de la estructura anatómica” (21%), “respuesta a estrés” (21%) y “metabolismo secundario” (3%), fueron los procesos más enriquecidos en GEDs sobreexpresados en Gal 1056 / R18T (Figura 4.20a); mientras que las categorías “proceso metabólico” (6%), “proceso celular” (6%) y “respuesta a estímulos” (5%), fueron los procesos más enriquecidos con GEDs en Oria 6 / R18T (Figura 4.20b).

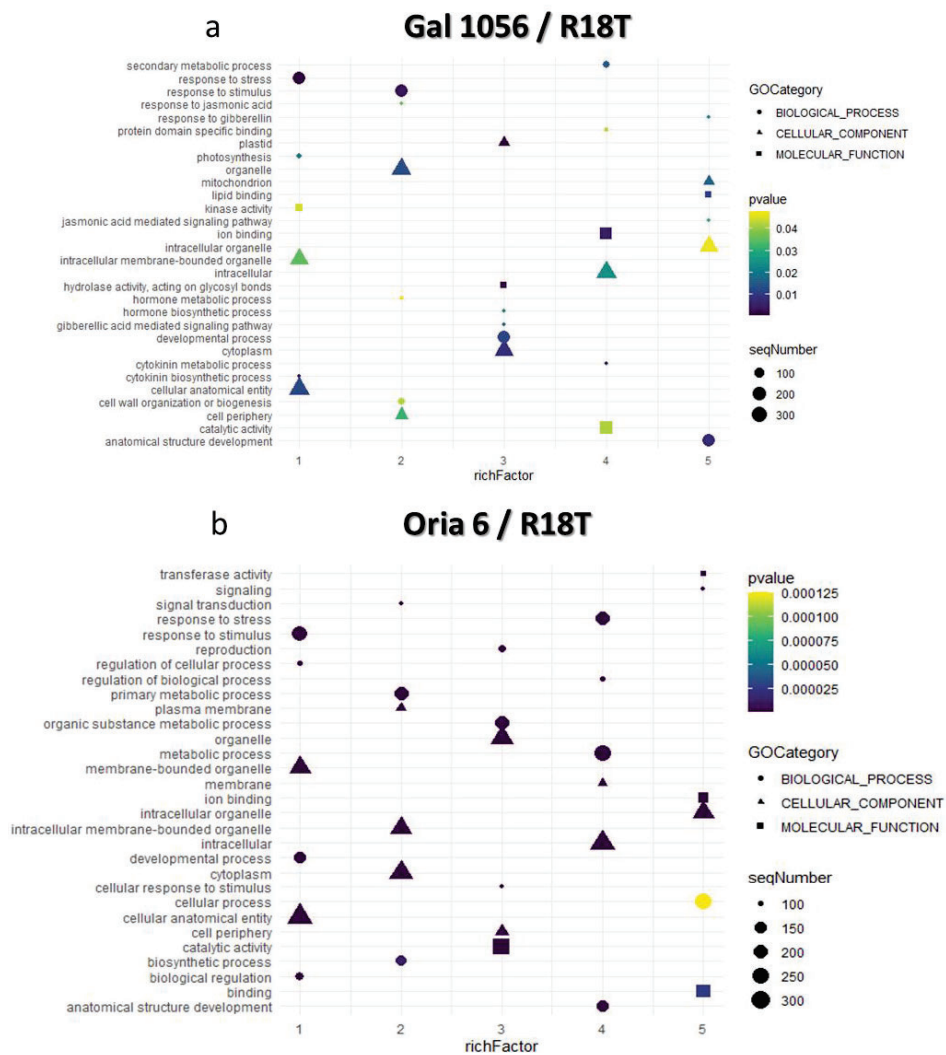


Figura 4.20. Categorías de los 30 términos GO enriquecidas en GEDs significativamente sobreexpresados [Log2FC ≤ -1,5 y Log2FC ≥ 1,5; p≤0,05] en los injertos (a) Gal 1056 / R18T y (b) Oria 6 / R18T sometidos a estrés hídrico. El círculo, triángulo y cuadrado representan las categorías procesos biológicos, componentes celulares y función molecular, respectivamente.

El análisis de las 30 principales rutas KEGG, reveló que las vías relacionadas con el metabolismo de almidón y sacarosa, metabolismo de purina, biosíntesis de fenilpropanoides, metabolismo de cisteína y metionina, metabolismo de glicerofosfolípidos, metabolismo de aminoazúcares y nucleótidos, y metabolismo de beta-alanina, estaban enriquecidas en GEDs sobreexpresados en Gal 1056 / R18T (Figura 4.21a); mientras que las rutas relacionadas con el metabolismo de almidón y sacarosa, glicólisis y gluconeogénesis, biosíntesis de flavonoides, metabolismo de tirosina, biosíntesis de alcaloides de isoquinolina, y fijación de carbono en organismo fotosintéticos, lo estaban en Oria 6 / R18T (Figura 4.21b).

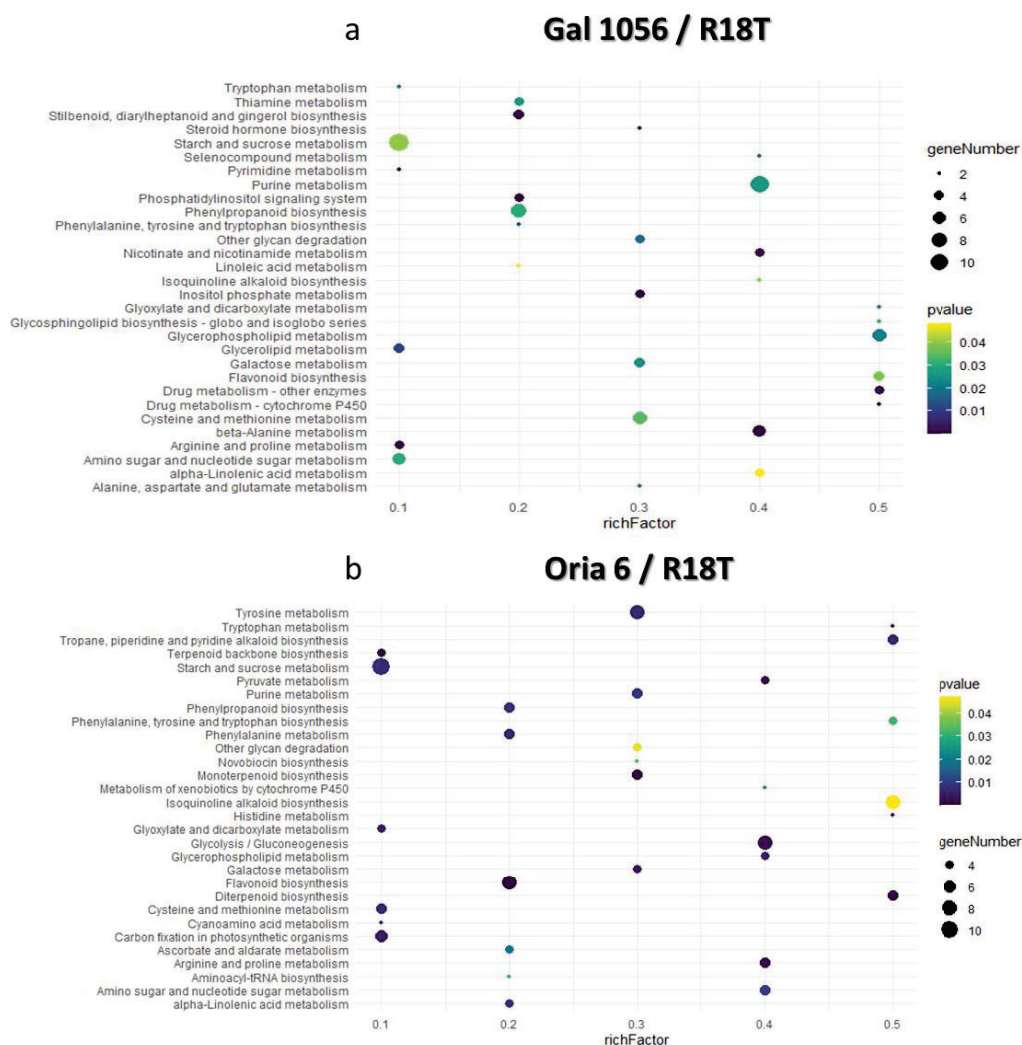


Figura 4.21. Análisis de las 30 principales rutas KEGG más enriquecidas en genes significativamente sobreexpresados ($\geq 1,5 \text{ Log}_2\text{FC}$; $p \leq 0,05$) en injertos (a) Gal 1056 / R18T y (b) Oria 6 / R18T sometidos a sequía. El factor de riqueza (*richFactor*) representa la relación entre el número de GEDs y el número de todos los genes de la ruta.

Genes expresados diferencialmente entre acículas de las púas de los progenitores injertados sobre portainjertos sensibles o tolerantes a la sequía al comparar injertos control frente a injertos sometidos a estrés hídrico

Asimismo, llevamos a cabo el estudio comparativo de los perfiles transcriptómicos de las acículas de cada una de las construcciones sometidas a los dos regímenes hídricos: injertos control frente a injertos sometidos a estrés hídrico. Para ello, se analizaron los genes expresados diferencialmente en las 24 librerías de ADNc estableciendo las siguientes comparativas: a) Gal 1056 / R1S control vs Gal 1056 / R1S sequía, b) Oria 6 / R1S control vs Oria 6 / R1S sequía, c) Gal 1056 / R18T control vs Gal 1056 / R18T sequía, y d) Oria 6 / R18T control vs Oria 6 / R18T sequía. El análisis de los componentes principales (PCA) del conjunto de datos de expresión génica permitió la agrupación de las muestras analizadas. El primer componente principal (PC1), asociado al genotipo de la púa, explicó el 84% de la varianza, mientras que los genotipos de los portainjertos (PC2) explicó el 5% de la varianza (Figura 4.22). Los genes expresados diferencialmente fueron analizados por la categorización funcional Mapman, anotación ontológica de términos GO en cada ontología, y estudio de rutas KEGG.

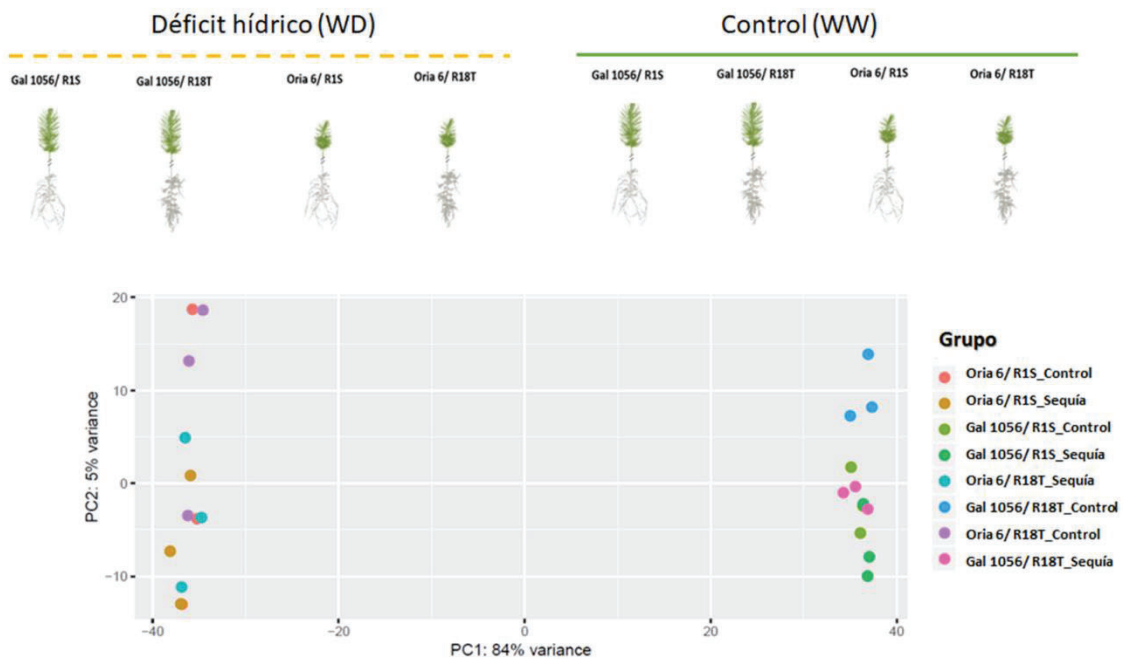


Figura 4.22. Injertos analizados combinando portainjertos tolerantes (R18T) y sensibles (R1S) a la sequía, con púas tolerantes (Oria 6) y sensibles (Gal 1056) a la sequía, sometidos a dos regímenes hídricos: control (WW) y déficit hídrico (WD). Gráfico PCA del FPKM log₂-normalizado de las muestras de ARN-Seq analizadas.

El análisis de los genes expresados diferencialmente al comparar de forma independiente las acículas control frente a las sometidas a estrés hídrico de cada injerto, permitió detectar 1.302 GEDs en Gal 1056 / R1S, con 655 y 647 GEDs sobreexpresados en los injertos Gal 1056 / R1S WD y Gal 1056 / R1S WW, respectivamente. En Gal 1056 / R18T se detectaron 1.525 GEDs, de ellos 975 y 550 GEDs sobreexpresados en Gal 1056 / R18T WD y Gal 1056 / R18T WW, respectivamente. En el caso de Oria 6 / R1S se detectaron 944 GEDs, de los que 637 y 307 eran GEDs sobreexpresados en Oria 6 / R1S WD y Oria 6 / R1S WW, respectivamente. Por último, en Oria 6 / R18T se identificaron 948 GEDs, con 501 y 447 GEDs sobreexpresados en Oria 6 / R18T WD y Oria 6 / R18T WW, respectivamente (Figura 4.23).

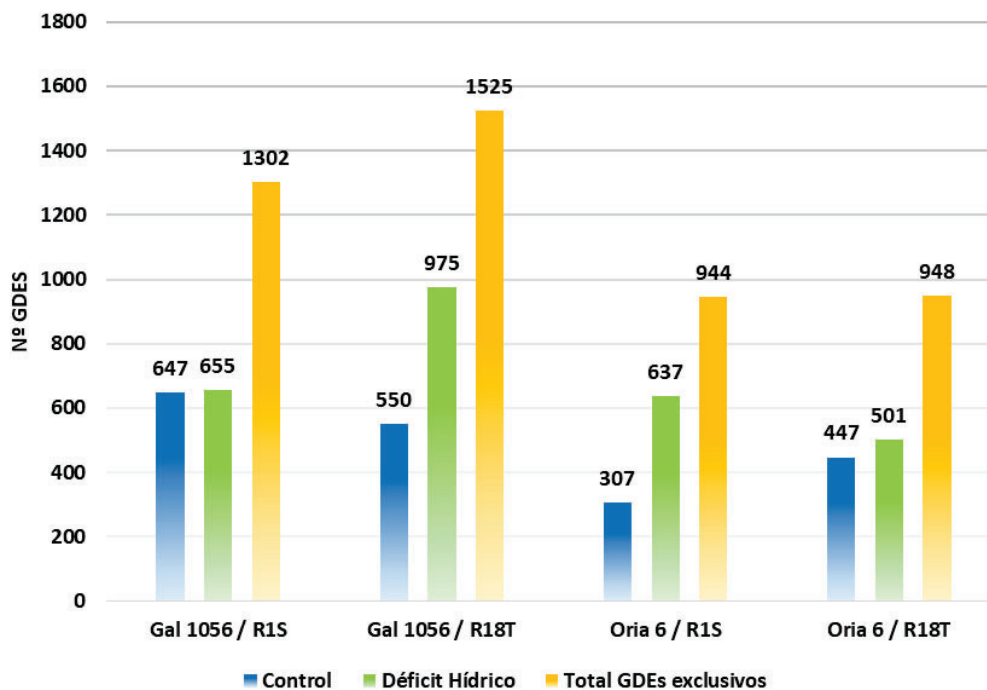


Figura 4.23. GEDs sobreexpresados en acículas de cada una de las construcciones analizadas, Gal 1056 / R1S, Gal 1056 / R18T, Oria 6 / R1S y Oria 6 / R18T, identificados al comparar los injertos control (WW) frente a los sometidos a déficit hídrico (WD) para cada construcción. GEDs sobreexpresados en injertos WW (azul), WD (verde) y GEDs totales (amarillos) [$\text{Log}_2\text{FC} \leq -1,5$ y $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1,5$; $p \leq 0,05$].

El análisis de categorización MapMan, permitió identificar los procesos celulares enriquecidos en GEDs en cada tipo de injerto. En Gal 1056 / R1S WW vs Gal 1056 / R1S WD se observó que los procesos relacionados con “organización de ciclo celular”, “organización de la pared celular”, “organización del citoesqueleto”, “biosíntesis de proteínas”, “metabolismo lipídico”, “biosíntesis de ARN”, “homeostasis de proteínas”, “transporte de solutos” y “modificación de proteínas”, estaban enriquecidos en GEDs sobreexpresados en las plantas WW.

Finalmente, metabolismo de carbohidratos incluía GEDs únicamente sobreexpresados en Gal 1056 / R1S WW. Por el contrario, los GEDs relacionados con “transporte de solutos”, “biosíntesis de ARN”, “metabolismo de aminoácidos”, “tráfico de vesículas” y “acción de fitohormonas”, estaban enriquecidos con GEDs sobreexpresados en plantas WD. El análisis también detectó que las categorías “fotosíntesis”, “translocación de proteínas” y “metabolismo de coenzimas” incluían GEDs únicamente sobreexpresados en Gal 1056 / R1S WD (Figura 4.24).

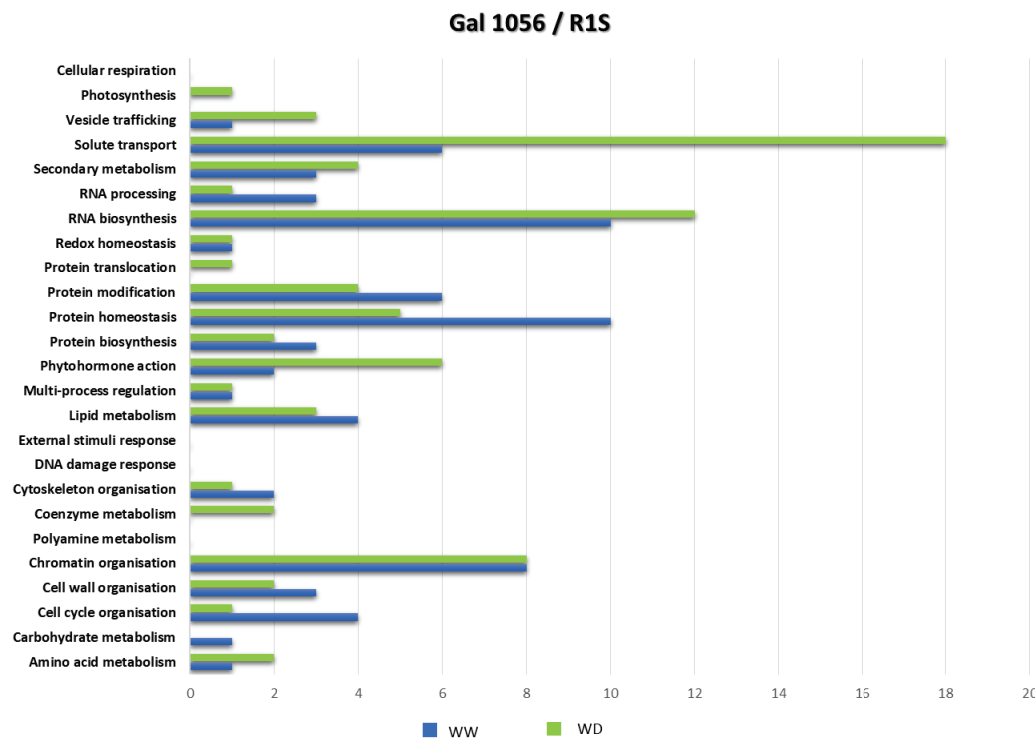


Figura 4.24. Histograma de las categorías MapMan enriquecidas en GEDs sobreexpresados ($\text{Log}_2\text{FC} \leq -1,5$ y $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1,5$; $p \leq 0,05$) en Gal 1056 / R1S control (WW, en azul) y en Gal 1056 / R1S sometidos a déficit hídrico (WD, en verde).

Entre los GEDs implicados en “biosíntesis de ARN” que codificaban FTs, C3H-ZF, MYB, NAC y NF-Y estaban enriquecidos en GEDs sobreexpresados en Gal 1056 / R1S WW; mientras que los FTs BBX-DBB, bHLH, bZIP, C2H2-ZF, DREB, ERF, GRF-GIF, mTERF y WRKY estaban enriquecidos en GEDs sobreexpresados en las acículas de Gal 1056 / R1S WD. Entre los GEDs implicados en “acción de fitohormonas”, aquellos relacionados con “péptidos de señalización”, estaban sobreexpresados en las muestras Gal 1056 / R1S WW, mientras que aquellos implicados en la percepción y señalización mediada por “ácido abscísico”, “etileno” y “giberelinas”, y la modificación y degradación de “giberelinas” y “citoquininas”, incluían GEDs sólo sobreexpresados en Gal 1056 / R1S WD. El análisis de GEDs asociados a “transporte de solutos”, reveló un enriquecimiento de genes que codifican proteínas transportadoras NRT1/PTR, que

estaban sobreexpresados en ambos tratamientos; mientras que aquellos relacionados con proteínas OCT y UmamiT, de las superfamilias MFS y DMT respectivamente, y los canales COPT y OSCA estaban sobreexpresados en Gal 1056 / R1S WW; y aquellos asociados con las proteínas transportadoras AAP, BOR, CCC y AZG de la superfamilia de proteínas transportadoras APC, las proteínas NGT, PHT1 y BT1 de la superfamilia MFS, las proteínas HKT, MTCC, SWEET y ZIP, y los canales GLR, PUP, QUAC/ALMT y TIP, estaban sobreexpresados en Gal 1056 / R1S WD. El análisis de GEDs implicados en “metabolismo secundario”, permitió identificar un enriquecimiento de GEDs asociados a biosíntesis de “antocianinas”, “chalconas” y la ruta del “mevalonato” sobreexpresados en Gal 1056 / R1S WW, y de aquellos asociados con la síntesis de “terpenos”, y la acción de las proteínas “flavonol sintasa” y “phenylalanina amonio liasa”, lo estaban en Gal 1056 / R1S WD.

El análisis MapMan de los GEDs en la comparativa Gal 1056 / R18T WW vs Gal 1056 / R18T WD, reveló que las categorías “biosíntesis de ARN”, “metabolismo de carbohidratos”, “acción de fitohormonas”, “homeostasis de proteínas” y “transporte de solutos”, estaban más enriquecidas en genes sobreexpresados en Gal 1056 / R18T WD; mientras que transporte de solutos, “metabolismo secundario” y “biosíntesis de ARN”, lo estaban en Gal 1056 / R18T WW. Las categorías “mantenimiento de la homeostásis redox” y “biosíntesis de proteínas” sólo incluían GEDs sobreexpresados en Gal 1056 / R18T WD, mientras que, por el contrario, “organización del citoesqueleto” y “metabolismo de coenzima” lo hacían en Gal 1056 / R18T WW (Figura 4.25).

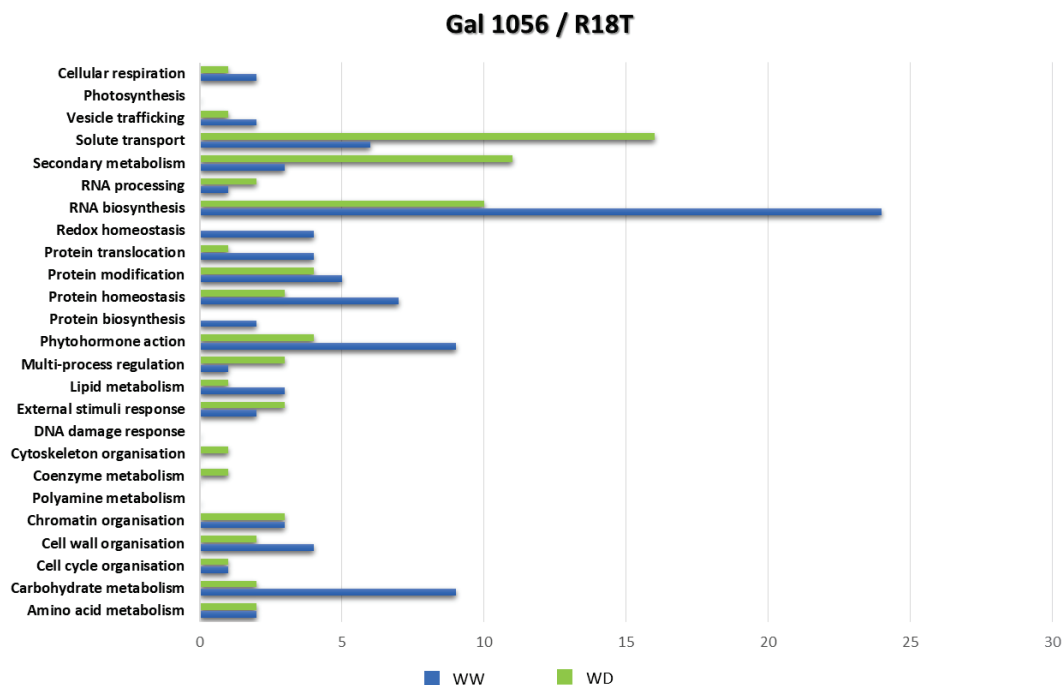


Figura 4.25. Histograma de las categorías MapMan enriquecidas en GEDs sobreexpresados ($\text{Log}_2\text{FC} \leq -1,5$ y $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1,5$; $p \leq 0,05$) en Gal 1056 / R18T control (WW, azul) en Gal 1056 / R18T sometidos a déficit hídrico (WD, verde).

El análisis de los GEDs en la categoría “biosíntesis de ARN”, relacionados con FTs DREB, ERF, MYB y NAC, estaban enriquecidos en GEDs sobreexpresados en plantas sometidas a los dos regímenes hídricos; mientras que los factores AFP/NINJA, BBX-CO, bHLH, bZIP, C2H2-ZF, DOF, GRF-GIF, HD-ZIP I/II, HSF, mTERF, RAV/NGATHA y TCP, estaban enriquecidos en genes sobreexpresados en Gal 1056 / R18T WW; y los factores de transcripción TUB, WOX y zf-HD, estaban sobreexpresados en Gal 1056 / R18T WD. El análisis de GEDs asociados a “transporte de solutos”, reveló un enriquecimiento de genes asociados a proteínas transportadoras UmamiT, que estaban sobreexpresados en plantas sometidas a ambos tratamientos; mientras que aquellos relacionados con proteínas CAX, INT, SULTR, UTE1|5 y VTL, de las superfamilias CDF, MFS, APC y DMT, y la familia VIT, respectivamente, estaban sobreexpresados en Gal 1056 / R18T WW; y aquellos asociados a las proteínas transportadoras AAP, BOR, COPT, DTX y Fabaceae-N70, la proteína HMA de la superfamilia de proteínas ATPasas tipo-P, la proteína LAT de la superfamilia APC, y las proteínas PHT1, NRTI/PTR, OPT y MTCC lo estaban en Gal 1056 / R18T WD. Entre los GEDs relacionados con “acción de fitohormonas”, aquellos relacionados con “péptidos de señalización” y percepción y señalización de “ácido abscísico”, estaban sobreexpresados en todas las plantas, mientras que aquellos relacionados con la proteína BKI inhibidora de “brasinosteroides” y con la biosíntesis de “citoquininas” y “etileno”, incluían GEDs sobreexpresados únicamente en Gal 1056 / R18T WW. Entre los GEDs asociados con metabolismo secundario, los genes relacionados con la biosíntesis de “glucosinolatos” y “carotenoides”, estaban sobreexpresados en Gal 1056 / R18T WW, y los genes asociados a la biosíntesis de “antocianina”, “chalconas”, “flavonoides”, “terpenos” y la enzima “fenilalanina amonio liasa”, lo estaban sobreexpresados en Gal 1056 / R18T WD. El análisis de los GEDs relacionados con “respuesta a estímulo externo”, permitió detectar que los genes que codificaban proteínas defensinas y EDS1, implicadas en respuesta a patógenos, estaban sobreexpresados en Gal 1056 / R18T WW, mientras que los que codificaban receptores NLR y AGG1/2, también de respuesta a patógeno, lo estaban en Gal 1056 / R18T WD.

El análisis MapMan de GEDs en la comparativa Oria 6 / R1S WW vs Oria 6 / R1S WD, reveló que las categorías “biosíntesis de ARN”, “transporte de solutos” y “organización de la pared celular”, eran las más enriquecidas en genes sobreexpresados en Oria 6 / R1S WW; mientras que las categorías “biosíntesis de ARN”, “transporte de solutos” y “modificación de proteínas”, eran las más enriquecidas en genes sobreexpresados en Oria 6 / R1S WD. Las categorías “fotosíntesis” y “homeostasis redox” incluían GEDs únicamente sobreexpresados en Oria 6 / R1S WW. Por el contrario, las categorías “tráfico vesicular”, “acción de fitohormonas”, “organización del citoesqueleto” y “metabolismo de coenzimas”, incluían genes únicamente sobreexpresados en Oria 6 / R1S WD (Figura 4.26).

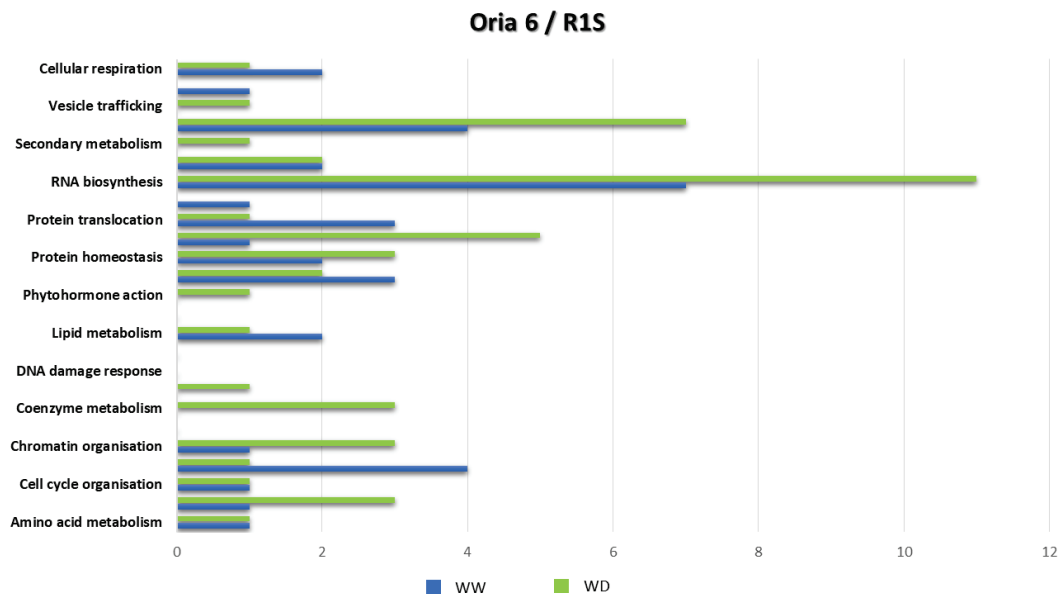


Figura 4.26. Histograma de las categorías MapMan enriquecidas en GEDs sobreexpresados ($\text{Log}_2\text{FC} \leq -1,5$ y $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1,5$; $p \leq 0,05$) en Oria 6 / R1S control (WW, azul) y Oria 6 / R1S sometidos a déficit hídrico (WD, verde).

Entre los GEDs implicados en “biosíntesis de ARN” que codificaban FTs, BBX-CO, JUMONJI, MADS/AGL y WRKY, estaban enriquecidos en genes sobreexpresados en Oria 6 / R1S WW; y los FTs bHLH, GRAS, HSF, mTERF, MYB, NAC, TIFY, YABBY y zf-HD, lo estaban en Oria 6 / R1S WD. Entre los GEDs relacionados con “transporte de solutos”, aquellos que codificaban las proteínas UmamiT, OPT, OSCA y el canal de aniones CLC, estaban sobreexpresados en Oria 6 / R1S WW, mientras que los que codificaban las proteínas PUP, Fabaceae-N70, NRT1/PTR, PLT y DTX, incluían GEDs sobreexpresados únicamente en Oria 6 / R1S WD. Entre los GEDs asociados con la “organización de la pared celular”, los genes relacionados con las proteínas de la pared celular AGP, la biosíntesis, modificación y degradación de pectinas, y la modificación y degradación de xilanos, estaban sobreexpresados en Oria 6 / R1S WW, mientras que sólo se encontraron GEDs codificantes de pectato liasa, implicada en modificación y degradación de pectinas, sobreexpresados en Oria 6 / R1S WD.

El análisis MapMan de los GEDs en la comparativa Oria 6 / R18T WW vs Oria 6 / R18T WD, reveló que los procesos “biosíntesis de ARN”, “transporte de solutos”, “organización de la pared celular”, “respuesta a estímulo externo” y “modificación de proteínas”, eran los más enriquecidos en genes sobreexpresados en Oria 6 / R18T WW; mientras que los procesos relacionados con “transporte de solutos”, “homeostasis de proteínas”, “acción de fitohormonas”, “biosíntesis de ARN” y “metabolismo de lípidos” lo eran en Oria 6 / R18T WD. Las categorías “tráfico vesicular”, “metabolismo secundario”, “homeostasis redox”, “regulación de multiprocesos”, “respuesta a daño del

ADN”, “metabolismo de poliaminas”, “organización de citoesqueleto”, “organización del ciclo celular” y “metabolismo de aminoácidos”, incluían GEDs sólo sobreexpresados en Oria 6 / R18T WW. Por el contrario, las categorías “respiración celular”, “fotosíntesis”, “biosíntesis de proteínas”, “metabolismo de coenzimas” y “metabolismo de carbohidratos”, incluían genes únicamente sobreexpresados en Oria 6 / R18T WD (Figura 4.27).

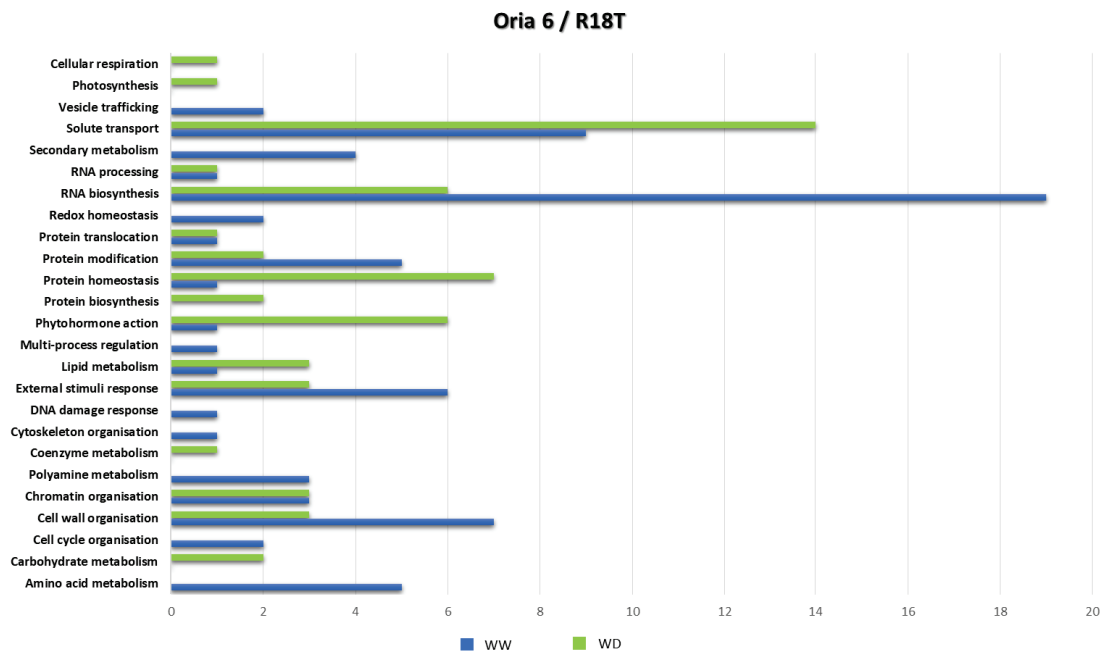


Figura 4.27. Histograma de las categorías MapMan enriquecidas en GEDs sobreexpresados ($\text{Log}_2\text{FC} \leq -1,5$ y $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1,5$; $p \leq 0,05$) en Oria 6 / R18T control (WW, azul) y en Oria 6 / R18T sometidos a déficit hídrico (WD, verde).

Entre los GEDs implicados en “biosíntesis de ARN” que codificaban FTs NAC, MYB y WRKY, estaban enriquecidos en genes sobreexpresados en ambos tratamientos, mientras que los FTs AP2/RAV, AS2/LOB, BBX-DBB, DREB, ERF, HD-ZIP I/II, PLATZ, TIFY y ULT, estaban enriquecidos con genes sobre expresados en Oria 6 / R18T WW, y los FTs DOF sobreexpresados en Oria 6 / R18T WD. Entre los GEDs implicados en el “transporte de solutos”, aquellos relacionados con las proteínas UmamiT estaban sobreexpresados en plantas sometidas a ambos tratamientos, mientras que los GEDs que codifican proteínas transportadoras ABCB, SWEET, PHT4, NiaP, MRS/MGT, MCA, DTX y MCU, sólo estaban sobreexpresados en Oria 6 / R18T WW, y BOR, CAX, FEX, LHT, NRT1/PTR, OPT, PHT1, PIP y PUP, lo estaban en Oria 6 / R18T WD. El análisis de los genes expresados diferencialmente implicados en “metabolismo secundario”, sólo detectó GEDs sobreexpresados, implicados en la biosíntesis de “glucosinolatos”, compuestos fenólicos como el “p-coumaroil-CoA” y

terpenoides como el “isoprenil difosfato” en Oria 6 / R18T WW. Entre los GEDs asociados con organización de la pared celular, los genes relacionados con la biosíntesis de lignina, celulosa y xilanos, y la modificación y degradación de pectinas, estaban sobreexpresados en Oria 6 / R18T WW, mientras que en Oria 6 / R18T WD los GEDs sobreexpresados estaban asociados con el ensamblaje de la red de celulosa-hemicelulosa, la modificación y degradación de xilanos, y la actividad de expansinas. El análisis de los genes expresados diferencialmente en procesos de respuesta a “estímulo externo”, reveló genes codificantes de proteínas NLR de respuesta a patógenos, sobreexpresados en injertos sometidos a ambos tratamientos; mientras que defensinas, FMO1 del sistema de adquisición de resistencia (SAR), y receptor quinasa NILR, implicadas en respuesta a patógeno, en Oria 6 / R18T WW; y GEDs codificantes de PAD4 y GIGANTEA, implicadas en la respuesta a patógeno y en la respuesta a estímulo luminoso, respectivamente, sobreexpresados Oria 6 / R18T WD.

En un estudio conjunto, la comparación del análisis MapMan de cada construcción y tratamiento reveló el enriquecimiento en GEDs para cada categoría (Figura 4.28). Así pudo observarse que las categorías “biosíntesis de ARN” y “transporte de solutos”, eran las más enriquecidas en GEDs en todas las muestras analizadas, y las categorías “metabolismo de coenzimas”, “metabolismo de lípidos”, “organización del citoesqueleto”, “biosíntesis de proteínas”, “homeostasis redox”, “respiración celular”, “fotosíntesis”, “procesamiento de ARN” y “tráfico de vesículas”, las menos enriquecidas en GEDs en todas las construcciones.

Los genotipos Gal 1056 / R18T WD y Oria 6 / R18T WD estaban más enriquecidos en GEDs implicados en “biosíntesis de ARN”, mientras que en “transporte de solutos”, lo estaban los genotipos Gal 1056 / R1S WW, Gal 1056 / R18T WW y Oria 6 / R18T WW y Oria 6 / R18T WD. Además, se observaron patrones de expresión comunes a varias construcciones asociadas con distintos procesos celulares. Sólo se detectaron GEDs sobreexpresados en “metabolismo de poliaminas” y “respuesta a daño del ADN”, en Oria 6 / R18T WD; en “organización del ciclo celular”, mientras que se detectaron genes expresados diferencialmente en todas las construcciones salvo en Oria 6 / R18T WW situación similar a la categoría de “traslocación de proteínas”, con GEDs en todas las construcciones salvo en Gal 1056 / R1S WD. Asimismo se observó que las categorías “metabolismo de aminoácidos” y “organización de la pared celular”, estaban especialmente enriquecidas en GEDs en Oria 6 / R18T WD. Además, el análisis de la categoría “respuesta a estímulos externo”, reveló que sólo estaban enriquecidos en GEDs aquellos genotipos injertados sobre portainjertos tolerantes (R18T), y que entre ellos, el número mayor de genes se observaba en Oria 6 / R18T WD. Por otro lado, la comparación de todas las muestras analizadas, reveló que Gal 1056 / R18T WD, incluía el mayor número de genes asociados a “metabolismo de carbohidratos”, “acción de fitohormonas” y “biosíntesis de ARN”. El análisis de la categoría “metabolismo secundario”, reveló que Gal 1056 / R18T WW incluía un número mayor de GEDs que el resto de muestras. La categoría “organización de la cromatina” estaba especialmente enriquecida en GEDs en Gal 1056 / R1S independientemente del régimen hídrico al que fuera sometido, y la categoría “regulación de multiprocesos” enriquecida únicamente en acículas de las púas del progenitor femenino, Gal 1056, independientemente del portainjerto y tratamiento analizado. La categoría “homeostasis de proteínas”, mostraba enriquecimiento de genes en los genotipos Gal 1056 / R1S WD, Gal 1056 / R18T WD y

Oria 6 / R18T WW, y la categoría “modificación de proteínas”, en genotipos Oria 6 / R1S WW.



Figura 4.28. Matriz cromática o heatmap comparando las categorías MapMan enriquecidas en GEDs compartidos en cada construcción (Gal 1056 / R1S, Gal 1056 / R18T, Oria 6 / R1S, Oria 6 / R18T) y tratamiento (control, WW, y sometidas a estrés hídrico, WD).

Identificación de genes expresados constitutivamente en acículas de injertos de Pinus pinaster

Por último, se llevó a cabo el estudio de la respuesta constitutiva, mediante el análisis funcional de aquellos genes que no mostraban diferencias de expresión significativas al comparar distintos regímenes hídricos en cada tipo de injerto, pero que sí diferían al comparar su expresión entre las acículas de las púas de ambos progenitores, bien en condiciones control o bien en respuesta a estrés hídrico. La comparación de los recuentos de lecturas normalizadas permitió la identificación de genes asociados a cada una de las cuatro construcciones estudiadas, Gal 1056 / R1S (1.229), Oria 6 / R1S (874), Gal 1056 / R18T (1.203) y Oria 6 / R18T (814). El análisis de ontología reveló que, al comparar los cuatro genotipos, cambiaban las categorías funcionales a las que pertenecían los genes constitutivos de cada construcción (Figura 4.29).

En Gal 1056 / R1S, se observó que los procesos de transporte de solutos (con 32 genes), biosíntesis de ARN (28), metabolismo secundario (27), homeostasis de proteínas (17), organización de la pared celular (15), organización de la cromatina (13), modificación de proteínas (11) y metabolismo de coenzimas (10), eran los más enriquecidos con genes expresados constitutivamente. Dentro de la categoría biosíntesis de ARN, se observó que aquellos genes que codificaban FTs estaban relacionados con AP2, DREB, ERF, WOX, MYB, NF-YA, NF-YB, AS2/LOB, bHLH, C2H2-ZF, MADS/AGL, NAC, TIFY y WRKY. Con respecto a los procesos relacionados con acción de fitohormonas, también se identificaron genes constitutivos relacionados con la biosíntesis de ABA, la percepción y traducción mediada por brasinosteroides, la biosíntesis de giberelinas y péptidos de señalización. En metabolismo secundario, identificamos GEDs asociados con la biosíntesis de flavonoides y chalconas, biosíntesis de dihidroflavonoides, de p-coumaroyl-CoA, de isoprenil difosfato, las vías MEP, y la biosíntesis de terpenos. El análisis de la categoría organización de la pared celular, reveló un enriquecimiento en genes expresados constitutivamente implicados en la pared celular como expansinas y proteínas AGP, en el ensamblaje de celulosa-hemicelulosa, en la biosíntesis de xilanos y ligninas, y en la modificación y degradación de pectinas. El análisis de genes implicados en transporte de solutos, permitió la identificación de los genes que codifican las proteínas AAP, ProT, LAT, BOR, KEA, PUP, UmamiT, Fabaceae-N70, NRT1/PTR, PHT1, UNE2, ERD6, PLT, DTX, OPT, KT, SWEET y ZIP, los canales FEZ, NIP, PIP, TIP, y la superfamilia de proteínas ABCG expresados constitutivamente en Gal 1056 / R1S.

En Gal 1056 / R18T, se observó que las categorías clasificación de enzimas (con 31 genes), transporte de solutos (15), biosíntesis de ARN (12), organización de la pared celular (9), respiración celular (9) y homeostasis de proteínas (9), eran las que presentaban un mayor número de genes expresados constitutivamente. En la categoría organización de la pared celular, se detectó un enriquecimiento de genes que participaban en procesos de ensamblaje de celulosa y hemicelulosa, biosíntesis de cutina, y modificación y degradación de ligninas y pectinas. El análisis de los genes asociados a respiración celular, reveló genes implicados en el complejo ATP sintasa, citocromo c reductasa y NADH deshidrogenasa, así como componentes del ciclo de

ácidos tricarbónicos. Entre los genes que codifican enzimas, se detectaron oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas y liasas. El análisis de procesos relacionados con la acción de fitohormonas, permitió detectar genes expresados constitutivamente implicados en la biosíntesis de auxinas y JA, así como con péptidos de señalización, mientras que sólo se detectó el gen implicado en la biosíntesis de p-coumarouyl-CoA al analizar la categoría metabolismo secundario. Entre los genes de biosíntesis de ARN, se encontraron FTs DREB, ERF, DOF, GATA, HD-ZIP I/II, AS2/LOB, C2H2-ZF, GRAS, NAC y WRKY. El análisis de genes implicados en transporte de solutos, permitió la identificación de genes expresados constitutivamente en Gal 1056 / R18T que codifican las proteínas transportadoras LHT, HAK/KUP/KT de la superfamilia APC, NCL/EF-CAX de la superfamilia CDF, Fabaceae- N70, NRT1/PTR, PHT4, OPT, SWEET, y los canales QUAC/ALMT, GLR y PIP.

El análisis de los genes expresados constitutivamente en Oria 6 / R1S reveló que, los procesos biosíntesis de ARN (con 15 genes), transporte de solutos (14), homeostasis de proteínas (10), respuesta a estímulo externo (9) y modificación de proteínas (7), presentaban el mayor número de genes expresados constitutivamente. Con respecto a los genes relacionados con respuesta a estímulo externo, destacar los genes EDS1, PAD4 y NL5, descritos en respuesta a patógenos. Entre los genes asociados a la acción de fitohormonas, encontramos genes implicados en la percepción y traducción mediada por etileno y péptidos de señalización. En cuanto a los genes de la categoría biosíntesis de ARN, los que que codifican los FTs GARP, AS2/LOB, MADS/AGL, NAC, TCP, ULT y WRKY estaban enriquecidos en genes expresados constitutivamente en Oria 6 / R1S. En los procesos implicados en transporte de solutos se observaron genes que codifican las proteínas transportadoras AAP, CAX, UmamiT, NRT1/PTR, G3P, SWEET, los canales FEX, GLR, MICU, y PPI y subunidades del complejo ATPasa V.

El análisis de los genes expresados constitutivamente en Oria 6 / R18T, reveló que los que codifican enzimas (con 67 genes), así como las categorías biosíntesis de ARN (19), homeostasis de proteínas (12), metabolismo secundario (11) y transporte de solutos (11), eran las categorías más enriquecidas. Entre los genes que codifican enzimas, destacaron oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas y liasas. En cuanto al análisis de los genes implicados biosíntesis de ARN, se detectaron genes expresados constitutivamente que codifican FTs ERF, bZIP, BBX-CO, zf-HD, GARP, MYB, bHLH, GRAS, NAC y TUB. En la categoría metabolismo secundario, se observó en enriquecimiento de genes implicados en biosíntesis de antocianinas y terpenos, y componentes de la ruta MEP. Entre los genes implicados en transporte de solutos, se observaron aquellos que codifican proteínas transportadoras UAfT de la superfamilia de proteínas DMT, y proteínas NRT1/PTR, NGT, DTX, OPT, VTL, canales FEX y proteínas transportadoras ABCG. El análisis de las categorías respuesta a estímulo externo y acción de fitohormonas, reveló la presencia de genes expresados constitutivamente implicados principalmente en la respuesta a patógenos y en menor medida a estímulo luminoso, así como genes relacionados con la percepción y traducción de señales mediadas por brasinosteroides y péptidos de señalización. Entre los genes implicados en organización de la pared celular, señalar los asociados con la formación de cutículas lipídicas, y con la modificación y degradación de xiloglucanos y pectinas.

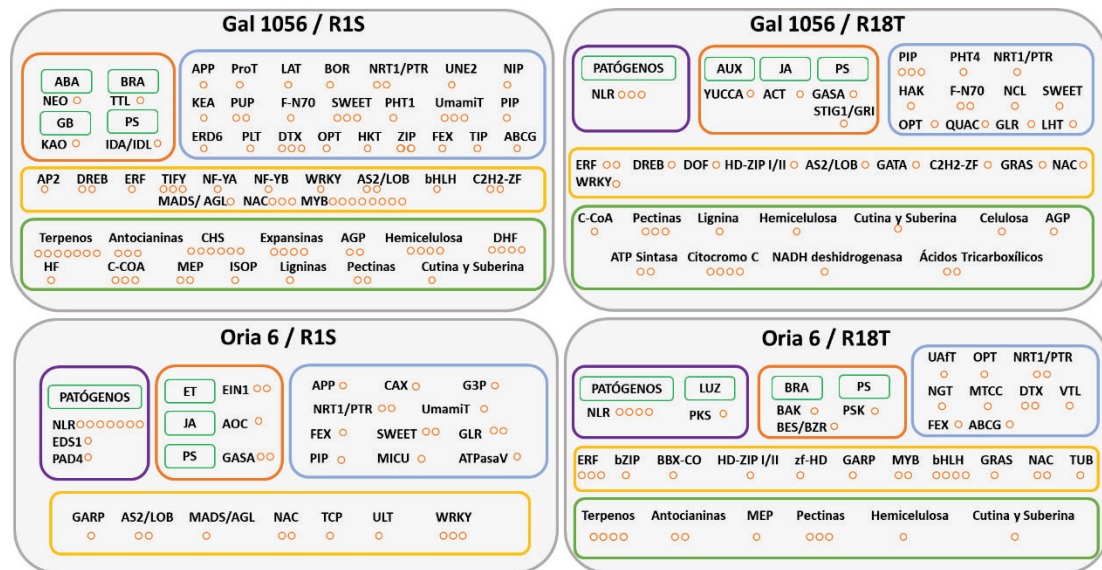


Figura 4.29. Esquema de las categorías funcionales enriquecidas en genes expresados constitutivamente en las construcciones analizadas (Gal 1056 / R1S, Gal 1056 / R18T, Oria 6 / R1S, Oria 6 / R18T). Los cuadrados morados agrupan genes de respuesta a estímulo externo, los naranjas a fitohormonas, amarillos a FTs, verdes procesos biológicos, y azul proteínas transportadoras. Cada círculo representa un gen expresado constitutivamente. Abreviaturas: ABA: ácido abscísico, AUX: auxinas; BRA: brasinosteroides; ET: etileno; GB: gibereleninas; ISOP: isoprenil difosfato; JA: ácido jasmónico; PS: péptidos de señalización; C-COA: p-cumaroil-CoA.

EFFECTO DEL PORTAINJERTO SOBRE LOS PATRONES METABOLÓMICOS DE PLANTAS INJERTADAS DE *PINUS PINASTER* EN RESPUESTA A ESTRÉS HÍDRICO

Basado en el artículo: Brígida Fernández de Simón, Ismael Aranda, Miriam López-Hinojosa, Lucía Miguel, María Teresa Cervera (2021) *Scion-rootstock interaction and drought systemic effect modulate the organ-specific terpene profiles in grafted Pinus pinaster Ait. Environmental and Experimental Botany 186: 104437*

Por último, una vez realizado el análisis transcriptómico implicado en la respuesta adaptativa a sequía de plantas injertadas de *Pinus pinaster*, se llevó a cabo el análisis metabolómico de las cuatro construcciones, Gal 1056 / R18T, Gal 1056 / R1S, Oria 6 / R18T y Oria 6 / R1S, con el fin de profundizar en la evaluación del uso de portainjertos para modificar la respuesta a estrés hídrico del árbol injertado.

Para ello se realizaron dos estudios paralelos analizando 6 réplicas biológicas de cada una de las combinaciones púa-portainjerto, donde la mitad de las plantas fueron sometidas a sequía y la otra mitad bien regadas usadas como control. Por un lado, se llevó a cabo el análisis del perfil de compuestos terpénicos (mono-, sesqui- y diterpenos neutros y ácidos resínicos) en acícula, raíz, tallo de portainjerto y tallo de púa, con el fin de evaluar cómo la sequía modifica el contenido y distribución de terpenos en la planta injertada. Por otro lado, se estudió el perfil de metabolitos (lípidos, carbohidratos, aminoácidos y compuestos nitrogenados, cofactores y compuestos fenólicos) en acícula de plantas injertadas, para profundizar en la comprensión del efecto de la púa y del portainjerto en los mecanismos de respuesta a sequía de plantas injertadas de *Pinus pinaster*. Estos análisis además contribuyeron a la adquisición de una visión global de los procesos adaptativos de respuesta a sequía, mediante el estudio integrado de datos metabólicos y transcriptómicos obtenidos en el Capítulo anterior. El flujo de trabajo seguido a lo largo del Capítulo se esquematiza en la figura 5.1.

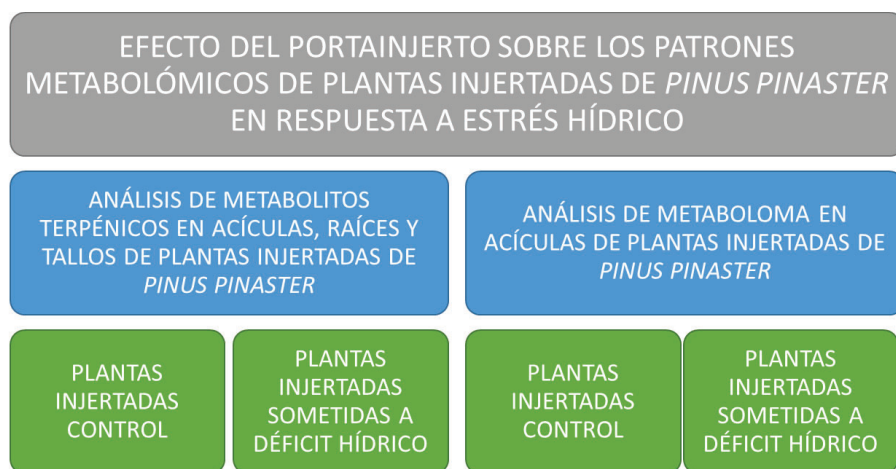


Figura 5.1. Flujo de trabajo seguido para analizar el efecto del portainjerto sobre los patrones metabolómicos en plantas injertadas de *Pinus pinaster* en respuesta a estrés hídrico.

Distribución de terpenos en plantas injertadas control

En primer lugar, se llevó a cabo el análisis de la composición terpénica en acícula, raíz, tallo de la púa y tallo del portainjerto, de las cuatro construcciones de *Pinus pinaster*, Gal 1056/ R18T, Gal 1056/ R1S, Oria 6/ R18T y Oria 6/ R1S, en condiciones control. Se detectaron 160 compuestos diferentes que incluían monoterpenos (MTs), sesquiterpenos (STs) y diterpenos neutros (DTs) y ácidos (DRAs), también conocidos como ácidos resínicos, de los cuales se identificaron 124, y se asignó una posible estructura a otros 28, quedando 8 no identificados.

Los cuatro tejidos presentaron diferencias significativas ($q < 0,05$) en la distribución de terpenos, tanto desde el punto de vista cuantitativo como cualitativo. Considerados globalmente, el contenido en acículas fue el mayor, alcanzando 20-110 mg g⁻¹ en peso seco, mientras que raíces, tallos de púas y tallos de portainjertos acumularon cantidades menores, especialmente estos últimos (11-18; 1,2-2,9 y 0,9-1,2 mg g⁻¹, respectivamente). Los DRAs fueron los compuestos más abundantes en acículas y raíces (90%), mientras que en las muestras de tallo no alcanzaron el 5%. En tallos, tanto de púas como de portainjertos, predominaron los DTs.

Además se detectaron perfiles de terpenos específicos de cada órgano, con 38 compuestos comunes a todos ellos, y 41 detectados exclusivamente en alguno de los cuatro órganos, de los cuales 26 resultaron exclusivos de acícula, no siendo detectados en los otros órganos. El análisis estadístico PLS-DA de los datos cuantitativos normalizados de estos perfiles terpénicos, clasificó las muestras en cuatro grupos diferenciados y coincidentes con los cuatro órganos analizados (Figura 5.1). En este modelo, el componente 1 (51,7% de varianza) discriminó las muestras de acículas y raíces, situadas en la zona positiva y claramente separadas entre sí, de las muestras de tallos de púa y portainjerto, en la zona negativa. Las mayores cargas positivas en este componente estaban asociadas a DRAs como abiético y 19-Nor-12-oxo-3,5, 8-abietatrienoico, más abundantes en acícula y raíz, y DTs como 8(17),13E-labdadien-15-al y 8(17),13Z-labdadien-15-ol, que no se detectaron en tallos. Por otro lado, las mayores cargas negativas del componente 1 estaban asociadas a cinco DTs, que no pudieron ser completamente identificados, y se detectaron exclusivamente en muestras de tallo. El análisis de distribución de las muestras a lo largo del componente 2 (37,1 % de varianza), permitió diferenciar las muestras de raíz, desplazadas significativamente hacia la zona positiva, y el resto de órganos localizados en el área negativa. Las muestras de acículas presentaron una carga negativa mayor, seguidas de las de tallos de púas y de portainjertos, por lo que este componente permitía diferenciar entre órganos aéreos y órganos subterráneos. Entre los terpenos que se identificaron como significativamente discriminantes, metoxiabietatetraenoico 51.4, epimanol, trans-isoeugenol y diterpeno 38.8, solo detectados en raíces, mostraron los coeficientes positivos más altos, mientras que catorce DTs como 8,11,13-abietatrieno, 8(14),13(15)-abietadieno y 8,13-abietadieno, con niveles significativamente más altos en acículas, o 19-Nor-4,8,11,13-abietatetraeno y dehidroabietal con niveles significativamente más altos en tallos, y ninguno de ellos detectado en raíces, presentaron los coeficientes negativos más altos.

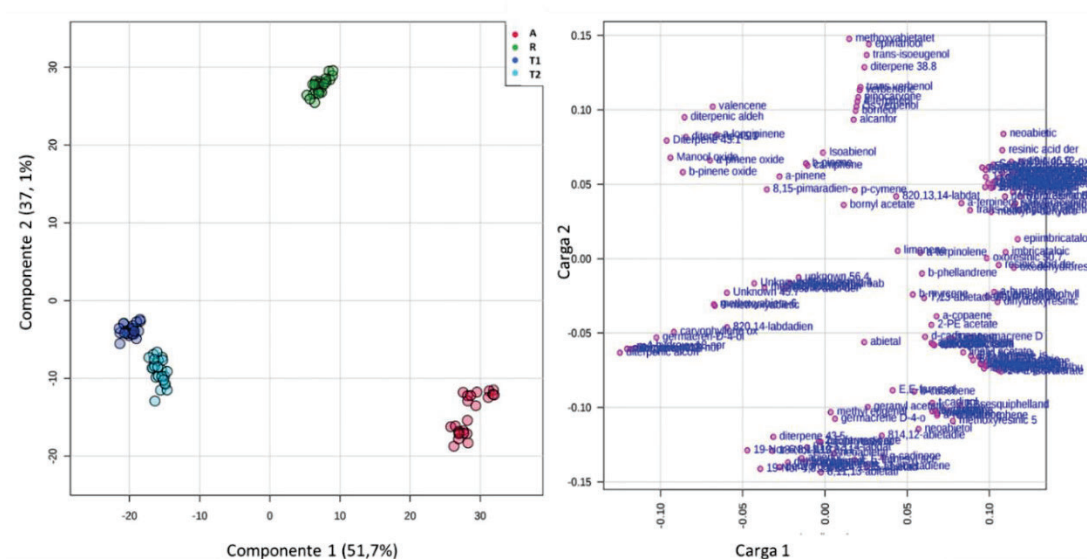


Figura 5.1. Modelo PLS-DA obtenido a partir de los datos cuantitativos normalizados de los perfiles terpénicos asociados a los órganos estudiados (A=acículas, R=raíces, T1=tallos de púas, T2=tallos de portainjertos) en plantas injertadas de *Pinus pinaster* en condiciones control. A la izquierda el gráfico de puntuación y a la derecha el gráfico de carga ($R^2=0,9821$, $Q^2=0,9805$ para los dos primeros componentes). Figura adaptada de Fernández de Simón *et al.*, 2021.

Con el objeto de conocer la posible influencia de la procedencia de la púa (Gal 1056 y Oria 6) en la composición terpénica de los distintos órganos, se realizaron análisis OPLS-DA (Figura 5.2). Como era de esperar, las diferencias más marcadas se encontraron en muestras de acículas y tallos de púas, pero también fue posible distinguir perfiles de terpenos diferenciados en órganos de portainjertos, tallos y raíces, aunque con capacidad predictiva baja ($Q^2 = 0,254$ y $0,309$ respectivamente). En acículas (Figura 5.2a), las diferencias entre ambas púas fueron cualitativas y cuantitativas, y estuvieron relacionadas con DTs y DRAs. Cinco DRAs con estructura bicíclica tipo labdano (eperúxico, anticopálico y tres isómeros de anticopálico) se detectaron exclusivamente en las acículas del progenitor femenino, mientras que el resto de DRAs en su mayoría con estructuras tricíclicas tipo pimarano o abietano, y algunos labdano, aunque se detectaron en todas las acículas, mostraron concentraciones significativamente mayores en el progenitor masculino, y todos ellos con altas cargas positivas y negativas en el modelo OPLS-DA obtenido. De los DTs, se detectaron concentraciones significativamente mayores de todos ellos en Gal 1056, a excepción de las de isoabienol, que fueron significativamente mayores en Oria 6 y que presentó la mayor carga positiva en el modelo. Es decir, el modelo obtenido distingue entre acículas de Oria 6 injertado en portainjertos sensibles, R1S, y tolerantes, R18T, con niveles significativamente bajos de DTs ($0,7-1,3$ mg g⁻¹) y altos de DRAs ($53-107$ mg g⁻¹); y acículas de Gal 1056 injertado en los mismos portainjertos tolerantes y sensibles, que

mostraron niveles más equilibrados de ambos tipos de terpenos (8,6-9,1 mg g⁻¹ y 9,1-9,8 mg g⁻¹, respectivamente), además del diferente perfil diterpénico.

En Tallos de púas (Figura 5.2b), las mayores diferencias se detectaban en los terpenos neutros, mientras que los DRAs apenas contribuyeron en la discriminación de la procedencia de la púa. Cuando la púa injertada era Oria 6, se detectaron niveles significativamente mayores de DTs con estructura labdano como isoabienol, abienol y óxido de manool, además de MTs y STs como valenceno, acetato de bornilo, canfeno y α -pineno. Por el contrario, en púas de Gal 1056 se detectaron acumulaciones significativamente mayores de STs como germacreno D, α -amorfeno, longifoleno y óxido de cariofileno, y DTs como 8,13-abietadieno y dehidroabietal. En tallos de portainjertos y raíces (Figura 5.2c y d), las mayores diferencias estuvieron asociadas a DTs con estructura labdano como abienol, isoabienol y óxido de manool; DRAs como 8,12-abietadien-18-oico, neoabiético, y levopimárico+palústrico; STs como valenceno y germacreno D; y MTs como α - y beta-pineno, y beta-felandreno, que presentaban una mayor acumulación en plantas con púas de Oria 6.

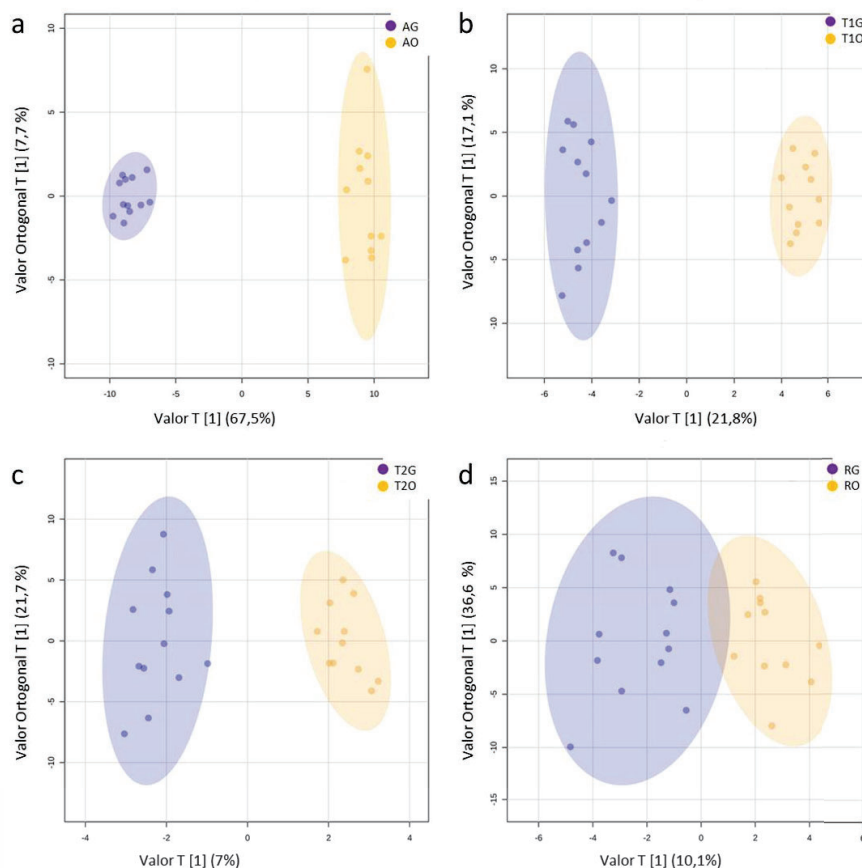


Figura 5.2. Gráficos de dispersión de valores del primer componente predictivo (eje x) frente al primer componente ortogonal (eje y) de los modelos OPLS-DA obtenidos de la composición terpénica en acículas, A, (a) ($R^2X=0,673$; $R^2Y=0,958$; $Q^2=0,953$), tallos de púas, T1, (b) ($R^2X=0,217$; $R^2Y=0,853$; $Q^2=0,794$), tallos de portainjertos, T2, (c) ($R^2X=0,066$; $R^2Y=0,729$; $Q^2=0,254$), y raíces, R, (d) ($R^2X=0,101$; $R^2Y=0,751$; $Q^2=0,309$), respecto a la procedencia de la púa en plantas injertadas de *Pinus pinaster*. La región sombreada muestra el intervalo de confianza del 95% (Gal 1056, G, en violeta y Oria 6, O, en amarillo). Figura adaptada de Fernández de Simón *et al.*, 2021.

Mediante análisis OPLS-DA, también se detectó la contribución del genotipo del portainjerto, R1S y R18T, en el contenido y distribución de terpenos en los órganos estudiados. Se obtuvieron buenos valores predictivos para todos los órganos excepto acículas ($Q^2 = 0,763; 0,741; 0,543; 0,088$ en raíces, tallos de portainjertos, tallos de púas y acículas, respectivamente). No se detectaron perfiles de terpenos comunes a todos los órganos en relación al genotipo del portainjerto; únicamente se observó un compuesto, 7,13-abietadieno, que presentó concentraciones significativamente mayores en todos los órganos cuando el portainjerto era sensible (R1S). Además, en raíces y tallos de plantas con portainjerto R1S se detectó una acumulación significativa de d-cadineno (Figura 5.3), y una mayor acumulación de STs como copaeno y germacreno D, DRAs como seco I, y DTs como epi-manool en raíces; y de DTs como abietal, neoabietal, dehidroabietol y 4-hidroxi-18-nor-abietano 2 en tallos. En plantas injertadas en portainjertos tolerantes, R18T, se observó una acumulación de DRAs como 7-oxodehidroabiético, 15-hidroxidehidroabiético y dihidroagático en raíces y tallos de portainjertos, y metoxiabietatetraenoico 51,4 y 15-metoxidehidroabiético en raíces y tallos de púas; y DTs como 8(20), 13, 14-labdatrieno, óxido de manool y 8,15-pimaradien-18-al en raíces y tallos de portainjertos (Figura 5.3).

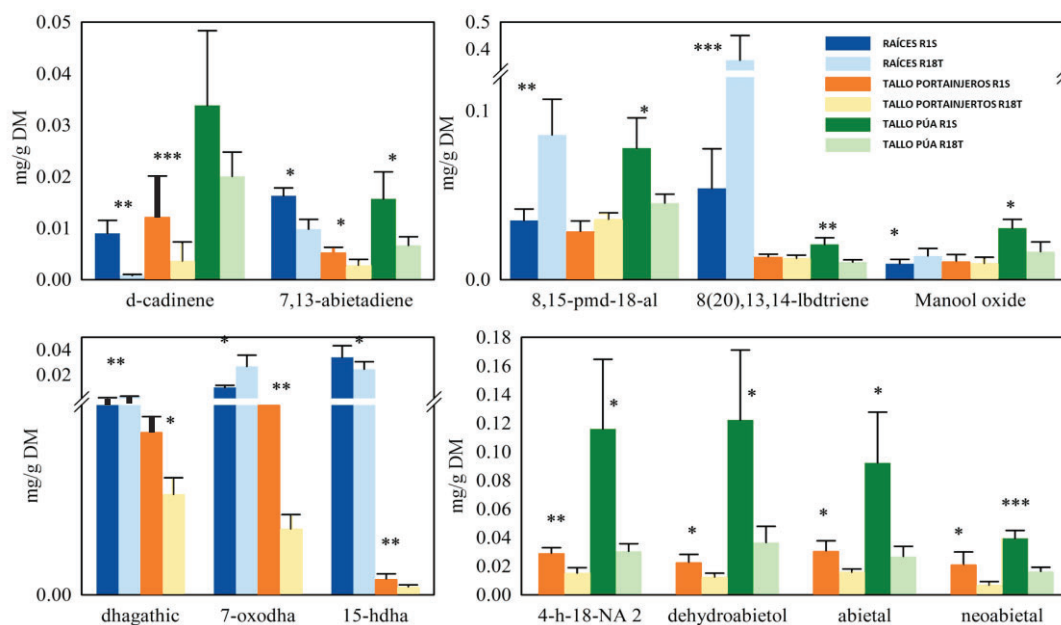


Figura 5.3. Histograma de concentraciones medias (mg/g de materia seca) y error estándar de los compuestos terpénicos en raíces, tallos de portainjertos y tallos de púas de plantas injertadas de *Pinus pinaster* en condiciones control. Los terpenos seleccionados fueron los más significativos en los modelos OPLS-DA obtenidos con el genotipo del portainjerto como variable dependiente. *, ** y *** indican diferencias significativas en cada órgano en función del portainjerto utilizado, a $p < 0,05$, $0,01$ y $0,001$, respectivamente. pmd = pimaradieno; lbdtriene = labdatrieno; dhagathic = dihidroagático; oxodha = oxodehidroabiético; hdha = hidroxidehidroabiético; NA = norabietano. Figura adaptada de Fernández de Simón *et al.*, 2021.

Distribución de terpenos en acícula, raíz y tallo de plantas injertadas sometidas a déficit hídrico

En los mismos órganos, pero de plantas sometidas a déficit hídrico, se analizaron los cambios en la composición de terpenos provocados por la sequía. En conjunto se detectó un aumento en todos los órganos de las plantas sometidas a sequía (entre el 1-45 %), excepto en acículas de Gal 1056 / R18T y Oria 6 / R18T, y en tallos de Gal 1056 / R1S (Figura 5.4). La disminución de terpenos en acículas de plantas injertadas en el portainjerto tolerante, R18T, se debió principalmente a los DRAs, y en tallos de Gal 1056 / R1S, a los DTs. También se detectó un descenso del contenido de DRAs en acículas de plantas Gal 1056 / R1S sometidas a sequía, mientras que en las acículas de plantas de Oria 6 / R1S no se detectaron cambios en el contenido de terpenos. En raíces, se detectó un aumento del contenido de terpenos en todos los genotipos sometidos a sequía, a excepción del contenido de DTs en muestras Oria 6 / R1S; y en tallos, no se observó un patrón metabólico común en respuesta a sequía (Figura 5.4).

El análisis de los patrones de modificación de terpenos individuales no desveló cambios de gran intensidad en la respuesta a sequía. Mediante análisis OPLS-DA usando sequía como variable dependiente, se identificaron los compuestos que contribuyeron en mayor medida al cambio en el perfil terpénico a nivel de órgano en la respuesta a sequía. La capacidad predictiva de los modelos obtenidos no fue alta ($0,36 \leq Q^2 \leq 0,59$), lo que indica que el efecto del régimen hídrico al que fueron sometidas las plantas fue pequeño, aunque se detectaron algunos cambios reseñables. En acículas y raíces, los DRAs fueron los compuestos con mayor peso a la hora de discriminar entre plantas control y sometidas a sequía ($Q^2 = 0,385$ en ambos tejidos), disminuyendo en acículas y aumentando en raíces. En acículas se observaron también incrementos en los niveles de algunos DTs y MTs, pero con una significación menor. En raíces también fue significativo el aumento de algunos MTs (borneol, alcanfor y trans-ocimeno), STs (α -longipineno y valenceno), y DTs (7,13-abietadieno), que se acumularon en las plantas sometidas a sequía. En tallos de púas ($Q^2 = 0,591$) los compuestos con mayor peso para discriminar entre muestras control y muestras sometidas a sequía fueron tanto STs (beta-cubebeno, germacreno D-4-ol y α -muroleno) como MTs (α -terpinoleno) y DTs (neoabietol, 7,13-abietadieno, 8 (14),12-abietadieno, isopimaral, dos isómeros del 4-hidroxi-18-nor-abietano, levopimaral y 8(14),13(15)-abietadieno), todos ellos acumulándose por efecto del déficit hídrico. En tallos de portainjertos ($Q^2 = 0,36$), α -copaeno, abietol y dehidroabietol, fueron los terpenos con mayor relevancia en el modelo OPLS, con un aumento en las concentraciones en las plantas sometidas a sequía con correlaciones superiores a 0,5.

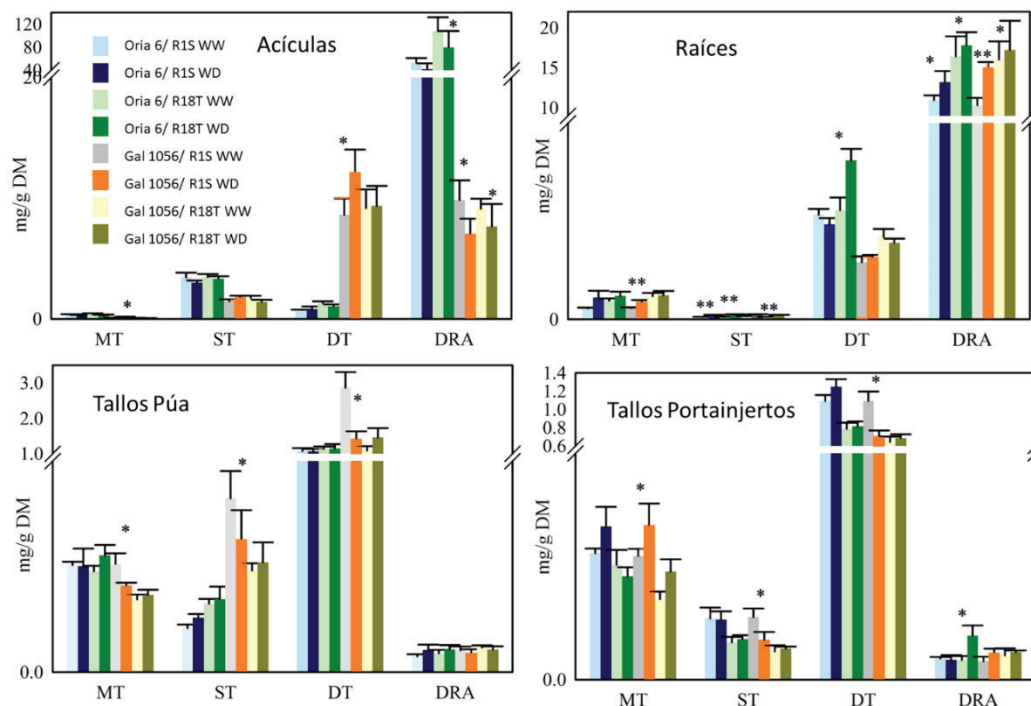


Figura 5.4. Histograma de las concentraciones medias (mg/g de peso seco) y error estándar de los grupos de terpenos en acículas, raíces, tallos de púas y tallos de portainjertos de plantas injertadas de *Pinus pinaster* en condiciones control (WW) y sequía (WD). MT=monoterpenos; ST=sesquiterpenos; DT=diterpenos; DRA=ácidos resínicos. *, ** y *** indican diferencias significativas en cada combinación de planta injertada considerada entre las plantas WW y WD, a $p < 0,05$, $0,01$ y $0,001$, respectivamente. Figura adaptada de Fernández de Simón *et al.*, 2021.

El bajo efecto del déficit hídrico sobre los niveles de terpenos en los diferentes órganos podría deberse a la compleja respuesta a sequía de cada genotipo que participa en las diferentes combinaciones púa - portainjerto. El análisis sPLS-DA individualizado para cada órgano permitió detectar patrones de respuesta específicos (Figura 5.5). En todos los órganos el componente 1 distribuyó las muestras según su genotipo original: el de la púa en el caso de muestras de acículas y tallos de púas, y el del portainjerto en las muestras de raíces y tallos de portainjertos. El efecto del régimen hídrico se reflejó en la distribución de las muestras a lo largo de los componentes 2 y 3.

En acículas (Figura 5.5a), DRAs fueron los compuestos más correlacionados con el componente 2, y terpenos neutros, como α -terpinoleno, limoneno y beta pineno, que aumentaron en plantas Gal 1056/ R1S sometidas a déficit hídrico y disminuyeron en el resto de genotipos sometidos a sequía, los más correlacionados con el componente 3 (Figura 5.6). En raíces el efecto de la sequía fue más notable en plantas injertadas sobre portainjertos tolerantes, y con púas de Oriá 6 ligeramente mayor que de Gal 1056. En Oriá 6 / R1S y Gal 1056 / R1S también se observó un efecto de la sequía asociado al componente 3, ligeramente superior en plantas injertadas del progenitor masculino (Figura 5.5b).

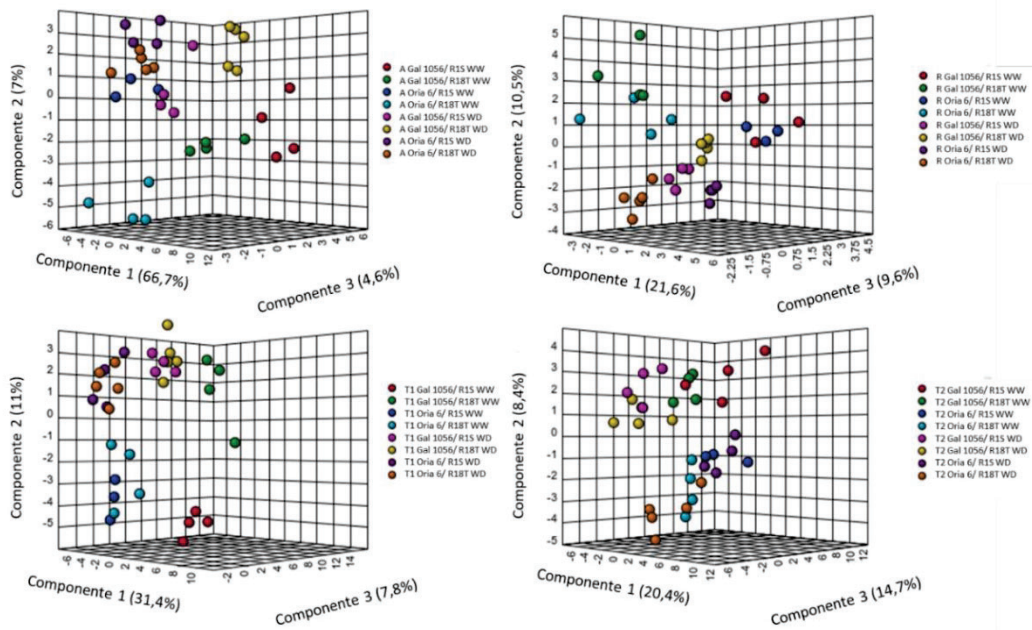


Figura 5.5. Gráfico de dispersión de los modelos sPLS-DA obtenidos considerando los datos cuantitativos normalizados de los perfiles de terpenos asociados a acículas (A), raíces (R), tallos de púas (T1), y tallos de portainjertos (T2) (tasas de error 0,06, 0,18, 0,15 y 0,39, respectivamente), con respecto a las combinaciones púa-portainjertos en plantas injertadas de *Pinus pinaster* en condiciones control (WW) y sequía (WD). Figura adaptada de Fernández de Simón *et al.*, 2021.

El análisis de tallos de púas reveló un resultado similar, con diferencias en la distribución de terpenos principalmente en DTs y STs, en todos los genotipos en función del tratamiento hídrico al que fueron sometidos, siendo más relevante para Gal 1056 / R1S a través del componente 2, y para Gal 1056 / R18T a través del componente 3 (Figura 5.5c). En tallos de portainjertos, el modelo sPLS-DA identificó un efecto muy bajo de la sequía en el perfil de terpenos (Figura 5.5d), discriminando las muestras en función del portainjerto sobre el que fueron injertadas a través del componente 1, y del genotipo de la púa, con independencia del régimen hídrico analizado, a través del componente 2.

Se detectó un ligero desplazamiento a través de los componentes 1 y 3 en plantas Gal 1056 / R1S y Gal 1056 / R18T sometidas a sequía, pero no fue suficiente para considerarlo discriminatorio (Figura 5.6). No se detectaron patrones de modificación comunes a todos los órganos en respuesta a sequía, con la excepción de los compuestos isoabienol, óxido de manool y α -copaeno, que presentaban mayores acumulaciones en muestras de raíces, tallos de púas y tallos de portainjertos de plantas sometidas a sequía. En acículas, estos componentes participaron en la discriminación de muestras en función del genotipo de la púa a través del componente 1.

Acículas					Raíces					Tallo de la púa				
Componente 2	Oria 6/ R1S	Oria 6/ R18T	Gal 1056/ R1S	Gal 1056/ R18T	Componente 2	Oria 6/ R1S	Oria 6/ R18T	Gal 1056/ R1S	Gal 1056/ R18T	Componente 2	Oria 6/ R1S	Oria 6/ R18T	Gal 1056/ R1S	Gal 1056/ R18T
Sandaracopimarico	*	***	**	*	7,13-abietadieno		**	*	**	8(14),12-abd	***	**	***	*
Pimarico	*	***	**	***	Neoabiético		**	*	**	α -terpinoleno	***	**	***	*
Seco II	*	***	**	***	Epimanool		**	*	**	Neobietol	***	**	***	*
Seco I	*	***	*	***	Resinico 46,9		**	*	**	7,13-abietadieno	***	**	***	*
Secodha isomer	*	***	*	**	Levopimaric palustrico	**	***	***	***	α -copaeno	***	**	**	*
Componente 3	Oria 6/ R1S	Oria 6/ R18T	Gal 1056/ R1S	Gal 1056/ R18T	Componente 2 y 3	Oria 6/ R1S	Oria 6/ R18T	Gal 1056/ R1S	Gal 1056/ R18T	Componente 3	Oria 6/ R1S	Oria 6/ R18T	Gal 1056/ R1S	Gal 1056/ R18T
α -terpinoleno		*	***	*	Borneol	***	***	***	***	Germacreno D-4-ol	***	***	***	***
Limoneno		*	***	**	Isobienol	*	*	*	*	Dihidroagático	*	*	*	*
β -pineno		*	***	*	Manool óxido	*	*	*	*	β -cubebeno	*	*	*	*
Levopimaral		*	***	*	Componente 3	Oria 6/ R1S	Oria 6/ R18T	Gal 1056/ R1S	Gal 1056/ R18T	Manool óxido	*	*	*	*
8(17),13Z-lb-15-ol	*	*	***	**	Metil-6-dehidrodha	*	*	*	*	Isobienol	*	*	*	*
Abietal	*	*	***	**	Trans caryofileno	*	*	*	*	Trans caryofileno	*	*	*	*
(E)-famesel	**	*	*	**	Dihidroagático	*	*	*	*	8(20),14-lb-13,19-diol	*	*	*	*

Figura 5.6. Selección de terpenos más significativos detectados en acículas, raíces y tallos de púas en plantas injertadas de *Pinus pinaster* sometidas a déficit hídrico. *, **, y *** indican diferencias significativas entre plantas control y sequía, a $p < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente. Sombreado azul = aumento en respuesta a sequía (de 0 a 2). Sombreado naranja = disminución en respuesta a sequía (de 0 a -2). dha = dehidroabiético; lb = labdadieno; abd = abietadieno. Figura adaptada de Fernández de Simón *et al.*, 2021.

Análisis del metaboloma en acícula de plantas injertadas en condiciones control

En primer lugar, se llevó a cabo el análisis del metaboloma de acículas de las cuatro construcciones de *Pinus pinaster*, Gal 1056 / R18T, Gal 1056 / R1S, Oria 6 / R18T y Oria 6 / R1S, en condiciones control. Se detectaron 245 compuestos diferentes, entre los que se incluían lípidos, azúcares, polialcoholes, ácidos orgánicos, transportadores de electrones, aminoácidos y compuestos nitrogenados, y compuestos fenólicos. Además, como se ha mostrado en el apartado anterior, se detectaron 124 compuestos terpénicos, neutros y ácidos, y que no se van a incluir en este apartado. El análisis estadístico sPLS-DA del perfil metabólico clasificó las muestras en 4 grupos coincidentes con las cuatro combinaciones de genotipos de plantas injertadas (Figura 5.7).

El análisis reveló que el metaboloma de la acícula de plantas con portainjerto sensible (R1S) presentaba mayores diferencias en relación al genotipo de la púa que el de plantas injertadas sobre portainjerto tolerante. El componente 1 (23.7% de varianza) discrimina las acículas de plantas injertadas en función del genotipo de la púa, las de Gal 1056 en la zona negativa y las de Oria 6 en la positiva. Las cargas positivas más altas fueron las de compuestos fenólicos como los glicósidos de siringetina, kaempferol-cumaroilo, siringoilo, miricetina, laricitrina, quercetin metil éter, o cafeoilo con concentraciones significativamente mayores en acículas de púas de Oria 6; así como otro tipo de metabolitos como ácidos grasos (oleico) aminoácidos y compuestos nitrogenados (feniletilamina, 2-metil-5-oxo-prolina), y ácidos orgánicos (ácido pirúvico). Por el contrario, las mayores cargas negativas estaban asociadas a compuestos fenólicos como dos hexaóxidos de isoramnetina, laricitrina pentósido, quercetin cumaroil pentosido, un lignano, el ciclitol sequoyitol y ácido linoleico entre otros, con concentraciones significativamente mayores en acículas de púas de Galicia 1056. El análisis de distribución de las muestras a lo largo del componente 2 (17,5 %), permitió diferenciar entre acículas de plantas injertadas sobre portainjertos tolerantes, R18T, desplazadas

hacia el área positiva, y las de plantas injertadas sobre portainjertos sensibles, R1S, situadas en la negativa.

Compuestos con concentraciones más altas cuando el portainjerto era tolerante (R18T) presentaron cargas positivas más altas especialmente azúcares como d-trehalosa, d-galactosa, fructosa y diversos disacáridos; compuestos fenólicos como epicatequina, y, ácido siríngico y ácido quínico; mientras que aminoácidos y compuestos nitrogenados como prolina, ácido piroglutámico, treonina, serina, lisina, tiramina o valina; azúcares ácidos como galacturónico; ácidos grasos como linolénico; y compuestos fenólicos como ácido benzoico y 3,4-dihidroxibenzoico, presentaron las cargas negativas más altas, reflejando concentraciones significativamente más altas en los portainjertos sensibles (R1S).

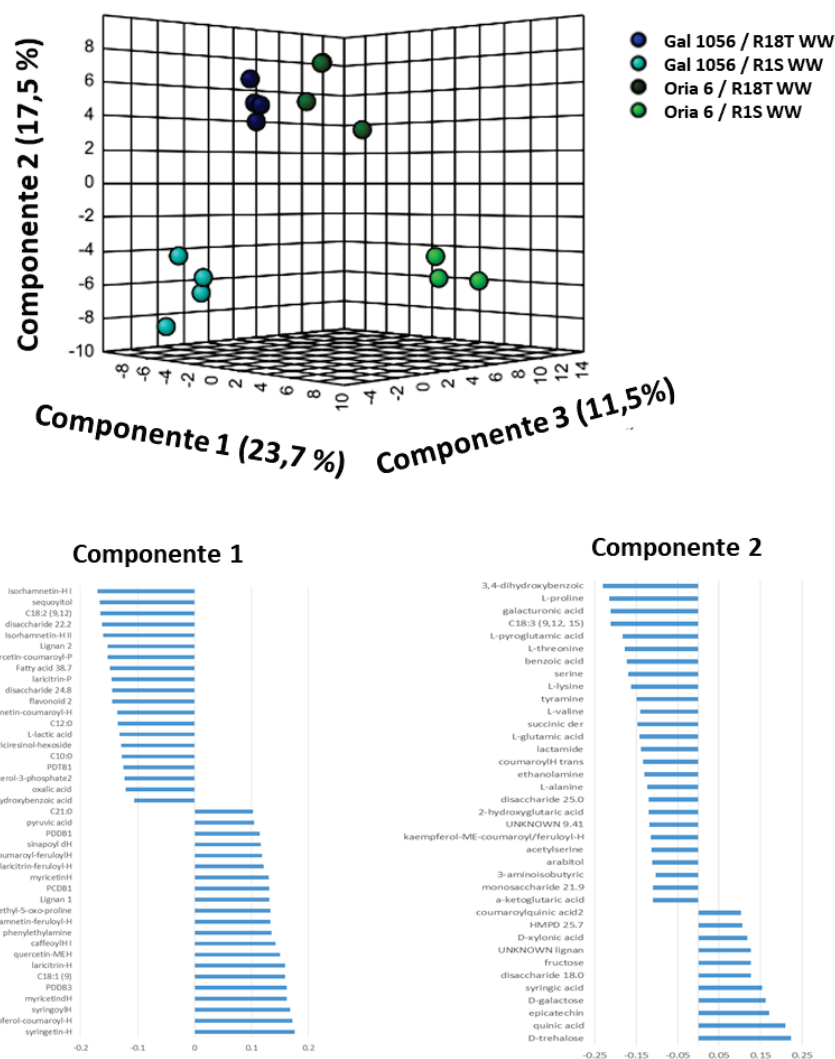


Figura 5.7. Modelo sPLS-DA obtenido a partir de los datos cuantitativos normalizados de los perfiles metabólicos asociados a las cuatro construcciones estudiadas de plantas injertadas de *Pinus pinaster* en condiciones control (tasa de error 0,4). Arriba el gráfico de puntuación y abajo los histogramas de cargas > 0,1 en relación a los componentes 1 (izquierda) y 2 (derecha) del modelo sPLS-DA.

Cambios en el metaboloma de acículas de plantas injertadas sometidas a déficit hídrico

En segundo lugar, se llevó a cabo el análisis del metaboloma en acículas de las cuatro construcciones de *Pinus pinaster*, Gal 1056 / R18T, Gal 1056 / R1S, Oria 6 / R18T y Oria 6 / R1S, sometidas a un tratamiento de déficit hídrico. Se detectaron patrones de distribución diferencial en función del genotipo de púa y portainjerto y del tratamiento. Para conocer el efecto de la sequía en los cambios metabólicos que se producen en la acícula, independientemente del genotipo de púa y portainjerto, se realizó un análisis OPLS-DA con el tratamiento de riego como variable dependiente (Figura 5.8).

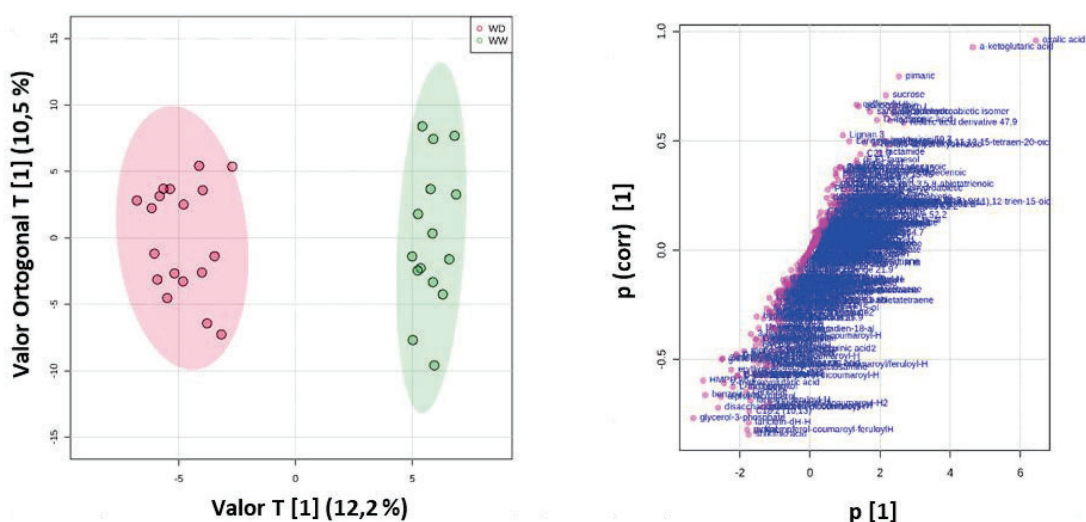


Figura 5.8. Modelo OPLS-DA obtenido con los datos cuantitativos normalizados de los perfiles metabólicos asociados a acículas de plantas injertadas de *Pinus pinaster* con el tratamiento de riego como variable dependiente ($Q^2=0.806$). WD = muestras sometidas a sequía; WW = muestras bien regadas. Izquierda-gráfico de dispersión de puntuación del primer componente predictivo (eje x) frente al primer componente ortogonal (eje y). Derecha-valores de p (eje x) frente a correlación de p respecto al componente predictivo (eje y). Los metabolitos más importantes son los situados en los extremos de cada cuadrante. En el cuadrante derecho superior los que disminuyen con la sequía, y en el izquierdo inferior los que aumentan con la sequía.

El modelo obtenido presentó un alto valor predictivo ($Q^2 = 0.806$), por lo que al contrario de lo que ocurría con los terpenos, el efecto del déficit hídrico sobre el perfil metabólico de la acícula es muy importante, independientemente de los genotipos de púa y portainjerto. Metabolitos de casi todas las rutas metabólicas participan con un peso notable en la discriminación entre muestras control y con estrés hídrico ($p > 0,5$; $p(\text{corr}) > 0,4$).

Entre los metabolitos que disminuyen por efecto de la sequía destacan los ácidos oxálico y α -cetoglutarico, que no se detectan en las muestras estresadas, pero también otros ácidos como d-eritrónico y l-málico, azúcares como lactosa y sacarosa, compuestos nitrogenados como lactamida, compuestos fenólicos y algunos lignanos. Pero son muchos más los compuestos que incrementan significativamente su concentración por efecto de la sequía, principalmente compuestos fenólicos flavonoideos como muchos derivados de kaempferol y quercetina, y algunos no flavonoideos, y su precursor, el ácido shikímico. Entre los metabolitos primarios destaca el incremento del pinitol, el de mayor correlación, así como otros ciclitoles como *chiro*-inositol y *scyllo*-inositol. También son importantes los incrementos en los niveles de aminoácidos, carbohidratos, ácidos orgánicos, ácidos grasos y otros compuestos como el α -tocoferol.

Por otra parte, para conocer las posibles diferencias en la respuesta metabólica a sequía determinadas por el genotipo de púa y portainjerto, se realizó un análisis sPLS-DA clasificando las muestras en ocho grupos diferentes teniendo en cuenta el genotipo de la púa (Gal 1056 y Oria 6) y del portainjerto (R18T y R1S), y el tratamiento de déficit hídrico (WD y WW). El modelo obtenido (tasa de error de las tres primeras componentes 0,06) permitió discriminar entre los ocho grupos de muestras (Figura 5.9).

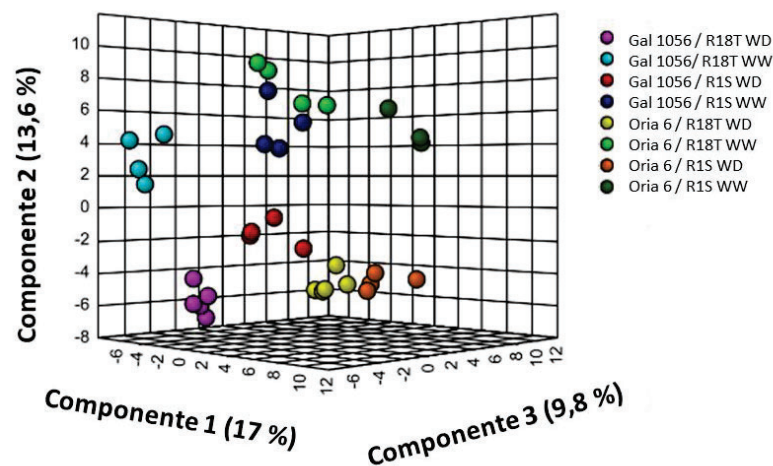


Figura 5.9. Modelo sPLS-DA obtenido con los datos cuantitativos normalizados de los perfiles metabólicos asociados a los cuatro genotipos estudiados en plantas injertadas de *Pinus pinaster* sometidas a sequía (WD) y condiciones control (WW).

El factor que mayor efecto causó en el metaboloma de la acícula fue el genotipo de la púa, ya que el componente 1, que explica el mayor porcentaje de varianza (17 %) permitió distinguir las acículas en relación al genotipo de la púa: las muestras de Gal 1056 aparecen situadas en la parte negativa del eje, y las de Oria 6 en la positiva.

El segundo factor más importante fue el tratamiento de déficit hídrico que se impuso a las plantas, ya que el componente 2 (13,6 % de la varianza) separa las muestras en relación al tratamiento, con las plantas bien regadas en el área positiva, y las sometidas a déficit hídrico en la negativa, apareciendo mucho más distanciadas entre sí las plantas con la púa de Oria 6 que las de Gal 1056. Por último, el componente 3 (9,8 %) discrimina las plantas injertadas en relación al portainjerto, sensible, R1S, o tolerante, R18T, desplazados hacia las áreas positiva y negativa, respectivamente, y provocando la sequía una disminución de la distancia entre las muestras en relación a la tolerancia del portainjerto. Las diferencias en el metaboloma relacionadas con el genotipo de la púa (Oria 6 vs Gal 1056 – Componente 1) se deben principalmente a compuestos fenólicos y lignanos (azul claro en la Figura 5.10a) y ácidos grasos (naranja), mientras que las debidas al genotipo del portainjerto están relacionadas con el metabolismo del nitrógeno (verde en la Figura 5.10b) y de carbohidratos (amarillo), aunque los compuestos de mayor peso fueron el ácido quínico, precursor en la vía de la fenilalanina que da lugar a multitud de metabolitos secundarios, con carga negativa, y el ácido linolénico, con carga positiva.

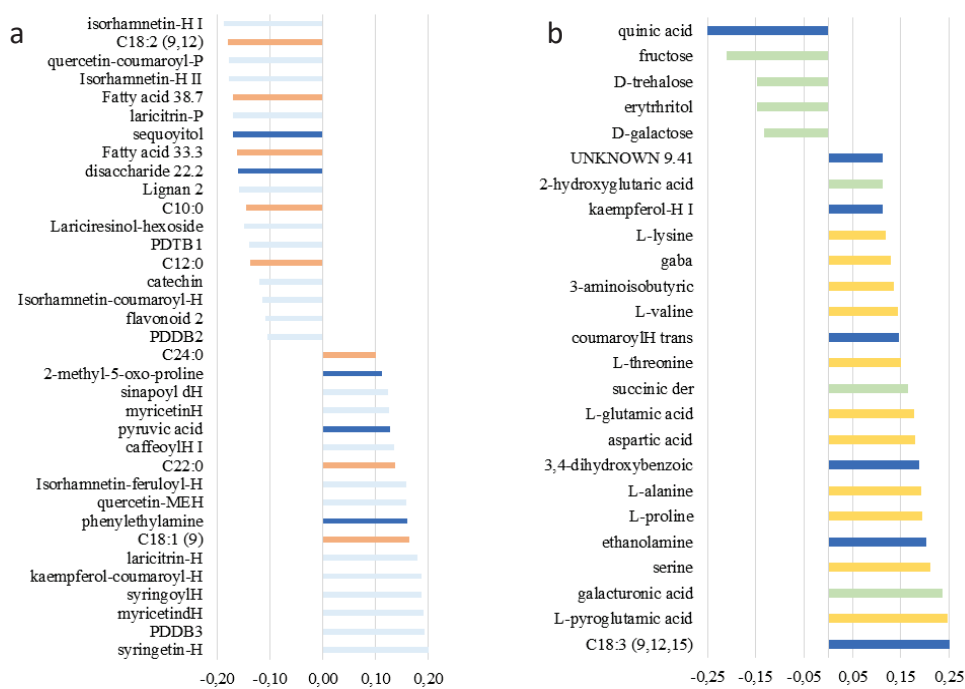


Figura 5.10. Histograma de cargas $>0,1$ en relación a los componentes 1 (a) y 3 (b) del modelo sPLS-DA que se muestra en la figura 5.9

La compleja respuesta metabolómica a sequía relacionada con los genotipos que participan en las diferentes combinaciones púa – portainjerto, y que se ve interferida por el metaboloma constitutivo de cada genotipo, nos lleva a un estudio más en detalle considerando separadamente los genotipos de púa y portainjerto. En primer lugar, se analizó el efecto de la púa sobre los perfiles de distribución de metabolitos en acículas de las plantas injertadas en respuesta a sequía. Para ello, se llevó a cabo el estudio diferencial del metaboloma en muestras de plantas Gal 1056 / R18T vs Oria 6 / R18T, y de plantas Gal 1056 / R1S vs Oria 6 / R1S, en condiciones control y déficit hídrico.

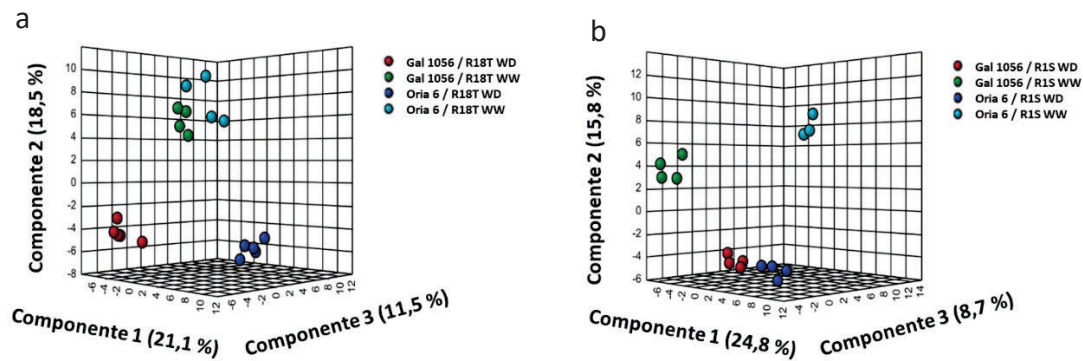


Figura 5.11. Modelo sPLS-DA obtenido con los datos cuantitativos normalizados de los perfiles metabólicos asociados al efecto de la púa en acículas de plantas injertadas de *Pinus pinaster* sobre portainjertos tolerantes, R18T (a) y sensibles, R1S (b).

En muestras de plantas injertadas sobre el portainjerto tolerante (Figura 5.11a), el modelo obtenido diferencia las muestras a través del componente 1 (21,1 % de la varianza) en relación al genotipo de la púa injertada, mientras que el efecto de la sequía puede apreciarse claramente a lo largo de los componentes 2 (18,5 %) y 3 (11,5 %). Con el componente 2 tienen mayor correlación aquellos compuestos que experimentan variaciones por efecto de la sequía que son independientes del genotipo del portainjerto, en general los que ya se han descrito a partir del modelo OPLS-DA de la Figura 5.8. Con el componente 3 por el contrario tienen altas correlaciones compuestos con una evolución diferencial en respuesta al tratamiento hídrico dependiente del genotipo del portainjerto. Entre estos últimos encontramos (Figura 5.12) carbohidratos (sorbitol, glucosa, disacárido 24.8, azúcar ácido 21.7, lactitol, eritritol), aminoácidos (ácido aspártico, lisina), compuestos fenólicos (PCDB1, kaempferol cumaroilferuloil hexóxido, ácido ferúlico, DPHD 24.8, ácido siríngico), ácidos grasos (2-metoxihexadecanoico, palmitoleico) y otros compuestos no identificados.

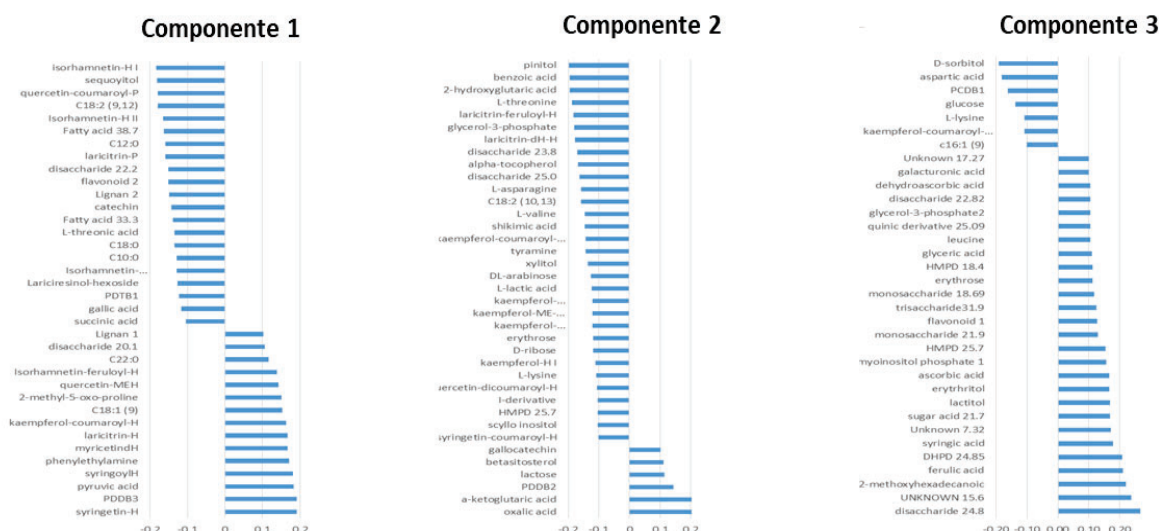


Figura 5.12. Histograma de cargas $>0,1$ en relación a los componentes 1 (a) y 3 (b) del modelo SPLS-DA que se muestra en la figura 5.11a.

En el modelo obtenido con muestras de plantas injertadas sobre el portainjerto sensible (Figura 5.11b), la distribución de las muestras es muy similar, siendo de nuevo el componente 3 (8,7% de varianza) el que muestra la evolución diferencial en relación al genotipo del portainjerto. Entre los compuestos con mayor correlación con este componente (Figura 5.13), encontramos compuestos fenólicos (hexóxidos de laricitrin feruloil, kaempferol dicumaroyil, siringetin cumaroyil, quercetin cumaroyil, ácido p-hidroxibenzoico, flavonoide 2, ácido benzoico), azúcares (ribosa), aminoácidos (lisina, glicina), lípidos (glicerol-3-fosfato, ácido palmitoleico), polialcoholes (scyllo inositol, sorbitol, treitol), ácidos orgánicos (glicérico, láctico, 2-hidroxiglutarico), etc.

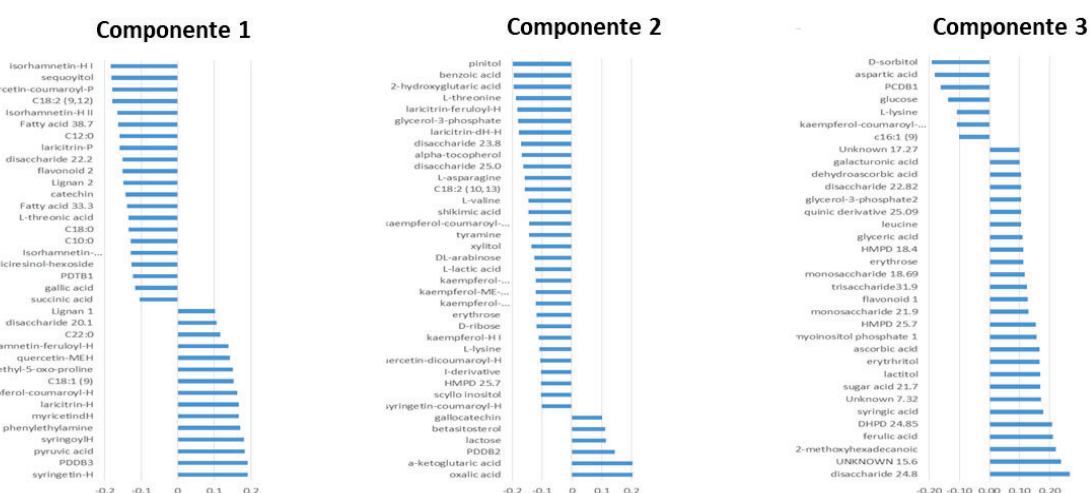


Figura 5.13. Histograma de cargas $>0,1$ en relación a los componentes 1 (a) y 3 (b) del modelo SPLS-DA que se muestra en la figura 5.11b.

En segundo lugar, se analizó el efecto del portainjerto sobre los perfiles metabólicos de acículas de las plantas injertadas con diferentes púas, en respuesta a sequía. Para ello, se llevó a cabo el estudio diferencial del contenido metabólico en muestras de plantas Gal 1056 / R1S vs Gal 1056 / R18T, y de plantas Oria 6 / R1S vs Oria 6 / R18T, en condiciones control y déficit hídrico. En los modelos obtenidos detectamos claras diferencias (Figura 5.14), ya que cuando la púa injertada es Gal 1056 el mayor factor de diferenciación en el metaboloma de acículas fue el genotipo del portainjerto (componente 1- 18,1 % de varianza) y el segundo el tratamiento de déficit hídrico (componente 2, 15,8 % de varianza), mientras que cuando la púa injertada era de Oria 6, el tratamiento de déficit hídrico fue el factor que más influyó en el metaboloma de la acícula (componente 1, 22,1 % de varianza), mientras que el genotipo del portainjerto incidió a diferente nivel según las plantas estuvieran bien regadas (componente 2, 14,6%) o sometidas a déficit hídrico (componente 3, 11,3 %).

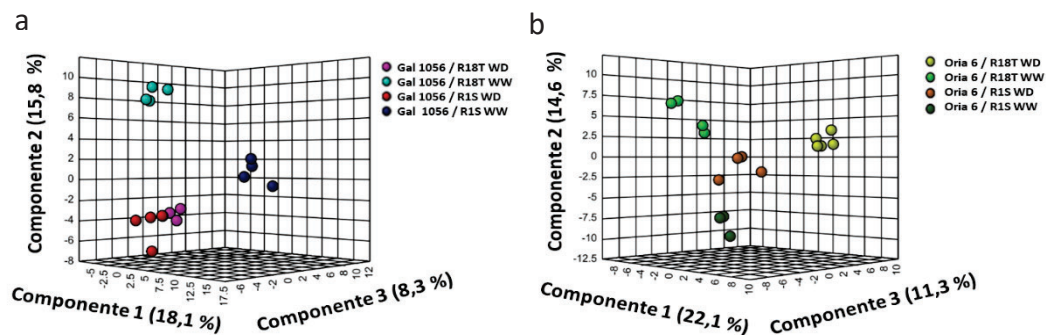


Figura 5.14. Modelos sPLS-DA obtenidos con los datos cuantitativos normalizados de los perfiles metabólicos asociados a los cuatro genotipos estudiados en plantas injertadas con púas de Gal 1056 (a) y Oria 6 (b) sobre portainjerto tolerante y sensible de *Pinus pinaster* sometidas a sequía (WD) y condiciones control (WW).

Multitud de vías metabólicas se ven afectadas en acículas por la sequía, modificando los niveles de un gran número de metabolitos, y esto ocurre de forma diferenciada según el genotipo del portainjerto y la púa. El análisis de muestras de la púa sensible, Gal 1056, injertadas sobre portainjertos tolerantes y sensibles (Figura 5.15) muestra que tanto aminoácidos y compuestos nitrogenados (19), como carbohidratos (33), lípidos (10) y compuestos fenólicos y lignanos (34) participan en la discriminación de las muestras. Así, algunos aminoácidos y compuestos nitrogenados, como lisina, tiramina, treonina y valina se acumulaban diferencialmente en muestras de plantas sometidas a déficit hídrico, y más en Gal 1056 / R18T; al igual que polialcoholes como sorbitol, polifenoles como algunos derivados de kaempferol, o α -tocoferol, glicerol-3-fosfato, ácido hexadeca-10,13-dienoico, ácido 2-hidroxi-glutárico, mientras que otros compuestos se acumulaban predominantemente en plantas de muestras control, Gal 1056 / R1S y Gal 1056 / R18T, como ácido oxálico, lariciresinol hexoside, beta sitosterol, ácido esteárico, galocatequina, ácido 2-metoxihexadecanoico y α -cetoglutárico.

Otros compuestos se acumularon o disminuyeron diferencialmente en Gal 1056 / R1S por efecto de la sequía como galactosa, trehalosa, sacarosa, monosacárido 22.7, melecitosa, ácidos galacturónico, málico y xilónico, scyllo inositol, todos ellos relacionados con el metabolismo del carbono; pero también compuestos de otras rutas metabólicas como ácido cumaroilquínico, siringetin cumaroil hexósido, flavonoide 2, lignano 1, urea, etc.

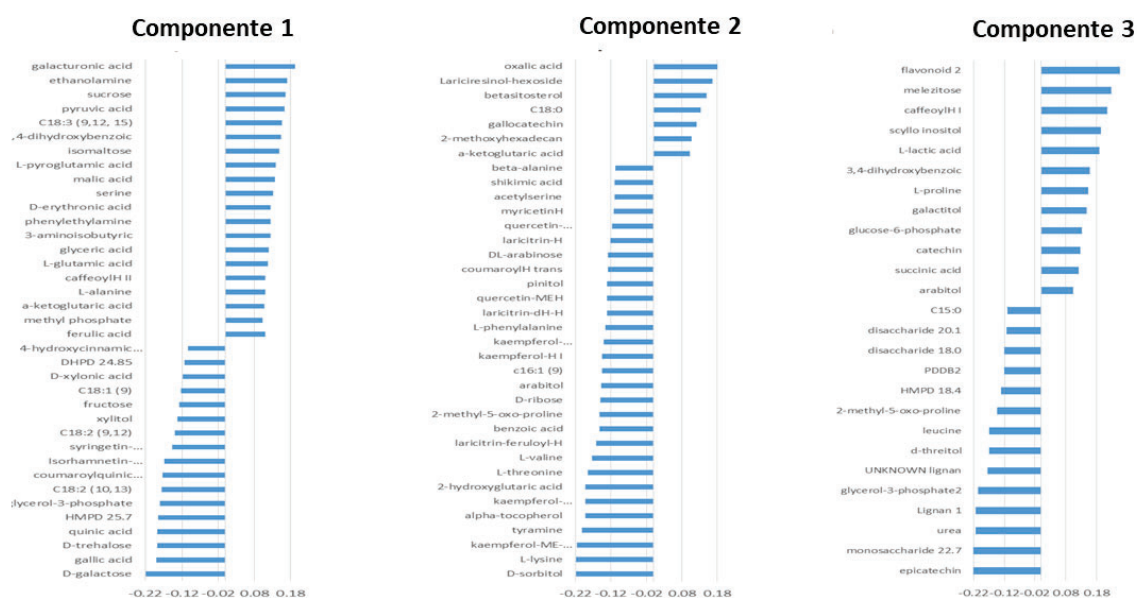


Figura 5.15. Histograma de cargas $>0,1$ en relación a los componentes 1, 2 y 3 del modelo SPLS-DA que se muestra en la figura 5.11a (púa Gal 1056).

En el caso de muestras con púas tolerantes, Oria 6, injertadas sobre portainjertos tolerantes y sensibles se detectaron compuestos altamente correlacionados con el modelo entre los aminoácidos y compuestos nitrogenados (13), carbohidratos (38), lípidos (13) y compuestos fenólicos (28) (Figura 5.16). Es de destacar el caso de compuestos lipídicos como betasitosterol y los ácidos glicólico, láurico, palmítico, palmitoleico y linolénico que aumentan significativamente por efecto de la sequía en plantas Oria 6 / R1S, mientras que disminuyen o no varían en Oria 6 / R18T. Por el contrario, compuestos como tiramina, laricitrin-feruloil hexosido, ácido pirúvico, siringetin cumaroil hexóxido, lactitol y α -tocoferol, aumentaron significativamente en plantas de Oria 6 / R18T por efecto de la sequía, mientras que disminuyeron o no se vieron afectadas en Oria 6 / R1S. El análisis del perfil de azúcares, permitió la identificación de patrones de distribución diferenciales en plantas control, mientras que no se detectaron diferencias claras entre muestras Oria 6 / R1S y Oria 6 / R18T de plantas sometidas a sequía, aunque compuestos como lactosa, ácido málico, glucosa y sacarosa disminuyeron sus concentraciones con mayor intensidad en muestras Oria 6 / R1S sometidas a sequía. Otros compuestos como ácido galacturónico, prolina, 3, 4-dihidroxibenzoico, disacárido 20.1, lisina o piroglutámico

muestran un comportamiento contradictorio en relación al portainjerto, aumentando o disminuyendo por efecto del tratamiento hídrico.

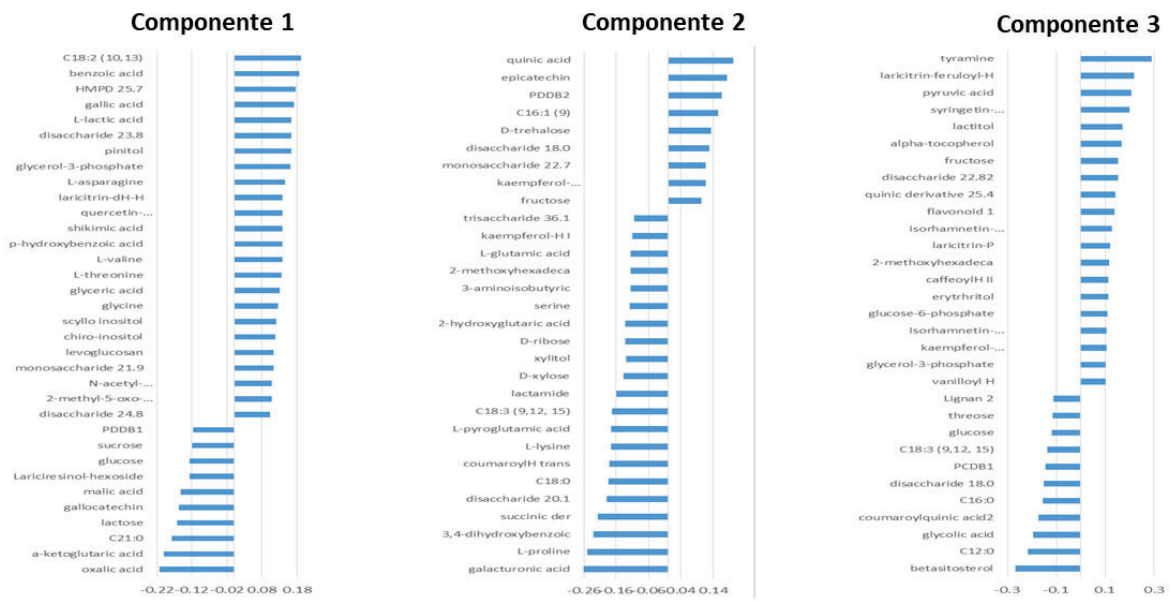


Figura 5.16. Histograma de cargas >0,1 en relación a los componentes 1, 2 y 3 del modelo sPLS-DA que se muestra en la figura 5.11b (púa Oria 6).

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

ANÁLISIS DE LA ACUMULACIÓN DIFERENCIAL DE TRANSCRITOS EN GENOTIPOS TOLERANTES Y SENSIBLES DE *PINUS PINASTER* EN RESPUESTA A ESTRÉS HÍDRICO A NIVEL DE ÓRGANO

La respuesta de las plantas a estrés por sequía es un proceso muy complejo en el que están implicados diversos mecanismos moleculares, celulares y fisiológicos (Fang y Xiong, 2015), que depende de su intensidad y duración. Con el fin de profundizar en los mecanismos moleculares que modulan la respuesta a sequía en *Pinus pinaster*, analizamos los perfiles transcriptómicos de acículas, tallos y raíces de genotipos seleccionados pertenecientes a una familia de *Pinus pinaster* que segregaba para la tolerancia / sensibilidad a estrés hídrico, que habían sido previamente caracterizados (de Miguel *et al.*, 2012, 2014, 2016). Este estudio comparativo entre genotipos tolerantes y sensibles a la sequía permitió identificar genes expresados diferencialmente, GEDs, en función del régimen hídrico aplicado, así como genes expresados constitutivamente.

El análisis de GEDs comparando mezclas de muestras agrupadas por órganos puso de manifiesto patrones específicos de expresión órgano-dependientes, que como primera aproximación, validaba la calidad del estudio transcriptómico. Así, por ejemplo, en acículas se detectó un enriquecimiento de transcritos implicados en fotosíntesis, en biosíntesis de precursores, en metabolismo lipídico y en energía.

El análisis diferencial de los perfiles de expresión entre genotipos sensibles y tolerantes crecidos en condiciones control o sometidos a una sequía moderada, reveló diferencias mayores en los recuentos de lecturas normalizadas en raíces frente a tallos y acículas, que coincide con lo descrito por Miguel *et al.*, (2014). La respuesta temprana en raíces parece estar relacionada con su función, ya que se trata del órgano sensorial encargado de transmitir las señales a los tejidos aéreos informando sobre el estado hídrico del suelo (Schachtman y Goodger 2008), y así regular la expresión de genes que controlan la respuesta a sequía en estos órganos (Janiak *et al.*, 2016). Al llevar a cabo el análisis de los perfiles transcriptómicos de genotipos sensibles y tolerantes, se detectaron mayores niveles de actividad transcripcional en genotipos tolerantes en todos los órganos, excepto en acículas de plantas control (Tabla 3.1). Sin embargo, el número de GEDs asociados a la respuesta a estrés hídrico, fue significativamente mayor en los órganos de los genotipos sensibles (Tabla 6.1).

Tabla 6.1. Acumulación diferencial de transcritos a nivel de órgano. Comparaciones por pares entre los transcritos asociados con la respuesta a estrés hídrico (WW vs WD) y entre plantas control (WW vs WW). Sobreexpresados (S); reprimidos (R). Tabla adaptada de de María *et al.*, (2020).

Genotipos	Plantas sometidas a estrés hídrico (WW vs WD)												Plantas control (WW vs WW)					
	Genotipos Sensibles (4 y 147)						Genotipos Tolerantes (132 y 144)						Genotipos Sensibles vs Tolerantes					
Tejidos	Raíces		Tallos		Acículas		Raíces		Tallos		Acículas		Raíces		Tallos		Acículas	
Librerías	1vs4		2vs5		3vs6		7vs10		8vs11		9vs12		1vs7		2vs8		3vs9	
Tendencia	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
Nr. transcritos	834	875	839	675	264	216	513	480	266	251	140	131	601	638	666	745	267	275

A pesar de que en acículas de genotipos sensibles y tolerantes se detectó una menor acumulación de transcritos que en el resto de órganos, el análisis de ontología genética, GO, reveló un enriquecimiento de genes sobreexpresados relacionados con “respuesta a sequía” en acículas de genotipos tolerantes en condiciones control. Estos resultados podrían indicar una activación basal de los mecanismos de respuesta a estrés en genotipos tolerantes con los que afrontar escenarios de sequías recurrentes. Estudios similares han descrito procesos de hiper-respuesta a estrés hídrico en genotipos de plantas sensibles a sequía (Yates *et al.*, 2014; Pucholt *et al.*, 2015; Fracasso *et al.*, 2016; Muthusamy *et al.*, 2016), lo que evidencia la posible ausencia de mecanismos moleculares de evitación capaces de atenuar los efectos de la sequía en estos genotipos.

Centrándonos en los resultados obtenidos al analizar los genotipos sensibles, sólo se identificaron tres genes que compartían la misma tendencia de sobreexpresión en todos los órganos estudiados en respuesta a estrés hídrico, lo que ponía de manifiesto una fuerte especificidad de órgano. Dos de ellos codifican FTs tipo ATL78-RING-H2 y NAC, implicados en la regulación de la expresión de genes inducidos por estrés hídrico, mejorando la respuesta a sequía (Pascual *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2016). El tercer gen codifica una proteína transportadora de nitrato, que estaba reprimida en respuesta a estrés hídrico. Estudios previos realizados en *Arabidopsis* han demostrado que los transportadores de nitrato están implicados en control estomático, contribuyendo al aumento de la susceptibilidad a sequía (Guo *et al.*, 2003). La represión de este gen en genotipos sensibles sometidos a sequía, podría interferir en procesos de intercambio de gases, inhibiendo el crecimiento y afectando al desarrollo de la planta. En plantas tolerantes, se detectaron dos transcritos acumulados en todos los órganos de plantas control, que codifican una proteína supresora SRP40 y una proteína D-tirosil-tRNA deacilasa.

El análisis de las rutas activadas en cada genotipo y órgano reveló patrones de expresión específicos de genotipos tolerantes y sensibles, en respuesta a sequía. Las raíces de los genotipos tolerantes mostraban un enriquecimiento de genes sobreexpresados implicados en metabolismo secundario, y más concretamente en la biosíntesis de flavonoides. Estos compuestos están implicados en la protección de la planta frente a estrés abiótico, en la defensa antioxidante y en la inhibición del transporte polar de auxinas en procesos de señalización hormonal (Dao *et al.*, 2011; Gill y Tuteja, 2010). Además, se ha demostrado que se acumulan diferencialmente en raíces laterales de plantas sometidas a estrés hídrico, induciendo su formación (Shojaie *et al.*, 2016); estando también implicados en procesos de producción de ABA en plantas sometidas a estrés salino (Ruiz-Sola *et al.*, 2014).

El análisis de los 30 GEDs más sobreexpresados en respuesta a estrés hídrico en las acículas de genotipos sensibles y tolerantes, y el análisis de los 30 genes de mayor sobreexpresión constitutiva en acículas de ambos genotipos, relacionados con respuesta a estrés hídrico permitió identificar diferentes grupos funcionales relacionados con respuesta a sequía. Entre ellos se observaron genes implicados en protección estructural, que codifican osmoprotectores, acuaporinas, chaperonas, proteínas de choque térmico (HSP) y proteínas de embiogénesis tardía (LEA), así como genes asociados con procesos de detoxificación de ROS, metabolismo de la pared celular, y protección de estructuras subcelulares (Figura 6.1).

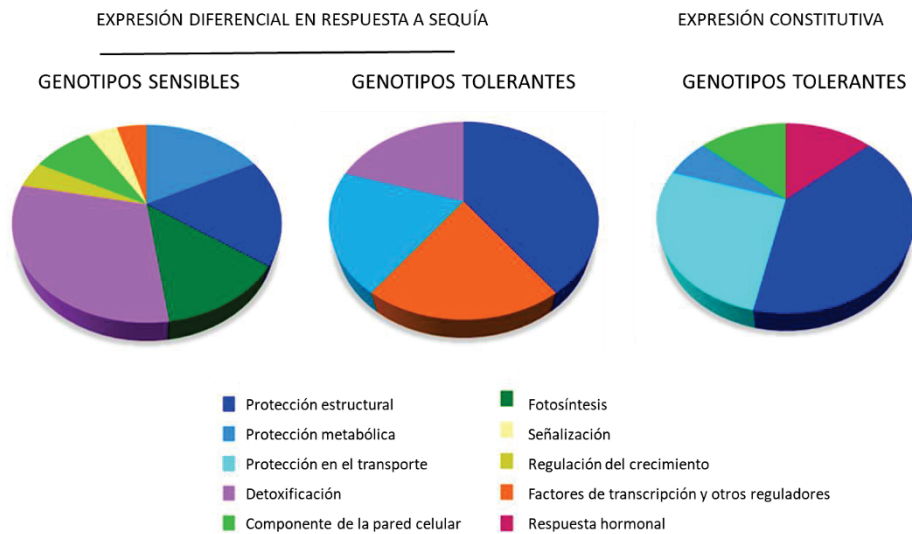


Figura 6.1. Distribución funcional de los 30 GEDs más sobreexpresados en respuesta a sequía en las acículas de genotipos sensibles y tolerantes, y de los 30 genes de mayor sobreexpresión constitutiva en acículas de genotipos tolerantes, relacionados con sequía. Figura adaptada de de María *et al.*, (2020).

En raíces, este estudio reveló que entre los 30 genes más sobreexpresados constitutivamente en genotipos sensibles se identificaron genes implicados en la detoxificación de ROS, el transporte de hidrógeno a través de la membrana, la regulación del plegamiento y agregación de proteínas, el metabolismo de azúcares y la biosíntesis de fenilpropanoides. El mismo análisis realizado en raíces de genotipos tolerantes, permitió identificar genes asociados con regulación redox, ajuste osmótico, remodelación de la pared celular y transporte, respuesta hormonal, señalización y regulación transcripcional. El mantenimiento de la integridad y fluidez de la membrana es fundamental para la supervivencia de las plantas bajo condiciones de déficit hídrico. Además, la deshidratación afecta a la estructura y configuración de la pared celular, y modifica la interfaz pared celular-membrana plasmática (Feng *et al.*, 2016). Las interacciones entre la pared celular y la membrana plasmática, así como las modificaciones en la tensión superficial de la membrana debido al transporte bidireccional de agua, son dos factores importantes para determinar la capacidad que tiene la planta de percibir y responder a cambios en el contenido hídrico del entorno (Monshausen y Gilroy, 2009). Uno de los genes sobreexpresados constitutivamente codifica la proteína xiloglicano endotransglicosilasa hidrolasa (XTH), que modula la conversión de xiloglicanos, principal polímero de la hemicelulosa, pudiendo estar implicado en procesos de remodelación de la pared celular, lo que sugeriría que los genotipos tolerantes son capaces de ensamblar reversiblemente y reorganizar la pared celular y la superficie exterior de las membranas plasmáticas. Los lípidos, además de ser los principales componentes de las membranas celulares, actúan como moléculas de

señalización. En los genotipos tolerantes también se detectó la sobreexpresión constitutiva de genes codificantes de la proteína *sec14*, proteína de transferencia del fosfatidilinositol / fosfatidilcolina, localizada en la membrana de Golgi, que funciona como precursor de genes de respuesta a estrés, y de fosfolípidos y galactolípidos, que aumentan la estabilidad de la membrana confiriendo tolerancia a estrés (Larsson *et al.*, 2006). Además, se observó una sobreexpresión de genes regulados por ABA, y una ligasa SCF E3, descrita recientemente en *Arabidopsis* como un represor de la respuesta a sequía, que participa en la vía de señalización independiente de ABA (Li *et al.*, 2014).

Por otro lado, se identificó un número limitado de GEDs relacionados con respuesta a sequía en raíces de genotipos sensibles y tolerantes sometidos a estrés hídrico. Las plantas sometidas a estrés hídrico cierran sus estomas para reducir las tasas de pérdida de agua, disminuyendo la conductancia estomática, limitando la capacidad de fijación fotosintética de carbono, lo que modifica el equilibrio metabólico de carbohidratos. Para hacer frente a esta reducción en las tasas de asimilación de carbono, las plantas acumulan carbohidratos solubles, entre otros compuestos, que actúan como osmolitos implicados en el ajuste osmótico, mantenimiento de la turgencia celular, integridad de la membrana y estabilización de proteínas (Xue *et al.*, 2007). Por lo tanto, la translocación de carbohidratos es un mecanismo usado por las plantas para hacer frente a estrés hídrico (Chen y Jiang, 2010). En genotipos tolerantes, la sobreexpresión del gen que codifica para una proteína transportadora de carbohidratos, ERD6-like 6, podría estar relacionado con el aumento del nivel de estos metabolitos en el citoplasma, y la modulación del potencial osmótico (Jarzyniak y Jasiński, 2014). Ya se ha descrito en *Pinus pinaster* y *P. pinea*, un transportador de carbohidratos bidireccional que se induce en respuesta a estrés hídrico severo (Perdiguero *et al.*, 2013), lo que podría indicar que diferencias en la disponibilidad hídrica podrían influir en la activación de diferentes proteínas transportadoras de carbohidratos. Además, se detectó la sobreexpresión del gen que codifica una prohibitina mitocondrial-like (PHB), miembro de un complejo proteico localizado en la membrana interna mitocondrial, que podría estar implicada en la modificación de la cadena respiratoria (Gehl y Sweetlove, 2014). Asimismo, estudios sobre las funciones de las proteínas PHB en plantas han demostrado su implicación en la proliferación del meristemo de raíz (Van Aken *et al.*, 2007). También en raíces de los genotipos tolerantes se detectaron dos genes regulados por ABA: el gen que codifica la subunidad reguladora de la proteína quinasa relacionada con SNF1 γ -1, implicado en la regulación transcripcional y metabólica en procesos de aclimatación de las plantas a diferentes estreses bióticos y abióticos (Crozet *et al.*, 2014); y un miembro de la familia NHL. La caracterización funcional de proteínas NHL6 ha revelado su implicación en señalización y biosíntesis mediada por ABA, inducida por estrés abiótico (Bao *et al.*, 2016).

Entre los GEDs más sobreexpresados en genotipos sensibles, se identificaron genes pertenecientes a diversos grupos funcionales implicados en respuesta a sequía, relacionados con el transporte transmembrana como el canal de potasio AHT1-like, cuya sobre-expresión en plantas de arroz se ha demostrado que mejora la tolerancia a estrés hídrico y osmótico al aumentar los niveles tisulares de K^+ (Ahmad *et al.*, 2016), y un gen que codifica *pita_000064630-r*, una proteína *disease resistance-like* GS3-1, que pertenece a la familia de transportadores ABC asociada al secuestro de metabolitos potencialmente tóxicos implicados en respuesta a estrés (Wanke y Kolukisaoglu, 2010).

También se identificó un gen que codifica la proteína serina treonina quinasa, SRK2E, una familia de quinatas implicada en la regulación de la respuesta de las plantas a diferentes estreses abióticos a través de vías dependientes e independientes de ABA (Kulik *et al.*, 2011). Finalmente, se caracterizaron dos GEDs, uno de ellos codifica una proteasa *ubiquitin-like-specific* 1D, que participa en procesos de SUMOilación, estando implicada en modificaciones postraduccionales reversibles; y el otro codifica un componente del módulo de desubiquitinación del complejo SAGA, implicado en la modificación postraduccional de varias histonas. Ambas participan en la respuesta a diversos estreses abióticos, mediante control epigenético, estando implicadas en el silenciamiento transcripcional de genes aberrantes (Liu *et al.*, 2017a), y la remodelación de cromatina (Moraga y Aquea, 2015), respectivamente.

En tallos, el análisis de los 30 genes que muestran mayor sobreexpresión constitutiva reveló que los genotipos tolerantes mostraban un mayor número de genes asociados con la respuesta a sequía, agrupados en distintos grupos funcionales. Entre éstos se identificó un gen que codifica la proteína β -galactosidasa 8, implicada en la degradación de polisacáridos de la pared celular para dirigir los azúcares al citoplasma y mantener la turgencia celular en condiciones de estrés hídrico (Gupta *et al.*, 2016). También se detectó una sobreexpresión constitutiva de genes que codifican un componente del canal permeable al calcio, y un translocador de carbohidratos (Jarzyniak y Jasiński, 2014), implicados en el transporte de estos compuestos a través de la membrana. También se identificaron genes implicados en la reorganización de la pared celular (endoglucanasa 17 y UDP-N-acetilglucosamina-dolichyl-fosfato N- acetilglucosamina-fosfotransferasa) y en la modificación de lípidos de membrana y señalización (α y β -hidrolasa y lipoxigenasa cloroplástica) (Hamiaux *et al.*, 2012, Bae *et al.*, 2016). Otros genes sobreexpresados constitutivamente codifican la proteína cloroplástica bifuncional 3-dehidroquinato deshidratasa / shikimato, implicada en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y de diferentes metabolitos secundarios aromáticos (alcaloides, flavonoides, ligninas y antibióticos aromáticos) involucrados en la respuesta a estrés. En situaciones de estrés hídrico, se produce la inhibición de la expansión del tallo. Las auxinas influyen en los procesos de elongación del tallo y el desarrollo de la estructura de la planta (Gallavotti, 2013). En nuestro estudio transcriptómico identificamos genes muy sobreexpresados en genotipos tolerantes que participan en la regulación de auxinas, como el factor de respuesta a auxina 6, un activador transcripcional que regula la expresión de genes de respuesta a auxina (Liu *et al.*, 2014), y la hidrolasa de IAA-aminoácidos ILR1-like 4, enzima que hidroliza conjugados de IAA-aminoácidos para producir IAA libre (Ludwig-Müller, 2011). Entre los genes asociados con la acción de hormonas, destaca la sobreexpresión de un componente del correceptor SCF (COI1), implicado en la percepción y transducción de señales de JA (Larrieu y Vernoux, 2016). En genotipos sensibles, se detectó la sobreexpresión de genes asociados con funciones protectoras como un inhibidor de cisteína proteasas, implicado en la regulación de la proteólisis (Kidrič *et al.*, 2014), una proteína 8-like, con un dominio A20/AN1-zinc-finger, cuya sobreexpresión en plantas de arroz sometidas a estrés reduce la clorosis y la muerte celular, mejorando su recuperación (Vij y Tyagi, 2006). Por último, se detectó la sobreexpresión de un gen que codifica la proteína CBL-CIPK implicada en la decodificación de señales de calcio, y que participa en respuesta a estrés y otras respuestas mediadas por ABA (Mao *et al.*, 2016).

El análisis de los GEDs en tallos de genotipos sensibles y tolerantes en respuesta a estrés hídrico, reveló un número similar de genes sobreexpresados relacionados con respuesta a sequía en ambos genotipos, significativamente menor al número de genes sobreexpresados constitutivamente detectados en tallos de genotipos tolerantes. En genotipos sensibles se detectaron genes relacionados con respuesta sequía, que codifican una proteína YLS9-like y la isoforma X2 del factor inhibidor de la migración de macrófagos, implicados en la inmunidad de plantas (Panstruga *et al.*, 2015). También se identificó una proteína similar a la quinasa de base esfingoides, también conocidas como bases de cadena larga (LCB-P), y una proteína que contiene repeticiones de pentatetrapéptidos, ambas implicadas en la respuesta a estrés abiótico en plantas, entre otras funciones, mediando la regulación del cierre estomático (Jiang *et al.*, 2015, Saucedo-García *et al.*, 2015). Por último, se identificó un gen que codifica una isoforma citoplasmática 2 de monodehidroascorbato, que participa en el ciclo del ascorbato-glutación eliminando el peróxido de hidrógeno, tóxico, así como el gen que codifica una proteína con dominio NHL, implicada en señalización y biosíntesis de ABA inducida por estrés (Bao *et al.*, 2016). En tallos de genotipos tolerantes, se identificaron GEDs sobreexpresados relacionados principalmente con el metabolismo de lípidos, como los codificantes de la proteína de la familia aciltransferasa de fosfolípidos/glicerol, el polipéptido proactivador 1-like y la enzima lipolítica GDSL esterasa/lipasa At2g04570-like. Como se indicó previamente, las plantas modifican la composición lipídica de sus membranas en respuesta a diferentes estreses abióticos (Harwood, 1996), generalmente variando el contenido de lípidos polares (Michaelson *et al.*, 2016). Los esfingolípidos son esenciales en las funciones celulares básicas, participando en procesos de organización, señalización y dinámicas de la membrana celular (Michaelson *et al.*, 2016). También identificamos dos GEDs sobreexpresados que codifican una invertasa vacuolar y una glicerato deshidrogenasa, implicadas en la hidrólisis de la sacarosa y en la biosíntesis de la serina, respectivamente. La invertasa vacuolar podría estar asociada al aumento de la hidrólisis de sacarosa vacuolar almacenada en respuesta a la disminución de la productividad fotosintética global y, por tanto, estar implicada en el flujo de carbono hacia los diferentes órganos en respuesta al estrés hídrico. Diversos estudios han descrito incrementos de la hidrólisis de sacarosa en variedades de plantas tolerantes a sequía (Wang *et al.*, 2000; Saedipour y Moradi, 2011); en condiciones de estrés, la mayor parte del carbono se desvía a la formación de los aminoácidos glicina y serina (Lawlor y Cornic, 2002).

El mismo tipo de análisis llevado a cabo en acículas de plantas tolerantes y sensibles a la sequía permitió identificar, entre los 30 genes con mayor sobreexpresión, tanto los genes constitutivos como los GEDs asociados con la respuesta a estrés hídrico. Entre los genes sobreexpresados constitutivamente en los genotipos tolerantes, pertenecientes a diferentes grupos funcionales, destacar los implicados en protección, preservando el plegamiento de moléculas de ARN y proteínas (por ejemplo, chaperonas o proteínas de choque térmico 70 kDa), en la biosíntesis de osmólitos (α -galactosidasa-like), y en la regulación osmótica (acuaporinas, una proteína de la familia YGGT, y una proteína del canal de calcio de dos poros). El efecto protector del fotosistema II ejercido por la chaperona cloroplástica DnaJ (Hsp40), en asociación con la Hsp70 fue descrito por Kong *et al.* (2014) en plantas transgénicas sometidas a estrés. La subfamilia de acuaporinas PIP está implicada en transporte de agua y de pequeños solutos,

desempeñando un papel activo en la respuesta a estrés hídrico (Forrest y Bhave, 2007), mediante la regulación de la tasa de captación de agua y transpiración (Afzal *et al.*, 2016). En cuanto a la proteína del canal de calcio de dos poros, se trata de un mensajero secundario implicado en regulación del crecimiento, desarrollo y adaptación. Los transportadores de calcio inducidos por ABA modifican la concentración citosólica de Ca^{2+} , regulando entre otros, procesos de apertura estomática (Song *et al.*, 2008). El aumento de la proteína del canal de calcio 1 en acículas y tallos de genotipos tolerantes, podría estar asociada con procesos de regulación de apertura estomática y tasa de transpiración. Asimismo, identificamos genes sobreexpresados constitutivamente en genotipos tolerantes implicados en remodelación de la pared celular, que codifican una xiloglucano endotransglucosilasa-hidrolasa y una subunidad 2-like no catalítica de la poligalacturonasa, y genes inducibles por sequía como la RD22 y un miembro de la familia NHL. Frente a la elevada proporción de genes expresados constitutivamente que participan en la respuesta a sequía en genotipos tolerantes, no se identificó ninguno en los genotipos sensibles, respaldando la hipótesis de que en los genotipos tolerantes existe una activación permanente de mecanismos de respuesta a estrés, que les confiere una “pre-adaptación” para responder más eficiente y rápidamente a situaciones de sequía.

El análisis de los 30 GEDs más sobreexpresados al comparar acículas de plantas control y estresadas de los genotipos sensibles y genotipos tolerantes, permitió detectar un mayor número de genes asociados con la respuesta a sequía en genotipos sensibles, que participan en la drástica reducción en las tasas de conducción estomática y fotosintética, del rendimiento cuántico efectivo del fotosistema II observado, en estos genotipos. Así, se detectaron GEDs sobreexpresados asociados con funciones protectoras como la preservación del correcto plegado de moléculas de ARN y proteínas (proteínas LEA), la biosíntesis de osmolitos (una galactinol sintasa y una serina acetiltransferasa 1), y un grupo de GEDs implicados en la remodelación de la pared celular (una celulasa y una proteína arabinogalactano con dominio fasciclina FLA16). El cierre estomático que se produce en respuesta a la sequía provoca cambios en la tasa fotosintética debido a la menor disponibilidad de CO_2 y a la producción de ROS como, por ejemplo, los radicales superóxido (Osakabe *et al.*, 2014). El aumento de la actividad fotorrespiratoria durante sequía va acompañado de niveles elevados de actividad glicolato-oxidasa, lo que resulta en la producción de H_2O_2 . En este estudio, 7 de los 30 GEDs más sobreexpresados en genotipos sensibles sometidos a sequía estaban asociados a enzimas que desintoxicaban especies reactivas de oxígeno, como la catalasa, la glutatión S-transferasa omega-like 2, la glutamina amidotransferasa YLR126C, la glutatión peroxidasa, y la γ -glutamilciclotransferasa At3g02910, un miembro del péptido metionina sulfóxido reductasa, y una proteína azul de cobre. Asimismo, se detectaron sobreexpresados tres GEDs con función fotosintética, la ribulosa-bisfosfato carboxilasa cloroplástica de cadena pequeña, la fructosa-bisfosfato aldolasa cloroplástica y una proteína del complejo de fotólisis / oxidación del agua también conocido como complejo productor de oxígeno del PSII; y otros tres GEDs asociados a señalización, *oxygen-evolving enhancer protein chloroplast-like* At2g19130, la proteína de esporulación RMD1 y la proteína universal de estrés a-like. Los genes que codifican proteínas con dominio USP están implicados en la percepción de señales de estrés y parecen promover la tolerancia a sequía (Sinha *et al.*, 2016). Por último, se detectaron

GEDs sobreexpresados que codifican un componente de un FT de un complejo multiproteico, una proteína asociada al mediador 1-like, y genes implicados en el metabolismo de poliaminas y en la regulación del crecimiento de plantas, la ornitina descarboxilasa-like. Por el contrario, solo cinco de los 30 GEDs más sobreexpresados en genotipos tolerantes estaban relacionados con respuesta a sequía. Entre ellos destacaban un grupo de transcritos relacionados con protección celular, que codifican una proteína chaperona DnaJ (Hsp 40) de tipo cloroplástico y un factor de intercambio de nucleótidos Hsp70 FES1, ambas implicadas en el plegado de moléculas bajo estrés; un antranilato de tipo cloroplástico implicado en la biosíntesis de osmolitos y ajuste osmótico (Liu *et al.*, 2014); y una proteína de tipo YLS9 implicada en respuesta oxidativa. El GED restante era un FT C2H2 tipo *zinc finger protein*, implicado en la regulación de la respuesta a sequía (Kielbowicz-Matuk, 2012). Finalmente, la búsqueda de GEDs sobreexpresados en genotipos tolerantes en condiciones control, acumulados diferencialmente en genotipos tolerantes y sensibles bajo estrés hídrico, sólo dio resultados positivos en raíces. Entre ellos, se detectaron GEDs, que conferían tolerancia a estrés hídrico, y que codificaban una chaperona (Park y Seo, 2015), y una proteína asociada a la familia de las auxinas de latencia, hormona implicada en la modificación de proteínas, transducción de señal y tolerancia a sequía (Peleg y Blumwald, 2011). Además, también se identificó GEDs que codifican una proteína LHY, un FT MYB. Los FTs son los principales reguladores de la expresión génica, desempeñando un papel crítico en la respuesta a estrés (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007, Buchanan *et al.*, 2015, Singh y Laxmi, 2015). En *Arabidopsis*, las mutaciones en el gen MYB produjeron hipersensibilidad a los agentes generadores de ROS, indicando su implicación en el proceso de detoxificación (Park *et al.*, 2016). Por último, también se detectó un GED que codifica una proteína de unión a calcio, CML25, implicada en la respuesta a estrés abiótico (Zeng *et al.*, 2015). Este conjunto de transcritos, implicados en la protección, señalización y regulación de la expresión génica, también podría contribuir a una respuesta rápida y más eficiente en genotipos tolerantes.

Estos resultados aportan información adicional sobre los mecanismos que median la respuesta a sequía en genotipos con diferente sensibilidad al déficit hídrico en *Pinus pinaster*. Entre ellos destaca el hecho de que la expresión constitutiva de genes relacionados con la sequía, específicamente genes regulados por hormonas, genes involucrados en vías de señalización, así como aquellos involucrados en la protección frente al estrés, puede proporcionar ventajas funcionales para hacer frente a un eventual déficit de agua en los genotipos tolerantes, que posiblemente sufren sequías recurrentes. Curiosamente, los genotipos sensibles, a diferencia de los tolerantes, muestran sobreexpresión de un número significativo de genes relacionados con el ciclo de Calvin y Benson y la regulación del PS-II al ser sometidos a déficit hídrico. Independientemente de la sobreexpresión de estos genes, los genotipos sensibles muestran una respuesta a sequía poco eficiente, pudiendo indicar que la expresión de dichos genes no representa una respuesta de aclimatación adaptativa a la sequía en los pinos sensibles y que otros mecanismos reguladores pueden limitar el alcance de su respuesta fisiológica ante el estrés hídrico. Aunque en los genotipos sensibles, no en los tolerantes, identificamos una sobreexpresión de un conjunto de genes relacionados con la protección osmorreguladora en respuesta al estrés, el patrón de variación del

potencial osmótico no reflejó diferencias significativas entre los distintos genotipos, que mostraron una capacidad similar para ajustarse osmóticamente al déficit hídrico.

Una interpretación conjunta de estos resultados parece sugerir que los genes expresados constitutivamente en plantas control, podrían estar más relacionados con una respuesta fisiológica adaptativa de aclimatación al déficit hídrico que los GEDs en plantas sometidas a un régimen hídrico moderado.

ANÁLISIS DEL EFECTO DEL PORTAINJERTO SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LA PÚA EN PLANTAS INJERTADAS DE *PINUS PINASTER* EN RESPUESTA A DÉFICIT HÍDRICO

El injerto es una técnica de propagación vegetativa ampliamente aplicada en árboles frutales y plantas herbáceas, que también ha sido utilizada para estudiar diferentes aspectos en biología vegetal, como, por ejemplo, la señalización sistémica (Tsutsui y Notaguchi, 2017). Sin embargo, su uso en la investigación de árboles forestales en general, y de coníferas en particular, ha sido escaso (Mutke *et al.*, 2019; Pérez-Luna *et al.*, 2020). Su aplicación en árboles se ve limitada principalmente por la pérdida de la capacidad de propagación asociada a su elevada longevidad, que reduce la tasa y alcance de la capacidad de enraizamiento específica de cada especie. En *Pinus pinaster*, la pérdida de la capacidad de enraizamiento se produce de forma temprana a los 4-5 años de edad, lo que limita la producción de réplicas, afectando en nuestro estudio, a la propagación de portainjertos. Debido a esta limitación, nuestro diseño se centra en el estudio de injertos que combinan dos genotipos de una misma especie, *Pinus pinaster*, utilizando individuos de la progenie procedente del cruce de referencia de esta especie Gal 1056 x Oria 6 como portainjertos, y sus progenitores como púas, con el fin de optimizar la compatibilidad de la planta injertada (Julia *et al.*, 2011).

Estudio de los transcriptomas de las acículas de los injertos en condiciones control

Con el objetivo de analizar cómo los genotipos con diferentes grados de sensibilidad a sequía, empleados como portainjertos, podían influir en el transcriptoma de las acículas de las púas injertadas procedentes de genotipos tolerantes o sensibles al déficit hídrico, estudiamos, inicialmente, los patrones de expresión génica en injertos crecidos en condiciones control con objeto de conocer las funciones que diferían entre las distintas construcciones (Figura 6.2). Uno de los resultados más relevantes fue la variación de la expresión génica mostrada por las acículas de las púas pertenecientes al progenitor sensible a sequía (Gal 1056) injertadas sobre los portainjertos sensibles (R1S) frente a las púas injertadas sobre los portainjertos tolerantes (R18T), que contrastaba con la escasa variación identificada en las acículas de las púas del progenitor tolerante (Oria 6) injertadas sobre los mismos portainjertos. El análisis de enriquecimiento funcional de los GEDs identificados en Gal 1056 / R1S vs Gal 1056 / R18T, reveló procesos, rutas y genes afectados. En Gal 1056 / R18T, se observaron GEDs sobreexpresados implicados en acción de fitohormonas y biosíntesis de ARN y metabolismo secundario (Figura 4.3b). Como ya se ha descrito anteriormente, las plantas expuestas a estrés acumulan terpenos y compuestos fenólicos como flavonoides y antocianinas (Kleiber *et al.*, 2017) que, entre otras funciones, actúan en procesos de detoxificación eliminando especies ROS (Hatier y Gould, 2008; Agati y Tattini, 2010). La sobreexpresión de genes implicados en la biosíntesis de flavonoides en Gal 1056 / R18T podría sugerir que los portainjertos tolerantes podrían afectar la acumulación de flavonoides en las acículas de las púas sensibles, al contrario de lo observado en las acículas de las púas tolerantes.

Además, en Gal 1056 / R18T se identificó un número significativo de genes que codifican FTs MYB. Los FTs MYB regulan diferentes procesos asociados con desarrollo, crecimiento y función de órganos y tipos celulares específicos, así como con la biosíntesis de metabolitos secundarios como los flavonoides (Deluc *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2014; Baldoni *et al.*, 2015), lo que podría sugerir la implicación de estos FT MYBs en la modulación del contenido de metabolitos secundarios de las acículas. Estos resultados coinciden con estudios previos realizados por de Miguel *et al.* (2016) que identificaron SNPs en el FT MYB1 que estaban asociados con diferentes concentraciones de fenilalanina y fenilpropanoides en esta familia de *Pinus pinaster*.

El análisis de plantas Gal 1056 / R1S vs Gal 1056 / R18T también mostró GEDs asociados con la biosíntesis y señalización mediada por fitohormonas, principalmente asociadas con ABA y auxinas, pero también con SA, JA, giberelinas y otros péptidos de señalización en ambas construcciones, lo que podría indicar un efecto del portainjerto en el metabolismo y acción de estos factores endógenos clave en la regulación del crecimiento y el desarrollo de la planta, en acículas de las púas sensibles a sequía. La hormona ABA es crítica en numerosos procesos biológicos, como la latencia en yemas, germinación de semillas, cierre de estomas y adaptación a estrés (Kumar *et al.*, 2019). La auxina es una fitohormona vegetal que participa en múltiples procesos de desarrollo, crecimiento y respuesta a estrés hídrico mediante la regulación, entre otros, de la arquitectura de raíces, de la expresión de genes que responden a ABA, del metabolismo de especies ROS y de la homeostasis del metabolismo del carbono (Shi *et al.*, 2014; Korver *et al.*, 2018). Por otro lado, el SA interviene en la regulación de una amplia gama de procesos en respuesta a déficit hídrico como fotosíntesis, mecanismos de asimilación del carbono, metabolismo de proteínas, aminoácidos y carbohidratos solubles, homeostasis redox y transducción de señales (Sharma *et al.*, 2017). El JA y las giberelinas son hormonas endógenas implicadas en el aumento de tolerancia a sequía mediante, entre otros procesos, la activación del sistema enzimático antioxidante y la regulación de la conductancia estomática (Wang *et al.*, 2021; Zawaski y Busov, 2014). La señalización peptídica interviene en respuesta a estrés hídrico mediante la regulación de una amplia diversidad de procesos, entre ellos, el desarrollo estomático (Lynn *et al.*, 2013). La mayoría de los GEDs asociados con la percepción y señalización mediada por ABA se encontraron sobreexpresados en Gal 1056 / R1S, incluyendo un gen que codifica el receptor PYR/PYL, que desempeña un papel importante en regulación de la apertura estomática (Dittrich *et al.*, 2019). Además, se identificaron GEDs que codifican la proteína fosfatasa 2C (PP2C), un componente del módulo PYL-PP2C-SnRK2, sobreexpresado en Gal 1056 / R18T. Los miembros de la familia de genes PYL-PP2C-SnRK2 están implicados en el crecimiento, el desarrollo y una variedad de respuestas a estrés abiótico, actuando como un componente clave en las cascadas de señalización mediadas por ABA (Xu *et al.*, 2020). Por último, se identificaron GEDs que codifican transportadores de membrana de ABA, ABCG y NRT1/PTR (Kuromori *et al.*, 2010; Jarzyniak y Jasiński, 2014), sobreexpresados en Gal 1056 / R1S. Se detectaron GEDs relacionados con la biosíntesis de auxinas sobreexpresados en Gal 1056 / R18T, mientras que aquellos implicados en la percepción y señalización de auxinas estaban sobreexpresados en Gal 1056 / R1S, al igual que los transportadores de auxinas de la superfamilia ABCB (Jarzyniak y Jasiński, 2014). La alta acumulación de flavonoides asociada con la sobreexpresión de genes implicados en su biosíntesis podría alterar el

transporte de auxinas modificando, entre otros mecanismos, el transportador ABCB, como describen Geisler y Murphy (2006).

Del mismo modo, se identificó un número significativo de genes asociados a respuesta a estímulo externo expresados diferencialmente en Gal 1056 / R1S frente a Gal 1056 / R18T. Entre ellos, se detectaron GEDs que codifican defensinas, proteínas ricas en cisteína que median en la respuesta inmune innata no específica, y que están involucradas en diferentes respuestas a estrés abiótico (Do *et al.*, 2004); y GEDs que codifican componentes del sistema de resistencia adquirida (SAR), cuya función en respuesta a estrés abiótico se ha descrito recientemente, modulando la respuesta a ROS, el metabolismo de la prolina y respuesta REDOX (La *et al.*, 2019). Otro proceso biológico significativamente enriquecido en GEDs en Gal 1056 / R1S fue la fotosíntesis, con sobreexpresión de genes que codifican componentes del complejo proteico del PSII, incluyendo subunidades del complejo de antena LHCI y proteínas extrínsecas del PSII, como la PsbS que aumenta la eficiencia del uso del agua (Głowacka *et al.*, 2018). Por último, se detectó un enriquecimiento en GEDs asociados con procesos de organización de la pared celular. Se identificaron genes sobreexpresados en Gal 1056 / R18T que codifican la cafeoil-CoA 3-O-metiltransferasa (CCoA-OMT), implicada en la biosíntesis de lignina (Chen *et al.*, 2000). Por el contrario, los genes implicados en metabolismo de pectinas, como los que codifican α -L-arabinofuranosidasa bifuncional y β -D-xilosidasa (BXL), que participan en el engrosamiento de la pared secundaria (Arsovski *et al.*, 2009) y una metil-esterasa (PME), implicada en adhesión celular (Daher y Braybrook, 2015), estaban sobreexpresados en Gal 1056 / R1S. Otros genes también sobreexpresados en Gal 1056 / R1S codifican una expansina de clase α , implicada en crecimiento celular (Cosgrove, 2000) y una proteína AGP β -1,3-galactosiltransferasa (AGP), implicada en crecimiento y desarrollo vegetativo (Amos y Mohnen, 2019).

Aunque estos resultados sugieren un mayor efecto del portainjerto en la modulación del perfil transcriptómico de acículas de púas del progenitor sensible a sequía, también se identificaron GEDs en acículas de púas del progenitor tolerante injertadas sobre portainjertos sensibles frente a las injertadas sobre portainjertos tolerantes a la sequía, Oria 6 / R1S vs Oria 6 / R18T. Así, se identificaron un total de 16 GEDs en acículas de Oria 6, principalmente asociados con regulación transcripcional. Entre ellos, destacan genes sobreexpresados que codifican FTs C2H2 -ZF y bZip en Oria 6 / R18T, y CAMTA y GRAS en Oria 6 / R1S. El número más significativo de GEDs identificados en Oria 6 / R1S frente a Oria 6 / R18T codifican el activador de transcripción de unión a calmodulina (CAMTA), que mostraba una mayor acumulación no sólo en acículas de plantas Oria 6 / R1S sino también en plantas Gal 1056 / R1S. CAMTA es una pequeña familia de FTs implicada en la vía de señalización de calcio, que media en la regulación del desarrollo y la respuesta a una amplia variedad de estímulos externos y hormonales, incluyendo estrés abiótico y ABA (Rahman *et al.*, 2016).

Estos resultados ponen de manifiesto que el uso de portainjertos tolerantes o sensibles a sequía modifica en mayor medida la expresión génica de acículas de púas del progenitor sensible a la sequía, Gal 1056. En Gal 1056 / R18T se observó una elevada sobreexpresión de genes asociados con el metabolismo secundario, y más concretamente con la biosíntesis de flavonoides, mientras que en Gal 1056 / R1S se

identificó una plétora de procesos y vías enriquecidas en GEDs (Figura 6.2), entre los que destacaban aquellos asociados a respuesta a estímulo externo, fotosíntesis y organización de la pared celular. Estas variaciones eran prácticamente inexistentes cuando se analizaban injertos Oria 6, lo que sugiere que los injertos de púas procedentes de genotipos sensibles y tolerantes a sequía difieren en su sensibilidad al efecto de portainjerto con distinto grado de sensibilidad a sequía.

En un segundo estudio análisis de los transcriptomas de acículas de los injertos crecidos en condiciones control, se compararon las púas de ambos genotipos injertadas bien sobre portainjertos sensibles (Gal 1056 / R1S vs Oria 6 / R1S) o bien injertadas sobre portainjertos tolerantes a sequía (Gal 1056 / R18T vs Oria 6 / R18T). Esta comparación proporcionó información sobre procesos, rutas y genes enriquecidos diferencialmente en acículas de las púas de los progenitores Gal 1056 y Oria 6, mostrando patrones de expresión que que diferían entre ambas comparaciones, influidos por el genotipo del portainjerto (Figura 6.2). Uno de los procesos más enriquecidos en GEDs en Gal 1056 / R18T al ser comparado con Oria 6 / R18T fue el metabolismo secundario, con genes que codifican proteínas implicadas en la biosíntesis de terpenoides y flavonoides, como mono/sesquiterpeno/diterpeno sintasa y chalcona sintasa. También involucrados en la biosíntesis de flavonoides, se observó, en ambas comparativas, una sobreexpresión de genes que codifican flavanona 3-hidroxilasa (F3H), ligeramente superior en plantas Oria 6 / R1S y Gal 1056 / R18T. La biosíntesis de glicina betaína fue uno de los procesos enriquecidos con GEDs sobreexpresados en púas de Gal 1056, independientemente del portainjerto sobre el que estaban injertadas. Este resultado, combinado con la sobreexpresión de GEDs asociados con estas rutas en Gal 1056 / R1S vs Gal 1056 / R18T y la ausencia de GEDs observada en Oria 6 / R1S vs Oria 6 / R18T, indicaba una mayor activación de estos procesos en las púas del progenitor sensible a sequía, que difería en función del genotipo del portainjerto. Como ya se describió en la primera comparativa, estos metabolitos secundarios son compuestos relevantes en la defensa química de la planta y actúan como antioxidantes promoviendo tolerancia a estrés (Isah, 2019). Es importante destacar que, en el caso de los terpenos, se han descrito patrones específicos de procedencia en acículas de diferentes coníferas (Arrabal *et al.*, 2012; Kännaste *et al.*, 2013; Kleiber *et al.*, 2017), sin embargo, esta variación parece verse incrementada por el efecto del porta tolerante sobre la púa sensible a sequía. Por el contrario, los genes que codifican la proteína γ -glutamyl peptidasa 1 (GGP1), implicada en la producción de glucosinolatos mediante la escisión del conjugado de glutatión, estaban sobreexpresados en púas de Oria 6 / R18T. Los glucosinolatos juegan un papel importante en la regulación estomática y en tolerancia a sequía (Martínez-Ballesta *et al.*, 2013). Estos resultados podrían sugerir que Oria 6 muestra una mayor activación de esta ruta cuando está injertado en R18T.

Otro de los procesos enriquecidos en GEDs en Gal 1056 vs Oria 6 estaba relacionado con la respuesta a estímulos externos, identificando un número mayor de genes sobreexpresados en púas injertadas sobre portainjertos sensibles a sequía (R1S). Asimismo, se identificó un enriquecimiento de genes implicados en la biosíntesis, percepción y transducción de señales de diferentes fitohormonas (ABA, auxinas, citoquininas, giberelinas, brasinoesteroides, etileno, AJ, péptidos señalizadores y estrigolactona), que mostraban pequeñas variaciones en los perfiles de expresión de ambas comparaciones. El análisis comparativo de plantas Gal 1056 / R1S vs Oria 6 /

R1S mostró un mayor número de GEDs asociados con auxinas, principalmente sobreexpresados en Oria 6 / R1S, que codifican TOPLESS (TPL), implicada en la represión transcripcional de la vía de las auxinas (Szemenyei *et al.*, 2008). La comparativa Gal 1056 / R18T vs Oria 6 / R18T reveló un enriquecimiento de GEDs asociados con giberelinas, principalmente sobreexpresados en Oria 6 / R18T. En cuanto a los genes relacionado con ABA, el gen que codifica la xantoxina oxidasa, también conocida como xantoxina deshidrogenasa, una enzima implicada en la biosíntesis de ABA que cataliza la conversión de la xantoxina en aldehído abscísico, estaba sobreexpresado en púas de Gal 1056 y Oria 6 injertadas en portainjertos tolerantes, con una mayor acumulación de transcritos en Oria 6 / R18T. En Gal 1056 / R18T se identificó sobreexpresión de GEDs que codifican la proteína SDIR1, una ligasa que regula positivamente la señalización mediada por ABA en respuesta a estrés (Zhang *et al.*, 2007). Estos resultados sugieren una mayor acumulación de transcritos implicados en la biosíntesis y señalización mediada por ABA en Gal 1056 / R18T, que podría indicar una mayor activación de la regulación asociada con esta hormona. La elevada acumulación de transcritos que codifican el componente PP2C en Oria 6 / R1S, podría estar asociada a su papel en procesos de tolerancia frente a estrés abiótico, al reprimir la señalización mediada por ABA, como se ha descrito previamente.

El análisis comparativo reveló también un elevado número de GEDs que codifican una amplia diversidad de FTs, siendo los más significativos MYB, AP2/ERF, C2H2-ZF, PHD, HSF, NAC y WRKY, que juegan un papel clave en señalización frente a estrés hídrico (Joshi *et al.*, 2016). Empleando como criterio el tipo de patrón de expresión, los GEDs podían agruparse en tres grupos al comparar Gal 1056 / R1S vs Oria 6 / R1S y Gal 1056 / R18T vs Oria 6 / R18T. Los genes que codifican FTs C2H2-ZF, DREB y NAC, se encontraban sobreexpresados en Gal 1056 / R1S y Oria 6 / R18T; mientras que AP2/ERF, MYB y WRKY lo estaban en Gal 1056 / R1S y Gal 1056 / R18T, y finalmente HSF y PHD en Gal 1056 / R1S. El primer grupo incluía FTs cuya expresión génica se veía modulada por la interacción entre mismo tipo de púa/portainjerto. Entre ellos, C2H2-ZF, participa en diversos procesos asociados a crecimiento y desarrollo, así como en la respuesta a un amplio espectro de estreses abióticos y bióticos (Han *et al.*, 2020). Los NAC son una gran familia de FTs que también están implicados en una gran variedad de procesos biológicos regulando el crecimiento, desarrollo y especialmente la tolerancia a estrés abiótico en plantas (Baillo *et al.*, 2019; Hoang *et al.*, 2020). Por último, DREB, pertenecen a la familia de factores de transcripción AP2/ERF que están implicados en rutas de traducción de señales independientes de ABA que se activan en respuesta a sequía, salinidad y estrés por frío (Sakuma *et al.*, 2002). El segundo grupo incluía FTs cuya expresión génica se asociaba principalmente al genotipo de la púa, aunque ligeramente modulada por el genotipo del portainjerto, como MYB, previamente discutido y AP2/ARV, miembro de la gran familia de FTs AP2/ERF, reguladores clave en respuestas a estrés hormonal y abiótico (Baillo *et al.*, 2019; Xie *et al.*, 2019). El enriquecimiento de GEDs que codifican MYB se observó principalmente en acículas de plantas Gal 1056 / R18T. Además, en este segundo grupo, se incluían GEDs que codifican WRKY, una gran familia implicada en desarrollo, respuesta a estrés (Wan *et al.*, 2018) y tolerancia a sequía (Tripathi *et al.*, 2014), actuando como regulares positivos y negativos (Chen *et al.*, 2019). Los otros dos FTs que se detectaron principalmente sobreexpresados en Gal 1056 / R1S, PHD y HSF, están involucrados en

la regulación del crecimiento y desarrollo, así como en la respuesta a estrés abiótico (Sun *et al.*, 2017; Giorno *et al.*, 2010). La identificación de GEDs que codifican C2H2-ZF, NAC y DREB, FTs implicados en respuesta a estrés hídrico, que se encontraron sobreexpresados en Gal 1056 / R1S y Oria 6 / R18T, podría sugerir una activación de estos factores asociada con el mismo tipo de comportamiento la de la púa y del genotipo del portainjerto en reacción a su grado de sensibilidad a sequía.

El análisis de enriquecimiento funcional de los genes que se expresaron de forma diferencial en Gal 1056 frente a Oria 6 injertados en portainjertos tolerantes o sensibles a sequía, reveló también un gran número de GEDs asociados con una diversidad de procesos que presentaban diferencias más reducidas en sus patrones de expresión. Los más significativos estaban asociados con el componente PAP1/TAC3, que interactúa con la subunidad α del núcleo del complejo de la ARN polimerasa (PEP) codificada en el cloroplasto para regular su actividad e intervenir en su desarrollo (Yagi *et al.*, 2012). Los GEDs que codifican el componente PAP1/TAC3 sólo se detectaron al comparar Gal 1056 / R1S vs Oria 6 / R1S, y principalmente en Oria 6 / R1S. Otros procesos enriquecidos en GEDs en Gal 1056 / R1S vs Oria 6 / R1S estaban relacionados con la biosíntesis de proteínas, entre ellos, genes asociados con la biosíntesis de ribosomas, así como con la modificación de proteínas, incluyendo GEDs que codifican quinasas similares a receptores ricos en leucina (LRR-RLKs) de las subfamilias X y XIII. Las LRR-RLKs representan un gran número de quinasas transmembrana que participan en el crecimiento, desarrollo y respuestas a estrés en plantas (Gish *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2017). Por el contrario, los genes que codifican HSP citosólicas de clase C-I sólo se identificaron muy sobreexpresados en la comparativa Gal 1056 / R18T vs Oria 6 / R18T. El gen HSPs C-I, con un papel protector frente a estrés, se expresa constitutivamente en diferentes especies de vegetales (Jiang *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2012). Asimismo, el GED que codifica la subunidad pequeña de RuBisCO (rbcS) mostró un patrón de expresión similar. RbcS es una proteína fotosintética clave, cuya abundancia se ve afectada por la sequía (Khanna-Chopra *et al.*, 2012) dando lugar a una reducción significativa de la fotosíntesis (Chaves *et al.*, 2009). Además, genes que codifican los componentes de la proteína de unión a clorofila-a/b del fotosistema II (LHCb) estaban sobreexpresados en Oria 6 / R18T. Un análisis de QTLs previo de la progenie utilizada como portainjertos, reveló la importancia de mantener la integridad de la maquinaria fotoquímica en respuesta a sequía en *Pinus pinaster*, e identificó un factor de transcripción MYB asociado significativamente con la eficiencia de captura de energía en los centros de reacción del PSII (de Miguel *et al.*, 2014). En este análisis también observamos un efecto significativo del portainjerto que conducía a una mayor sobreexpresión de GEDs en Gal 1056 / R18T, implicados principalmente en dos procesos: la fosforilación oxidativa mitocondrial para la producción de ATP, y la biosíntesis de ácidos grasos, especialmente con genes que codifican la acetil-CoA carboxilasa del cloroplasto, implicada en la biosíntesis de ácidos grasos insaturados C18 (AGPI C18). Los AGPI C18 desempeñan múltiples funciones, como componentes de las membranas, reservas de carbono y energía, constituyentes de la cutina y la suberina, antioxidantes, y precursores de diversas moléculas bioactivas (He *et al.*, 2020a), y recientemente se ha demostrado su participación en señalización (Lim *et al.*, 2017).

Por último, el metabolismo de poliaminas fue otro de los procesos biológicos modulado por el genotipo del portainjerto. Se identificaron GEDs que codifican poliaminoxidasas citosólicas (PAO1) sobreexpresados en Gal 1056 / R1S. Este resultado indica que las púas sensibles (Gal1056) injertadas sobre portainjertos sensibles a sequía (R1S) mostraban una mayor acumulación de transcritos que participaban en la degradación de poliaminas (PA). Las PA participan en la regulación de diversos procesos fisiológicos, así como en la respuesta a diversos estreses abióticos y bióticos (Xu *et al.*, 2014c; Mustafavi *et al.*, 2018). Además, se asocian con procesos de regulación del tamaño de los canales de potasio y de los poros de la membrana plasmática, participando en el control de la pérdida de agua (Liu *et al.*, 2000). La sequía provoca un aumento de los niveles de ABA endógeno que promueve un incremento en el nivel de expresión de los genes codificantes de PA (Alcázar *et al.*, 2010).

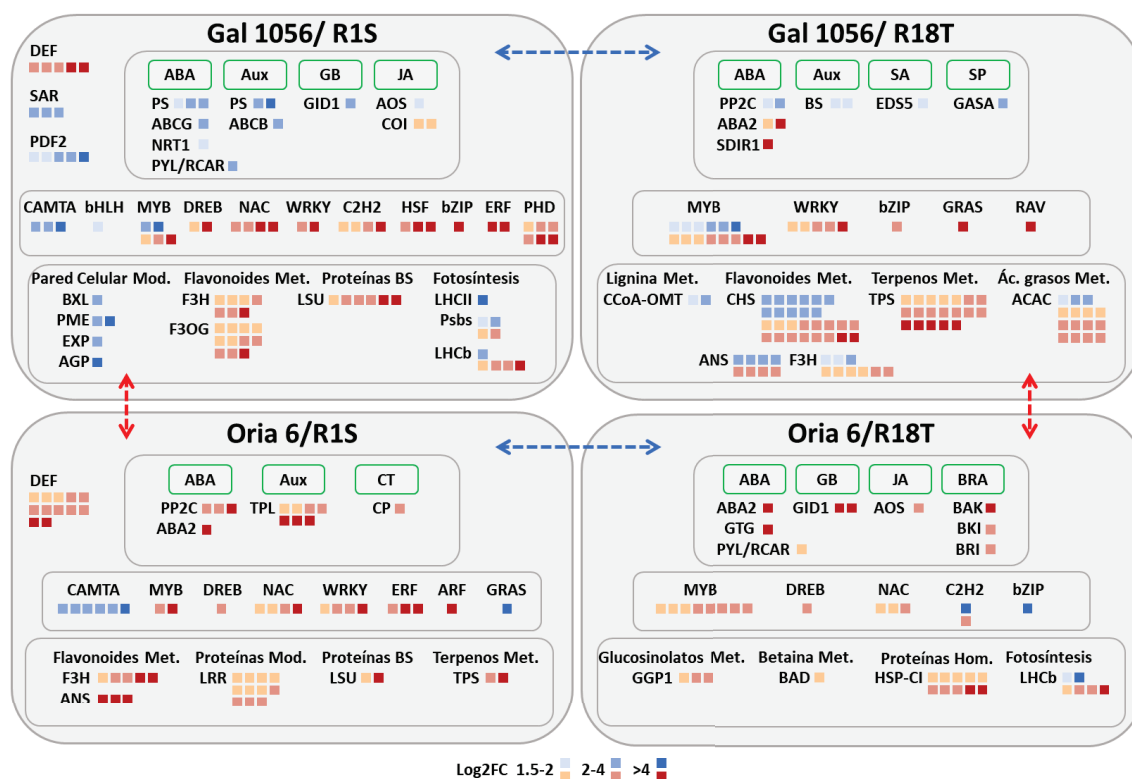


Figura 6.2. Modelo esquemático de los perfiles de expresión de las acículas de los 4 tipos de injertos crecidos en condiciones control, observados en los distintos análisis comparativos ($\leq -1,5$ y $\geq 1,5$ Log₂FC; $p \leq 0,05$). Los cuadrados verdes representan las fitohormonas. Las flechas indican el análisis diferencial, Gal 1056 / R1S vs Gal 1056 / R18T u Oria 6 / R1S vs Oria 6 / R18T (azul) y Gal 1056 / R1S vs Oria 6 / R1S o Gal 1056 / R18T vs Oria 6 / R18T (rojo). Los cuadrados pequeños en tonos azules y rojos muestran los GEDs identificados en los dos tipos de análisis diferenciales, asociados con respuesta a estímulo externo, fitohormonas, FTs y procesos biológicos. Met. = Metabolismo; Mod, = Modificación; BS= Biosíntesis; Hom.= Homeostasis.

En conjunto, el análisis del efecto del portainjerto sobre el transcriptoma de las acículas de las púas de los genotipos injertados crecidos en condiciones control, ha revelado diversos procesos, como los asociados a metabolismo secundario, que están determinados principalmente por el genotipo de la púa, así como el efecto generalizado de los portainjertos sobre la expresión génica de las acículas de los genotipos de las púas injertadas de *Pinus pinaster*.

Estudio de los transcriptomas de las acículas de los injertos en respuesta a estrés hídrico

Tras haber analizado los patrones de expresión de los injertos en condiciones control, procedimos a analizar el efecto del portainjerto sobre el transcriptoma de las acículas de las púas de los injertos Gal 1056 / R1S, Gal 1056 / R18T, Oria 6 / R1S y Oria 6 / R18T, en respuesta a déficit hídrico (Figura 6.3). El análisis comparativo de la expresión génica reveló una menor variación en las acículas de las púas sensibles a sequía (Gal 1056) injertadas sobre portainjertos sensibles frente a tolerantes, frente a la observada en acículas de púas tolerantes (Oria 6) injertadas sobre los mismos portainjertos, que es contraria a la observada en condiciones control. Asimismo, se identificó un mayor número de GEDs en plantas injertadas sobre portainjertos tolerantes, Gal 1056 / R18T y Oria 6 / R18T.

El análisis de enriquecimiento funcional de los GEDs en Gal 1056 / R1S vs Gal 1056 / R18T y en Oria 6 / R1S vs Oria 6 / R18T, permitió identificar procesos, rutas y genes alterados en respuesta a déficit hídrico (Figura 4.12b y c). Se detectaron GEDs sobreexpresados asociados con transporte de solutos y biosíntesis de ARN en todos los injertos. Además, en Gal 1056 / R18T se detectaron GEDs sobreexpresados asociados con el tráfico vesicular y homeostasis de proteínas, este último proceso también enriquecido en plantas Oria 6 / R18T. En plantas Gal 1056 / R1S y Oria 6 / R18T, se observó un enriquecimiento de GEDs asociados con metabolismo secundario. Por último, en Oria 6 / R1S se identificó un enriquecimiento de GEDs asociados con organización de la pared celular, acción de fitohormonas y procesamiento de ARN.

Entre los GEDs implicados en biosíntesis de ARN, aquellos que codifican FTs WRKY, C2H2-ZF, NAC y AS2LOB, cuyo papel en la señalización frente a estrés hídrico ya se ha descrito previamente (Joshi *et al.*, 2016; Baillo *et al.*, 2019; Han *et al.*, 2020; Hoang *et al.*, 2020), estaban sobreexpresados únicamente en Gal 1056 / R18T y Oria 6 / R18T. Los dominios LOB, de sus siglas en inglés Lateral Organ Boundaries, de la familia de genes LBD, juegan un papel fundamental en crecimiento y desarrollo vegetal (Zhang *et al.*, 2020a), estando implicados en procesos de resistencia a sequía (Liu *et al.*, 2019). La expresión diferencial de estos FTs en acículas de púas de ambos progenitores injertados sobre portainjertos tolerantes podría indicar un efecto del portainjertos tolerante en la regulación a distancia de la expresión de estos factores cruciales en crecimiento, desarrollo y respuesta a sequía, con independencia del genotipo de la púa analizada. En Oria 6 / R18T, además de los FTs antes descritos, también se observó un enriquecimiento en GEDs asociados a GRAS, bHLH, MYB, ERF, mTERF, NF-YA,

MADS/AGL y TIFY. En los últimos años diversos estudios han descrito la participación de los FTs GRAS en señalización mediada por giberelinas y JA, desarrollo de raíces y meristemas, y respuesta a estímulos luminosos y a otros estreses abióticos y bióticos (Bole, 2004). En respuesta a sequía, se ha demostrado que juegan un papel fundamental en la modulación positiva de tolerancia a través de la inducción de genes específicos de respuesta a estrés (Xu *et al.*, 2015). Los factores de respuesta a etileno ERF constituyen una gran familia de FTs que cuentan con un dominio AP2/ERF conservado, y desempeñan un papel clave en crecimiento y desarrollo, así como en la respuesta a estrés hídrico, entre otros, mediante la regulación positiva de la biosíntesis de antocianinas y otros compuestos fenólicos (An *et al.*, 2020), al igual que sucede con los factores MYB y bHLH (Allan *et al.*, 2008; Jaakola, 2013). Como se ha descrito previamente, los compuestos fenólicos como las antocianinas y los flavonoides participan activamente en los mecanismos de respuesta a estrés hídrico mediante la eliminación de especies ROS (Agati y Tattini, 2010; Nakabayashi *et al.*, 2014). La familia de factores de terminación de la transcripción mitocondrial (mTERF), implicados en procesos de desarrollo celular, participan activamente en la respuesta a estrés abiótico (Quesada, 2016). Los factores heterotriméricos NF-Y, compuestos, entre otras, por la subunidad NF-YA, desempeñan papeles clave en diferentes etapas de la simbiosis de nódulos radiculares y micorrizas arbusculares, así como durante la interacción de las plantas con microorganismos patógenos y respuesta a estrés hídrico (Zanetti *et al.*, 2017). El FT MADS/AGL es un represor de la resistencia a sequía que participa en el control de la densidad estomática y la acumulación de ABA en hojas (Zhao *et al.*, 2020). Por último, los factores TIFY participan en procesos de regulación mediados por JA en respuesta a diversos estreses abióticos como salinidad o sequía (Yang *et al.*, 2019). Adicionalmente, en Gal 1056 /R18T se identificaron GEDs que codifican los FTs GRF-GIF, bHLH, DOF y HAF/TAF1. Los factores reguladores del crecimiento GRF-GIF, controlan procesos de desarrollo en múltiples tejidos y órganos en diferentes especies, siendo relevantes en la coordinación del crecimiento en función de distintos factores endógenos y condiciones ambientales (Liebsch y Palatnik, 2019). La familia de factores DOF, *DNA binding with One Finger*, participan en el desarrollo de semillas, latencia y germinación, desarrollo de la planta y otros procesos de respuesta a estímulo luminoso (Ruta *et al.*, 2020). Las proteínas de la familia HAF o proteínas TAF1 forman parte del complejo de preiniciación durante el inicio de la transcripción, junto con la ARN polimerasa II y un subconjunto de otros factores centrales de la transcripción, y desempeñan diversas funciones durante el desarrollo de la planta, mediando la respuesta de la misma frente a factores abióticos como estímulos luminosos (Fina *et al.*, 2017).

Por otro lado, se observó un enriquecimiento de GEDs que codifican FTs MYB, bZIP, bHLH, YABBY y zf-HD en Gal 1056 / R1S. Como se ha descrito previamente, los factores MYB, bZIP, bHLH juegan un papel fundamental en crecimiento y desarrollo, así como en la respuesta a diversos estreses abióticos y bióticos (Joshi *et al.*, 2016). Los FTs YABBY están implicados en múltiples procesos biológicos, como en establecimiento de la polaridad en acículas, en morfogénesis y desarrollo, y en la respuesta a fitohormonas y a diversos estreses ambientales (Zhang *et al.*, 2020). Por último, los factores zf-HD, juegan un papel fundamental en procesos de desarrollo, en respuestas a fitohormonas, como ABA, SA y JA, y a estrés, principalmente a estrés

abiótico asociado con sequía y frío (Zhou *et al.*, 2021). En Oria 6 / R1S se detectó un enriquecimiento de GEDs que codifican FTs DREB, GARP, BOP, ERF, LIM y una RNA polimerasa I-V. El papel de los FTs DREB (Dehydration-responsive element-binding protein) en respuesta a sequía está relacionado con el mantenimiento de la homeostasis REDOX celular mediante la eliminación de especies ROS, la reducción en la apertura y densidad de estomas, la modulación de la biosíntesis de metabolitos secundarios como la lignina, para controlar la pérdida de agua, y la inducción de la expresión de genes de respuesta a estrés (Li *et al.*, 2020). La familia de FTs GARP (formada por ARR-B y G2-like) contiene genes que desempeñan funciones muy diversas en el desarrollo, transporte, señalización hormonal y respuesta a cambios en la disponibilidad de nitrógeno del suelo, y su acción aparece frecuentemente asociada con los MYBs (Safi *et al.*, 2017, 2021). Los FTs BOP (Blade-On-Petiole) participan en procesos de desarrollo, y en la respuesta de la planta a cambios ambientales a través de la interacción con fitocromos, modulando procesos de foto- y termo-morfogénesis (Zhang *et al.*, 2017). Finalmente, los FTs LIM actúan como reguladores clave en desarrollo mediante la modulación de la transcripción, organización del citoesqueleto y regulación de la dinámica de la actina (Arnaud *et al.*, 2007; Hoffmann *et al.*, 2014), asimismo, participan activamente en procesos metabólicos y de defensa frente a diversos estreses abióticos y bióticos (Srivastava y Verma, 2017). Estos resultados parecen indicar que la expresión de FTs relacionados con desarrollo y respuesta a estrés en acículas de la planta injertada está afectada por el genotipo del portainjerto utilizado, provocando un mayor efecto el portainjerto tolerante, R18T.

Con respecto a los genes asociados a metabolismo secundario, se detectaron GEDs implicados en la biosíntesis de terpenos sobreexpresados en todos los genotipos. Adicionalmente, en Gal 1056 / R18T y Oria 6 / R18T se identificó un enriquecimiento de GEDs implicados en la biosíntesis de flavonoides, cuyo número era mayor en Oria 6 / R18T, con genes relacionados con la biosíntesis de antocianinas, chalconas y dihidroflavonoides. La acumulación diferencial de metabolitos secundarios como terpenos, flavonoides, antocianinas y carotenoides, es un mecanismo de defensa fundamental en la respuesta de la planta a estrés hídrico (Kleiber *et al.*, 2017; Hatier y Gould, 2008; Agati y Tattini, 2010). Estos resultados refuerzan la hipótesis de que los portainjertos tolerantes parecen modular la capacidad de respuesta a sequía de las acículas de las púas injertadas en mayor medida que los portainjertos sensibles. Además, esta modulación parece estar mediada por la sobreexpresión de FTs implicados en el control de la respuesta a estrés, que favorecerían la acumulación de dichos metabolitos secundarios. El análisis también mostró GEDs asociados con la biosíntesis y señalización mediada por fitohormonas en ambas comparativas (Gal 1056 / R1S vs Gal 1056 / R18T y Oria 6 / R1S vs Oria 6 / R18T). En la primera comparativa se detectaron GEDs asociados con la acción de péptidos de señalización ricos en cisteína (CRP) en ambos injertos. Asimismo, en Gal 1056 / R1S se identificaron GEDs asociados principalmente con el metabolismo de giberelinas y auxinas, mientras que en Gal 1056 / R18T con genes implicados en la biosíntesis de citoquinas. En la segunda comparativa, se observaron GEDs asociados con señalización mediada por estringolactonas en ambos injertos. Asimismo, en Oria 6 / R1S se identificaron GEDs asociados con percepción y traducción de señales mediadas por citoquinas y etileno, mientras que Oria 6 / R18T mostraba un enriquecimiento de GEDs implicados en la

biosíntesis de ABA. En Oria 6 / R18T también se detectaron GEDs que codifican transportadores de membrana de ABA, NRT1/PTR (Jarzyniak y Jasiński, 2014). Estos resultados podrían indicar el efecto del portainjerto en el metabolismo y acción de estas fitohormonas en acículas de púas sensibles y tolerantes a sequía en respuesta a estrés hídrico. Diversos estudios han demostrado el papel de los péptidos de señalización CRP en múltiples funciones como desarrollo y respuesta a diversos estreses bióticos y abióticos, entre otros, mediante la regulación de los mecanismos de apertura estomática (Ostrowski y Stanislaw, 2015; Srivastava *et al.*, 2021). Las auxinas están implicadas en división, elongación y diferenciación celular, y desempeñan un papel clave en la regulación del crecimiento en respuesta a estrés (Korver *et al.*, 2018). Asimismo, las giberelinas juegan un papel clave en regulación del crecimiento y la adaptación a estrés en especies forestales (Zawaski y Busov, 2014). Las citoquinas están implicadas en la división celular y la fotosíntesis, así como en la respuesta de la planta a sequía (Novakova *et al.*, 2007), contrarrestando procesos inducidos por ABA en respuesta a estrés hídrico, como la regulación del cierre estomático (Cowan *et al.*, 2005; Novakova *et al.*, 2007). Como ya se ha descrito anteriormente, la hormona endógena ABA además de ser uno de los reguladores clave en la respuesta de la planta al estrés hídrico, es crítica en otras numerosas funciones como germinación y desarrollo (Kumar *et al.*, 2019). Con respecto a los genes asociados al transporte de solutos, se identificaron GEDs sobreexpresados en todos los injertos analizados, con una sobreexpresión más acusada en Gal 1056 / R1S. Entre ellos, destacaban los GEDs que codifican transportadores de prolina, aniones y cationes, monosacáridos y metales, así como transportadores de fitohormonas. Cabe destacar el transportador de aminoácidos UnamiT que se ha demostrado que participa en la inducción de fenotipos de estrés y resistencia a factores abióticos a través de rutas dependientes de SA (Besnard *et al.*, 2021). El gen que codifica este transportador también estaba sobreexpresado en Oria 6 / R1S. Conjuntamente, se detectaron GEDs que codifican transportadores ERD6, early-responsive to dehydration, que, como se describió en el apartado anterior, se inducen tras procesos de deshidratación y en respuesta a otros estreses abióticos (Büttner, 2007), así como transportadores ZIP, que participan en la captación celular del Zn, y su tráfico intracelular (Krishna *et al.*, 2020). Los transportadores ZIP se localizan en tejidos específicos y participan activamente en el mantenimiento de la homeostasis de Zn y en la adaptación a suelos con diferentes contenidos de nutrientes (Tiong *et al.*, 2015). Por último, se detectó un enriquecimiento en GEDs asociados con procesos de organización de la pared celular en acículas de plantas injertadas sobre portainjertos sensibles, mayor en Oria 6 / R1S que en Gal 1056 / R1S.

En Oria 6 / R1S se identificaron GEDs sobreexpresados implicados en metabolismo de pectinas, como los que codifican la β -D-xilosidasa (BXL), que participa en el engrosamiento de la pared secundaria (Arsovski *et al.*, 2009), y la proteína AGP β -1,3-galactosiltransferasa (AGP), que, como se describió previamente, está implicada en crecimiento y desarrollo vegetativo (Amos y Mohnen, 2019). En Oria 6 / R1S también se detectaron GEDs implicados en el metabolismos de celulosas y hemicelulosas, como la endo- β -1,4-mananasa y la O-acetiltransferasa, y genes implicados en germinación de semillas, estructura y desarrollo a través de la modificación de las paredes celulares (Yuan *et al.*, 2006), así como genes que codifican la proteína cutina sintasa implicada, entre otras funciones, en protección frente a la pérdida de agua y resistencia frente a

diversos estreses bióticos y abióticos (Serrano *et al.*, 2014). En Gal 1056 /R1S se detectó un GED sobreexpresado que codifica un exportador de lípidos implicado en el metabolismo de cutina y suberina, más concretamente.

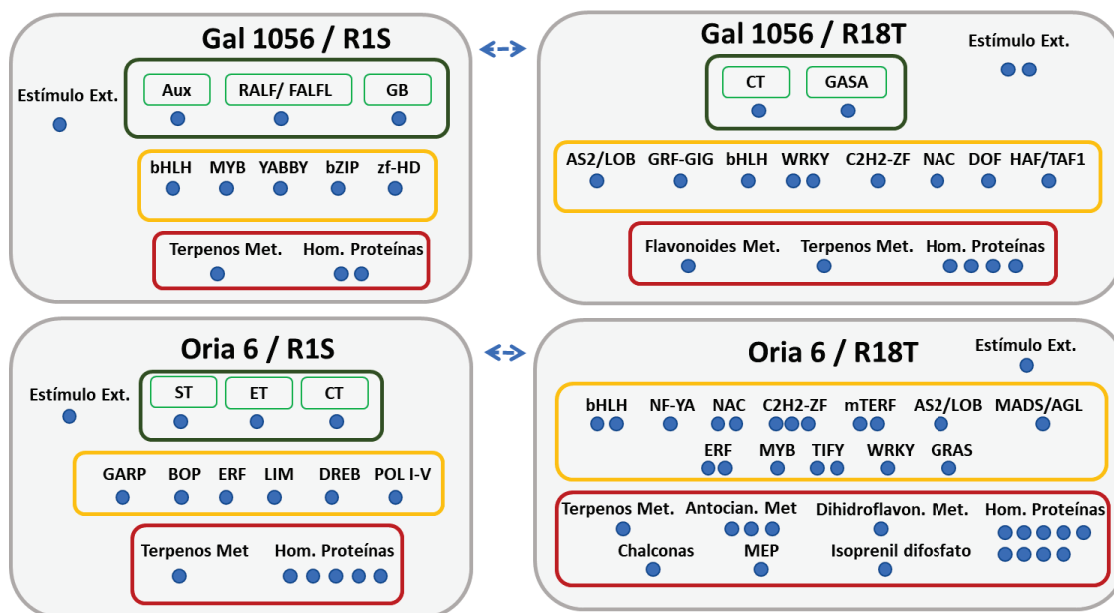


Figura 6.3. Modelo esquemático de los perfiles de expresión diferencial observado al comparar los transcriptomas de las acículas de las púas de Gal 1056 / R1S vs Gal 1056 / R18T y de Oria 6 / R1S vs Oria 6 / R18T en respuesta a estrés hídrico ($\leq -1,5$ y $\geq 1,5$ Log₂FC; $p \leq 0,05$). Los cuadrados verdes, amarillos y rojos señalan fitohormonas, FTs y procesos biológicos, respectivamente. Cada círculo representa un GED asociado con respuesta a estímulo externo, fitohormonas, FTs y procesos. Antocian.= Antocianinas; Dihidroflavon. = Dihidroflavonoides; Met. = Metabolismo; Hom.= Homeostasis.

Estos resultados ponen de manifiesto que el uso de portainjertos tolerantes o sensibles a sequía puede alterar la expresión génica de la respuesta a estrés hídrico de las acículas de púas sensibles (Gal 1056) y tolerantes (Oria 6). En análisis comparativo de las púas injertadas sobre portainjertos tolerantes, Gal 1056 / R18T y Oria 6 / R18T, se observó una sobreexpresión de GEDs asociados con el metabolismo secundario, y más concretamente con la biosíntesis de flavonoides. En plantas injertadas sobre portainjertos sensibles se detectó un enriquecimiento de GEDs asociados con el transporte de solutos en Gal 1056 / R1S, y con la organización de la pared celular en Oria 6 / R1S. Estas variaciones sugieren que los portainjertos sensibles y tolerantes a sequía difieren en el efecto sobre la funcionalidad de las púas Gal 1056 y Oria 6, en respuesta a déficit hídrico.

Por otro lado, la comparación entre los dos tipos de púas injertadas sobre portainjertos sensibles (Gal 1056 / R1S vs Oria 6 / R1S) o tolerantes a sequía (Gal 1056 / R18T vs Oria 6 / R18T), sometidos a déficit hídrico, también proporcionó información sobre procesos, rutas y genes enriquecidos diferencialmente en acículas de púas de Gal 1056 y

Oria 6, mostrando patrones de expresión afectados por el genotipo del portainjerto (Figura 6.4). Se detectó un número similar de GEDs en ambas comparativas, con un enriquecimiento algo mayor en las acículas de los injertos del progenitor sensible, Gal 1056 / R1S y Gal 1056 / R18T.

El análisis de enriquecimiento funcional llevado a cabo en la comparativa de las acículas de las púas injertadas sobre portainjertos sensibles permitió identificar, en ambos progenitores, GEDs implicados en el transporte de solutos y biosíntesis de ARN. Además, en Gal 1056 / R1S se encontraban sobreexpresados numerosos genes implicados en metabolismo secundario y organización de la pared celular. Las acículas de Oria 6 / R1S mostraban enriquecimiento en GEDs sobreexpresados asociados con homeostasis de proteínas (Figura 4.17b). El análisis de las púas injertadas sobre portainjertos tolerantes también permitió identificar enriquecimiento de GEDs asociados con transporte de solutos y biosíntesis de ARN, no sólo en Gal 1056 sino también en Oria 6. Además, en Gal 1056 / R18T se detectaron GEDs sobreexpresados implicados en organización de la pared celular, mientras que en Oria 6 / R18T lo estaban en metabolismo secundario y homeostasis de proteínas (Figura 4.17c).

Entre los GEDs asociados a biosíntesis de ARN en Gal 1056 / R1S vs Oria 6 / R1S, se detectaron FTs sobreexpresados en ambos genotipos, como AS2/LOB, C2H2-ZF, DREB, NAC, MADS/AGL y WRKY, ya descritos previamente. Por otro lado, se detectaron GEDs sobreexpresados en injertos Oria 6 / R1S que codifican FTs GARP, mTERF, TCP y ULT; mientras que en Gal 1056 / R1S se identificó sobreexpresión de GEDs AP2/ERF, bHLH, ERF, MYB, NF-YA, NF-YB, TIFY y WOX. El papel de mTERF, AP2/ERF, bHLH, ERF, TIFY, NF-YA y MYB en la modulación de los mecanismos de respuesta a sequía, ya se ha revisado previamente (Bole, 2004; Joshi *et al.*, 2016; Quesada, 2016; Zanetti *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2019; An *et al.*, 2020). GARP, junto con MYB, participan en mecanismos de tolerancia a estrés abiótico mediante la acumulación de osmoprotectores en plantas leñosas (Sun *et al.*, 2018). TCP está implicado en respuestas a estrés abiótico, respuestas a fitohormonas y regulación del crecimiento y desarrollo (Ling *et al.*, 2020). Los factores ricos en cisteína ULTRAPETALA, ULT, participan en el control del desarrollo, regulación de la organización de la cromatina, modulación mediada por fitohormonas, principalmente auxina, metiljasmonato y SA, y metabolismo de carotenoides (Ashraf *et al.*, 2015). Ya se ha descrito el papel de los factores heterotriméricos NF-Y en respuesta de la planta a cambios en el ambiente. Entre otros, se ha descrito la participación de las subunidades NF-YB en el desarrollo de las raíces primarias y laterales y en la respuesta a la limitación de agua y nutrientes (Zanetti *et al.*, 2017). Finalmente, los factores WOX, *WUSCHEL-related homeobox*, están implicados en procesos de desarrollo, crecimiento y respuesta a estrés abiótico (Wang *et al.*, 2018). Estos resultados sugieren un efecto del genotipo de la púa injertada en portainjertos sensibles, R1S, en injertos sometidos a estrés hídrico que afectan la expresión de FTs relacionados con desarrollo, crecimiento y respuesta a estreses abióticos, y en particular a sequía. Esta influencia parece ser mayor en el caso del análisis de las acículas de las púas del progenitor sensible a sequía, Gal 1056.

El análisis funcional de la comparativa Gal 1056 / R18T vs Oria 6 / R18T, reveló GEDs asociados a la biosíntesis de ARN que codifican los TFs AS2/LOB, C2H2-ZF, ERF, GRAS, WRKY y NAC en ambos genotipos; mientras que GEDs DOF, DREB, GATA, HD-ZIP I/II, TCP y una RNA polimerasa I-V estaban sobreexpresados en Gal 1056 / R18T, frente a BBX-CO, bHLH, TIFY, MADS/AGL, MYB y mTERF sobreexpresados en Oria / R18T. Además de los FT previamente descritos, las proteínas BBX son FTs clave en las redes de regulación que controlan procesos de crecimiento y desarrollo que incluyen fotomorfogénesis, regulación fotoperiódica de la floración y respuesta estrés biótico y abiótico (Gangappa y Botto, 2014). Los FT HD-ZIP, *Homeodomain Leucine Zipper*, promueven la tolerancia a sequía induciendo la acumulación de ABA, el cierre estomático y la detoxificación de ROS (Yao *et al.*, 2021). Estos resultados sugieren, de nuevo, un efecto del genotipo de la púa injertada, en este caso, en portainjertos tolerantes, R18T, sometidos a estrés hídrico, en el control de la expresión de FTs que están implicados en la respuesta a sequía. Cabe destacar la sobreexpresión de genes que codifican para los factores GRAS, DREB y NAC, cuyo papel en respuesta a estrés hídrico ya ha sido descrita en coníferas (Abarca *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2021; Pascual *et al.*, 2015).

Entre los GEDs asociados con metabolismo secundario, se observó un enriquecimiento de genes implicados en la biosíntesis de flavonoles en ambos progenitores en la comparativa Gal 1056 / R1S vs Oria 6 / R1S, mientras que el resto de genes asociados con la biosíntesis de flavonoides, y principalmente de antocianinas, chalconas y dihidroflavonoides, así como de otros metabolitos secundarios como terpenos y p-coumaroil-CoA, estaban únicamente sobreexpresados en el genotipo sensible, Gal 1056 / R1S. Sin embargo, en la comparativa Gal 1056 / R18T vs Oria 6 / R18T, sólo se detectaron GEDs implicados en la biosíntesis de p-coumaroil-CoA en Gal 1056 / R18T, mientras que en Oria 6 / R18T se detectaron genes asociados a la biosíntesis de flavonoides, principalmente de antocianinas, y de terpenos. Los mayores cambios en los patrones transcriptómicos de genes asociados a metabolismo secundario se observaron en plantas Gal 1056 / R1S y Oria 6 / R18T, resultados similares a los observados previamente al analizar el efecto del portainjerto en las comparativas Gal 1056 / R1S vs Gal 1056 / R18T y Oria 6 / R1S vs Oria 6 / R18T. Este resultado parece indicar una mayor activación de estas vías en injertos que combinan genotipos con un mismo tipo de respuesta a sequía, es decir, púas sensibles, Gal 1056, injertadas sobre portainjertos sensibles, R1S, y púas tolerantes, Oria 6, injertadas sobre portainjertos tolerantes, R18T.

Asimismo, se identificó un número relevante de GEDs implicados en la biosíntesis, percepción y traducción de señales de diferentes fitohormonas, ABA, auxinas, giberelinas, brasinoesteroides, etileno, JA y péptidos señalizadores, que mostraban pequeñas variaciones en los perfiles de expresión en ambas comparativas. El análisis de plantas Gal 1056 / R1S vs Oria 6 / R1S mostró un mayor número de GEDs sobreexpresados, principalmente asociados con la biosíntesis de ABA y giberelinas, y con la señalización mediada por brasinosteroides en Gal 1056 / R1S. También los injertos Gal 1056 / R1S mostraron un enriquecimiento en GEDs sobreexpresados asociados principalmente con proteínas neoxantinas implicadas en la biosíntesis de ABA bajo condiciones de estrés hídrico (Daszkowska-Golec y Szarejko, 2013), también con proteínas TTL, *Tetratricopeptide Thioredoxin-Like*, que funcionan como proteínas de andamiaje al reunir componentes de señalización de BR de la membrana plasmática

y del citoplasma (Amorim-Silva et al., 2019); y con ácido ent-kaurenoico oxidasa (KAO), una clase de citocromo P450 monooxigenasa que cataliza la conversión del ácido ent-kaurenoico (KA) en giberelina (GA), desempeñando un papel importante en la determinación de la concentración de GA durante el desarrollo (Regnault et al., 2014). Por otro lado, en los injertos Oria 6 / R1S se identificaron GEDs sobreexpresados asociados con la biosíntesis de JA y a la percepción y transducción de señales mediadas por etileno, giberelinas y péptidos de señalización. Se observó un notable efecto del portainjerto en Oria 6 / R1S, principalmente asociado con genes que codifican proteínas traductoras de señales EIN3, una familia de FTs que regulan la expresión de genes sensibles a etileno que interactúan con miembros de las familias AP2/ERF, WRKY y NAC en respuesta a diversos estreses abióticos (Dolgikh et al., 2019). También se observó en estos injertos un enriquecimiento de GEDs que codifican péptidos de señalización GASA, ricos en cisteína, implicados en respuesta a estrés.

El análisis funcional de la comparativa Gal 1056 / R18T vs Oria 6 / R18T reveló un enriquecimiento de GEDs en ambos tipos de injerto. Así, en Gal 1056 / R18T se identificaron GEDs que codifican la enzima YUCCA, una flavina monooxigenasa (FMO) que cataliza la hidroxilación del grupo amino de la triptamina durante la biosíntesis de auxinas (Kendrew, 2001); y genes que codifican acyl-CoA thioesterasas implicadas en la biosíntesis del JA (Li et al., 2005). Mientras, en los injertos Oria 6 / R18T se observó un enriquecimiento de GEDs asociados con proteínas oxofitodienoato reductasa (OPR), un enzima clave en la biosíntesis del JA que participa en la respuesta a diversos estreses (Xin et al., 2017); con factores implicados en señalización mediada por brasinosteroides, como receptores quinasa BAK (Jia et al., 2002) y con proteínas BES/BZR, *BRI1-EMS suppressor/brassinazole-resistant* (Cui et al., 2019) implicadas en respuesta a estrés hídrico.

El transcriptoma de otros procesos también varió según el injerto analizado. En la comparativa Gal 1056 / R1S vs Oria 6 / R1S se identificó un gran número de GEDs asociados con la organización de la pared celular, con un enriquecimiento muy acusado de genes en plantas Gal 1056 / R1S. En las acículas de este injerto se detectaron GEDs que codifican expansinas, proteínas de la pared celular que permiten el deslizamiento local de polímeros reduciendo la adhesión entre los polisacáridos adyacentes a la pared, participando en múltiples procesos de desarrollo al desempeñar un papel fundamental en la remodelación de la pared celular tras la citocinesis, (Marowa et al., 2016); AGP β -1,3-galactosiltransferasa (AGP) (Amos y Mohnen, 2019); proteínas reguladoras COB implicadas en la biosíntesis de celulosa y la remodelación de la pared celular (Li et al., 2019a); proteínas del complejo ECERIFERUM1 y 3 (CER1/CER3) implicadas en la biosíntesis de ceras cuticulares mediante la conversión de acil-Coenzima A a alcanos, con una estricta especificidad de sustrato para los compuestos que contienen más de 29 carbonos (Pascal et al., 2019); galacturonosiltransferasas y xilosiltransferasas (IRX14), implicadas en la biosíntesis de hemicelulosa (Pauly et al., 2013); caffeoyl-CoA 3-O-metiltransferasas (CCoA-OMT) implicados en la biosíntesis de lignina mediante la formación de las subunidades totales de guayacol y de siringil (Guo et al., 2001); y proteínas implicadas en la modificación de pectinas como pectato liasas y poligalacturonasas, que participan activamente en desarrollo, crecimiento y protección frente a diversos estreses (Xiao et al., 2014; Uluisika y Seymour, 2020). En la comparativa entre púas, Gal 1056 vs Oria 6, injertadas sobre portainjertos tolerantes,

R18T, se detectaron GEDs implicados en la organización de la pared celular en ambos genotipos, con una mayor acumulación de genes en plantas Gal 1056 / R18T. En estas plantas también se detectaron genes que codifican proteínas AGP, así como genes implicados en la modificación y degradación de pectinas como pectato liasas, poligalacturonasas y β -D-xilosidasa (BXL); en la biosíntesis de ligninas como cafeoil-CoA 3-O-metiltransferasas; en la biosíntesis de cutinas como lisofosfolipasas (BDG), implicadas además en diversos mecanismos de respuesta a estrés (Miao *et al.*, 2019); en el metabolismo de celulosas y hemicelulosas como celulosas sintetasas y endo- β -1,4-mananasas. En plantas Oria 6 / R18T se detectaron GEDs que estaban principalmente asociados con la degradación y modificación de pectinas y a la biosíntesis de cutinas. Estos resultados, junto con los descritos en las comparativas previas entre injertos sometidos a déficit hídrico, ponen en manifiesto la influencia de la púa Gal 1056 en la expresión de genes relacionados con la modificación, organización y remodelación de las paredes celulares, siendo el efecto mayor en púas injertadas sobre portainjertos sensibles, R1S.

El estudio comparativo también permitió detectar un enriquecimiento funcional de genes implicados en procesos de reorganización de la cromatina en Gal 1056 / R1S, con GEDs que codifican proteínas H2A, H3 y H4, asociadas con la modificación de la cromatina en procesos de desarrollo y respuesta a estrés, como por ejemplo estrés osmótico (Sura *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2012; Xin *et al.*, 2020). Además, en este tipo de injerto se detectaron GEDs implicados en el metabolismo de coenzimas, con genes asociados con la biosíntesis de pantotenato a partir de β -alaninas, como la pantoato: β -alanina ligasa, que participa en mecanismos de protección contra temperaturas extremas, hipoxia, sequía y algunos estreses bióticos (Parthasarathy *et al.*, 2019); con la biosíntesis del cluster FeS, a través del sistema de ensamblaje citosólico de grupos de hierro y azufre (CIA), fundamentales en procesos de desarrollo (Sharma *et al.*, 2010; Balk y Pilon, 2011); y con la biosíntesis de NAD/NADP a través de NAD quinasas y adenililtransferasas, que intervienen en desarrollo y tolerancia a estrés (Hashida *et al.*, 2009). También se detectaron GEDs que codifican S-adenosil metionina sintetasas implicadas en el ciclo de la S-adenosil metionina (SAM) que interviene en la respuesta frente a estrés biótico y abiótico (Mäkinen y De, 2019); p-coumarato: CoA ligasas implicadas en la biosíntesis de prenilquinonas, que participan en la biosíntesis de metabolitos secundarios como monolignoles y flavonoides en coníferas (Wagner *et al.*, 2013); nudux hidrolasas implicadas en la biosíntesis del tetrahidrofolato (Kraszewska, 2008); y la proteína Thi4 implicada en la biosíntesis de tiazoles (Sun *et al.*, 2019).

En cuanto a los GEDs asociados a respuesta a estímulo externo, al analizar ambas comparativas se observó un enriquecimiento de genes en plantas Oria 6 injertadas sobre portainjertos sensibles y tolerantes, siendo en plantas Oria 6 / R1S donde se detectaron los mayores niveles de expresión. Entre los GEDs identificados la mayoría codifican proteínas receptoras ricas en repeticiones de leucina, NLR, implicadas en procesos de respuesta a estrés abiótico mediante la inducción de resistencia (Ngou *et al.*, 2020). También cabe destacar el enriquecimiento de GEDs asociados con respiración celular en muestras Gal 1056 / R18T, con genes implicados en fosforilación oxidativa que codifican proteínas de los complejos ATP sintasa, citocromo c oxidasa y citocromo c reductasa, y en el ciclo de ácidos tricarbónicos, con proteínas asociadas principalmente al complejo succinato deshidrogenasa. Estos resultados coinciden con los descritos

previamente en muestras control, que también revelaron un enriquecimiento de GEDs sobreexpresados asociados con respiración celular en muestras Gal 1056 / R18T, que parece sugerir el marcado efecto de este proceso en en estos injertos con independencia del tratamiento hídrico al que han sido sometidos.

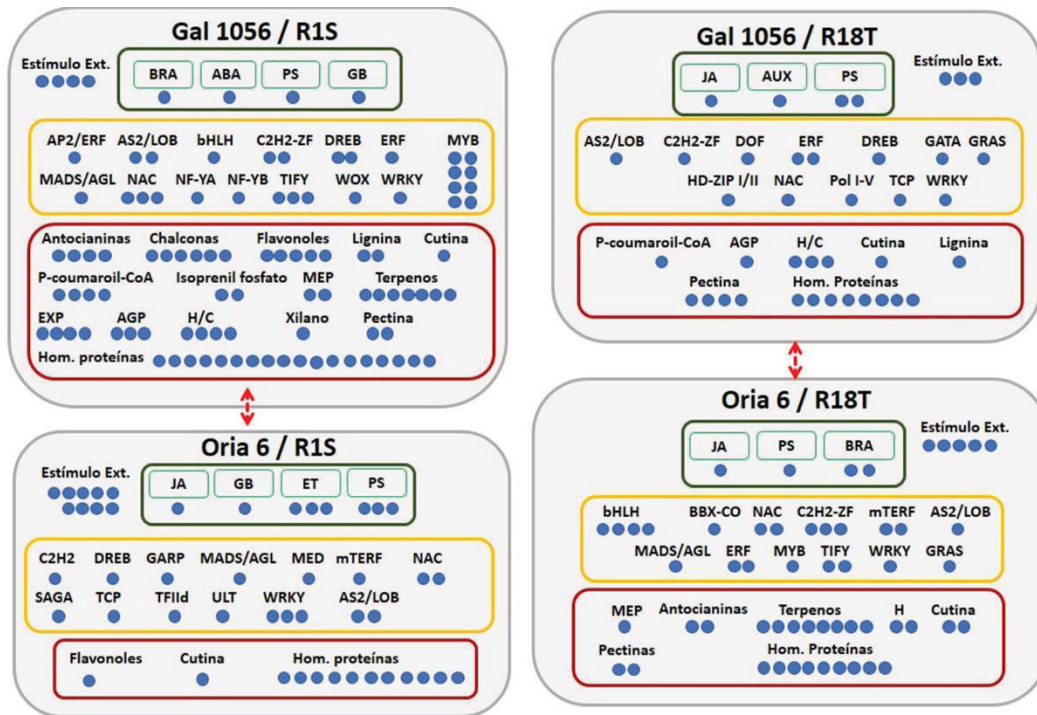


Figura 6.4. Modelo esquemático de los perfiles de expresión diferencial observado al comparar los transcriptomas de las acículas de las púas de Gal 1056 / R1S vs Oria 6 / R1S y de Gal 1056 / R18T vs Oria 6 / R18T sometidas a estrés hídrico ($\leq -1,5$ y $\geq 1,5$ Log₂FC; $p \leq 0,05$). Los cuadrados verdes, amarillos y rojos señalan fitohormonas, FTs y procesos biológicos. Cada círculo representa un GED asociado con respuesta a estímulo externo, fitohormonas, FTs y procesos.

Por último, se observó enriquecimiento de GEDs implicados en el transporte de solutos en los cuatro injertos, aunque de manera más significativa en plantas Gal 1056, y principalmente en Gal 1056 / R1S. En todos los injertos se identificaron genes sobreexpresados que codifican proteínas transportadoras de ABA, NRT1/PTR (Jarzyniak y Jasiński, 2014), proteínas UmamiT y ZIP (Besnard *et al.*, 2021; Tiong *et al.*, 2015), y proteínas SWEET, *Sugars Will Eventually be Exported Transporters*, que median la translocación de azúcares a través de la membrana celular, y participan en respuesta a diversos estreses (Jeena *et al.*, 2019). También se observó un enriquecimiento de GEDs asociados principalmente con organización de la pared celular, modificación de la cromatina, y transporte de solutos en púas Gal 1056 y con respuesta a estímulo externo en púas de Oria 6, con independencia del portainjerto sobre el que estaban injertadas.

En un tercer análisis, y con el fin de determinar cómo afectaba el régimen hídrico al perfil transcriptómico en cada uno de los genotipos analizados, se llevó a cabo el estudio comparativo de los perfiles transcriptómicos de de injertos control frente a los mismos injertos sometidos a estrés hídrico. El análisis de enriquecimiento funcional reveló que las mayores diferencias se detectaban en los genotipos Gal 1056 / R18T y Oria 6 / R18T, enriquecidos en GEDs implicados en la acción de fitohormonas, homeostasis de proteínas, transporte de solutos, biosíntesis de ARN, y metabolismo secundario. Además, en Gal 1056 / R18T se detectó un enriquecimiento de GEDs asociados con homeostasis REDOX y con metabolismo de carbohidratos, mientras que en Oria 6 / R18T se observó un enriquecimiento de GEDs implicados en metabolismo de aminoácidos, organización de la pared celular y respuesta a estímulo externo. Aunque con un menor número de GEDs, en Gal 1056 / R1S se observó enriquecimiento de GEDs asociados con la acción de fitohormonas, transporte de solutos y homeostasis de proteínas, mientras que la biosíntesis de ARN fue el proceso biológico con mayor enriquecimiento de GEDs en Oria 6 / R1S.

Entre los GEDs asociados con la acción de fitohormonas, en Gal 1056 / R1S se detectaron genes que codifican el componente PYR/PYL del receptor de ABA; también citoquininas deshidrogenasas, implicadas en la conjugación y degradación de citoquinas; proteínas de respuesta a etileno, EIN3; y proteínas implicadas en la modificación, degradación y señalización mediada por giberelinas, como giberelinas oxidasas. En Gal 1056 / R18T se observó un enriquecimiento de GEDs asociados con la acción de fitohormonas en plantas sometidas a déficit hídrico, implicados principalmente en la señalización mediada por ABA, brasinosteroides, citoquinas, etileno y péptidos de señalización que, como se ha descrito previamente, participan en la regulación de la respuesta a estrés abiótico. En Oria 6 / R1S se identificó un único GED asociado con la acción de fitohormonas en injertos control, que codifica una hormona peptídica de señalización, NCRP, implicada en desarrollo, mantenimiento de meristemas, desarrollo vascular, germinación y control del crecimiento en respuesta a señales ambientales (Hirakawa *et al.*, 2019). Por el contrario, en Oria 6 / R18T se observó un enriquecimiento de GEDs en injertos sometidos a sequía, que codifican proteínas implicadas en la biosíntesis de auxinas, como triptofano aminotransferasa; así como en la conjugación y degradación de citoquinas, como citoquina deshidrogenasa; y péptidos de señalización ricos en cisteínas de tipos GASA y RALF. Estos resultados sugieren que el genotipo del portainjerto modula los mecanismos de respuesta a déficit hídrico mediados por fitohormonas.

Un estudio más detallado de los GEDs implicados en el transporte de solutos reveló que las diferencias más significativas se observaron en Gal 1056 / R1S, con una acumulación mayor de genes en injertos control, que codifican, entre otros, proteínas NRT1/ PTR, SWEET, y ZIP. Cabe destacar que, en todas las púas injertadas sobre portainjertos tolerantes, R18T, se identificaron proteínas transportadoras UmamiT, que, como se ha descrito previamente, participan en respuesta a estrés abiótico a través de rutas dependientes de AS (Besnard *et al.*, 2021). En cuanto a los GEDs asociados con la homeostasis de proteínas, se detectaron enriquecidos principalmente en injertos Gal 1056 / R1S y Gal 1056 / R18T sometidos a sequía, y en injertos Oria 6 / R1S y Oria 6 /

R18T control, con genes que codifican proteínas implicadas en autofagia, chaperonas, peptidasas y componentes del complejo ubiquitin-proteosoma. Estos resultados sugieren que el genotipo de la púa tiene una gran influencia en los mecanismos homeostáticos implicados en respuesta a sequía del injerto.

El análisis comparativo de los perfiles transcriptómicos asociado a FTs reveló un enriquecimiento en púas injertadas sobre portainjertos sensibles sometidos a sequía, mientras que la mayoría de los GEDs observados en púas injertadas sobre portainjertos tolerantes se detectaban en condiciones control. Estos resultados pasugieren un efecto del portainjerto tolerante en la inducción de la expresión de FTs implicados en respuesta a estrés hídrico en acículas de púas Gal 1056 y Oria 6 en condiciones control, resultado que coincide con la hipótesis establecida a partir de los resultados del capítulo anterior, que podría sugerir que los portainjertos tolerantes modularían la expresión de genes que codifican FTs “preadaptando” las púas injertadas sobre ellos a eventos de estrés hídrico. En Gal 1056 / R1S se detectaron GEDs que codifican bHLH, bZIP, C2H2-ZF, ERF, DREB, WRKY, mTERF, BBX-DBB y GRF-GIF en injertos sometidos a sequía; mientras que en injertos control codifican MYB, NF-YC, C3H-ZF y NAC. En plantas Gal 1056 / R18T se detectaron DREB, ERF, MYB y NAC en ambos regímenes hídricos, mientras que en injertos control se detectaron también otra plétora de FTs como bHLH, bZIP, C2H2-ZF, DOF, HSF, TCP, GRF-GIF, HD-ZIP I/II y RAV, todos ellos descritos como FT implicados en respuesta estrés. En injertos Oria 6 / R1S se detectaron BBX-CO, JUMONJI, MADS/AGL y WRKY en condiciones control, mientras que bHLH, GRAS, HSF, mTERF, MYB, NAC, TIFY, YABBY y zf-HD en injertos sometidos a sequía. Por último, en plantas Oria 6 / R18T se detectaron factores NAC, MYB, WRKY tanto en condiciones control como sometidas a sequía, mientras que en plantas control se identificaron adicionalmente factores AS2/LOB, TIFY, ULT, ERF, DREB, AP2/RAV, BBX-ZP I/II y BBX-DBB. Los FTs JUMONJI participan en regulación de la expresión génica, mediante la modulación de procesos de reprogramación y control epigenético (Chen *et al.*, 2011).

También se detectó expresión diferencial de genes implicados en organización de la pared celular entre injertos sometidos a ambos tratamientos hídricos, más enriquecidos en plantas Oria 6 / R18T, y en todos los casos, con un mayor número de GEDs en plantas sometidas a estrés hídrico. En el caso de plantas Gal 1056 / R1S sometidas a sequía se identificaron GEDs que codifican proteínas del complejo CER1-CER3, que como ya se ha descrito, participan en procesos de formación de cutinas; proteínas expansinas; una proteína implicada en la exportación de esporopolenina, componente de la pared exterior de esporas y granos de polen, que participa en procesos de protección frente a múltiples agresiones ambientales (Li *et al.*, 2019); y proteínas BXL y CFL, implicadas en el metabolismo de cutinas, en plantas control. En plantas Gal 1056 / R18T, la mayoría de GEDs detectados, tanto en condiciones control como en injertos sometidos a déficit hídrico, estaban relacionados con el metabolismo de pectinas; y con la proteína de la pared celular AGP en injertos sometidos a sequía. En Oria 6 / R1S, se detectaron GEDs que codifican proteínas D-arabinosa-5-fosfato isomerasa implicadas en la biosíntesis de pectinas (Harholt *et al.*, 2010); proteínas AGP; y proteínas glucuronoxilano 4-O-metiltransferasa implicadas en el metabolismo de hemicelulosas en los injertos sometidos a sequía, mientras que codifican proteínas pectato liasas implicadas en la modificación y degradación de pectinas en plantas control. Finalmente,

en Oria 6 / R18T los GEDs identificados en injertos sometidos a sequía estaban implicados en la biosíntesis de lignina, como las proteínas CCoA-OMT; en la modificación y degradación de pectinas, como pectato liasas y pectinas metilesterasas; y proteínas implicadas en el metabolismo de celulosas y hemicelulosas, como proteínas del complejo celulosa sintasa y galacturonosiltransferasas; mientras que en injertos control estaban implicados, principalmente, en la modificación y degradación de hemicelulosas, como las proteínas O-acetiltransferasas y expansinas.

Asimismo, se detectó un enriquecimiento de GEDs implicados en metabolismo primario en púas injertadas sobre portainjertos tolerantes, en plantas Gal 1056 / R18T control y Oria 6 / R18T sometidas a sequía, con genes asociados con el metabolismo de carbohidratos y aminoácidos, respectivamente. En plantas Gal 1056 / R18T control, se observó un enriquecimiento de GEDs principalmente asociados con el metabolismo de oligosacáridos, como la galactinol sintasa; con la fermentación alcohólica, como la alcohol deshidrogenasa; y con el metabolismo del almidón, como reguladores diquinasa ESV1. Distintos estudios han mostrado que los niveles de carbohidratos como la glucosa, fructosa y oligosacáridos de la familia de la rafinosa aumentan en plantas sometidas a condiciones de deshidratación (Fàbregas y Fernie, 2019), y que la proteína galactinol sintasa juega un papel fundamental en la acumulación de osmoprotectores como el galactinol y la rafinosa en condiciones de estrés abiótico induciendo tolerancia a sequía (Taji *et al.*, 2002). También se ha demostrado el papel que juega la alcohol deshidrogenasa en resistencia frente a diversos estreses abióticos y bióticos mediante el aumento de la sensibilidad a ABA (Shi *et al.*, 2017). Asimismo, el metabolismo del almidón se ve alterado en respuesta al estrés abiótico, participando en procesos de control estomático mediante la regulación del intercambio de agua y CO₂ con el ambiente (Thalman y Santelia, 2017). Estos resultados apoyan la hipótesis de que portainjertos tolerantes podrían inducir un estado de preadaptación a sequía en púas Gal 1056. En plantas Oria 6 / R18T sometidas a sequía, se detectaron GEDs implicados en el metabolismo de aminoácidos, principalmente asociados a procesos de biosíntesis de metioninas, histidinas, isoleucinas, fenilalanina y tirosinas, y en la degradación de aminoácidos aromáticos. Diversos análisis metabólicos han revelado que en plantas sometidas a sequía se producen variaciones significativas en los niveles de aminoácidos y azúcares solubles para contribuir a la disminución del potencial osmótico (Aranjuelo *et al.*, 2011).

En plantas Oria 6 / R18T sometidas a sequía, se observó una acumulación de GEDs asociados con el metabolismo de poliaminas, implicados en la biosíntesis de espermidina y putrescina, que codifican S-adenosil metionina descarboxilasa y ornitina descarboxilasa, respectivamente. Como ya se ha descrito previamente, las poliaminas participan en la respuesta a múltiples estreses abióticos y bióticos (Xu *et al.*, 2014c; Mustafavi *et al.*, 2018), y se acumulan en condiciones de déficit hídrico como consecuencia del aumento de los niveles de ABA endógeno (Alcázar *et al.*, 2010). También en injertos Gal 1056 / R18T y Oria 6 / R18T, se identificó un incremento de GEDs asociados con la respuesta a estímulo externo, principalmente asociados con respuesta a patógenos, tanto en plantas control como en injertos sometidos a déficit hídrico, que fue mayor en plantas Oria 6 / R18T sometidas a sequía. En Gal 1056 / R18T se detectó un incremento de GEDs que codifican defensinas y componentes EDS1 en plantas sometidas a sequía, así como de proteínas receptoras NLR y un

componente del complejo proteico G heterotrimérico no canónico, AGG1/AGG2, en injertos control. En el caso de Oria 6 / R18T, se identificaron GEDs que codifican defensinas, proteínas FMO1 implicadas en mecanismos de respuesta SAR, NLR y receptores quinasa NLR en plantas sometidas a sequía; mientras que PAD4 y NLR, y GIGANTEA, una proteína de respuesta a estímulo luminoso, en plantas control. Recientemente, se ha demostrado que las proteínas PAD4 y EDS1 están implicadas en la respuesta a la sequía en plantas superiores, así como en la producción de biomasa, desarrollo vegetativo y organización de las paredes celulares (Szechyńska-Hebda *et al.*, 2016), entre otros, mediante la regulación de la hormona endógena SA y especies ROS como H₂O₂ (Bernacki *et al.*, 2019). Las proteínas NLR participan en los mecanismos de respuesta y defensa a un amplio repertorio de patógenos (Li *et al.*, 2015). GIGANTEA regula diversos procesos fisiológicos y de desarrollo, como floración fotoperiódica y respuesta a estrés abiótico (Krahmer *et al.*, 2015); mientras que las proteínas quinasa similares a los receptores ricos en leucina, NLR, son receptores inmunitarios que participan en la inducción de inmunidad basal (PTI) en respuesta a diversos estreses (Mendy *et al.*, 2017). Las proteínas FMO1 participan en la resistencia sistémica adquirida a patógenos invasivos virulentos y en respuesta a estrés abiótico (Czarnocka *et al.*, 2020). Finalmente, la subunidad γ de las proteínas G heterotriméricas está implicada en la respuesta a diversos cambios ambientales bióticos y abióticos (Trusov *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2016).

El análisis de los patrones de expresión génica asociados con metabolismo secundario, reveló GEDs en plantas Gal 1056 / R18T y Oria 6 / R18T. En plantas Gal 1056 / R18T sometidas a sequía, se detectaron GEDs que codifican γ -glutamyl-peptidasas implicadas en el metabolismo de glucosinolatos, así como una neoxantin sintasa implicada en la biosíntesis de carotenoides. Por otro lado, en plantas control se identificaron GEDs que codifican proteínas implicadas en la biosíntesis de flavonoides, como chalcona sintasas, antocianina sintasas y flavonona 3-hidrolasas; así como en la biosíntesis de mono, sesqui y diterpenos. En Oria 6 / R18T únicamente se detectaron GEDs en plantas sometidas a sequía, implicados principalmente en la biosíntesis de glucosinolatos, con γ -glutamyl-peptidasas, proteínas isoprenil difosfato sintasa, y un regulador proteolítico de la fenilalanina-amonio liasa (KFB-PAL) implicado en la biosíntesis de p-coumaroil-CoA. El papel que juegan estos metabolitos secundarios en la respuesta a sequía, modulación estomática e inducción de tolerancia se ha descrito previamente (Dao *et al.*, 2011; Gill y Tuteja, 2010; Martínez-Ballesta *et al.*, 2013; Kleiber *et al.*, 2017). Estos resultados sugieren que el genotipo del portainjerto es determinante en la modulación de los mecanismos de respuesta desencadenados en las acículas de las púas injertadas en respuesta a déficit hídrico, y aporta luz sobre rutas y genes implicados.

Por último, se llevó a cabo el estudio de los mecanismos de respuesta constitutiva, mediante el análisis funcional de aquellos genes que no mostraban diferencias de expresión significativas al comparar los distintos regímenes hídricos de cada tipo de injerto, de forma independiente, pero si lo hacían al comparar los patrones de expresión de acículas de las púas injertadas entre injertos, bien en condiciones control o bien sometidas a déficit hídrico. El análisis de ontología reveló diferencias entre los genes constitutivos enriquecidos en cada genotipo (Figura 4.29), con un enriquecimiento de genes asociados a las categorías transporte de solutos, biosíntesis de ARN, metabolismo

secundario, organización de la pared celular, respiración celular, homeostasis de proteínas, modificación de proteínas y respuesta a estímulo externo.

Entre los genes que codifican FTs, destacaba el enriquecimiento observado en los injertos de las púas de ambos progenitores sobre portainjertos tolerantes. En Gal 1056 / R18T se identificaron GEDs que codifican FTs, DREB, ERF, DOF, GATA, HD-ZIP I/II, AS2/ LOB, C2H2-ZF, GRAS, NAC y WRKY, mientras que en Oria 6 / R18T se detectaron genes expresados constitutivamente que codifican ERF, bZIP, BBX-CO, zf-HD, GARP, MYB, bHLH, GRAS, NAC y TUB. Cabe destacar la presencia de genes GRAS, DREB, ERF, bZIP NAC y WRKY sobreexpresados constitutivamente. Los GRAS están implicados en múltiples procesos de crecimiento y desarrollo vegetal, como transducción de señales mediadas por giberelinas (Ikeda *et al.*, 2001) y mantenimiento de meristemas y de la estructura radicular (Helariutta *et al.*, 2000; Stuurman *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003), y desarrolla un papel fundamental en respuesta a sequía, regulando positivamente la tolerancia a déficit hídrico (Li *et al.*, 2018). Asimismo, bZIP, MYB, NAC, ERF, WRKY y DREB están implicado en la mejora de tolerancia a sequía de plantas (Gahlaut *et al.*, 2016). Estos resultados coinciden con los descritos en el primer apartado de este estudio, que indicaría que los portainjertos tolerantes desencadenaban mecanismos de respuesta a sequía en las púas injertadas, incluso antes de ser sometidas al tratamiento de déficit hídrico, sugiriendo que los portainjertos R18T tienen un efecto modulador de en la respuesta constitutiva de tolerancia a sequía en dichas acículas.

El análisis de genes implicados en la organización de la pared celular, reveló que el mayor enriquecimiento en genes expresados constitutivamente se detectaba en acículas de púas de Gal 1056 injertadas sobre ambos portainjertos, y más acusadamente en Gal 1056 / R1S. En estos injertos se identificaron genes implicados en el mantenimiento de la pared celular como expansinas y proteínas AGP, en el ensamblaje de celulosas y hemicelulosas, en la biosíntesis de xilanos y ligninas, y en la modificación y degradación de pectinas. El mismo patrón se observó al analizar los genes expresados constitutivamente que participan en el metabolismo de compuestos secundarios y transporte de solutos, con un enriquecimiento de genes en Gal 1056 / R1S. En estas plantas se identificó enriquecimiento de genes asociados con la biosíntesis de múltiples metabolitos secundarios como flavonoides, dihidroflavonoides, p-coumaroil-CoA, isoprenil difosfatos y terpenos, así como genes implicados en las rutas MEP de síntesis de isoprenoides; y de transportadores de solutos como proteínas AAP, ProT, LAT, BOR, KEA, PUP, UmamiT, Fabaceae-N70, NRT1/PTR, PHT1, UNE2, ERD6, PLT, DTX, OPT, KT, SWEET y ZIP, los canales FEZ, NIP, PIP, TIP, y la superfamilia de proteínas ABCG.

El análisis de los genes asociados con respiración celular reveló un mayor número de genes expresados constitutivamente en Gal 1056 / R18T que codifican componentes de los complejos ATP sintasa, citocromo c reductasa y NADH deshidrogenasa, así como integrantes del ciclo de ácidos tricarbónicos. Diversos estudios destacan el papel de la respiración celular en mitocondrias en la supervivencia y la rápida recuperación de la productividad en condiciones de estrés hídrico (Atkin y Macherel, 2009). Por otro lado, se identificaron genes relacionados con respuesta a estímulo externo en plantas Oria 6 / R1S, entre los que se encontraban EDS1, PAD4 y NL5, implicados en la respuesta a

patógenos. En Oria 6 / R18T se detectaron genes expresados constitutivamente implicados, principalmente, en respuesta a patógenos y en menor medida en estímulo luminoso.

Estos resultados parecen sugerir la existencia de un efecto del genotipo del portainjerto también en la respuesta constitutiva de acículas de plantas injertadas de *Pinus pinaster*. En plantas Gal 1056 / R1S se detectaron genes principalmente implicados en desarrollo y crecimiento, regulando procesos relacionados con organización de la pared celular y transporte de solutos. Por el contrario, las púas injertadas sobre portainjertos tolerantes mostraron una plétora de genes expresados constitutivamente en respuesta al estrés hídrico, muchos de ellos relacionados con respuesta a sequía, entre los que se encontraban FTs y genes de respuesta a estímulo externo. En plantas Oria 6 / R1S se detectaron los niveles más bajos de genes expresados constitutivamente, entre los que destacaban genes de respuesta a estímulo externo, que podría estar asociado con un efecto del genotipo de la púa en la expresión de estos genes. El conjunto de estos resultados apoya la hipótesis de que los portainjertos tolerantes participan en la modulación de la respuesta a sequía de las acículas de las púas injertadas, tanto a nivel constitutivo como inducido, aumentando su capacidad adaptativa a déficit hídrico. Asimismo, el genotipo de las púas participa en la regulación de diversos procesos que también contribuyen a perfilar dicha capacidad adaptativa de las acículas de las púas de cada injerto.

ANÁLISIS DEL EFECTO DEL PORTAINJERTO SOBRE EL PERFIL METABÓLICO DE LA PÚA EN PLANTAS INJERTADAS DE *PINUS PINASTER* EN RESPUESTA A DÉFICIT HÍDRICO

Para profundizar en el efecto del portainjerto en las dinámicas de respuesta a sequía de acículas de plantas injertadas de *Pinus pinaster*, se llevó a cabo el análisis del contenido de metabolitos primarios y secundarios en plantas control y plantas sometidas a déficit hídrico.

Debido a la importancia descrita de los metabolitos secundarios en los mecanismos sistémicos de respuesta de la planta a sequía, en primer lugar se llevó a cabo el análisis de la composición y distribución de terpenos en órganos aéreos y subterráneos de plantas Gal 1056 / R1S, Gal 1056 / R18T, Oria 6 / R1S y Oria 6 / R18T control y sometidas a déficit hídrico. El análisis de la distribución constitutiva reveló que las principales diferencias estaban asociadas a la compartimentalización de estos metabolitos en los distintos órganos, más que a la procedencia de la púa o el genotipo del portainjerto. Estas variaciones entre órganos no fueron solo cuantitativas, en relación con el contenido total o individual de terpenos, sino principalmente cualitativas, lo que se demostró mediante análisis PLS-DA (Figura 5.1). Existen pocos estudios previos que se centren en la composición de terpenos en órganos aéreos y subterráneos conjuntamente, y en particular en raíces, a pesar de desempeñar un papel fundamental en la interacción de la planta con su entorno (Huber *et al.*, 2005; Henke *et al.*, 2015; Peñuelas *et al.*, 2014; Santonja *et al.*, 2019). Recientemente se han realizado estudios en abeto de Douglas, que muestran diferencias significativas tanto cuantitativas como cualitativas en la composición de monoterpenos y sesquiterpenos de acículas y raíces (Kleiber *et al.*, 2017; Duan *et al.*, 2019), sin embargo los estudios realizados en coníferas en relación a los diterpenos son escasos (Huber *et al.*, 2005). En nuestro estudio se detectaron diferencias cuantitativas, con una acumulación total de diterpenos mayor en acículas que en raíces, y particularmente baja en tallos. Además, los diterpenos neutros fueron los diterpenos más abundantes en tallos, y los DRAs en acículas y raíces, siendo los terpenos más relevantes a la hora de discriminar entre órganos aéreos y subterráneos. Estas diferencias, además de responder a patrones específicos de la especie, podrían estar relacionadas con mecanismos de defensa compartimentalizados en los distintos órganos para construir la respuesta global a los estímulos ambientales (Kleine y Müller, 2014; Mason *et al.*, 2015), conduciendo a la acumulación de terpenos específicos en función de su importancia cuantitativa o de su presencia exclusiva en un órgano concreto.

La composición de terpenos en coníferas se ha asociado durante mucho tiempo con la respuesta ambiental constitutiva y/o inducida del árbol frente a estrés abiótico y biótico (Blanch *et al.*, 2009; Huber *et al.*, 2004; Keeling y Bohlmann, 2006), a través de la síntesis de terpenos específicos en cantidades determinadas (Zhao *et al.*, 2011a). En *Pinus pinaster* esta respuesta no sólo se lleva a cabo localmente en el tejido afectado, sino que, como se ha descrito previamente se puede producir de manera sistémica inducida en la parte distal de la planta (López-Goldar *et al.*, 2020). Aunque la mayoría de estudios relacionado con el metabolismo de terpenos en coníferas se han centrado en acículas, el contenido de estos metabolitos en raíces y tallos juega un papel crucial en la

interacción del árbol con el ambiente. Diversos estudios han demostrado que DRAs como el ácido dehidroabiético, se acumulan en grandes cantidades en raíces y tallos de numerosas especies como *Pinus densiflora* (Oh *et al.*, 2017), *Pinus halepensis* (Suárez-Vidal *et al.*, 2019), *Pinus pinaster*, *Pinus radiata* (López-Goldar *et al.*, 2020) o *Picea sitchensis* (Robert, 2010), participando en la defensa frente a factores abióticos. En nuestras muestras, a pesar de que los niveles de DRAs detectados en tallos fueron menores a los detectados en raíces y acículas, la elevada acumulación de diterpenos neutros observada en tallos hace posible la rápida acumulación de DRAs si fuera necesario, mediante procesos de oxidación específicos (López-Goldar *et al.*, 2020). Además, la acumulación diferencial de algunos monoterpenos como limoneno, y de sesquiterpenos como copaeno, cubebeno y longipineno, en tallos de *Pinus pinaster* (López-Goldar *et al.*, 2018) y *Picea abies* (Pettersson *et al.*, 2008), les confiere mayor resistencia frente a estrés abiótico. Por lo tanto, cada vez son más las evidencias que apoyan el papel fundamental que juegan los terpenos en la respuesta de las coníferas a estrés abiótico (Duan *et al.*, 2019; Fernández de Simón *et al.*, 2020; Hussain *et al.*, 2020; Kleiber *et al.*, 2017; Loreto *et al.*, 2014; Niinemets, 2016).

Este sistema constitutivo de respuesta a estrés con la asignación optimizada a largo plazo de los recursos defensivos (Hahn y Maron, 2016), podría explicar las diferencias encontradas en los perfiles metabólicos de terpenos en acículas en función de su procedencia, Gal 1056 y Oria 6, como se ha observado en otras especies como *Pinus silvestre* (Kannaste *et al.*, 2013, 2018; Pazouki *et al.*, 2016), *Pseudotsuga menziesii* (Kleiber *et al.*, 2017; Duan *et al.*, 2019) o *Pinus banksiana* (Taft *et al.*, 2015). Así, los terpenos detectados en este órgano se correspondían con los descritos previamente por Arrabal *et al.* (2012) para individuos de procedencia atlántica (Gal 1056) y mediterránea (Oria 6). El genotipo de la púa explicó el 67 % de la varianza observada en acículas, en base a las diferencias cuantitativas, además de las cualitativas como los cinco DRAs con esqueleto bicíclico de labdano que sólo se detectaron en plantas con púas Gal 1056. En estas construcciones también se detectaron niveles significativamente más altos de casi todos los diterpenos neutros, especialmente de isómeros de abietadieno, y de alcoholes y aldehídos diterpénicos, junto con niveles de DRAs muy bajos. Por el contrario, en plantas con púas Oria 6 se detectaron niveles significativamente más altos del diterpeno isoabienol y de DRAs, particularmente los de esqueleto tricíclico. En coníferas, los DRAs tricíclicos se sintetizan a partir de diterpenos como el abietadieno o el abietatrieno siguiendo la secuencia: diterpeno → alcohol diterpénico → aldehído diterpénico → ácido resínico, en una serie de oxidaciones mediadas por monooxigenasas dependientes del citocromo P450 (CYP) de la familia CYP720B (Keeling y Bohlman, 2006; Bathe y Tissier, 2019). En acículas de plantas con púas de Gal 1056, esta vía de oxidación estaría de alguna manera constitutivamente reprimida, lo que lleva a niveles más bajos en la biosíntesis de estos DRAs a partir de los correspondientes diterpenos, pero no de los de estructura labdano, al contrario que en acículas de plantas injertadas con púas de Oria 6. En coníferas, la biosíntesis de DRAs bicíclicos de labdano no se ha demostrado que esté mediada por proteínas CYPs (Bathe y Tissier, 2019), y en ella participan dos factores diferentes que regulan rutas alternativas: en una están implicados ácidos resínicos como imbricatolico, epiimbricatolico, dihidroagático y pinifólico; mientras que la otra incluye compuestos como anticopálico, eperuico y los isómeros de anticopálico, estando reguladas con signo opuesto en cada procedencia, quedando estos

signos de regulación ligados a los de la biosíntesis de DRAs tricíclicos. Teniendo en cuenta la alta diversidad genética y adaptativa que presenta *Pinus pinaster* (Eveno *et al.*, 2008, Pérez-Izquierdo *et al.*, 2019), así como la gran variedad de mecanismos de control epigenético que dominan su respuesta a cambios locales (Bussotti *et al.*, 2015), el factor ambiental puede haber afectado selectivamente a la biosíntesis de DRAs, como ya se ha observado para otros compuestos en diversas coníferas (Baradat y Yazdani, 1988; Taft *et al.*, 2015; Kännaste *et al.*, 2018).

En nuestro estudio, al igual de lo observado en otras especies de coníferas, no se detectaron patrones metabólicos específicos en función de la procedencia de la púa en tallos y raíces (Duan *et al.*, 2019; Kleiber *et al.*, 2017; Kleine y Müller, 2014). Sin embargo, el análisis OPLS-DA utilizando el genotipo de la púa como variable dependiente (Figura 5.2), nos permitió identificar una posible comunicación entre órganos en función de la procedencia de la púa, que conduce a la acumulación de patrones de terpenos específicos en cada uno de ellos. Uno de los terpenos más afectados por el genotipo de la púa fue el isoabienol, que mostraba concentraciones significativamente mayores en todos los órganos de plantas Oria 6, independientemente del portainjerto en el fueron injertadas. Estos resultados coinciden con estudios previos realizados en *Pinus sylvestris* (Kännaste *et al.*, 2018). Diterpenos como abienol y óxido de manool también mostraron mayores concentraciones en plantas con púas de Oria 6 en todos los órganos excepto en acículas, donde no se detectaron (óxido de manool) o los niveles fueron más bajos que en las de plantas con púas de Gal 1056. Kännaste *et al.* (2018) demostró la existencia de una correlación positiva entre la disponibilidad de nitrógeno y el perfil de diterpenos, especialmente de isoabienol y de óxido de manool, en acículas de *Pinus sylvestris*. Así, a niveles elevados de N, las acículas deberían contener los niveles más altos de isoabienol y falta de óxido de manool al igual que se observa en nuestros injertos, lo que puede estar relacionado con la fertilización de las plantas durante el estudio. De alguna manera, estos diterpenos podrían estar involucrados en las redes de comunicación a larga distancia que coordinan la respuesta de crecimiento en coníferas desde tejidos aéreos a subterráneos, en función de la disponibilidad de N (Thomas y Frank, 2019), además de desempeñar un papel importante en defensa antimicrobiana y antifúngica (Cheng *et al.*, 2012; Koutsaviti *et al.*, 2011).

Conjuntamente, se obtuvieron dos resultados llamativos: por un lado, los DRAs parecían no contribuir en la diferenciación de muestras de tallos en función de la procedencia de la púa, pero sí permitían diferenciar entre muestras de acículas y raíces, lo que podría sugerir una posible comunicación entre estos dos órganos para su regulación metabólica. Por otro lado, los pocos terpenos detectados en acículas y tallos de púas que contribuyeran en ambos órganos a su diferenciación en función de la procedencia de la púa: además de isoabienol, sólo 8, 13-abietadieno, 8, 11, 13-abietatrieno, dehidroabietol (Gal 1056 > Oria 6), y α -pineno (Oria 6 > Gal 1056). Estos resultados refuerzan la hipótesis de la existencia de sistemas de regulación de terpenos y de mecanismos de respuesta a estrés específicos de cada órgano (Bezemer y van Dam 2005; Kleine y Müller, 2014; Mason *et al.*, 2015; Zangerl y Rutledge, 1996).

Las muestras de tallos de púas también permitieron diferenciar entre plantas Gal 1056 y Oria 6, en función del portainjerto, ya que se detectaron diferencias significativas en los

niveles de monoterpenos como β -pineno y β -felandreno en tallos de púas y raíces de plantas injertadas con púas de Gal 1056; y de sesquiterpenos como germacreno D y valenceno en tallos de púas y raíces de plantas en las que se usaron púas de Oria 6. El papel potencial de la púa en la regulación de los rasgos funcionales de la planta injertada ha sido poco estudiado en especies forestales, donde la mayoría de los esfuerzos se han centrado principalmente en su efecto sobre la biomasa radicular (Bhogale *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2018a), y la transmisión de moléculas de señalización a larga distancia (Beveridge *et al.*, 1997; Lejay *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2016; Ohkubo *et al.*, 2017), para la regulación del contenido de nutrientes y agua en raíces (Gautier *et al.*, 2019; Ko y Helariutta, 2017; Thomas y Frank, 2019). Todavía no se han realizado estudios de cómo la púa puede influir en la modulación del perfil metabólico de terpenos en los diferentes órganos de coníferas injertadas, y por tanto participar en la respuesta a sequía de la planta, por lo que se necesitan estudios complementarios para verificar los resultados obtenidos.

Por otro lado, el posible efecto que el portainjerto puede tener sobre el perfil de terpenos en los diferentes órganos de la planta injertada mostró una elevada variabilidad no siendo posible asignar una contribución común a todos ellos. Estos resultados coinciden con los observados al analizar el efecto de la púa, y refuerzan la hipótesis de la existencia de mecanismos de respuesta específicos de cada órgano. Sorprendentemente el portainjerto no tuvo ningún efecto en el perfil terpénico de acículas aunque es posible que las grandes diferencias entre los dos quimiotipos de acículas enmascaren el efecto del portainjerto. En la literatura podemos encontrar muchos estudios sobre el efecto del portainjerto en frutos en relación al contenido de terpenos (Huang *et al.*, 2020) o en la emisión de compuestos orgánicos volátiles (Ceballos y Rioja, 2019), pero poco se sabe acerca del efecto del portainjerto en el perfil de terpenos de hojas de plantas injertadas, aunque se ha prestado más atención a otros metabolitos no volátiles, particularmente en hojas de té (Qi *et al.*, 2019).

El análisis de terpenos en respuesta a sequía reveló cambios significativos específicos de cada órgano. Estudios previos realizados en coníferas sometidas a déficit hídrico han demostrado que en acículas se producen disminuciones significativas de los niveles de DRAs (Fernández de Simón *et al.*, 2017), además de variaciones en los niveles de monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos neutros (Kainulainen *et al.*, 1992; Llusá y Peñuelas, 1998; Turtola *et al.*, 2003). Estas modificaciones mostraron su relación con la intensidad de la sequía (Sancho-Knapik *et al.*, 2017), la combinación con otros estreses (Fernández de Simón *et al.*, 2020), y el estado ontogenético de la acícula (acículas adultas vs juveniles) (Fernández de Simón *et al.*, 2017). En nuestro análisis observamos una reducción de los niveles de DRAs en acículas en respuesta a sequía, que se correlacionaba con un aumento en raíces. Estos resultados podrían indicar que la planta injertada ajusta la distribución de DRAs en acículas y raíces de manera coordinada en función de la disponibilidad de agua, posiblemente para optimizar el funcionamiento de toda la planta (Thomas y Frank, 2019). En muestras de tallo, no se detectaron grandes diferencias en los niveles de DRAs en respuesta a sequía, lo que coincide con lo descrito para pino Jack y pino Carrasco (Hussain *et al.*, 2020; Suárez-Vidal *et al.*, 2019).

En coníferas, los DRAs juegan un papel defensivo fundamental frente a estrés biótico (Mason *et al.*, 2015; Oh *et al.*, 2017; Robert *et al.*, 2010), por lo que su acumulación

inducida por sequía en raíces en detrimento de la observada en acículas, probablemente tiene como objetivo aumentar la capacidad de defensa constitutiva en una situación de escasez de agua, mostrando el mayor valor de la raíz para la planta en su conjunto (Tsunoda *et al.*, 2017). Teniendo en cuenta que la producción de estos metabolitos de defensa dependen de la disponibilidad de C procedente de la fotosíntesis, una mayor movilización de carbohidratos solubles hacia raíces puede paliar la reducción en la disponibilidad de C que se produce en condiciones de estrés hídrico, debido al cierre de los estomas e inhibición de la fotosíntesis (de Miguel *et al.*, 2016; Wiley y Helliker, 2012). Esta reasignación de compuestos aseguraría la acumulación de DRAs y otros metabolitos secundarios en los órganos en los que sean necesarios, proporcionando una mayor capacidad defensiva con mecanismos de respuesta más rápidos (López-Goldar *et al.*, 2016). Además, ofrece un nuevo punto de vista sobre como la percepción de la sequía por parte del portainjerto puede aumentar o disminuir la susceptibilidad a déficit hídrico de púas de *Pinus pinaster*, como ya se ha demostrado en otras coníferas (Suárez-Vidal *et al.*, 2019; Hussain *et al.*, 2020). El análisis de la distribución de DRAs en acículas y raíces en respuesta a sequía reveló diferencias según la combinación de púa-portainjerto analizada, con una mayor acumulación en raíces de plantas con portainjerto sensible Gal 1056 / R1S y Oria 6 / R1S, mayoritariamente en Gal 1056 / R1S, y una mayor disminución en acículas de plantas con portainjerto tolerante Gal 1056 / R18T y Oria 6 / R18T, principalmente en Oria 6 / R18T. Estos efectos sistémicos desencadenados en respuesta a sequía han recibido poca atención en coníferas (de Miguel *et al.*, 2016; Han *et al.*, 2019), y poco o nada se sabe acerca de su relación con los niveles de DRAs observados en plantas injertadas de *Pinus pinaster*.

Los cambios en los niveles de los otros compuestos terpénicos provocados por la escasez de agua también mostraron diferencias en función de la combinación púa-portainjerto. Destacan las plantas Gal 1056 / R1S, ya que en la mayoría de los órganos muchos terpenos individuales mostraron variaciones más altas o con tendencia opuesta a las observadas en las otras combinaciones de injerto. Este efecto fue más claro en monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos en acículas y tallos de portainjertos; en sesquiterpenos y diterpenos en tallos de púas; y en monoterpenos en raíces, tal como se observó en el análisis sPLS-DA (Figura 5.5). En plántulas de abeto de Douglas que difieren en tolerancia a la sequía, Kleiber *et al.* (2017) observaron que monoterpenos y sesquiterpenos mostraron diferentes respuestas en acículas y raíces, con incrementos significativamente mayores en los árboles sensibles a la sequía. Sin embargo, este efecto solo se detectó bajo condiciones de sequía moderada, siendo menos relevante en condiciones de sequía severa. Sancho-Knapik *et al.* (2017) correlacionaron en *Pinus sylvestris* los cambios en los terpenos de las agujas con el nivel de estrés hídrico que soportan los árboles (con respecto al potencial hídrico antes del amanecer, la conductancia estomática y la tasa de asimilación neta), concluyendo que se producen mayores niveles de MT y ST sólo bajo niveles moderados de estrés hídrico, lo que puede explicar las diferencias encontradas entre nuestras combinaciones de injertos.

A continuación, se profundizó en el análisis del metaboloma de acículas de las cuatro construcciones de *Pinus pinaster*, Gal 1056 / R18T, Gal 1056 / R1S, Oria 6 / R18T y Oria 6 / R1S, en condiciones control. Se identificaron cambios significativos en los patrones metabolómicos de lípidos, azúcares, polialcoholes, ácidos orgánicos, transportadores de electrones, aminoácidos y compuestos nitrogenados, compuestos fenólicos, y compuestos terpénicos, neutros y ácidos, que permitieron diferenciar los cuatro genotipos en las plantas injertadas (Figura 5.7). Se detectaron mayores diferencias en el metaboloma de acículas de plantas injertadas sobre portainjertos R1S en función del genotipo de la púa, que en plantas injertadas sobre portainjertos R18T. Entre los compuestos más significativos se encontraron aminoácidos y compuestos nitrogenados como prolina, ácido piroglutámico, treonina, serina, lisina, tiramina o valina; azúcares ácidos como ácido galacturónico; ácidos grasos como linolénico; y compuestos fenólicos como ácido benzoico y 3,4-dihidroxibenzoico. El ácido benzoico está considerado como un elemento estructural fundamental en plantas para la síntesis de otros múltiples metabolitos primarios, así como de hormonas vegetales, cofactores, compuestos implicados en defensa y germinación (Widhalm y Dudareva, 2015). En plantas injertadas sobre portainjertos tolerantes se detectó la acumulación de azúcares como d-trehalosa, d-galactosa, fructosa y diversos disacáridos; y compuestos fenólicos como epicatequina, ácido siríngico y ácido quínico. Diversos estudios demuestran que en respuesta a estrés se produce la acumulación de azúcares solubles que actúan como osmolitos manteniendo la turgencia celular y proporcionando una primera línea de defensa contra la pérdida de agua, ayudando a mantener el equilibrio hídrico en plantas tolerantes a sequía (Krasensky y Jonak, 2012; Marček *et al.*, 2019; Ullah *et al.*, 2017; Khan *et al.*, 2019), y actuando como moléculas de señalización para modular el crecimiento, el desarrollo y la respuesta a múltiples estreses (Gundaraniya *et al.*, 2020). Los compuestos fenólicos, y en particular el ácido siríngico, se han descrito en procesos de inducción de tolerancia a estrés biótico y abiótico, participando en la eliminación de especies ROS (Gundaraniya *et al.*, 2020). También se ha descrito que los polifenoles responsables de controlar el potencial osmótico y el metabolismo de la prolina proporcionan tolerancia a varios estreses abióticos (Li *et al.*, 2015a; Khanh *et al.*, 2018). Estos resultados coinciden con los observados en capítulos anteriores, y que parecen indicar que el uso de portainjertos tolerantes conduce a procesos de preadaptación a sequía en acículas de la planta injertada. El análisis también permitió la diferenciación de las muestras en función del genotipo de la púa. En plantas Gal 1056 / R1S y Gal 1056 / R18T se detectó la acumulación diferencial de compuestos fenólicos como dos hexóxidos de isoramnetina, laricitrina pentósido y quercetina cumaroil pentósido; un lignano; el ciclitol sequoyitol y ácido linoleico entre otros. Por el contrario, en plantas Oria 6 / R1S y Oria 6 / R18T se identificó la acumulación diferencial de compuestos fenólicos como glicósidos de siringetina, kaempferol-cumaroilo, siringoilo, miricetina, laricitrina, quercetin metil éter o cafeoilo; ácidos grasos como ácido oleico; aminoácidos y compuestos nitrogenados como feniletilamina y 2-metil-5-oxo-prolina; y ácidos orgánicos como ácido pirúvico. En general, se ha descrito que los fenoles están implicados en la respuesta metabólica a diversos estreses abióticos, incluyendo estrés hídrico (Bautista *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2019), debido a sus propiedades antioxidantes que les permiten eliminar especies reactivas de oxígeno acumuladas en condiciones de estrés (Karuppanapandian *et al.*, 2011), y por lo tanto se espera que su contenido aumente en condiciones de escasez de agua. Este incremento no se produce

de forma homogénea en todos ellos, sino que experimentan variaciones específicas, aumentando o disminuyendo en función del compuesto (Köhler *et al.*, 2020). En el caso de kaempferol (Guignard *et al.*, 2005), algunos glicósidos fenólicos (Hale *et al.*, 2005) y ácido cafeico (Köhler *et al.*, 2020) se ha descrito que se acumulan diferencialmente en respuesta a sequía. Por otro lado, se han observado variaciones cualitativas y cuantitativas en los niveles de ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados en respuesta a sequía que dependían del genotipo de la planta analizada (Bayati *et al.*, 2020). Aminoácidos como prolina y feniletilamina se han descrito en plantas tolerantes actuando como osmolitos que protegen, entre otros, las membranas celulares (Bhaskara *et al.*, 2015; Ghodke *et al.*, 2018), y participan en la respuesta inducida por especies ROS (Kawano *et al.*, 2000).

El análisis del metaboloma en acículas de cada uno de los genotipos sometidos a déficit hídrico detectó un ajuste complejo al estrés con patrones diferenciales en función del genotipo de la púa, del portainjerto y del régimen hídrico soportado. Al contrario de lo observado en terpenos, el efecto del tratamiento hídrico sobre el perfil metabólico de la acícula fue importante, independientemente de los genotipos de púa y portainjerto, identificando gran variedad de metabolitos implicados en la discriminación entre muestras control y muestras sometidas a sequía. La mayoría de metabolitos aumentaban significativamente sus concentraciones en respuesta a sequía. Entre ellos destacan compuestos fenólicos, flavonoideos (derivados de kaempferol y quercetina) y no flavonoideos, así como su precursor el ácido shikímico. En respuesta a estrés se produce la acumulación dinámica de compuestos flavonoideos, donde la determinación del tipo, cantidad y localización de los mismos, depende tanto de la intensidad y duración del estrés (Shojaie *et al.*, 2016), como de los patrones estacionales de acumulación relacionados con la edad de las acícula (Cañas *et al.*, 2015; de Miguel *et al.*, 2016; Meijón *et al.*, 2016). Actúan como importantes compuestos que modulan no sólo la aclimatación a la sequía, sino también los cambios en el metabolismo de la acícula asociados a procesos de desarrollo en *Pinus pinaster* (Fernández de Simón *et al.*, 2017). Diversos estudios han descrito un aumento de compuestos derivados de kaempferol y quercetina en respuesta a estrés hídrico severo, relacionados principalmente con su potencial antioxidante (Seyoum *et al.*, 2006; Shojaie *et al.*, 2016), produciéndose la acumulación de estos antioxidantes mediante la regulación de vías metabólicas como la del shikimato/fenilalanina (Fernández de Simón *et al.*, 2017). Entre los metabolitos primarios acumulados diferencialmente en respuesta a sequía destacan en particular algunos ciclitos como pinitol, chiro-inositol y scyllo-inositol que se acumulan significativamente en respuesta a sequía en acículas, principalmente con el fin de mantener la maquinaria antioxidante (Fernández de Simón *et al.*, 2017). Entre ellos, destaca el papel de pinitol que actúa como osmorregulador en condiciones de déficit hídrico (de Miguel *et al.*, 2016). También se ha descrito el papel que juegan los carbohidratos solubles en ajuste osmótico, estabilización de membranas y prevención de la degradación de proteínas (Warren *et al.*, 2011), acumulándose principalmente en especies de hábitat méxico en respuesta a sequía. Con respecto a los aminoácidos, se ha descrito ampliamente su función en respuesta a sequía, acumulándose en acículas por su carácter osmoprotector (Aranda *et al.*, 2017). Además, la acumulación de aminoácidos en respuesta a déficit hídrico se ha asociado con el mantenimiento del equilibrio carbono-nitrógeno, protección de membranas y el suministro de sustratos respiratorios

en condiciones de estrés, participando en los mecanismos de desarrollo de tolerancia (Araújo *et al.*, 2011; Ashraf y Foolad, 2007; D'Andrea *et al.*, 2014; Selmar y Kleinwächter, 2013). En respuesta a déficit hídrico, los mecanismos de inducción de tolerancia suponen un aumento de las necesidades energéticas (Janz *et al.*, 2010), por lo que estos cambios metabólicos podrían jugar un papel importante en la adaptación/tolerancia a sequía en *Pinus pinaster*.

Se ha descrito el aumento de los niveles de ácidos orgánicos en respuesta a sequía asociados a procesos de fotorrespiración y asimilación de CO₂ en sistemas metabólicos más resistentes (Maurino y Engqvist, 2015). Los ácidos grasos libres, tanto saturados como insaturados, se acumulan diferencialmente en respuesta a déficit hídrico para el ajuste de la fluidez de membranas (Zhong *et al.*, 2011). Las vías metabólicas de los ácidos grasos desempeñan un papel fundamental en defensa, regulando procesos como el crecimiento, desarrollo y la respuesta a diversos estreses bióticos y abióticos (Upchurch, 2008), entre otros, permitiendo la compartimentación celular en respuesta a sequía (Gigon *et al.*, 2004). Por último, se ha descrito el papel fundamental de α -tocoferol en la preservación de la integridad de la membrana en condiciones de sequía, además de participar en desarrollo y crecimiento bajo diferentes situaciones de estrés ambiental (Sadiq *et al.*, 2019).

Entre los compuestos que disminuían por efecto de la sequía destacan los ácidos oxálico y α -cetoglutarico, que no se detectaron en muestras estresadas, así como otros ácidos como d-eritrónico y l-málico, tal y como se ha descrito en otras plantas (Guo *et al.*, 2018). Estos ácidos orgánicos desempeñan un papel importante durante el ajuste osmótico ayudando a equilibrar el potencial osmótico de las vacuolas (Guo *et al.*, 2018). Otros compuestos que disminuyen su concentración en acículas por efecto de la sequía son algunos disacáridos como lactosa y sacarosa, para la obtención de sus monómeros, con el fin de asegurar la energía necesaria para llevar a cabo la respiración celular y permitir el mantenimiento de las reservas de carbono para la biosíntesis de otros compuestos orgánicos (Marček, *et al.*, 2019), así como algunos compuestos nitrogenados como lactamida, que proviene del ácido láctico estando involucrada en procesos de desarrollo (Kinnersley *et al.*, 1990), compuestos fenólicos y lignanos. En respuesta a sequía.

Algunas de las diferencias en la respuesta metabólica a sequía que se producen en la acícula estaban determinadas por el genotipo de la púa, que tuvo un efecto mayor que el tratamiento de déficit hídrico, siendo menor el efecto del genotipo del portainjerto. En el caso del genotipo de la púa destaca la participación de compuestos fenólicos, lignanos y ácidos grasos, mientras que en relación al genotipo del portainjerto son las vías relacionadas con el metabolismo del nitrógeno y de carbohidratos, y en especial del ácido quínico en plantas injertadas sobre el portainjerto tolerante, y de ácido linolénico en plantas injertadas sobre el portainjerto sensible. El ácido quínico participa en los mecanismos moleculares que subyacen a la resistencia a sequía, confiriendo tolerancia a estrés hídrico en diversas especies (Guo *et al.*, 2018; Aranda *et al.*, 2020; Wan *et al.*, 2021); mientras que el ácido linolénico también se ha observado que se acumula diferencialmente en respuesta a sequía, disminuyendo o aumentando en función de la especie (Feng *et al.*, 2017; Keshavarz, 2020).

En particular, en acículas de plantas injertadas sobre el portainjerto tolerante se detectó la acumulación diferencial de carbohidratos como sorbitol, glucosa, disacárido 24.8, azúcar ácido 21.7, lactitol y eritritol; aminoácidos como ácido aspártico y lisina; compuestos fenólicos como kaempferol y ácido ferúlico; ácidos grasos como palmitoleico; y otros compuestos no identificados. El incremento de los niveles de sorbitol en condiciones de estrés hídrico responde a su participación en los mecanismos de respuesta adaptativa a sequía mediante el mantenimiento del metabolismo de la sacarosa (Lo Bianco *et al.*, 2000). El eritritol también se ha demostrado que es uno de los azúcares cuyo metabolismo se ve más afectado en respuesta a sequía, acumulándose desde estadios tempranos de estrés hídrico moderado (Fàbregas y Fernie, 2019). Por otra parte, se ha observado el aumento del contenido de ácido ferúlico como respuesta a déficit hídrico en hojas, como uno de los mecanismos de protección inducidos en condiciones de sequía. Se ha visto, que el ácido ferúlico se une covalentemente a los carbohidratos de la pared celular actuando como un filtro de luz en condiciones de sequía, y participando en procesos de adaptación mediante la regulación a la baja del crecimiento de la hoja (Hura *et al.*, 2009). En respuesta a sequía se produce además la remodelación de los lípidos de membrana como una estrategia adaptativa efectiva, en lo que participa el ácido palmitoleico, un ácido graso monoinsaturado que se acumula en la planta en condiciones de déficit hídrico (Liu *et al.*, 2019a). Por otro lado, en plantas injertadas sobre el portainjerto sensible encontramos un incremento significativo de los niveles de compuestos fenólicos como hexóxidos de laricitrin feruloil, kaempferol dicumaroil, siringetin cumaroil, quercetin cumaroil, ácido p-hidroxibenzoico, y ácido benzoico; azúcares como ribosa; aminoácidos como lisina y glicina; lípidos como glicerol-3-fosfato y ácido palmitoleico; polialcoholes como scillo inositol, sorbitol y treitol; y ácidos orgánicos como glicérico, láctico y 2-hidroxiglutarico. Se ha descrito que la ribosa se acumula diferencialmente en respuesta a sequía, junto con otros azúcares, aunque de manera más marginal, y se correlaciona con cambios en el potencial osmótico (Marček *et al.*, 2019). El aumento en el contenido de aminoácidos en las plantas en condiciones de sequía puede producirse como consecuencia del proceso de degradación de proteínas, mostrando un comportamiento órgano-dependiente, con la acumulación de aminoácidos como lisina de manera diferencial en acículas de *Pinus pinaster* (de Miguel *et al.*, 2016). Polialcoholes como sorbitol y los inositoles funcionan como fuente de carbono y energía, y actúan como solutos osmoprotectores, acumulándose en las hojas en respuesta a sequía en plantas superiores (Conde *et al.*, 2015; de Miguel *et al.*, 2016). Los ácidos orgánicos desempeñan un papel fundamental en el desarrollo, la producción de energía y la biosíntesis de aminoácidos, y se acumulan en situaciones de estrés hídrico (Marček *et al.*, 2019) o de otros estreses abióticos como es el caso del ácido glicérico (Chang *et al.*, 2020).

Por otro lado, fue importante el efecto del portainjertos sobre el metaboloma de acículas de las plantas injertadas con diferentes púas, en respuesta a sequía. Cuando la púa injertada era Gal 1056 el mayor factor de diferenciación en el metaboloma de acículas fue el genotipo del portainjerto y el segundo el tratamiento de déficit hídrico, mientras que cuando la púa injertada era Oriá 6, el tratamiento de déficit hídrico era el factor que más influía en el metaboloma de la acícula, dependiendo la influencia del genotipo del portainjerto de si se trataban de plantas control o sometidas a déficit hídrico. Una gran diversidad de metabolitos y vías metabólicas participan en los cambios que se producen

en estos metabolomas, particularmente tanto aminoácidos y compuestos nitrogenados, como carbohidratos, lípidos, compuestos fenólicos y lignanos. En acículas de plantas injertadas con púas de Gal 1056 se detectó la acumulación diferencial en muestras sometidas a estrés, de aminoácidos como lisina, tiramina, treonina y valina, sorbitol, polifenoles como algunos derivados de kaempferol o α -tocoferol, glicerol-3-fosfato, ácido hexadeca-10,13-dienoico, y ácido 2-hidroxi-glutárico, especialmente en la combinación con portainjerto tolerante Gal 1056 / R18T. El glicerol-3-fosfato es un importante metabolito intermediario que participa en las rutas metabólicas de glicerolípidos, glucólisis y gluconeógenos, además de desempeñar un importante rol en la adaptación a diversos estreses (Chanda *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2018). Por otro lado, en plantas control se detectó una acumulación significativa de compuestos como ácido oxálico, lariciresinol hexósido, β -sitosterol, ácido esteárico, galocatequina, ácido 2-metoxihexadecanoico y α -cetoglutárico. La síntesis de oxalato está relacionada con fotorrespiración a través de la oxidación del glicolaldehído, y se ha demostrado que en estudios de respuesta a sequía, se acumula en plantas control aumentando las tasas fotosintéticas (Gouveia *et al.*, 2017). En el caso de portainjerto sensible Gal 1056 / R1S, las plantas sometidas a sequía también vieron alterados los patrones metabolómicos de otros compuestos relacionados con el metabolismo del carbono como galactosa, trehalosa, sacarosa, melecitosa, ácido galacturónico, ácido málico y xilónico, y scyllo inositol; así como metabolitos secundarios como flavonoides, lignanos o urea. Se ha observado que la acumulación diferencial de urea en respuesta a sequía responde a su participación en procesos de tolerancia a través de la protección del aparato fotosintético, la activación del sistema de defensa antioxidante y la mejora de la osmorregulación (Gou *et al.*, 2017).

En el caso de muestras con púas tolerantes Oria 6, injertadas sobre portainjertos tolerantes y sensibles se vieron afectadas las rutas biosintéticas de aminoácidos y compuestos nitrogenados, pero también las de carbohidratos, lípidos y compuestos fenólicos. Destaca el metabolismo lipídico por su diferente respuesta en relación a la tolerancia del portainjerto, ya que solo se ve afectado en el caso de portainjertos sensibles, lo que puede deberse a una mejor preparación para situaciones de sequía cuando se utilizan portainjertos tolerantes. Por el contrario, compuestos como tiramina, laricitrin-feruloil hexosido, ácido pirúvico, siringetin cumaroil hexóxido, lactitol y α -tocoferol, aumentaron significativamente por efecto de la sequía en plantas con portainjertos tolerantes, mientras que disminuyeron o no se vieron afectadas en el caso de portainjertos sensibles. Por otro lado, compuestos como lactosa, ácido málico, glucosa y sacarosa disminuyeron sus concentraciones con mayor intensidad en plantas sometidas a sequía cuando el portainjerto era sensible a sequía, además de otros compuestos como ácido galacturónico, prolina, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, lisina o ácido piroglutámico que mostraron un comportamiento contradictorio en relación al portainjerto, aumentando o disminuyendo por efecto del tratamiento hídrico.

Está claro que la acícula de *Pinus pinaster* en plantas injertadas está preparada para adaptarse a situaciones de déficit hídrico desarrollando un amplio abanico de estrategias, en las que participan multitud de rutas biosintéticas, siendo determinante el genotipo de púa y portainjerto no solo en sí mismo para desplegar el metaboloma constitutivo, sino en la adaptación metabólica a sequía. Además, cada combinación de

genotipos de púa y portainjerto es capaz de desarrollar su propia estrategia de respuesta metabólica en situaciones de falta de disponibilidad de agua.

ANÁLISIS INTEGRADO DE LA RESPUESTA DE LOS INJERTOS DE *PINUS PINASTER* AL DÉFICIT HÍDRICO

Para analizar cómo el genotipo del portainjerto influye en la modulación de la respuesta a sequía de plantas injertadas de *Pinus pinaster*, primero se analizó el perfil transcriptómico de individuos de la progenie procedentes del cruce controlado Gal 1056 x Oria 6, que presentaban respuestas contrastadas a sequía (de Miguel *et al.*, 2016), en condiciones control y déficit hídrico. Hermanos de la misma progenie fueron utilizados posteriormente como portainjertos en el estudio de la respuesta de injertos al estrés hídrico. Uno de los hallazgos de este primer análisis fue que genotipos tolerantes a sequía acumulan un elevado número de transcritos relacionados con la respuesta a la sequía antes de su exposición al estrés hídrico, al contrario de lo observado en genotipos sensibles, en los que se detectan en etapas posteriores del tratamiento. En concreto, se detectó la acumulación constitutiva de transcritos relacionados con la regulación de fitohormonas, señalización, y de protección estructural, metabólica y de transporte, en genotipos tolerantes. Por el contrario, se detectó una elevada acumulación de transcritos relacionados con protección osmorreguladora bajo condiciones de déficit hídrico sólo en genotipos sensibles. Este resultado podría sugerir que los genes relacionados con respuesta a sequía que se expresan de forma constitutiva en genotipos tolerantes podrían estar más relacionados con una respuesta fisiológica adaptativa activa, más efectiva, para aclimatarse rápidamente a condiciones de estrés hídrico, que aquellos expresados de forma facultativa en condiciones de déficit hídrico.

El análisis del efecto del portainjerto en el transcriptoma y metaboloma de las acículas de las púas de los progenitores injertadas en condiciones control, permitía explorar si la hipótesis establecida en base a los resultados obtenidos con plantas íntegras podían observarse en injertos, y así pudiera emplearse los portainjertos para profundizar en la comprensión de la comunicación entre órganos y, desde un punto de vista práctico, como una estrategia para mejorar la tolerancia a sequía de púas procedentes de genotipos élite, con peor respuesta a estrés hídrico injertándolas sobre portainjertos tolerantes. El análisis del transcriptoma reveló un mayor efecto del genotipo del portainjerto en púas Gal 1056 que en Oria 6, con un enriquecimiento de genes asociados con tolerancia a estrés hídrico implicados en metabolismo secundario, organización de la pared celular, señalización, fitohormonas y respuesta a estímulo externo al analizar Gal 1056 / R1S vs Gal 1056 / R18T. Estos resultados refuerzan dicha hipótesis sugiriendo que portainjertos tolerantes a sequía pueden modular la tolerancia a estrés hídrico de púas sensibles modificando la expresión de genes implicados en la tolerancia a sequía en condiciones control. El análisis del metaboloma confirmó los resultados obtenidos en los perfiles de expresión génica, observándose cambios en el perfil metabólico de compuestos primarios y secundarios de acículas de las púas injertadas. Se detectaron diferencias constitutivas en la acumulación de lípidos, azúcares, polialcoholes, ácidos orgánicos, transportadores de electrones, aminoácidos y compuestos nitrogenados y fenólicos. Al contrario de lo observado en el perfil transcriptómico, el análisis reveló que el metaboloma de la acícula se veía más activado por el portainjerto sensible que por el portainjerto tolerante. Esto podría indicar una mayor actividad de procesos asociados a desarrollo en plantas Gal 1056 / R1S y Oria 6 /

R1S inducidas por el portainjerto sensible, mientras que portainjertos tolerantes podrían modular el crecimiento de la planta injertada, ralentizándolo, redirigiendo recursos hacia mecanismos de respuesta a sequía.

A pesar de ello, en plantas injertadas sobre el portainjerto tolerante se detectó la acumulación de ácido quínico cuyo papel en la inducción de tolerancia ha sido previamente descrito. El análisis del perfil de compuestos terpenoicos en acículas reveló diferencias claras que se correspondían con los perfiles de procedencia atlántica y mediterránea descritos previamente para la especie (Walter *et al.*, 1985; Arrabal *et al.*, 2012), con una acumulación diferencial de diterpenos neutros y ácidos principalmente. No se detectó un efecto claro del genotipo del portainjerto en el perfil metabólico de terpenos en acículas. Es posible que las grandes diferencias detectadas en los patrones de estos compuestos según la procedencia de la púa, pudieran enmascarar dicho efecto.

Asimismo, el análisis transcriptómico apoya la existencia de una regulación constitutiva bidireccional entre púas y portainjertos que afecta a múltiples genes, rutas y procesos. Entre ellos los implicados en el metabolismo secundario de terpenos y flavonoides principalmente en Gal 1056 / R1S y Gal 1056 / R18T; en respuesta a estímulo externo y en la biosíntesis, percepción y transducción de señales de diferentes fitohormonas, con un mayor número de genes asociados a la regulación mediada por ABA y auxina en Oria 6 / R1S y Oria 6 / R18T, con genes que codifican FTs implicados en respuesta a sequía como factores MYB, AP2/ERF, C2H2-ZF, PHD, HSF, NAC y WRKY. Estos resultados también se observaron al analizar el perfil de terpenos constitutivos en diferentes tejidos de la planta. Se detectaron diferencias en el perfil de terpenos tanto cualitativas como cuantitativas entre órganos y genotipos, lo que refuerza la hipótesis de que las púas de genotipos tolerantes juegan un papel fundamental en conferir una mayor tolerancia en respuesta a estrés hídrico, y que además este sistema es órgano dependiente, con mecanismos compartimentados que permite la optimización de todos los recursos de la planta a largo plazo. El análisis reveló que entre los mecanismos de regulación bidireccional púa-portainjerto, se producía una redistribución constitutiva de terpenos neutros y ácidos de acículas a raíces que proporcionaba una mayor capacidad defensiva constitutiva en raíces ante situaciones de déficit hídrico. Estos resultados se confirmaron al analizar genes expresados constitutivamente en púas injertadas sobre portainjertos tolerantes, que reveló la sobreexpresión de genes relacionados con transporte de solutos, biosíntesis de ARN, metabolismo secundario, organización de la pared celular, respiración celular, homeostasis de proteínas, modificación de proteínas y respuesta a estímulo externo. Entre otros, se detectó la sobreexpresión constitutiva de genes GRAS, DREB, ERF, bZIP NAC y WRKY, FTs asociados con respuesta a déficit hídrico en coníferas, y mayor acumulación de metabolitos secundarios como flavonoides, dihidroflavonoides, p-coumaroil-CoA, isoprenil difosfatos y terpenos. Estos resultados confirman la influencia del portainjerto tolerante en la inducción de mecanismos de tolerancia de la púa injertada de *Pinus pinaster*.

También se analizó el efecto de los portainjertos en el transcriptoma y metaboloma de las acículas de las púas injertadas en injertos sometidos a déficit hídrico moderado. Es importante señalar que en el estudio de genotipos de la progenie de *Pinus pinaster*, que mostraban una respuesta contrastada a sequía, se identificó que la mayor modificación del transcriptoma observada en respuesta a sequía se producía en raíces.

Este resultado coincide con los perfiles metabólicos descritos previamente en otros genotipos de *Pinus pinaster* sometidos a sequía (de Miguel *et al.*, 2016). La respuesta temprana de las raíces está relacionada con su función, ya que son los órganos sensoriales primarios que transmiten señales químicas a los tallos y acículas con el fin de informar sobre el estado hídrico del suelo y regular la expresión de genes que controlan las vías moleculares de respuesta a la sequía (Janiak *et al.*, 2016). La comparación entre los perfiles transcriptómicos de los genotipos sensibles y tolerantes reveló que se producía una mayor acumulación de transcritos asociados a estrés hídrico en genotipos sensibles. Estos resultados están en concordancia con la hipótesis de que la activación basal, constitutiva, de los mecanismos de respuesta a estrés hídrico en genotipos tolerantes podría favorecer una respuesta rápida y eficiente ante episodios de sequías recurrentes. Otros estudios también han descrito que genotipos sensibles de distintas especies vegetales muestran una hiperrespuesta a estrés por sequía en comparación con los genotipos tolerantes (Yates *et al.*, 2014, Pucholt *et al.*, 2015, Fracasso *et al.*, 2016, Muthusamy *et al.*, 2016). Este hecho podría sugerir la ausencia de algunos mecanismos de evitación del estrés en los genotipos sensibles que atenúen los efectos de la sequía. Entre las rutas específicas que diferían entre genotipos sensibles y tolerantes destacan aquellas relacionadas con el metabolismo secundario implicadas en la biosíntesis de flavonas, flavonoles y carotenoides, cuyo papel en la respuesta al estrés hídrico ha sido ampliamente descrito (Gill y Tuteja 2010; Dao *et al.*, 2011; Ruiz-Sola *et al.*, 2014; Shojaie *et al.*, 2016). El análisis pormenorizado de los transcritos sobreexpresados en los diferentes órganos sometidos a sequía, nos permitió adquirir una visión global de su actividad funcional según el genotipo de la planta. Las raíces de genotipos tolerantes mostraban acumulación de transcritos relacionados con el transporte de carbohidratos solubles, proteínas implicadas en la cadena respiratoria, y asociadas a la acción de ABA. Por el contrario, las de los genotipos sensibles incluían transcritos que codifican proteínas de transporte en membranas, de resistencia a enfermedades y estrés y reguladores postranscripcionales. Los tallos de los genotipos sensibles sometidos a sequía también mostraron un mayor número de transcritos con un enriquecimiento de aquellos implicados en inmunidad y respuesta a estrés; mientras, en los tallos de los genotipos tolerantes se observó una acumulación de transcritos que participan en el metabolismo de lípidos, carbohidratos y aminoácidos. Por último, las acículas mostraron la mayor cantidad de transcritos relacionados con respuesta a sequía en genotipos sensibles, que era significativamente inferior al observado constitutivamente en los genotipos tolerantes. Se identificaron transcritos asociados con proteínas implicadas en la protección de ARN y otras proteínas, en detoxificación, fotosíntesis, biosíntesis de osmolitos, señalización, remodelación de la pared celular y metabolismo de poliaminas. En contraste, las acículas de los genotipos tolerantes mostraron una baja acumulación de transcritos en respuesta a sequía, que estaban implicados en la protección del plegamiento de moléculas, en ajuste osmótico y respuesta oxidativa.

El análisis de portainjertos reveló un efecto mayor de los portainjertos tolerantes en la expresión de genes relacionados con la respuesta a sequía en acículas de las púas injertadas, en respuesta a déficit hídrico. Este efecto se hacía visible tanto en púas Gal 1056 como Oria 6, siendo más acusado en plantas Oria 6 / R18T. Al analizar del efecto del portainjerto en plantas injertadas Gal 1056, se observó, en Gal 1056 / R18T, la sobreexpresión de genes asociados con la respuesta a sequía que codifican bHLH, NAC,

C2H2-ZF o WRKY; proteínas implicadas en respuesta a estímulo externo, en la acción de fitohormonas, en la homeostasis de proteínas y en metabolismo secundario, en particular, en la biosíntesis de flavonoides. Por el contrario, no se observaron cambios en genes implicados en el metabolismo de terpenos entre plantas injertadas sobre los portainjertos sensibles y tolerantes. Los injertos Oria 6 / R18T sometidos a estrés hídrico mostraron sobreexpresión de genes implicados en metabolismo de proteínas, homeostasis de proteínas y FTs. Por el contrario, no se detectaron diferencias en la respuesta a estímulo externo, ni en la acción de fitohormonas. Con respecto a la sobreexpresión de genes que codifican FTs, se identificaron, entre otros, factores implicados en respuesta a sequía como GRAS, ERF, MYB. Además, se observó un aumento muy significativo de genes implicados en el metabolismo de antocianinas y otros flavonoides. Como en el caso anterior, no se observaron diferencias en el metabolismo de terpenos. Estos resultados sugieren un efecto de los portainjertos tolerantes en el transcriptoma de las acículas de las púas injertadas en respuesta a sequía, que implica la comunicación a distancia entre los órganos subterráneos y aéreos, y por consiguiente una modulación de genes implicados en procesos asociados con la tolerancia al estrés hídrico moderado. A estos resultados observados al analizar los injertos que integran portainjertos tolerantes se une los derivados del estudio del efecto de la púa en plantas injertadas en respuesta a sequía. El análisis comparativo de los injertos Gal 1056 / R1S vs Oria 6 / R1S sometidos a déficit hídrico, reveló un enriquecimiento de genes sobreexpresados en Gal 1056 / R1S implicados en el metabolismo de terpenos, antocianinas y otros flavonoides, organización de la pared celular, homeostasis de proteínas, FTs asociados con la respuesta a sequía y acción de fitohormonas, como ABA. Asimismo, en Oria 6 / R1S se detectó una mayor acumulación de genes implicados en respuesta a estímulo externo. Estos resultados sugieren el control de diversos procesos asociados con respuesta a sequía por parte de los genotipos de las púas que, en el caso del progenitor tolerante, en condiciones control, muestra escasa variabilidad al comparar la expresión génica sobre ambos portainjertos. Estas observaciones también concuerdan con el estudio transcritómico de distintos órganos de individuos de la progenie Gal 1056 x Oria 6 sometidos a estrés hídrico, que reveló una marcada inducción de genes implicados en respuesta a sequía en genotipos sensibles.

El análisis metabólico del perfil de terpenos en respuesta a sequía reveló diferencias específicas en los diferentes órganos de plantas injertadas de *Pinus pinaster*. En concreto en acículas, se detectó una notable disminución de DRAs y variaciones en los niveles de otros terpenos como monoterpenos, sesquiterpenos o diterpenos neutros. Estos resultados coinciden con lo observado en otras especies de coníferas (Kainulainen *et al.*, 1992; Llusá y Peñuelas, 1998; Turtola *et al.*, 2003). Esta disminución de DRAs en acículas se correlacionó con el aumento observado en raíces en respuesta a sequía, que refuerza la idea de la comunicación y regulación bidireccional constitutiva descrita previamente en plantas injertadas, y que podría sugerir que ante déficit hídrico se produce una redistribución de terpenos entre púas y portainjertos de acuerdo a la disponibilidad de agua, mostrando una asignación coordinada de DRAs entre ambos órganos. Estos cambios fueron muy poco significativos en muestras de tallos de injertos sometidos a sequía. Además esta redistribución de DRAs de acículas a raíces en condiciones de sequía fue más acusada en plantas Gal 1056 / R1S, mientras que la

menor disminución de diterpenos ácidos en acículas fue detectado en plantas Gal 1056 / R18T y Oria 6 / R18T, y principalmente en Oria 6 / R18T. Parece claro que la intensidad de los cambios en los niveles de DRAs inducidos en respuesta a sequía en acículas y raíces de injertos de *Pinus pinaster* está relacionada con el nivel de tolerancia a sequía del portainjerto utilizado. Con respecto al resto de terpenos, también se detectaron cambios en los perfiles metabólicos en condiciones de escasez de agua, destacando nuevamente las observadas en Gal 1056 / R1S en los que se identificaron acumulaciones más altas o con tendencias opuestas a las observadas en el resto de combinaciones de genotipos, al igual que se ha descrito para otras especies de coníferas (Sancho-Knapik *et al.*, 2017). En acículas este efecto se observó tanto en monoterpenos y sesquiterpenos como en diterpenos neutros. Estos resultados coinciden con los observados a partir del análisis transcriptómico, que reveló una mayor acumulación de transcritos implicados en el metabolismo de terpenos en plantas Gal 1056 / R1S sometidas a sequía. El análisis de metabolitos primarios en acículas reveló también modificaciones en los perfiles metabólicos de múltiples compuestos. En plantas Gal 1056 / R1S y Gal 1056 / R18T sometidas a sequía se observó una acumulación diferencial de aminoácidos y otros compuestos nitrogenados, carbohidratos lípidos, compuestos fenólicos y lignanos. Esta acumulación era mayor en plantas Gal 1056 / R18T. Este resultado coincide con lo observado en el estudio de genes implicados en el metabolismo de compuestos fenólicos y de aminoácidos, ligeramente sobreexpresados en individuos injertados sobre el portainjerto tolerante frente al sensible. En plantas Gal 1056 / R1S sometidas a sequía se vieron alterados, principalmente, patrones metabólicos de compuestos relacionados con el metabolismo del carbono, que podría estar asociado con los patrones de acumulación y redistribución de DRAs en estos genotipos. En plantas Oria 6 injertadas sobre portainjertos tolerantes y sensibles sometidas a sequía se observó la acumulación diferencial de aminoácidos y compuestos nitrogenados, carbohidratos, lípidos y compuestos fenólicos, con un aumento más acusado de estos últimos compuestos en plantas Oria 6 / R18T, que correlaciona con los resultados del análisis transcriptómico.

Estos resultados en su conjunto proporcionan, por primera vez, un visión holística de la respuesta molecular a sequía de *Pinus pinaster*, incluyendo el análisis de clones e injertos sometidos a déficit hídrico. El estudio diferencial permitió comenzar a desentrañar la respuesta pre-adaptativa de los pinos tolerantes a la sequía. Asimismo, el análisis del efecto de los portainjertos tolerantes a la sequía sugieren su participación en la modulación de los perfiles transcriptómicos y metabólicos de las púas injertadas tanto en condiciones control como en respuesta a estrés hídrico, principalmente modificando la expresión de genes asociados con la respuesta a estímulo externo, la acción de fitohormonas, FTs de respuesta a sequía, homeostasis de proteínas, y acumulación de metabolitos secundarios como flavonoides y otros compuestos fenólicos, que inducen una mayor capacidad adaptativa de la planta injertada. De confirmarse estos resultados mediante el análisis de un mayor número de construcciones, el empleo de portainjertos seleccionados por su tolerancia a sequía podría constituir una estrategia para la producción de genotipos élite de *Pinus pinaster*, en muchos casos muy sensibles a sequía, con mayor capacidad adaptativa, y desarrollar una nueva línea en los programas de mejora de *Pinus pinaster*, centrada en la obtención y selección de portainjertos.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

1. El estudio de mezclas de ARN de acículas, tallos y raíces de individuos tolerantes o de individuos sensibles a sequía permite analizar tendencias de los perfiles de expresión génica en respuesta estrés hídrico.
2. El análisis transcriptómico de plantas de la progenie del cruce controlado Gal 1056 x Oria 6 revela que los genotipos tolerantes a la sequía acumulan un elevado número de transcritos relacionados con la respuesta a sequía incluso antes de ser sometidos a déficit hídrico, a diferencia de los genotipos sensibles.
3. Los genes expresados constitutivamente en genotipos tolerantes, que están relacionados con respuesta a sequía, implicados en señalización, la acción de hormonas y la protección contra el estrés, podrían proporcionar ventajas adaptativas frente a condiciones de déficit hídrico.
4. El análisis de los injertos Gal 1056 / R1S, Gal 1056 / R18T, Oria 6 / R1S y Oria 6 / R18T en condiciones control revela que el genotipo de los portainjertos afecta significativamente al perfil de expresión génica de las acículas de las púas del progenitor sensible a sequía Gal 1056. Así, las acículas de Gal 1056 / R18T muestran enriquecimiento de genes relacionados con tolerancia a estrés hídrico, implicados en respuesta a estímulo externo, acción de fitohormonas, biosíntesis del ARN y metabolismo secundario. Por el contrario, el perfil de expresión génica de las acículas de las púas del progenitor tolerante a la sequía, Oria 6, está poco afectado por los portainjertos sobre los que están injertadas, indicando un mayor efecto del genotipo tolerante de la púa.
5. En condiciones de déficit hídrico, las acículas de las púas de Oria 6 injertadas en portainjertos tolerantes muestran una mayor inducción de genes asociados principalmente con FTs relacionados con respuesta a sequía y biosíntesis de flavonoides. Asimismo, en este genotipo se observa sobreexpresión de genes implicados en la biosíntesis y señalización de ABA, fitohormona clave en la regulación de la respuesta a déficit hídrico.
6. También en condiciones de déficit hídrico, y con independencia del portainjerto, las acículas de las púas de Gal 1056 muestran un enriquecimiento de genes implicados en la organización de la pared celular, mientras que en Oria 6 están relacionados con respuesta a estímulo externo y homeostasis de proteínas, procesos que parecen estar determinados por el genotipo de la púa. Estos resultados sugieren que la respuesta a estrés hídrico observado en las acículas de los injertos es resultado de la integración de señales procedentes de ambos genotipos que conforman el injerto y por consiguiente, debe existir una comunicación entre púa y portainjerto que da lugar al perfil de expresión génica mostrado por cada construcción.
7. La comparación del perfil de expresión génica de las acículas de plantas injertadas sometidas a ambos regímenes hídricos, control y déficit hídrico moderado, revela una inducción génica mayor en plantas injertadas sobre portainjertos tolerantes, con un elevado porcentaje de genes implicados en

- respuesta a sequía. Asimismo, los resultados sugieren la existencia de un efecto del genotipo del portainjerto en la sobreexpresión constitutiva de una plétora de genes implicados en respuesta a estrés hídrico e inducción de tolerancia, asociada con el portainjertos tolerante.
8. El análisis del perfil metabólico revela que el genotipo de la púa y del portainjerto afecta al contenido cuantitativo y cualitativo de terpenos constitutivos y acumulados diferencialmente en respuesta a déficit hídrico en los distintos órganos de la planta injertada. Estas modificaciones podrían conferir sistemas de defensa compartimentados de respuesta a estrés para la asignación optimizada de los recursos a largo plazo.
 9. La procedencia de la púa es determinante en la diversidad del perfil de terpenos en la acícula, con diferencias más marcadas en el contenido de diterpenos neutros y ácidos. Además, se confirma la existencia de una potencial comunicación entre órganos, no sólo desde los subterráneos a los aéreos, sino también en sentido contrario. La sequía afecta a la distribución constitutiva de terpenos entre acículas y raíces, proporcionando un mayor nivel defensivo en raíces bajo condiciones de escasez de agua.
 10. El genotipo de la púa y del portainjerto también afecta a los niveles de monoterpenos y sesquiterpenos, mostrando en general modificaciones más intensas bajo niveles moderados de estrés hídrico, por lo que podemos considerarlos parte de la respuesta temprana a sequía.
 11. En condiciones control ya se detectan variaciones significativas en los patrones metabólicos de acículas en relación a los genotipos de púa y portainjerto, que afectan a la biosíntesis de lípidos, azúcares, polialcoholes, ácidos orgánicos, transportadores de electrones, aminoácidos y compuestos fenólicos. Las mayores diferencias se observan en el metaboloma de acículas de púas injertadas en portainjertos sensibles.
 12. En la respuesta a déficit hídrico, el análisis del metaboloma en acículas identifica patrones diferenciales en función del genotipo de púa y portainjerto, con una influencia mayor del genotipo de la púa, produciendo la sequía una acumulación significativa de la mayoría de los metabolitos, dirigida a mantener el potencial osmótico, en el que el pinitol participa activamente, así como el equilibrio redox con los compuestos fenólicos flavonoideos y no flavonoideos como importantes antioxidantes.
 13. La acícula de *Pinus pinaster* en plantas injertadas se adapta a situaciones de déficit hídrico desarrollando una estrategia metabólica propia en cada combinación de púa y portainjerto. En relación al genotipo de la púa, las diferencias en la respuesta metabólica a sequía están asociadas con compuestos fenólicos, lignanos y ácidos grasos, mientras que las debidas al genotipo del portainjerto lo están con el metabolismo del nitrógeno y de carbohidratos, así como del ácido quínico en plantas injertadas sobre el

portainjerto tolerante, y del ácido linolénico en plantas injertadas sobre el portainjerto sensible

14. La tolerancia a sequía del portainjerto es un importante factor para determinar el nivel de acumulación de los metabolitos en la acícula de la planta injertada en respuesta a sequía, pero en esta respuesta es también de gran importancia el genotipo de la púa injertada, particularmente si se utilizan púas de genotipos tolerantes a sequía como Oria 6.
15. El estudio centrado en los injertos ha aportado nueva información sobre el control molecular de la respuesta a sequía de *Pinus pinaster*, revelándose como un sistema experimental con el que poder abordar el análisis de la comunicación e interpretación de las señales generadas por la parte aérea (acículas y tallos) y subterránea (raíces) en respuesta al estrés hídrico. Asimismo, si se confirman los resultados obtenidos con un mayor número de genotipos, e incorporando un seguimiento de la respuesta a sequía a lo largo del desarrollo de los injertos, la selección y mejora de portainjertos de la especie podría permitir la propagación de púas de genotipos élite de *Pinus pinaster* sensibles a sequía, mejorando su capacidad adaptativa.

CAPÍTULO VI: REFERENCIAS

- Abarca, D., Pizarro, A., Hernández, I., Sánchez, C., Solana, S. P., del Amo, A., Carneros, E., & Díaz-Sala, C. (2014). The GRAS gene family in pine: Transcript expression patterns associated with the maturation-related decline of competence to form adventitious roots. *BMC Plant Biology*, *14*(1), 354. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0354-8>
- Acosta, J. J., Fahrenkrog, A. M., Neves, L. G., Resende, M. F. R., Dervinis, C., Davis, J. M., Holliday, J. A., & Kirst, M. (2019). Exome resequencing reveals evolutionary history, genomic diversity, and targets of selection in the conifers *Pinus taeda* and *Pinus elliottii*. *Genome Biology and Evolution*, *11*(2), 508-520. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz016>
- Adams, R.P., 1989. Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy. Academic Press, San Diego, California. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-044230-0.50001-0>.
- Afzal, Z., Howton, T., Sun, Y., & Mukhtar, M. (2016). The roles of aquaporins in plant stress responses. *Journal of Developmental Biology*, *4*(1), 9. <https://doi.org/10.3390/jdb4010009>
- Agati, G., & Tattini, M. (2010). Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytologist*, *186*(4), 786-793. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03269.x>
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., & Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science*, *196*, 67-76. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.07.014>
- Ahmad, I., Mian, A., & Maathuis, F. J. M. (2016). Overexpression of the rice AKT1 potassium channel affects potassium nutrition and rice drought tolerance. *Journal of Experimental Botany*, *67*(9), 2689-2698. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw103>
- Ahuja, M. R., & Neale, D. B. (2005). Evolution of Genome Size in Conifers. *Silvae Genetica*, *54*(1-6), 126-137. <https://doi.org/10.1515/sg-2005-0020>
- Aitken, S. N., Yeaman, S., Holliday, J. A., Wang, T., & Curtis-McLane, S. (2008). Adaptation, migration or extirpation: Climate change outcomes for tree populations. *Evolutionary Applications*, *1*(1), 95-111. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2007.00013.x>
- Aizat, W. M., Baharum, S. N., & Goh, H.-H. (Eds.). (2018). *Omics Applications for Systems Biology* (1st ed. 2018). Springer International Publishing: Imprint: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-98758-3>
- Albacete, A., Martínez-Andujar, C., Martínez-Perez, A., Thompson, A. J., Dodd, I. C., & Pérez-Alfocea, F. (2015). Unravelling rootstockxscion interactions to improve food security. *Journal of Experimental Botany*, *66*(8), 2211-2226. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv027>
- Alcázar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C., Carrasco, P., & Tiburcio, A. F. (2010). Polyamines: Molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta*, *231*(6), 1237-1249. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1130-0>
- Alía, R., Martín, S., de Miguel, J., Galera, R., Agúndez, D., Gordo, J., Salvador L., Catalán, G., & Gil, A. 1996. Regiones de procedencia *Pinus pinaster* Aiton. *Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Madrid*, 75.

- Alía Miranda, R. & Organismo Autónomo Parques Nacionales. (2009a). *Regiones de procedencia de especies forestales en España*. Organismo Autónomo Parques Nacionales.
- Alía, R., & Martín, S. (2009). Guía técnica para la conservación genética y utilización del pino negral (*Pinus pinaster*). *Foresta, Madrid, España*, 2.
- Allan, A. C., Hellens, R. P., & Laing, W. A. (2008). MYB transcription factors that colour our fruit. *Trends in Plant Science*, 13(3), 99-102. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.11.012>
- Alonso, R., Salavert, F., Garcia-Garcia, F., Carbonell-Caballero, J., Bleda, M., Garcia-Alonso, L., Sanchis-Juan, A., Perez-Gil, D., Marin-Garcia, P., Sanchez, R., Cubuk, C., Hidalgo, M. R., Amadoz, A., Hernansaiz-Ballesteros, R. D., Alemán, A., Tarraga, J., Montaner, D., Medina, I., & Dopazo, J. (2015). Babelomics 5.0: Functional interpretation for new generations of genomic data. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W117-W121. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv384>
- Al-Shahrour, F., Minguez, P., Tarraga, J., Medina, I., Alloza, E., Montaner, D., & Dopazo, J. (2007). FatiGO+: A functional profiling tool for genomic data. Integration of functional annotation, regulatory motifs and interaction data with microarray experiments. *Nucleic Acids Research*, 35(suppl_2), W91-W96. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm260>
- Alsina, M. M., Smart, D. R., Bauerle, T., de Herralde, F., Biel, C., Stockert, C., Negron, C., & Save, R. (2011). Seasonal changes of whole root system conductance by a drought-tolerant grape root system. *Journal of Experimental Botany*, 62(1), 99-109. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq247>
- Amorim-Silva, V., García-Moreno, Á., Castillo, A. G., Lakhssassi, N., Esteban del Valle, A., Pérez-Sancho, J., Li, Y., Posé, D., Pérez-Rodríguez, J., Lin, J., Valpuesta, V., Borsani, O., Zipfel, C., Macho, A. P., & Botella, M. A. (2019). TTL proteins scaffold brassinosteroid signaling components at the plasma membrane to optimize signal transduction in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 31(8), 1807-1828. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00150>
- Amos, R. A., & Mohnen, D. (2019). Critical review of plant cell wall matrix polysaccharide glycosyltransferase activities verified by heterologous protein expression. *Frontiers in Plant Science*, 10, 915. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00915>
- An, J., Zhang, X., Bi, S., You, C., Wang, X., & Hao, Y. (2020). The ERF transcription factor MdERF38 promotes drought stress-induced anthocyanin biosynthesis in apple. *The Plant Journal*, 101(3), 573-589. <https://doi.org/10.1111/tpj.14555>
- Anders, S., & Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*, 11(10), R106. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-10-r106>
- Andrews, S. (2010). *FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data*. 2010.
- Aranda, I., Alía, R., Ortega, U., Dantas, Â. K., & Majada, J. (2010). Intra-specific variability in biomass partitioning and carbon isotopic discrimination under moderate drought stress in seedlings from four *Pinus pinaster* populations. *Tree Genetics & Genomes*, 6(2), 169-178. <https://doi.org/10.1007/s11295-009-0238-5>

- Aranda, I., Gil-Pelegrín, E., Gascó, A., Guevara, M. A., Cano, J. F., De Miguel, M., Ramírez-Valiente, J. A., Peguero-Pina, J. J., Perdiguero, P., Soto, A., Cervera, M. T., & Collada, C. (2012). Drought Response in Forest Trees: From the Species to the Gene. En R. Aroca (Ed.), *Plant Responses to Drought Stress* (pp. 293-333). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-32653-0_12
- Aranda, I., Cano, F. J., Gasco, A., Cochard, H., Nardini, A., Mancha, J. A., Lopez, R., & Sanchez-Gomez, D. (2015). Variation in photosynthetic performance and hydraulic architecture across European beech (*Fagus sylvatica* L.) populations supports the case for local adaptation to water stress. *Tree Physiology*, 35(1), 34-46. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpu101>
- Aranda, I., Sánchez-Gómez, D., de Miguel, M., Mancha, J. A., Guevara, M. A., Cadahía, E., & Fernández de Simón, M. B. (2017). *Fagus sylvatica* L. provenances maintain different leaf metabolic profiles and functional response. *Acta Oecologica*, 82, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2017.05.003>
- Aranda, I., Cadahía, E., & Fernández de Simón, B. (2021). Specific leaf metabolic changes that underlie adjustment of osmotic potential in response to drought by four *Quercus* species. *Tree Physiology*, 41, 728-743. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpaa157>
- Aranjuelo, I., Molero, G., Erice, G., Avice, J. C., & Nogués, S. (2011). Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, 62(1), 111-123. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq249>
- Araújo, W. L., Tohge, T., Ishizaki, K., Leaver, C. J., & Fernie, A. R. (2011). Protein degradation – an alternative respiratory substrate for stressed plants. *Trends in Plant Science*, S1360138511001063. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.05.008>
- Arnaud, D., Déjardin, A., Leplé, J.-C., Lesage-Descauses, M.-C., & Pilate, G. (2007). Genome-wide analysis of LIM gene family in *Populus trichocarpa*, *Arabidopsis thaliana*, and *Oryza sativa*. *DNA Research*, 14(3), 103-116. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsm013>
- Arrabal, C., García-Vallejo, M. C., Cadahia, E., Cortijo, M., & Fernández de Simón, B. (2012). Characterization of two chemotypes of *Pinus pinaster* by their terpene and acid patterns in needles. *Plant Systematics and Evolution*, 298(2), 511-522. <https://doi.org/10.1007/s00606-011-0562-8>
- Arrabal, C., García-Vallejo, M. C., Cadahia, E., Cortijo, M., & Fernández de Simón, B. (2014). Seasonal variations of lipophilic compounds in needles of two chemotypes of *Pinus pinaster* Ait. *Plant Systematics and Evolution*, 300(2), 359-367. <https://doi.org/10.1007/s00606-013-0888-5>
- Arsovski, A. A., Popma, T. M., Haughn, G. W., Carpita, N. C., McCann, M. C., & Western, T. L. (2009). *AtBXL1* encodes a bifunctional β -D-xylosidase/ α -L - arabinofuranosidase required for pectic arabinan modification in *Arabidopsis* mucilage secretory cells. *Plant Physiology*, 150(3), 1219-1234. <https://doi.org/10.1104/pp.109.138388>
- Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59(2), 206-216. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.12.006>

- Ashraf, N., Jain, D., & Vishwakarma, R. A. (2015). Identification, cloning and characterization of an ultrapetala transcription factor CsULT1 from *Crocus*: A novel regulator of apocarotenoid biosynthesis. *BMC Plant Biology*, *15*(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0423-7>
- Atkin, O. K., & Macherel, D. (2009). The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. *Annals of Botany*, *103*(4), 581-597. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn094>
- Ávila Flores, D. Y., & Pompa García, M. (2008). Caracterización de la reproducción clonal del género *Pinus* en Silvicultores Unidos de Guachochi, Chihuahua. *Universale forestum*, *7*(2), 12-15.
- Bae, K. S., Rahimi, S., Kim, Y. J., Devi, B. S. R., Khorolragchaa, A., Sukweenadhi, J., Silva, J., Myagmarjav, D., & Yang, D. C. (2016). Molecular characterization of lipoxygenase genes and their expression analysis against biotic and abiotic stresses in *Panax ginseng*. *European Journal of Plant Pathology*, *145*(2), 331-343. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0847-9>
- Baillo, E.H., Kimotho, R.N., Zhang, Z. & Xu, P. (2019). Transcription factors associated with abiotic and biotic stress tolerance and their potential for crops improvement. *Genes*, *10*(10), 771. <https://doi.org/10.3390/genes10100771>
- Bairoch, A. (2000). The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Research*, *28*(1), 45-48. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.45>
- Baldoni, E., Genga, A., & Cominelli, E. (2015). Plant MYB transcription factors: their role in drought response mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(7), 15811-15851. <https://doi.org/10.3390/ijms160715811>
- Balk, J., & Pilon, M. (2011). Ancient and essential: The assembly of iron–sulfur clusters in plants. *Trends in Plant Science*, *16*(4), 218-226. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.12.006>
- Bao, Y., Song, W. M., Pan, J., Jiang, C.-M., Srivastava, R., Li, B., Zhu, L. Y., Su, H. Y., Gao, X. S., Liu, H., Yu, X., Yang, L., Cheng, X. H., & Zhang, H. X. (2016). Overexpression of the NDR1/HIN1-like gene NHL6 modifies seed germination in response to abscisic acid and abiotic stresses in *Arabidopsis*. *PLOS ONE*, *11*(2), e0148572. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148572>
- Baradat, Ph., & Yazdani, R. (1988). Genetic expression for monoterpenes in clones of *Pinus sylvestris* grown on different sites. *Scandinavian Journal of Forest Research*, *3*(1-4), 25-36. <https://doi.org/10.1080/02827588809382492>
- Barchet, G. L. H., Dauwe, R., Guy, R. D., Schroeder, W. R., Soolanayakanahally, R. Y., Campbell, M. M., & Mansfield, S. D. (2014). Investigating the drought-stress response of hybrid poplar genotypes by metabolite profiling. *Tree Physiology*, *34*(11), 1203-1219. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpt080>
- Bathe, U., & Tissier, A. (2019). Cytochrome P450 enzymes: A driving force of plant diterpene diversity. *Phytochemistry*, *161*, 149-162. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.12.003>

- Bauerle, T. L., Centinari, M., & Bauerle, W. L. (2011). Shifts in xylem vessel diameter and embolisms in grafted apple trees of differing rootstock growth potential in response to drought. *Planta*, 234(5), 1045-1054. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1460-6>
- Bautista, I., Boscaiu, M., Lidón, A., Llinares, J. V., Lull, C., Donat, M. P., Mayoral, O., & Vicente, O. (2016). Environmentally induced changes in antioxidant phenolic compounds levels in wild plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(1), 9. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-2025-2>
- Bayati, P., Karimmojeni, H., & Razmjoo, J. (2020). Changes in essential oil yield and fatty acid contents in black cumin (*Nigella sativa* L.) genotypes in response to drought stress. *Industrial Crops and Products*, 155, 112764. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112764>
- Behringer, D., Zimmermann, H., Ziegenhagen, B., & Liepelt, S. (2015). Differential gene expression reveals candidate genes for drought stress response in *Abies alba* (Pinaceae). *PLOS ONE*, 10(4), e0124564. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124564>
- Bernacki, M. J., Czarnocka, W., Rusaczek, A., Witoń, D., Kęska, S., Czyż, J., Szechyńska-Hebda, M., & Karpiński, S. (2019). LSD1-, EDS1- and PAD4-dependent conditional correlation among salicylic acid, hydrogen peroxide, water use efficiency and seed yield in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 165(2), 369-382. <https://doi.org/10.1111/ppl.12863>
- Besnard, J., Sonawala, U., Maharjan, B., Collakova, E., Finlayson, S. A., Pilot, G., McDowell, J., & Okumoto, S. (2021). Increased expression of UMAMIT amino acid transporters results in activation of salicylic acid dependent stress response. *Frontiers in Plant Science*, 11, 606386. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.606386>
- Beveridge, C. A., Murfet, I. C., Kerhoas, L., Sotta, B., Miginiac, E., & Rameau, C. (1997). The shoot controls zeatin riboside export from pea roots. Evidence from the branching mutant RMS4. *The Plant Journal*, 11(2), 339-345. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.11020339.x>
- Bezemer, T., & van Dam, N. (2005). Linking aboveground and belowground interactions via induced plant defenses. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(11), 617-624. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.08.006>
- Bhaskara, G. B., Yang, T.-H., & Verslues, P. E. (2015). Dynamic proline metabolism: Importance and regulation in water limited environments. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00484>
- Bhogale, S., Mahajan, A. S., Natarajan, B., Rajabhoj, M., Thulasiram, H. V., & Banerjee, A. K. (2014). *MicroRNA156*: A potential graft-transmissible microRNA that modulates plant architecture and tuberization in *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. *Plant Physiology*, 164(2), 1011-1027. <https://doi.org/10.1104/pp.113.230714>
- Blanch, J. S., Peñuelas, J., Sardans, J., & Llusà, J. (2009). Drought, warming and soil fertilization effects on leaf volatile terpene concentrations in *Pinus halepensis* and *Quercus ilex*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(1), 207-218. <https://doi.org/10.1007/s11738-008-0221-z>
- Blanco Castro, E. (2005). *Los Bosques ibéricos: Una interpretación geobotánica*. Planeta.

- Bolle, C. (2004). The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta*, 218(5), 683-692. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1203-z>
- Bräutigam, K., Vining, K. J., Lafon-Placette, C., Fossdal, C. G., Mirouze, M., Marcos, J. G., Fluch, S., Fraga, M. F., Guevara, M. Á., Abarca, D., Johnsen, Ø., Maury, S., Strauss, S. H., Campbell, M. M., Rohde, A., Díaz-Sala, C., & Cervera, M. T. (2013). Epigenetic regulation of adaptive responses of forest tree species to the environment. *Ecology and Evolution*, 3(2), 399-415. <https://doi.org/10.1002/ece3.461>
- Brodribb, T. J., Feild, T. S., & Sack, L. (2010). Viewing leaf structure and evolution from a hydraulic perspective. *Functional Plant Biology*, 37(6), 488. <https://doi.org/10.1071/FP10010>
- Brunetti, C., George, R. M., Tattini, M., Field, K., & Davey, M. P. (2013). Metabolomics in plant environmental physiology. *Journal of Experimental Botany*, 64(13), 4011-4020. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert244>
- Bucci, G., González-Martínez, S. C., Le Provost, G., Plomion, C., Ribeiro, M. M., Sebastiani, F., Alía, R., & Vendramin, G. G. (2007). Range-wide phylogeography and gene zones in *Pinus pinaster* Ait. revealed by chloroplast microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 16(10), 2137-2153. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03275.x>
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, J. L. (2015). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. John Wiley & Sons.
- Buschiazzo, E., Ritland, C., Bohlmann, J., & Ritland, K. (2012). Slow but not low: Genomic comparisons reveal slower evolutionary rate and higher dN/dS in conifers compared to angiosperms. *BMC Evolutionary Biology*, 12(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-8>
- Bushnell, B. (2014). *BBMap: A fast, accurate, splice-aware aligner*. Lawrence Berkeley National Lab. (LBNL), Berkeley, CA (United States).
- Bussotti, F., Pollastrini, M., Holland, V., & Brüggemann, W. (2015). Functional traits and adaptive capacity of European forests to climate change. *Environmental and Experimental Botany*, 111, 91-113. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.11.006>
- Büttner, M. (2007). The monosaccharide transporter (-like) gene family in *Arabidopsis*. *FEBS Letters*, 581(12), 2318-2324. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.03.016>
- Cabezas, J. A., González-Martínez, S. C., Collada, C., Guevara, M. A., Boury, C., de María, N., Eveno, E., Aranda, I., Garnier-Géré, P. H., Brach, J., Alía, R., Plomion, C., & Cervera, M. T. (2015). Nucleotide polymorphisms in a pine ortholog of the *Arabidopsis* degrading enzyme cellulase KORRIGAN are associated with early growth performance in *Pinus pinaster*. *Tree Physiology*, 35(9), 1000-1006. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpv050>
- Calama, R., Tome, M., Sánchez-González, M., Miina, J., Spanos, K., & Palahi, M. (2010). Modelling non-wood forest products in Europe: A review. *Forest Systems*, 3(4), 69. <https://doi.org/10.5424/fs/201019S-9324>
- Canales, J., Bautista, R., Label, P., Gómez-Maldonado, J., Lesur, I., Fernández-Pozo, N., Rueda-López, M., Guerrero-Fernández, D., Castro-Rodríguez, V., Benzekri, H., Cañas, R. A., Guevara, M.-A., Rodrigues, A., Seoane, P., Teyssier, C., Morel, A., Ehrenmann,

- F., Le Provost, G., Lalanne, C., Cánovas, F. M. (2014). *De novo* assembly of maritime pine transcriptome: Implications for forest breeding and biotechnology. *Plant Biotechnology Journal*, 12(3), 286-299. <https://doi.org/10.1111/pbi.12136>
- Cano, F. J., Sánchez-Gómez, D., Rodríguez-Calcerrada, J., Warren, C. R., Gil, L., & Aranda, I. (2013). Effects of drought on mesophyll conductance and photosynthetic limitations at different tree canopy layers: Limitations to carbon uptake into the canopy. *Plant, Cell & Environment*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/pce.12103>
- Cañas, R. A., Canales, J., Muñoz-Hernández, C., Granados, J. M., Ávila, C., García-Martín, M. L., & Cánovas, F. M. (2015). Understanding developmental and adaptive cues in pine through metabolite profiling and co-expression network analysis. *Journal of Experimental Botany*, 66(11), 3113-3127. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv118>
- Cañas, R. A., Feito, I., Fuente-Maqueda, J. F., Ávila, C., Majada, J., & Cánovas, F. M. (2015a). Transcriptome-wide analysis supports environmental adaptations of two *Pinus pinaster* populations from contrasting habitats. *BMC Genomics*, 16(1), 909. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2177-x>
- Cao, F., Wei, Y., Wang, X., Li, Y., Peng, F., (2019). A study of the evaluation of the pecan drought resistance of grafted 'Pawnee' trees from different seedling rootstocks.
- Caudullo, G., Welk, E., & San-Miguel-Ayanz, J. (2017). Chorological maps for the main European woody species. *Data in Brief*, 12, 662-666. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2017.05.007>
- Ceballos, R., & Rioja, T. (2019). Rootstock affects the blend of biogenic volatile organic compounds emitted by avocado. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 79(2), 330-334. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392019000200330>
- Chanda, B., Xia, Y., Mandal, M. K., Yu, K., Sekine, K., Gao, Q., Selote, D., Hu, Y., Stromberg, A., Navarre, D., Kachroo, A., & Kachroo, P. (2011). Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants. *Nature Genetics*, 43(5), 421-427. <https://doi.org/10.1038/ng.798>
- Chang, S., Puryear, J., & Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11(2), 113-116. <https://doi.org/10.1007/BF02670468>
- Chang, B., Ma, K., Lu, Z., Lu, J., Cui, J., Wang, L., & Jin, B. (2020). Physiological, transcriptomic, and metabolic responses of *Ginkgo biloba* L. to drought, salt, and heat stresses. *Biomolecules*, 10(12), 1635. <https://doi.org/10.3390/biom10121635>
- Chaves, M., & Davies, B. (2010). Drought effects and water use efficiency: Improving crop production in dry environments. *Functional Plant Biology*, 37(2), iii. https://doi.org/10.1071/FPv37n2_FO
- Chaves, M. M., Flexas, J., & Pinheiro, C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 103(4), 551-560. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn125>
- Chen, F., Kota, P., Blount, J. W., & Dixon, R. A. (2001). Chemical syntheses of caffeoyl and 5-OH coniferyl aldehydes and alcohols and determination of lignin O-methyltransferase activities in dicot and monocot species. *Phytochemistry*, 58(7), 1035-1042. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00391-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00391-0)

- Chen, H., & Jiang, J. G. (2010). Osmotic adjustment and plant adaptation to environmental changes related to drought and salinity. *Environmental Reviews*, 18(NA), 309-319. <https://doi.org/10.1139/A10-014>
- Chen, X., Hu, Y., & Zhou, D. X. (2011). Epigenetic gene regulation by plant Jumonji group of histone demethylase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1809(8), 421-426. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.03.004>
- Chen, X., Yao, Q., Gao, X., Jiang, C., Harberd, N. P., & Fu, X. (2016). Shoot-to-root mobile transcription factor HY5 coordinates plant carbon and nitrogen acquisition. *Current Biology*, 26(5), 640-646. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.066>
- Chen, X., Li, C., Wang, H., & Guo, Z. (2019). WRKY transcription factors: Evolution, binding, and action. *Phytopathology Research*, 1(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s42483-019-0022-x>
- Chen, S., Yi, L., Korpelainen, H., Yu, F., Liu, M., (2020). Roots play a key role in drought tolerance of poplars as suggested by reciprocal grafting between male and female clones. *Plant Physiology and Biochemistry*. 153, 81-91. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.05.014>, 91-91.
- Cheng, S. S., Chung, M.-J., Lin, C. Y., Wang, Y. N., & Chang, S. T. (2012). Phytochemicals from *Cunninghamia konishii* Hayata act as antifungal agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(1), 124-128. <https://doi.org/10.1021/jf2042196>
- Cheng, J., Li, H., Wang, W., Duan, C., Wang, J., & He, F. (2020). The influence of rootstocks on the scions' aromatic profiles of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay. *Scientia Horticulturae*, 272, 109517. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109517>
- Chinnusamy, V., & Zhu, J. K. (2009). Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(2), 133-139. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.12.006>
- Chong, J., Soufan, O., Li, C., Caraus, I., Li, S., Bourque, G., Wishart, D. S., & Xia, J. (2018). MetaboAnalyst 4.0: Towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W486-W494. <https://doi.org/10.1093/nar/gky310>
- Chu, C., Hsu, A. L., Chou, K. H., Bandettini, P., & Lin, C. (2012). Does feature selection improve classification accuracy? Impact of sample size and feature selection on classification using anatomical magnetic resonance images. *NeuroImage*, 60(1), 59-70. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.11.066>
- Conde, A., Regalado, A., Rodrigues, D., Costa, J. M., Blumwald, E., Chaves, M. M., & Gerós, H. (2015). Polyols in grape berry: Transport and metabolic adjustments as a physiological strategy for water-deficit stress tolerance in grapevine. *Journal of Experimental Botany*, 66(3), 889-906. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru446>
- Conesa, A., Gotz, S., Garcia-Gomez, J. M., Terol, J., Talon, M., & Robles, M. (2005). Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21(18), 3674-3676. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti610>
- Corcuera, L., Gil-Pelegrin, E., & Notivol, E. (2010). Phenotypic plasticity in *Pinus pinaster* $\delta^{13}\text{C}$: Environment modulates genetic variation. *Annals of Forest Science*, 67(8), 812-812. <https://doi.org/10.1051/forest/2010048>

- Corcuera, L., Gil-Pelegri, E., & Notivol, E. (2012). Differences in hydraulic architecture between mesic and xeric *Pinus pinaster* populations at the seedling stage. *Tree Physiology*, 32(12), 1442-1457. <https://doi.org/10.1093/treephys/tps103>
- Cosgrove, D. J. (2000). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*, 407(6802), 321-326. <https://doi.org/10.1038/35030000>
- Cowan, A. Keith., Freeman, M., Björkman, P.-O., Nicander, B., Sitbon, F., & Tillberg, E. (2005). Effects of senescence-induced alteration in cytokinin metabolism on source-sink relationships and ontogenic and stress-induced transitions in tobacco. *Planta*, 221(6), 801-814. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-1489-5>
- Crepeau, M. W., Langley, C. H., & Stevens, K. A. (2017). From Pine Cones to Read Clouds: Rescaffolding the Megagenome of Sugar Pine (*Pinus lambertiana*). *G3 Genes Genomes Genetics*, 7(5), 1563-1568. <https://doi.org/10.1534/g3.117.040055>
- Crozet, P., Margalha, L., Confraria, A., Rodrigues, A., Martinho, C., Adamo, M., Elias, C. A., & Baena-González, E. (2014). Mechanisms of regulation of SNF1/AMPK/SnRK1 protein kinases. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00190>
- Cruz de Carvalho, M. H. (2008). Drought stress and reactive oxygen species: Production, scavenging and signaling. *Plant Signaling & Behavior*, 3(3), 156-165. <https://doi.org/10.4161/psb.3.3.5536>
- Cuevas-Cruz, J. C., Jiménez-Casas, M., Jasso-Mata, J., Pérez-Rodríguez, P., López-Uptón, J., & Villegas-Monter, Á. (2015). Asexual propagation of *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. Et Cham. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, XXI (1), 81-95. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2014.08.033>
- Cui, X. Y., Gao, Y., Guo, J., Yu, T. F., Zheng, W. J., Liu, Y. W., Chen, J., Xu, Z. S., & Ma, Y. Z. (2019). BES/BZR transcription factor TaBZR2 positively regulates drought responses by activation of *TaGST1*. *Plant Physiology*, 180(1), 605-620. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00100>
- Czarnocka, W., Fichman, Y., Bernacki, M., Rózańska, E., Sańko-Sawczenko, I., Mittler, R., & Karpiński, S. (2020). FMO1 is involved in excess light stress-induced signal transduction and cell death signaling. *Cells*, 9(10), 2163. <https://doi.org/10.3390/cells9102163>
- Daher, F. B., & Braybrook, S. A. (2015). How to let go: Pectin and plant cell adhesion. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00523>
- D'Andrea, R. M., Andreo, C. S., & Lara, M. V. (2014). Deciphering the mechanisms involved in *Portulaca oleracea* (C₄) response to drought: Metabolic changes including crassulacean acid-like metabolism induction and reversal upon re-watering. *Physiologia Plantarum*, 152(3), 414-430. <https://doi.org/10.1111/ppl.12194>
- Dao, T. T. H., Linthorst, H. J. M., & Verpoorte, R. (2011). Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochemistry Reviews*, 10(3), 397-412. <https://doi.org/10.1007/s11101-011-9211-7>
- Daszkowska-Golec, A., & Szarejko, I. (2013). The molecular basis of ABA-mediated plant response to drought. En K. Vahdati (Ed.), *Abiotic Stress—Plant Responses and Applications in Agriculture*. InTech. <https://doi.org/10.5772/53128>

- Davey, M. P., Burrell, M. M., Woodward, F. I., & Quick, W. P. (2008). Population-specific metabolic phenotypes of *Arabidopsis lyrata* ssp. *petraea*. *New Phytologist*, *0*(0), 071119221045001. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02282.x>
- David, R. (1974). La fixation des dunes de la region d'Aquitaine: Role du pin maritime, influence de l'eau sur la croissance du pin. *International Journal of Biometeorology*, *18*(2), 128-132. <https://doi.org/10.1007/BF01452233>
- de Magalhães Erismann, N., Caruso Machado, E., & Sant' Anna Tucci, M. L. (2008). Photosynthetic limitation by CO₂ diffusion in drought stressed orange leaves on three rootstocks. *Photosynthesis Research*, *96*(2), 163-172. <https://doi.org/10.1007/s11120-008-9297-y>
- de María, N., Guevara, M. Á., Perdiguero, P., Vélez, M. D., Cabezas, J. A., López-Hinojosa, M., Li, Z., Díaz, L. M., Pizarro, A., Mancha, J. A., Sterck, L., Sánchez-Gómez, D., Miguel, C., Collada, C., Díaz-Sala, M. C., & Cervera, M. T. (2020). Molecular study of drought response in the Mediterranean conifer *Pinus pinaster* Ait.: Differential transcriptomic profiling reveals constitutive water deficit-independent drought tolerance mechanisms. *Ecology and Evolution*, *10*(18), 9788-9807. <https://doi.org/10.1002/ece3.6613>
- de Miguel, M., de Maria, N., Guevara, M., Diaz, L., Sáez-Laguna, E., Sánchez-Gómez, D., Chancerel, E., Aranda, I., Collada, C., Plomion, C., Cabezas, J. A., & Cervera, M. T. (2012a). Annotated genetic linkage maps of *Pinus pinaster* Ait. From a Central Spain population using microsatellite and gene based markers. *BMC Genomics*, *13*(1), 527. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-527>
- de Miguel, M., Sánchez-Gomez, D., Cervera, M. T., & Aranda, I. (2012). Functional and genetic characterization of gas exchange and intrinsic water use efficiency in a full-sib family of *Pinus pinaster* Ait. in response to drought. *Tree Physiology*, *32*(1), 94-103. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpr122>
- de Miguel, M., Cabezas, J.-A., de María, N., Sánchez-Gómez, D., Guevara, M.-Á., Vélez, M.-D., Sáez-Laguna, E., Díaz, L.-M., Mancha, J.-A., Barbero, M.-C., Collada, C., Díaz-Sala, C., Aranda, I., & Cervera, M.-T. (2014). Genetic control of functional traits related to photosynthesis and water use efficiency in *Pinus pinaster* Ait. drought response: Integration of genome annotation, allele association and QTL detection for candidate gene identification. *BMC Genomics*, *15*(1), 464. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-464>
- de Miguel, M., Guevara, M. Á., Sánchez-Gómez, D., de María, N., Díaz, L. M., Mancha, J. A., Fernández de Simón, B., Cadahía, E., Desai, N., Aranda, I., & Cervera, M.-T. (2016). Organ-specific metabolic responses to drought in *Pinus pinaster* Ait. *Plant Physiology and Biochemistry*, *102*, 17-26. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.02.013>
- De Ollas, C., Arbona, V., Gómez-Cadenas, A., & Dodd, I. C. (2018). Attenuated accumulation of jasmonates modifies stomatal responses to water deficit. *Journal of Experimental Botany*, *69*(8), 2103-2116. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery045>
- del Carmen Martínez-Ballesta, M., Moreno, D., & Carvajal, M. (2013). The Physiological Importance of Glucosinolates on Plant Response to Abiotic Stress in Brassica. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(6), 11607-11625. <https://doi.org/10.3390/ijms140611607>

- De-Li, S. O. N. G., Shao-Ling, J. I., & Li-Min, Z. (2007). Primary study on survival and growth potential of different grafting methods for Korean pine (J.). *Jilin Forestry Science and Technology*, 3, 002.
- Deluc, L., Bogs, J., Walker, A. R., Ferrier, T., Decendit, A., Merillon, J.-M., Robinson, S. P., & Barrieu, F. (2008). The transcription factor VvMYB5b contributes to the regulation of anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in developing grape berries. *Plant Physiology*, 147(4), 2041-2053. <https://doi.org/10.1104/pp.108.118919>
- De-Lucas, A. I., González-Martínez, S. C., Vendramin, G. G., Hidalgo, E., & Heuertz, M. (2009). Spatial genetic structure in continuous and fragmented populations of *Pinus pinaster* Aiton. *Molecular Ecology*, 18(22), 4564-4576. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04372.x>
- Dittrich, M., Mueller, H. M., Bauer, H., Peirats-Llobet, M., Rodriguez, P. L., Geilfus, C.-M., Carpentier, S. C., Al Rasheid, K. A. S., Kollist, H., Merilo, E., Herrmann, J., Müller, T., Ache, P., Hetherington, A. M., & Hedrich, R. (2019). The role of *Arabidopsis* ABA receptors from the PYR/PYL/RCAR family in stomatal acclimation and closure signal integration. *Nature Plants*, 5(9), 1002-1011. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0490-0>
- Dodd, I. C., Theobald, J. C., Richer, S. K., & Davies, W. J. (2009). Partial phenotypic reversion of ABA-deficient flacca tomato (*Solanum lycopersicum*) scions by a wild-type rootstock: Normalizing shoot ethylene relations promotes leaf area but does not diminish whole plant transpiration rate. *Journal of Experimental Botany*, 60(14), 4029-4039. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp236>
- Dolgikh, V. A., Pukhovaya, E. M., & Zemlyanskaya, E. V. (2019). Shaping ethylene response: The role of EIN3/EIL1 transcription factors. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1030. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01030>
- Dong, H., Niu, Y., Li, W., & Zhang, D. (2008). Effects of cotton rootstock on endogenous cytokinins and abscisic acid in xylem sap and leaves in relation to leaf senescence. *Journal of Experimental Botany*, 59(6), 1295-1304. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern035>
- Duan, Q., Kleiber, A., Jansen, K., Junker-Frohn, L. V., Kammerer, B., Han, G., Zimmer, I., Rennenberg, H., Schnitzler, J.-P., Ensminger, I., Gessler, A., & Kreuzwieser, J. (2019). Effects of elevated growth temperature and enhanced atmospheric vapour pressure deficit on needle and root terpenoid contents of two Douglas fir provenances. *Environmental and Experimental Botany*, 166, 103819. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103819>
- Durán, R., Rodriguez, V., Carrasco, A., Neale, D., Balocchi, C., & Valenzuela, S. (2019). SNP discovery in radiata pine using a de novo transcriptome assembly. *Trees*, 33(5), 1505-1511. <https://doi.org/10.1007/s00468-019-01875-w>
- Eckert, A. J., van Heerwaarden, J., Wegrzyn, J. L., Nelson, C. D., Ross-Ibarra, J., González-Martínez, S. C., & Neale, David. B. (2010). Patterns of population structure and environmental associations to aridity across the range of loblolly pine (*Pinus taeda* L., Pinaceae). *Genetics*, 185(3), 969-982. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.115543>
- Estan, M. T. (2005). Grafting raises the salt tolerance of tomato through limiting the transport of sodium and chloride to the shoot. *Journal of Experimental Botany*, 56(412), 703-712. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri027>

- Estravis-Barcala, M., Mattera, M. G., Soliani, C., Bellora, N., Opgenoorth, L., Heer, K., & Arana, M. V. (2020). Molecular bases of responses to abiotic stress in trees. *Journal of Experimental Botany*, 71(13), 3765-3779. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz532>
- Eveno, E., Collada, C., Guevara, M. A., Leger, V., Soto, A., Diaz, L., Leger, P., Gonzalez-Martinez, S. C., Cervera, M. T., Plomion, C., & Garnier-Gere, P. H. (2008). Contrasting patterns of selection at *Pinus pinaster* Ait. drought stress candidate genes as revealed by genetic differentiation analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 25(2), 417-437. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm272>
- Fàbregas, N., & Fernie, A. R. (2019). The metabolic response to drought. *Journal of Experimental Botany*, 70(4), 1077-1085. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery437>
- Falgueras, J., Lara, A. J., Fernandez-Pozo, N., Canton, F. R., Perez-Trabado, G., & Claros, M. G. (2010). SeqTrim: A high-throughput pipeline for preprocessing any type of sequence reads. *BMC Bioinformatics*, 11(1), 38. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-38>
- Fang, Y., & Xiong, L. (2015). General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(4), 673-689. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1767-0>
- Feng, W., Lindner, H., Robbins, N. E., & Dinneny, J. R. (2016). Growing out of stress: The role of cell- and organ-scale growth control in plant water-stress responses. *The Plant Cell*, 28(8), 1769-1782. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00182>
- Feng, Y., Liang, C., Li, B., Wan, T., Liu, T., & Cai, Y. (2017). Differential expression profiles and pathways of genes in drought resistant tree species *Prunus mahaleb* roots and leaves in response to drought stress. *Scientia Horticulturae*, 226, 75-84. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.07.057>
- Fernández de Simón, B., García Vallejo, M. C., Cadahía, E., Arrabal Miguel, C., & Cortijo Martínez, M. (2001). Analysis of lipophilic compounds in needles of *Pinus pinea* L. *Annals of Forest Science*, 58(4), 449-454. <https://doi.org/10.1051/forest:2001138>
- Fernández de Simón, B., Sanz, M., Cervera, M. T., Pinto, E., Aranda, I., & Cadahía, E. (2017). Leaf metabolic response to water deficit in *Pinus pinaster* Ait. relies upon ontogeny and genotype. *Environmental and Experimental Botany*, 140, 41-55. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.05.017>
- Fernández de Simón, B., Sanz, M., Sánchez-Gómez, D., Cadahía, E., & Aranda, I. (2020). Rising [CO₂] effect on leaf drought-induced metabolome in *Pinus pinaster* Aiton: Ontogenetic- and genotypic-specific response exhibit different metabolic strategies. *Plant Physiology and Biochemistry*, 149, 201-216. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.02.011>
- Fernández de Simón, B., Aranda, I., López-Hinojosa, M., Miguel, L., & Cervera, M. T. (2021). Scion-rootstock interaction and drought systemic effect modulate the organ-specific terpene profiles in grafted *Pinus pinaster* Ait. *Environmental and Experimental Botany*, 186, 104437. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104437>
- Fernández-García, N., Martínez, V., Cerdá, A., & Carvajal, M. (2002). Water and nutrient uptake of grafted tomato plants grown under saline conditions. *Journal of Plant Physiology*, 159(8), 899-905. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00652>

- Fernie, A. R., Carrari, F., & Sweetlove, L. J. (2004). Respiratory metabolism: Glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(3), 254-261. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.03.007>
- Ferreira-Santos, P., Zanusso, E., Genisheva, Z., Rocha, C. M. R., & Teixeira, J. A. (2020). Green and sustainable valorization of bioactive phenolic compounds from *Pinus* by-products. *Molecules*, 25(12), 2931. <https://doi.org/10.3390/molecules25122931>
- Fina, J. P., Masotti, F., Rius, S. P., Crevacuore, F., & Casati, P. (2017). HAC1 and HAF1 histone acetyltransferases have different roles in UV-B responses in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1179. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01179>
- Forner, A., Aranda, I., Granier, A., & Valladares, F. (2014). Differential impact of the most extreme drought event over the last half century on growth and sap flow in two coexisting Mediterranean trees. *Plant Ecology*, 215(7), 703-719. <https://doi.org/10.1007/s11258-014-0351-x>
- Forrest, K. L., & Bhave, M. (2007). Major intrinsic proteins (MIPs) in plants: A complex gene family with major impacts on plant phenotype. *Functional & Integrative Genomics*, 7(4), 263-289. <https://doi.org/10.1007/s10142-007-0049-4>
- Fox, H., Doron-Faigenboim, A., Kelly, G., Bourstein, R., Attia, Z., Zhou, J., Moshe, Y., Moshelion, M., & David-Schwartz, R. (2018). Transcriptome analysis of *Pinus halepensis* under drought stress and during recovery. *Tree Physiology*, 38(3), 423-441. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpx137>
- Foyer, C. H., Parry, M., & Noctor, G. (2003). Markers and signals associated with nitrogen assimilation in higher plants. *Journal of Experimental Botany*, 54(382), 585-593. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg053>
- Fracasso, A., Trindade, L. M., & Amaducci, S. (2016). Drought stress tolerance strategies revealed by RNA-Seq in two sorghum genotypes with contrasting WUE. *BMC Plant Biology*, 16(1), 115. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0800-x>
- Fundación Instituto Roche. 2018. Informes Anticipando biología de sistemas. *Observatorio de tendencias*. <https://www.institutoroche.es/observatorio/biologiadestemas>
- Gahlaut, V., Jaiswal, V., Kumar, A., & Gupta, P. K. (2016). Transcription factors involved in drought tolerance and their possible role in developing drought tolerant cultivars with emphasis on wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 129(11), 2019-2042. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2794-z>
- Gallavotti, A. (2013). The role of auxin in shaping shoot architecture. *Journal of Experimental Botany*, 64(9), 2593-2608. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert141>
- Gangappa, S. N., & Botto, J. F. (2014). The BBX family of plant transcription factors. *Trends in Plant Science*, 19(7), 460-470. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.01.010>
- Gautier, A. T., Chambaud, C., Brocard, L., Ollat, N., Gambetta, G. A., Delrot, S., & Cookson, S. J. (2019). Merging genotypes: Graft union formation and scion-rootstock interactions. *Journal of Experimental Botany*, 70(3), 747-755. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery422>
- Gebre, G. M., & Tschaplinski, T. J. (2002). Solute accumulation of chestnut oak and dogwood leaves in response to throughfall manipulation of an upland oak forest. *Tree Physiology*, 22(4), 251-260. <https://doi.org/10.1093/treephys/22.4.251>

- Gehl, B., & Sweetlove, L. J. (2014). Mitochondrial Band-7 family proteins: Scaffolds for respiratory chain assembly? *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00141>
- Geisler, M., & Murphy, A. S. (2006). The ABC of auxin transport: The role of p-glycoproteins in plant development. *FEBS Letters*, 580(4), 1094-1102. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.11.054>
- Ghodke, P. H., Andhale, P. S., Gijare, U. M., Thangasamy, A., Khade, Y. P., Mahajan, V., & Singh, M. (2018). Physiological and biochemical responses in onion crop to drought stress. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(1), 2054-2062. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.701.247>
- Gigon, A., Matos, A. R., Laffray, D., Zuily-Fodil, Y., & Pham-Thi, A. T. (2004). Effect of drought stress on lipid metabolism in the leaves of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia). *Annals of Botany*, 94(3), 345-351. <https://doi.org/10.1093/aob/mch150>
- Gil, L., & Prada, M. A. 1993. Los pinos como especies básicas de la restauración forestal en el medio mediterráneo. *Ecología*, 7:113-125.
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Gimeno, T. E., Camarero, J. J., Granda, E., Pias, B., & Valladares, F. (2012). Enhanced growth of *Juniperus thurifera* under a warmer climate is explained by a positive carbon gain under cold and drought. *Tree Physiology*, 32(3), 326-336. <https://doi.org/10.1093/treephys/tps011>
- Giorno, F., Wolters-Arts, M., Grillo, S., Scharf, K.-D., Vriezen, W. H., & Mariani, C. (2010). Developmental and heat stress-regulated expression of HsfA2 and small heat shock proteins in tomato anthers. *Journal of Experimental Botany*, 61(2), 453-462. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp316>
- Gish, L. A., & Clark, S. E. (2011). The RLK/Pelle family of kinases: *The Plant Journal*, 66(1), 117-127. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04518.x>
- Głowacka, K., Kromdijk, J., Kucera, K., Xie, J., Cavanagh, A. P., Leonelli, L., Leakey, A. D. B., Ort, D. R., Niyogi, K. K., & Long, S. P. (2018). Photosystem II Subunit S overexpression increases the efficiency of water use in a field-grown crop. *Nature Communications*, 9(1), 868. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03231-x>
- González-Martínez, S. C., Burczyk, J., Nathan, R., Nanos, N., Gil, L., & Alía, R. (2006). Effective gene dispersal and female reproductive success in Mediterranean maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton): reproductive success and dispersal in pine. *Molecular Ecology*, 15(14), 4577-4588. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03118.x>
- Gou, W., Zheng, P., Tian, L., Gao, M., Zhang, L., Akram, N. A., & Ashraf, M. (2017). Exogenous application of urea and a urease inhibitor improves drought stress tolerance in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Plant Research*, 130(3), 599-609. <https://doi.org/10.1007/s10265-017-0933-5>
- Gourcilleau, D., Bogeat-Triboulot, M.-B., Thiec, D., Lafon-Placette, C., Delaunay, A., El-Soud, W. A., Brignolas, F., & Maury, S. (2010). DNA methylation and histone acetylation: Genotypic variations in hybrid poplars, impact of water deficit and

- relationships with productivity. *Annals of Forest Science*, 67(2), 208-208. <https://doi.org/10.1051/forest/2009101>
- Gouveia, C. S., Ganança, J. F., Lebot, V., & de Carvalho, M. Â. P. (2018). Quantitation of oxalates in corms and shoots of *Colocasia esculenta* (L.) Schott under drought conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40(12), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2784-7>
- Grivet, D., Climent, J., Zabal-Aguirre, M., Neale, D. B., Vendramin, G. G., & González-Martínez, S. C. (2013). Adaptive evolution of Mediterranean pines. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 68(3), 555-566. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.03.032>
- Guignard, C., Jouve, L., Bogéat-Triboulot, M. B., Dreyer, E., Hausman, J.-F., & Hoffmann, L. (2005). Analysis of carbohydrates in plants by high-performance anion-exchange chromatography coupled with electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1085(1), 137-142. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.05.068>
- Gundaraniya, S. A., Ambalam, P. S., & Tomar, R. S. (2020). Metabolomic profiling of drought-tolerant and susceptible peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes in response to drought stress. *ACS Omega*, 5(48), 31209-31219. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c04601>
- Guo, D., Chen, F., Inoue, K., Blount, J. W., & Dixon, R. A. (2001). Downregulation of caffeic acid 3- *O*-methyltransferase and caffeoyl CoA 3-*O*--methyltransferase in transgenic alfalfa: Impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin. *The Plant Cell*, 13(1), 73-88. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.1.73>
- Guo, F.Q., Young, J., & Crawford, N. M. (2003). The nitrate transporter AtNRT1.1 (CHL1) functions in stomatal opening and contributes to drought susceptibility in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 15(1), 107-117. <https://doi.org/10.1105/tpc.006312>
- Guo, R., Shi, L., Jiao, Y., Li, M., Zhong, X., Gu, F., Liu, Q., Xia, X., & Li, H. (2018). Metabolic responses to drought stress in the tissues of drought-tolerant and drought-sensitive wheat genotype seedlings. *AoB PLANTS*, 10(2). <https://doi.org/10.1093/aobpla/ply016>
- Gupta, D. B., Rai, Y., Gayali, S., Chakraborty, S., & Chakraborty, N. (2016). Plant organellar proteomics in response to dehydration: turning protein repertoire into insights. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00460>
- Hahn, P. G., & Maron, J. L. (2016). A framework for predicting intraspecific variation in plant defense. *Trends in Ecology & Evolution*, 31(8), 646-656. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.05.007>
- Hale, B. K., Herms, D. A., Hansen, R. C., Clausen, T. P., & Arnold, D. (2005). Effects of drought stress and nutrient availability on dry matter allocation, phenolic glycosides, and rapid induced resistance of poplar to two lymantriid defoliators. *Journal of Chemical Ecology*, 31(11), 2601-2620. <https://doi.org/10.1007/s10886-005-7616-8>
- Hamanishi, E. T., Barchet, G. L., Dauwe, R., Mansfield, S. D., & Campbell, M. M. (2015). Poplar trees reconfigure the transcriptome and metabolome in response to drought in a genotype- and time-of-day-dependent manner. *BMC Genomics*, 16(1), 329. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1535-z>

- Hamiaux, C., Drummond, R. S. M., Janssen, B. J., Ledger, S. E., Cooney, J. M., Newcomb, R. D., & Snowden, K. C. (2012). DAD2 is an α/β hydrolase likely to be involved in the perception of the plant branching hormone, strigolactone. *Current Biology*, *22*(21), 2032-2036. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.08.007>
- Han, Q., Luo, J., Li, Z., Korpelainen, H., & Li, C. (2018). Improved drought resistance by intergeneric grafting in *Salicaceae* plants under water deficits. *Environmental and Experimental Botany*, *155*, 217-225. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.07.003>
- Han, Q., Guo, Q., Korpelainen, H., Niinemets, Ü., & Li, C. (2019). Rootstock determines the drought resistance of poplar grafting combinations. *Tree Physiology*, *39*(11), 1855-1866. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpz102>
- Han, G., Lu, C., Guo, J., Qiao, Z., Sui, N., Qiu, N., & Wang, B. (2020). C2H2 Zinc finger proteins: master regulators of abiotic stress responses in plants. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 115. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00115>
- Hare, P. D., Cress, W. A., & Van Staden, J. (1998). Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment*, *21*(6), 535-553. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00309.x>
- Harholt, J., Suttangkakul, A., & Vibe Scheller, H. (2010). Biosynthesis of pectin. *Plant Physiology*, *153*(2), 384-395. <https://doi.org/10.1104/pp.110.156588>
- Harwood, J. L. (1996). Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, *1301*(1-2), 7-56. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(95\)00242-1](https://doi.org/10.1016/0005-2760(95)00242-1)
- Hashida, S., Takahashi, H., & Uchimiya, H. (2009). The role of NAD biosynthesis in plant development and stress responses. *Annals of Botany*, *103*(6), 819-824. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp019>
- Hatier, J. H. B., & Gould, K. S. (2008). Anthocyanin function in vegetative organs. En C. Winefield, K. Davies, & K. Gould (Eds.), *Anthocyanins* (pp. 1-19). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77335-3_1
- He, M., Qin, C.-X., Wang, X., & Ding, N.-Z. (2020). Plant Unsaturated Fatty Acids: Biosynthesis and Regulation. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 390. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00390>
- Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Nakajima, K., Jung, J., Sena, G., Hauser, M.-T., & Benfey, P. N. (2000). The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell*, *101*(5), 555-567. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80865-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80865-X)
- Henke, C., Kunert, M., Veit, D., Kunert, G., Krause, K., Kothe, E., & Boland, W. (2015). Analysis of volatiles from *Picea abies* triggered by below-ground interactions. *Environmental and Experimental Botany*, *110*, 56-61. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.09.009>
- Hirakawa, Y., Uchida, N., Yamaguchi, Y. L., Tabata, R., Ishida, S., Ishizaki, K., Nishihama, R., Kohchi, T., Sawa, S., & Bowman, J. L. (2019). Control of proliferation in the haploid meristem by CLE peptide signaling in *Marchantia polymorpha*. *PLOS Genetics*, *15*(3), e1007997. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007997>

- Hoang, X. L. T., Nguyen, Y.-N. H., Thao, N. P., & Tran, L.-S. P. (2020). NAC transcription factors in drought and salinity tolerance. En M. Hasanuzzaman & M. Tanveer (Eds.), *Salt and Drought Stress Tolerance in Plants* (pp. 351-366). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-40277-8_14
- Hoffmann, C., Moes, D., Dieterle, M., Neumann, K., Moreau, F., Furtado, A. T., Dumas, D., Steinmetz, A., & Thomas, C. (2014). Live cell imaging reveals actin-cytoskeleton-induced self-association of the actin-bundling protein WLIM1. *Journal of Cell Science*, *127*(6), 1357-1357. <https://doi.org/10.1242/jcs.151852>
- Huang, G. T., Ma, S. L., Bai, L. P., Zhang, L., Ma, H., Jia, P., Liu, J., Zhong, M., & Guo, Z.-F. (2012). Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Molecular Biology Reports*, *39*(2), 969-987. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-0823-1>
- Huang, Z., Van Houten, J., Gonzalez, G., Xiao, H., & van der Knaap, E. (2013). Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of SUN, OFP and YABBY gene family in tomato. *Molecular Genetics and Genomics*, *288*(3-4), 111-129. <https://doi.org/10.1007/s00438-013-0733-0>
- Huang, L., Grosser, J., Gmitter, F. G., Sims, C. A., & Wang, Y. (2020). Effects of scion/rootstock combination on flavor quality of orange juice from Huanglongbing (HLB)-affected trees: A two-year study of the targeted metabolomics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *68*(10), 3286-3296. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07934>
- Huber, D. P. W., Ralph, S., & Bohlmann, J. (2004). Genomic hardwiring and phenotypic plasticity of terpenoid-based defenses in conifers. *Journal of Chemical Ecology*, *30*(12), 2399-2418. <https://doi.org/10.1007/s10886-004-7942-2>
- Huber, D. P. W., Philippe, R. N., Madilao, L. L., Sturrock, R. N., & Bohlmann, J. (2005). Changes in anatomy and terpene chemistry in roots of Douglas-fir seedlings following treatment with methyl jasmonate. *Tree Physiology*, *25*(8), 1075-1083. <https://doi.org/10.1093/treephys/25.8.1075>
- Hunter, S., Apweiler, R., Attwood, T. K., Bairoch, A., Bateman, A., Binns, D., Bork, P., Das, U., Daugherty, L., Duquenne, L., Finn, R. D., Gough, J., Haft, D., Hulo, N., Kahn, D., Kelly, E., Laugraud, A., Letunic, I., Lonsdale, D., Yeats, C. (2009). InterPro: The integrative protein signature database. *Nucleic Acids Research*, *37*(Database), D211-D215. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn785>
- Hura, T., Hura, K., & Grzesiak, S. (2009). Possible contribution of cell-wall-bound ferulic acid in drought resistance and recovery in triticale seedlings. *Journal of Plant Physiology*, *166*(16), 1720-1733. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.04.012>
- Hussain, A., Classens, G., Guevara-Rozo, S., Cale, J. A., Rajabzadeh, R., Peters, B. R., & Erbilgin, N. (2020). Spatial variation in soil available water holding capacity alters carbon mobilization and allocation to chemical defenses along jack pine stems. *Environmental and Experimental Botany*, *171*, 103902. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103902>
- Ikeda, A., Ueguchi-Tanaka, M., Sonoda, Y., Kitano, H., Koshioka, M., Futsuhara, Y., Matsuoka, M., & Yamaguchi, J. (2001). *Slender Rice*, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the *SLR1* Gene, an ortholog of the

- height-regulating gene *GAI/RGA/RHT/D8*. *The Plant Cell*, 13(5), 999-1010. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.5.999>
- Isah, T. (2019). Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological Research*, 52(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0246-3>
- Jaakola, L. (2013). New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. *Trends in Plant Science*, 18(9), 477-483. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.06.003>
- Jablonka, E., & Raz, G. (2009). Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. *The Quarterly Review of Biology*, 84(2), 131-176. <https://doi.org/10.1086/598822>
- Jain, M., Olsen, H. E., Paten, B., & Akeson, M. (2016). The Oxford Nanopore MinION: Delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biology*, 17(1), 239. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1103-0>
- Janiak, A., Kwaśniewski, M., & Szarejko, I. (2016). Gene expression regulation in roots under drought. *Journal of Experimental Botany*, 67(4), 1003-1014. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv512>
- Janz, D., Behnke, K., Schnitzler, J. P., Kanawati, B., Schmitt-Kopplin, P., & Polle, A. (2010). Pathway analysis of the transcriptome and metabolome of salt sensitive and tolerant poplar species reveals evolutionary adaptation of stress tolerance mechanisms. *BMC Plant Biology*, 10(1), 150. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-150>
- Jarzyniak, K. M., & Jasinski, M. (2014). Membrane transporters and drought resistance a complex issue. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00687>
- Jeena, G. S., Kumar, S., & Shukla, R. K. (2019). Structure, evolution and diverse physiological roles of SWEET sugar transporters in plants. *Plant Molecular Biology*, 100(4-5), 351-365. <https://doi.org/10.1007/s11103-019-00872-4>
- Jiang, C., Xu, J., Zhang, H., Zhang, X., Shi, J., Li, M., & Ming, F. (2009). A cytosolic class I small heat shock protein, RcHSP17.8, of *Rosa chinensis* confers resistance to a variety of stresses to *Escherichia coli*, yeast and *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment*, 32(8), 1046-1059. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01987.x>
- Jiang, S. C., Mei, C., Liang, S., Yu, Y. T., Lu, K., Wu, Z., Wang, X. F., & Zhang, D.-P. (2015). Crucial roles of the pentatricopeptide repeat protein SOAR1 in *Arabidopsis* response to drought, salt and cold stresses. *Plant Molecular Biology*, 88(4-5), 369-385. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0327-9>
- Joshi, R., Wani, S. H., Singh, B., Bohra, A., Dar, Z. A., Lone, A. A., Pareek, A., & Singla-Pareek, S. L. (2016). Transcription factors and plants response to drought stress: current understanding and future directions. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01029>
- Julia A., D., Yulia V., S., Eugene A., V., Alexi M., G., Galina V., K., & Sukachev V.N. (2011). Grafts of woody plants and the problem of incompatibility between scion and rootstock (a review). *Journal of Siberian Federal University. Biology*, 4(1), 54-63. <https://doi.org/10.17516/1997-1389-0185>
- Kainulainen, P., Oksanen, J., Palomäki, V., Holopainen, J. K., & Holopainen, T. (1992). Effect of drought and waterlogging stress on needle monoterpenes of *Picea abies*. *Canadian Journal of Botany*, 70(8), 1613-1616. <https://doi.org/10.1139/b92-203>

- Kanehisa, M. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27-30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Kännaste, A., Copolovici, L., Pazouki, L., Suhhorutsenko, M., & Niinemets, U. (2013). Highly variable chemical signatures over short spatial distances among Scots pine (*Pinus sylvestris*) populations. *Tree Physiology*, 33(4), 374-387. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpt013>
- Kännaste, A., Laanisto, L., Pazouki, L., Copolovici, L., Suhorutšenko, M., Azeem, M., Toom, L., Borg-Karlson, A.-K., & Niinemets, Ü. (2018). Diterpenoid fingerprints in pine foliage across an environmental and chemotypic matrix: Isoabienol content is a key trait differentiating chemotypes. *Phytochemistry*, 147, 80-88. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.12.007>
- Karuppanapandian, T., Moon, J.-C., Kim, C., Manoharan, K., & Kim, W. (2011). Reactive oxygen species in plants: Their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science*, 5, 709-725.
- Kawano, T., Pinontoan, R., Uozumi, N., Morimitsu, Y., Miyake, C., Asada, K., & Muto, S. (2000). Phenylethylamine-induced generation of reactive oxygen species and ascorbate free radicals in tobacco suspension culture: mechanism for oxidative burst mediating Ca²⁺ influx. *Plant and Cell Physiology*, 41(11), 1259-1266. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcd053>
- Ke, D., & Saltveit, M. E. (1988). Plant hormone interaction and phenolic metabolism in the regulation of russet spotting in iceberg lettuce. *Plant Physiology*, 88(4), 1136-1140. <https://doi.org/10.1104/pp.88.4.1136>
- Keeling, C. I., & Bohlmann, J. (2006). Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. *New Phytologist*, 170(4), 657-675. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01716.x>
- Kendrew, S. G. (2001). YUCCA: A flavin monooxygenase in auxin biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(4), 218. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)01814-X](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01814-X)
- Keshavarz, H. (2020). Study of water deficit conditions and beneficial microbes on the oil quality and agronomic traits of canola (*Brassica napus* L.). *Grasas y Aceites*, 71(3), 373. <https://doi.org/10.3989/gya.0572191>
- Khan, N., Bano, A., Rahman, M. A., Guo, J., Kang, Z., & Babar, Md. A. (2019). Comparative physiological and metabolic analysis reveals a complex mechanism involved in drought tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) induced by PGPR and PGRs. *Scientific Reports*, 9(1), 2097. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38702-8>
- Khanh, T., Anh, L., Nghia, L., Huu Trung, K., Bich Hien, P., Minh Trung, D., & Dang Xuan, T. (2018). Allelopathic responses of rice seedlings under some different stresses. *Plants*, 7(2), 40. <https://doi.org/10.3390/plants7020040>
- Khanna-Chopra, R. (2012). Leaf senescence and abiotic stresses share reactive oxygen species-mediated chloroplast degradation. *Protoplasma*, 249(3), 469-481. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0308-z>
- Kidrič, M., Sabotič, J., & Stevanović, B. (2014). Desiccation tolerance of the resurrection plant *Ramonda serbica* is associated with dehydration-dependent changes in levels of

- proteolytic activities. *Journal of Plant Physiology*, 171(12), 998-1002. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.03.011>
- Kiełbowicz-Matuk, A. (2012). Involvement of plant C2H2-type zinc finger transcription factors in stress responses. *Plant Science*, 185-186, 78-85. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.11.015>
- Kim, J. M., To, T. K., Ishida, J., Matsui, A., Kimura, H., & Seki, M. (2012). Transition of chromatin status during the process of recovery from drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 53(5), 847-856. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs053>
- Kinnersley, A. M., Scott, T. C., Yopp, J. H., & Whitten, G. H. (1990). Promotion of plant growth by polymers of lactic acid. *Plant Growth Regulation*, 9(2), 137-146. <https://doi.org/10.1007/BF00027441>
- Kleiber, A., Duan, Q., Jansen, K., Verena Junker, L., Kammerer, B., Rennenberg, H., Ensminger, I., Gessler, A., & Kreuzwieser, J. (2017). Drought effects on root and needle terpenoid content of a coastal and an interior Douglas fir provenance. *Tree Physiology*, 37(12), 1648-1658. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpx113>
- Kleine, S., & Müller, C. (2014). Drought stress and leaf herbivory affect root terpenoid concentrations and growth of *Tanacetum vulgare*. *Journal of Chemical Ecology*, 40(10), 1115-1125. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0505-2>
- Klos, R. J., Wang, G. G., Bauerle, W. L., & Rieck, J. R. (2009). Drought impact on forest growth and mortality in the southeast USA: An analysis using Forest Health and Monitoring data. *Ecological Applications*, 19(3), 699-708. <https://doi.org/10.1890/08-0330.1>
- Ko, D., & Helariutta, Y. (2017). Shoot–Root communication in flowering plants. *Current Biology*, 27(17), R973-R978. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.06.054>
- Koch, K. (2004). Sucrose metabolism: Regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(3), 235-246. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.03.014>
- Köhler, A., Förster, N., Zander, M., & Ulrichs, C. (2020). Compound-specific responses of phenolic metabolites in the bark of drought-stressed *Salix daphnoides* and *Salix purpurea*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 155, 311-320. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.07.004>
- Kong, F., Deng, Y., Zhou, B., Wang, G., Wang, Y., & Meng, Q. (2014). A chloroplast-targeted DnaJ protein contributes to maintenance of photosystem II under chilling stress. *Journal of Experimental Botany*, 65(1), 143-158. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert357>
- Kooyers, N. J. (2015). The evolution of drought escape and avoidance in natural herbaceous populations. *Plant Science*, 234, 155-162. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.02.012>
- Kopylova, E., Noé, L., & Touzet, H. (2012). SortMeRNA: Fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics*, 28(24), 3211-3217. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts611>
- Korver, R. A., Koevoets, I. T., & Testerink, C. (2018). Out of shape during stress: a key role for auxin. *Trends in Plant Science*, 23(9), 783-793. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.05.011>

- Koutsaviti, A., Milenković, M., & Tzakou, O. (2011). Antimicrobial activity of the essential oil of Greek endemic *Stachys spruneri* and its main component, isoabienol. *Natural Product Communications*, 6(2), 277-280.
- Krahmer, J., Goralogia, G. S., Kubota, A., Zardilis, A., Johnson, R. S., Song, Y. H., MacCoss, M. J., Le Bihan, T., Halliday, K. J., Imaizumi, T., & Millar, A. J. (2019). Time-resolved interaction proteomics of the GIGANTEA protein under diurnal cycles in *Arabidopsis*. *FEBS Letters*, 593(3), 319-338. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13311>
- Kráľová, K., Jampilek, J., & Ostrovský, I. (2012). Metabolomics—useful tool for study of plant responses to abiotic stresses. *Ecological Chemistry and Engineering S*, 19(2), 133-161. <https://doi.org/10.2478/v10216-011-0012-0>
- Krasensky, J., & Jonak, C. (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, 63(4), 1593-1608. <https://doi.org/10.1093/jxb/err460>
- Kraszewska, E. (2008). The plant Nudix hydrolase family. *Acta Biochimica Polonica*, 55(4), 663-671.
- Krishnan, A., & Pereira, A. (2008). Integrative approaches for mining transcriptional regulatory programs in *Arabidopsis*. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 7(4), 264-274. <https://doi.org/10.1093/bfgp/eln035>
- Krishna, T. P., Maharajan, T., Victor Roch, G., Ignacimuthu, S., & Antony Ceasar, S. (2020). Structure, function, regulation and phylogenetic relationship of ZIP family transporters of plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 662. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00662>
- Kulik, A., Wawer, I., Krzywińska, E., Bucholc, M., & Dobrowolska, G. (2011). SnRK2 protein kinases—key regulators of plant response to abiotic stresses. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 15(12), 859-872. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0091>
- Kumar, M., Kesawat, M. S., Ali, A., Lee, S. C., Gill, S. S., & Kim, H. U. (2019). Integration of abscisic acid signaling with other signaling pathways in plant stress responses and development. *Plants*, 8(12), 592. <https://doi.org/10.3390/plants8120592>
- Kuromori, T., Miyaji, T., Yabuuchi, H., Shimizu, H., Sugimoto, E., Kamiya, A., Moriyama, Y., & Shinozaki, K. (2010). ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(5), 2361-2366. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912516107>
- Kvaalen, H., & Johnsen, Ø. (2008). Timing of bud set in *Picea abies* is regulated by a memory of temperature during zygotic and somatic embryogenesis. *New Phytologist*, 0(0), 071009191540003. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02222.x>
- Kyriacou, M. C., Roupael, Y., Colla, G., Zrenner, R., & Schwarz, D. (2017). Vegetable grafting: The implications of a growing agronomic imperative for vegetable fruit quality and nutritive value. *Frontiers in Plant Science*, 8, 741. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00741>
- La, V. H., Lee, B. R., Islam, Md. T., Park, S. H., Jung, H., Bae, D. W., & Kim, T. H. (2019). Characterization of salicylic acid-mediated modulation of the drought stress responses:

- Reactive oxygen species, proline, and redox state in *Brassica napus*. *Environmental and Experimental Botany*, 157, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.09.013>
- Larrieu, A., & Vernoux, T. (2016). Q&A: How does jasmonate signaling enable plants to adapt and survive? *BMC Biology*, 14(1), 79. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0308-8>
- Larsson, K. E., Nyström, B., & Liljenberg, C. (2006). A phosphatidylserine decarboxylase activity in root cells of oat (*Avena sativa*) is involved in altering membrane phospholipid composition during drought stress acclimation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(4), 211-219. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2006.04.002>
- Lawlor, D. W., & Cornic, G. (2002). Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell & Environment*, 25(2), 275-294. <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00814.x>
- Lê Cao, K.-A., Boitard, S., & Besse, P. (2011). Sparse PLS discriminant analysis: Biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems. *BMC Bioinformatics*, 12(1), 253. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-253>
- Lejay, L., Wirth, J., Pervent, M., Cross, J. M.-F., Tillard, P., & Gojon, A. (2008). Oxidative pentose phosphate pathway-dependent sugar sensing as a mechanism for regulation of root ion transporters by photosynthesis. *Plant Physiology*, 146(4), 2036-2053. <https://doi.org/10.1104/pp.107.114710>
- Li, J., Wen, J., Lease, K. A., Doke, J. T., Tax, F. E., & Walker, J. C. (2002). BAK1, an Arabidopsis LRR Receptor-like Protein Kinase, Interacts with BRI1 and Modulates Brassinosteroid Signaling. *Cell*, 110(2), 213-222. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00812-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00812-7)
- Li, X., Qian, Q., Fu, Z., Wang, Y., Xiong, G., Zeng, D., Wang, X., Liu, X., Teng, S., Hiroshi, F., Yuan, M., Luo, D., Han, B., & Li, J. (2003). Control of tillering in rice. *Nature*, 422(6932), 618-621. <https://doi.org/10.1038/nature01518>
- Li, C., Schillmiller, A. L., Liu, G., Lee, G. I., Jayanty, S., Sageman, C., Vrebalov, J., Giovannoni, J. J., Yagi, K., Kobayashi, Y., & Howe, G. A. (2005). Role of β -oxidation in jasmonate biosynthesis and systemic wound signaling in tomato. *The Plant Cell*, 17(3), 971-986. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.029108>
- Li, Y., Jia, F., Yu, Y., Luo, L., Huang, J., Yang, G., Wu, C., & Zheng, C. (2014). The SCF E3 ligase AtPP2-B11 plays a negative role in response to drought stress in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 32(5), 943-956. <https://doi.org/10.1007/s11105-014-0705-5>
- Li, X., Kapos, P., & Zhang, Y. (2015). NLRs in plants. *Current Opinion in Immunology*, 32, 114-121. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.01.014>
- Li, Z., Jing, W., Peng, Y., Zhang, X. Q., Ma, X., Huang, L. K., & Yan, Y. (2015a). Spermine alleviates drought stress in white clover with different resistance by influencing carbohydrate metabolism and dehydrins synthesis. *PLOS ONE*, 10(4), e0120708. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120708>
- Li, Z., Yu, J., Peng, Y., & Huang, B. (2017). Metabolic pathways regulated by abscisic acid, salicylic acid and γ -aminobutyric acid in association with improved drought tolerance in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). *Physiologia Plantarum*, 159(1), 42-58. <https://doi.org/10.1111/ppl.12483>

- Li, P., Zhang, B., Su, T., Li, P., Xin, X., Wang, W., Zhao, X., Yu, Y., Zhang, D., Yu, S., & Zhang, F. (2018). BrLAS, a GRAS transcription factor from *Brassica rapa* is involved in drought stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 1792. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01792>
- Li, W., de Ollas, C., & Dodd, I. C. (2018a). Long-distance ABA transport can mediate distal tissue responses by affecting local ABA concentrations: ABA transport and effects in grafted plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, *60*(1), 16-33. <https://doi.org/10.1111/jipb.12605>
- Li, F. S., Phyto, P., Jacobowitz, J., Hong, M., & Weng, J.K. (2019). The molecular structure of plant sporopollenin. *Nature Plants*, *5*(1), 41-46. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0330-7>
- Li, P., Liu, Y., Tan, W., Chen, J., Zhu, M., Lv, Y., Liu, Y., Yu, S., Zhang, W., & Cai, H. (2019a). *Brittle Culm 1* encodes a COBRA-like protein involved in secondary cell wall cellulose biosynthesis in sorghum. *Plant and Cell Physiology*, *60*(4), 788-801. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy246>
- Li, T., Huang, Y., Khadr, A., Wang, Y.-H., Xu, Z.-S., & Xiong, A.-S. (2020). DcDREB1A, a DREB-binding transcription factor from *Daucus carota*, enhances drought tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* and modulates lignin levels by regulating lignin-biosynthesis-related genes. *Environmental and Experimental Botany*, *169*, 103896. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103896>
- Liebsch, D., & Palatnik, J. F. (2020). MicroRNA miR396, GRF transcription factors and GIF co-regulators: A conserved plant growth regulatory module with potential for breeding and biotechnology. *Current Opinion in Plant Biology*, *53*, 31-42. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.09.008>
- Lin, S.I., Chiang, S.-F., Lin, W. Y., Chen, J. W., Tseng, C. Y., Wu, P. C., & Chiou, T. J. (2008). Regulatory network of MicroRNA399 and *PHO2* by systemic signaling. *Plant Physiology*, *147*(2), 732-746. <https://doi.org/10.1104/pp.108.116269>
- Lim, G.-H., Singhal, R., Kachroo, A., & Kachroo, P. (2017). Fatty acid- and lipid-mediated signaling in plant defense. *Annual Review of Phytopathology*, *55*(1), 505-536. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035406>
- Ling, L., Zhang, W., An, Y., Du, B., Wang, D., & Guo, C. (2020). Genome-wide analysis of the TCP transcription factor genes in five legume genomes and their response to salt and drought stresses. *Functional & Integrative Genomics*, *20*(4), 537-550. <https://doi.org/10.1007/s10142-020-00733-0>
- Liu, K., Fu, H., Bei, Q., & Luan, S. (2000). Inward potassium channel in guard cells as a target for polyamine regulation of stomatal movements. *Plant Physiology*, *124*(3), 1315-1326. <https://doi.org/10.1104/pp.124.3.1315>
- Liu, J., Li, W., Ning, Y., Shirsekar, G., Cai, Y., Wang, X., Dai, L., Wang, Z., Liu, W., & Wang, G.-L. (2012). The U-Box E3 ligase SPL11/PUB13 is a convergence point of defense and flowering signaling in plants. *Plant Physiology*, *160*(1), 28-37. <https://doi.org/10.1104/pp.112.199430>
- Liu, N., Wu, S., Van Houten, J., Wang, Y., Ding, B., Fei, Z., Clarke, T. H., Reed, J. W., & van der Knaap, E. (2014). Down-regulation of AUXIN RESPONSE FACTORS 6 and 8

- by microRNA 167 leads to floral development defects and female sterility in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 65(9), 2507-2520. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru141>
- Liu, P. L., Du, L., Huang, Y., Gao, S. M., & Yu, M. (2017). Origin and diversification of leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (LRR-RLK) genes in plants. *BMC Evolutionary Biology*, 17(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s12862-017-0891-5>
- Liu, S., Liu, Y., Zhao, J., Cai, S., Qian, H., Zuo, K., Zhao, L., & Zhang, L. (2017a). A computational interactome for prioritizing genes associated with complex agronomic traits in rice (*Oryza sativa*). *The Plant Journal*, 90(1), 177-188. <https://doi.org/10.1111/tpj.13475>
- Liu, H., Cao, M., Chen, X., Ye, M., Zhao, P., Nan, Y., Li, W., Zhang, C., Kong, L., Kong, N., Yang, C., Chen, Y., Wang, D., & Chen, Q. (2019). Genome-wide analysis of the lateral organ boundaries domain (LBD) gene family in *Solanum tuberosum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 5360. <https://doi.org/10.3390/ijms20215360>
- Liu, X., Ma, D., Zhang, Z., Wang, S., Du, S., Deng, X., & Yin, L. (2019a). Plant lipid remodeling in response to abiotic stresses. *Environmental and Experimental Botany*, 165, 174-184. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.06.005>
- Llusià, J., & Peñuelas, J. (1998). Changes in terpene content and emission in potted Mediterranean woody plants under severe drought. *Canadian Journal of Botany*, 76(8), 1366-1373. <https://doi.org/10.1139/cjb-76-8-1366>
- Lo Bianco, R., Rieger, M., & Sung, S. J. S. (2000). Effect of drought on sorbitol and sucrose metabolism in sinks and sources of peach. *Physiologia Plantarum*, 108(1), 71-78. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2000.108001071.x>
- López-Goldar, X., Sampedro, L., & Zas, R. (2016). Carbon starvation by light deprivation does not constrain the ability of young pines to produce induced chemical defences in response to a bark-chewing herbivore. *Environmental and Experimental Botany*, 130, 141-150. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.05.010>
- López-Goldar, X., Villari, C., Bonello, P., Borg-Karlson, A. K., Grivet, D., Zas, R., & Sampedro, L. (2018). Inducibility of plant secondary metabolites in the stem predicts genetic variation in resistance against a key insect herbivore in maritime pine. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1651. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01651>
- López-Goldar, X., Zas, R., & Sampedro, L. (2020). Resource availability drives microevolutionary patterns of plant defences. *Functional Ecology*, 34(8), 1640-1652. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13610>
- López-Hinojosa, M., de María, N., Guevara, M. A., Vélez, M. D., Cabezas, J. A., Díaz, L. M., Mancha, J. A., Pizarro, A., Manjarrez, L. F., Collada, C., Díaz-Sala, C., & Cervera, M. T. 2021. Rootstock effects on scion gene expression in Maritime pine. *Scientific Reports*, 11, 11582. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90672-y>
- Lorenz, W. W., Alba, R., Yu, Y.-S., Bordeaux, J. M., Simões, M., & Dean, J. F. (2011). Microarray analysis and scale-free gene networks identify candidate regulators in drought-stressed roots of loblolly pine (*P. taeda* L.). *BMC Genomics*, 12(1), 264. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-264>

- Loreto, F., Pollastri, S., Fineschi, S., & Velikova, V. (2014). Volatile isoprenoids and their importance for protection against environmental constraints in the Mediterranean area. *Environmental and Experimental Botany*, *103*, 99-106. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.09.005>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, *15*(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Ludwig-Müller, J. (2011). Auxin conjugates: Their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of Experimental Botany*, *62*(6), 1757-1773. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq412>
- Luo, D., Bernard, D. G., Balk, J., Hai, H., & Cui, X. (2012). The DUF59 Family Gene AE7 Acts in the Cytosolic Iron-Sulfur Cluster Assembly Pathway to Maintain Nuclear Genome Integrity in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *24*(10), 4135-4148. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.102608>
- Lynn, K., Daigle, J., Hoffman, J., Lake, F., Michelle, N., Ranco, D., Viles, C., Voggesser, G., & Williams, P. (2013). The impacts of climate change on tribal traditional foods. *Climatic Change*, *120*(3), 545-556. <https://doi.org/10.1007/s10584-013-0736-1>
- Mackay, J., Dean, J. F. D., Plomion, C., Peterson, D. G., Cánovas, F. M., Pavy, N., Ingvarsson, P. K., Savolainen, O., Guevara, M. Á., Fluch, S., Vinceti, B., Abarca, D., Díaz-Sala, C., & Cervera, M. T. (2012). Towards decoding the conifer giga-genome. *Plant Molecular Biology*, *80*(6), 555-569. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9961-7>
- Maherali, H., Moura, C. F., Caldeira, M. C., Willson, C. J., & Jackson, R. B. (2006). Functional coordination between leaf gas exchange and vulnerability to xylem cavitation in temperate forest trees. *Plant, Cell and Environment*, *29*(4), 571-583. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01433.x>
- Mahunu, G. K., Adjei, P. Y., Adjei, P. Y., Asante, A. K., & Asante, A. K. (2009). Comparative studies on ages of rootstock seedlings and grafting methods in cashew (*Anacardium occidentale L.*). *Ghana Journal of Horticulture* *7*, 11-17
- Mäkinen, K., & De, S. (2019). The significance of methionine cycle enzymes in plant virus infections. *Current Opinion in Plant Biology*, *50*, 67-75. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.03.002>
- Mao, J., Manik, S., Shi, S., Chao, J., Jin, Y., Wang, Q., & Liu, H. (2016). Mechanisms and physiological roles of the CBL-CIPK networking system in *Arabidopsis thaliana*. *Genes*, *7*(9), 62. <https://doi.org/10.3390/genes7090062>
- Marček, T., Hamow, K. Á., Végh, B., Janda, T., & Darko, E. (2019). Metabolic response to drought in six winter wheat genotypes. *PLOS ONE*, *14*(2), e0212411. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212411>
- Marguerit, E., Brendel, O., Lebon, E., Van Leeuwen, C., & Ollat, N. (2012). Rootstock control of scion transpiration and its acclimation to water deficit are controlled by different genes. *New Phytologist*, *194*(2), 416-429. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04059.x>

- Mariette, S., Chagné, D., Decroocq, S., Vendramin, G. G., Lalanne, C., Madur, D., & Plomion, C. (2001). Microsatellite markers for *Pinus pinaster* Ait. *Annals of Forest Science*, 58(2), 203-206. <https://doi.org/10.1051/forest:2001119>
- Marowa, P., Ding, A., & Kong, Y. (2016). Expansins: Roles in plant growth and potential applications in crop improvement. *Plant Cell Reports*, 35(5), 949-965. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1948-4>
- Martinez-Rodriguez, M. M., Estañ, M. T., Moyano, E., Garcia-Abellan, J. O., Flores, F. B., Campos, J. F., Al-Azzawi, M. J., Flowers, T. J., & Bolarín, M. C. (2008). The effectiveness of grafting to improve salt tolerance in tomato when an 'excluder' genotype is used as scion. *Environmental and Experimental Botany*, 63(1-3), 392-401. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.12.007>
- Mason, C. J., Klepzig, K. D., Kopper, B. J., Kersten, P. J., Illman, B. L., & Raffa, K. F. (2015). Contrasting patterns of diterpene acid induction by red pine and white spruce to simulated bark beetle attack, and interspecific differences in sensitivity among fungal associates. *Journal of Chemical Ecology*, 41(6), 524-532. <https://doi.org/10.1007/s10886-015-0588-4>
- Maurino, V. G., & Engqvist, M. K. M. (2015). 2-Hydroxy acids in plant metabolism. *The Arabidopsis Book*, 13, e0182. <https://doi.org/10.1199/tab.0182>
- Mee Do, H., Chul Lee, S., Won Jung, H., Hoon Sohn, K., & Kook Hwang, B. (2004). Differential expression and in situ localization of a pepper defensin (CADEF1) gene in response to pathogen infection, abiotic elicitors and environmental stresses in *Capsicum annuum*. *Plant Science*, 166(5), 1297-1305. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.01.008>
- Meijón, M., Feito, I., Oravec, M., Delatorre, C., Weckwerth, W., Majada, J., & Valledor, L. (2016). Exploring natural variation of *Pinus pinaster* Aiton using metabolomics: Is it possible to identify the region of origin of a pine from its metabolites? *Molecular Ecology*, 25(4), 959-976. <https://doi.org/10.1111/mec.13525>
- Mencuccini, M., Hölttä, T., Petit, G., & Magnani, F. (2007). Sanio's laws revisited. Size-dependent changes in the xylem architecture of trees. *Ecology Letters*, 10(11), 1084-1093. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01104.x>
- Mendy, B., Wang'ombe, M. W., Radakovic, Z. S., Holbein, J., Ilyas, M., Chopra, D., Holton, N., Zipfel, C., Grundler, F. M. W., & Siddique, S. (2017). *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor-like kinase NILR1 is required for induction of innate immunity to parasitic nematodes. *PLOS Pathogens*, 13(4), e1006284. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006284>
- Merchant, A., Tausz, M., Arndt, S. K., & Adams, M. A. (2006). Cyclitols and carbohydrates in leaves and roots of 13 *Eucalyptus* species suggest contrasting physiological responses to water deficit. *Plant, Cell and Environment*, 29(11), 2017-2029. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01577.x>
- Miao, R., Lung, S. C., Li, X., Li, X. D., & Chye, M. L. (2019). Thermodynamic insights into an interaction between ACYL-CoA-BINDING PROTEIN2 and LYSOPHOSPHOLIPASE2 in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 294(16), 6214-6226. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006876>

- Michaelson, L. V., Napier, J. A., Molino, D., & Faure, J. D. (2016). Plant sphingolipids: Their importance in cellular organization and adaptation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(9), 1329-1335. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.04.003>
- Monshausen, G. B., & Gilroy, S. (2009). Feeling green: Mechanosensing in plants. *Trends in Cell Biology*, 19(5), 228-235. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.02.005>
- Moraga, F., & Aquea, F. (2015). Composition of the SAGA complex in plants and its role in controlling gene expression in response to abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00865>
- Moran, E., Lauder, J., Musser, C., Stathos, A., & Shu, M. (2017). The genetics of drought tolerance in conifers. *New Phytologist*, 216(4), 1034-1048. <https://doi.org/10.1111/nph.14774>
- Muñiz García, M. N., País, S. M., Téllez-Iñón, M. T., & Capiati, D. A. (2011). Characterization of StPPI1, a proton pump interactor from *Solanum tuberosum* L. that is up-regulated during tuber development and by abiotic stress. *Planta*, 233(4), 661-674. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1329-0>
- Muñoz Flores, H. J., Prieto Ruiz, J. Á., Flores García, A., Pineda Ojeda, T., & Morales González, E. (2013). "Técnicas de injertado" "enchapado lateral" y "fisura terminal" en *Pinus pseudostrobus* Lindl.
- Mustafavi, S. H., Naghdi Badi, H., Şekara, A., Mehrafarin, A., Janda, T., Ghorbanpour, M., & Rafiee, H. (2018). Polyamines and their possible mechanisms involved in plant physiological processes and elicitation of secondary metabolites. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40(6), 102. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2671-2>
- Muthusamy, M., Uma, S., Backiyarani, S., Saraswathi, M. S., & Chandrasekar, A. (2016). Transcriptomic changes of drought-tolerant and sensitive banana cultivars exposed to drought stress. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01609>
- Mutke, S., Vendramin, G. G., Fady, B., Bagnoli, F., & González-Martínez, S. C. (2019). Molecular and quantitative genetics of stone pine (*Pinus pinea*). En D. Nandwani (Ed.), *Genetic Diversity in Horticultural Plants* (Vol. 22, pp. 61-84). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-96454-6_3
- Nakabayashi, R., Yonekura-Sakakibara, K., Urano, K., Suzuki, M., Yamada, Y., Nishizawa, T., Matsuda, F., Kojima, M., Sakakibara, H., Shinozaki, K., Michael, A. J., Tohge, T., Yamazaki, M., & Saito, K. (2014). Enhancement of oxidative and drought tolerance in *Arabidopsis* by overaccumulation of antioxidant flavonoids. *The Plant Journal*, 77(3), 367-379. <https://doi.org/10.1111/tpj.12388>
- Neale, D. B., Wegrzyn, J. L., Stevens, K. A., Zimin, A. V., Puiu, D., Crepeau, M. W., Cardeno, C., Koriabine, M., Holtz-Morris, A. E., Liechty, J. D., Martínez-García, P. J., Vasquez-Gross, H. A., Lin, B. Y., Zieve, J. J., Dougherty, W. M., Fuentes-Soriano, S., Wu, L. S., Gilbert, D., Marçais, G., Langley, C. H. (2014). Decoding the massive genome of loblolly pine using haploid DNA and novel assembly strategies. *Genome Biology*, 15(3), R59. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r59>
- Ngou, B. P. M., Ahn, H.-K., Ding, P., Redkar, A., Brown, H., Ma, Y., Youles, M., Tomlinson, L., & Jones, J. D. G. (2020). Estradiol-inducible AvrRps4 expression

- reveals distinct properties of TIR-NLR-mediated effector-triggered immunity. *Journal of Experimental Botany*, 71(6), 2186-2197. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz571>
- Nguyen, A., & Lamant, A. (1988). Pinitol and myo-inositol accumulation in water-stressed seedlings of maritime pine. *Phytochemistry*, 27(11), 3423-3427. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)80742-8](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80742-8)
- Niinemets, Ü. (2016). Uncovering the hidden facets of drought stress: Secondary metabolites make the difference. *Tree Physiology*, tpv128. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpv128>
- Nogués, S., Aljazairi, S., Arias, C., Sánchez, E., & Aranjuelo, I. (2014). Two distinct plant respiratory physiotypes might exist which correspond to fast-growing and slow-growing species. *Journal of Plant Physiology*, 171(13), 1157-1163. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.03.006>
- Novakova, M., Dobrev, P., Motyka, V., Gaudinova, A., Malbeck, J., Pospisilova, J., Haisel, D., Storchova, H., Dobra, J., Mok, M. C., Mok, D. W. S., Martin, R., & Vankova, R. (2007). Cytokinin function in drought stress response and subsequent recovery. En Z. Xu, J. Li, Y. Xue, & W. Yang (Eds.), *Biotechnology and Sustainable Agriculture 2006 and Beyond* (pp. 171-174). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6635-1_25
- Nystedt, B., Street, N. R., Wetterbom, A., Zuccolo, A., Lin, Y.-C., Scofield, D. G., Vezzi, F., Delhomme, N., Giacomello, S., Alexeyenko, A., Vicedomini, R., Sahlin, K., Sherwood, E., Elfstrand, M., Gramzow, L., Holmberg, K., Hällman, J., Keech, O., Klasson, L., Jansson, S. (2013). The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution. *Nature*, 497(7451), 579-584. <https://doi.org/10.1038/nature12211>
- Oh, H. W., Yun, C.S., Jeon, J. H., Kim, J. A., Park, D. S., Ryu, H. W., Oh, S. R., Song, H. H., Shin, Y., Jung, C. S., & Shin, S. W. (2017). Conifer diterpene resin acids disrupt juvenile hormone-mediated endocrine regulation in the indian meal moth *Plodia interpunctella*. *Journal of Chemical Ecology*, 43(7), 703-711. <https://doi.org/10.1007/s10886-017-0861-9>
- Ohkubo, Y., Tanaka, M., Tabata, R., Ogawa-Ohnishi, M., & Matsubayashi, Y. (2017). Shoot-to-root mobile polypeptides involved in systemic regulation of nitrogen acquisition. *Nature Plants*, 3(4), 17029. <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.29>
- O'Leary, N. A., Wright, M. W., Brister, J. R., Ciufu, S., Haddad, D., McVeigh, R., Rajput, B., Robbertse, B., Smith-White, B., Ako-Adjei, D., Astashyn, A., Badretin, A., Bao, Y., Blinkova, O., Brover, V., Chetvermin, V., Choi, J., Cox, E., Ermolaeva, O., Pruitt, K. D. (2016). Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: Current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D733-D745. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1189>
- Oliveros, J. C. (2015). *Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. 2007-2015.*
- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K., & Tran, L.-S. P. (2014). Response of plants to water stress. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00086>
- Ostrowski, M., & Stanislaw, K. (2015). Plant signaling peptides Cysteine-rich peptides. *Advances in Biochemistry, Postępy Biochemii*, 61, 79-92.

- Paajanen, P., Kettleborough, G., López-Girona, E., Giolai, M., Heavens, D., Baker, D., Lister, A., Cugliandolo, F., Wilde, G., Hein, I., Macaulay, I., Bryan, G. J., & Clark, M. D. (2019). A critical comparison of technologies for a plant genome sequencing project. *GigaScience*, 8(3). <https://doi.org/10.1093/gigascience/giy163>
- Panstruga, R., Baumgarten, K., & Bernhagen, J. (2015). Phylogeny and evolution of plant macrophage migration inhibitory factor/D-dopachrome tautomerase-like proteins. *BMC Evolutionary Biology*, 15(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0337-x>
- Park, C. J., & Seo, Y. S. (2015). Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones for plant immunity. *The Plant Pathology Journal*, 31(4), 323-333. <https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.08.2015.0150>
- Park, M. J., Kwon, Y. J., Gil, K. E., & Park, C. M. (2016). LATE ELONGATED HYPOCOTYL regulates photoperiodic flowering via the circadian clock in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*, 16(1), 114. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0810-8>
- Parthasarathy, A., Savka, M. A., & Hudson, A. O. (2019). The synthesis and role of β -alanine in plants. *Frontiers in Plant Science*, 10, 921. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00921>
- Pascal, S., Bernard, A., Deslous, P., Gronnier, J., Fournier-Goss, A., Domergue, F., Rowland, O., & Joubès, J. (2019). *Arabidopsis* CER1-LIKE1 functions in a cuticular very-long-chain alkane-forming complex. *Plant Physiology*, 179(2), 415-432. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01075>
- Pascual, M. B., Cánovas, F. M., & Ávila, C. (2015). The NAC transcription factor family in maritime pine (*Pinus Pinaster*): Molecular regulation of two genes involved in stress responses. *BMC Plant Biology*, 15(1), 254. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0640-0>
- Patro, R., Duggal, G., Love, M. I., Irizarry, R. A., & Kingsford, C. (2017). Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods*, 14(4), 417-419. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4197>
- Pauly, M., Gille, S., Liu, L., Mansoori, N., de Souza, A., Schultink, A., & Xiong, G. (2013). Hemicellulose biosynthesis. *Planta*, 238(4), 627-642. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1921-1>
- Pazouki, L., Shanjani, P. S., Fields, P. D., Martins, K., Suhhorutšenko, M., Viinalass, H., & Niinemets, Ü. (2016). Large within-population genetic diversity of the widespread conifer *Pinus sylvestris* at its soil fertility limit characterized by nuclear and chloroplast microsatellite markers. *European Journal of Forest Research*, 135(1), 161-177. <https://doi.org/10.1007/s10342-015-0928-5>
- Peleg, Z., & Blumwald, E. (2011). Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(3), 290-295. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.02.001>
- Peñuelas, J., Asensio, D., Tholl, D., Wenke, K., Rosenkranz, M., Piechulla, B., & Schnitzler, J. P. (2014). Biogenic volatile emissions from the soil. *Plant, Cell & Environment*, 37(8), 1866-1891. <https://doi.org/10.1111/pce.12340>
- Perdiguero, P., Collada, C., Barbero, M. del C., García Casado, G., Cervera, M. T., & Soto, A. (2012). Identification of water stress genes in *Pinus pinaster* Ait. by controlled

- progressive stress and suppression-subtractive hybridization. *Plant Physiology and Biochemistry*, 50, 44-53. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.09.022>
- Perdiguero, P., Barbero, M. del C., Cervera, M. T., Collada, C., & Soto, Á. (2013). Molecular response to water stress in two contrasting Mediterranean pines (*Pinus pinaster* and *Pinus pinea*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 67, 199-208. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.03.008>
- Perdiguero, P., Rodrigues, A. S., Chaves, I., Costa, B., Alves, A., María, N., Vélez, M. D., Díaz-Sala, C., Cervera, M. T., & Miguel, C. M. (2021). Comprehensive analysis of the isomiRome in the vegetative organs of the conifer *Pinus pinaster* under contrasting water availability. *Plant, Cell & Environment*, 44(3), 706-728. <https://doi.org/10.1111/pce.13976>
- Pérez-Izquierdo, L., Zabal-Aguirre, M., González-Martínez, S. C., Buée, M., Verdú, M., Rincón, A., & Goberna, M. (2019). Plant intraspecific variation modulates nutrient cycling through its below ground rhizospheric microbiome. *Journal of Ecology*, 107(4), 1594-1605. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13202>
- Pérez-Luna, A., Wehenkel, C., Prieto-Ruiz, J. Á., López-Upton, J., Solís-González, S., Chávez-Simental, J. A., & Hernández-Díaz, J. C. (2020). Grafting in Conifers: A review. *Pakistan Journal of Botany*, 52(4). [https://doi.org/10.30848/PJB2020-4\(10\)](https://doi.org/10.30848/PJB2020-4(10))
- Pettersson, M., Kännaste, A., Lindström, A., Hellqvist, C., Stattin, E., Långström, B., & Borg-Karlson, A.-K. (2008). Mini-seedlings of *Picea abies* are less attacked by *Hylobius abietis* than conventional ones: Is plant chemistry the explanation? *Scandinavian Journal of Forest Research*, 23(4), 299-306. <https://doi.org/10.1080/02827580802203560>
- Piasecka, A., Kachlicki, P., & Stobiecki, M. (2019). Analytical methods for detection of plant metabolomes changes in response to biotic and abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 379. <https://doi.org/10.3390/ijms20020379>
- Pinheiro, C., Chaves, M. M., & Ricardo, C. P. (2001). Alterations in carbon and nitrogen metabolism induced by water deficit in the stems and leaves of *Lupinus albus* L. *Journal of Experimental Botany*, 52(358), 1063-1070. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.358.1063>
- Plomion, C., Lalanne, C., Claverol, S., Meddour, H., Kohler, A., Bogeat-Triboulot, M.-B., Barre, A., Le Provost, G., Dumazet, H., Jacob, D., Bastien, C., Dreyer, E., de Daruvar, A., Guehl, J.-M., Schmitter, J.-M., Martin, F., & Bonneu, M. (2006). Mapping the proteome of poplar and application to the discovery of drought-stress responsive proteins. *PROTEOMICS*, 6(24), 6509-6527. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600362>
- Plomion, C., Bastien, C., Bogeat-Triboulot, M.-B., Bouffier, L., Déjardin, A., Duplessis, S., Fady, B., Heuertz, M., Le Gac, A. L., Le Provost, G., Legué, V., Lelu-Walter, M. A., Lepié, J. C., Maury, S., Morel, A., Oddou-Muratorio, S., Pilate, G., Sanchez, L., Scotti, I., Vacher, C. (2016). Forest tree genomics: 10 achievements from the past 10 years and future prospects. *Annals of Forest Science*, 73(1), 77-103. <https://doi.org/10.1007/s13595-015-0488-3>
- Pomper, K. W., Crabtree, S. B., & Lowe, J. D. (2009). Enhancing pawpaw chip budding success. *Journal of the American Pomological Society*, 63(4), 145.

- Pot, D., McMillan, L., Echt, C., Le Provost, G., Garnier-Géré, P., Cato, S., & Plomion, C. (2005). Nucleotide variation in genes involved in wood formation in two pine species. *New Phytologist*, *167*(1), 101-112. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01417.x>
- Proost, S., Van Bel, M., Sterck, L., Billiau, K., Van Parys, T., Van de Peer, Y., & Vandepoele, K. (2009). PLAZA: A comparative genomics resource to study gene and genome evolution in plants. *The Plant Cell*, *21*(12), 3718-3731. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.071506>
- Pucholt, P., Sjödin, P., Weih, M., Rönnerberg-Wästljung, A. C., & Berlin, S. (2015). Genome-wide transcriptional and physiological responses to drought stress in leaves and roots of two willow genotypes. *BMC Plant Biology*, *15*(1), 244. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0630-2>
- Qi, D., Li, J., Qiao, X., Lu, M., Chen, W., Miao, A., Guo, W., & Ma, C. (2019). Non-targeted metabolomic analysis based on Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry reveals the effects of grafting on non-volatile metabolites in fresh tea leaves (*Camellia sinensis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *67*(23), 6672-6682. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01001>
- Querejeta, J. I., Egerton-Warburton, L. M., & Allen, M. F. (2007). Hydraulic lift may buffer rhizosphere hyphae against the negative effects of severe soil drying in a California Oak savanna. *Soil Biology and Biochemistry*, *39*(2), 409-417. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.08.008>
- Quesada, V. (2016). The roles of mitochondrial transcription termination factors (MTERFs) in plants. *Physiologia Plantarum*, *157*(3), 389-399. <https://doi.org/10.1111/ppl.12416>
- Rahman, H., Yang, J., Xu, Y. P., Munyampundu, J. P., & Cai, X. Z. (2016). Phylogeny of plant CAMTAs and role of AtCAMTAs in nonhost resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Frontiers in Plant Science*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00177>
- Raj, S., Brautigam, K., Hamanishi, E. T., Wilkins, O., Thomas, B. R., Schroeder, W., Mansfield, S. D., Plant, A. L., & Campbell, M. M. (2011). Clone history shapes *Populus* drought responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(30), 12521-12526. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103341108>
- Regnault, T., Davière, J. M., Heintz, D., Lange, T., & Achard, P. (2014). The gibberellin biosynthetic genes *AtKAO1* and *AtKAO2* have overlapping roles throughout *Arabidopsis* development. *The Plant Journal*, *80*(3), 462-474. <https://doi.org/10.1111/tpj.12648>
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, *43*(7), e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
- Rivero, R. M., Ruiz, J. M., & Romero, L. (2005). Iron metabolism in tomato and watermelon plants: Influence of grafting. *Journal of Plant Nutrition*, *27*(12), 2221-2234. <https://doi.org/10.1081/PLN-200034708>
- Robert, J. A., Madilao, L.L., White, R., Yanchuk, A., King, J., Bohlmann, J., (2010). Terpenoid metabolite profiling in Sitka spruce identifies association of dehydroabietic acid, (b)-3-carene, and terpinolene with resistance against white pine weevil. *Botany* *88* (9),_810e820. <https://doi.org/10.1139/B10-049>

- Rodrigues, A.M., Ribeiro-Barros, A.I., & Antonio, C. (2019) Experimental design and sample preparation in forest tree metabolomics. *Metabolites* 9, 285; <https://doi.org/10.3390/metabo9120285>
- Romero, L., Belakbir, A., Ragala, L., & Ruiz, J. M. (1997). Response of plant yield and leaf pigments to saline conditions: Effectiveness of different rootstocks in melon plants (*Cucumis melo* L.). *Soil Science and Plant Nutrition*, 43(4), 855-862. <https://doi.org/10.1080/00380768.1997.10414652>
- Rouphael, Y., Cardarelli, M., Colla, G., & Rea, E. (2008). Yield, mineral composition, water relations, and water use efficiency of grafted mini-watermelon plants under deficit irrigation. *HortScience*, 43(3), 730-736. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.43.3.730>
- Ruan, C. J., & Teixeira da Silva, J. A. (2011). Metabolomics: Creating new potentials for unraveling the mechanisms in response to salt and drought stress and for the biotechnological improvement of xero-halophytes. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(2), 153-169. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.505908>
- Ruiz, L., Janssen, D., Martin, G., Velasco, L., Segundo, E., & Cuadrado, I. M. (2006). Analysis of the temporal and spatial disease progress of Bemisia tabaci-transmitted Cucurbit yellow stunting disorder virus and Cucumber vein yellowing virus in cucumber. *Plant Pathology*, 55(2), 264-275. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01316.x>
- Ruiz-Sola, M. Á., Arbona, V., Gómez-Cadenas, A., Rodríguez-Concepción, M., & Rodríguez-Villalón, A. (2014). A root specific induction of carotenoid biosynthesis contributes to ABA production upon salt stress in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*, 9(3), e90765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090765>
- Ruta, V., Longo, C., Lepri, A., De Angelis, V., Occhigrossi, S., Costantino, P., & Vittorioso, P. (2020). The DOF transcription factors in seed and seedling development. *Plants*, 9(2), 218. <https://doi.org/10.3390/plants9020218>
- Sadiq, M., Akram, N. A., Ashraf, M., Al-Qurainy, F., & Ahmad, P. (2019). Alpha-tocopherol-induced regulation of growth and metabolism in plants under non-stress and stress conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38(4), 1325-1340. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-09936-7>
- Saeedipour, S., & Moradi, F. (2011). Comparison of the drought stress responses of tolerant and sensitive wheat cultivars during grain filling: Impact of invertase activity on carbon metabolism during kernel development. *Journal of Agricultural Science*, 3(2), p32. <https://doi.org/10.5539/jas.v3n2p32>
- Safi, A., Medici, A., Szponarski, W., Ruffel, S., Lacombe, B., & Krouk, G. (2017). The world according to GARP transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology*, 39, 159-167. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.07.006>
- Safi, A., Medici, A., Szponarski, W., Martin, F., Clément-Vidal, A., Marshall-Colon, A., Ruffel, S., Gaymard, F., Rouached, H., Leclercq, J., Coruzzi, G., Lacombe, B., & Krouk, G. (2021). GARP transcription factors repress *Arabidopsis* nitrogen starvation response via ROS-dependent and -independent pathways. *Journal of Experimental Botany*, erab114. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab114>
- Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J. G., Abe, H., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002). DNA-Binding Specificity of the ERF/AP2 Domain of Arabidopsis DREBs,

- Transcription Factors Involved in Dehydration- and Cold-Inducible Gene Expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290(3), 998-1009. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6299>
- Sánchez-Gómez, D., Majada, J., Alía, R., Feito, I., & Aranda, I. (2010). Intraspecific variation in growth and allocation patterns in seedlings of *Pinus pinaster* Ait. submitted to contrasting watering regimes: Can water availability explain regional variation? *Annals of Forest Science*, 67(5), 505-504. <https://doi.org/10.1051/forest/2010007>
- Sánchez-Gómez, D., Mancha, J. A., Cervera, M. T., & Aranda, I. (2017). Inter-genotypic differences in drought tolerance of maritime pine are modified by elevated [CO₂]. *Annals of Botany*, 120(4), 591-602. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx080>
- Sancho-Knapik, D., Sanz, M. Á., Peguero-Pina, J. J., Niinemets, Ü., & Gil-Pelegrín, E. (2017). Changes of secondary metabolites in *Pinus sylvestris* L. needles under increasing soil water deficit. *Annals of Forest Science*, 74(1), 24. <https://doi.org/10.1007/s13595-017-0620-7>
- Santa-Cruz, A., Martínez-Rodríguez, M. M., Pérez-Alfocea, F., Romero-Aranda, R., & Bolarin, M. C. (2002). The rootstock effect on the tomato salinity response depends on the shoot genotype. *Plant Science*, 162(5), 825-831. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00030-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00030-4)
- Santonja, M., Bousquet-Mélou, A., Greff, S., Ormeño, E., & Fernandez, C. (2019). Allelopathic effects of volatile organic compounds released from *Pinus halepensis* needles and roots. *Ecology and Evolution*, 9(14), 8201-8213. <https://doi.org/10.1002/ece3.5390>
- Sanz, F., Latour, S., Neves, M., Bastet, E., Pischedda, D., Piñeiro, G., Gauthier, T., Lesbats, J., Plantier, C., & Marques, A. (2006). Aplicaciones industriales de la madera de pino pinaster. *Centro de Innovación y Servicios Tecnológicos de la Madera de Galicia*.
- Sardans, J., Peñuelas, J., & Rivas-Ubach, A. (2011). Ecological metabolomics: Overview of current developments and future challenges. *Chemoecology*, 21(4), 191-225. <https://doi.org/10.1007/s00049-011-0083-5>
- Saucedo-García, M., Gavilanes-Ruíz, M., & Arce-Cervantes, O. (2015). Long-chain bases, phosphatidic acid, MAPKs, and reactive oxygen species as nodal signal transducers in stress responses in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00055>
- Schachtman, D. P., & Goodger, J. Q. D. (2008). Chemical root to shoot signaling under drought. *Trends in Plant Science*, 13(6), 281-287. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.04.003>
- Selmar, D., & Kleinwächter, M. (2013). Stress enhances the synthesis of secondary plant products: the impact of stress-related over-reduction on the accumulation of natural products. *Plant and Cell Physiology*, 54(6), 817-826. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct054>
- Serrano, M., Coluccia, F., Torres, M., L'Haridon, F., & Métraux, J. P. (2014). The cuticle and plant defense to pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00274>

- Seyoum, A., Asres, K., & El-Fiky, F. K. (2006). Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*, 67(18), 2058-2070. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.07.002>
- Sharma, A. K., Pallesen, L. J., Spang, R. J., & Walden, W. E. (2010). Cytosolic iron-sulfur cluster assembly (CIA) system: factors, mechanism, and relevance to cellular iron regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 285(35), 26745-26751. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.122218>
- Sharma, M., Gupta, S. K., Majumder, B., Maurya, V. K., Deeba, F., Alam, A., & Pandey, V. (2017). Salicylic acid mediated growth, physiological and proteomic responses in two wheat varieties under drought stress. *Journal of Proteomics*, 163, 28-51. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.05.011>
- Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., & Zheng, B. (2019). Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules*, 24(13), 2452. <https://doi.org/10.3390/molecules24132452>
- Shi, H., Chen, L., Ye, T., Liu, X., Ding, K., & Chan, Z. (2014). Modulation of auxin content in *Arabidopsis* confers improved drought stress resistance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 82, 209-217. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.06.008>
- Shi, H., Liu, W., Yao, Y., Wei, Y., & Chan, Z. (2017). Alcohol dehydrogenase 1 (ADH1) confers both abiotic and biotic stress resistance in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 262, 24-31. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.05.013>
- Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58(2), 221-227. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl164>
- Shojaie, B., Mostajeran, A., & Ghannadian, M. (2016). Flavonoid dynamic responses to different drought conditions: Amount, type, and localization of flavonols in roots and shoots of *Arabidopsis thaliana*. *Turk J Biol*, 40, 612-622. <https://doi.org/10.3906/biy-1505-2>
- Singh, D., & Laxmi, A. (2015). Transcriptional regulation of drought response: A tortuous network of transcriptional factors. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00895>
- Singh, S., & Singh, B. B. (2017). Nutritional evaluation of grasses and top foliages through in vitro system of sheep and goat for silvipasture system. *Range Management and Agroforestry*, 38(2), 241-248.
- Sinha, P., Pazhamala, L. T., Singh, V. K., Saxena, R. K., Krishnamurthy, L., Azam, S., Khan, A. W., & Varshney, R. K. (2016). Identification and Validation of Selected Universal Stress Protein Domain Containing Drought-Responsive Genes in Pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01065>
- Song, W. Y., Zhang, Z. B., Shao, H. B., Guo, X. L., Cao, H. X., Zhao, H. B., Fu, Z. Y., & Hu, X. J. (2008). Relationship between calcium decoding elements and plant abiotic-stress resistance. *International Journal of Biological Sciences*, 116-125. <https://doi.org/10.7150/ijbs.4.116>

- Song, L., Huang, S. S. C., Wise, A., Castanon, R., Nery, J. R., Chen, H., Watanabe, M., Thomas, J., Bar-Joseph, Z., & Ecker, J. R. (2016). A transcription factor hierarchy defines an environmental stress response network. *Science*, *354*(6312), aag1550-aag1550. <https://doi.org/10.1126/science.aag1550>
- Spanò, R., Ferrara, M., Gallitelli, D., & Mascia, T. (2020). The role of grafting in the resistance of tomato to viruses. *Plants*, *9*(8), 1042. <https://doi.org/10.3390/plants9081042>
- Sperry, J. S., Hacke, U. G., & Pittermann, J. (2006). Size and function in conifer tracheids and angiosperm vessels. *American Journal of Botany*, *93*(10), 1490-1500. <https://doi.org/10.3732/ajb.93.10.1490>
- Srivastava, S., Dashora, K., Ameta, K. L., Singh, N. P., El-Enshasy, H. A., Pagano, M. C., Hesham, A. E., Sharma, G. D., Sharma, M., & Bhargava, A. (2021). Cysteine-rich antimicrobial peptides from plants: The future of antimicrobial therapy. *Phytotherapy Research*, *35*(1), 256-277. <https://doi.org/10.1002/ptr.6823>
- Srivastava, V., & Verma, P. K. (2017). The plant LIM proteins: Unlocking the hidden attractions. *Planta*, *246*(3), 365-375. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2715-7>
- Sterck, L., Cabezas, J. A., Avila, C., De Miguel, M., Li, Z., de Maria, N., Rodrigues, A., Cañas, R. A., Ehrenmann, F., Guevara, M. Á., Chaves, I., Mongy, M., López-Hinojosa, M., de la Torre, F. N., Pizarro, A., Vasques Costa, B., Arrillaga, I., Miguel, C., Plomion, C., Cervera, M. T. (2019). Maritime pine genome sequence and analysis. XIII IUFRO Conference on Tree Biotechnology, Raleigh, NC (USA).
- Stevens, K. A., Wegrzyn, J. L., Zimin, A., Puiu, D., Crepeau, M., Cardeno, C., Paul, R., Gonzalez-Ibeas, D., Koriabine, M., Holtz-Morris, A. E., Martínez-García, P. J., Sezen, U. U., Marçais, G., Jermstad, K., McGuire, P. E., Loopstra, C. A., Davis, J. M., Eckert, A., de Jong, P., Langley, C. H. (2016). Sequence of the Sugar Pine Megagenome. *Genetics*, *204*(4), 1613-1626. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.193227>
- Stuurman, J. (2002). Shoot meristem maintenance is controlled by a GRAS-gene mediated signal from differentiating cells. *Genes & Development*, *16*(17), 2213-2218. <https://doi.org/10.1101/gad.230702>
- Suárez-Vidal, E., Sampedro, L., Voltas, J., Serrano, L., Notivol, E., & Zas, R. (2019). Drought stress modifies early effective resistance and induced chemical defences of Aleppo pine against a chewing insect herbivore. *Environmental and Experimental Botany*, *162*, 550-559. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.04.002>
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., & Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(43), 15545-15550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>
- Sun, L., Liu, Y., Kong, X., Zhang, D., Pan, J., Zhou, Y., Wang, L., Li, D., & Yang, X. (2012). ZmHSP16.9, a cytosolic class I small heat shock protein in maize (*Zea mays*), confers heat tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell Reports*, *31*(8), 1473-1484. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1262-8>
- Sun, M., Jia, B., Yang, J., Cui, N., Zhu, Y., & Sun, X. (2017). Genome-wide identification of the PHD-finger family genes and their responses to environmental stresses in *Oryza*

- sativa* L. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), 2005. <https://doi.org/10.3390/ijms18092005>
- Sun, X., Matus, J. T., Wong, D. C. J., Wang, Z., Chai, F., Zhang, L., Fang, T., Zhao, L., Wang, Y., Han, Y., Wang, Q., Li, S., Liang, Z., & Xin, H. (2018). The GARP/MYB-related grape transcription factor AQUILO improves cold tolerance and promotes the accumulation of raffinose family oligosaccharides. *Journal of Experimental Botany*, 69(7), 1749-1764. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery020>
- Sun, J., Sigler, C. L., Beaudoin, G. A. W., Joshi, J., Patterson, J. A., Cho, K. H., Ralat, M. A., Gregory, J. F., Clark, D. G., Deng, Z., Colquhoun, T. A., & Hanson, A. D. (2019). Parts-prospecting for a high-efficiency thiamin thiazole biosynthesis pathway. *Plant Physiology*, 179(3), 958-968. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01085>
- Sura, W., Kabza, M., Karlowski, W. M., Bieluszewski, T., Kus-Slowinska, M., Pawełszek, Ł., Sadowski, J., & Ziolkowski, P. A. (2017). Dual role of the histone variant H2A.Z in transcriptional regulation of stress-response genes. *The Plant Cell*, 29(4), 791-807. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00573>
- Szechyńska-Hebda, M., Czarnocka, W., Hebda, M., & Karpiński, S. (2016). PAD4, LSD1 and EDS1 regulate drought tolerance, plant biomass production, and cell wall properties. *Plant Cell Reports*, 35(3), 527-539. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1901-y>
- Szemenyei, H., Hannon, M., & Long, J. A. (2008). TOPLESS Mediates Auxin-Dependent Transcriptional Repression During Arabidopsis Embryogenesis. *Science*, 319(5868), 1384-1386. <https://doi.org/10.1126/science.1151461>
- Taft, S., Najar, A., Godbout, J., Bousquet, J., & Erbilgin, N. (2015). Variations in foliar monoterpenes across the range of jack pine reveal three widespread chemotypes: Implications to host expansion of invasive mountain pine beetle. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00342>
- Taji, T., Ohsumi, C., Iuchi, S., Seki, M., Kasuga, M., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2002). Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 29(4), 417-426. <https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2001.01227.x>
- Takahashi, T., Shimoi, H., & Ito, K. (2001). Identification of genes required for growth under ethanol stress using transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*, 265(6), 1112-1119. <https://doi.org/10.1007/s004380100510>
- Tattini, M., Galardi, C., Pinelli, P., Massai, R., Remorini, D., & Agati, G. (2004). Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. *New Phytologist*, 163(3), 547-561. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01126.x>
- Thalmann, M., & Santelia, D. (2017). Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. *New Phytologist*, 214(3), 943-951. <https://doi.org/10.1111/nph.14491>
- Thomas, H. R., & Frank, M. H. (2019). Connecting the pieces: Uncovering the molecular basis for long-distance communication through plant grafting. *New Phytologist*, 223(2), 582-589. <https://doi.org/10.1111/nph.15772>

- Tiong, J., McDonald, G. K., Genc, Y., Pedas, P., Hayes, J. E., Toubia, J., Langridge, P., & Huang, C. Y. (2014). H v ZIP 7 mediates zinc accumulation in barley (*Hordeum vulgare*) at moderately high zinc supply. *New Phytologist*, *201*(1), 131-143. <https://doi.org/10.1111/nph.12468>
- Tiwari, S., Lata, C., Chauhan, P. S., Prasad, V., & Prasad, M. (2017). A functional genomic perspective on drought signalling and its crosstalk with phytohormone-mediated signalling pathways in plants. *Current Genomics*, *18*(6). <https://doi.org/10.2174/1389202918666170605083319>
- Todaka, D., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2015). Recent advances in the dissection of drought-stress regulatory networks and strategies for development of drought-tolerant transgenic rice plants. *Frontiers in Plant Science*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00084>
- Tombesi, S., Johnson, R. S., Day, K. R., & DeJong, T. M. (2010). Interactions between rootstock, inter-stem and scion xylem vessel characteristics of peach trees growing on rootstocks with contrasting size-controlling characteristics. *AoB PLANTS*, *2010*. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plq013>
- Torres Ruíz, J. M. (2018). Vulnerabilidad al embolismo: El reto de las plantas para transportar agua desde el suelo a las hojas. *Revista de la Sociedad Espanola de Fisiologia Vegetal*, *66*, 4-12.
- Tramontini, S., van Leeuwen, C., Domec, J. C., Destrac-Irvine, A., Basteau, C., Vitali, M., Mosbach-Schulz, O., & Lovisolo, C. (2013). Impact of soil texture and water availability on the hydraulic control of plant and grape-berry development. *Plant and Soil*, *368*(1-2), 215-230. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1507-x>
- Tripathi, P., Rabara, R. C., & Rushton, P. J. (2014). A systems biology perspective on the role of WRKY transcription factors in drought responses in plants. *Planta*, *239*(2), 255-266. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1985-y>
- Trusov, Y., Zhang, W., Assmann, S. M., & Botella, J. R. (2008). $G\gamma 1 + G\gamma 2 \neq G\beta$: Heterotrimeric G protein $G\gamma$ -deficient mutants do not recapitulate all phenotypes of $G\beta$ -deficient mutants. *Plant Physiology*, *147*(2), 636-649. <https://doi.org/10.1104/pp.108.117655>
- Tsunoda, T., Krosse, S., & van Dam, N. M. (2017). Root and shoot glucosinolate allocation patterns follow optimal defence allocation theory. *Journal of Ecology*, *105*(5), 1256-1266. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12793>
- Tsutsui, H., & Notaguchi, M. (2017). The use of grafting to study systemic signaling in plants. *Plant and Cell Physiology*, *58*(8), 1291-1301. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx098>
- Turner, N. C. (2018). Turgor maintenance by osmotic adjustment: 40 years of progress. *Journal of Experimental Botany*, *69*(13), 3223-3233. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery181>
- Turtola, S., Manninen, A. M., Rikala, R., & Kainulainen, P. (2003). Drought stress alters the concentration of wood terpenoids in Scots pine and Norway spruce seedlings. *Journal of Chemical Ecology*, *29*(9), 1981-1995. <https://doi.org/10.1023/A:1025674116183>
- Tyree M. T. & Zimmermann M. H. (2002). Xylem Structure and the Ascent of Sap. New York, NY, USA: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-04931-0>

- Ulaş, A., Aydın, A., Ulas, F., & Yetişir, H. (2019). Contribution of roots to growth and physiology of watermelon grafted onto rooted and unrooted seedlings of various bottle gourd rootstocks. *International Journal of Agriculture, Environment and Food Sciences*, 211-212. <https://doi.org/10.31015/jaefs.2019.4.2>
- Ullah, N., Yüce, M., Neslihan Öztürk Gökçe, Z., & Budak, H. (2017). Comparative metabolite profiling of drought stress in roots and leaves of seven *Triticeae* species. *BMC Genomics*, 18(1), 969. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4321-2>
- Ulusik, S., & Seymour, G. B. (2020). Pectate lyases: Their role in plants and importance in fruit ripening. *Food Chemistry*, 309, 125559. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125559>
- Upchurch, R. G. (2008). Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnology Letters*, 30(6), 967-977. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9639-z>
- Urano, K., Maruyama, K., Ogata, Y., Morishita, Y., Takeda, M., Sakurai, N., Suzuki, H., Saito, K., Shibata, D., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2009). Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in *Arabidopsis* by metabolomics. *The Plant Journal*, 57(6), 1065-1078. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03748.x>
- Usadel, B., Poree, F., Nagel, A., Lohse, M., Czedik-Eysenberg, A., & Stitt, M. (2009). A guide to using MapMan to visualize and compare Omics data in plants: A case study in the crop species, Maize. *Plant, Cell & Environment*, 32(9), 1211-1229. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01978.x>
- Valladares, F., Matesanz, S., Guilhaumon, F., Araújo, M. B., Balaguer, L., Benito-Garzón, M., Cornwell, W., Gianoli, E., Kleunen, M., Naya, D. E., Nicotra, A. B., Poorter, H., & Zavala, M. A. (2014). The effects of phenotypic plasticity and local adaptation on forecasts of species range shifts under climate change. *Ecology Letters*, 17(11), 1351-1364. <https://doi.org/10.1111/ele.12348>
- Van Aken, O., Pečenková, T., van de Cotte, B., De Rycke, R., Eeckhout, D., Fromm, H., De Jaeger, G., Witters, E., Beemster, G. T. S., Inzé, D., & Van Breusegem, F. (2007). Mitochondrial type-I prohibitins of *Arabidopsis thaliana* are required for supporting proficient meristem development. *The Plant Journal*, 52(5), 850-864. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03276.x>
- Van den Berg, R. A., Hoefsloot, H. C., Westerhuis, J. A., Smilde, A. K., & van der Werf, M. J. (2006). Centering, scaling, and transformations: Improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics*, 7(1), 142. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-142>
- Vanderklein, D., Martinez-Vilalta, J., Lee, S., & Mencuccini, M. (2007). Plant size, not age, regulates growth and gas exchange in grafted Scots pine trees. *Tree Physiology*, 27(1), 71-79. <https://doi.org/10.1093/treephys/27.1.71>
- Vaughn, M. W., Tanurdžić, M., Lippman, Z., Jiang, H., Carrasquillo, R., Rabinowicz, P. D., Dedhia, N., McCombie, W. R., Agier, N., Bulski, A., Colot, V., Doerge, R. W., & Martienssen, R. A. (2007). Epigenetic natural variation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biology*, 5(7), e174. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050174>

- Velasco-Conde, T., Yakovlev, I., Majada, J. P., Aranda, I., & Johnsen, Ø. (2012). Dehydrins in maritime pine (*Pinus pinaster*) and their expression related to drought stress response. *Tree Genetics & Genomes*, 8(5), 957-973. <https://doi.org/10.1007/s11295-012-0476-9>
- Vij, S., & Tyagi, A. K. (2006). Genome-wide analysis of the stress associated protein (SAP) gene family containing A20/AN1 zinc-finger(s) in rice and their phylogenetic relationship with Arabidopsis. *Molecular Genetics and Genomics*, 276(6), 565-575. <https://doi.org/10.1007/s00438-006-0165-1>
- Wagner, A., Tobimatsu, Y., Goeminne, G., Phillips, L., Flint, H., Steward, D., Torr, K., Donaldson, L., Boerjan, W., & Ralph, J. (2013). Suppression of CCR impacts metabolite profile and cell wall composition in *Pinus radiata* tracheary elements. *Plant Molecular Biology*, 81(1-2), 105-117. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9985-z>
- Walter, J., Delmond, B., & Pauly, G. (1985). The resin acids of needles and cortical tissues of maritime pines (*Pinus pinaster* Ait.) from Landes and Corsica. Occurrence of anticopalic acid in the needles from Corsican origin. *C. R. Acad. Sci. Ser.* 3(301), 539–542.
- Wan, Y., Mao, M., Wan, D., Yang, Q., Yang, F., Mandlaa, Li, G., & Wang, R. (2018). Identification of the WRKY gene family and functional analysis of two genes in *Caragana intermedia*. *BMC Plant Biology*, 18(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1235-3>
- Wan, T., Feng, Y., Liang, C., Pan, L., He, L., & Cai, Y. (2021). Metabolomics and transcriptomics analyses of two contrasting cherry rootstocks in response to drought stress. *Biology*, 10(3), 201. <https://doi.org/10.3390/biology10030201>
- Wang, H., Lee, P., Chen, W., Huang, D., & Su, J. (2000). Osmotic stress-induced changes of sucrose metabolism in cultured sweet potato cells. *Journal of Experimental Botany*, 51(353), 1991-1999. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.353.1991>
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 57-63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>
- Wang, S., Li, E., Porth, I., Chen, J.-G., Mansfield, S. D., & Douglas, C. J. (2014). Regulation of secondary cell wall biosynthesis by poplar R2R3 MYB transcription factor PtrMYB152 in *Arabidopsis*. *Scientific Reports*, 4(1), 5054. <https://doi.org/10.1038/srep05054>
- Wang, M. M., Liu, M. M., Ran, F., Guo, P. C., Ke, Y. Z., Wu, Y. W., Wen, J., Li, P. F., Li, J. N., & Du, H. (2018). Global analysis of WOX transcription factor gene family in *Brassica napus* reveals their stress- and hormone-responsive patterns. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3470. <https://doi.org/10.3390/ijms19113470>
- Wang, X., Li, Q., Xie, J., Huang, M., Cai, J., Zhou, Q., Dai, T., & Jiang, D. (2021). Abscisic acid and jasmonic acid are involved in drought priming-induced tolerance to drought in wheat. *The Crop Journal*, 9(1), 120-132. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2020.06.002>
- Wanke, D., & Kolukisaoglu, H. U. (2010). An update on the ABCC transporter family in plants: Many genes, many proteins, but how many functions? : An update on the ABCC transporter family in plants. *Plant Biology*, 12, 15-25. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2010.00380.x>

- Warren, C. R., Aranda, I., & Cano, F. J. (2011). Responses to water stress of gas exchange and metabolites in *Eucalyptus* and *Acacia* spp. *Plant, Cell & Environment*, 34(10), 1609-1629. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02357.x>
- Warren, C. R., Aranda, I., & Cano, F. J. (2012). Metabolomics demonstrates divergent responses of two *Eucalyptus* species to water stress. *Metabolomics*, 8(2), 186-200. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0299-y>
- Warren, R. L., Keeling, C. I., Yuen, M. M. S., Raymond, A., Taylor, G. A., Vandervalk, B. P., Mohamadi, H., Paulino, D., Chiu, R., Jackman, S. D., Robertson, G., Yang, C., Boyle, B., Hoffmann, M., Weigel, D., Nelson, D. R., Ritland, C., Isabel, N., Jaquish, B., Bohlmann, J. (2015). Improved white spruce (*Picea glauca*) genome assemblies and annotation of large gene families of conifer terpenoid and phenolic defense metabolism. *The Plant Journal*, 83(2), 189-212. <https://doi.org/10.1111/tpj.12886>
- Whittle, C. A., Otto, S. P., Johnston, M. O., & Krochko, J. E. (2009). Adaptive epigenetic memory of ancestral temperature regime in *Arabidopsis thaliana*. *Botany*, 87(6), 650-657. <https://doi.org/10.1139/B09-030>
- Widhalm, J. R., & Dudareva, N. (2015). A familiar ring to it: biosynthesis of plant benzoic acids. *Molecular Plant*, 8(1), 83-97. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.001>
- Wiley, E., & Helliker, B. (2012). A re-evaluation of carbon storage in trees lends greater support for carbon limitation to growth. *New Phytologist*, 195(2), 285-289. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04180.x>
- Xiao, C., Somerville, C., & Anderson, C. T. (2014). Polygalacturonase involved in expansion1 functions in cell elongation and flower development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 26(3), 1018-1035. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.123968>
- Xie, Z., Nolan, T. M., Jiang, H., & Yin, Y. (2019). AP2/ERF Transcription Factor Regulatory Networks in Hormone and Abiotic Stress Responses in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 10, 228. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00228>
- Xin, Z., Zhang, J., Ge, L., Lei, S., Han, J., Zhang, X., Li, X., & Sun, X. (2017). A putative 12-oxophytodienoate reductase gene CsOPR3 from *Camellia sinensis*, is involved in wound and herbivore infestation responses. *Gene*, 615, 18-24. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.03.013>
- Xin, X., Su, T., Li, P., Wang, W., Zhao, X., Yu, Y., Zhang, D., Yu, S., & Zhang, F. (2021). A histone H4 gene prevents drought-induced bolting in Chinese cabbage by attenuating the expression of flowering genes. *Journal of Experimental Botany*, 72(2), 623-635. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa452>
- Xu, L., Xing, S. T., Sun, X. Z., Guo, J. E., & Xu, D. H. (2014). Effects of polyamines on hormones contents and the relationship with the flower bud differentiation in *Chrysanthemum*. *Zhiwu Shengli Xuebao / Plant Physiol*, 50, 1195. <https://doi.org/10.13592/j.cnki.ppj.2014.0212>
- Xu, K., Chen, S., Li, T., Ma, X., Liang, X., Ding, X., Liu, H., & Luo, L. (2015). OsGRAS23, a rice GRAS transcription factor gene, is involved in drought stress response through regulating expression of stress-responsive genes. *BMC Plant Biology*, 15(1), 141. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0532-3>

- Xu, Q., Zhao, M., Wu, K., Fu, X., & Liu, Q. (2016). Emerging insights into heterotrimeric G protein signaling in plants. *Journal of Genetics and Genomics*, 43(8), 495-502. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2016.06.004>
- Xu, P., Zhang, X., Su, H., Liu, X., Wang, Y., & Hong, G. (2020). Genome-wide analysis of *PYL-PP2C-SnRK2s* family in *Camellia sinensis*. *Bioengineered*, 11(1), 103-115. <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1710932>
- Xue, G. P., McIntyre, C. L., Jenkins, C. L. D., Glassop, D., van Herwaarden, A. F., & Shorter, R. (2008). Molecular dissection of variation in carbohydrate metabolism related to water-soluble carbohydrate accumulation in stems of wheat. *Plant Physiology*, 146(2), 323-324. <https://doi.org/10.1104/pp.107.113076>
- Xylem Structure and the Ascent of Sap*. (2002). <https://doi.org/10.1007/978-3-662-04931-0>
- Yagi, Y., Ishizaki, Y., Nakahira, Y., Tozawa, Y., & Shiina, T. (2012). Eukaryotic-type plastid nucleoid protein pTAC3 is essential for transcription by the bacterial-type plastid RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(19), 7541-7546. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119403109>
- Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 781-803. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105444>
- Yang, S. D., Seo, P. J., Yoon, H. K., & Park, C. M. (2011). The Arabidopsis NAC transcription factor VNI2 integrates abscisic acid signals into leaf senescence via the COR/RD genes. *The Plant Cell*, 23(6), 2155-2168. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.084913>
- Yang, Y., Ahammed, G. J., Wan, C., Liu, H., Chen, R., & Zhou, Y. (2019). Comprehensive analysis of TIFY transcription factors and their expression profiles under jasmonic acid and abiotic stresses in watermelon. *International Journal of Genomics*, 2019, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2019/6813086>
- Yao, T., Zhang, J., Xie, M., Yuan, G., Tschaplinski, T. J., Muchero, W., & Chen, J.-G. (2021). Transcriptional regulation of drought response in *Arabidopsis* and woody plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 572137. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.572137>
- Yates, S. A., Swain, M. T., Hegarty, M. J., Chernukin, I., Lowe, M., Allison, G. G., Ruttink, T., Abberton, M. T., Jenkins, G., & Skøt, L. (2014). De novo assembly of red clover transcriptome based on RNA-Seq data provides insight into drought response, gene discovery and marker identification. *BMC Genomics*, 15(1), 453. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-453>
- Yoshida, T., Mogami, J., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2014). ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 21, 133-139. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.07.009>
- Yoshida, T., Fujita, Y., Maruyama, K., Mogami, J., Todaka, D., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2015). Four Arabidopsis AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic acid signalling in response to osmotic stress. *Plant, Cell & Environment*, 38(1), 35-49. <https://doi.org/10.1111/pce.12351>

- Yuan, J. S., Yang, X., Lai, J., Lin, H., Cheng, Z.-M., Nonogaki, H., & Chen, F. (2006). The Endo- β -Mannanase gene families in *Arabidopsis*, rice, and poplar. *Functional & Integrative Genomics*, 7(1), 1-16. <https://doi.org/10.1007/s10142-006-0034-3>
- Zanetti, M. E., Rípodas, C., & Niebel, A. (2017). Plant NF-Y transcription factors: Key players in plant-microbe interactions, root development and adaptation to stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1860(5), 645-654. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.11.007>
- Zangerl, A. R., & Rutledge, C. E. (1996). The Probability of Attack and Patterns of Constitutive and Induced Defense: A Test of Optimal Defense Theory. *The American Naturalist*, 147(4), 599-608. <https://doi.org/10.1086/285868>
- Zawaski, C., & Busov, V. B. (2014). Roles of gibberellin catabolism and signaling in growth and physiological response to drought and short-day photoperiods in *Populus* trees. *PLoS ONE*, 9(1), e86217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086217>
- Zeng, H., Xu, L., Singh, A., Wang, H., Du, L., & Poovaiah, B. W. (2015). Involvement of calmodulin and calmodulin-like proteins in plant responses to abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00600>
- Zhang, Y., Yang, C., Li, Y., Zheng, N., Chen, H., Zhao, Q., Gao, T., Guo, H., & Xie, Q. (2007). SDIR1 is a ring finger E3 ligase that positively regulates stress-responsive abscisic acid signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19(6), 1912-1929. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048488>
- Zhang, Y., Zhang, F., Li, X., Baller, J. A., Qi, Y., Starker, C. G., Bogdanove, A. J., & Voytas, D. F. (2012). Transcription Activator-Like Effector Nucleases Enable Efficient Plant Genome Engineering. *Plant Physiology*, 161(1), 20-27. <https://doi.org/10.1104/pp.112.205179>
- Zhang, B., Holmlund, M., Lorrain, S., Norberg, M., Bakó, L., Fankhauser, C., & Nilsson, O. (2017). Blade-on-petiole proteins act in an E3 ubiquitin ligase complex to regulate phytochrome interacting factor 4 abundance. *ELife*, 6, e26759. <https://doi.org/10.7554/eLife.26759>
- Zhang, T., Li, C., Li, D., Liu, Y., & Yang, X. (2020). Roles of YABBY transcription factors in the modulation of morphogenesis, development, and phytohormone and stress responses in plants. *Journal of Plant Research*, 133(6), 751-763. <https://doi.org/10.1007/s10265-020-01227-7>
- Zhang, Y., Li, Z., Ma, B., Hou, Q., & Wan, X. (2020a). Phylogeny and functions of LOB domain proteins in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2278. <https://doi.org/10.3390/ijms21072278>
- Zhao, R., Sun, H. L., Mei, C., Wang, X. J., Yan, L., Liu, R., Zhang, X. F., Wang, X. F., & Zhang, D. P. (2011). The *Arabidopsis* Ca²⁺-dependent protein kinase CPK12 negatively regulates abscisic acid signaling in seed germination and post-germination growth. *New Phytologist*, 192(1), 61-73. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03793.x>
- Zhao, T., Krokene, P., Hu, J., Christiansen, E., Björklund, N., Långström, B., Solheim, H., & Borg-Karlson, A.-K. (2011a). Induced terpene accumulation in Norway Spruce inhibits bark beetle colonization in a dose-dependent manner. *PLoS ONE*, 6(10), e26649. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026649>

- Zhao, J., Zhao, Y., Hu, C., Zhao, C., Zhang, J., Li, L., Zeng, J., Peng, X., Lu, X., & Xu, G. (2016). Metabolic profiling with Gas Chromatography–Mass Spectrometry and Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry reveals the carbon–nitrogen status of tobacco leaves across different planting areas. *Journal of Proteome Research*, *15*(2), 468-476. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00807>
- Zhao, Y., Li, X., Wang, F., Zhao, X., Gao, Y., Zhao, C., He, L., Li, Z., & Xu, J. (2018). Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) gene family in *Zea mays* L.: Identification, subcellular localization, and transcriptional responses to abiotic stresses. *PLOS ONE*, *13*(7), e0200357. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200357>
- Zhao, P. X., Miao, Z. Q., Zhang, J., Chen, S. Y., Liu, Q. Q., & Xiang, C. B. (2020). Arabidopsis MADS-box factor AGL16 negatively regulates drought resistance via stomatal density and stomatal movement. *Journal of Experimental Botany*, *71*(19), 6092-6106. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa303>
- Zhong, D., Du, H., Wang, Z., & Huang, B. (2011). Genotypic variation in fatty acid composition and unsaturation levels in bermudagrass associated with leaf dehydration tolerance. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *136*(1), 35-40. <https://doi.org/10.21273/JASHS.136.1.35>
- Zhou, X., Hua, D., Chen, Z., Zhou, Z., & Gong, Z. (2009). Elongator mediates ABA responses, oxidative stress resistance and anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *60*(1), 79-90. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03931.x>
- Zhou, C., Zhu, C., Xie, S., Weng, J., Lin, Y., Lai, Z., & Guo, Y. (2021). Genome-wide analysis of zinc finger motif-associated homeodomain (ZF-HD) family genes and their expression profiles under abiotic stresses and phytohormones stimuli in tea plants (*Camellia sinensis*). *Scientia Horticulturae*, *281*, 109976. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.109976>
- Zhu, J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, *53*(1), 247-273. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.091401.143329>
- Zhu, P., Chen, Y., Zhang, J., Wu, F., Wang, X., Pan, T., Wei, Q., Hao, Y., Chen, X., Jiang, C., & Ji, K. (2021). Identification, classification, and characterization of AP2/ERF superfamily genes in Masson pine (*Pinus massoniana* Lamb.). *Scientific Reports*, *11*(1), 5441. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84855-w>
- Zimin, A. V., Stevens, K. A., Crepeau, M. W., Puiu, D., Wegrzyn, J. L., Yorke, J. A., Langley, C. H., Neale, D. B., & Salzberg, S. L. (2017). An improved assembly of the loblolly pine mega-genome using long-read single-molecule sequencing. *GigaScience*, *6*(1). <https://doi.org/10.1093/gigascience/giw016>
- Zonneveld, B. J. M. (2012). Conifer genome sizes of 172 species, covering 64 of 67 genera, range from 8 to 72 picogram. *Nordic Journal of Botany*, *30*(4), 490-502. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.2012.01516.x>

CAPÍTULOS VII:
AGRADECIMIENTOS

Y ahora toca la parte complicada de la Tesis. Me da miedo no ser capaz de plasmarlo todo y olvidarme de nombrar a alguien, pero ¡Allá voy!

Quería comenzar este apartado agradeciendo sinceramente a mis directoras y tutora de Tesis, Maite, Maribrí y Carmen Díaz-Sala, que me han hecho este camino mucho más fácil. Además de contagiarme su capacidad de trabajo y coraje, me han guiado en todo el proceso de investigación, en cada idea y experimento, permitiéndome integrar conocimientos de un montón de disciplinas. Maite tu ayuda constante, a cualquier hora y día de la semana, siempre con una solución, haces crecer a cada persona que trabaja contigo, mil gracias. Maribrí, tu paciencia y ayuda en un mundo que me era desconocido, siempre dispuesta a colaborar, formarme y guiarme, muchas gracias. Carmen, junto con Alberto, me acogiste en tu laboratorio y gracias a ti comencé mi andadura en este proceso de formación ¡Mi más sincera gratitud! No se me ocurren mejores ejemplos de mujeres de ciencia, en los que me gustaría verme reflejada algún día. Muchas gracias por el apoyo que he recibido hasta finalizar la Tesis, espero que nos queden muchos proyectos por compartir.

Gracias a todas las personas que han formado y forman los grupazos de Genómica Forestal y Química Orgánica del CIFOR, que además de grandes profesionales, son grandes personas. A Ángeles, mi compañera de laboratorio en las larguísimas sesiones de extracciones, me has ayudado enormemente en todo el proceso y has sido fundamental para conseguir la publicación del paper, ¡Mil gracias! A Nuria, que me introdujiste en el mundo de la bioinformática y me acompañaste en mi estancia formativa en la UAH, muchas gracias por tu paciencia y comprensión. A Mariló, mi compi de despacho y laboratorio, contigo todo ha sido mucho más sencillo, me has inculcado tu precisión y destreza en el laboratorio, muchas gracias. A mi vecino JAC, por estar siempre dispuesto a ayudar, poniendo la calma incluso en las situaciones más estresantes, como cuando se trataba de Linux... ¡Muchas gracias compañero! A mis compañeros jubiletas Luis y Antonio, los jefes del laboratorio, presentes en cada experimento, vuestra experiencia ha sido clave para llegar a este momento, ¡Os debo una fresquita! A José Antonio, por tu ayuda en el cuidado y preparación de las plantas, nadie las conoce como tú, tanto en invernadero como en la finca, mil gracias. A Lorenzo, por tu ayuda en los últimos análisis, mucha suerte en el camino que emprendes. Al resto de compis del laboratorio de Química Orgánica, por ayudarme a enterarme mejor del análisis de picos y metabolitos, Estrella, Susana y Rosa, muchas gracias por nuestras charlas entre análisis y experimentos. Gracias además a todas las personas que han contribuido en algún momento a la consecución de la Tesis, aunque no os puedo nombrar a todo/as, mi más sincera gratitud. A Susana por ser la alegría del INIA, transmitiendo siempre tan buen rollo, todavía me acuerdo de mi primer día y como me acogiste, muchas gracias. A mis compañeras becarias, Azucena, Aída, Marta, estoy segura que vais a tener un futuro brillante chicas. A Carmen por su ayuda en el laboratorio. A Carmen Collada por su ayuda en la recogida de muestra y análisis de datos, ¡Mil gracias! A Manolo y Pablo, nuestros compañeros “granaínos” por su ayuda durante mi estancia y por los largos paseos por la Sierra de Oria. Al antiguo equipo de Life Sequencing, y en especial a Dani, por tu ayuda en el análisis de datos, ¡Me ayudaste a no perder mucho la cabeza! Mencionar también a todas aquellas instituciones que han financiado mis estudios doctorales y han permitido mi formación, las ayudas FPI para la formación de doctores, además de los distintos proyectos nacionales e

internacionales que se detallan en cada uno de los capítulos ¡Gracias también a mis diseñadores gráficos! Mi compi de entrenos y sufrimientos Dani y mi compañera cecopera, Iciar, que me ha ayudado a la maquetación de la Tesis.

Me gustaría acabar agradeciendo a mi familia, mi pilar fundamental, aunque sea difícil explicar en tan poco espacio el amor y admiración que os tengo. A Marta, mi hermana, amiga, confidente y cómplice. Gracias por estar ahí cada vez que lo necesitaba, por todas las cosas que solo nosotras entendemos... ¡Pera! A mis padres, Francis y Paqui, por su apoyo incondicional en cada una de mis decisiones, sois mi inspiración diaria para querer crecer como persona, os debo todo lo que soy y me gustaría ser. Papá eres mi referente del trabajo bien hecho, perfeccionista y buen compañero. Mamá eres la definición de mujer luchadora, para ti no hay obstáculos. Gracias a los dos. A Adri, por aguantar mis momentos de estrés y de locura, por hacerme mejor persona, por ser mi compañero de vida. Sin vosotros nada de esto hubiera sido posible. También quería hacer una mención especial a mis abuelos, Paquita, Rosarito, Antonio y mi ángel desde el cielo, Luis, por transmitirme tanto amor y velar por mi cada día. Y en general agradecer a toda mi familia, titos, titas, mis primos enanos, mi familia política Mari y Paco, y todos los que me dejo sin nombrar pero que han sido fundamentales para formarme como persona.

Muchas gracias a todos, ¡Esto es un trabajo de todos!

