

TOLERANCIA DE *EUCALYPTUS GLOBULUS* (LABILL) AL ESTRÉS HÍDRICO SEVERO: DE LA FISIOLOGÍA A LA GENÉTICA

VÍCTOR GRANDA GARCÍA



Universidad de Oviedo

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado: Biología aplicada a la sostenibilidad de recursos naturales  
(Mención de calidad)

Departamento de Biología de Organismos y Sistemas  
Área de Fisiología Vegetal  
Facultad de Biología  
Universidad de Oviedo

2015 Oviedo

Víctor Granda García: *Tolerancia de Eucalyptus globulus (Labill) al estrés hídrico severo: de la fisiología a la genética*

**DIRECTORAS:**

Dra. Ana Rodríguez Alonso

Dra. Isabel Feito Díaz





## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: <b>Tolerancia de <i>Eucalyptus globulus</i> (Labill.) al estrés hídrico severo: de la fisiología a la genética.</b>	Inglés: <b>Severe drought tolerance of <i>Eucalyptus globulus</i> (Labill.): from physiology to genetics.</b>
2.- Autor	
Nombre: <b>Víctor Granda García</b>	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: <b>Biología aplicada a la sostenibilidad de recursos naturales (Mención de calidad)</b>	
Órgano responsable:	

### RESUMEN (en español)

Los investigación realizada durante el desarrollo de esta tesis se ha dividido en dos bloques fundamentales: en primer lugar un estudio dirigido para la caracterización fisiológica y molecular del estrés severo (-0,6 MPa) a corto plazo en plantas juveniles del clon comercial C14 de *Eucalyptus globulus* (Labill.) y posteriormente un estudio aplicado simulando un estrés hídrico a largo plazo en nueve clones diferentes de *E. globulus* en condiciones naturales.

En el primer bloque, el desarrollo de un método de inducción del estrés rápido y controlado, ha permitido profundizar en las primeras etapas del estrés, desde el momento de la inducción hasta pasadas 72 h de estrés severo constante. Así, se ha obtenido información sobre la señalización química a larga distancia del estrés, de los procesos fisiológicos implicados en las respuestas de estas plantas y las dinámicas de expresión de genes afectados por el déficit hídrico, como son HDA6, PDR, CESA, NCED, STS-like y PX27.

En un primer momento y antes del establecimiento de un estrés constante, tras iniciarse el descenso en la disponibilidad de agua y el potencial hídrico, se produce una alcalinización del pH del líquido xilemático de las raíces, seguida inmediatamente por un aumento en la concentración de ABA de manera secuencial en toda la planta: primero observamos un aumento del contenido en el xilema radical, posteriormente en el xilema de la parte aérea y finalmente en los tejidos apicales del tallo. Esta dinámica no solo se relaciona directamente con las modificaciones observadas en los parámetros fotosintéticos y estomáticos (Gs, E, y A), también se correlacionan significativamente con las medidas hídricas y de crecimiento.

Los genes analizados en el estrés a corto plazo mostraron, por su parte, un comportamiento diferencial, sobre todo en la parte aérea, dividiéndose en dos grupos: el primero de ellos reunió a los genes funcionales o de síntesis (CESA, NCED, STS-like y PX27), que presentan una alteración del patrón de expresión en las plantas estresadas anterior al establecimiento del estrés constante y no mostraron relación directa con el contenido en ABA de las plantas. El segundo grupo está formado por genes coordinadores o reguladores de la respuesta (HDA6 y PDR). HDA6 está implicada en regulaciones epigenéticas vinculadas con cambios en los patrones de expresión génica. PDR influye en la coordinación temporal de la respuesta del ABA. Ambos genes mostraron una correlación causal con el contenido de esta hormona en el xilema, compartiendo su misma dinámica.

La visión en conjunto de los resultados obtenidos en el estudio dirigido a corto plazo muestran el papel principal del pH y del ABA xilemático como señalizadores químicos del estrés hídrico severo, al menos en las primeras horas, afectando tanto a las respuestas fisiológicas como a las moleculares.



En el segundo bloque se analiza el comportamiento de diferentes clones de *E. globulus* bajo una deficiencia hídrica severa a largo plazo. El estudio conjunto de todas las respuestas mostradas por los clones permitió definir un comportamiento diferencial pudiendo establecer dos grupos con respuestas homogéneas entre los miembros de cada uno de ellos: Clones ahorradores de agua (C14, C120, C405, C491 y C601), los cuales focalizan todas sus respuestas en el mantenimiento de agua en los tejidos, reduciendo su crecimiento y modificando su morfología foliar. Estos clones presentaron un ajuste osmótico menor y fueron incapaces de sobrevivir a capacidades de campo inferiores al 13 %. El otro grupo de clones (C46, C97, C222 y C371), denominados derrochadores de agua, mostró una gran adaptación osmótica, así como modificaciones en la actividad fotosintética que les permitió sobrevivir a capacidades de campo inferiores al 13 %, manteniendo una tasa de crecimiento mayor en comparación con el primer grupo. En este ensayo, en las fases finales del tratamiento impuesto, el ABA no parece ser la fuerza motriz de las modificaciones fisiológicas observadas en los diferentes clones.

La metodología propuesta permite distinguir entre las diferentes estrategias desarrolladas por los clones, pese a que ambos grupos muestran respuestas dentro del rango fisiológico de la especie. Éstas se han podido agrupar en tres componentes principales, "Hídrico", "Pigmentos" y "Crecimiento", lo que abre la posibilidad de seleccionar los clones más adecuados en función de las condiciones ensayadas, así como reducir el número de variables a ensayar en futuros estudios.

#### RESUMEN (en Inglés)

Research done during this thesis development was divided in two main blocks: In the first place, a directed study in order to typify physiological and molecular responses to short-term severe drought stress (-0,6 MPa) in juvenile plants of C14 *Eucalyptus globulus* clone. The second one was an applied study to simulate natural long-term drought stress in nine different clones of *E. globulus*.

In the first block a fast and controlled stress induction method was developed, allowing to delve in the first steps of drought, from the induction moment to 72 h of constant stress. In this way, information about long-distance drought signaling, as well as physiological processes and gene expression dynamics involved in stress (HDA6, PDR, CESA, NCED, STS-like and PX27) was obtained.

Before the constant stress was settled up, in the very first moments of stress induction where water content and potential showed an acute decrease, alkalization of root xylematic pH was observed. This alkalization was followed by a sequential increase in ABA content: First in root xylem and subsequently in the shoot xylem and finally in the apical shoot tissues. The ABA dynamic is related to measured photosynthetic and stomatal parameters and a significant correlation was found between ABA content and water and growth measures.

Analyzed genes in the short-term drought showed a differentiating behavior, at least in the aerial tissues. This allowed to classify the genes in two groups: First group gathered functional and synthesis genes (CESA, NCED, STS-like and PX27), with altered expression pattern in stressed plants previous to the constant stress phase. These genes showed no direct relationship with ABA contents. The second group of genes was composed by regulation and coordination genes (HDA6 and PDR). HDA6 is involved in epigenetic regulation related to global changes in expression pattern. PDR affects the temporal coordination of ABA response. Both genes showed a causal correlation with xylematic ABA content, sharing the same dynamics.

Gathering the results obtained in the directed study, pH and ABA emerge as chemical signals of severe short-term drought, at least in the first hours of stress, affecting both physiological and molecular plant responses.

The second block analyzes the responses of nine *E. globulus* clones under severe long-term drought. For this, all physiological parameters recorded in the clones were studied as a whole, allowing two groups of clones to be established, based on the differential behavior showed: Water spenders group (C14, C120, C405, C491 y C601), all of which



**focused their responses in maintain tissue water content at all cost, showing reduced growth and modified foliar morphology, as well as a minor osmotic adjustment. These clones were unable to survive in field capacities under 13 %. Second group, water savers clones (C46, C97, C222 y C371), showed a great osmotic adjustment, as well as modifications in photosynthetic activity, which allowed these clones to survive field capacities below 13 %, maintaining higher growth rates than the first group. In this assay, at the final stages of long-term drought ABA seems to have no relation with the physiological modifications presented by the clones.**

**Methodology described in this assay allows to distinguish between different strategies taken by clones, despite both groups responses were between the physiological range of the species. Three principal components was obtained from these responses, "Hydrological", "Pigmentation" and "Growth", offering the possibility of clone selection based on the assayed conditions, as well as variable reduction for future studies.**

SR. DIRECTOR DE DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE ORGANISMOS Y SISTEMAS



Esta tesis ha sido realizada en:

*Universidad de Oviedo*

Facultad de Biología, Departamento de Biología de Organismos y Sistemas  
Área de Fisiología Vegetal

*Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias*

*Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA)*

*Programa de Investigación Forestal (en colaboración con el Centro Tecnológico y Forestal de la Madera)*

Finca de la Mata, Grado, Asturias

*Universidad de León*

Facultad de Biología, Departamento de Ingeniería y Ciencias Agrarias  
Área de Fisiología Vegetal

*Universidad de Barcelona*

Facultad de Biología, Departamento de Fisiología Vegetal

Financiación personal y de la investigación

Beca predoctoral de formación de personal investigador (FPI) del Ministerio de Educación y Ciencia (BES-2007-15663)

Proyecto AGL2006-13912-C02-01

«Estrés hídrico: Bases fisiológicas y moleculares en especies de interés forestal»

Proyecto GEN2006-27791-C2-1-E / VEG

«EUCANET: Eucalyptus Genomics Research Network for Improved Wood Properties and Adaptation to Drought»





*A mis padres.*



## AGRADECIMIENTOS

---

En este largo camino que es la tesis, son muchas las personas que te encuentras. Personas con las que compartes los mejores y los peores momentos, con las que sufres y te diviertes. Personas gracias a las cuales no solo aprendes a trabajar en un laboratorio o en un invernadero, si no que también te enseñan grandes lecciones de la vida. Esta tesis es tan suya como mía, así que gracias a todos y cada uno (y a los que seguro se me olvide incluir aquí).

Ana e Isabel, ¡gracias!. Gracias por vuestra infinita paciencia y confianza a lo largo de estos años. Las dos me habéis animado en los momentos duros y habéis sido capaces de atravesar mi espesa cabezonería. Ana, gracias por mantener siempre el optimismo aunque a veces no fuese sencillo, por preocuparte tanto por mí y por enseñarme a ser mejor científico. Isabel, gracias por abrirme las puertas a un mundo maravilloso, me diste la oportunidad de disfrutar con el diseño experimental, con los muestreos, por muy estresantes que fuesen, con el análisis de datos y hasta con la fontanería de invernadero. Entre las dos habéis logrado que tanto esta tesis como yo cobrásemos forma, ¡muchísimas gracias por todo!

Belén, gracias a tu confianza pude empezar esta tesis, me diste la oportunidad de seguir en este gran rompecabezas que es la ciencia metiendo la nariz en cómo funcionan las plantas, lo que me sigue maravillando pese al paso del tiempo.

Mariluz, sin ti no hubiese empezado en esto y gracias a ti he vivido algunos de los momentos más felices de mi vida en la ciencia. No solo me guiaste paso a paso cuando empezaba a ser un «científico», sino que me diste la confianza para ser la persona que soy ahora. Empezaste como jefa, pero pronto te convertiste en amiga y *madre adoptiva*, ¡muchas gracias por todo!

Ricardo, compartiste conmigo tu sabiduría en biología molecular, que es mucha, y gracias a ti le perdí el miedo y terminé pasándolo bien con ella. Pero sobre todo, quiero agradecerte tu comprensión y tus consejos tras mi desastroso estreno en el mundo de los congresos, Cercedilla, aún tengo escalofríos al pensar en ese lugar.

A todos los profesores del Área de Fisiología Vegetal, gracias por tener siempre la puerta abierta para cualquier consulta, siempre que lo necesité pude contar con vuestro consejo.

Enrique, eres el pegamento que nos mantiene unidos en el laboratorio, no me lo puedo imaginar sin tu humor y tu visión del mundo. Aunque no lo sepas, me has ayudado mucho en estos años, ¡muchas gracias!

Candela y Cires, no tengo palabras para agradecerlos todo. Me acogisteis como uno más desde el primer día, y no solo habéis sido compañeros de laboratorio, si no que

sois grandes amigos. Candela, me enseñaste todo lo que sabías y me ayudaste en lo bueno y en lo malo, no podría haber llegado al final sin ti. Cires, gracias por poder contar contigo para todo y por aportarme un punto de vista que necesitaba mucho.

Marta, Mauro, Marcos y Helen, habéis estado ahí en cualquier problema, duda o preocupación, para animarme y ayudarme sin necesidad de nada a cambio. Hemos compartido risas y lágrimas a lo largo de esta aventura, pero también hemos compartido mucha ciencia y sin vosotros mucho de lo que se escribe aquí no sería posible, ¡muchas gracias por todo!

Carolina, ¡uff!, difícil intentar agradecerte todo sin que se destruya el universo. Se supone que era yo el que tenía que enseñarte a hacer las cosas y al final has sido tú la que me ha enseñado a ser mejor persona. Gracias por estar dispuesta siempre a sonreír aunque estuviésemos luchando contra ratones o cámaras de Schölander a las cuatro de la mañana, sin ti esto no hubiese sido lo mismo.

Estrella, Rebe, Chus, Sara A., Dani, Mónica, Luis, Sara G., Miguel, Pilar, y todos los que han estado y están por el laboratorio, gracias por todos esos momentos, dentro y fuera del departamento, que hacen que los días sean mejores.

Chelu, me cediste tu casa cuando decidiste empezar tu aventura europea, ¡muchas gracias! y espero que pronto estés al 100 % otra vez.

A todo el personal del SERIDA y del CETEMAS en Grado, gracias por acogerme y hacer de «La Corte» mi segundo hogar.

Lucia, me ayudas a tomarme cada mañana y cada día de la mejor manera posible, y si consigo alguna vez ser la mitad de profesional que tu podré estar orgulloso de todo lo que me has enseñado.

Fran, siempre has estado dispuesto a echar una mano y tomártelo con buen humor y eso hace que haya una lista interminable de cosas por agradecerte, aunque el precio haya sido verte en bata, ¡muchas gracias por todo!

Angelo não poderia escolher melhor colega para passar horas nos viveiros, espero ter conseguido aprender um pouco da sua “arte”. Mas, como você diz, eu não estou contando “penas”, obrigado pela sua ajuda e la honra em ser padrinho do “Tomasito”.

María, me enseñaste el camino y has estado siempre dispuesta a reír, a ayudar o a lo que hiciese falta, aunque eso costase un subidón de azúcar. ¡Muchísimas gracias!

Antonio, aguantaste a otro becario que solo venía a darte trabajo y encima le enseñaste a rozar la perfección cuando se ajusta un pH, así que ¡muchas gracias! (No te preocupes, tu recompensa está en camino desde León).

Ernesto, gracias (lo siento pero tenía que decirlo).

Geli, Mónica, Ney-Fran, Jorge y todos los demás, gracias por hacer que vaya a trabajar a las 8 de la mañana con una sonrisa en la cara y por esos cafés llenos de teorías, lectura de posos, *scrap-booking* y *washi-tapes*.

A todos los profesores y compañeros de Fisiología Vegetal de la Universidad de León, Toño, Jose Luis, Penélope, Ana, Hugo, María, Asier y todos los demás, muchas gracias

por dejarme tener ahí un hueco siempre. Toño, sin tu preocupación y tu confianza nunca me hubiese atrevido con los cursos de R, y eso es solo una pequeña parte de toda la ayuda que me has prestado desde que nos conocemos, ¡muchas gracias!.

A Marta López, y todos los profesores y becarios del área de Fisiología Vegetal de la Universidad de Barcelona, por recibirme con los brazos abiertos y portarse tan bien conmigo.

Edu, Mayor, Santi, Julia, Lucía, Chamy, Jose, Ana y Ana B., gracias por hacer que no pase el tiempo cuando vuelvo por casa, con vosotros es fácil recargar las pilas para volver al día a día.

Chisco, Susana, Ainara y Ranita, habéis sido una constante en todos estos años, aguantándome y ofreciendo vuestro apoyo a cada momento. No podría pedir unos mejores amigos, ¡gracias!.

A Hadley Wickham, Robert Peng y todos los desarrolladores y colaboradores que trabajan en herramientas y programas tan maravillosos como archlinux, R y RStudio, Lyx, LibreOffice, L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X, y muchos más, que han hecho posible que esta tesis esté realizada al 99 % con software libre y colaborativo (hay un poco de SPSS, pero nadie es perfecto).

Y por último, pero no por ello menos importante, ¡muchas gracias a toda mi familia!. A mis padres, a mis hermanos, a mis cuñadas y a Mirva, Martín, Laura, Marta, Laia, Brezo y cosita. Esta tesis es para vosotros, por vuestro apoyo, comprensión y, sobre todo, por vuestro cariño.



# ÍNDICE GENERAL

---

<b>i</b>	<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>3</b>
1.1	<i>Eucalyptus globulus</i> (Labill.) . . . . .	3
1.1.1	Descripción e importancia . . . . .	3
1.1.2	Distribución . . . . .	3
1.1.3	Clon <i>C14</i> y descendientes . . . . .	4
1.2	Estrés hídrico . . . . .	5
1.2.1	Respuestas y estrategias frente al estrés hídrico . . . . .	5
1.3	Señalización del estrés hídrico . . . . .	7
1.3.1	Detección y señalización celular del estrés hídrico . . . . .	7
1.3.2	Señalización a larga distancia del estrés hídrico . . . . .	8
1.4	Control hormonal del estrés hídrico . . . . .	9
1.4.1	Ácido Abscísico . . . . .	10
1.4.2	Citoquininas . . . . .	13
<b>ii</b>	<b>PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
<b>iii</b>	<b>ESTRÉS HÍDRICO A CORTO PLAZO</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>RESPUESTA RÁPIDA A ESTRÉS HÍDRICO SEVERO</b>	<b>25</b>
2.1	Introducción . . . . .	25
2.2	Materiales y métodos . . . . .	26
2.2.1	Material vegetal y condiciones de cultivo . . . . .	26
2.2.2	Medidas fotosintéticas y de intercambio de gases . . . . .	27
2.2.3	Medidas de crecimiento y de contenido de agua . . . . .	28
2.2.4	Contenido hormonal . . . . .	28
2.2.5	Extracción y purificación de ABA y CKs . . . . .	28
2.2.6	Separación por HPLC de ABA y CKs . . . . .	29
2.2.7	Cuantificación de ABA y CKs . . . . .	30
2.2.8	Análisis estadístico . . . . .	31
2.3	Resultados . . . . .	31
2.4	Discusión . . . . .	38
<b>3</b>	<b>GENES DE REFERENCIA EN EUCALIPTO</b>	<b>43</b>
3.1	Introducción . . . . .	43
3.2	Materiales y métodos . . . . .	44
3.2.1	Material vegetal, condiciones experimentales y extracción de Ácido Ribonucleico (RNA) . . . . .	44
3.2.2	Selección de HKG y diseño de cebadores . . . . .	46
3.2.3	RT-qPCR y tratamiento de los datos . . . . .	46
3.3	Resultados . . . . .	47
3.3.1	Amplificación de los HKG . . . . .	47
3.3.2	Selección de los HKG . . . . .	47
3.3.3	Genes de estrés y niveles de expresión . . . . .	48



3.4	Discusión . . . . .	48
4	DINÁMICAS DE EXPRESIÓN GÉNICA	53
4.1	Introducción . . . . .	53
4.2	Materiales y métodos . . . . .	54
4.2.1	Material vegetal y condiciones de estrés . . . . .	54
4.2.2	Contenido hormonal . . . . .	54
4.2.3	Obtención e identificación de genes de interés relacionados con sequía . . . . .	55
4.2.4	PCR cuantitativa . . . . .	55
4.2.5	Análisis estadísticos . . . . .	56
4.3	Resultados . . . . .	58
4.4	Discusión . . . . .	64
íV	ESTRÉS HÍDRICO A LARGO PLAZO	67
5	ESTRÉS HÍDRICO A LARGO PLAZO	69
5.1	Introducción . . . . .	69
5.2	Materiales y métodos . . . . .	71
5.2.1	Material vegetal y condiciones de estrés hídrico . . . . .	71
5.2.2	Medidas fisiológicas, bioquímicas y hormonales . . . . .	72
5.2.3	Análisis estadísticos . . . . .	73
5.3	Resultados . . . . .	74
5.4	Discusión . . . . .	80
V	DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES	83
6	DISCUSIÓN GENERAL	85
	CONCLUSIONES	89
vi	APÉNDICE	91
A	APÉNDICE A	93
	BIBLIOGRAFÍA	99

## ABREVIATURAS

---

<b>A</b>	Eficiencia Fotosintética
<b>AB</b>	Biomasa Aérea (Aerial Biomass)
<b>ABA</b>	Ácido Abscísico (Abscisic Acid)
<b>ABRE</b>	Elemento de Respuesta a ABA (Abscisic Acid Responsive Element)
<b>ACT<sub>11</sub></b>	Actina 11
<b>ACT<sub>2</sub></b>	Actina 2
<b>ANOVA</b>	Análisis de la Varianza (Analysis of Variance)
<b>APRT</b>	Adenina Fosforibosil Transferasa
<b>BA</b>	Benciladenina
<b>BLAST</b>	Herramienta de Búsqueda de Alineamientos Locales Básicos (Basic Local Alignment Search Tool)
<b>BSA</b>	Seroalbúmina Bovina (Bovine Seroalbumin)
<b>Ca</b>	Concentración Externa de CO <sub>2</sub>
<b>cDNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico Complementario (Complementary Desoxyribonucleic Acid)
<b>CDPK</b>	Quinasas Dependientes de Calcio (Calcium Dependent Phospokinases)
<b>CE</b>	Eficiencia de Carboxilación (Carboxylation Efficiency)
<b>CESA</b>	Celulosa Sintasa subunidad A
<b>CETEMAS</b>	Centro Tecnológico, Forestal y de la Madera
<b>Chl<sub>A</sub></b>	Clorofila A
<b>Chl<sub>B</sub></b>	Clorofila B
<b>Chl<sub>T</sub></b>	Clorofila Total
<b>Ci</b>	Concentración Intracelular de CO <sub>2</sub>
<b>CKs</b>	Citoquininas (Citokinins)
<b>CYP</b>	Ciclofilina
<b>CYP<sub>2</sub></b>	Ciclofilina 2
<b>CYP<sub>735A</sub></b>	Citocromo P450 Monooxigenasa (Cytochrome P450 Mono-oxigenase)

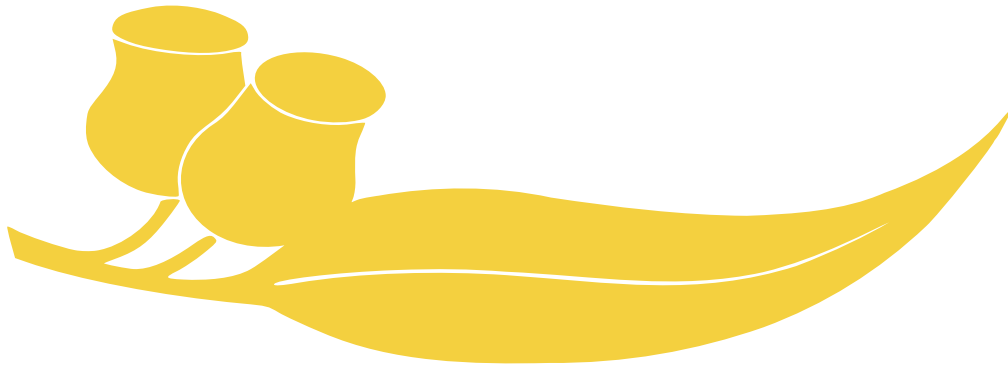
<b>DHZ</b>	Dihidrozeatina
<b>DL<sub>50</sub></b>	Número de días en los que la mitad de plantas de cada clon mostró síntomas irreversibles de sequía
<b>DMAPP</b>	Dimetilalilpirofosfato
<b>DRE</b>	Elemento de Respuesta a Sequía (Drought Responsive Element)
<b>DW</b>	Peso Seco (Dry Weight)
<b>DW<sub>l</sub></b>	Peso Seco de Hojas (Leaf Dry Weight)
<b>DW<sub>s</sub></b>	Peso Seco de Tallo (Shoot Dry Weight)
<b>E</b>	Tasa de Transpiración
<b>EF<sub>1<math>\alpha</math></sub></b>	Factor de Elongación 1- $\alpha$ (Elongation Factor 1- $\alpha$ )
<b>EF<sub>1<math>\beta</math></sub></b>	Factor de Elongación 1- $\beta$ (Elongation Factor 1- $\beta$ )
<b>ELISA</b>	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)
<b>ENCE</b>	Empresa Nacional de Celulosa Española
<b>EST</b>	Fragmentos de Secuencias Expresadas (Expressed Fragment Tags)
<b>FC</b>	Capacidad de Campo (Field Capacity)
<b><math>\Phi_{II}</math></b>	Potencial Osmótico
<b><math>\Phi_{II100}</math></b>	Potencial Osmótico a Saturación
<b>FW</b>	Peso Fresco (Fresh Weight)
<b>FW<sub>l</sub></b>	Peso Fresco de Hojas (Leaf Fresh Weight)
<b>FW<sub>s</sub></b>	Peso Fresco de Tallo (Shoot Fresh Weight)
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído-3-fosfato Deshidrogenasa
<b>Gs</b>	Conductancia Estomática
<b>HDA6</b>	Histona Desacetilasa 6
<b>HKG</b>	Genes de Referencia (Housekeeping Genes)
<b>HPLC</b>	Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (High Performance Liquid Chromatography)
<b>HTK</b>	Histidina Quinasa (Histidine Kinase)
<b>IAA</b>	Ácido Indolacético (Indolacetic Acid)
<b>iP</b>	Isopenteniladenina
<b>iPA</b>	Isopenteniladenosina

<b>IPP</b>	Isopentenil Pirofosfato
<b>IPTs</b>	Isopenteniladenosin Transferasas
<b>K<sub>sp</sub></b>	Conductancia Hidráulica
<b>L<sub>2</sub></b>	Proteína Ribosomal L2
<b>LA</b>	Área Foliar (Leaf Area)
<b>LAR</b>	Proporción de Área Foliar (Leaf Area Ratio)
<b>MANOVA</b>	Análisis Multivariante de la Varianza (Multivariate Analysis of Variance)
<b>MAPK</b>	Quinasas Activadas por Mitógeno (Mitogen Activated Phosphokinases)
<b>MEP</b>	Metil-Eritrosa-Fosfato
<b>NCED</b>	9- <i>cis</i> -epoxicarotenoide Dioxigenasa (9- <i>cis</i> -Epoxicarotenoid Dioxigenase)
<b>N<sub>h</sub></b>	Número Total de Hojas
<b>PBS</b>	Tampón Fosfato Salino 50 mM pH 7,0 (Phosphate Buffered Saline)
<b>PCA</b>	Análisis de Componentes Principales (Principal Components Analysis)
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
<b>PDR</b>	Pleiotropic Drug Resistance-like
<b>PEG</b>	Polietilenglicol 8000
<b><math>\Psi_{md}</math></b>	Potencial Hídrico de Hoja al Mediodía
<b><math>\Psi_{pd}</math></b>	Potencial Hídrico de Hoja al Amanecer
<b>PX27</b>	Peroxidasa de Lignina 27
<b>QTL</b>	Locis de Caracteres Cuantitativos (Quantitative Trait Loci)
<b>RDHZ</b>	Ribósido de Dihidrozeatina
<b>RIA</b>	Radioinmunoensayo (Radioimmunoassay)
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico (Ribonucleic Acid)
<b>RQ</b>	Cantidad Relativa (Relative Quantity)
<b>RT-qPCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa con Transcripción Reversa
<b>RWC</b>	Contenido Relativo de Agua (Relative Water Content)
<b>RWC<sub>h</sub></b>	Contenido Relativo de Agua en Hoja (Leaf Relative Water Content)
<b>RZ</b>	Ribósido de Zeatina
<b>SERIDA</b>	Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario

<b>SLA</b>	Área Foliar Específica (Specific Leaf Area)
<b>STS-like</b>	Estaquiosa Sintasa-like
<b>TBS</b>	Tampón Tris Salino 25 mM pH 7,5 (Tris Buffered Saline)
<b>TLA</b>	Área Foliar Total (Total Leaf Area)
<b>TUA</b>	$\alpha$ -Tubulina
<b>TUA<sub>2</sub></b>	$\alpha$ -Tubulina 2
<b>TUB</b>	$\beta$ -Tubulina
<b>Tukey-HSD</b>	Test de Tukey de Diferencias Significativas Honestas (Tukey Honest Significant Differences)
<b>UBQ</b>	Ubiquitina
<b>VPD</b>	Déficit de Presión de Vapor (Vapor Pressure Deficit)
<b>WC</b>	Contenido de Agua (Water Content)
<b>WCh</b>	Contenido de agua en hoja
<b>W<sub>t</sub></b>	Peso a Máxima Turgencia (Turgid Weight)
<b>WUE<sub>i</sub></b>	Eficiencia en el Uso de Agua Intrínseca (Intrinsic Water Use Efficiency)
<b>XDH</b>	Xantina Deshidrogenasa (Xanthine Dehydrogenase)
<b>Z</b>	Zeatina
<b>18S</b>	RNA 18S

Parte I

INTRODUCCIÓN GENERAL





## INTRODUCCIÓN GENERAL

---

### 1.1 *Eucalyptus globulus* (LABILL.)

#### 1.1.1 Descripción e importancia

El eucalipto común o eucalipto azul (*Eucalyptus globulus*) es una especie arbórea perteneciente al género *Eucalyptus*. Este género de la familia Myrtaceae comprende más de 700 especies de eucaliptos, originarias de Australia y las islas limítrofes. Descrito en 1799 por La Billardiére (La Billardiére, 1799), el *E. globulus* procede de la isla de Tasmania (Australia) y en condiciones naturales puede alcanzar los 75 m de altura y los 2 m de diámetro de tronco. Presenta dimorfismo foliar, con las hojas juveniles sésiles y opuestas, mientras que las hojas adultas son alternas y pecioladas. Está adaptado a zonas de costa, por debajo de los 500-600 m de altitud en terrenos con una alta disponibilidad de agua (Tibbits *et al.*, 1997). Las características de la madera del *E. globulus*, tales como la densidad, la proporción de pulpa, la longitud de las fibras y su contenido en lignina y celulosa (Raymond, 2002) convierten a esta especie en la materia prima ideal para la fabricación de pasta de papel, así como un recurso maderero muy importante (MAGRAMA, 2002; FAO, 2011).

#### 1.1.2 Distribución

Debido a las características citadas anteriormente, así como a su uso como planta ornamental, la distribución de *E. globulus* en los dos últimos siglos se ha ido extendiendo a zonas templadas y tropicales de todo el mundo (Eldridge *et al.*, 1993), llegando a Sudamérica (Chile, Argentina y Uruguay), Asia (China e India), África (Sudáfrica) y Europa (España y Portugal) (Pardos, 2007). En España, según el Inventario Forestal Nacional (DGDRPF, 2012), el eucalipto supone el 2 % de todas las reforestaciones de tipo productor y ocupa el 3 % de la superficie forestal, contribuyendo con cerca del 40 % al total de la producción maderera, lo que la convierte en la especie de producción forestal más importante, superando al *Pinus pinaster* (30 % del total de producción maderera). En la Figura 1.1 se puede observar la distribución de las plantaciones de eucalipto en la Península Ibérica, destacando la zona norte (Galicia, Asturias, Cantabria y País Vasco), la zona centro (Portugal y Extremadura) y la zona sur (Andalucía occidental).

Actualmente se ha extendido la selección y uso de clones que presentan las mejores cualidades de crecimiento y producción (ENCE, comunicación personal), gracias a estudios que relacionan la productividad y la calidad de estos clones con rasgos gené-



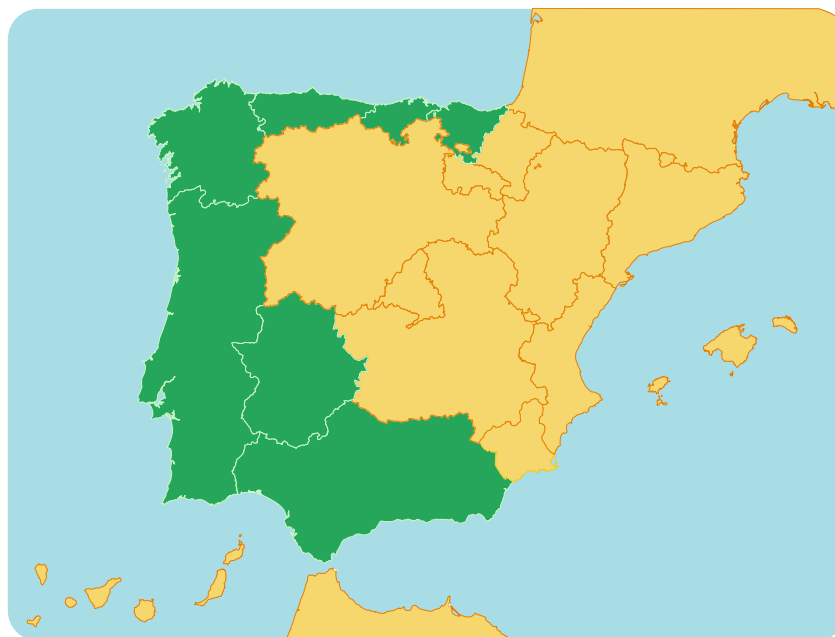


Figura 1.1: Distribución de *E. globulus* en la Península Ibérica (en verde), a partir de los datos recogidos en MAGRAMA (2002); FAO (2011).

uticos adecuados para la selección (Resende *et al.*, 2012; Freeman *et al.*, 2013), pero el uso de *E. globulus* en zonas templadas fuera de su distribución natural implica una serie de problemas añadidos. No solo se deben seleccionar los clones a utilizar en base a su calidad o productividad, sino que se tienen que tener en cuenta las posibles condiciones ambientales presentes en las zonas de cultivo, tales como la escasez estacional de agua. El estrés hídrico es uno de los factores ambientales más importantes que afectan al establecimiento y el desarrollo de las plantas, incluidas las especies arbóreas, como el *E. globulus*. Este efecto representa un problema mayor cuando hablamos de plantaciones monoclonales, donde una selección errónea del material de partida puede llevar a pérdidas económicas y de tiempo muy importantes (White *et al.*, 2009).

### 1.1.3 Clon C14 y descendientes

En esta línea de selección clonal, en 1982 el grupo Empresa Nacional de Celulosa Española (ENCE) llevó a cabo una prospección de 45000 ha de *E. globulus* con el fin de seleccionar individuos élite de esta especie para su uso en plantaciones comerciales dentro de la Península Ibérica. De esta prospección inicial se obtuvieron 1800 árboles con características óptimas de crecimiento y con rasgos indicadores de una potencial tolerancia al estrés hídrico. Tras una segunda selección sobre estos últimos individuos se obtuvieron finalmente 16 clones de *E. globulus* con potencial para ser usados en plantaciones a gran escala en ambientes áridos o con baja disponibilidad hídrica. De los 16 clones destacó el C14, que fue finalmente seleccionado para establecer plantaciones comerciales, dada su aparente adaptación a condiciones semi-áridas, pero sobre todo por su capacidad de crecimiento en condiciones ambientales de alta disponibilidad hídrica.

Posteriormente, entre 2005 y 2007, en una colaboración entre ENCE, la Universidad de Oviedo y el Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) enmarcada en el proyecto «Estrés hídrico: Bases fisiológicas y moleculares en especies de interés forestal» (AGL2006-1392-CO2-01/FOR) con el fin de desarrollar un mapa de Locis de Caracteres Cuantitativos (QTL) para especies forestales, se obtuvieron 680 descendientes del clon C14 y un individuo de bajo valor biológico (Wilson Promontori 114), a partir de los cuales se seleccionaron 8 clones con diferente rango de sensibilidad a condiciones de baja disponibilidad hídrica: C46, C97, C120, C222, C371, C405, C491 y C601. Esta exhaustiva selección de material, junto con el hecho de que el clon C14 es usado a nivel nacional en plantaciones con fin productivo convierte a este clon y sus descendientes en un material ideal para el estudio de la respuesta al estrés hídrico del eucalipto.

## 1.2 ESTRÉS HÍDRICO

El estrés hídrico se produce cuando la absorción de agua por parte de las raíces de las plantas es inferior a la pérdida de agua por transpiración. Diferentes estreses abióticos pueden generar un estrés hídrico a nivel de planta entera, como la sequía o el estrés salino, o por deshidratación de los tejidos, como en el caso del estrés por bajas temperaturas. En una situación de déficit hídrico se interrumpen funciones celulares y fisiológicas en toda la planta. La falta de agua produce una reducción en la turgencia celular y en consecuencia se provoca el cierre estomático con el objetivo de reducir la transpiración, pero esto a su vez reduce la fijación de CO<sub>2</sub> y limita el crecimiento. Se producen daños en el aparato fotosintético debido al exceso de radiación, y si la pérdida de turgencia se mantiene, el crecimiento se paraliza completamente (Bray, 2001). Todo este proceso impacta negativamente en el desarrollo, el crecimiento y la producción de las especies vegetales (Boyer, 1982). Dado que en la mayoría de los escenarios de cambio climático se sugiere un aumento global de la aridez (Petit *et al.*, 1999), la necesidad de conocer a fondo la reacción de las plantas frente a la sequía se ha incrementado en las últimas décadas.

### 1.2.1 Respuestas y estrategias frente al estrés hídrico

La reducción en la disponibilidad de agua puede ser suave y prolongada (semanas o meses) o corta e intensa (horas o días), lo que provoca respuestas diferentes en las plantas (Figura 1.2). En el caso de estreses prolongados las plantas pueden optimizar la obtención de recursos a través de respuestas de aclimatación, tales como el incremento del crecimiento de la zona radical, modificaciones metabólicas y ajuste osmótico, mientras que en los estreses rápidos y severos las plantas reaccionan para minimizar la pérdida de agua y los efectos dañinos de ésta, así como el estrés oxidativo asociado al déficit hídrico (Chaves *et al.*, 2003). En función de las respuestas que presenten las plantas, nos encontramos con diferentes estrategias frente al estrés hídrico:

- A. Escape: Las plantas pueden escapar del estrés mediante el acortamiento de su ciclo vital, desarrollándose y reproduciéndose únicamente en las estaciones hú-

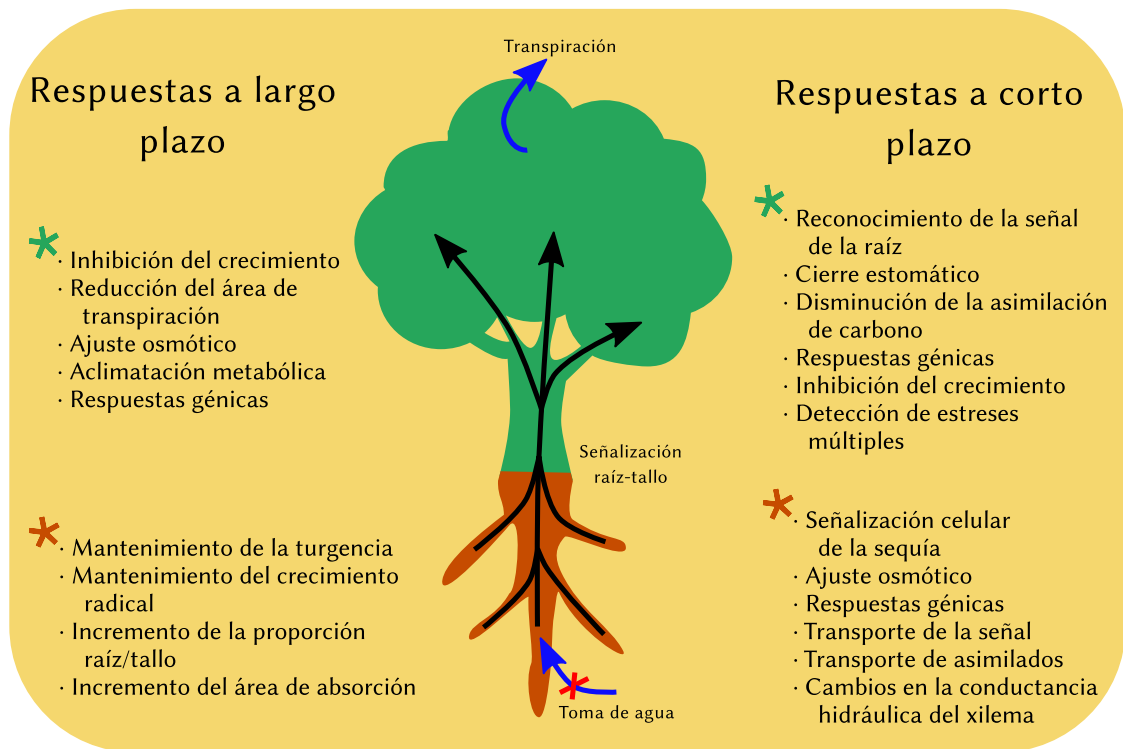


Figura 1.2: Respuestas de las plantas al estrés hídrico a largo plazo (izquierda) y a corto plazo (derecha). Modificado a partir de Chaves *et al.* (2003).

medas. De esta manera las especies pueden superar los períodos prolongados y estacionales de sequía. Esta estrategia la aplican algunas especies herbáceas (Maroco *et al.*, 2000), como *Brassica rapa*, que ante la señal de restricción hídrica adelanta la floración a costa de empeorar la eficiencia en el uso de agua (Franks, 2011).

- B. Evitación: En el caso de las plantas anuales o perennes, la estrategia más común es evitar la deshidratación de los tejidos, ya sea manteniendo el potencial hídrico de los mismos lo más alto posible o tolerando su reducción. Para ello, las plantas buscan minimizar las pérdidas de agua mediante el cierre estomático, las modificaciones foliares y la reducción del crecimiento, así como aumentar la absorción de agua por parte de las raíces, aumentando el desarrollo y tamaño de éstas. Esta estrategia conlleva un ajuste para adaptarse al descenso de los recursos hídricos y minerales, ya que la reducción en la absorción de agua va unida a una reducción en la absorción de minerales. Para ello se producen cambios enzimáticos y de desarrollo en las hojas jóvenes, ya que éstas alcanzan la madurez antes, reduciendo así su área foliar específica y aumentando la eficacia en el uso de nutrientes, como en el caso de *Ricinus communis* (Schurr *et al.*, 2000).
- C. Tolerancia: Que implica tolerar potenciales hídricos bajos en los tejidos. Se debe producir un ajuste osmótico, así como una reducción del tamaño celular y un aumento de la rigidez de las paredes celulares, acompañado generalmente de una tasa fotosintética y conductancia estomática bajas. En el caso del género *Eucalyptus*, esta reducción de la tasa fotosintética en hojas desarrolladas en sequía

puede no producirse (Lambers *et al.*, 2008), lo que implica la existencia de otros mecanismos fotoprotectores.

La combinación de las diferentes estrategias posibles nos ofrece la oportunidad de clasificar las plantas según cómo utilicen los recursos hídricos disponibles en condiciones de baja disponibilidad de agua. Así, podemos tener plantas *ahorradoras de agua* y plantas *derrochadoras de agua* (Ludlow, 1989). Las primeras suelen presentar un ajuste estomático y mantienen un mayor contenido de agua en los tejidos, mientras que las segundas mantienen tasas de transpiración, fotosíntesis y crecimiento altas durante el tiempo en que pueden seguir absorbiendo agua.

### 1.3 SEÑALIZACIÓN DEL ESTRÉS HÍDRICO

#### 1.3.1 Detección y señalización celular del estrés hídrico

Para desarrollar las respuestas vistas anteriormente, las plantas han de ser capaces de reconocer a nivel celular el déficit hídrico. Existen varios puntos clave en el mecanismo de detección celular: la disminución o pérdida de turgencia celular y las consiguientes alteraciones en las conexiones entre la membrana y la pared celular, cambios en el volumen celular o en la superficie de la membrana y cambios en la concentración de solutos (Bray, 1997). Estos procesos son detectados mediante osmosensores tales como la Histidina Quinasa (HTK) (Urao *et al.*, 1999) o por transportadores de tipo ABC osmorregulados (Chaves *et al.*, 2003), que convierten el estímulo físico o químico en una respuesta bioquímica que inicia los procesos de transducción de la señal (Figura 1.3). Dentro de la célula comienza la cascada señalizadora, implicando la intervención de proteínas-quinasas y fosfatasa, entre las que destacan las Quinasas Dependientes de Calcio (CDPK) y las Quinasas Activadas por Mitógeno (MAPK) (Ramanjulu & Bartels, 2002). A través de la acción de estas proteínas se inicia la vía de señalización independiente de Ácido Abscísico (ABA), mediante la activación de genes que contienen regiones conservadas de tipo Elemento de Respuesta a Sequía (DRE) en sus promotores. Estas regiones permiten la unión de factores de transcripción inducidos por diferentes estreses abióticos e inician la transcripción de genes implicados en la tolerancia al estrés hídrico. Por otro lado, las CDPK y las MAPK también inducen un incremento en la síntesis de ABA mediante la activación de las enzimas clave en la ruta de síntesis, siendo la más importante la 9-*cis*-epoxicarotenoide Dioxigenasa (NCED). El aumento en la concentración de ABA, así como la llegada de éste procedente del xilema o del simplasto, se detecta mediante receptores transmembrana activando la cascada de señalización dependiente de ABA. En este caso se induce la expresión de genes que contienen en sus promotores la región conservada de tipo Elemento de Respuesta a ABA (ABRE), donde se unen factores de transcripción inducidos por el ABA (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007). El resultado de ambas cascadas es la producción de proteínas destinadas a la tolerancia al estrés hídrico, divididas en dos grandes grupos (Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 2002):

1. Proteínas funcionales. En este grupo se incluyen aquellas proteínas que están implicadas en la tolerancia al estrés propiamente dicho, entre las que destacan enzimas clave en la síntesis de osmolitos (prolina, glicina betaína...), macromoléculas

protectoras (proteínas LEA, chaperonas...), enzimas detoxificantes y transportadores (acuaporinas...).

2. Proteínas reguladoras. Aquí se engloban las proteínas que influyen en la regulación de la señal y de la expresión génica. Este grupo incluye factores de transcripción (DREB<sub>2</sub>, AREB...), proteín-quinasas y fosfatasa, enzimas involucradas en el metabolismo de fosfolípidos y enzimas de la ruta de síntesis de ABA (NCED).

### 1.3.2 Señalización a larga distancia del estrés hídrico

La señalización celular ha de estar acompañada de una señalización a larga distancia (raíz-tallo), que involucre a toda la planta (Figura 1.2). Dado que las raíces están en contacto con el suelo, son las primeras en detectar los cambios en el estado hídrico del mismo, y las encargadas de transmitir esa información al resto de los tejidos y órganos, provocando respuestas protectoras en la parte aérea antes de que el estatus hídrico

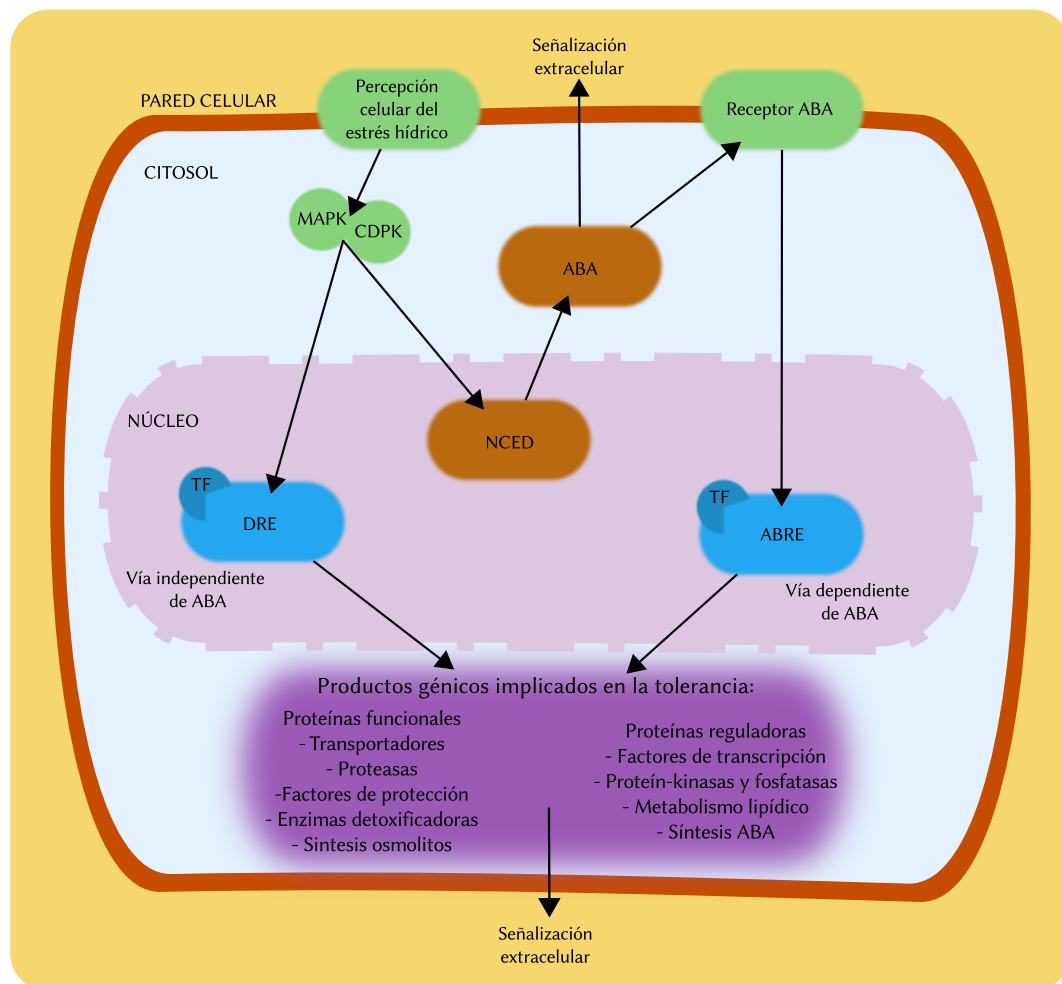


Figura 1.3: Esquema de la detección y señalización celular del estrés hídrico. MAPK: Quinasas Activadas por Mitógeno; CDPK: Kinasas Dependientes de Calcio; ABA: Ácido Abscísico; NCED: 9-*cis*-epoxicarotenoide-dioxigenasa; TF: Factor de Transcripción; DRE: Elementos de Respuesta a Sequía; ABRE: Elemento de Respuesta a ABA.

de ésta se vea afectado. La señalización a larga distancia del estrés hídrico implica el transporte de moléculas señalizadoras hacia la parte aérea, así como cambios en las propiedades físico-químicas del xilema (e.g. la conductancia hidráulica o el pH) (Comstock, 2002).

Para que una molécula pueda ser considerada una señal a larga distancia tiene que reunir dos características principales (Dodd, 2005):

1. Presentar un movimiento de tipo acropétalo vía apoplasto (xilema) o simplasto (transporte activo).
2. Tener influencia en procesos fisiológicos en órganos diana lejanos (i.e. hojas, frutos) con respecto a su lugar de síntesis (i.e. raíz).

Entre las moléculas señalizadoras elicidadas durante una situación de déficit hídrico, destaca como señal principal el ABA (Davies *et al.*, 2005). Como se ha descrito previamente (Sección 1.3.1, Figura 1.3), el ABA tiene su propia cascada de señalización celular, pero, en paralelo a esta función, también ejerce de molécula señalizadora a larga distancia afectando a procesos fisiológicos en la parte aérea, como el cierre estomático o la reducción en el crecimiento foliar. Las Citoquininas (CKs) también tienen un papel importante en la comunicación entre la raíz y el tallo, ya que en muchas especies vegetales, durante el estrés hídrico, el contenido de CKs en el xilema se reduce, incrementado el efecto inhibitor del ABA en el crecimiento de la parte aérea y favoreciendo la senescencia de las hojas adultas (Dodd, 2005). Además del ABA y las CKs, la señalización cruzada existente con otros estreses abióticos implica a otras señales, como pueden ser el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico, precursor del etileno y uno de los componentes de la señalización en estreses edáficos, las giberelinas o los nitratos (Dodd, 2005). No obstante, el ABA es un candidato ideal como marcador fisiológico de estrés, dada su estrecha relación con la señalización y respuesta frente a éste.

El efecto de la señalización a larga distancia se puede ver modulado por factores como el estado de desarrollo y/o nutricional de la planta, así como por el pH del líquido xilemático y del apoplasto de los órganos diana. Por tanto, pueden presentarse diferencias en las respuestas de una planta al estrés hídrico con la misma concentración de la molécula señalizadora en función de los valores de pH que presente el líquido xilemático (Davies *et al.*, 2005). De hecho, el pH por sí mismo es considerado una señal informativa para la planta del estado del suelo en muchos estreses abióticos (deficiencias nutricionales, sequía, frío...) (Comstock, 2002). Finalmente, los cambios en la conductancia hidráulica del xilema pueden actuar directamente sobre la fisiología de los estomas, como reguladores de presión para prevenir la cavitación del sistema xilemático y la pérdida, por tanto, de la presión necesaria para mantener un flujo mínimo de agua hacia la parte aérea (Chaves *et al.*, 2003).

#### 1.4 CONTROL HORMONAL DEL ESTRÉS HÍDRICO

El papel de las fitohormonas durante una situación de déficit hídrico es fundamental para una correcta coordinación y control de las respuestas de las plantas. Aunque, como sucede en la mayoría de estreses abióticos, en el control hormonal del déficit

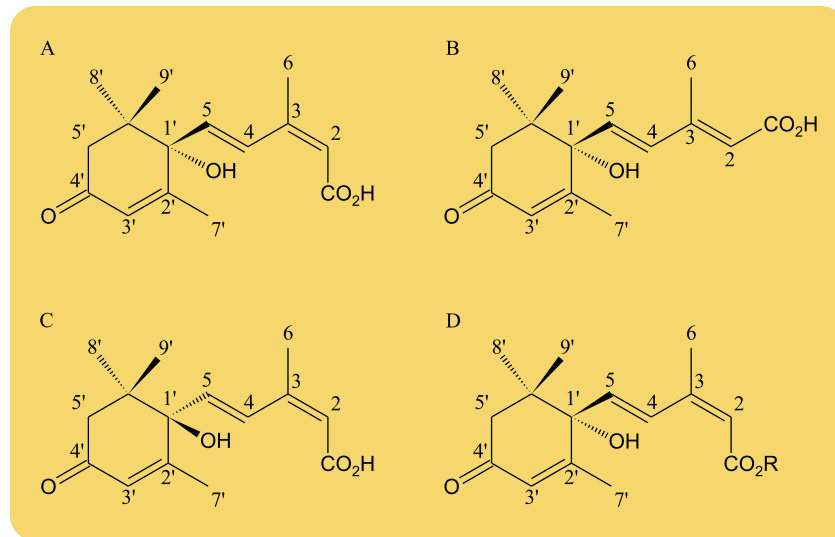


Figura 1.4: Diferentes formas y conjugados de la molécula del ABA. A: (+)-2*cis*-4*trans*-ABA; B: (+)-2*trans*-4*trans*-ABA; C: (-)-2*cis*-4*trans*-ABA; D: (+)-2*cis*-4*trans*-ABA-conjugado. R: residuo conjugado

hídrico intervienen un gran número de reguladores del crecimiento, como el ácido salicílico, el etileno o las auxinas, sin duda las fitohormonas más importantes son el ABA y las CKs.

#### 1.4.1 Ácido Abscísico

El ABA es la molécula integradora por excelencia en las respuestas a estreses abióticos, especialmente en situaciones de déficit hídrico. El nombre de ácido abscísico fue propuesto por primera vez por Addicott *et al.* (1968) para el compuesto conocido hasta entonces como «dormina» o «abscisina II». Poco después de su descubrimiento se comprobó su efecto sobre el cierre estomático y el aumento de esta fitohormona en situaciones de sequía, indicando su papel en la fisiología del estrés (Milborrow, 2001).

##### Naturaleza química

El ABA es una molécula perteneciente al grupo de metabolitos denominados isoprenoides o también terpenoides (Nambara & Marion-Poll, 2005). Consta de 15 átomos de carbono que forman un anillo alifático con un único doble enlace y tres grupos metilo, y una cadena lateral insaturada en cuya posición terminal (C1) hay un grupo carboxilo (Figura 1.4A). La orientación del grupo carboxilo con respecto al C2 determina la existencia de dos isómeros (2*cis* y 2*trans*), que son formas interconvertibles entre sí (Figura 1.4A y B). Además, el ABA presenta un carbono asimétrico en la posición C1' del anillo, que da lugar a los enantiómeros + (o S) y - (o R), no interconvertibles entre sí (Figura 1.4A y C), siendo la forma natural y activa de la molécula en las plantas el (+)-2*cis*-4*trans*-ABA (Taiz & Zeiger, 2002). En el C1 puede producirse la conjugación del ABA con glucosa para formar el ABA- $\beta$ -D-glucosil éster (Figura 1.4D), lo que conlleva

la inactivación del ABA y puede servir como forma de transporte (Boyer & Zeevaart, 1982; Hartung *et al.*, 2002).

### *Metabolismo*

La biosíntesis de ABA se realiza entre plastidios y citosol y se resume en la Figura 1.5. Al plastidio entra Isopentenil Pirofosfato (IPP) procedente de dos vías, la ruta del mevalonato y la ruta Metil-Eritrosa-Fosfato (MEP). Dentro del orgánulo se forma la zeaxantina, un carotenoide de 40 átomos de carbono (C<sub>40</sub>) que por sucesivas epoxidaciones da lugar a la violaxantina. La violaxantina puede isomerizarse en 9-*cis*-Violaxantina o transformarse en 9'-*cis*-neoxantina y ambas sirven de sustrato a la NCED. Esta enzima produce una rotura oxidativa que da lugar a la xantoxina, que sale del plastidio hacia el citosol para continuar la ruta de síntesis. Ya en el citosol, se produce una hidroxilación para formar el ABA-aldehído y un oxidación final que termina dando lugar al ABA (Schwartz & Zeevaart, 2010).

El catabolismo del ABA se realiza de dos maneras diferentes. Por un lado la molécula se puede inactivar mediante hidroxilaciones, siendo la más común la que sucede en el C8' mediante la ABA-8'-hidroxilasa, y que da lugar al ácido faseico y al ácido dihidrofaseico. También puede inactivarse, reversible o irreversiblemente por conjugación del grupo carboxilo del C1 (Nambara & Marion-Poll, 2005).

El balance entre síntesis y catabolismo es uno de los factores, junto con el transporte, que modula los niveles endógenos de ABA en los tejidos de las plantas. La regulación del metabolismo de esta fitohormona radica principalmente en dos puntos, la NCED en el caso de la síntesis y la ABA-8'-hidroxilasa en el caso del catabolismo. Aún así, la regulación es compleja y se pueden producir ajustes en pasos previos (como la síntesis de carotenos o la ruta MEP) e incluso el propio ABA puede autorregular los niveles de expresión de los genes implicados en su metabolismo (Nambara & Marion-Poll, 2005; Zaharia *et al.*, 2005).

### *Funciones fisiológicas*

Las funciones fisiológicas del ABA son variadas, interviniendo en diferentes procesos y etapas de desarrollo de manera determinante (Azcón-Bieto & Talón, 2001). Por un lado, del ABA depende el desarrollo embrionario, ya que regula la síntesis de proteínas implicadas en la tolerancia a la desecación y también interviene en la germinación, favoreciendo la latencia del embrión e impidiendo la germinación precoz (germinación de las semillas del fruto cuando todavía están unidos a la planta) (Taiz & Zeiger, 2002). También interviene en la inhibición del desarrollo vegetativo, en un equilibrio con las giberelinas, favoreciendo la dormición de las yemas vegetativas y actuando sobre la extensibilidad de la pared celular de tejidos en desarrollo. Las interacciones planta-patógeno también se ven moduladas por el ABA, aumentando la síntesis de callosa (Mauch-Mani & Mauch, 2005) e interfiriendo en la señalización cruzada de otros reguladores como el ácido salicílico, el ácido jasmónico o el etileno. Con éste último también interactúa, mediante inducción de la síntesis del etileno, en los procesos de abscisión de hojas y frutos.



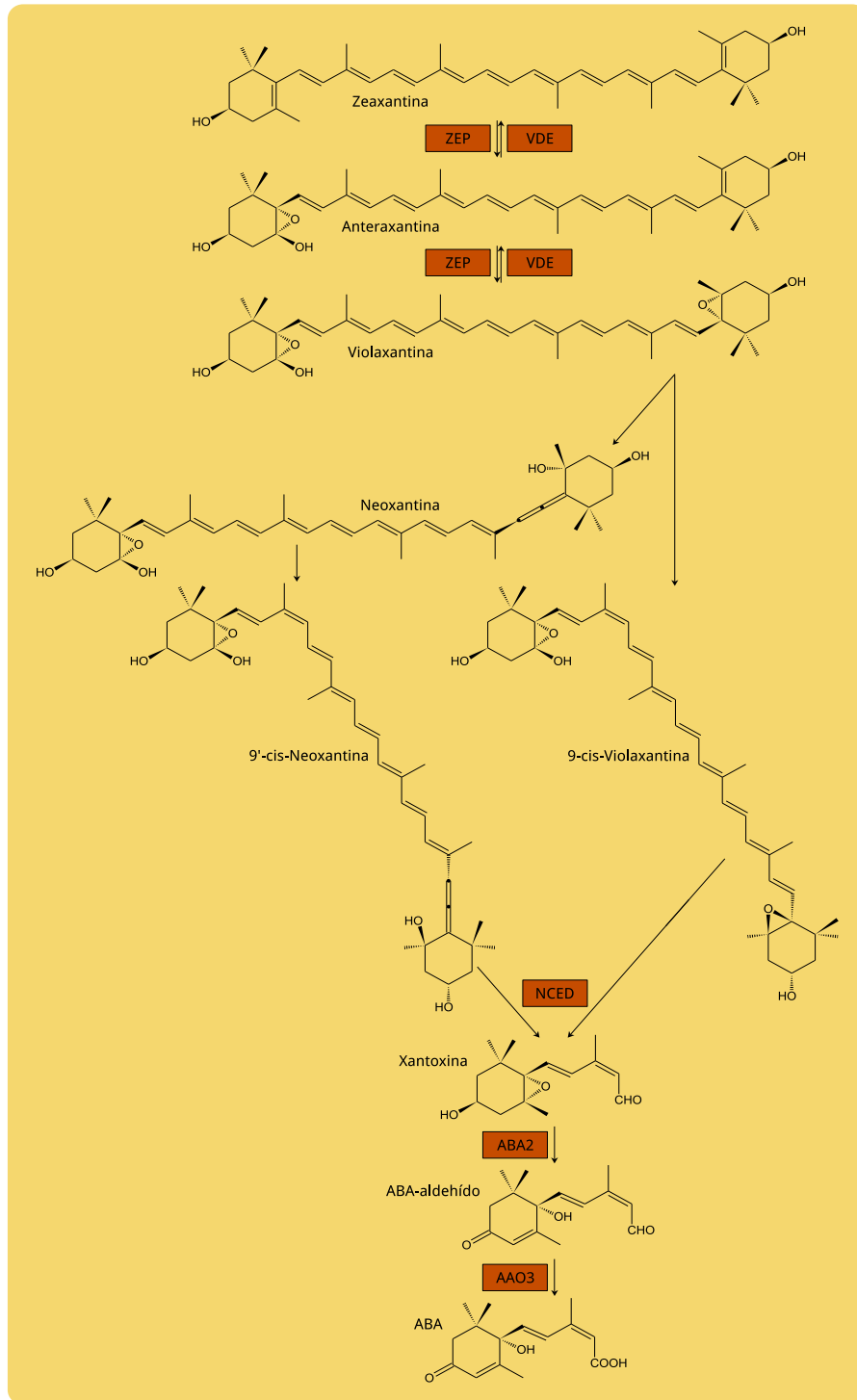


Figura 1.5: Ruta de biosíntesis del ABA. En recuadros se indican las enzimas claves de la ruta: ZEP, zeaxantina epoxidasa; VDE, violaxantina de-epoxidasa; NCED, 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa; ABA2, deshidrogenasa de alcoholes de cadena corta; AAO3, abscísico aldehído oxidasa. Modificado de [Nambara & Marion-Poll \(2005\)](#).

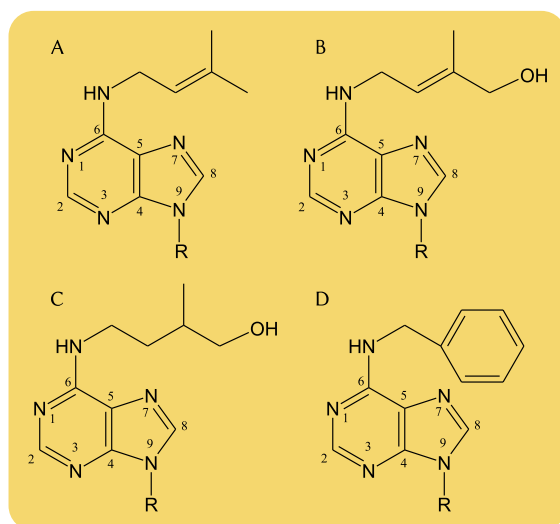


Figura 1.6: Diferentes citoquininas isoprenoídicas (A-C) y aromáticas (D). A: iP; B: Z; C: DHZ; D: BA. R: residuo conjugado

Además, como ya se ha comentado, el aumento de las concentraciones de ABA se relaciona con diversos estreses abióticos e induce cambios en los niveles de expresión génica en muchos grupos de genes. En *Arabidopsis*, alrededor de dos tercios de los genes que responden al estrés hídrico, aumentando o disminuyendo su expresión, son regulados por el ABA (Huang *et al.*, 2008), lo que sugiere que juega un papel crucial en las respuestas a este tipo de estrés.

#### 1.4.2 Citoquininas

##### Naturaleza química

Las CKs naturales presentes en las plantas derivan de la adenina, una base púrica. Se dividen en dos grandes grupos según la naturaleza del sustituyente localizado en la posición 6 del anillo de purina (Sakakibara, 2006):

- A. **CKs isoprenoídicas:** El sustituyente que presenta este grupo es una cadena lateral isoprenoide de cinco átomos de carbono. Este grupo engloba las familias de la Isopenteniladenina (iP), la Zeatina (Z) y la Dihidrozeatina (DHZ) (Figura 1.6A-C), junto a sus correspondientes conjugados, generalmente con ribosa en la posición 9 del anillo de purina. Las CKs isoprenoídicas son las más abundantes y frecuentes de todas las CKs descritas en plantas.
- B. **CKs aromáticas:** En este caso el sustituyente es un anillo de benceno unido a la base por un átomo de carbono, siendo el ejemplo más característico de este grupo la Benciladenina (BA) (Figura 1.6D). Las CKs aromáticas son menos frecuentes y algunas se encuentran solo en determinadas especies.

Estos reguladores del crecimiento pueden encontrarse en forma de bases libres o bien en forma de diferentes conjugados. La presencia de ribosa en la posición 9 del anillo de purina es uno de los conjugados más habituales, aunque pueden existir modificaciones

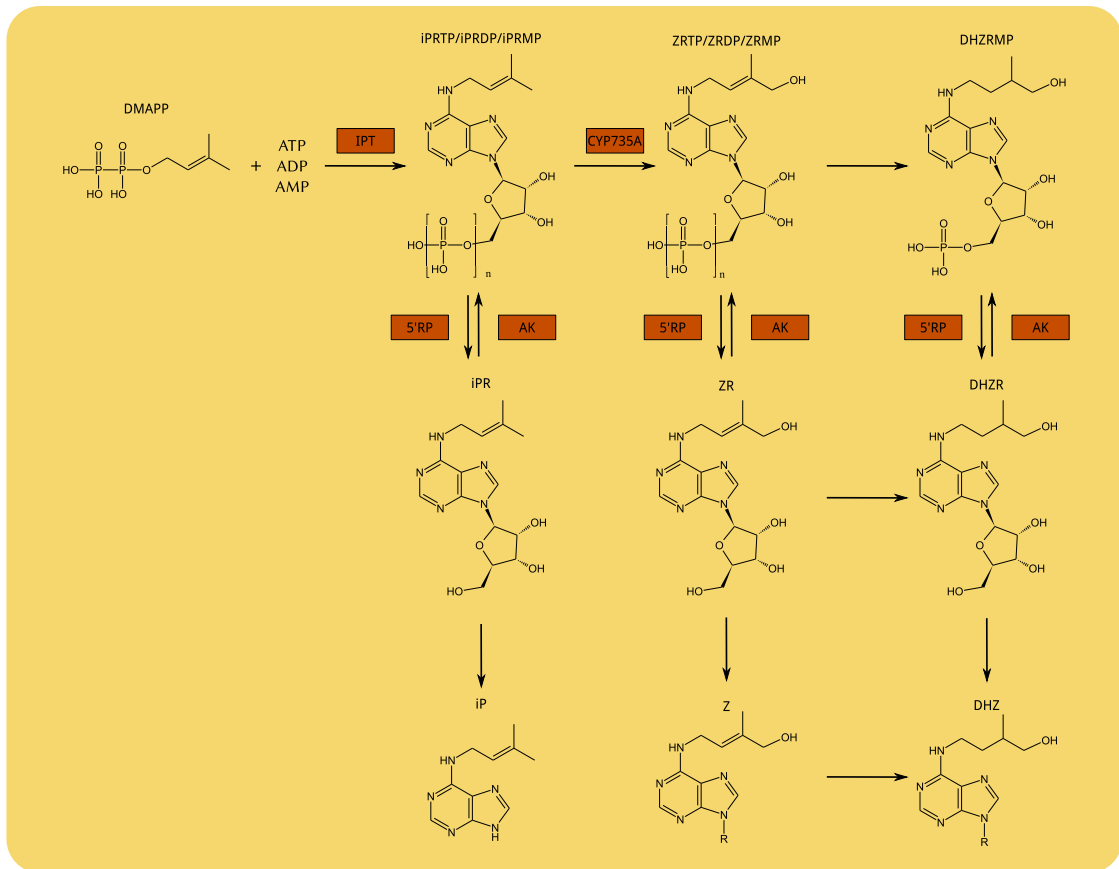


Figura 1.7: Ruta de síntesis de las CKs isoprenoídicas. En los recuadros se indican las enzimas clave de la ruta: IPT: Adenosil fosfato isopentenil transferasas; CYP735A: Citocromo P450 monooxigenasa; 5'RP: 5'-Ribonucleótido fosfohidrolasa; AK: Adenosina quinasa. Modificado de Sakakibara (2006).

como la conjugación con glucosa en diferentes posiciones, como en el grupo hidroxilo de la cadena isoprenoide o la posición 7 del anillo de purina (Azcón-Bieto & Talón, 2001).

### Metabolismo

Como se puede observar en la Figura 1.7, la síntesis de las CKs isoprenoídicas comienza con la combinación de Dimetilalilpirofosfato (DMAPP) y una adenosina con diferente grado de fosforilación por la acción de las Isopenteniladenosil Transferasas (IPTs). Posteriormente, la Isopenteniladenosina (iPA), con o sin fosfato, puede convertirse en Ribósido de Zeatina (RZ) mediante una hidroxilación catalizada por la Citocromo P450 Monooxigenasa (CYP735A), o ir perdiendo los fosfatos y la ribosa unidos en la posición 9 del anillo hasta llegar a iP o Z. Tanto el RZ como la Z pueden reducirse a Ribósido de Dihidrozeatina (RDHZ) o DHZ mediante fosforilasas y nucleosidasas. Las enzimas claves de esta ruta, donde se produce la mayor parte de la regulación, son las IPTs y la CYP735A (Sakakibara, 2006). Los ribósidos, además de ser formas intermedias en la ruta de síntesis, también son la forma mayoritaria de translocación de las CKs.

El catabolismo de este grupo de compuestos se produce principalmente por una deshidrogenización que rompe la cadena lateral isoprenoídica liberando adenina y 3-metil-2-butenal mediante la citoquinina deshidrogenasa.

La ruta metabólica de las CKs aromáticas todavía no se ha establecido con claridad, pero se han encontrado conjugados de ribosa, con o sin fosfato, y glucosa de estas CKs, lo que implica que al menos parte de la ruta metabólica se comparte con las CKs isoprenoídicas (Sakakibara, 2010).

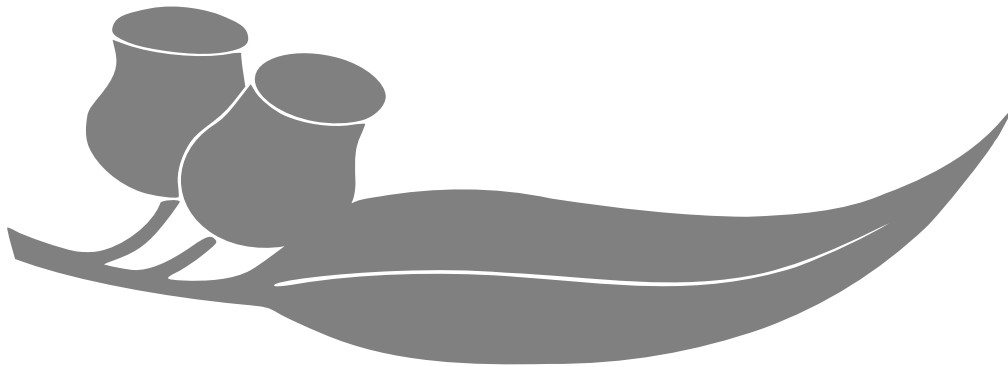
#### *Funciones fisiológicas*

Las CKs son fitohormonas implicadas principalmente en los procesos de división celular y desarrollo en combinación con las auxinas (Davies, 2010), pero también intervienen como señales a larga distancia del estado nutricional del suelo para mediar en las respuestas moleculares a los cambios en la disponibilidad de NO<sub>3</sub> (Davies *et al.*, 2005). Durante el estrés hídrico las CKs actúan como antagonistas del ABA en el efecto sobre el cierre estomático, así como sobre el crecimiento de la planta en estas condiciones, favoreciendo por ejemplo el crecimiento de yemas laterales, la elongación celular en hojas y retrasando la senescencia foliar (Davies, 2010).



## Parte II

### PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS





## PLANTEAMIENTO

---

Los bosques son componentes esenciales de los paisajes naturales y juegan un papel muy importante en la regulación del ciclo global del carbono, el control de la erosión y el mantenimiento de la biodiversidad. También desde el punto de vista productivo son un recurso importante. La superficie forestal española comprende un 21 % de la superficie total, lo que genera una gran actividad económica. De esta superficie, el 3 % corresponde al eucalipto, principal fuente de fibra maderera para la industria de la pasta y del papel, lo que lo convierte en una fuente alternativa de ingresos importante para las comunidades rurales. En este aspecto la madera del *E. globulus* es la que presenta las mejores condiciones de todas las especies de fibra corta conocidas, y por ello su uso se ha extendido a zonas de clima mediterráneo donde se enfrentan a diferentes condiciones ambientales poco favorables, siendo la sequía la más importante de todas. Esto, unido a las condiciones de cambio climático que favorecen la existencia de zonas cada vez más áridas en la Península Ibérica, resalta la necesidad de aumentar el potencial de adaptación a sequía del eucalipto a corto y largo plazo manteniendo la productividad, lo que permitiría satisfacer la demanda creciente de madera de esta especie de manera sostenible.

Ampliar el conocimiento de las dinámicas fisiológicas y moleculares que permitan entender cómo se enfrentan las especies leñosas como el eucalipto a la escasez de agua para poder predecir y seleccionar los mejores individuos en cada situación es, por tanto, uno de los desafíos más importantes. Para ello, dentro de la colaboración establecida desde hace varias décadas entre el grupo de reguladores del crecimiento del Área de Fisiología Vegetal de la Universidad de Oviedo y el grupo del Programa de Investigación Forestal (PIF), formado por el área de Cultivos Hortofrutícolas y Forestales del [SERIDA](#) en colaboración con el Centro Tecnológico, Forestal y de la Madera ([CETEMAS](#)), se han ido sentando los precedentes que conducen al desarrollo de esta tesis. Ambos grupos han trabajado coordinadamente en el estudio de reguladores del crecimiento vegetal [[ABA](#), [CKs](#) y [Ácido Indolacético \(IAA\)](#)] y su relación con la propagación de plantas (cultivo *in-vitro*, micropropagación, estaquillado y embriogénesis somática) y con la respuesta a estrés abiótico, centrándose en el estudio de especies de interés forestal como el castaño (*Castanea sativa* Mill.), el pino marítimo (*Pinus pinaster* Aiton.) y el eucalipto azul (*Eucalyptus globulus* Labill.).

Esta tesis surge a partir de los proyectos de investigación «Estrés hídrico: Bases fisiológicas y moleculares en especies de interés forestal» (AGL2006-13912-Co2-01) y «EUCANET: Eucalyptus Genomics Research Network for Improved Wood Properties and Adaptation to Drought» (GEN2006-27791-C2-1-E / VEG), donde participan ambos grupos de investigación, y tiene como finalidad el estudio del efecto del estrés hídrico en una especie de amplio uso forestal, como es el *E. globulus*. Para ello se han planteado una serie de objetivos principales.





## OBJETIVOS PRINCIPALES

---

- A. Establecer un sistema experimental que permita implantar un estrés puntual inmediato y severo que obligue a la planta a manifestar una respuesta rápida.
- B. Caracterizar la respuesta fisiológica inmediata del clon C14 a un estrés hídrico rápido y severo.
- C. Definir posibles marcadores y señalizadores fisiológicos de tolerancia a sequía en plantas juveniles del clon C14.
- D. Obtener y validar genes de referencia para *E. globulus* para su uso en ensayos de transcripción.
- E. Establecer la dinámica de genes de interés en los procesos fisiológicos relacionados con el estrés hídrico severo.
- F. Caracterizar fisiológicamente clones seleccionados de la descendencia de un cruzamiento controlado del clon C14 de *E. globulus* con una madre de bajo valor biológico frente a estrés hídrico severo a largo plazo.
- G. Establecer un método de análisis de datos rápido y eficiente para clasificar los clones según su respuesta al estrés hídrico severo.



Parte III

ESTRÉS HÍDRICO A CORTO PLAZO





## RESPUESTA RÁPIDA A ESTRÉS HÍDRICO SEVERO

---

### 2.1 INTRODUCCIÓN

En los últimos años las nuevas plantaciones de *Eucalyptus globulus* han empezado a utilizar clones seleccionados adaptados a condiciones semi-áridas en España, tales como el clon C14. Este clon ha sido seleccionado en ensayos de campo por su comportamiento en condiciones ambientales que afectan a la disponibilidad de agua [ENCE, comunicación personal]. Numerosos autores han estudiado el mecanismo de tolerancia a la sequía en *E. globulus*, usando tanto clones tolerantes como susceptibles. Estos estudios se han centrado en las respuestas mostradas por plantas cultivadas en contenedor en las que se han examinado sus características fisiológicas, biofísicas y morfológicas, poniendo especial énfasis en el crecimiento radical y el comportamiento hidráulico de las mismas (Pita & Pardos, 2001; Silva *et al.*, 2004; Shvaleva *et al.*, 2006). Sin embargo, los conocimientos adquiridos sobre la relación entre la señalización temprana y las respuestas fisiológicas en las primeras fases del estrés siguen siendo escasos, especialmente en plantas juveniles de interés forestal. El potencial de respuesta de las plantas juveniles es clave en los procesos de reforestación, necesiéndose, por tanto, un mejor conocimiento de los mecanismos de respuesta a sequía en este tipo de plantas para optimizar el establecimiento y el desarrollo de cultivos forestales.

El estrés hídrico es uno de los factores abióticos más importantes que afectan al crecimiento y desarrollo de las especies vegetales. Las respuestas de las plantas a este tipo de estrés engloban procesos fisiológicos y genéticos orientados a aumentar su probabilidad de supervivencia, tanto a corto como a largo plazo (Chaves *et al.*, 2002). Todos estos cambios están mediados por una compleja red de señalización que incluye tanto señales hidráulicas como bioquímicas (Comstock, 2002). Dentro de la señalización química, la principal molécula indicadora es el ABA, siendo la hormona de estrés por excelencia. Además del ABA, existen otras señales, tales como las CKs y el pH, que también pueden contribuir de manera significativa a la señalización del estrés (Jia & Zhang, 2008). Esta señalización química raíz-tallo a través del xilema todavía debe ser clarificada, ya que aún se desconoce la identidad de todas las moléculas involucradas, la secuencia en la que actúan y la contribución de cada una al proceso (Schachtman & Goodger, 2008).

Para poder estudiar, analizar y comprender las respuestas fisiológicas al estrés por sequía en las primeras fases de desarrollo de las plantas se necesita establecer ensayos que mantengan unas condiciones muy controladas y permitan fijar el nivel de estrés y la velocidad de imposición del mismo. El cultivo hidropónico en combinación con la adición de Polietilenglicol 8000 (PEG) permite el estudio del estrés hídrico bajo condiciones uniformes (Sanguineti *et al.*, 2006), ya que elimina la variabilidad inducida por el sustrato, ofreciendo una serie de ventajas:

1. No es absorbido por el sistema radical, por lo que no provoca ningún efecto tóxico en la planta (Michel & Kaufmann, 1973; Michel, 1983) en comparación con otros osmolitos usados en este tipo de cultivo, como el NaCl.
2. El efecto sobre la Conductancia Estomática ( $G_s$ ) y el Contenido Relativo de Agua (RWC) es mayor en comparación con otros osmolitos usados, tales como el NaCl (Caruso *et al.*, 2002).
3. El efecto del PEG se produce en todo el sistema radical de manera homogénea, evitando así variaciones dentro de las raíces y de las plantas sometidas al mismo tratamiento (Kato *et al.*, 2008).

En este capítulo se describe un sistema experimental diseñado para inducir estrés hídrico de manera rápida, específica y localizada en raíces, permitiendo el estudio de las respuestas fisiológicas tempranas. Este sistema permite, además, el análisis de los factores que puedan estar actuando como señales entre raíz y tallo. La elección del material vegetal para la puesta a punto de este sistema experimental es muy importante; por ello se seleccionó el clon *C14*, ya que su naturaleza clonal evita la variabilidad debida al genotipo y es un clon seleccionado por su tolerancia al estrés hídrico y usado a gran escala en plantaciones comerciales en España.

## 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

Como material vegetal se usaron esquejes enraizados de un año de *E. globulus* procedentes del clon *C14*, cedidos por ENCE. Las plantas se mantuvieron en invernadero bajo condiciones controladas de temperatura y humedad ( $20 \pm 2^\circ \text{C}$  y  $80 \pm 10\%$ , respectivamente) en la finca experimental «La Mata», en Grado, Asturias ( $43^\circ 32'$  Norte y  $7^\circ 00'$  Oeste, 65 m). Los esquejes enraizados se transplantaron al cultivo hidropónico, en el que se usó como soporte planchas de poliuretano expandido. La solución nutritiva utilizada estuvo compuesta de:

- $7,94 \text{ mEq L}^{-1} \text{ NO}_3^-$
- $5,60 \text{ mEq L}^{-1} \text{ PO}_4\text{H}_2^-$
- $0,62 \text{ mEq L}^{-1} \text{ SO}_4^{2-}$
- $1,99 \text{ mEq L}^{-1} \text{ NH}_4^+$
- $7,99 \text{ mEq L}^{-1} \text{ K}^+$
- $2,70 \text{ mEq L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$
- $1,58 \text{ mEq L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$
- $25 \text{ mg L}^{-1}$  de una mezcla de micronutrientes comercial (Hortrilone, Compo, España)

- El pH final se ajustó a 6.0 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$

Para evitar la anoxia del sistema radical se aireó la solución con pulsos de aire a través de un sistema de bombeo a presión (12 pulsos de 1 minuto por hora). La solución nutritiva con todos los componentes alcanzó un potencial osmótico de  $-0,1$  MPa.

Después de un mes de aclimatación al medio líquido, la mitad de las plantas se mantuvieron en la solución nutritiva como controles, mientras que el resto de plantas fueron sometidas a estrés hídrico mediante la adición de PEG (Sigma, Estados Unidos) al medio de cultivo. El PEG se administró por medio de un incremento gradual nocturno durante 10,5 h (período de inducción del estrés). Para ello, se bombeó en las bandejas de cultivo una solución concentrada de PEG [38 % (v/v)] a flujo constante usando una bomba peristáltica hasta que la solución nutritiva alcanzó un potencial osmótico de  $-0,6$  MPa. El exceso de solución se redirigió hacia la fuente de PEG mediante gravedad. Las soluciones, tanto de la bandeja de cultivo como de la fuente de PEG, se homogeneizaron durante todo el proceso mediante un sistema de aire comprimido para evitar la disminución en la disponibilidad de oxígeno debida al PEG (Figura 2.1). Este potencial osmótico de  $-0,6$  MPa se mantuvo durante 72 h (período de estrés constante). Para cada tratamiento, control y estrés, se establecieron tres bandejas con 45 plantas cada una. Tres plantas al azar fueron seleccionadas en los intervalos de tiempo señalados en la Tabla 2.1 para realizar las medidas de los parámetros fisiológicos y hormonales.

### 2.2.2 Medidas fotosintéticas y de intercambio de gases

Mediante un analizador de gases por infrarrojos (IRGA ADC type LCA-4, Analytical Development CO Ltd, Reino Unido) se cuantificaron la Eficiencia Fotosintética ( $A$ ), la Tasa de Transpiración ( $E$ ), la  $G_s$  y la Concentración Intracelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) en la segunda hoja completamente expandida de cada planta. Para evitar alteraciones en los resultados debidas al efecto de las variaciones en la cantidad de luz solar, todas las medidas se realizaron bajo condiciones de luz constantes de  $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , mediante el uso de lámparas de alta presión de vapor de sodio (OSRAM E40/ES 400W).

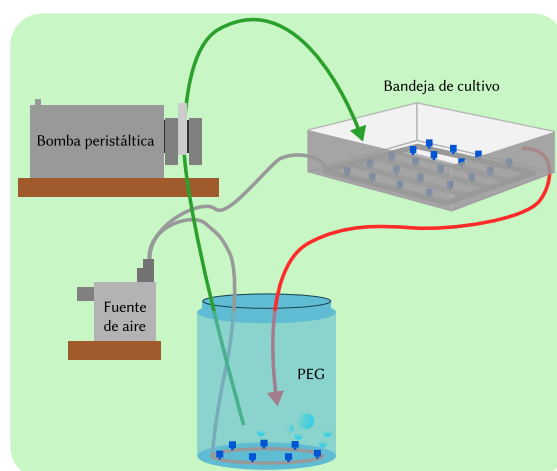


Figura 2.1: Vista esquemática del sistema experimental para la inducción del estrés. Las flechas indican la dirección del flujo de PEG.



Tabla 2.1: Tiempos de muestreo de los parámetros hormonales y fisiológicos.

		PERÍODO DE INDUCCIÓN DEL ESTRÉS			PERÍODO DE ESTRÉS CONSTANTE								
		Día 0			Día 1			Día 2			Día 3		
Medidas hormonales, hídricas y de crecimiento	Tiempo (h)	-10,5	-9	-6	0	0,5	1,5	3	6	12	24	36	72
	Hora del día	20:00	21:30	00:30	06:30	07:00	08:00	09:30	12:30	18:30	06:30	18:30	06:30
Medidas fotosintéticas y de intercambio de gases	Tiempo (h)				4,5	6,5	8,5	10,5	12,5	28,5	36,5	76,5	
	Hora del día				11:00	13:00	15:00	17:00	19:00	11:00	19:00	11:00	

También se calcularon la Eficiencia en el Uso de Agua Intrínseca (*WUEi*) y la Eficiencia de Carboxilación (*CE*) mediante los cocientes *A/Gs* y *A/Ci*, respectivamente.

### 2.2.3 Medidas de crecimiento y de contenido de agua

Para la determinación de los potenciales hídricos en tallo y raíz se usó una cámara de Scholander (PMS Instrument Co., Estados Unidos), siguiendo la metodología propuesta por Scholander *et al.* (1965) y Turner (1988). Para ello, cada planta fue dividida en tallo y raíz e introducida inmediatamente en la cámara para obtener el valor del potencial hídrico. En este paso, además, se recogió por pipeteo el líquido xilemático y se midió su pH (Crison pH 52-09 pHmeter, Crison S.A., España). Posteriormente, se determinó el Peso Fresco (*FW*) de raíces, tallos y hojas para cada planta, y, tras mantener los tejidos una semana a 60°C, se obtuvo el Peso Seco (*DW*). Con ambos pesos se calculó el Contenido de Agua (*WC*) usando la siguiente fórmula:  $(FW - DW) / FW$ .

### 2.2.4 Contenido hormonal

Se cuantificó el contenido hormonal (*ABA* y *CKs*) en las regiones apicales de tallo (ápice más los dos primeros pares de hojas sin expandir) y de raíz (últimos 2 cm apicales). También se determinó la concentración del *ABA* en el líquido xilemático, tanto en tallo como en raíz.

### 2.2.5 Extracción y purificación de *ABA* y *CKs*

Los segmentos apicales de tallo y raíz de las plantas se congelaron en nitrógeno líquido inmediatamente después de su recolección y, posteriormente, fueron liofilizados y triturados. Tanto el *ABA* como las bases y ribósidos de *CKs* (*Z*, *RZ*, *DHZ*, *RDHZ*, *iP* e *iPA*)

se extrajeron siguiendo el método descrito por Dobrev & Kamínek (2002), con ligeras modificaciones. Para ello, 100 mg de ápices de tallo y 20 mg de ápices de raíz se extrajeron durante toda la noche en 5 mL de solución de Bielecki (Bielecki, 1964) modificada [Metanol:Agua:Ácido acético (75:20:5; v/v/v)] a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En este paso se añadieron estándares radiactivos de ABA ( $[^3\text{H}]\text{ABA}$ ,  $1,7\text{ TBq mmol}^{-1}$ , Amersham Ibérica, España) y de CKs ( $[^{14}\text{C}]\text{BA}$ ,  $1,96\text{ GBq mmol}^{-1}$ , Moravek Biochemicals, Estados Unidos) para cuantificar las posibles pérdidas de las fitohormonas durante el proceso analítico. Una vez transcurrida la extracción, las muestras se centrifugaron durante 20 min a  $4500\text{ g}$  y se recogió el sobrenadante. Con el precipitado se realizó una re-extracción usando 1 mL de Bielecki modificado, incubándolo durante 1 h a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior centrifugación en las mismas condiciones que en el paso anterior. Ambos sobrenadantes se mezclaron y se eliminó el metanol bajo condiciones de vacío (Savant SC-200, Cambridge Scientific, Estados Unidos). Por último, se añadieron a cada muestra 0,6 mL de ácido acético 1 M, se mezcló vigorosamente por agitación y sonicación y se transfirieron a una columna de fase reversa de C18 (Varian, Estados Unidos) previamente equilibrada con ácido acético 1 M/Metanol 80 %. Para incrementar la eficacia de la extracción, este paso se repitió dos veces más con 0,2 mL de ácido acético. Las muestras se eluyeron de la columna de fase reversa con 1 mL de ácido acético 1 M/Metanol 80 % (v/v) directamente sobre una columna de modo mixto (fase reversa/intercambio catiónico, OASIS<sup>TM</sup> MCX, Waters, Estados Unidos), recogiendo una primera fracción que contenía el ABA y compuestos relacionados. Posteriormente se lavó la columna OASIS con 1 mL de hidróxido de amonio 0,35 M, y finalmente se eluyeron las bases y ribósidos de CKs con 1 mL de hidróxido de amonio 0,35 M/metanol 60 % (v/v). Para cuantificar las pérdidas de las fitohormonas en este paso, se recogió una alícuota de cada fracción y se midieron en un contador de centelleo (Packard 2500 TR, Estados Unidos). Ambas fracciones se secaron a vacío y las diferentes fitohormonas se separaron mediante Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) en un cromatógrafo Waters 2695 equipado con un detector de fotodiodo (Waters 2996) acoplado a un colector de fracciones (Waters Fraction Collector III, Waters, Estados Unidos).

### 2.2.6 Separación por HPLC de ABA y CKs

Para la separación del ABA se utilizaron dos solventes como fase móvil: Solvente A, constituido por Agua/Metanol/Ácido acético glacial (89:10:1) (v/v/v); y Solvente B, constituido únicamente por metanol. Previo a la inyección en el HPLC, las muestras de tallo y raíz se resuspendieron en 1 y 0,5 mL de Solvente A, respectivamente, y se filtraron a través de un filtro de  $0,45\text{ }\mu\text{m}$  de poro (PVDF Filter, Millipore, Estados Unidos). Alícuotas de 0,1 mL de cada filtrado se inyectaron en una columna Symmetry C18 ( $3,5\text{ }\mu\text{m}$ ,  $7,5\text{ cm}\times 0,46\text{ cm}$ ; Waters, Estados Unidos) y se eluyeron mediante un gradiente lineal de Solvente A:Solvente B, partiendo de 90:10 (v/v) y finalizando en 40:60 (v/v), durante 10 min, seguido de 5,5 min de condiciones isocráticas en la última proporción. El flujo de solvente se fijó en  $1\text{ mL min}^{-1}$ , recogiendo fracciones a intervalos de 1 minuto coincidiendo con el tiempo de retención de un estándar conocido.

Las bases y ribósidos de CKs se separaron en una columna Kromasil 100 C18 ( $5\text{ }\mu\text{m}$ ,  $15\text{ cm}\times 0,46\text{ cm}$ ; Scharlab). Las muestras se resuspendieron en 0,15 mL de solvente C, constituido por Acetonitrilo/Tampón acetato de trietilamina 40 mM pH 7,0 (1:19) (v/v),

se filtraron de la misma forma descrita para las muestras de ABA y se pinchó una alícuota de 0,1 mL a través de la columna. Para la separación de las CKs se utilizó un gradiente lineal de Solvente C:Solvente D (Acetonitrilo), partiendo de 5:95 (v/v) hasta 20:80 (v/v) durante 20 minutos, seguido de condiciones isocráticas durante 7 minutos. El flujo de solvente se fijó en  $1,5 \text{ mL min}^{-1}$  y tal como se realizó con el ABA, se recogieron fracciones de 1 minuto coincidiendo con los tiempos de retención de los diferentes estándares de CKs.

Después de la recolección, las muestras de las fitohormonas se llevaron a sequedad bajo condiciones de vacío.

### 2.2.7 Cuantificación de ABA y CKs

El contenido en ABA se midió mediante Radioinmunoensayo (RIA) competitivo, tanto para las muestras procedentes de ápice de tallo y raíz como para las muestras sin purificar procedentes del líquido xilemático. Para ello se usaron anticuerpos policlonales anti-ABA (C4') (Centeno & Granda, 2009) específicos de la forma libre del ABA. Las muestras procedentes del líquido xilemático se diluyeron en una proporción 1:10 (v/v) en Tampón Fosfato Salino 50 mM pH 7,0 (PBS), mientras que las muestras de tejidos apicales fueron resuspendidas en 0,5 mL del mismo solvente. Para llevar a cabo el RIA se preparó una mezcla de incubación consistente en 0,5 mL de gelatina al 0,1 % (p/v) en PBS, 0,1 mL de Seroalbúmina Bovina (BSA) al 1 % (p/v) en PBS, 0,1 mL de muestra diluida, 0,1 mL de [ $^3\text{H}$ ]ABA conteniendo 0,16 pmol y 0,1 mL de una solución de anticuerpos 1:1000. La mezcla de incubación se mantuvo durante 3 h a  $4^\circ\text{C}$  en oscuridad, después de lo cual se añadió 1 mL de una solución de sulfato amónico saturada y se mantuvo 30 min a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo las muestras se centrifugaron a  $13500 g$  y  $4^\circ\text{C}$  durante 15 min. Tras la centrifugación se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 mL de sulfato amónico saturado al 50 % durante 15 min a temperatura ambiente, centrifugándose posteriormente en las mismas condiciones que en el paso anterior. De nuevo se descartó el sobrenadante y se añadieron 0,15 mL de agua destilada y 1,5 mL de líquido de centelleo (Ultima Gold XR, PerkinElmer, Estados Unidos), mezclándose de manera vigorosa. La radiactividad resultante se midió en un contador de centelleo (Packard 2500 TR, Estados Unidos).

Las fracciones secas de CKs obtenidas tras la separación mediante HPLC se resuspendieron en Tampón Tris Salino 25 mM pH 7,5 (TBS) y se procedió a su cuantificación mediante Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) (Centeno *et al.*, 1996). Para ello se usaron tres tipos de anticuerpos policlonales (Fernández *et al.*, 1995):

1. Anticuerpos anti-RZ: Diseñados frente a RZ sirvieron para la cuantificación directa de RZ, así como la cuantificación indirecta de Z por reacción cruzada.
2. Anticuerpos anti-iPA: Diseñados frente a iPA para la cuantificación directa de iPA e indirecta de iP.
3. Anticuerpos anti-RDZH: Diseñados frente a RDZH para la cuantificación directa de RDZH e indirecta de DHZ.



Figura 2.2: Síntomas visuales de sequía en plantas del clon *C14* a las 3 h de estrés constante.

### 2.2.8 Análisis estadístico

Los datos cuantitativos se analizaron mediante un Análisis de la Varianza (ANOVA) de dos vías, considerando tratamiento y tiempo como factores fijos y estableciendo el nivel de confianza en un 95 % ( $\alpha = 0,05$ ). Los datos de cada bandeja de cultivo se trataron como réplicas experimentales, obteniendo así una  $n = 3$  para los cálculos y las representaciones gráficas. El cálculo del coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) y el Análisis de Componentes Principales (PCA) se realizaron con el programa informático SPSS v18. El PCA se basó en una matriz de correlaciones, aplicando una rotación de tipo *varimax*.

## 2.3 RESULTADOS

Durante el período de inducción del estrés no se observaron síntomas visuales de sequía en las plantas (doblado de hojas y ápices de tallo). Estos síntomas aparecieron después de 3 h de estrés constante, coincidiendo con el mediodía (Figura 2.2).

Dentro de los parámetros fotosintéticos y de intercambio de gases, la  $G_s$  presentó diferencias significativas entre tratamientos ( $p = 0,045$ ), mostrando la máxima diferencia entre control y estrés a las 8,5 h de estrés constante (Figura 2.3A). Las diferencias en  $E$  entre tratamientos se acercaron a la significancia ( $p = 0,052$ ), mostrando una tendencia similar, tanto en las plantas estresadas como en las control, a la observada para la  $G_s$  (Figura 2.3B). Las plantas control aumentaron la  $A$  durante el ensayo, especialmente al mediodía, mientras que las plantas sometidas a estrés presentaron unos valores de  $A$  inferiores y constantes durante el período de estrés (Figura 2.3C). La  $C_i$  también se vio reducida en éste período, pero solamente a partir de 10,5 h de estrés constante (Figura 2.3D). La  $CE$  presentó un máximo en las plantas control a mitad del primer día que no se manifestó en las plantas mantenidas en PEG (Figura 2.3E). Finalmente, la  $WUE_i$  mostró un patrón de comportamiento completamente diferente del resto del parámetros (Figura 2.3F), en el cual las plantas sometidas a estrés presentaron valores más altos a partir de 6,5 h de estrés constante con un máximo en la diferencia entre tratamientos a las 8,5 h.

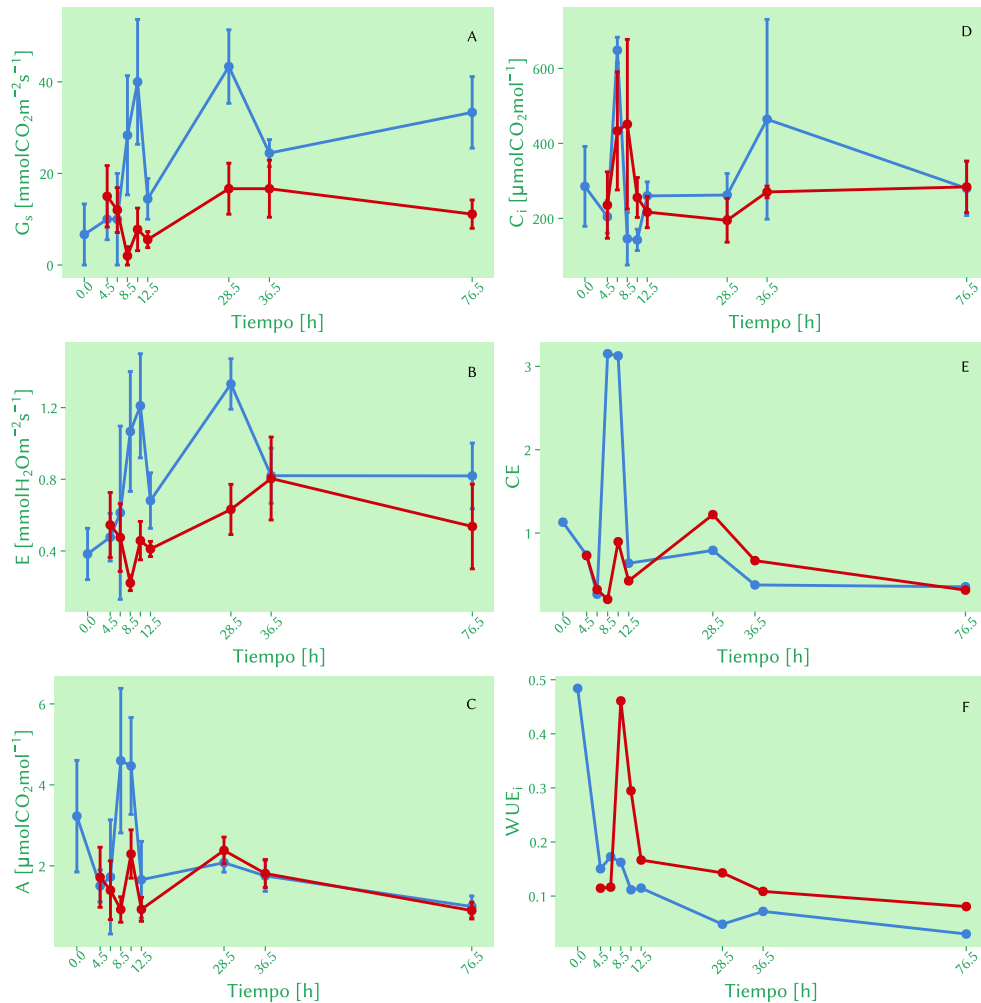


Figura 2.3: Cambios en (A) la conductancia estomática, (B) la tasa de transpiración, (C) la eficacia fotosintética, (D) la concentración intracelular de  $\text{CO}_2$ , (E) la eficiencia de carboxilación y (F) la eficiencia en el uso de agua durante el período de estrés constante. En rojo se indica el tratamiento de sequía y en azul el tratamiento control. Las barras representan el error estándar ( $n = 3$ ).

El contenido de agua de las plantas del clon  $C14$  bajo estrés hídrico fue más bajo que en los controles a lo largo del experimento (Figura 2.4). Las raíces y los tallos se vieron significativamente más afectados por el tratamiento que las hojas ( $p < 0,001$ ,  $p = 0,002$  y  $p = 0,187$ , respectivamente).

En cuanto al pH del líquido xilemático, éste fue siempre significativamente más alto, entre 0,2 y 0,6 unidades de pH, en las plantas del clon  $C14$  cultivadas en presencia de PEG, tanto en los tallos como en las raíces ( $p = 0,001$  y  $p < 0,001$ , respectivamente, Figura 2.5A y B). Sin embargo, mientras que en el líquido xilemático de los tallos de las plantas estresadas se observó una tendencia del pH a incrementarse a lo largo del tiempo, en las raíces se mantuvo constante después de un incremento inicial en el período de inducción del estrés. La evolución del potencial hídrico fue la misma para los dos tratamientos, tanto en raíz como en tallo, siguiendo un patrón circadiano (Figura 2.5C y D). Pese a compartir la tendencia a lo largo del tiempo, los valores de potencial hídrico de las plantas del clon  $C14$  con PEG en el medio de cultivo fueron

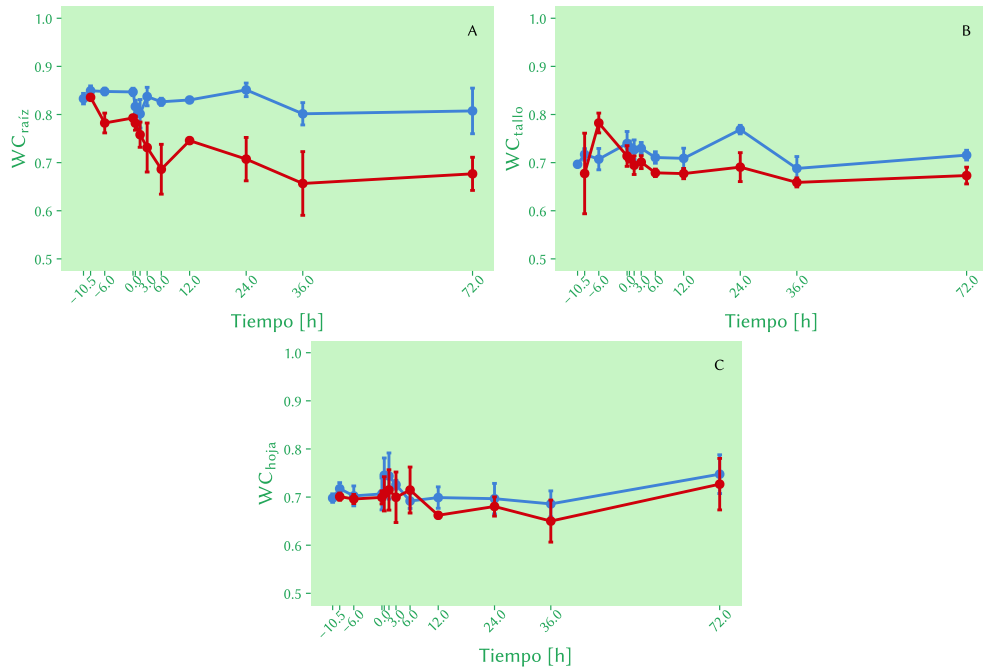


Figura 2.4: Contenido de agua en (A) raíces, (B) tallos y (C) hojas durante el período de inducción del estrés (-10,5 a 0 h) y el período de estrés constante (0 a 72 h). En rojo se indica el tratamiento de sequía y en azul el tratamiento control. Las barras representan el error estándar ( $n = 3$ ).

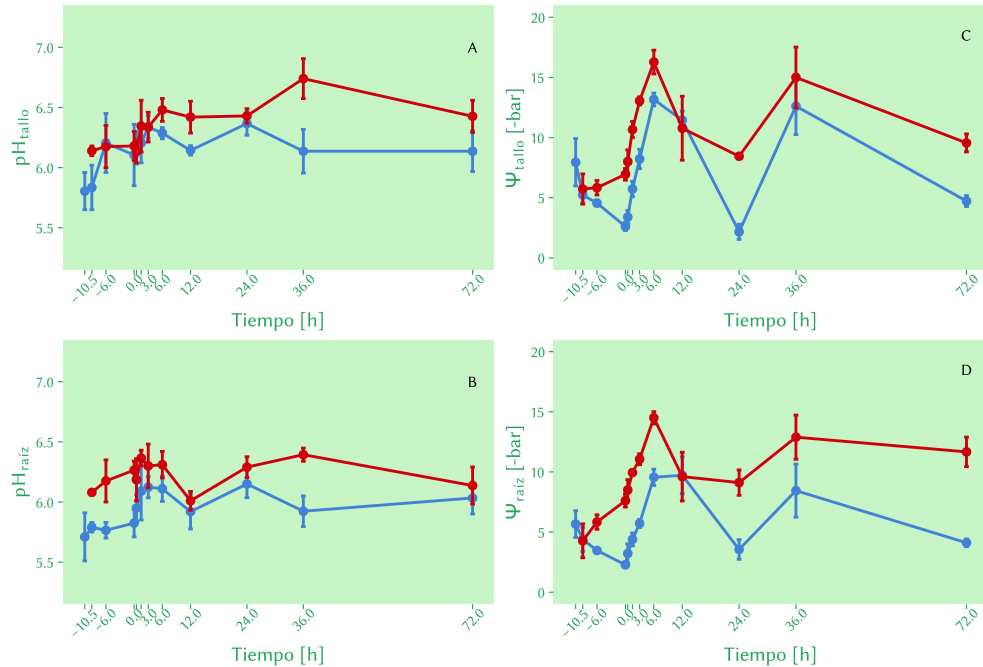


Figura 2.5: pH en (A) tallos y (B) raíces y potencial hídrico en (C) tallos y (D) raíces durante el período de inducción del estrés (de -10,5 a 0 h) y el período de estrés constante (de 0 a 72 h). En rojo se indica el tratamiento de sequía y en azul el tratamiento control. Las barras representan el error estándar ( $n = 3$ ).

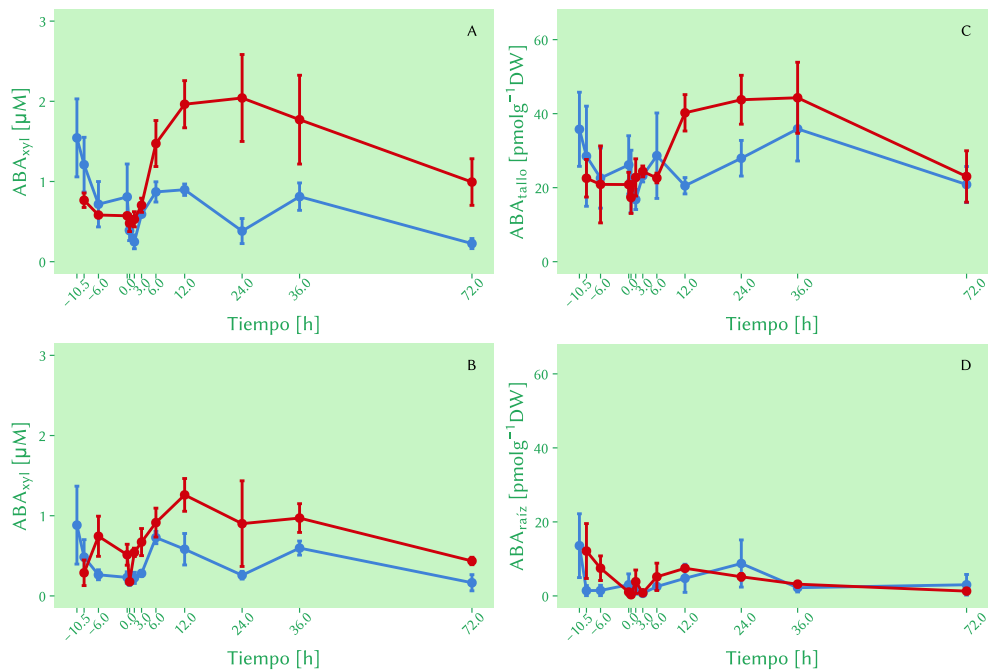


Figura 2.6: Contenido de ABA en (A) xilema de tallo, (B) xilema de raíz, (C) ápice de tallo y (D) ápice de raíz durante el período de inducción del estrés (de -10,5 a 0 h) y el período de estrés constante (de 0 a 72 h). En rojo se indica el tratamiento de sequía y en azul el tratamiento control. Las barras representan el error estándar ( $n = 3$ ).

siempre significativamente superiores en valor absoluto (dos veces más) que en aquellas cultivadas en ausencia de PEG ( $p < 0,001$  para ambas partes, tallo y raíz).

El ABA xilemático presentó valores significativamente diferentes para los tratamientos tanto en tallo como en raíz ( $p = 0,001$  y  $p = 0,006$ , respectivamente). La concentración de ABA en el líquido xilemático de las plantas del clon C14 sometidas a estrés hídrico fue mayor, tanto en la parte aérea como en la radical (Figura 2.6A y B). De igual manera, aunque no se observaron diferencias significativas ( $p = 0,432$ ), el contenido en ABA de la región apical del tallo fue mayor en las plantas estresadas (Figura 2.6C). En el ápice de raíz tampoco se encontraron diferencias significativas ( $p = 0,759$ ) entre los tratamientos (Figura 2.6D). El contenido de ABA de las plantas control se incrementa durante el día y disminuye a niveles basales durante la noche (Figura 2.6). Sin embargo, en aquellas plantas sometidas a estrés el incremento se mantiene durante las primeras 24 h de tratamiento, tanto en el líquido xilemático como en la región apical del tallo. Este comportamiento diferencial conduce al establecimiento, después de 24 h de estrés constante, de máximas diferencias en el contenido de ABA, de hasta 5,3 veces más en xilema de tallo y 3,5 veces más en xilema de raíz de plantas estresadas frente a control.

En general se observa una disminución de la concentración de CKs en la raíz a lo largo del experimento (Tabla 2.2), siendo esta reducción mayor en las plantas cultivadas en presencia de PEG, mostrando diferencias significativas para la DHZ ( $p < 0,001$ ), la RDHZ ( $p < 0,001$ ), iP ( $p = 0,005$ ) e iPA ( $p = 0,003$ ). Por el contrario, en tallo no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en el contenido de ninguna citoquinina, mostrando las plantas el mismo patrón de comportamiento independientemente del tratamiento.

Tabla 2.2: Contenido de citoquinas [ $\text{pmol } 10^2 \mu\text{L}^{-1} \pm \text{ES}$ ] en tallos y raíces del clon C14 durante el período de inducción del estrés (de -10,5 a 0 h) y el período de estrés constante (de 0 a 72 h). <sup>a</sup>: Diferencias significativas entre tratamientos ( $\alpha < 0,05$ ); <sup>b</sup>: Diferencias significativas entre tiempos ( $\alpha < 0,05$ ); <sup>c</sup>: Interacción significativa entre tiempos y tratamientos ( $\alpha < 0,05$ ); ES: error estándar. N.M.: No medido; L.D.: Por debajo del límite de detección.

CK	TRATAMIENTO	TIEMPO DE CULTIVO (h)											
		-10,5	-9	-6	0	0,5	1,5	3	6	12	24	36	72
Tallo	Control	62,1 ± 37,6	38,6 ± 16,0	42,6 ± 34,5	65,2 ± 39,2	36,6 ± 15,1	22,0 ± 10,0	41,0 ± 10,6	53,0 ± 26,2	22,8 ± 8,5	44,0 ± 22,1	40,2 ± 19,3	23,0 ± 12,2
	Estrés	30,7 ± 13,7	28,5 ± 23,1	61,2 ± 37,9	34,1 ± 14,6	35,4 ± 2,0	47,3 ± 22,1	37,8 ± 16,9	35,4 ± 4,6	27,7 ± 10,7	44,3 ± 21,3	25,2 ± 12,4	
iPA	Control	31,5 ± 20,5	16,4 ± 7,0	24,8 ± 17,5	25,7 ± 13,4	16,0 ± 9,5	10,1 ± 2,0	21,9 ± 7,9	32,8 ± 10,1	8,8 ± 2,3	16,6 ± 10,7	19,2 ± 5,9	13,4 ± 6,6
	Estrés	14,4 ± 6,9	11,2 ± 1,9	23,7 ± 10,4	16,7 ± 7,4	10,5 ± 1,6	18,0 ± 6,9	14,7 ± 7,6	10,7 ± 0,1	10,4 ± 4,9	15,9 ± 7,0	11,3 ± 2,0	
DHZ	Control	156,9 ± 86,4	221,3 ± 185,2	149,7 ± 51,9	450,1 ± 391,6	211,6 ± 102,5	107,0 ± 35,1	124,8 ± 78,7	83,8 ± 28,9	112,9 ± 38,8	284,9 ± 95,7	96,1 ± 36,5	122,6 ± 36,3
	Estrés	127,7 ± 109,3	51,7 ± 18,8	496,6 ± 451,5	131,5 ± 103,1	247,6 ± 222,2	306,3 ± 248,6	87,0 ± 63,3	261,5 ± 34,0	313,0 ± 274,3	153,0 ± 106,4	189,8 ± 169,6	
RDHZ <sup>c</sup>	Control	135,4 ± 57,2	77,0 ± 49,8	54,9 ± 12,6	312,2 ± 199,0	58,0 ± 10,2	57,2 ± 10,1	80,3 ± 37,7	54,7 ± 6,1	43,4 ± 5,7	295,3 ± 132,1	48,8 ± 12,7	44,6 ± 5,3
	Estrés	73,4 ± 46,6	N.M.	191,4 ± 159,0	93,9 ± 23,6	99,8 ± 87,9	74,9 ± 47,9	40,2 ± 24,4	284,9 ± 158,2	85,0 ± 69,4	51,7 ± 29,5	L.D.	L.D.
Z	Control	64,1 ± 31,6	N.M.	34,6 ± 5,3	156,6 ± 85,0	N.M.	16,9 ± 1,2	63,5 ± 40,2	21,8 ± 2,8	43,7 ± 13,5	41,5 ± 8,0	N.M.	L.D.
	Estrés	L.D.	N.M.	120,7 ± 57,5	N.M.	L.D.	61,1 ± 35,6	43,0 ± 22,8	59,9 ± 35,9	L.D.	L.D.	L.D.	L.D.
RZ	Control	44,0 ± 34,4	17,0 ± 5,9	N.M.	57,0 ± 34,6	19,0 ± 2,1	10,7 ± 4,6	10,7 ± 0,6	19,3 ± 4,2	16,1 ± 7,5	19,4 ± 0,7	N.M.	N.M.
	Estrés	8,8 ± 1,0	9,8 ± 0,3	26,2 ± 16,8	N.M.	10,0 ± 0,7	4,8 ± 2,2	14,3 ± 5,1	27,9 ± 16,1	11,3 ± 4,6	N.M.	L.D.	L.D.
Raíz	Control	291,4 ± 131,6	143,6 ± 37,2	143,1 ± 23,7	254,1 ± 98,6	416,2 ± 85,9	236,2 ± 95,2	179,6 ± 51,5	121,0 ± 64,1	178,7 ± 43,1	206,6 ± 173,7	129,1 ± 56,3	92,1 ± 57,8
	Estrés	197,9 ± 79,3	50,8 ± 2,3	118,9 ± 48,2	87,1 ± 12,4	111,4 ± 25,1	195,7 ± 107,1	87,9 ± 39,2	104,2 ± 13,9	81,7 ± 33,5	49,4 ± 2,5	131,5 ± 97,6	
iPA <sup>a,b</sup>	Control	216,2 ± 118,3	70,4 ± 25,5	73,2 ± 20,0	164,8 ± 37,5	99,7 ± 38,9	93,0 ± 33,5	76,8 ± 43,4	56,4 ± 25,3	40,5 ± 18,1	64,1 ± 41,0	26,3 ± 8,5	47,2 ± 17,6
	Estrés	38,0 ± 3,2	39,6 ± 8,1	78,7 ± 19,0	42,6 ± 7,1	119,2 ± 75,7	132,1 ± 54,2	36,3 ± 17,0	35,3 ± 1,7	52,2 ± 15,0	14,5 ± 1,6	40,5 ± 20,1	
DHZ <sup>b</sup>	Control	831,2 ± 105,7	584,3 ± 165,9	513,0 ± 158,3	202,6 ± 84,2	739,6 ± 330,3	904,1 ± 365,2	497,5 ± 220,3	664,4 ± 241,6	280,9 ± 100,1	257,5 ± 109,8	369,0 ± 199,8	236,2 ± 52,2
	Estrés	53,1 ± 3,9	156,0 ± 138,4	466,7 ± 373,7	39,9 ± 12,4	707,7 ± 557,3	87,6 ± 5,5	244,0 ± 126,3	136,5 ± 112,8	151,2 ± 55,3	25,0 ± 4,3	146,9 ± 13,5	
RDHZ <sup>b,b</sup>	Control	610,6 ± 227,7	284,1 ± 96,2	383,9 ± 117,5	86,4 ± 34,7	344,3 ± 102,3	605,4 ± 190,1	232,7 ± 58,7	323,5 ± 82,6	172,5 ± 53,5	131,8 ± 36,8	182,8 ± 87,1	136,5 ± 20,5
	Estrés	160,1 ± 130,5	124,6 ± 103,2	206,9 ± 71,0	37,6 ± 0,4	349 ± 0,1	67,1 ± 10,6	124,5 ± 62,1	67,1 ± 52,1	120,6 ± 42,0	119,8 ± 109,5	74,5 ± 25,3	
Z	Control	171,0 ± 149,3	62,4 ± 4,4	208,3 ± 173,5	N.M.	81,5 ± 23,5	112,9 ± 69,8	N.M.	122,8 ± 61,3	65,8 ± 47,9	41,5 ± 30,7	41,3 ± 14,1	L.D.
	Estrés	N.M.	L.D.	184,4 ± 172,2	N.M.	L.D.	N.M.	N.M.	N.M.	L.D.	L.D.	L.D.	L.D.
RZ	Control	193,3 ± 179,8	47,1 ± 2,7	139,1 ± 110,3	N.M.	32,5 ± 18,3	52,7 ± 12,6	N.M.	92,5 ± 49,9	39,8 ± 22,0	55,6 ± 48,9	57,4 ± 39,8	69,8 ± 33,1
	Estrés	19,1 ± 1,0	19,8 ± 12,9	93,4 ± 74,5	18,2 ± 6,4	59,6 ± 31,2	48,0 ± 26,6	N.M.	44,6 ± 19,6	28,5 ± 0,4	10,3 ± 4,9	L.D.	L.D.



Tabla 2.3: Correlaciones de Pearson ( $r$ ) para los parámetros de crecimiento e hídricos frente a las concentraciones hormonales y el pH. \*: Correlación significativa ( $\alpha < 0,05$ ).

PARÁMETROS DE CRECIMIENTO E HÍDRICOS										
	DW <sub>raíz</sub>	DW <sub>tallo</sub>	DW <sub>hoja</sub>	WC <sub>raíz</sub>	WC <sub>tallo</sub>	WC <sub>hoja</sub>	$\Psi$ <sub>tallo</sub>	$\Psi$ <sub>raíz</sub>	pH <sub>tallo</sub>	pH <sub>raíz</sub>
pH <sub>tallo</sub>	0,673*	0,172	0,114	-0,738*	-0,333	-0,375	0,512*	0,627*	1	0,767*
ABA <sub>xil.tallo</sub>	0,510*	0,412	0,332	-0,512*	-0,564*	-0,672*	0,486*	0,503*	0,295	0,069
ABA <sub>tallo</sub>	0,343	0,294	0,282	-0,345	-0,354	-0,748*	0,336	0,285	0,302	0,050
Z <sub>tallo</sub>	0,137	-0,190	0,031	0,175	0,238	-0,163	-0,347	-0,255	-0,075	-0,058
RZ <sub>tallo</sub>	-0,155	-0,051	-0,030	0,304	0,264	-0,091	-0,297	-0,287	-0,371	-0,464*
DHZ <sub>tallo</sub>	-0,001	-0,266	-0,302	0,018	0,274	-0,062	-0,242	-0,171	0,158	-0,015
RDHZ <sub>tallo</sub>	-0,054	-0,005	-0,057	0,094	-0,048	-0,235	-0,238	-0,219	-0,103	-0,342
iP <sub>tallo</sub>	-0,195	-0,052	0,145	0,238	0,203	-0,280	0,033	-0,126	-0,149	-0,299
iPA <sub>tallo</sub>	-0,290	-0,012	0,279	0,428*	0,273	-0,104	-0,054	-0,228	-0,333	-0,345
CKs <sub>tot.tallo</sub>	-0,158	-0,229	-0,141	0,241	0,329	-0,096	-0,308	-0,326	-0,138	-0,312
ABA/CK <sub>tallo</sub>	0,454*	0,001	-0,148	-0,493*	-0,324	-0,294	0,150	0,285	0,336	0,350
pH <sub>raíz</sub>	0,744*	0,107	0,143	-0,693*	-0,255	-0,174	0,495*	0,643*	0,767*	1
ABA <sub>xil.raíz</sub>	0,544*	0,528*	0,486*	-0,559*	-0,648*	-0,721*	0,679*	0,658*	0,357	0,214
ABA <sub>raíz</sub>	-0,154	-0,043	0,118	0,131	-0,205	-0,321	-0,090	-0,123	-0,171	-0,200
Z <sub>raíz</sub>	-0,111	-0,221	-0,042	0,260	0,271	0,202	-0,124	-0,164	-0,269	-0,188
RZ <sub>raíz</sub>	-0,281	-0,089	0,096	0,437*	0,370	0,195	-0,254	-0,353	-0,329	-0,426*
DHZ <sub>raíz</sub>	-0,535*	-0,328	-0,259	0,483*	0,415*	0,421*	-0,377	-0,503*	-0,560*	-0,533*
RDHZ <sub>raíz</sub>	-0,570*	0,302	-0,204	0,506*	0,313	0,348	-0,329	-0,495*	-0,549*	-0,545*
iP <sub>raíz</sub>	-0,547*	-0,369	-0,316	0,358	0,213	0,309	-0,223	-0,364	-0,530*	-0,542*
iPA <sub>raíz</sub>	-0,312	-0,196	-0,044	0,331	0,280	0,172	-0,264	-0,339	-0,556*	-0,482*
CKs <sub>tot.raíz</sub>	-0,550*	-0,327	-0,247	0,484*	0,372	0,380	-0,345	-0,489*	-0,576*	-0,590*
ABA/CK <sub>raíz</sub>	0,084	-0,068	0,061	-0,183	-0,527*	-0,375	0,120	0,105	0,239	0,253

Tabla 2.4: Variabilidad total explicada por los componentes principales obtenidos en el PCA

	TOTAL	%	% ACUMULADO
Componente 1	6,412	29,145	29,145
Componente 2	6,237	28,352	57,497
Componente 3	2,593	11,787	69,284

Tabla 2.5: Contribución de los diferentes parámetros analizados sobre los componentes principales obtenidos en el PCA. Entre paréntesis se muestra el valor de la contribución

COMPONENTE 1	COMPONENTE 2	COMPONENTE 3
CKt <sub>raíz</sub> (0,914)	ABA <sub>xil.raíz</sub> (0,855)	ABA <sub>raíz</sub> (0,816)
RDHZ <sub>raíz</sub> (0,847)	Ψ <sub>tallo</sub> (0,840)	ABA/CKs <sub>raíz</sub> (0,704)
iPA <sub>raíz</sub> (0,838)	Ψ <sub>raíz</sub> (0,823)	
DHZ <sub>raíz</sub> (0,831)	ABA <sub>xil.tallo</sub> (0,769)	
iP <sub>raíz</sub> (0,749)	DW <sub>tallo</sub> (0,736)	
RZ <sub>raíz</sub> (0,707)	DW <sub>hoja</sub> (0,696)	
pH <sub>raíz</sub> (-0,694)	DW <sub>raíz</sub> (0,690)	
pH <sub>tallo</sub> (-0,655)	ABA <sub>tallo</sub> (0,617)	
	WC <sub>raíz</sub> (-0,681)	
	WC <sub>tallo</sub> (-0,651)	

Los coeficientes de correlación de Pearson ( $r$ ) de los parámetros bioquímicos (pH y contenido hormonal) frente a los parámetros de crecimiento ( $DW$ ) e hídricos (potencial hídrico y contenido de agua en los tejidos) se muestran en la [Tabla 2.3](#). La concentración en  $ABA$  del líquido xilemático de raíz presentó correlaciones significativas con todos los parámetros de crecimiento y contenido de agua en los tejidos, mientras que la concentración de  $ABA$  en el xilema de tallo mostró correlaciones significativas principalmente con los parámetros hídricos. Con respecto al resto de parámetros hormonales, en raíz las  $CKs$  cuantificadas, especialmente la  $DHZ$ , presentó correlaciones con los parámetros de crecimiento e hídricos. En el caso de los valores de pH, existe una correlación significativa con el potencial hídrico, tanto en tallo como en raíz, y también con el  $DW$  y el contenido de agua en la raíz. Además, se observó una alta correlación entre el pH y las  $CKs$  detectadas en la raíz.

Los resultados obtenidos mediante el PCA mostraron 3 componentes principales que explicaron el 69,28 % de la varianza total: El primer componente, compuesto por la concentración de diferentes  $CKs$  de la raíz y el pH, explicó un 29,15 % de la varianza total; el segundo componente, formado por el  $ABA$  y el potencial hídrico, un 28,35 %; y finalmente, un tercer componente principal englobando el contenido de  $ABA$  en la raíz explicó un 11,79 % de la varianza total ([Tabla 2.4](#) y [Tabla 2.5](#)).

## 2.4 DISCUSIÓN

El estrés hídrico impuesto por el PEG es notablemente diferente del estrés hídrico que ocurre de manera natural en campo. El PEG permite la imposición de un estrés hídrico rápido, interpretado por la planta como un estímulo instantáneo, más que un estímulo natural a largo plazo. De esta manera, el sistema experimental establecido, mediante cultivo hidropónico en presencia de PEG, puede ser usado para estudiar los mecanismos iniciados por la privación de agua en el momento preciso en que ésta es detectada por las raíces de las plantas del clon C14, permitiendo la observación de las respuestas tempranas de la planta, a las pocas horas de la inducción del estrés.

El principal riesgo del uso de la combinación de cultivo hidropónico y un agente osmótico para simular una condición de sequía es la posibilidad de generar un choque osmótico debido a cambios bruscos del potencial osmótico de la solución de cultivo (Chefdor *et al.*, 2006). Una manera de evitar esto es usar un gradiente en etapas (Erdei *et al.*, 2002; Guóth *et al.*, 2008); sin embargo, este tipo de inducción de estrés tiene dos grandes inconvenientes: consume demasiado tiempo y existe el riesgo de que cada «etapa» sea interpretada por la planta como estímulos separados. Esto hace que un gradiente en etapas sea posible para estudios a largo plazo, pero no permite profundizar en las respuestas tempranas y la señalización.

Con el gradiente propuesto en este sistema experimental se han tratado de evitar estos problemas y los resultados obtenidos sugieren que ha sido así: la falta de síntomas visuales de sequía durante el período de inducción del estrés y su aparición en los momentos de máxima demanda hidrológica, en el mediodía solar, indican una privación de agua en las plantas tratadas solamente después del período de inducción. En experimentos previos se observó que las plantas presentaban síntomas visuales de sequía permanente con antelación al usar gradientes más rápidos y si se sometían a potenciales osmóticos inferiores a -0.6 MPa los síntomas eran irreversibles, por lo que se hacía imposible prolongar el estudio del estrés hídrico más allá de las primeras horas de tratamiento.

A lo largo del período de inducción, las raíces de las plantas del clon C14 estresadas mostraron una reducción del contenido en agua, confirmando que el estrés afecta en primera instancia al sistema radical. Con las condiciones de alta humedad relativa mantenidas en el invernadero se aseguró que las respuestas presentadas en la parte aérea de las plantas estresadas se debieran por completo al estrés detectado en las raíces. La deshidratación de las raíces observada durante el período de inducción del estrés afectó al potencial hídrico de raíz y de tallo de las plantas del clon C14 estresadas, iniciándose un comportamiento diferencial entre tratamientos que se mantuvo a lo largo de todo el experimento. Los resultados obtenidos parecen indicar que en la fase del gradiente existen estímulos de estrés, pero no llegan a afectar a la parte aérea. El pH del líquido xilemático, considerado como una de las señales bioquímicas tempranas de estrés (Goodger *et al.*, 2005), se modificó en las raíces pero no en el líquido xilemático de tallo durante el período de inducción del estrés. Como el trabajo de Goodger *et al.* (2005) indica, en muchas especies vegetales se producen estas señales químicas previas a las señales hidráulicas, representando una «advertencia temprana» de la escasez de agua en el suelo. La correlación encontrada en este estudio entre el pH y los indicado-

res hídricos soportan esta hipótesis, mostrando un pH más alcalino en situaciones de escasez de agua.

Durante la fase de estrés constante, la alcalinización del xilema de tallo comenzó a las 3 h, y después de 6 h la diferencia con respecto a las plantas control ya estaba completamente establecida. Esta secuencia de tiempos coincide con varios procesos fisiológicos de las plantas del clon *C14* estresadas: a las 3 h el potencial hídrico de las raíces comienza a aumentar de manera constante, en valores absolutos. También en ese tiempo, la concentración de *ABA* en el xilema de raíz y de tallo comienza a separarse entre las plantas estresadas y control. A las 6 h es cuando se produce la máxima diferencia entre tratamientos en el potencial hídrico de las raíces, coincidiendo con el comienzo de las diferencias en *E*, *Gs*, *A* y *WUEi*.

Con respecto al *ABA*, se observó un incremento secuencial de su contenido: primero en el líquido xilemático de raíz a las 1,5 h del período de inducción del estrés, seguido de un aumento en el líquido xilemático de tallo (3 h de estrés constante) y, finalmente, en el segmento apical del tallo (12 h). Aunque no se detectó un aumento de *ABA* en el ápice de raíz tan grande como los detectados por otros autores (*Hartung et al., 2002*), la secuencia observada sugiere la existencia de síntesis *de novo* en las raíces de las plantas del clon *C14* y un transporte de esta fitohormona a través del xilema. Sin embargo, a partir de los datos obtenidos no se pueden descartar los efectos de la síntesis local de *ABA* y el reciclaje floemático (*Dodd, 2005*), pero los datos concuerdan con las propuestas de otros autores de que el *ABA* en el líquido xilemático puede aumentar como resultado de una reducción de la disponibilidad de agua en las raíces, antes de que se aprecien síntomas de estrés en la parte aérea (ver *Wilkinson & Davies (2002)* para más detalles).

El incremento de los niveles de *ABA* en el líquido xilemático de las plantas de *E. globulus* cultivadas en presencia de *PEG* ocurre al mismo tiempo que la reducción de la *E* y la *Gs*, pero el pico de *ABA* en el ápice de tallo es posterior a esta disminución de los parámetros fotosintéticos. Estos resultados parecen indicar que en las primeras fases del estrés, las plantas del clon *C14* responden al contenido de *ABA* en el xilema, más que a la concentración de éste en los tejidos. Esto se corresponde con el papel externo descrito para el *ABA*, donde su acción se ha demostrado que es debida a su transporte por el xilema más que a su acumulación en las hojas (*Jia & Zhang, 1999; Acharya & Assmann, 2009*). La correlación significativa entre la concentración del *ABA* xilemático en raíz con los parámetros de crecimiento e hídricos concuerda con esta hipótesis.

Por otro lado, aunque el *ABA* es considerado como la principal fitohormona responsable de la coordinación de las respuestas al estrés en las plantas (*Wilkinson & Davies, 2002*) y la principal molécula señalizadora a larga distancia en plantas sometidas a sequía (*Sauter et al., 2001*), las *CKs* también parecen estar implicadas en estos procesos. *Ghanem et al. (2008)* documentaron una modificación en el cociente raíz/tallo de la concentración de *CKs* en plantas sometidas a estrés y *Kudoyarova et al. (2007)* han sugerido un papel de estas fitohormonas como moléculas señalizadoras en la vía raíz-tallo similar a lo que ocurre en otro tipo de estreses, como el déficit de nitrógeno (*Rahayu et al., 2005*).

En el trabajo presentado en este capítulo, la dinámica general mostrada por la mayoría de las *CKs* durante el experimento fue de descenso en sus niveles, siendo éste

mayor en las plantas del clon C<sub>14</sub> cultivadas en presencia de PEG. Esta reducción del contenido en CKs en los tejidos sometidos a estrés concuerda con el comportamiento general de este grupo de compuestos en plantas bajo déficit hídrico (Hare *et al.*, 1997). No obstante, las diferencias entre tratamientos solo fueron significativas para las CKs medidas en raíz, exceptuando la Z y la RZ, y además mostraron correlaciones significativas con los parámetros de crecimiento e hídricos en las raíces, y con el pH tanto en la parte aérea como en la radical.

Las CKs de tipo DHZ parecen ser las principales responsables de este comportamiento, debido a su estabilidad en ambientes oxidativos (Moncaleán *et al.*, 2003), y son las que podrían estar implicadas en el retraso de la diferenciación de los meristemas radicales y por tanto, en el incremento de la relación raíces/parte aérea (de Ollas *et al.*, 2014). La ausencia de diferencias entre tratamientos en el contenido en CKs en la parte aérea hace que, al menos durante el período de estrés analizado, no se pueda atribuir a estas fitohormonas una función señalizadora de raíz a tallo en *E. globulus*. Sin embargo, puede que tengan ese papel a largo plazo en relación a respuestas de tipo adaptativo tales como la reducción del crecimiento foliar (Acharya & Assmann, 2009). La correlación tan alta observada entre el contenido de CKs en la raíz y el crecimiento de la misma, así como el hecho de que en el PCA el primer componente extraído lo componían las CKs presentes en la raíz y el pH, aportando más de un cuarto de la variabilidad total, lleva a reforzar la idea de que estas fitohormonas tienen un papel principal en la regulación de la raíz bajo condiciones de sequía. Este papel puede estar relacionado con la protección de las células de la raíz contra el daño producido por los estreses hídrico y osmótico, tal y como proponen Wang *et al.* (2008), y también con el incremento del crecimiento de la raíz bajo estas condiciones, como sugieren Arkhipova *et al.* (2007).

Las correlaciones entre las hormonas analizadas indican una falta de comportamiento antagónico o sinérgico entre ellas durante la fase temprana del estrés. El cociente ABA/CKs, considerado una señal de estrés en otras especies (Pospíšilová *et al.*, 2000), no parece actuar como tal en la respuesta a corto plazo del clon C<sub>14</sub> de *E. globulus*, ya que no se encontraron diferencias en este cociente entre los tratamientos, así como suficientes correlaciones con los parámetros hídricos. Los datos del PCA indican que ambos tipos de hormonas, ABA y CKs, son importantes, pero que actúan de forma independiente sin relación entre ellas.

En conclusión, en este modelo de estrés rápido se evidencia una señalización química entre raíz y tallo mediada por el pH y el ABA, observándose un comportamiento específico en las dinámicas de estas dos señales químicas en la respuesta a corto plazo del clon C<sub>14</sub> de *E. globulus* tras la adición del PEG. El pH actúa como una señal temprana y posteriormente es el contenido en ABA del líquido xilemático el que se convierte en la señal principal. Las respuestas rápidas, tales como los cambios en la conductancia estomática y las relaciones hídricas se pueden relacionar con estas señales, así como con la divergencia en la dinámica del ABA entre las plantas estresadas y los controles. No se puede, sin embargo, excluir la posibilidad de que otros tipos de señales, como por ejemplo las CKs u otras señales químicas, estén reforzando o disminuyendo el efecto del ABA y el pH, así como actuando en procesos de adaptación a sequía donde estas otras señales pueden tener una implicación menor.

Mientras que los resultados obtenidos se limitan a procesos fisiológicos, se ha establecido la secuencia de señalización a larga distancia, así como el comportamiento inicial de *E. globulus* frente al estrés por sequía, que sirve de punto de partida con el que iniciar estudios moleculares y de relación fisiología-genética que permitan aumentar la base de conocimiento de las respuestas a corto plazo y la señalización de la sequía en esta especie, y, por tanto, en otros cultivos forestales.



## SELECCIÓN DE GENES DE REFERENCIA EN *E. GLOBULUS* PARA ENSAYOS DE ESTRÉS HÍDRICO SEVERO

---

### 3.1 INTRODUCCIÓN

La búsqueda de individuos o clones tolerantes a la sequía en especies forestales se ha convertido en una necesidad, siendo común la existencia de investigaciones dirigidas a mejorar la productividad en estos ambientes. Estos estudios incluyen planteamientos basados en técnicas moleculares, tales como los análisis de expresión génica (de Oliveira *et al.*, 2012), ya que el conocimiento de las bases genéticas que dirigen estas respuestas puede ayudar a comprender cómo funciona la resistencia a sequía. Un problema asociado a la selección de clones tolerantes es la limitación de la productividad que suele acompañar a los rasgos de tolerancia a sequía expresados por estos clones. Así, se hace necesario profundizar aún más en este tipo de estudios con el fin de discriminar qué respuestas permiten aumentar la resistencia y reducir en un grado mínimo la productividad.

Parámetros fisiológicos como la  $G_s$ , el pH xilemático, el balance hormonal o procesos de naturaleza mecánica se usan como evaluadores de tolerancia en los estudios clonales (Pita & Pardos, 2001; Correia *et al.*, 2014), aunque en los últimos años el uso de marcadores moleculares se ha ido extendiendo cada vez más (Bartholomé *et al.*, 2013; Graziani *et al.*, 2014). En este caso es necesario relacionar los procesos fisiológicos con los niveles de expresión de los marcadores candidatos, así como su comportamiento en diferentes situaciones para poder seleccionar aquellos que presenten una mayor capacidad de discriminación en las condiciones ambientales elegidas y obtener así genes específicos relacionados con el estrés hídrico que puedan ser utilizados para estimar el grado de tolerancia de las plantas a analizar. Para llevar a cabo este tipo de estudios una de las técnicas más usadas globalmente es la Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa con Transcripción Reversa (RT-qPCR). Esta técnica se basa en la determinación de los niveles de expresión de los genes diana en comparación con genes expresados constitutivamente en las condiciones del ensayo. La expresión de estos genes, denominados Genes de Referencia (HKG), debe ser estable durante el tratamiento que se estudia, algo que frecuentemente se asume sin comprobación.

El éxito de la detección de clones resistentes a sequía mediante los niveles de expresión de genes relacionados con el estrés se basa en la elección de genes de referencia adecuados, capaces de mantener una expresión estable bajo las condiciones experimentales específicas y en los tejidos estudiados (Paolacci *et al.*, 2009). Una lista actualizada con los HKG más comunes empleados en estudios de expresión génica en plantas, que incluye, entre otros, la actina, la tubulina, la Gliceraldehído-3-fosfato Deshidrogenasa (GAPDH) y el Factor de Elongación  $1-\alpha$  (EF1 $\alpha$ ) ha sido proporcionada por de Oliveira *et al.* (2012). Estos mismos autores indican el poco esfuerzo de investigación destina-



do a la validación de la estabilidad de la expresión de estos HKG en los últimos años, iniciando un estudio extenso realizado específicamente en *Eucalyptus*, dada la reciente disponibilidad de los datos de su transcriptoma y genoma que podría aumentar el número de ensayos de expresión en estas especies. Sin embargo, existen todavía lagunas de información en relación a los tejidos radicales y a tipos de cultivo alternativos, como el hidropónico, en este género.

Por ello, establecido un sistema experimental que permite evaluar la respuesta rápida al estrés hídrico (Capítulo 2 y Granda *et al.*, 2011) y definida a nivel fisiológico la secuencia de acontecimientos que ocurre tras un estrés localizado y severo el siguiente paso es completar el estudio del estrés hídrico en *E. globulus* determinando el perfil de expresión de genes relacionados con las respuestas a estrés en esta especie. Previo a esta determinación, en este capítulo se describe la selección y validación de los genes de referencia más adecuados para el sistema experimental propuesto, tanto en tejidos de raíz como en tejidos de tallo, completando los huecos existentes en el establecimiento de HKG para una amplia diversidad de ensayos en *Eucalyptus*, mediante el ensayo de 14 candidatos a HKG: Actina 11 (*ACT11*), Actina 2 (*ACT2*), Ciclofilina (*CYP*), Ciclofilina 2 (*CYP2*),  $\alpha$ -Tubulina (*TUA*),  $\alpha$ -Tubulina 2 (*TUA2*),  $\beta$ -Tubulina (*TUB*), Ubiquitina (*UBQ*), *EF1 $\alpha$* , Factor de Elongación 1- $\beta$  (*EF1 $\beta$* ), RNA 18S (*18S*), Proteína Ribosomal L2 (*L2*), Adenina Fosforibosil Transferasa (*APRT*) y *GAPDH*.

### 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.2.1 Material vegetal, condiciones experimentales y extracción de RNA

En el ensayo se utilizaron esquejes enraizados de un año del clon *C14* de *E. globulus*, aclimatados a las condiciones de cultivo hidropónico, tal y como se detalla en Sección 2.2.1. Después de la aclimatación, se indujo un estrés hídrico a la mitad de las plantas, mediante la adición de PEG en un gradiente nocturno: se introdujo gradualmente una solución concentrada de PEG [38 % (v/v)] a flujo constante en las bandejas de cultivo, hasta que la solución de cultivo alcanzó un potencial osmótico de -0,6 MPa (ver detalles en la Figura 2.1). Al resto de plantas no se les añadió PEG y se mantuvieron hasta el fin del experimento en la solución nutritiva como controles sin déficit hídrico. Las regiones apicales de tallo y raíz de las plantas sometidas a los dos tratamientos se recogieron después de 0, 6, 12, 24 y 36 h desde el establecimiento del estrés constante (-0,6 MPa), congelándose inmediatamente en nitrógeno líquido, y se almacenaron a -80°C hasta su utilización en la extracción del RNA. Se utilizaron tres réplicas experimentales, cada una de las cuales incluyó tres réplicas biológicas para cada tiempo de muestreo.

A partir de 0,1 g de tejido congelado se purificó el RNA mediante el kit NucleoSpin RNA plant (Macherey-Nagel, Alemania). Posteriormente, partiendo de 1  $\mu$ g del RNA extraído, se sintetizó el Ácido Desoxirribonucleico Complementario (cDNA) necesario para llevar a cabo los análisis usando una transcriptasa inversa (MultiScribe Reverse transcriptase, Invitrogen, Estados Unidos). El cDNA resultante se almacenó a -20°C hasta su uso en los análisis de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Tabla 3.1: Descripción de los genes de *Eucalyptus* y los cebadores utilizados, incluyendo los genes de referencia seleccionados en base a la bibliografía y los genes de comprobación. \*: Todas las secuencias de *Eucalyptus* son EST, y han sido nombrados basándose en su similitud con las proteínas de *Arabidopsis* establecidas vía BLASTx (Altschul et al., 1997). En la mayoría de los casos, los nombres solo indican una familia o subfamilia génica, más que un miembro específico de ésta, debido a que las secuencias parciales de *Eucalyptus* y el BLAST no identifican necesariamente al ortólogo putativo de *Arabidopsis*; \*\*: Homólogo de *Arabidopsis* más cercano, identificado mediante Tair BLAST 2.0 (<http://www.arabidopsis.org/Blast/>). Las secuencias nucleotídicas de *Eucalyptus* se enfrentaron con la base de datos de proteínas AGI utilizando BLASTx, o, como en el caso del 18S, con la base de datos del genoma de *Arabidopsis* mediante BLASTn; <sup>a</sup> Fuente Brunner et al. (2004); <sup>b</sup> Fuente Nicot et al. (2005).

NOMBRE*	Nº ACCESO GENBANK / ESPECIES	LOCUS HOMÓLOGO / ESPECIES	BLAST SCORE / VALOR E	<i>arabidopsis</i> LOCUS** / DESCRIPCIÓN	SECUENCIAS DE cebadores (FORWARD / REVERSE)
ACT11 <sup>a</sup>	ES595007.1 / <i>E. globulus</i>	CA824001 / <i>Populus trichocarpa</i> x <i>Populus deltoides</i>	668 / 0.0	AT3G12110 / Actin 11	TCACTGAGCGTGGTTACTCG / GCTCATAGTCCAAGGGCAA
ACT2 <sup>a</sup>	ES590532.1 / <i>E. globulus</i>	BU879695 / <i>P. trichocarpa</i>	610 / 7·10 <sup>-179</sup>	AT5G09810 / Actin 2/7	CCATGTACGTTGCAATCCAG / AGTGGAACTCCACCATCAC
CYP2 <sup>a</sup>	ES590754.1 / <i>E. globulus</i>	BU875027 / <i>P. trichocarpa</i>	414 / 1·10 <sup>-119</sup>	AT2G21130 / Cyclophilin 2	GATCTCAGTCGTTTCGAGCA / CGACACAGATGAGAGGACCA
TUA <sup>a</sup>	ES594405.1 / <i>E. globulus</i>	CA822230 / <i>P. trichocarpa</i> x <i>P. deltoides</i>	461 / 8·10 <sup>-134</sup>	AT5G19780 / Tubulin $\alpha$ 3/ $\alpha$ 5 chain	AGCTCTACTGCCTGGAGCAC / GCTCTAGGCACATGCTTTCC
TUA2	ES596313.1 / <i>E. globulus</i>	CA825391 / <i>P. trichocarpa</i> x <i>P. deltoides</i>	264 / 1·10 <sup>-74</sup>		CTTACCCGCCAGCTCTTTTCAC / GATCCACGATCTCCTTTCCA
TUB <sup>b</sup>	ES596313.1 / <i>E. globulus</i>	CA824237 / <i>P. trichocarpa</i> x <i>P. deltoides</i>	407 / 1·10 <sup>-117</sup>	AT4G20890 / Tubulin $\beta$ 9 chain	TGGAGAATGCTGATGAGTGC / CAAATCGCCAAAGCTAGGAG
UBQ <sup>a</sup>	ES590561.1 / <i>E. globulus</i>	BU879229 / <i>P. trichocarpa</i>	733 / 0.0	AT4G05050 / Polyubiquitin 11	TCACCTTGTCTCCGCTTTC / GATCTGGCCCTTGACGTTGT
EF1 $\beta$ <sup>a</sup>	CT987794.1 / <i>E. gunni</i>	BI125345 / <i>P. tremula</i> x <i>P. tremuloides</i>	316 / 1·10 <sup>-90</sup>	AT2G18110 / Elongation factor 1 $\beta$ (putative)	TTACTCGCAITCCATGCTG / CAACACGTCCACCAACAACAA
18S <sup>a</sup>	CT982123.1 / <i>E. gunni</i>	AF206999 / <i>P. tremuloides</i>	1349 / 0.0	18RRNA / 18S Ribosomal RNA	CTAATAAGCTGGCCGTGGAG / ATGGCCGTTCTTAGTTGGTG
EF1 $\alpha$ <sup>b</sup>	ES596656.1 / <i>E. globulus</i>	AB061263 / <i>Solanum tuberosum</i>	955 / 0.0	- / Elongation factor 1 $\alpha$	TCGTGAACATGCTCTCCCTG / TGGTGGCAITCCATCTGTTA
L2 <sup>b</sup>	ES593077.1 / <i>E. globulus</i>	39816659 / <i>S. tuberosum</i>	504 / 9·10 <sup>-147</sup>	- / Ribosomal protein L2	GCAGGTGGAGGTAGGACTGA / TTGCCACACCACGTAACCTTA
aprt <sup>b</sup>	ES592951.1 / <i>E. globulus</i>	CK270447 / <i>S. tuberosum</i>	452 / 6·10 <sup>-131</sup>		TAAAGGGTCGAGATCGGTTG / TTGGTGTTCACGGCTACTG
CYP <sup>b</sup>	CD669032.1 / <i>E. tereticornis</i>	AF126551 / <i>S. tuberosum</i>	201 / 7·10 <sup>-56</sup>	AY054468.1 / Cyclophilin	GGCCAGCTTTCCTAGATCG / GGAAACGGACTGGAGATCAG
GAPDH	ES592814.1 / <i>E. globulus</i>	ABK96725.1 / <i>P. trichocarpa</i> x <i>P. deltoides</i>	1182 / 0.0	- / Glycerinaldehido 3 Phosphate Deshydrogenase	GGAGTCAATGCCGACCTCTA / ATGATGCCGAACCTCTGGTC
STS-like	-	-	-	-	TCAACACCTTCAAGCTGCTG / TCCTTCGACGAACTCCTGAAC
XDH	-	-	-	- / Xanthine Dehydrogenase	-

### 3.2.2 Selección de HKG y diseño de cebadores

En base a los trabajos publicados sobre el uso de HKG en plantas (Brunner *et al.*, 2004; Nicot *et al.*, 2005) se seleccionaron 14 candidatos a HKG, y se obtuvieron las secuencias homólogas para *Eucalyptus* spp. mediante la base de datos de EST del GeneBank (Tabla 3.1). Los cebadores para estas 14 secuencias se diseñaron usando el programa informático Primer3Plus (Untergasser *et al.*, 2007), seleccionándolos en base a tres criterios principales:

- A. Un contenido en Guanina-Citosina del  $50 \pm 5$  %.
- B. Una temperatura de fusión ( $T_m$ ) de  $60 \pm 5$  °C.
- C. Longitud de los cebadores entre 18 y 27 bases.

La calidad de los cebadores obtenidos se comprobó mediante protocolos estándar de PCR y RT-qPCR. Para las reacciones de PCR se usó la polimerasa DreamTaq (Fermentas, Estados Unidos) según el protocolo descrito a continuación: 3 min a 94°C, seguido de 34 ciclos de 45 s a 94°C, 30 s a 55,5°C y 20 s a 72°C, y un paso final de 5 min a 72°C. En cuanto a las reacciones de RT-qPCR, se usó el kit KapaSybr Fast qPCR (KapaBiosystems, Estados Unidos) con las siguientes condiciones: 20 s a 95°C seguido de 50 ciclos de 1 s a 95°C, 20 s a 60°C y 20 s a 70°C. Una vez obtenidos los productos de las reacciones, éstos se comprobaron mediante geles de agarosa al 1 %, buscando bandas dobles o «rastros» (*smears*) indicativos de mal funcionamiento de la reacción. Aquellos cebadores que presentaron alguno de estos síntomas se rediseñaron y probaron de nuevo hasta obtener finalmente los usados en este capítulo (Tabla 3.1). Todas las reacciones de comprobación se llevaron a cabo en un termociclador MyCicle PCR (BioRad, Estados Unidos).

### 3.2.3 RT-qPCR y tratamiento de los datos

Los análisis de RT-qPCR se realizaron en un sistema ABI PRISMA HT7900 Real Time PCR (Applied Biosystems, Estados Unidos), usando el kit KapaSybr Fast qPCR, en las mismas condiciones que para la comprobación de los cebadores (Sección 3.2.2). Los datos brutos obtenidos se analizaron mediante el programa informático LinReg 11.0 (Ruijter *et al.*, 2009) con el fin de obtener el valor  $N_0$  para cada HKG en cada tiempo de muestreo. Los valores de  $N_0$  se usaron para estimar la mejor pareja de HKG para cada tejido usando dos algoritmos estadísticos distintos, NormFinder (Andersen *et al.*, 2004) y GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002).

Los HKG más estables para tallo y raíz se utilizaron para el análisis de dos genes presumiblemente afectados por el estrés hídrico, Estaquirosa Sintasa-like (*STS-like*) y Xantina Deshidrogenasa (*XDH*) (Yesbergenova *et al.*, 2005; Meng *et al.*, 2008). Para analizar los datos obtenidos se usó el programa informático RQ Manager (Applied Biosystems, Estados Unidos), usando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001). Los niveles de expresión de estos genes en las plantas control a las 0 h del establecimiento del estrés constante se usaron como referencia, y se llevaron a cabo tres réplicas experimentales para obtener la expresión relativa de los genes analizados. La expresión relativa en las

condiciones contrastantes de estrés y control se analizó mediante un ANOVA de dos vías usando el programa estadístico R (R Core Team, 2012).

Tabla 3.2: Comparación de los patrones de expresión y los valores de estabilidad de los HKG propuestos. \*: Cambios en el patrón de expresión entre los tratamientos (control y estrés). 0 indica ausencia de cambios en el patrón, mientras que 1 indica presencia de cambios en el patrón de expresión. NA indica falta de amplificación para estos genes en el tejido indicado.

HKG	TALLO			RAÍZ		
	CAMBIOS*	GENORM	NORMFINDER	CAMBIOS*	GENORM	NORMFINDER
ACT11	NA	NA	NA	1	1,970	0,547
ACT2	NA	NA	NA	1	1,388	0,235
CYP2	NA	NA	NA	1	1,934	0,526
TUA	1	2,361	1,705	0	1,854	0,487
TUA2	0	0,252	0,364	0	1,512	0,302
TUB	1	1,391	0,965	0	1,372	0,185
UBQ	NA	NA	NA	0	1,570	0,299
EF1 $\beta$	1	0,515	0,058	0	1,832	0,469
18S	0	0,360	0,510	0	2,209	0,502
EF1 $\alpha$	0	0,291	0,350	0	1,607	0,337
L2	0	0,453	0,147	0	1,300	0,168
aprt	1	0,615	0,105	0	1,550	0,235
CYP	0	0,575	0,290	0	1,239	0,074
GAPDH	0	0,252	0,366	NA	NA	NA

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Amplificación de los HKG

Los cebadores de los 14 candidatos a HKG se comprobaron mediante PCR estándar, tanto en tallo como en raíz de las plantas del clon C14. En tallo, para ACT11, ACT2, CYP2 y UBQ se probaron varios diseños, sin ningún resultado positivo en la amplificación para ninguno de ellos. En raíz, la GAPDH no presentó amplificación, independientemente de los diferentes diseños de cebadores (Tabla 3.2). Los genes que no presentaron amplificación no se usaron para la selección de las parejas de HKG óptimas en ese tejido.

#### 3.3.2 Selección de los HKG

Los análisis de expresión de los candidatos a HKG se realizaron mediante ensayos de RT-qPCR. Los valores de estabilidad se obtuvieron a través de NormFinder y GeNorm (Tabla 3.2) y también se observaron los cambios en el patrón de expresión de los HKG

en función del tratamiento (Figura 3.1). Estos resultados indicaron que *TUA2* (0,252 y 0,364 para GeNorm y NormFinder, respectivamente) y *GAPDH* (0,252 y 0,366) fueron los dos mejores *HKG* en tallo, mientras que *L2* (1,300 y 0,168) y *CYP* (1,239 y 0,074) mostraron los mejores resultados en raíz.

Tabla 3.3: Resultados del ANOVA para los genes de comprobación. \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*:  $p < 0,05$

GEN		F	SIGNIFICANCIA
<i>XDH<sub>tallo</sub></i>	Tratamiento	0,090	
	Tiempo	6,825	*
	Interacción	6,057	*
<i>STS<sub>tallo</sub></i>	Tratamiento	16,497	***
	Tiempo	3,301	
	Interacción	3,327	
<i>STS<sub>raíz</sub></i>	Tratamiento	2,848	
	Tiempo	1,949	
	Interacción	0,235	

### 3.3.3 Genes de estrés y niveles de expresión

Dos genes presumiblemente afectados por el estrés, *STS-like* y *XDH*, fueron analizados utilizando las parejas de *HKG* propuestas para tallo y raíz. Las dinámicas de expresión de estos dos genes se muestran en la Figura 3.2. La expresión de *STS-like* mostró diferencias significativas entre los tratamientos en el tallo, sobre-expresándose en las plantas de *E. globulus* sometidas a estrés hídrico, mientras que en raíz no se observaron diferencias significativas (Tabla 3.3). Por otro lado, los niveles de expresión de la *XDH* solo se detectaron en tallo y no presentaron diferencias significativas entre tratamientos, aunque sí en función del tiempo de estrés así como de la interacción entre ambos (Tabla 3.3), ya que las plantas cultivadas en presencia de *PEG* mostraron un descenso en la expresión de *XDH* después de 36 h de estrés constante.

## 3.4 DISCUSIÓN

Los *HKG* de uso general son ampliamente utilizados en los análisis cuantitativos de expresión. Sin embargo, en los últimos años, un número cada vez mayor de estudios indican que los genes de referencia empleados comúnmente podrían no ser los adecuados para ciertas especies, o cuando se consideran determinados estados de desarrollo de las plantas, diferentes tejidos o factores ambientales como los estreses abióticos (Moura *et al.*, 2012). En este ensayo, a partir de un amplio número de *HKG* conocidos se han obtenido dos parejas diferentes de *HKG* estables en el mismo sistema experimental (respuesta a sequía) en los tejidos estudiados (tallo y raíz). Esto indica la importancia

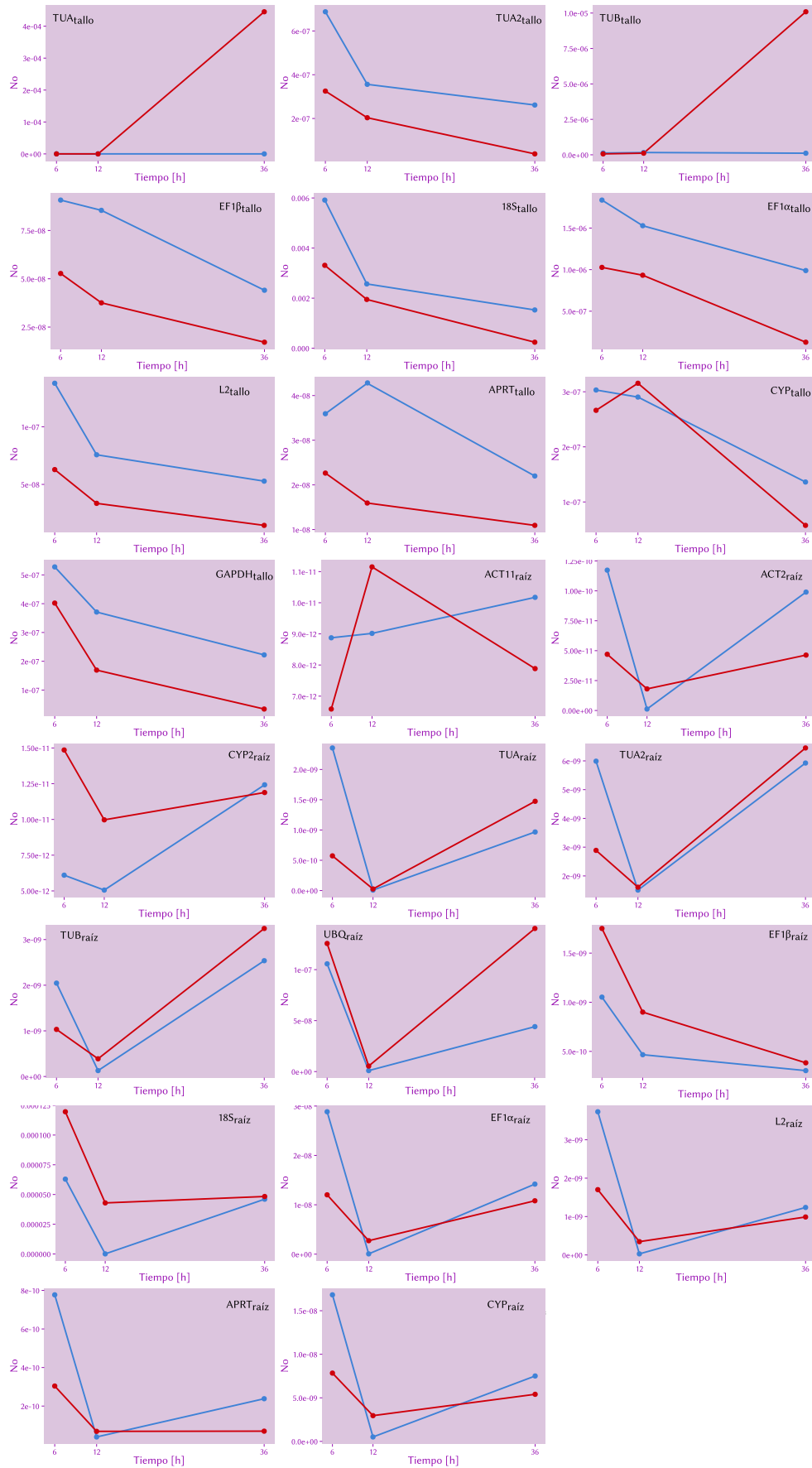


Figura 3.1: Niveles de expresión de los HKG candidatos en el tallo y la raíz del clon *C14* durante la fase de estrés constante. En rojo se indica el tratamiento de sequía y en azul el tratamiento control. Se representan los valores medios sin error.

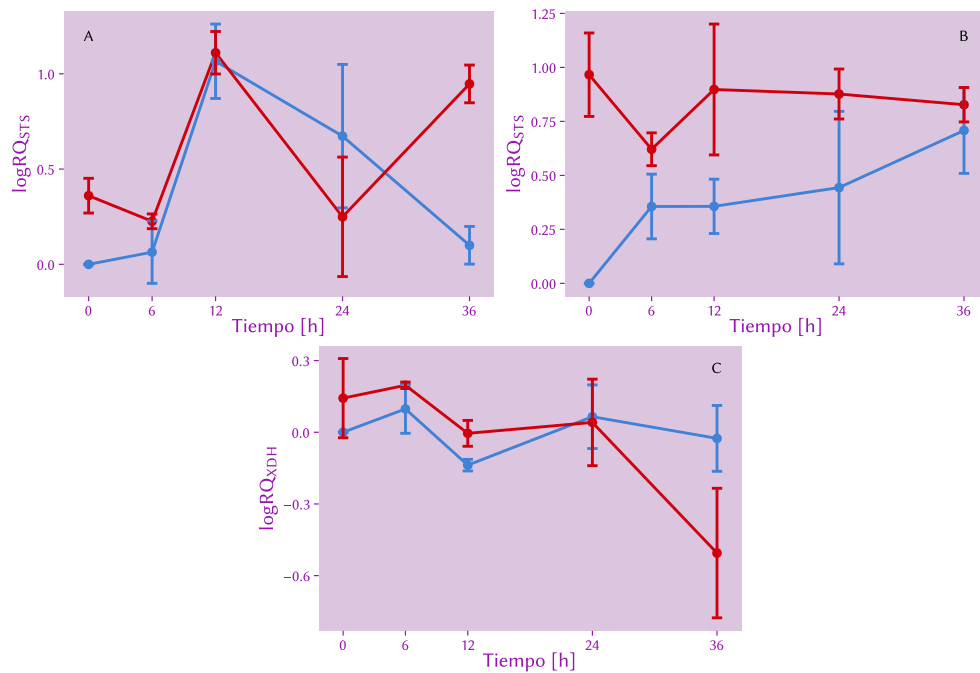


Figura 3.2: Niveles de expresión normalizados de (A) STS en raíz, (B) STS en tallo y (C) XDH en tallo obtenidos en la RT-qPCR durante la fase de estrés constante. En rojo se indica el tratamiento de sequía y en azul el tratamiento control. Las barras representan el error estándar de las réplicas biológicas ( $n = 3$ ).

de la validación previa de los genes de referencia, ya que una correcta selección de éstos es un paso clave en la mejora de la cuantificación de la expresión de los genes de interés. Las respuestas de las plantas a estímulos o diversos estreses son generalmente dependientes del tejido provocando diferencias generales en los patrones de expresión, incluso de genes considerados «constitutivos», lo que implica que usar el mismo gen de referencia para el análisis de los dos tejidos utilizados en este estudio puede llevar a estimar erróneamente los niveles de transcripción y las dinámicas de los genes de interés. Esto ocurre también en diferentes tipos de cultivo o en diferentes estados de desarrollo.

En tallo, los dos HKG más estables fueron *TUA2* y *GAPDH*. *TUA2* pertenece al grupo de las  $\alpha$ -tubulinas, una familia multigénica que compone por sí sola la mayor parte de los microtúbulos celulares, siendo considerados sus productos proteínas estructurales, una característica común a muchos HKG (actina, ubiquitina...). La primera familia de genes de  $\alpha$ -tubulinas en *Arabidopsis* fue descrita por Ludwig *et al.* (1987), comprobando que los diversos genes de la familia tenían una expresión específica de tejido, así como una expresión constitutiva en todos los tejidos estudiados. De hecho han sido utilizadas como genes de referencia para evaluar estreses abióticos en diversos trabajos (Seki *et al.*, 2001). En este ensayo se probaron dos isoformas del gen TUA, *TUA* y *TUA2*, siendo esta última la más estable bajo las condiciones experimentales ensayadas, similar a lo establecido por Oakley *et al.* (2007) en chopo (*Populus*). El otro HKG seleccionado en tallo fue la *GAPDH*, un gen que codifica para una proteína relacionada principalmente con la glicólisis y el ciclo de fijación de carbono, pese a que cada vez están apareciendo más funciones para esta proteína (Tristan *et al.*, 2011). La *GAPDH* también ha sido usada

como gen de referencia en diversos sistemas experimentales (Suzuki *et al.*, 2000; Nicot *et al.*, 2005).

En contraste con otros estudios recientes en *Eucalyptus* (Moura *et al.*, 2012), la *GAPDH* presentó valores más estables que genes como la *UBQ* o los dos tipos de actinas (*ACT11* y *ACT2*), indicando que diferentes estados de desarrollo o diferentes tipos de inducción de estrés afectan en la selección de los *HKG* óptimos para un ensayo específico.

En la raíz fueron la *L2* y la *CYP* los genes que mostraron mejores resultados. La *L2* es conocida por su papel en la asociación de las subunidades ribosomales (Diedrich *et al.*, 2000) y ha sido usada como gen de referencia en especies de solanáceas (*Solanaceae*) tales como patata o tomate (Nicot *et al.*, 2005; Løvdaal & Lillo, 2009). Por otro lado, la familia de las ciclofilinas está presente en todos los compartimentos celulares y las proteínas *CYP* están implicadas en numerosos procesos celulares como el procesamiento del *RNA*, translocación de proteínas y señalización de receptores, entre otras (Romano *et al.*, 2004). De hecho, los genes de la familia de las ciclofilinas han sido usados como *HKG* en diversos estudios relacionados con el estrés por frío y otros estreses abióticos, incluyendo ensayos en *Eucalyptus* (Boava *et al.*, 2010).

Dentro del género *Eucalyptus* se han llevado a cabo estudios con el fin de establecer *HKG* adecuados para un amplio rango de sistemas experimentales, tejidos y especies. de Almeida *et al.* (2010) establecieron *HKG* para cultivo *in vitro* durante la generación de raíces adventicias en *E. globulus*. Boava *et al.* (2010) identificaron *HKG* válidos para el estudio de estreses abióticos y bióticos en plántulas de clones de *Eucalyptus*, analizando las mejores parejas de *HKG* para cuatro situaciones diferentes, obteniendo la *CYP*, la *UBQ* y diferentes factores de elongación como los genes más estables, en función de la situación ensayada. Por otro lado de Oliveira *et al.* (2012), en un amplio estudio, establecieron tres nuevos *HKG* para especies de *Eucalyptus* (*E. grandis*, *E. globulus* y *E. urophylla*) en xilema, hojas y flores de individuos adultos crecidos en campo, ninguno de ellos usado anteriormente. Sin embargo, los mismos autores indican la estabilidad de genes como la *GAPDH* y la *TUA2*, aunque no sean los más adecuados en sus condiciones. No obstante, ninguno de estos estudios incluyó raíces en sus ensayos, ni tampoco el cultivo hidropónico ha sido incluido como posible sistema experimental, lo que permite a los resultados obtenidos en este ensayo ampliar la información de *HKG* disponibles para este género, proponiendo un gen nuevo en eucalipto para raíces (*L2*), y confirmando la estabilidad en este sistema de otros *HKG* más conocidos, como son la *CYP*, la *TUA2* y la *GAPDH*.

El hecho de que exista diferencia entre los *HKG* seleccionados en tallo y en raíz no supone una sorpresa. Las condiciones experimentales aplicadas para el establecimiento del estrés hídrico (cultivo hidropónico) implican unas diferencias enormes en cómo experimentan y responden al estrés impuesto los tejidos de la parte aérea y la parte radical (ver Capítulo 2). En este sistema experimental son las raíces las que están sometidas a un estrés real, mientras que la parte aérea de las plantas responde bajo señalización, sin estar sometida realmente a estrés hídrico, definiendo dos procesos completamente diferentes. Es, por tanto, comprensible que los tejidos de raíz presenten un metabolismo oxidativo elevado, mientras que los tejidos aéreos están sometidos a unas condiciones metabólicas más estables en las que genes como la *TUA2* (proteí-



na estructural) o la *GAPDH* (enzima involucrada en el metabolismo general) pueden permanecer en niveles de expresión constitutiva, al menos a corto plazo (de 0 a 36 h).

Los *HKG* seleccionados en cada tejido fueron utilizados para el establecimiento de la dinámica de dos genes implicados en estrés hídrico, *STS-like* y *XDH*. En la dinámica de la *STS-like* se puede observar que se produce una sobreexpresión de este gen solamente en tallo. Estos niveles de expresión en los tejidos aéreos del clon *C14* puede estar asociada con el papel protector de la estaquiosa en la adaptación a frío y sequía (Meng *et al.*, 2008), una de las moléculas osmoprotectantes relacionadas con la tolerancia a estos estreses. En el caso de la *XDH*, su expresión solo fue detectada en tallo, reduciéndose en las plantas estresadas tras 36 h de estrés constante. Teniendo en cuenta el papel de esta enzima en la síntesis de *ABA*, así como la comparación con las dinámicas de esta hormona observadas (ver Figura 2.6 en el Capítulo 2), se puede hipotetizar que este descenso en la expresión de *XDH* se corresponde con la ausencia de un incremento en el contenido de *ABA*. Tanto la *XDH* en tallo como la *STS-like* en raíz no se vieron inmediatamente afectados por las condiciones de estrés, al menos durante el período inicial de 36 h.

En este capítulo se demuestra la importancia de la validación de genes de referencia apropiados, específica para cada sistema experimental utilizado. Con las dos parejas de *HKG* propuestos, los ensayos en cultivo hidropónico y el tejido radical quedan cubiertos en el estudio de *E. globulus*.

## DINÁMICAS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN ESTRÉS HÍDRICO Y SU RELACIÓN CON LA SEÑALIZACIÓN HORMONAL TEMPRANA EN *E. GLOBULUS*

---

### 4.1 INTRODUCCIÓN

En los últimos años la información genómica y molecular del género *Eucalyptus* se ha incrementado notablemente. Los esfuerzos en este campo incluyen la secuenciación completa de genomas, como en *E. grandis* (Myburg *et al.*, 2014), el estudio proteómico (Bedon *et al.*, 2011; Valdés *et al.*, 2013) y las relaciones entre genética y calidad de madera (Stackpole *et al.*, 2011; Freeman *et al.*, 2013). En este género, los principales focos de investigación molecular han sido la pared celular, el desarrollo del xilema o la composición de la madera, sin embargo, se desconoce mucha información sobre los mecanismos moleculares de respuesta a estrés hídrico y su relación con la señalización fisiológica. Completar la información disponible para las especies de *Eucalyptus* sobre las respuestas moleculares a sequía resulta especialmente importante en climas templados o mediterráneos, donde se usan plantaciones monoclonales de material mejorado de estas especies para maximizar el rendimiento (Forrester *et al.*, 2010). Estas plantaciones monoespecíficas son más susceptibles a cambios ambientales y estreses abióticos, siendo el estrés hídrico el que más afecta al desarrollo y establecimiento de las plantas. En estas situaciones, la selección y uso del material incorrecto puede llevar a la pérdida completa de la plantación (Tausz *et al.*, 2008; White *et al.*, 2009). La señalización a larga distancia raíz-tallo es un paso clave en la respuesta de los árboles en este tipo de ambientes y puede englobar tanto cambios en la conductancia hidráulica (Pou *et al.*, 2008), como cambios químicos (pH) y señalización bioquímica. El ABA es la principal hormona relacionada con los estreses abióticos, incluyendo el estrés hídrico. Los efectos inmediatos del ABA incluyen alteraciones fisiológicas (i.e cierre estomático) y moleculares (inducción o represión de la expresión génica). Los cambios en la expresión mediados por ABA engloban dos grandes grupos de productos génicos:

1. Proteínas funcionales involucradas en la protección celular frente a la pérdida de agua.
2. Proteínas reguladoras tales como factores de transcripción involucrados en la regulación de la transducción de la señal y de la expresión de genes afectados por el estrés.

Por otro lado, las CKs también pueden afectar a las respuestas mostradas por las plantas durante una situación de privación de agua. Estudios recientes apuntan a un posible papel de estas fitohormonas como reguladores negativos en el estrés hídrico (Nishiyama *et al.*, 2011, 2012), además de la existencia de relaciones entre la cascada de

señalización y los genes activados por ABA y aquellos regulados por CKs (Kudoyarova *et al.*, 2007).

Pese a que las especies de *Eucalyptus* se incluyen entre aquellas con mayor superficie de plantación entre las especies forestales en la Península Ibérica, poco se conoce sobre los genes relacionados con sequía en este género. En este capítulo se presentan las dinámicas de seis genes relacionados con el estrés hídrico que se expresan diferencialmente en sequía en *E. globulus*:

- A. *NCED*
- B. *STS-like*
- C. Peroxidasa de Lignina 27 (*PX27*)
- D. Pleiotropic Drug Resistance-like (*PDR*)
- E. Celulosa Sintasa subunidad A (*CESA*)
- F. Histona Desacetilasa 6 (*HDA6*)

Los niveles de expresión de estos genes se han relacionado con las dinámicas hormonales analizadas en el [Capítulo 2](#) para poder establecer las relaciones entre la señalización temprana a sequía y los cambios en la expresión génica partiendo del mismo tejido.

## 4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.2.1 *Material vegetal y condiciones de estrés*

Tanto el material vegetal utilizado como la inducción del estrés hídrico fueron los mismos que los descritos en [Sección 2.2.1](#) y [Granda \*et al.\* \(2011\)](#), con modificaciones: en cada muestreo se recogieron tres plantas aleatoriamente de cada una de las tres réplicas experimentales establecidas, a las 0, 6, 12, 24 y 36 h del establecimiento de un estrés constante (-0,6 MPa).

### 4.2.2 *Contenido hormonal*

El ABA y las CKs totales se extrajeron y purificaron a partir de las regiones apicales de tallo y raíz tal y como se ha descrito en el [Capítulo 2](#). El contenido hormonal se cuantificó mediante ELISA. Para el ABA se utilizaron anticuerpos policlonales específicos de la forma libre del ABA ([Centeno & Granda, 2009](#)) siguiendo la metodología descrita por [Prado \*et al.\* \(2014\)](#). Anticuerpos policlonales específicos de CKs (iPA, RZ y RDHZ) ([Fernández \*et al.\*, 1995](#)) fueron utilizados para cuantificar estas fitohormonas y sus bases libres.

Tabla 4.1: Cebadores degenerados. <sup>a</sup>: Cebador degenerado amablemente cedido por Pérez *et al.* (2015). <sup>b</sup>: *STS-like* y *PX27* fueron obtenidos a partir de la misma pareja de cebadores degenerados. AT: Temperatura de anillamiento. EPL: Longitud esperada del producto en pares de bases.

GEN	CEBADOR DIRECTO	CEBADOR INVERSO	AT (°C)	EPL (PB)
<i>HDA6</i> <sup>a</sup>	ATCGGHRASCTACTAYTAYGGYCAA	ATCKCCATGGTGGACATC	51,0	495
<i>NCED</i>	TGACCCACCAGATTCCATHITTYAAYGA	TGGAGTCTATGAAAGTGCCATGRAANCCRTA	60,5	405
<i>PDR</i>	TGGGTGTTTCTGGAGCTGGNAARAYNAC	TGGGGAATGGATATCGTTTTGYTCRCARTA	62,0	99
<i>PX27</i> <sup>b</sup>	GGAAAAACAGGTGTCAGAGGNCCNAARSC	TCCAGTATATGAATCGCTTGCCRTAYTYTT	61,5	459
<i>STS-like</i> <sup>b</sup>	GGAAAAACAGGTGTCAGAGGNCCNAARSC	TCCAGTATATGAATCGCTTGCCRTAYTYTT	61,5	459

#### 4.2.3 Obtención e identificación de genes de interés relacionados con sequía

Los genes ensayados fueron seleccionados en base a la bibliografía disponible entre aquellos relacionados con las dinámicas hormonales, así como genes de estrés ya establecidos en un amplio rango de especies (Bray, 2002; Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Para poder obtener las secuencias de genes de interés relacionados con las respuestas fisiológicas a la sequía se diseñaron cebadores degenerados entre los dominios conservados de los genes que aparecen en la Tabla 4.1, usando el programa informático CODEHOP (Rose *et al.*, 2003).

Los productos de PCR obtenidos de la amplificación de los cebadores degenerados se aislaron mediante el kit de purificación de DNA de Macherey-Nagel (Macherey-Nagel, Alemania) y posteriormente se clonaron en el vector de clonación p-JET 1.2-Blunt (Thermo Fisher Scientific Inc. Estados Unidos). Los productos de la clonación se secuenciaron mediante un secuenciador ABI PRISM HT7900 Real Time PCR (Applied Biosystems, Estados Unidos). Para verificar la identidad de las secuencias obtenidas se llevó a cabo un análisis mediante Herramienta de Búsqueda de Alineamientos Locales Básicos (BLAST). Las secuencias así obtenidas y verificadas se tradujeron a secuencias de aminoácidos para generar árboles filogenéticos con la librería *phangorn* del software estadístico R (Schliep, 2011), mediante el método de máxima probabilidad y el modelo de distancia JTT. Los árboles filogenéticos se re-muestraron por el método *bootstrap* (n = 10000 iteraciones).

#### 4.2.4 PCR cuantitativa

Una vez secuenciadas y establecidas las secuencias en eucalipto, se diseñaron cebadores específicos para cada gen ensayado con el fin de poder llevar a cabo estudios de expresión cuantitativa. En la Tabla 4.2 se presentan los cebadores específicos obtenidos. Estos cebadores fueron diseñados usando el programa informático Primer3Plus (Untergasser *et al.*, 2007). A diferencia del resto, los cebadores para la *CESA* se diseñaron frente a la secuencia específica de eucalipto obtenida de la base de datos del NCBI (Número de acceso: AB 368175.1).

Tabla 4.2: Cebadores específicos. MT: Temperatura de fusión. EPL: Longitud esperada del producto en pares de bases.

GEN	CEBADOR DIRECTO	CEBADOR INVERSO	MT (°C)	EPL (PB)
<i>CESA</i>	CCCAGAGCTTTGCTACCTTG	AACAGAACCAAGTGCCCAAC	60,0	412
<i>HDA6</i>	AAACCTCTTGAGATGGCGAGAG	CTTCCACTCCGACGACTACG	60,0	91
<i>NCED</i>	CGGCGAAGTGAGCAGATTTTTG	TCACGAAGCTCATCAAGTACCC	60,5	116
<i>PDR</i>	GGATGTCCTTTGTGGGAGAA	TTGCTCGCAGTAACCAGAGA	59,8	112
<i>PX27</i>	AACTTACCAGCCGTTTTGG	ACCGGTGGATCCACTTTCTTC	59,7	90
<i>STS-like</i>	TCAACACCTTCAAGCTGCTG	TCCTTCGACGAACTCCTGAAC	59,2	137

Para llevar a cabo la RT-qPCR, se aisló el RNA total a partir de tejidos apicales de *E. globulus* por medio del kit de purificación de RNA de Macherey-Nagel (Alemania), usando un homogeneizado de tres plantas por tratamiento y tiempo. A partir del RNA total se sintetizó el cDNA por transcripción con la retrotranscriptasa MultiScribe (Thermo Fisher Scientific Inc. Estados Unidos) y cebadores aleatorios, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el kit. Las reacciones de RT-qPCR se llevaron a cabo en un volumen de 10  $\mu$ L, usando 20 ng de cDNA y una concentración final de 200 nM para cada cebador (Tabla 4.2), con el resto de componentes pertenecientes al kit Kapa Sybr FAST qPCR (Kapa Biosystems, Estados Unidos). Se realizaron tres réplicas de cada reacción en un termociclador ABI PRISM HT7900 Real Time PCR (Applied Biosystems, Estados Unidos). Los HKG para cada tejido establecidos en el Capítulo 3 se usaron como controles internos para normalizar los niveles de RNA: *TUA2* y *GAPDH* en las muestras de tallo y *L2* y *CYP* en raíz. Los niveles de expresión relativa de cada secuencia estudiada se calcularon mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001), incorporando las eficiencias medias de las PCR de los HKG y las secuencias objetivo y normalizando frente al tratamiento control a las 0 h de estrés constante. La eficiencia de cada reacción, así como los valores de Ct se calcularon mediante el programa informático RQ Manager (Applied Biosystems, Estados Unidos).

#### 4.2.5 Análisis estadísticos

Todos los análisis se realizaron mediante el programa estadístico R (R Core Team, 2012). Los niveles de expresión génica, así como el contenido hormonal en los diferentes tiempos y tratamientos se analizó mediante un ANOVA de dos vías, estableciendo  $\alpha = 0,05$ .

Con el fin de agrupar los genes basándose en su comportamiento, se realizó un análisis de cluster aglomerativo jerárquico mediante la librería de R *cluster* (Maechler et al., 2012). Posteriormente se llevó a cabo un análisis de caminos («path analysis») mediante la comprobación de diversos modelos explicativos de la covarianza existente entre el contenido hormonal y los niveles de expresión de los genes estudiados, con la librería *lavaan* de R (Rosseel, 2012). Los modelos comprobados se basaron en el conocimiento previo de la señalización hormonal temprana e hipótesis posibles sobre la interacción entre variables. Se usaron los coeficientes de correlación de Pearson para

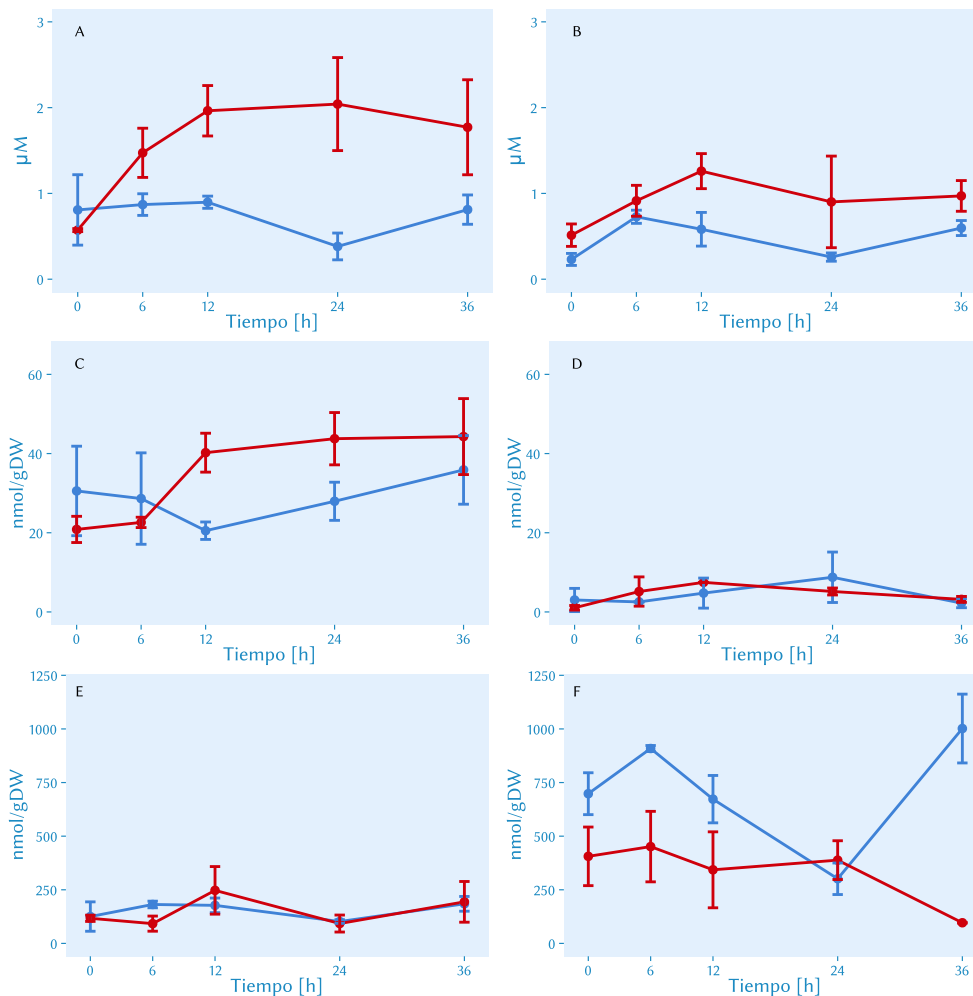


Figura 4.1: Contenido en ABA en (A) xilema de tallo, (B) xilema de raíz, (C) ápice de tallo, (D) ápice de raíz y contenido en CKs en (E) ápice de tallo y (F) ápice de raíz. En rojo se indica el tratamiento de sequía y en azul el tratamiento control. Las barras representan el error estándar de las réplicas biológicas ( $n = 3$ )

construir una estructura de varianzas y covarianzas con el fin de enfrentarlo a los datos observados, obteniéndose grafos dirigidos («modelos de caminos») que muestran las relaciones causales. Todas las posibles combinaciones de las variables entre aquellas con significado biológico fueron incluidas en el análisis (Shiple, 2009; Perez-Martin *et al.*, 2014), estableciéndose las relaciones entre las variables mediante una base empírica basada en el conocimiento previo del problema y la bibliografía existente. Las hipótesis principales comprobadas fueron las siguientes:

1. Tanto el ABA en los tejidos como el ABA xilemático afectan a la expresión génica durante el estrés hídrico (Jia & Zhang, 1999; Acharya & Assmann, 2009).
2. El ABA puede iniciar modificaciones epigenéticas y de la cromatina mediante cambios en la expresión de genes tales como la *HDA6* que alteran el patrón de expresión de la planta (Chinnusamy *et al.*, 2008).
3. El contenido en CKs afecta a la expresión de transportadores de tipo ABC, tales como la *PDR* (van den Brûle & Smart, 2002; Kuromori & Shinozaki, 2014).

- Las CKs modifican las respuestas producidas frente a la sequía (Kudoyarova *et al.*, 2007; de Ollas *et al.*, 2014).

Todos los modelos con una baja capacidad predictiva ( $p < 0,05$ ) fueron rechazados.

#### 4.3 RESULTADOS

La dinámica del contenido total en CKs y ABA en las plantas control y estresadas se muestra en la Figura 4.1. Tanto en el xilema de raíz como en el de tallo, el contenido de ABA fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en las plantas de *E. globulus* sometidas a sequía, empezando a partir de las 6 h de estrés constante. El contenido en tejidos, ápice de tallo y de raíz, en cambio, no fue significativamente diferente entre los tratamientos, aunque los niveles de esta fitohormona a partir de las 12 h de estrés constante sí mostraron un aumento comparándolos con los niveles presentes en las plantas control. La evolución en el contenido de CKs en el tallo fue similar en ambos tratamientos y no se detectaron diferencias significativas entre ellos, mientras que en tejidos de raíz las plantas estresadas mostraron valores significativamente más bajos con respecto a las control ( $p < 0,05$ ).

Las secuencias clonadas a partir de las reacciones con los cebadores degenerados se validaron mediante BLAST (Tabla 4.3). En el caso de la *STS-like* y la *PX27*, ambas secuencias se obtuvieron a partir de la misma pareja de cebadores degenerados (ver la Tabla 4.1), diseñados para obtener genes relacionados con el Citocromo P450.

En la Figura 4.2 se muestran los árboles filogenéticos para cada gen de *E. globulus* analizado. En el caso de la *HDA6*, la secuencia obtenida en *E. globulus* agrupa junto a la secuencia obtenida en *Quercus suber*, mientras se separa de las secuencias de otras especies leñosas como *Populus trichocarpa* o *Vitis vinifera*. La secuencia correspondiente a la *PDR* agrupa junto a la *PDR10* de *Arabidopsis thaliana*, en la misma rama que la *PDR4* de la misma especie y varias *PDR* putativas de *P. trichocarpa*. La secuencia correspondiente a la *STS-like* se situó próxima a las de *V. vinifera* y *P. trichocarpa*, y separada de las especies no leñosas. En cuanto a la *NCED* de *E. globulus*, formó un cluster junto a las *NCED9* y 3 de *A. thaliana* y otras *NCEDs* provenientes de *P. trichocarpa* y *Mes cassava*.

Tabla 4.3: Resultados del BLAST para las secuencias obtenidas

GEN	NÚMERO DE ACCESO DE LA SECUENCIA HOMÓLOGA	ESPECIE	BLAST SCORE	E-VALUE
<i>HDA6</i>	XM_003549555.2	<i>Glycine max</i>	156	$9 \cdot 10^{-35}$
<i>NCED</i>	XM_002283149.1	<i>Vitis vinifera</i>	206	$1 \cdot 10^{-49}$
<i>PDR</i>	XM_006493278.1	<i>Citrus sinensis</i>	156	$9 \cdot 10^{-35}$
<i>PX27</i>	XM_008226547.1	<i>Prunus mume</i>	185	$5 \cdot 10^{-43}$
<i>STS-like</i>	AJ344091.1	<i>Stachys sieboldii</i>	223	$1 \cdot 10^{-54}$
<i>CESA</i>	AB_368175.1	<i>E. globulus</i>	-	-

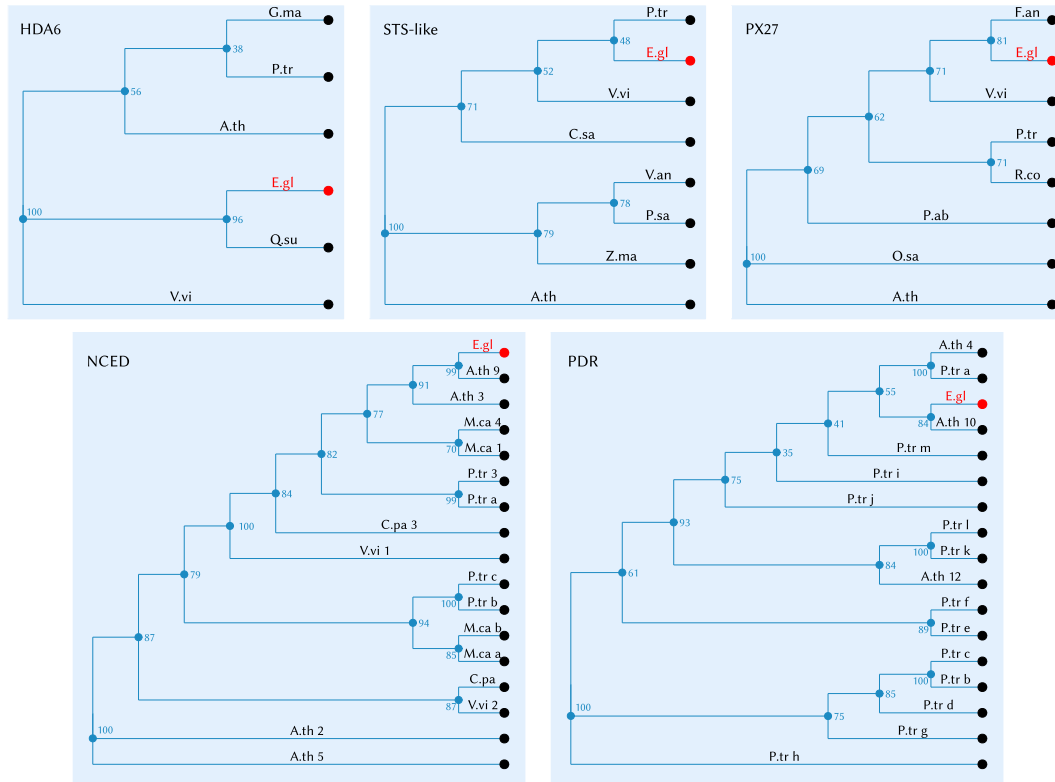


Figura 4.2: Árboles filogenéticos de los genes relacionados con estrés obtenidos en *E. globulus*. En rojo se indica el nodo correspondiente a *E. globulus*. Los números en los nódulos indican los valores de convergencia del *bootstrap* ( $n = 10000$ ). G.ma: *Glycine max*; P.tr: *Populus trichocarpa*; A.th: *Arabidopsis thaliana*; Q.su: *Quercus suber*; V.vi: *Vitis vinifera*; C.sa: *Cucumis sativus*; V.an: *Vigna angularis*; P.sa: *Pisum sativum*; Z.ma: *Zea mays*; F.an: *Fragaria ananasa*; R.co: *Ricinus communis*; P.ab: *Picea abies*; O.sa: *Oryza sativa*; M.ca: *Mes cassava*; C.pa: *Carica papaya*.

Finalmente, la *PX27* se localizó en la misma rama que las peroxididasas de *V. vinifera* y *Fragaria ananasa*.

Los valores de *RQ* para los genes de interés se expresaron como  $\log(RQ)$  para su representación gráfica (Figura 4.3 y Figura 4.4). En tallo todos los genes estudiados presentaron unos niveles de expresión significativamente mayores en las plantas sometidas a estrés hídrico que en los controles (Tabla 4.4). De acuerdo con el análisis de clúster (Figura 4.5) los genes de tallo se pueden agrupar en dos clústeres en base a sus dinámicas de expresión:

1. El primer grupo engloba a la *STS-like*, la *CESA*, la *NCED* y la *PX27*. Estos genes presentan niveles de expresión más altos en las plantas estresadas ya desde las 0h de estrés constante, manteniendo estos niveles a lo largo del experimento. Al final del mismo los niveles de expresión de estos genes tienden a igualarse en las plantas sometidas a ambos tratamientos.
2. El segundo grupo está formado por la *HDA6* y la *PDR*. En este grupo los niveles de expresión de estos genes para los dos tratamientos son similares a las 0h de estrés constante, pero se observa un gran incremento de la expresión en las



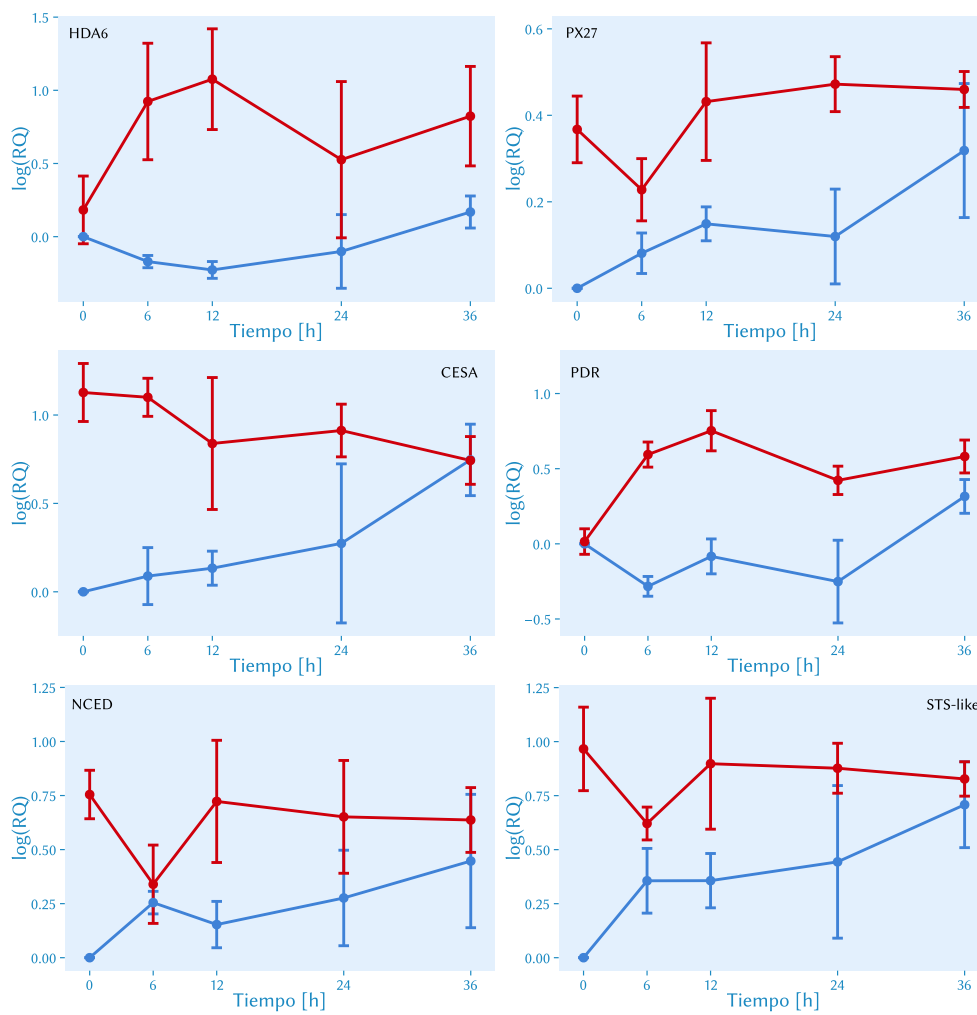


Figura 4.3: Dinámica de expresión de los genes relacionados con estrés en tallo. En rojo se indica el tratamiento de sequía y en azul el tratamiento control. Las barras representan el error estándar de las réplicas biológicas ( $n = 3$ )

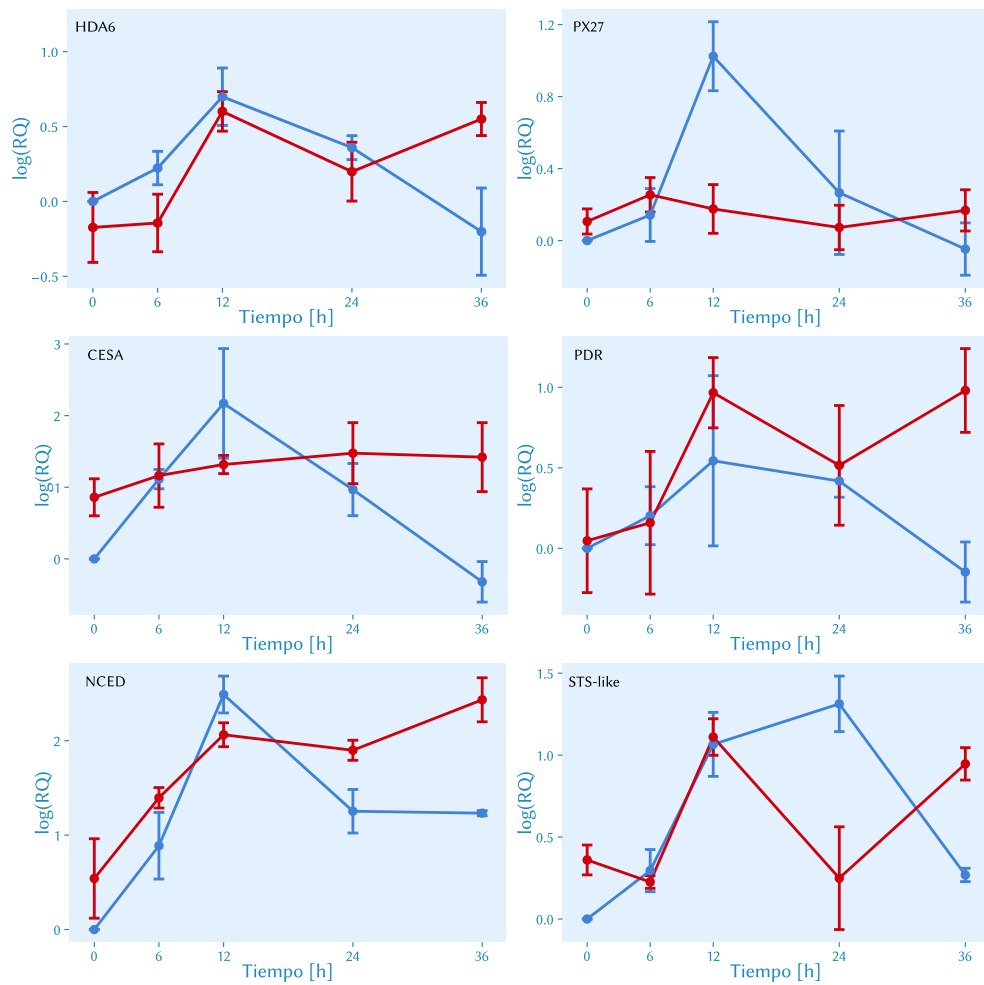


Figura 4.4: Dinámicas de expresión de los genes relacionados con estrés en raíz. En rojo se indica el tratamiento de sequía y en azul el tratamiento control. Las barras representan el error estándar de las réplicas biológicas ( $n = 3$ )

Tabla 4.4: Resumen ANOVA del log(RQ) de los genes seleccionados. \*: Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). La interacción solo se muestra para aquellos genes que la presentan, habiendo sido eliminada del análisis en el resto de genes, siguiendo el principio de máxima parsimonia.

GEN	TRATAMIENTO (p)	TIEMPO (p)	INTERACCIÓN (p)
<i>NCED</i> <sub>tallo</sub>	0,002*	0,232	
<i>STS-like</i> <sub>tallo</sub>	< 0,001*	0,086	
<i>PX27</i> <sub>tallo</sub>	< 0,001*	0,006*	
<i>PDR</i> <sub>tallo</sub>	< 0,001*	0,034*	
<i>HDA6</i> <sub>tallo</sub>	< 0,001*	0,363	
<i>CESA</i> <sub>tallo</sub>	< 0,001*	0,362	0,006*
<i>NCED</i> <sub>raiz</sub>	0,005*	< 0,001*	
<i>STS-like</i> <sub>raiz</sub>	0,958	0,104	
<i>PX27</i> <sub>raiz</sub>	0,745	0,688	
<i>PDR</i> <sub>raiz</sub>	0,106	0,246	
<i>HDA6</i> <sub>raiz</sub>	0,740	0,234	0,024*
<i>CESA</i> <sub>raiz</sub>	0,030*	0,904	

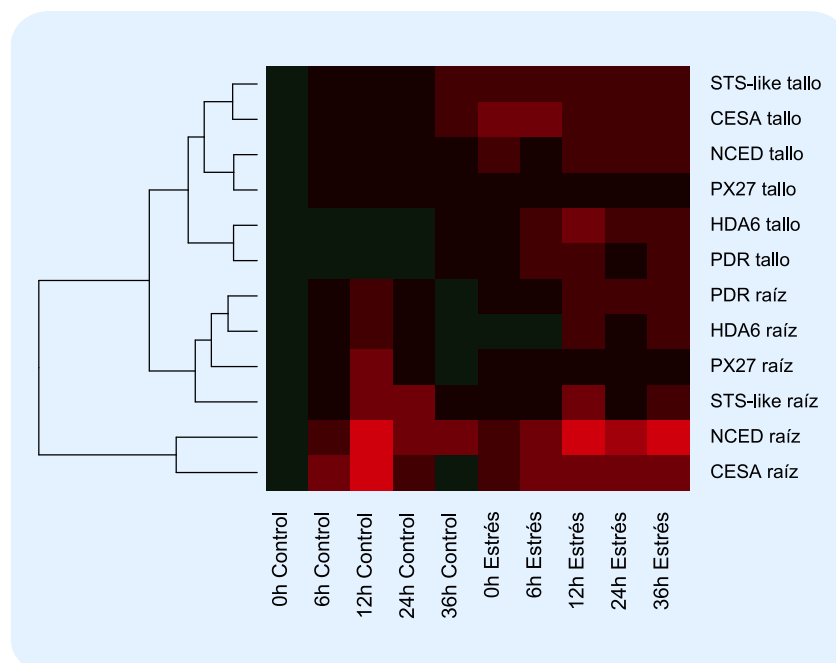


Figura 4.5: Análisis de clúster de los genes relacionados con el estrés

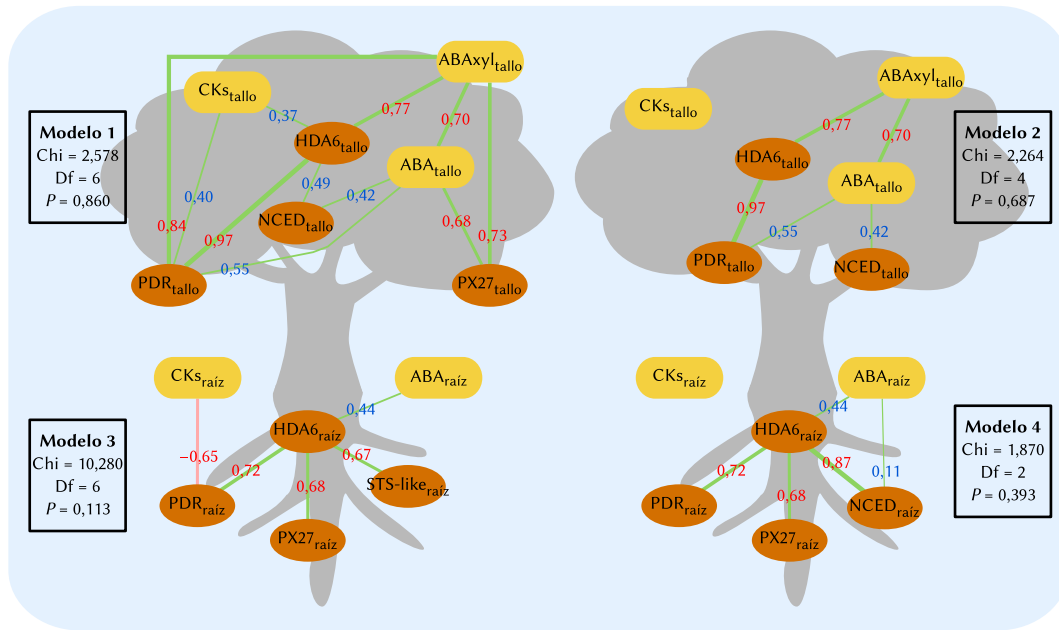


Figura 4.6: Modelos causales utilizados en el análisis de caminos. Las flechas indican una relación directa positiva (verde) o negativa (roja), y los números indican el coeficiente de correlación de Pearson, en rojo los valores significativos ( $p < 0,05$ ) y en azul los valores no significativos ( $p > 0,05$ ). Chi: Valor del estadístico *Chi*; Df: Grados de libertad.

plantas sometidas a sequía entre las 6 y las 12 h de estrés constante. Después de ese período los valores vuelven a igualarse en las plantas estresadas y control.

En raíz, solamente la *NCED* y la *CESA* presentaron incrementos significativos en sus niveles de expresión con respecto a las plantas control durante la fase de estrés constante (Tabla 4.4). Ambos genes forman un clúster propio (Figura 4.5), mostrando dinámicas similares para los dos tratamientos hasta las 24 h de estrés constante. A partir de este momento las plantas estresadas mostraron un incremento de la expresión de estos dos genes con respecto a los controles, que disminuyen la expresión. Por otro lado, la expresión de la *PX27* y la *STS-like* se reduce en situación de estrés, si bien las diferencias no llegan a ser significativas.

Los modelos causales se muestran en la Figura 4.6. En tallo, los modelos más representativos (Modelos 1 y 2) fueron consistentes con las hipótesis 1 y 2, mostrando un fuerte efecto por parte del *ABA* xilemático en la expresión de los genes analizados. Además, cuando el posible papel de las *CKs* se añadió a los modelos (hipótesis 3 y 4), como se puede observar en el Modelo 1, se mejoró la proporción de la variabilidad explicada ( $P = 0,86$ ).

En raíz, los modelos no fueron capaces de explicar tanta variabilidad como en tallo (Modelos 3 y 4). No obstante, se pudo observar un comportamiento diferencial con respecto al tallo. Los modelos que incluyeron el efecto del *ABA* xilemático fueron rechazados ( $P < 0,05$ ) y aquellos que incluyeron el efecto de las *CKs*, como el Modelo 3 disminuyeron la proporción de variabilidad explicada ( $P = 0,11$ ). El mejor modelo de raíz fue el Modelo 4, basado en la hipótesis 2, aunque en este caso el efecto del conte-

nido hormonal es pequeño, por lo que no se puede asegurar un efecto directo de las fitohormonas analizadas sobre los niveles de expresión de los genes ensayados.

#### 4.4 DISCUSIÓN

La dinámica hormonal muestra un incremento secuencial del contenido de *ABA* en las plantas estresadas respecto a las control, empezando en el xilema de raíz, luego el xilema de tallo y finalmente en los ápices de tallo (Figura 4.1), que se corresponde con los cambios en los parámetros fisiológicos medidos en el Capítulo 2 (Granda *et al.*, 2011). En cuanto a las *CKs*, aunque se ha postulado un papel antagónico entre éstas y el *ABA* en diversos procesos fisiológicos y de crecimiento, incluyendo la adaptación a distintos estreses abióticos (Zdunek & Lips, 2001; Chow & McCourt, 2004; Werner *et al.*, 2006), con los datos obtenidos en este sistema experimental solo se observa un descenso significativo en el contenido de estas fitohormonas en la raíz de las plantas estresadas. Esto concuerda con lo descrito para el comportamiento general de las *CKs*, que durante los estreses abióticos, como la sequía, disminuyen su síntesis y transporte desde las raíces. Esta reducción puede incrementar las respuestas de tallo a las concentraciones crecientes de *ABA* a lo largo del estrés (Davies & Zhang, 1991), aumentando finalmente la resistencia estomática (Goicoechea *et al.*, 1997; Rivero *et al.*, 2009). La disminución del contenido de estas fitohormonas en el sistema radical de plantas sometidas a estrés hídrico también puede estar relacionada con el crecimiento de la raíz observado en estas plantas respecto a las control.

En tallo es donde se encontraron las principales diferencias en la expresión de los genes analizados en base al tratamiento impuesto. Como se observa en la Figura 4.3 y la Tabla 4.4, todos los genes en este tejido mostraron niveles de expresión significativamente más altos en situación de estrés, encontrándose dos clústeres principales en función de su comportamiento:

1. Un primer grupo formado por la *STS-like*, la *CESA*, la *NCED* y la *PX27*. Los niveles de expresión de estos genes en estrés se ven afectados desde el principio del experimento, a 0 h de estrés constante, hasta que, después de 12 h de estrés, tienden a igualarse entre tratamientos. Este comportamiento parece independiente de la dinámica de *ABA* en el xilema y en el ápice de tallo, salvo para la *PX27*, implicando una activación indirecta o independiente del *ABA* para estos genes en la adaptación a la sequía de los tejidos aéreos. El comportamiento de la *CESA*, en contraste a lo que ocurría en raíz, indica un esfuerzo por mantener la formación de pared celular secundaria durante las primeras horas de estrés severo en eucalipto, tal y como se ha observado en tallos de arroz sometidos a concentraciones exógenas de *ABA*, lo que refuerza la hipótesis de la activación indirecta de este gen por el *ABA*. Después de este incremento inicial, los niveles de *CESA* en las plantas estresadas recuperaron niveles parecidos a los controles. En el caso de la expresión de la *PX27* en tallo, también se encuentra potenciada desde el inicio del estrés constante, a las 0 h, pero, a diferencia de la *CESA*, la *PX27* presenta un segundo incremento en tiempos más largos, lo que concuerda con los aumentos de expresión descritos en diferentes genes de peroxidasas (Hiraga *et al.*, 2000) y las alteraciones en el contenido y composición de la lignina durante distintos ti-

pos de estrés abiótico en plantas (Moura *et al.*, 2010). La *STS-like* presenta también una cinética muy similar a la *PX27*, pero con un segundo incremento de menor intensidad. La sobreexpresión de *STS-like* a lo largo del tratamiento de estrés puede estar relacionada con el papel protector de la estaquiosa en la adaptación a sequía (Meng *et al.*, 2008).

2. Un segundo grupo formado por la *HDA6* y la *PDR*. Las cinéticas de estos dos genes presentaron niveles similares al principio del experimento en las plantas sometidas a los dos tratamientos, para luego, según se avanzó en la fase de estrés constante y el contenido de *ABA* fue aumentando, la expresión de estos dos genes experimentó un incremento similar, entre las 6 y las 12 h. Tal y como ha sido revisado por Chinnusamy *et al.* (2008), las histona deacetilasas han sido implicadas en procesos de represión transcripcional de genes en *A. thaliana*. Por su parte, en arroz, la expresión de estos reguladores epigenéticos puede verse influenciada por el *ABA* y por los estreses abióticos (Fu *et al.*, 2007), generalmente mediante represión de la transcripción de estos reguladores. La misma dinámica se observa en la *PDR*. En *A. thaliana*, la proteína codificada por el gen *PDR12* es un paso clave para una correcta coordinación temporal de las respuestas al *ABA* (Kang *et al.*, 2010), mientras que en otras especies, los miembros de la familia *PDR* se encuentran sobreexpresados en presencia de *ABA* (van den Brûle & Smart, 2002).

Las dinámicas de expresión génica en raíz de los genes estudiados no presentaron diferencias generales entre los tratamientos, excepto para la *NCED* y la *CESA*. La *NCED* es un gen clave en la biosíntesis de *ABA*, y se ha documentado su sobreexpresión en *A. thaliana* bajo condiciones de estrés como la sequía (*NCED3*) o el proceso de desecación de semillas (*NCED9*) (Iuchi *et al.*, 2001). La secuencia obtenida para este gen en *E. globulus* se localiza en el mismo clúster del árbol filogenético que estos dos genes de *A. thaliana*, sobreexpresándose durante el estrés hídrico a las horas finales del experimento. Esta activación tardía sugiere que el aumento en los niveles de *ABA* observados en el xilema de las plantas estresadas puede haberse producido principalmente por procesos de traslocación y desconjugación (Dodd, 2005). Sorprendentemente, los resultados de raíz también indican que los niveles de expresión de la *CESA* en las plantas estresadas sufren un aumento, pequeño pero constante, a lo largo del experimento. De manera general, en *A. thaliana*, la familia de las celulosa sintasas ve reducida su expresión durante los estreses abióticos con el fin de reducir la tasa de crecimiento (Bray, 2004), pero tanto en *Eucalyptus* como en *Hordeum* (cebada) se han encontrado dos tipos diferentes de complejos multienzimáticos que incluyen la *CESA* que pueden mostrar patrones de expresión diferenciales al comportamiento general (Burton *et al.*, 2004; Ranik & Myburg, 2006). La dinámica del resto de genes fue similar en ambos tratamientos, como se puede observar en la Figura 4.4, y el análisis de clúster solo discriminó entre aquellos genes afectados por el estrés (*CESA* y *NCED*) y aquellos que no mostraron sensibilidad alguna al tratamiento efectuado (*STS-like*, *PX27*, *PDR* y *HDA6*). A pesar de la ausencia de diferencias significativas, estos genes parece que tienden a incrementar su expresión en los tiempos finales del experimento, indicando un más que probable papel a tiempos más largos en los tejidos de raíz sometidos a estrés hídrico.

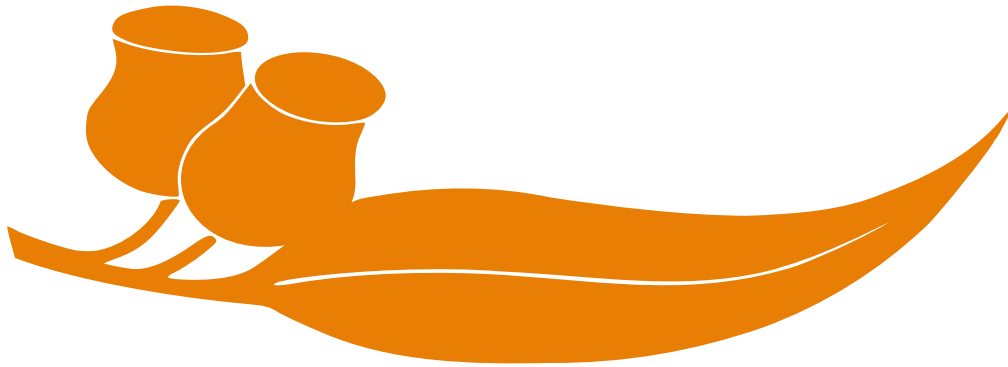
Las dinámicas de expresión, por tanto, muestran el mismo comportamiento que se ha visto en las dinámicas hormonales y las respuestas fisiológicas, donde la sequía es detectada en las raíces pero las respuestas se expresan en la parte aérea, como se ha

visto en el [Capítulo 2](#). Esto refuerza la validez del sistema experimental propuesto en ese capítulo para el estudio del estrés hídrico rápido y severo, no solo a nivel fisiológico sino también a nivel molecular.

Finalmente, los modelos causales explorados ayudan a explicar y entender mejor las relaciones existentes entre los niveles hormonales y los niveles de expresión génica. En raíces, tanto el [ABA](#) xilemático como en tejido no presentaron ninguna correlación significativa con la expresión de los genes analizados. Sin embargo, en tallo, el [ABA](#) xilemático mostró correlaciones significativas con los niveles de expresión de tres genes, la [HDA6](#), la [PX27](#) y la [PDR](#) (coeficientes de correlación de Pearson de 0,77; 0,73 y 0,84 respectivamente). El [ABA](#) tisular solo mostró una correlación significativa con la expresión de la [PX27](#) (coeficiente de correlación de Pearson de 0,68). Todo esto indica que, al menos en los tejidos de tallo, las alteraciones en los niveles de expresión de los genes afectados por [ABA](#) responden mayoritariamente al flujo xilemático, más que a la acumulación de [ABA](#) en los tejidos, tal y como ocurre también en las respuestas fisiológicas ([Jia & Zhang, 1999](#); [Acharya & Assmann, 2009](#)). Las [CKs](#) tampoco muestran una correlación directa con los cambios en la expresión de los genes, excepto para la [PDR](#) en el ápice de raíz (coeficiente de correlación de Pearson de -0,68). Dado el efecto establecido de las [CKs](#) en la expresión de los genes pertenecientes a la familia de transportadores ABC ([Ramírez-Carvajal et al., 2009](#)), la correlación negativa encontrada entre las [CKs](#) y este gen indican que en las raíces el efecto del [ABA](#) se ve disminuido por estas fitohormonas. En conclusión, el análisis de caminos ([Figura 4.6](#)) nos ayuda a reforzar la hipótesis de que el [ABA](#) xilemático parece ser la fuerza motriz, directa o indirecta, que altera la expresión de los genes, mediante la alteración del contenido tisular de [ABA](#) y cambiando los patrones de expresión de [HDA6](#), [PX27](#) y [PDR](#) por una posible inducción de cambios epigenéticos dirigidos por genes como la [HDA6](#). La validación de los modelos causales no implica que las hipótesis comprobadas sean ciertas, pero sí son plausibles dados los datos empíricos disponibles ([Shiple, 2009](#)). Para los otros tres genes estudiados, [NCED](#), [CESA](#) y [STS-like](#), no se pudo corroborar ningún efecto hormonal, implicando una probable activación independiente de [ABA](#) en el sistema experimental presentado.

Parte IV

ESTRÉS HÍDRICO A LARGO PLAZO







## CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE CLONES DE *E. GLOBULUS* FRENTE A ESTRÉS HÍDRICO SEVERO A LARGO PLAZO

---

### 5.1 INTRODUCCIÓN

En los climas templados o mediterráneos, que presentan períodos estacionales de sequía, las especies forestales de crecimiento rápido se han convertido en especies muy relevantes en cuanto a producción y en los planes de reforestación (FAO, 2011). En España estas especies constituyen el 66 % del aprovechamiento forestal total y son, por tanto, un recurso esencial (MAGRAMA, 2002). Entre ellas se encuentra el *E. globulus*, considerado como productor de madera de corte de calidad y adecuado para zonas templadas [ENCE, comunicación personal]. En este tipo de aprovechamientos forestales es común el uso de plantaciones monoespecíficas de material de *E. globulus* seleccionado para mejorar el rendimiento (Forrester *et al.*, 2010), aunque tales plantaciones sean más susceptibles a los cambios ambientales y a los estreses abióticos. Dado que, como hemos mencionado anteriormente, el estrés hídrico puede afectar negativamente al establecimiento y al crecimiento de esta especie, llevando incluso a la pérdida de la plantación entera (Tausz *et al.*, 2008; White *et al.*, 2009), entender las bases de la tolerancia al estrés hídrico en esta u otras especies forestales es esencial. Sin embargo, los esfuerzos en este campo se enfrentan a dos dificultades principales:

1. La tolerancia a la sequía es un proceso muy complejo que involucra un gran número de respuestas, obligando a las plantas a desarrollar ajustes fisiológicos y morfológicos. Generalmente estos ajustes están mediados por el balance hormonal y engloban cambios tales como variaciones en el contenido en pigmentos (Lei *et al.*, 2006; Shvaleva *et al.*, 2006, 2008; Liu *et al.*, 2011), ajustes osmóticos (Merchant *et al.*, 2006; Warren *et al.*, 2007; Callister *et al.*, 2008), ajustes fotosintéticos (Warren *et al.*, 2007) o modificaciones del crecimiento (Lei *et al.*, 2006; Drew *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011).
2. Diferentes genotipos o estados de desarrollo de la misma especie pueden comportarse de manera diferente bajo condiciones de estrés (Pita & Pardos, 2001). Esto es especialmente importante en las especies arbóreas, dado que por su largo ciclo vital puede llevarnos a tomar decisiones erróneas a la hora de seleccionar los mejores individuos.

A pesar de estos impedimentos, los rasgos fisiológicos relacionados con la resistencia a sequía pueden ser usados como indicadores en la selección de material para las plantaciones y mejorar así el rendimiento y la producción si cumplen una serie de requisitos (Pita *et al.*, 2005):

- A. Su medición debe ser sencilla y rápida para permitir su aplicación en un gran número de muestras.
- B. Deben mostrar una adecuada heredabilidad.
- C. Deben relacionarse con una variación genotípica.
- D. Deben permitir a los mejoradores forestales identificar consistentemente los mejores y los peores genotipos para una serie de condiciones específicas.

Obtener este tipo de marcadores fisiológicos, útiles en diferentes estados fisiológicos y para diferentes genotipos, es extremadamente difícil, ya que se necesita una interpretación global de las respuestas para poder entender completamente el mecanismo de tolerancia a sequía en las plantas. Los análisis clásicos, por ejemplo el ANOVA y los test *post-hoc*, aportan una visión individual de cada parámetro analizado, y tanto las correlaciones lineales (coeficientes  $r$  de Pearson) como la identificación de los factores que causan las diferencias observadas solo ofrecen comparaciones dos a dos entre variables analizadas. Así pues, encontrar las relaciones entre genotipos o clones y los rasgos fisiológicos y su vínculo con posibles estrategias de las plantas frente al estrés hídrico es un trabajo complicado cuando se parte de este tipo de análisis.

Los análisis multivariantes, en cambio, permiten procesar todos los parámetros estudiados de manera conjunta, para poder así obtener una visión general de las estrategias empleadas por los clones o genotipos para enfrentarse al estrés, y poder identificar de esta manera los rasgos adecuados para caracterización clonal, como se ha visto en otros estudios similares (De Diego *et al.*, 2012; Correia *et al.*, 2014).

En este capítulo se pretende establecer un método eficaz para explicar las respuestas frente a sequía de *E. globulus* agrupando las variables cuantificadas en relación a las diferentes estrategias presentadas por diversos clones de esta especie. Además, se evaluará la capacidad de las variables agrupadas para diferenciar entre clones, así como la coherencia del agrupamiento resultante. Para ello se han estudiado las respuestas fisiológicas y de crecimiento de nueve clones de *E. globulus*: el clon C14, un clon comercial ampliamente usado en las plantaciones de *Eucalyptus* y en nuestros estudios previos, y ocho clones hijos. Las respuestas mostradas por estos clones se analizaron mediante un Análisis Multivariante de la Varianza (MANOVA) semiparamétrico, PCA y análisis de clúster, ya que estas técnicas permiten agrupar tanto los clones como las respuestas en función de su similitud en las condiciones ensayadas. Con esta combinación de análisis se puede monitorizar una gran selección de material y de respuestas fisiológicas de manera simultánea, ofreciendo la posibilidad de seleccionar los clones óptimos para las condiciones ambientales requeridas, reduciendo el riesgo de pérdida durante el establecimiento de plantaciones, así como agrupar las variables en grupos funcionales que permitan disminuir el número de variables a analizar, lo que facilitaría la optimización de la catalogación de nuevos materiales o su comportamiento en campo.

## 5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.2.1 *Material vegetal y condiciones de estrés hídrico*

Como material de partida para el ensayo se utilizaron esquejes enraizados de dos años de edad de nueve clones diferentes de *E. globulus*: El clon parental C14 y los clones hijos C46, C97, C120, C222, C371, C405, C491 y C601. Estos últimos se obtuvieron a partir de la clonación de los descendientes obtenidos en el cruzamiento controlado del clon C14 con el clon de bajo valor genético WPE. Los esquejes enraizados, que presentaban morfología juvenil con hojas sésiles, fueron cultivados en exterior en macetas de 2 L usando como sustrato turba:perlita (1:1, v/v) en las mesas de cultivo de la finca «La Mata», Grado, Asturias (43°32' Norte y 7°00' Oeste, 65 m), entre el 20 de Julio y el 13 de Octubre del 2009. En el ensayo se utilizaron un total de 324 plantas: 9 clones  $\times$  2 tratamientos  $\times$  6 plantas  $\times$  3 réplicas.

Como paso previo, las plantas se podaron para igualar el tamaño entre ellas, así como para favorecer la formación de nuevas ramas durante el ensayo. Después de la poda se trasladaron a invernadero bajo condiciones de humedad y temperatura controladas ( $80 \pm 5$  % y  $20 \pm 2^\circ$  C respectivamente). Para impedir la evaporación del agua desde el sustrato se cubrió la superficie de cada maceta con film transparente y, con el fin de evitar posibles plagas a lo largo del ensayo, se trataron todas las plantas con insecticida (Confidor 20 LS, Bayer Cropscience, España) y fungicida (Botrix, CAPA Ecosystems, España).

La Capacidad de Campo (FC) de cada maceta se calculó mediante métodos gravimétricos (peso al 100 % de FC) y se usó para establecer dos tratamientos, control y sequía. El estrés hídrico en el tratamiento de sequía se indujo en dos fases:

1. Primera fase: Las plantas se sometieron a una restricción del aporte hídrico hasta que alcanzaron un 40 % de FC, después de un mes.
2. Segunda fase: La FC se fue reduciendo gradualmente en un 5 % cada semana. Para ello, se pesaron las macetas tres veces por semana y se repuso el agua absorbida para alcanzar el peso correspondiente a la FC deseada.

Cuando la mitad de las plantas de cada clon presentaron síntomas irreversibles de sequía (estrés severo), tales como el ápice de tallo doblado y marchitez en las hojas, se obtuvo el dato del número de días transcurridos hasta ese momento ( $DL_{50}$ ), y se realizaron las mediciones correspondientes (ver más adelante, [Sección 5.2.2](#)).

En el tratamiento control las plantas se mantuvieron a lo largo del experimento con una FC de  $92 \pm 8$  % mediante riegos tres veces por semana. Por otro lado, las plantas sometidas a ambos tratamientos fueron fertirrigadas una vez a la semana con 4 mL de una solución nutritiva a pH 6 compuesta por:

- $7,94 \text{ mEq L}^{-1} \text{ NO}_3^-$
- $5,60 \text{ mEq L}^{-1} \text{ PO}_4\text{H}_2^-$
- $0,62 \text{ mEq L}^{-1} \text{ SO}_4^{2-}$

- 1,99 mEq L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub><sup>+</sup>
- 7,99 mEq L<sup>-1</sup> K<sup>+</sup>
- 2,70 mEq L<sup>-1</sup> Ca<sup>2+</sup>
- 1,58 mEq L<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup>
- 25 mg L<sup>-1</sup> de mezcla de micronutrientes comercial (Hortrilone, Compo, España)

### 5.2.2 Medidas fisiológicas, bioquímicas y hormonales

Todas las medidas y cuantificaciones se llevaron a cabo en tejidos formados exclusivamente durante el período de ensayo, tanto para las plantas procedentes del tratamiento control como del tratamiento de sequía, asegurando en éstas últimas que los tejidos y órganos recolectados se hubiesen formado durante el estrés.

El diámetro y la longitud del tallo principal de todas las plantas se determinó mediante un calibre digital y un metro, respectivamente. El Potencial Hídrico de Hoja al Amanecer ( $\Psi_{pd}$ ) y el Potencial Hídrico de Hoja al Mediodía ( $\Psi_{md}$ ), en MPa, se midió mediante una cámara de Scholander en hojas apicales completamente extendidas, siguiendo la metodología propuesta por Scholander *et al.* (1965) y Turner (1988). También se cuantificaron los parámetros fotosintéticos *A*, *E*, *G<sub>s</sub>*, *C<sub>i</sub>* y Déficit de Presión de Vapor (*VPD*) en hojas completamente extendidas de cada planta por medio de un analizador infrarrojo de gases portátil (IRGA ADC type LCA-4, Analytical Development Co. UK). Estas medidas se llevaron a cabo fijando la Concentración Externa de CO<sub>2</sub> (*C<sub>a</sub>*) en 400  $\mu\text{mol}$  y bajo condiciones de luz constantes de 1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  usando lámparas de alta presión de sodio (OSRAM E40/ES 400 W) para minimizar las variaciones producidas por las condiciones variables de luz solar. La Conductancia Hidráulica (*K<sub>sp</sub>*) se calculó como

$$\frac{E}{(\Psi_{pd} - \Psi_{md})}$$

tal y como describen Pou *et al.* (2008). También se calcularon los cocientes *C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub>* y *A/C<sub>i</sub>* y finalmente la *WUE<sub>i</sub>* como *A/G<sub>s</sub>*. Se contó el Número Total de Hojas (*N<sub>h</sub>*) en cada planta y se seleccionaron nueve hojas para analizar la circularidad y el Área Foliar (*LA*) mediante el programa informático ImageJ (National Institutes of Health, Estados Unidos). Se cuantificó el Peso Fresco de Tallo (*FW<sub>s</sub>*) y el Peso Fresco de Hojas (*FW<sub>l</sub>*) en las hojas seleccionadas anteriormente y posteriormente se mantuvieron a 60 °C hasta que se obtuvo un peso seco constante en ambos tejidos [Peso Seco de Hojas (*DW<sub>l</sub>*) y Peso Seco de Tallo (*DW<sub>s</sub>*)]. A partir de estos valores se calcularon diversos índices generales:

- Biomasa Aérea (*AB*) como  $DW_l + DW_s$
- Área Foliar Total (*TLA*) como  $LA \times N_h$
- Área Foliar Específica (*SLA*) como  $LA/DW_l$
- Proporción de Área Foliar (*LAR*) como  $TLA/AB$

- WC como  $DW/FW \times 100$ , tanto para tallo como para hoja.

A partir de tres hojas de cada planta se estimó el Peso a Máxima Turgencia ( $W_t$ ) manteniendo las hojas en agua destilada a 4 °C en oscuridad durante 24 h Turner (1981) y a partir de él se calculó el Contenido Relativo de Agua en Hoja ( $RWC_h$ ) como

$$\frac{FW - DW}{W_t - DW} \times 100$$

El Potencial Osmótico ( $\Phi_{II}$ ) y el Potencial Osmótico a Saturación ( $\Phi_{II100}$ ) se midieron en dos hojas apicales de cada planta. Ambas medidas se realizaron siguiendo el método descrito por Nguyen-Queyrens & Bouchet-Lannat (2003) con modificaciones: a partir de la parte distal de hojas frescas (para el  $\Phi_{II}$ ) y de hojas turgentes (para el  $\Phi_{II100}$ ), obtenidas de la misma manera que para la estimación del  $W_t$ , se recortaron discos de 9 mm de diámetro que, tras un proceso de congelación y descongelación, se introdujeron en un psicrómetro Psyspro (Wescor Inc. USA) con el que se obtuvieron las medidas. La densidad estomática promedio se calculó usando un área de 1 mm<sup>2</sup> en dos hojas elegidas al azar para cada planta mediante el programa informático ImageJ. Finalmente, las hojas restantes fueron utilizadas para obtener el contenido en pigmentos mediante una extracción simple en acetona 80 %. La Clorofila A ( $Chl_A$ ), la Clorofila B ( $Chl_B$ ) y la Clorofila Total ( $Chl_T$ ) se calcularon a partir de la absorbancia a 663,6 y 646,6 nm, mediante las ecuaciones revisadas de Arnon (Arnon, 1949; Porra, 2005):

$$\begin{cases} Chl_A(\mu g/mL) = 12,25(A_{663,6}) - 2,55(A_{646,6}) \\ Chl_B(\mu g/mL) = 20,31(A_{646,6}) - 4,91(A_{663,6}) \\ Chl_T(\mu g/mL) = 17,76(A_{646,6}) - 7,34(A_{663,6}) \end{cases}$$

para posteriormente obtener el cociente  $Chl_A/Chl_B$ . A partir de la misma extracción se calculó el contenido en carotenoides mediante la ecuación de Wellburn & Lichtenthaler (1984):

$$Carotenoides(\mu g/mL) = \frac{1000(A_{470}) - 3,27[Chl_A] - 104[Chl_B]}{227}$$

El ABA de los ápices de la parte aérea se extrajo y purificó de la misma manera que en el Capítulo 2. La cuantificación en este caso se realizó mediante ELISA usando anticuerpos policlonales anti-ABA (C4') (Centeno & Granda, 2009), específicos de la forma libre del ABA, siguiendo la metodología descrita por Prado *et al.* (2014).

### 5.2.3 Análisis estadísticos

Las medidas realizadas bajo estrés severo se analizaron individualmente mediante ANOVA y Test de Tukey de Diferencias Significativas Honestas (Tukey-HSD). Por otro lado, se analizaron todos los datos de manera conjunta por medio de técnicas de análisis multivariantes:

- MANOVA semiparamétrico. Este test se usa para describir cómo se distribuye la variabilidad entre los diferentes tratamientos experimentales o covariables sin controlar (Oksanen *et al.*, 2012). Para ello se consideraron el clon y el tratamiento (control y sequía) como factores fijos.

- b. **PCA**. Este test se realizó para poder reducir las respuestas medidas en el estrés severo en componentes relacionados con el factor clon, con el factor tratamiento o con ambos (Husson *et al.*, 2012). EL **PCA** es una técnica estadística de síntesis de información, i.e. reducción de variables, cuyo resultado es la obtención de componentes principales a partir de combinaciones lineales de las variables originales.
- c. **Análisis de clúster**. La información obtenida en el **PCA** se complementó mediante un análisis de clúster jerárquico y aglomerativo (Maechler *et al.*, 2012). El análisis de clúster es una técnica exploratoria que permite agrupar a las variables y/o a los individuos en función de la distancia entre ellos, siendo el grado de similitud entre los miembros del mismo grupo mayor que con los miembros de otro grupo.

Todos el análisis de datos se llevaron a cabo con el programa estadístico R (R Core Team, 2012), estableciendo un nivel de confianza del 95 % ( $\alpha = 0,05$ ) en los análisis que lo requiriesen.

### 5.3 RESULTADOS

Los resultados de **DL<sub>50</sub>** y la **FC** para los clones se muestran en la **Tabla 5.1**. El rango de días varía desde los 101 días para los clones **C97** y **C46** hasta los 84 días para el clon **C405**. El grado de estrés severo tolerado por los clones varió en función del clon, distinguiendo entre aquellos clones capaces de soportar una **FC** inferior al 12 % (**C97**, **C46**, **C371** y **C222**) y el resto de clones, que como máximo se pueden llevar hasta un 13 %.

Los resultados del **ANOVA** para cada parámetro (**Tabla A.1** en el **Apéndice A**) muestran diferencias significativas en alguno de los factores o interacción para todos los

Tabla 5.1: Supervivencia de los clones y condiciones de estrés severo al final del experimento para cada clon. **DL<sub>50</sub>**: número de días tras los que la mitad de las plantas de cada clon presentaron síntomas irreversibles de sequía y fueron recolectados; **FC**: Capacidad de campo en el momento de la recolección.

CLON	DL <sub>50</sub>	FC
C97	101	10
C46	101	11
C371	99	8
C222	99	11
C120	95	13
C601	94	13
C491	85	13
C14	85	14
C405	84	13

Tabla 5.2: Tabla de contingencia del **MANOVA**. Df: Grados de libertad; SumaC: Suma de cuadrados; MediaC: Media de cuadrados; Sig: Nivel de significancia (\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,010$ ; \* $p < 0,050$ ).

FACTOR	DF	SumaC	MediaC	VALOR F	p	SIG.
Clon	8	0,25	0,03	3,05	0,003	**
Tratamiento	1	1,17	1,17	115,07	$1 \cdot 10^{-04}$	***
Clon:Tratamiento	8	0,23	0,03	2,81	0,004	**
Residuales	36	0,37	0,01			
Total	53	2,01				

parámetros fisiológicos, hormonales y bioquímicos medidos. Tanto el cociente  $C_i/C_a$  como el Contenido de agua en hoja ( $WCh$ ), el  $RWC_h$ , el  $\Phi_{H100}$  y el diámetro de tallo presentaron diferencias significativas solo entre tratamientos (control y sequía), mientras que la circularidad de las hojas fue la única variable que mostró diferencias únicamente para el factor clon. Por otro lado, tanto para el  $ABA$  como para la  $K_{sp}$  se encontraron diferencias para tratamiento e interacción, y los carotenoides y el  $\Psi_{pd}$  las presentaron para el clon e interacción. Los 21 parámetros restantes mostraron diferencias para los dos factores, tratamiento y clon, y para la interacción. Los resultados del **Tukey-HSD** para el factor clon se muestran en la **Figura A.1** y la **Figura A.2** del **Apéndice A**.

El **MANOVA** semiparamétrico se realizó para analizar de manera conjunta la existencia de diferencias generales de comportamiento entre clones y entre tratamientos, así como su interacción. Los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 5.2**. Se observaron diferencias significativas para los dos factores y para la interacción, siendo el factor más importante el tratamiento, con un 58 % de la variabilidad observada, calculada a partir de la media de cuadrados. Las diferencias debidas al clon contaron para un 12 % de la variabilidad encontrada en los parámetros bioquímicos, hormonales y fisiológicos, mientras que la interacción entre factores compuso un 11 %, indicando el efecto del clon sobre las respuestas al tratamiento, es decir, que existen diferencias en la manera que los clones responden al estrés hídrico.

El **PCA** permitió agrupar las medidas en tres componentes principales involucrados en el comportamiento de los clones (**Tabla 5.3**), explicando entre los tres más del 60 % de la variación total. La mayoría de los parámetros relacionados con el estatus hídrico formaron el primer componente, denominado «Componente Hídrico». Este componente se relacionó principalmente con el factor tratamiento ( $P = 2,81 \times 10^{-30}$ ), debido a las grandes diferencias en el estado hídrico existentes entre las plantas control y las plantas estresadas. El segundo componente estuvo formado por las medidas de pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores y se denominó como «Componente de Pigmentos», relacionándose con la interacción clon-tratamiento ( $P = 1,24 \times 10^{-04}$ ). Por último, el tercer componente agrupó las variables relacionadas con el crecimiento aéreo y los parámetros de intercambio gaseoso. Este «Componente de Crecimiento» se relacionó tanto con el factor clon como con la interacción clon-tratamiento ( $P = 6,36 \times 10^{-07}$  y  $P = 1,70 \times 10^{-07}$ , respectivamente).



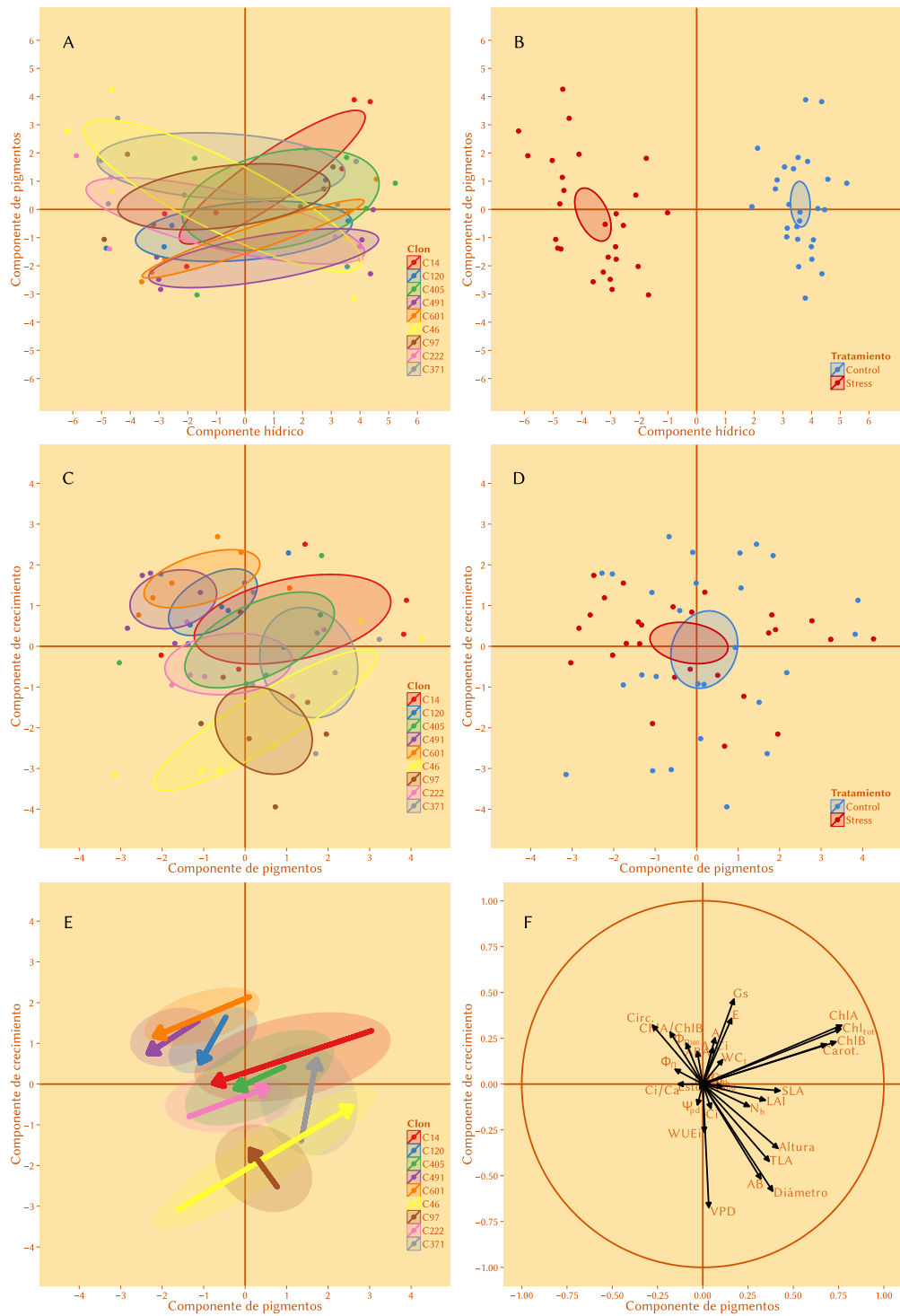


Figura 5.1: Mapas de factores del PCA. Distribución de las muestras (A) por clon y (B) tratamiento en función de los componentes Hídrico y de Pigmentos. Distribución de los individuos (C) por clon y (D) tratamiento en función de los componentes de Pigmentos y de Crecimiento. Se muestran las elipses de confianza al 95 % y los puntos de las medias de cada réplica experimental ( $n = 3$ ). (E) Dirección del cambio en la distribución debido al tratamiento. Las flechas indican el sentido del cambio en la distribución desde la situación control a la situación de estrés. (F) Contribución individual de cada variable a los componentes de Pigmentos y de Crecimiento. Las flechas indican la intensidad y el sentido de la contribución.

Tabla 5.3: Resumen del PCA. Se muestran los parámetros más importantes ( $| \text{correlación} | > 0,350$ ) que contribuyen a cada componente principal obtenido. La correlación indica la intensidad de la contribución del parámetro al componente principal correspondiente. Los factores relacionados significativamente con cada componente principal se muestran en la parte inferior de la tabla.  $R^2$  indica la correlación del ajuste lineal.

«COMPONENTE HÍDRICO» (45,7 % DE VARIACIÓN)			«COMPONENTE DE PIGMENTOS» (10,9 % DE VARIACIÓN)			«COMPONENTE DE CRECIMIENTO» (8,1 % DE VARIACIÓN)		
PARÁMETRO	CORRELACIÓN	p	PARÁMETRO	CORRELACIÓN	p	PARÁMETRO	CORRELACIÓN	p
WCh	0,948	$1,28 \cdot 10^{-27}$	Chl <sub>a</sub>	0,768	$1,25 \cdot 10^{-11}$	VPD	-0,674	$2,29 \cdot 10^{-08}$
$\Psi_{ind}$	0,942	$2,55 \cdot 10^{-26}$	Chl <sub>r</sub>	0,763	$1,97 \cdot 10^{-11}$	Diámetro tallo	-0,584	$3,50 \cdot 10^{-06}$
$\Psi_{pd}$	0,932	$1,40 \cdot 10^{-24}$	Chl <sub>b</sub>	0,736	$2,20 \cdot 10^{-10}$	AB	-0,517	$6,21 \cdot 10^{-05}$
WCt	0,907	$3,29 \cdot 10^{-21}$	Carotenoides	0,684	$1,21 \cdot 10^{-08}$	TLA	-0,422	$1,50 \cdot 10^{-03}$
RWC <sub>h</sub>	0,896	$5,64 \cdot 10^{-20}$	SLA	0,427	$1,29 \cdot 10^{-03}$	Altura tallo	-0,351	$9,32 \cdot 10^{-03}$
A	0,864	$4,23 \cdot 10^{-17}$	Altura tallo	0,415	$1,80 \cdot 10^{-03}$	Gs	0,464	$4,10 \cdot 10^{-04}$
E	0,863	$4,35 \cdot 10^{-17}$	Diámetro tallo	0,386	$3,93 \cdot 10^{-03}$	E	0,359	$7,72 \cdot 10^{-03}$
A/Ci	0,856	$1,67 \cdot 10^{-16}$	TLA	0,367	$6,38 \cdot 10^{-03}$			
$\Phi_{II}$	0,845	$9,23 \cdot 10^{-16}$						
Gs	0,782	$2,87 \cdot 10^{-12}$						
N <sub>h</sub>	0,774	$6,67 \cdot 10^{-12}$						
WUEi	0,725	$5,83 \cdot 10^{-10}$						
TLA	0,714	$1,38 \cdot 10^{-09}$						
Ci	-0,775	$5,94 \cdot 10^{-12}$						
FACTOR	$R^2$	p	FACTOR	$R^2$	p	FACTOR	$R^2$	p
Tratamiento	0,920	$2,81 \cdot 10^{-30}$	Clon: Tratamiento	0,668	$1,24 \cdot 10^{-04}$	Clon: Tratamiento	0,784	$1,70 \cdot 10^{-07}$
Clon: Tratamiento	0,980	$2,90 \cdot 10^{-25}$	Clon	0,299	0,03	Clon	0,600	$6,36 \cdot 10^{-07}$

El establecimiento de los componentes principales permitió el agrupamiento de los clones en función del comportamiento expresado durante el ensayo de sequía (Figura 5.1). La representación gráfica del «Componente Hídrico» (Figura 5.1A y B) resultó en la separación de las muestras únicamente en función del tratamiento al que fueron sometidas, dificultando así la identificación de los efectos debidos al clon o la interacción, ya que el estrés hídrico impuesto modificó las respuestas expresadas por las plantas con respecto a aquellas sin déficit en el aporte hídrico (Figura 5.1B). En contraste, la representación del «Componente de Pigmentos» y del «Componente de Crecimiento» (Figura 5.1C-F) permite la visualización de los efectos debidos al clon y a la interacción, incluso en relación con los parámetros hídricos, independientemente de la condición debida al tratamiento, tal y como se muestra en la Figura 5.1D. Así pues, los clones muestran un comportamiento diferencial en estos dos componentes:

- A. Los clones *C120*, *C491* y *C601* se localizaron en el cuadrante superior izquierdo, implicando valores bajos de crecimiento y pigmentación.
- B. El clon parental *C14* y el clon *C405* se dispusieron en el cuadrante superior derecho y en el centro de la gráfica, es decir, presentaron valores de crecimiento y pigmentación medios.
- C. Los clones *C46*, *C97*, *C222* y *C371* se localizaron entre el centro y el cuadrante inferior derecho, lo que implica valores mayores de crecimiento y un contenido medio en pigmentos.

Con respecto a la interacción clon-tratamiento, en la Figura 5.1E se representa el cambio en la localización de los centroides de cada clon en función del tratamiento al que han sido sometidos. De esta manera se identifican tres estrategias diferentes en el comportamiento de los clones de *E. globulus* frente al estrés hídrico severo:

- A. Los clones *C14*, *C120*, *C405*, *C491* y *C601* modificaron su posición hacia valores más bajos de los dos componentes cuando comparamos control y estrés.
- B. Los clones *C46* y *C222* cambiaron hacia valores positivos en ambos componentes.
- C. Los clones *C97* y *C371* derivaron hacia valores positivos sólo en el «Componente de Crecimiento»

Finalmente, la Figura 5.1F muestra la contribución individual de cada variable medida en cada componente representado («Componente de Crecimiento» y «Componente de Pigmentos»), tal y como también se muestra en la Tabla 5.3.

La agrupación de las variables obtenida mediante el PCA fue confirmada y ampliada en el análisis de clúster presentado en la Figura 5.2. Las respuestas mostradas por los clones de *E. globulus* se agruparon en cuatro grandes clústeres:

1. Un primer clúster compuesto por el ABA y las medidas de morfología foliar
2. Un segundo clúster formado por el contenido en pigmentos y las variables relacionadas con el intercambio gaseoso
3. El tercer clúster agrupó las variables relacionadas con el estado hídrico de la planta y la actividad estomática

4. Por último, un cuarto clúster agrupando las medidas de crecimiento aéreo y foliar

Por otro lado, los clones se agruparon en torno a dos clústeres principales, separando las plantas control de las plantas estresadas. Estos dos clústeres se formaron únicamente en base a la diferencia entre las condiciones hídricas de los dos tratamientos, ya que todas las plantas sometidas a sequía presentaron valores inferiores en las variables relacionadas con el contenido en agua. Dentro de estos dos clústeres principales los clones se dividen en dos grupos separados por sus respuestas diferenciales, obteniéndose exactamente la misma agrupación en los tratamientos. Estos dos grupos los hemos nombrado en base al clon más destacado en cada uno de ellos:

1. «Clúster  $C_{14}$ », compuesto por los clones  $C_{14}$ ,  $C_{120}$ ,  $C_{405}$ ,  $C_{491}$  y  $C_{601}$ . Las respuestas de este grupo al estrés hídrico involucraron un ligero incremento en el contenido de pigmentos al mismo tiempo que una reducción drástica de la  $E$  y la  $G_s$ . Como resultado, los parámetros hídricos de este grupo permanecen a niveles

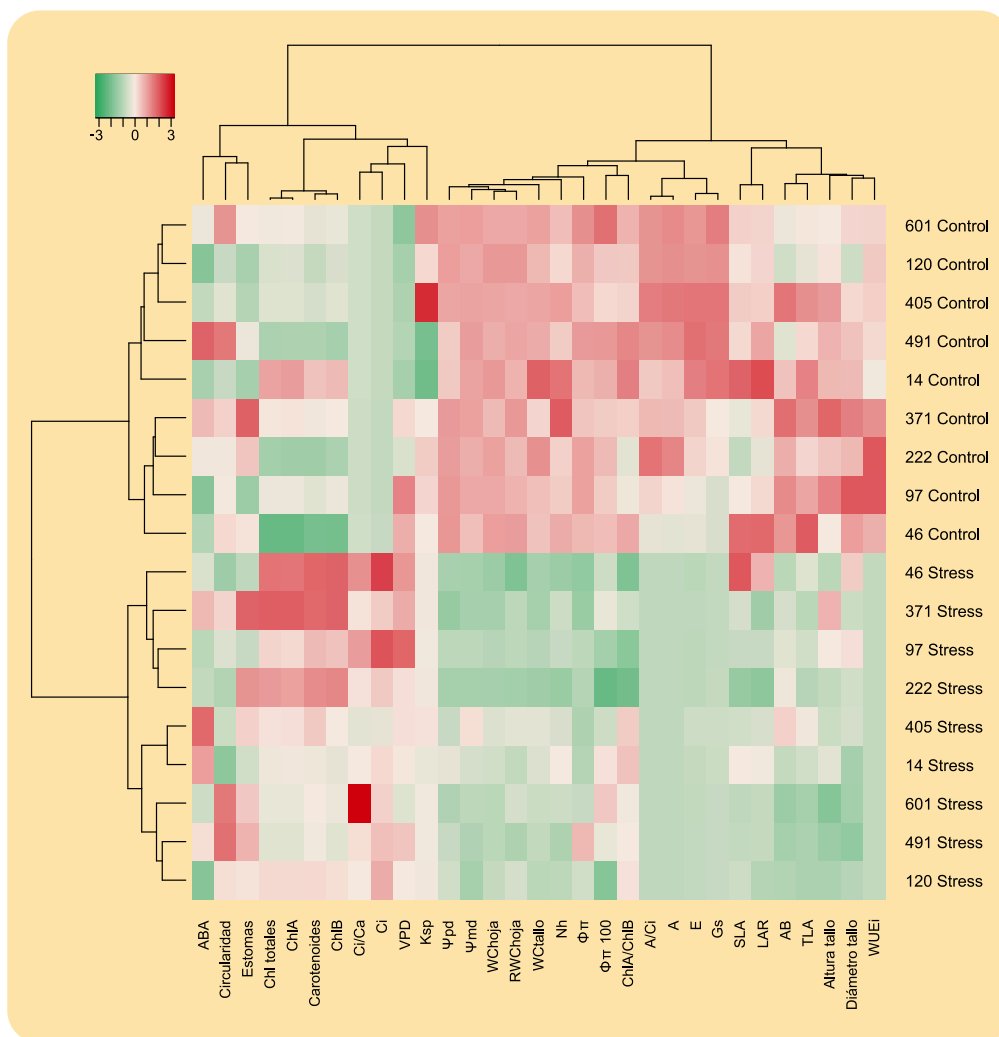


Figura 5.2: Dendrogramas y mapa de calor obtenidos en el análisis de cluster jerárquico aglomerativo. Los colores del mapa de calor indican los valores inferiores (en verde), iguales (en blanco) y por encima (en rojo) de la media de cada variable. Los dendrogramas se formaron a partir de las réplicas experimentales ( $n = 3$ ).

altos incluso en condiciones de estrés. Además, el crecimiento aéreo y los índices de área foliar se reducen durante el estrés para estos clones.

2. «Clúster C<sub>46</sub>», formado por los clones restantes, C<sub>46</sub>, C<sub>97</sub>, C<sub>222</sub> y C<sub>371</sub>. En este grupo, durante la situación de sequía los niveles de pigmentos y de **Ci** se vieron incrementados drásticamente, mientras que la **E** y la **Gs** se redujeron ligeramente. El contenido hídrico de estos clones en situación de estrés se redujo notablemente, y aunque el crecimiento aéreo y foliar se vieron afectados por el tratamiento, los miembros de este grupo presentaron los valores más altos de crecimiento en ausencia de un aporte hídrico suficiente.

El comportamiento de los niveles hormonales y la morfología foliar fue similar en ambos grupos, aumentando el contenido de **ABA** y el número de estomas y reduciendo la circularidad de las hojas, cuando se someten a estrés hídrico, si bien el grado de modificación de estos parámetros fue mayor en el «Clúster C<sub>14</sub>».

#### 5.4 DISCUSIÓN

Los análisis multivariantes confirman los resultados obtenidos por los análisis clásicos y además permiten ampliar la información obtenida indicando relaciones entre variables y clones de una manera más eficiente.

El **MANOVA** señaló la existencia de diferencias debidas al tratamiento y/o al clon, los mismos resultados que los obtenidos en los **ANOVA** individuales. Por otro lado, el **PCA** permitió agrupar los clones gracias a la reducción de variables realizada por este análisis, pero aún más importante, posibilitó la visualización de las diferentes estrategias seguidas por cada clon de *E. globulus* al enfrentarse al estrés hídrico impuesto (Figura 5.1E). Sin embargo, aunque el agrupamiento producido por el **PCA** permite identificar o señalar ciertos parámetros como responsables de los cambios en el comportamiento de las plantas, es necesario un análisis posterior, como el análisis de clúster, para poder obtener una visión general de las relaciones entre parámetros y clones.

El agrupamiento de clones obtenido en el **PCA** y el análisis de clúster justifica las diferencias que se encontraron en las comparaciones dos a dos del test **Tukey-HSD** (Figura A.1 y Figura A.2). Gracias a estos dos análisis, las respuestas fisiológicas pudieron ser agrupadas en unidades funcionales de acuerdo con los valores presentados en los diferentes tratamientos y clones, revelando diversas asociaciones reseñables. La relación **Chl<sub>A</sub>/Chl<sub>B</sub>** se localizó en el mismo clúster que las respuestas hídricas y osmóticas, indicando una adaptación a nivel fotosintético a la situación de déficit hídrico en los tejidos. La localización de la **WUE<sub>i</sub>** en el clúster de crecimiento en vez de en el clúster de parámetros hídricos reafirma la relación existente entre la **WUE<sub>i</sub>** y el rendimiento del crecimiento como se ha indicado en trabajos previos (Monclus *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2010). El pequeño efecto del **ABA** mostrado por el **PCA** y la distancia de su clúster con respecto al resto de clústeres apuntan que el **ABA** tiene una función limitada en las fases finales de un estrés hídrico severo. Sin embargo, los clones pertenecientes al «Clúster C<sub>14</sub>» fueron una excepción, manteniendo niveles altos de **ABA** al final del estrés impuesto, lo que probablemente se relacione con la incapacidad de estos clones menos

tolerantes de mantener la homeostasis del ABA bajo un estrés a largo plazo, tal y como mencionan Sreenivasulu *et al.* (2012) en su revisión.

El análisis de los resultados obtenidos en este capítulo permite la identificación de dos grupos distintos de clones de *E. globulus*, independientemente de si existe déficit hídrico o no. El primer grupo, «Clúster C14», compuesto por el clon parental C14 y aquellos clones hijos con un comportamiento similar (C120, C405, C491 y C601), mientras que el segundo grupo, «Clúster C46», agrupa aquellos clones hijos (C46, C97, C222 y C371) con un comportamiento diferencial con respecto al clon parental. La tolerancia a la restricción en el aporte hídrico es distinta para los dos grupos, lo que se ve ilustrado por el hecho de que el «Clúster C46» puede sobrevivir bajo condiciones más secas que el «Clúster C14». Las diferencias de comportamiento en las situaciones control y estrés permiten establecer las estrategias seguidas por los dos grupos de clones:

- A. «Clúster C14»: Este grupo de clones presentó un elevado ajuste estomático con los valores de  $E$  y  $G_s$  reducidos drásticamente (12-15 veces menores) en situación de estrés hídrico severo, indicando una estrategia basada en un ajuste estomático, tal y como indican otros autores (Chaves *et al.*, 2002; Medrano *et al.*, 2002; Warren *et al.*, 2007). También mostraron un incremento pequeño (10-15 %) del contenido de pigmentos y el  $N_h$  y el TLA se redujeron solo hasta un 40 % durante la sequía, indicando una adaptación a sequía mediada fundamentalmente por cambios morfológicos a nivel foliar, tal y como indican los valores de SLA y circularidad de las hojas. Por último, este grupo presentó los valores más bajos de crecimiento en estrés severo. Todos los cambios en los parámetros fisiológicos de estos clones van dirigidos a mantener el agua en los tejidos a cualquier coste, como evidencian los niveles del RWC en hojas y tallo, con descensos menores al 25 %, lo que concuerda con los resultados obtenidos en estudios previos (Pita & Pardos, 2001; Pita *et al.*, 2005). Este «mantenimiento» hídrico se ve reflejado en la reducción ligera del potencial osmótico, menos de un 50 %, indicando la necesidad de conservar un alto contenido hídrico en estrés para poder mantener sus funciones fisiológicas, siendo incapaces de sobrevivir cuando la FC cae por debajo del 13 %. La presencia de altos niveles de ABA en estos clones indica que en los estados finales del estrés severo existe una señalización activa pero tardía.
- B. «Clúster C46»: Los clones pertenecientes a este grupo fueron capaces de resistir una drástica pérdida de agua, más intensa que en el «Clúster C14». Para tolerar niveles tan bajos en el RWC, estos clones presentaron un mayor ajuste osmótico, con un acusado descenso, más del 50 %, en los valores de  $\Phi_{II}$  y  $\Phi_{III00}$  (Merchant *et al.*, 2007). Además, este grupo dirigió sus esfuerzos a mantener la actividad fotosintética durante la situación de estrés hídrico mediante incrementos de hasta 2 veces en el contenido de pigmentos, lo que indica la ausencia de una fotoprotección activa (Shvaleva *et al.*, 2006), así como la reducción en la proporción  $Chl_A/Chl_B$  para poder mantener la actividad (Liu *et al.*, 2011). En el caso de estos clones, hubo un menor ajuste estomático, con valores en los parámetros estomáticos 10 veces menores, lo que permitió una mayor acumulación de  $CO_2$  en estas plantas y sobre todo, un mayor crecimiento en altura y diámetro, si bien el TLA y el  $N_h$  se redujeron un 60 % en situación de estrés, viéndose afectados en mayor medida que en el «Clúster C14». La morfología foliar se vio menos influi-

da, indicando una menor plasticidad fenotípica en estos clones, en contraste con los resultados obtenidos en otras especies de *Eucalyptus* (Nouvellon *et al.*, 2010). Como resultado de esta estrategia general, los clones pertenecientes al «Clúster C46» son capaces de prolongar su supervivencia, mostrando al mismo tiempo los mayores valores de crecimiento de todos los clones estudiados.

Las estrategias descritas para los dos grupos de clones de *E. globulus* indican que diferentes clones se comportan de distinta manera en la misma situación de estrés abiótico, limitado, eso sí, dentro del rango posible de las respuestas de *Eucalyptus*. De hecho, este comportamiento diferencial es similar al presentado por Ludlow (1989) en su clasificación de las plantas, dividiéndolas en *derrochadoras de agua* y *ahorradoras de agua*. El «Clúster C14» presenta un comportamiento típico de *ahorradores de agua*, mostrando un ajuste osmótico notable, así como menores reducciones del agua en los tejidos. El resto de clones, el «Clúster C46», presentaron la respuesta clásica de *derrochadores de agua*, manteniendo altos niveles de transpiración, fotosíntesis y crecimiento. Este resultado es sorprendente, ya que con esta estrategia estos clones han conseguido sobrevivir a valores más bajos de FC y a DL<sub>50</sub> más altas. Esto indica la posibilidad de poder seleccionar clones altamente productivos que sean capaces de tolerar limitaciones hídricas. Además, la variación clonal en las respuestas a estreses abióticos indicada por Pita & Pardos (2001) está presente en las respuestas de los clones de *E. globulus*, con éstos comportándose de dos maneras diferenciadas, e incluso dentro de cada grupo, modificando cada clon su respuesta en un grado diferente.

La combinación de indicadores de sequía conocidos con técnicas de análisis multivariantes presentada en este capítulo puede ser usada para una selección a gran escala rápida de material clonal de especies forestales, así como las estrategias desarrolladas pueden ayudar en la identificación y selección de los mejores clones para cada propósito, como se ha visto en estudios similares (De Diego *et al.*, 2012; Correia *et al.*, 2014). En conclusión, el método descrito en este capítulo sirve como un estudio preliminar que permite identificar rápidamente y reducir la cantidad de material necesario para futuros estudios de heredabilidad y variación genotípica, estudios que siguen siendo necesarios.

## Parte V

### DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES







## DISCUSIÓN GENERAL

---

Pese a toda la información disponible generada en las últimas décadas sobre el estrés hídrico en plantas gracias a los trabajos realizados con diferentes especies sometidas a diversas situaciones estresantes, quedan por definir en profundidad procesos tan importantes como la percepción y la transmisión de las señales en la planta completa. Esto se debe a dos hechos fundamentales, por un lado la diversidad en las respuestas existente entre diferentes especies, entre diferentes genotipos dentro de una especie e incluso en diferentes órganos dentro de los genotipos (Pita *et al.*, 2005). Por otro lado está la dificultad para la inducción de un estímulo estresante puntual y localizado que permita seguir, en toda la planta, la evolución desde la señalización hasta la cascada completa que origina una determinada respuesta. Pese a ello, tanto en la percepción como en la transmisión del estrés hídrico en las plantas hay aspectos claramente establecidos, como la participación del ABA en ambos (Cutler *et al.*, 2010).

Este regulador es el nexo coordinador de las respuestas al estrés abiótico en general, especialmente en el estrés por sequía, integrando tanto modificaciones fisiológicas como moleculares. En algunos casos, como en el control estomático, la acción del ABA es directa (Comstock, 2002), de la misma manera que en la activación de determinados genes por la vía dependiente de ABA, donde la recepción de la hormona inicia el proceso (Seki *et al.*, 2007; Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Sin embargo, en respuestas a largo plazo que implican tejidos y órganos con mayor complejidad, el papel del ABA ya no resulta tan evidente, ya que se pueden producir interacciones con otros reguladores o cambios de sensibilidad en los diferentes tejidos diana.

El desarrollo de un sistema de cultivo en el que poder aislar la señal de estrés y localizarla en un solo órgano, la raíz, ha permitido poner de manifiesto la participación del ABA en la señalización química a larga distancia raíz-tallo en eucalipto, así como la secuencia de procesos fisiológicos en los que parece estar implicada. Asimismo, se ha corroborado que su actuación es posterior a los cambios en el pH del líquido xilemático, aspecto indicado por otros autores (Dodd, 2005), y que produce modificaciones en la translocación de la fitohormona entre los tejidos. La secuencia general de acontecimientos se resume en la Figura 6.1, observándose el incremento del pH y del ABA xilemático en raíces en la fase de inducción del estrés, antes de alcanzar la situación de estrés constante. Posteriormente se produce el incremento del ABA en el xilema de tallo, coincidiendo con las modificaciones morfológicas y fisiológicas observadas. Esto ha permitido identificar la concentración de ABA en el xilema como factor determinante en las respuestas fisiológicas de las plantas en el estrés hídrico a corto plazo y no la cantidad presente en los tejidos aéreos, lo que pudo haber influido en los resultados obtenidos en el estudio a largo plazo de los clones de *E. globulus* (Capítulo 5 y Granda *et al.* 2014), donde a pesar de poder definir dos estrategias diferentes de respuesta según lo establecido por Ludlow (1989), no se ha podido asignar a la presencia de esta hormona en los tejidos un papel determinante en ninguna de ellas.

El ABA también influye de manera importante en la expresión de genes relacionados con el estrés en la parte aérea, principalmente en los genes reguladores o de coordinación, que muestran una correlación directa y causal con el ABA, especialmente con el contenido en el xilema, con unos patrones de expresión similares a las dinámicas de la hormona. Tanto *HDA6*, implicada en modificaciones epigenéticas que conllevan cambios en los patrones de expresión génica (Chinnusamy *et al.*, 2008), como *PDR*, importante en la coordinación temporal de las respuestas relacionadas con ABA (Kang *et al.*, 2010), muestran un comportamiento típico de los genes activados por la vía dependiente de ABA. Sin embargo, como podemos ver en la Figura 6.1 parte de la respuesta de activación génica, la correspondiente a los genes de síntesis y estructurales, es previa a la señalización hormonal en tallo, indicando la presencia de otros tipos de señales químicas o físico-químicas como el pH, los potenciales hídricos o la conductancia hidráulica (Schachtman & Goodger, 2008). La existencia de una activación génica independiente del ABA en respuesta al estrés no es sorprendente, como se ha visto anteriormente (Shinozaki *et al.*, 2003; Seki *et al.*, 2007), pero su localización en órganos no sometidos directamente al estrés, como es la parte aérea de las plantas del clon C14,

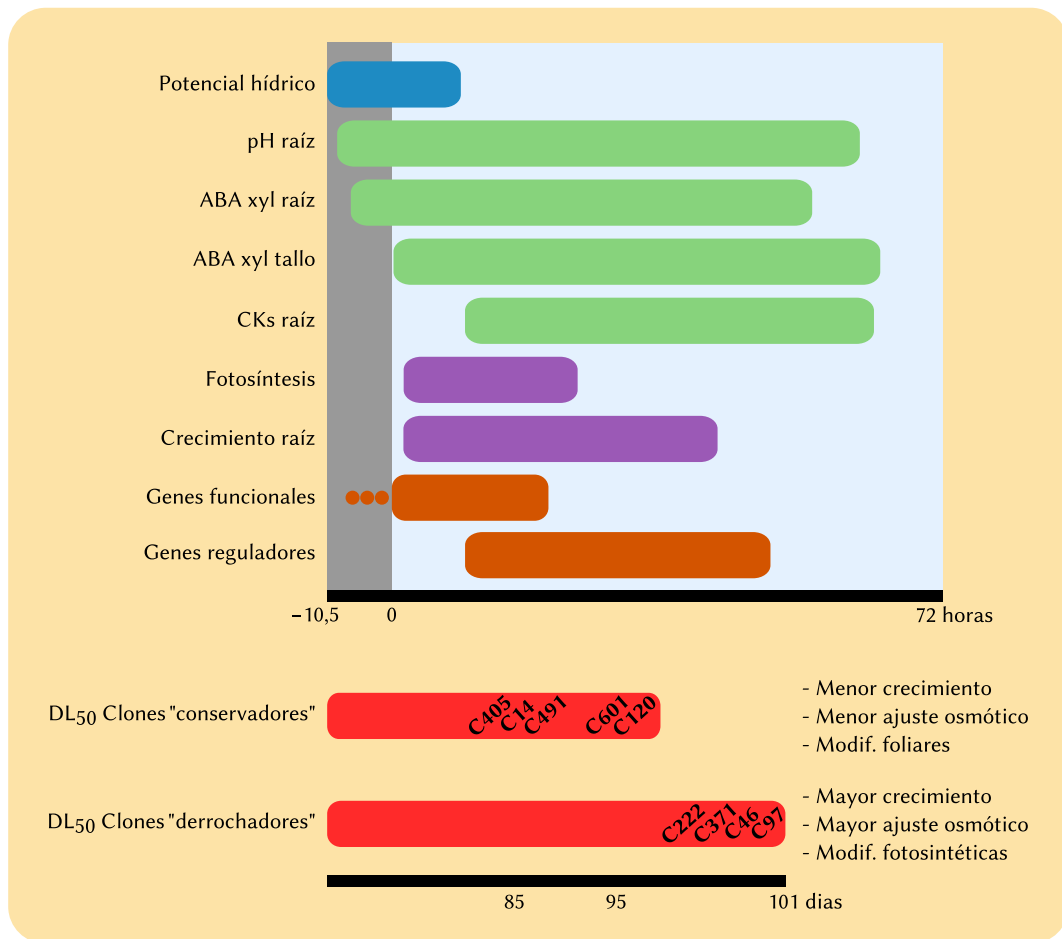


Figura 6.1: Resumen general de las dinámicas fisiológicas, hormonales y moleculares en estrés a corto plazo y supervivencia de los clones a largo plazo. En el corto plazo se representan las horas en donde se localiza el inicio y mantenimiento de la divergencia entre tratamientos. DL<sub>50</sub>: Número de días en los que la mitad de plantas de cada clon mostró síntomas irreversibles de sequía.

obliga a valorar la existencia de otro tipo de detección y señalización del estrés a larga distancia, como los citados anteriormente o las CKs. El papel de estas fitohormonas en la comunicación raíz-tallo de estreses abióticos, como la deficiencia en nutrientes y en otros sistemas experimentales, está ampliamente documentada (Davies *et al.*, 2005; Rahayu *et al.*, 2005).

En el trabajo presentado en esta tesis no se ha podido corroborar el posible papel de las CKs como señal química debido a las limitaciones en la cantidad de líquido xilemático obtenido de las plantas y, al igual que ocurre con el ABA, es posible que su contenido en las partes de planta analizadas no sea representativo de su papel señalizador. No obstante, el sistema experimental desarrollado abre la posibilidad de realizar este tipo de estudios en mayor profundidad en un futuro.

Los parámetros hídricos y la cuantificación de las medidas de crecimiento, como son el incremento de peso y las relaciones alométricas, permiten constatar que la respuesta de adaptación de las plantas del clon C14 frente al estrés hídrico puntual se produce muy rápidamente (0 a 24 h). Por otro lado, la definición de las estrategias de aclimatación a un estrés prolongado de los descendientes del clon C14 en su cruzamiento con una madre de bajo valor biológico mostró la existencia de dos grupos de clones que modifican su crecimiento en respuesta al estrés de manera diferente, dejando abierta la posibilidad de profundizar en el desencadenante de la respuesta a corto plazo en el grupo de clones «derrochadores». Además, la caracterización del modelo de respuesta, la reducción y síntesis de las variables en *meta*-componentes, así como la agrupación de materiales vegetales según ese modelo, permitirían contrastar la validez de las respuestas observadas y hacerlo extensible a otros clones con la misma estrategia, simplificando el volumen de datos necesarios para la definición de nuevos materiales vegetales. De hecho, la estrategia presentada por el «Clúster C46», con una tasa de crecimiento mayor con aportes hídricos reducidos, así como una DL<sub>50</sub> mayor que el «Clúster C14», demuestra la variabilidad presente en las respuestas a nivel de clon en *E. globulus*. Esto hace suponer que la capacidad de respuesta de esta especie está aún poco explorada y que es posible hacer confluír los intereses productivos con una mayor tolerancia al estrés, tal y como muestra este grupo de clones.

La selección de materiales vegetales para fines ambientales o productivos entraña riesgos importantes que han de ser asumidos, sopesando el interés por seleccionar un clon concreto que aun siendo más productivo puede enfrentarse al problema de cambios imprevisibles en las condiciones climáticas que provoquen su decaimiento. Así, la obtención de un amplio rango de materiales vegetales adecuados para distintas condiciones ambientales permite, entre otras ventajas, reducir este riesgo mediante la mezcla de diferentes genotipos, así como, en el caso de que se quisiera asumir, poder seleccionar el clon más indicado para una plantación monoclonal, mediante el uso de las técnicas y análisis mostrados en el último capítulo de esta tesis.



## CONCLUSIONES

---

1. El sistema experimental desarrollado es capaz de inducir un estrés hídrico rápido y severo de manera controlada. Este sistema ha demostrado ser robusto y repetitivo, tanto para realizar análisis fisiológicos como moleculares.
2. Frente a un déficit hídrico rápido y severo, *E. globulus* responde con modificaciones fisiológicas que ocurren en el transcurso de las primeras horas. Los datos obtenidos confirman como señales químicas principales los cambios en el pH xilemático y el ABA.
3. El ABA ha demostrado ser el candidato más idóneo como marcador de tolerancia a sequía en plantas juveniles de *E. globulus*. Su interacción con todos los procesos fisiológicos y moleculares analizados demuestra su papel como coordinador de la respuesta al estrés hídrico.
4. La fuerza promotora principal de los cambios en la expresión de genes relacionados con el estrés hídrico es el ABA xilemático, más que las variaciones del contenido de esta fitohormona en los tejidos apicales de las plantas de *E. globulus*.
5. *TUA2* y *GAPDH* en tallo, y *L2* y *CYP* en raíz, se expresan de manera estable, por lo que se establecen como los HKG más recomendables para los estudios moleculares en *E. globulus* en cultivo hidropónico.
6. La *HDA6* y la *PDR* integran las respuestas fisiológicas y moleculares del estrés hídrico rápido y severo, mostrando una relación causal con el ABA.
7. *CESA*, *NCED*, *STS-like* y *PX27*, todos ellos genes funcionales o de síntesis, no se ven afectados, al menos directamente, por el ABA, implicando una acción indirecta o una activación independiente de esta fitohormona.
8. La ausencia de relación causal entre la *NCED* y el ABA en el sistema experimental propuesto en todas las partes de la planta donde se ha analizado esta fitohormona implica, por un lado, una regulación de este gen por vías independientes del ABA y, por otro, que los procesos de transporte y translocación de ABA en los momento iniciales del estrés son tan importantes como la biosíntesis *de-novo*.
9. Las modificaciones fisiológicas frente a la sequía a largo plazo presentadas por diversos clones de *E. globulus* permiten identificar al menos dos estrategias diferentes de respuesta, agrupando los clones en aquellos que se muestran como *derrochadores de agua*, pero que son capaces de mantener un mayor crecimiento durante más tiempo y aquellos que presentan una estrategia conservadora y que, sorprendentemente, no son capaces de sobrevivir a situaciones tan limitantes como las del grupo anterior.

10. Las variables definitorias de las estrategias mostradas por los clones de *E. globulus* estudiados se han podido agrupar en tres *meta*-componentes fisiológicos (Hídrico, Pigmentación y Crecimiento), lo que permite reducir su número de cara a la asignación de individuos a una estrategia determinada.
11. La metodología propuesta para el análisis del estrés hídrico a largo plazo ha demostrado ser capaz de sintetizar una gran cantidad de información y permite la discriminación de comportamientos fisiológicos diferentes integrando y ponderando gran cantidad de pequeños cambios dentro de los rangos en que se encuentran en una especie como *E. globulus*.

Parte VI

APÉNDICE





APÉNDICE A

Tabla A.1: ANOVAs individuales de los parámetros analizados en el estrés hídrico a largo plazo.  
 Df: Grados de libertad; SumaC: Suma de cuadrados; MediaC: Media de cuadrados;  
 Sig: Nivel de significancia (\*\* $p < 0,001$ ; \* $p < 0,010$ ; \* $p < 0,050$ ).

PARÁMETRO	FACTOR	DF	SumaC	MediaC	VALOR F	p	SIGNIFICANCIA
ABA	Clon	6	140,00	23,41	2,893	0,026	*
	Tratamiento	1	14,59	14,59	1,804	0,191	
	Clon:Tratamiento	6	191,78	31,96	3,950	0,006	***
	Residuales	27	218,47	8,09			
Circularidad	Clon	8	0,035	0,004	5,405	$1,7 \cdot 10^{-04}$	***
	Tratamiento	1	0,001	0,001	1,208	0,279	
	Clon:Tratamiento	8	0,006	0,001	0,873	0,548	
	Residuales	36	0,029	0,001			
Densidad estomática	Clon	8	2504	313	8,249	$2,8 \cdot 10^{-06}$	***
	Tratamiento	1	254	254	6,705	0,014	*
	Clon:Tratamiento	8	349	43,65	1,150	0,355	
	Residuales	36	1366	37,95			
Chl <sub>T</sub>	Clon	8	$1,2 \cdot 10^{05}$	15030	2,325	0,040	*
	Tratamiento	1	$1,5 \cdot 10^{05}$	$1,5 \cdot 10^{05}$	24,129	$2,0 \cdot 10^{-05}$	***
	Clon:Tratamiento	8	$2,7 \cdot 10^{05}$	34761	5,378	$1,7 \cdot 10^{-04}$	***
	Residuales	36	$2,3 \cdot 10^{05}$	6464			
Chl <sub>A</sub>	Clon	8	74496	9312	2,343	0.039	*
	Tratamiento	1	86136	86136	21,669	$4,3 \cdot 10^{-05}$	***
	Clon:Tratamiento	8	$1,6 \cdot 10^{05}$	20581	5,178	$2,4 \cdot 10^{-04}$	***
	Residuales	36	$1,4 \cdot 10^{05}$	3975			
Carotenoides	Clon	8	2045	256	1,929	0.086	
	Tratamiento	1	6388	6388	48,218	$3,9 \cdot 10^{-08}$	***
	Clon:Tratamiento	8	5551	694	5,237	$2,1 \cdot 10^{-04}$	***
	Residuales	36	4769	133			
Chl <sub>B</sub>	Clon	8	6025	753	2,430	0.033	*
	Tratamiento	1	10289	10289	33,19	$1,5 \cdot 10^{-06}$	***
	Clon:Tratamiento	8	14885	1861	6,002	$6,6 \cdot 10^{-05}$	***
	Residuales	36	11160	310			

PARÁMETRO	FACTOR	DF	Sumac	Mediac	VALOR F	p	SIGNIFICANCIA
Ci/Ca	Clon	8	444	55,45	0,951	0,489	
	Tratamiento	1	610	610	10,453	0,003	**
	Clon:Tratamiento	8	439	54,81	0,940	0,497	
	Residuales	36	2100	58,34			
Ci	Clon	8	$1,5 \cdot 10^{07}$	$1,9 \cdot 10^{06}$	2,644	0,022	*
	Tratamiento	1	$5,7 \cdot 10^{07}$	$5,7 \cdot 10^{07}$	75,453	$2,3 \cdot 10^{-10}$	***
	Clon:Tratamiento	8	$1,5 \cdot 10^{07}$	$1,9 \cdot 10^{06}$	2,518	0,028	*
	Residuales	36	$2,7 \cdot 10^{07}$	$7,5 \cdot 10^{05}$			
VPD	Clon	8	13,387	1,673	157	$< 2,2 \cdot 10^{-16}$	***
	Tratamiento	1	4,640	4,640	435	$< 2,2 \cdot 10^{-16}$	***
	Clon:Tratamiento	8	0,953	0,119	11,152	$9,2 \cdot 10^{-08}$	***
	Residuales	36	0,385	0,011			
K <sub>sp</sub>	Clon	8	2578	322	5,082	$2,8 \cdot 10^{-04}$	***
	Tratamiento	1	41,24	41,24	0,651	0,425	
	Clon:Tratamiento	8	2129	266	4,198	0,001	**
	Residuales	36	2283	63,40			
$\Psi_{pd}$	Clon	8	1,638	0,205	1,317	0,267	
	Tratamiento	1	80,544	80,544	518	$< 2,2 \cdot 10^{-16}$	***
	Clon:Tratamiento	8	8,090	1,011	6,504	$3,1 \cdot 10^{-05}$	***
	Residuales	36	5,598	0,155			
$\Psi_{md}$	Clon	8	7,770	0,971	6,641	$2,6 \cdot 10^{-05}$	***
	Tratamiento	1	98,415	98,415	673	$< 2,2 \cdot 10^{-16}$	***
	Clon:Tratamiento	8	5,531	0,691	4,727	$0,5 \cdot 10^{-04}$	***
	Residuales	36	5,265	0,146			
RWC <sub>h</sub>	Clon	8	668	83,4	1,282	0,283	
	Tratamiento	1	10580	10580	162,56	$6,5 \cdot 10^{-15}$	***
	Clon:Tratamiento	8	654	81,8	1,256	0,296	
	Residuales	36	2343	65,1			
RWC <sub>t</sub>	Clon	8	131	16	1,522	0,184	
	Tratamiento	1	3310	3310	308,62	$< 2,2 \cdot 10^{-16}$	***
	Clon:Tratamiento	8	82	10	0,956	0,484	
	Residuales	36	386	11			
WCt! (wcT!)	Clon	8	301	37,62	5,585	$1,3 \cdot 10^{-04}$	***
	Tratamiento	1	1993	1993	296	$< 2,2 \cdot 10^{-16}$	***
	Clon:Tratamiento	8	87,87	10,98	1,631	0,150	
	Residuales	36	242	6,73			
N <sub>h</sub>	Clon	8	9557	1195	2,851	0,015	*
	Tratamiento	1	31844	31884	75,987	$2,1 \cdot 10^{-10}$	***

PARÁMETRO	FACTOR	DF	sumac	mediac	VALOR F	p	SIGNIFICANCIA
	Clon:Tratamiento	8	2573	322	0,768	0,633	
	Residuales	36	15087	419			
$\Phi_{II}$	Clon	8	2,588	0,324	5,423	$1,6 \cdot 10^{-04}$	***
	Tratamiento	1	12,380	12,380	208	$< 2,2 \cdot 10^{-16}$	***
	Clon:Tratamiento	8	1,062	0,133	2,225	0,048	*
	Residuales	36	2,148	0,060			
$\Phi_{III100}$	Clon	8	0,439	0,055	1,952	0,082	
	Tratamiento	1	0,698	0,698	24,813	$1,6 \cdot 10^{-05}$	***
	Clon:Tratamiento	8	0,164	0,020	0,728	0,666	
	Residuales	36	1,012	0,028			
$Chl_A/Chl_B$	Clon	8	0,333	0,042	6,911	$1,7 \cdot 10^{-05}$	***
	Tratamiento	1	0,230	0,230	38,32	$3,9 \cdot 10^{-07}$	***
	Clon:Tratamiento	8	0,105	0,013	2,186	0,052	
	Residuales	36	0,217	0,006			
A/Ci	Clon	8	$3,8 \cdot 10^{-04}$	$0,4 \cdot 10^{-04}$	4,789	$4,5 \cdot 10^{-04}$	***
	Tratamiento	1	0,003	0,003	339	$< 2,2 \cdot 10^{-16}$	***
	Clon:Tratamiento	8	$3,8 \cdot 10^{-04}$	$0,4 \cdot 10^{-04}$	4,789	$4,5 \cdot 10^{-04}$	***
	Residuales	36	$3,5 \cdot 10^{-04}$	$9,9 \cdot 10^{-06}$			
A	Clon	8	44,17	5,52	8,503	$2,1 \cdot 10^{-06}$	***
	Tratamiento	1	347	347	534	$< 2,2 \cdot 10^{-16}$	***
	Clon:Tratamiento	8	44,17	5,52	8,503	$2,1 \cdot 10^{-06}$	***
	Residuales	36	23,38	0,65			
E	Clon	8	49,028	6,128	67,386	$< 2,2 \cdot 10^{-16}$	***
	Tratamiento	1	213	213	2348	$< 2,2 \cdot 10^{-16}$	***
	Clon:Tratamiento	8	32,505	4,063	44,676	$< 2,2 \cdot 10^{-16}$	***
	Residuales	36	3,274	0,091			
Gs	Clon	8	0,258	0,032	53,406	$< 2,2 \cdot 10^{-16}$	***
	Tratamiento	1	0,673	0,673	1113	$< 2,2 \cdot 10^{-16}$	***
	Clon:Tratamiento	8	0,208	0,026	43,071	$3,7 \cdot 10^{-16}$	***
	Residuales	36	0,022	$6,0 \cdot 10^{-04}$			
SLA	Clon	8	13322	1665	9,042	$1,0 \cdot 10^{-06}$	***
	Tratamiento	1	3145	3145	17,080	$2,0 \cdot 10^{-04}$	***
	Clon:Tratamiento	8	1478	185	1,003	0,451	
	Residuales	36	6630	184			
LAR	Clon	8	4407	551	8,126	$3,3 \cdot 10^{-06}$	***
	Tratamiento	1	4342	4342	64,055	$1,7 \cdot 10^{-09}$	***
	Clon:Tratamiento	8	409	51,1	0,754	0,645	
	Residuales	36	2440	67,8			

PARÁMETRO	FACTOR	DF	Sumac	Mediac	VALOR F	p	SIGNIFICANCIA
AB	Clon	8	252	31,507	4,536	$7,0 \cdot 10^{-04}$	***
	Tratamiento	1	287	287	41,258	$1,9 \cdot 10^{-07}$	***
	Clon:Tratamiento	8	43,154	5,394	0,777	0,626	
	Residuales	36	250	6,946			
TLA	Clon	8	$2,2 \cdot 10^{06}$	$2,7 \cdot 10^{05}$	4,141	0,001	**
	Tratamiento	1	$5,1 \cdot 10^{06}$	$5,1 \cdot 10^{06}$	77,388	$1,7 \cdot 10^{-10}$	***
	Clon:Tratamiento	8	$4,2 \cdot 10^{05}$	52970	0,803	0,604	
	Residuales	36	$2,4 \cdot 10^{06}$	65953			
Altura tallo	Clon	8	617	77,11	2,524	0,027	*
	Tratamiento	1	772	772	25,288	$1,4 \cdot 10^{-05}$	***
	Clon:Tratamiento	8	57,96	7,25	0,237	0,981	
	Residuales	36	1100	30,55			
Diámetro tallo	Clon	8	5,208	0,651	2,152	0,056	
	Tratamiento	1	7,163	7,163	23,675	$2,3 \cdot 10^{-05}$	***
	Clon:Tratamiento	8	1,582	0,198	0,654	0,728	
	Residuales	36	10,891	0,303			
WUEi	Clon	8	2009	251	3,849	0,002	**
	Tratamiento	1	10164	10164	156	$1,2 \cdot 10^{-14}$	***
	Clon:Tratamiento	8	2009	251	3,846	0,002	**
	Residuales	36	2351	65,3			

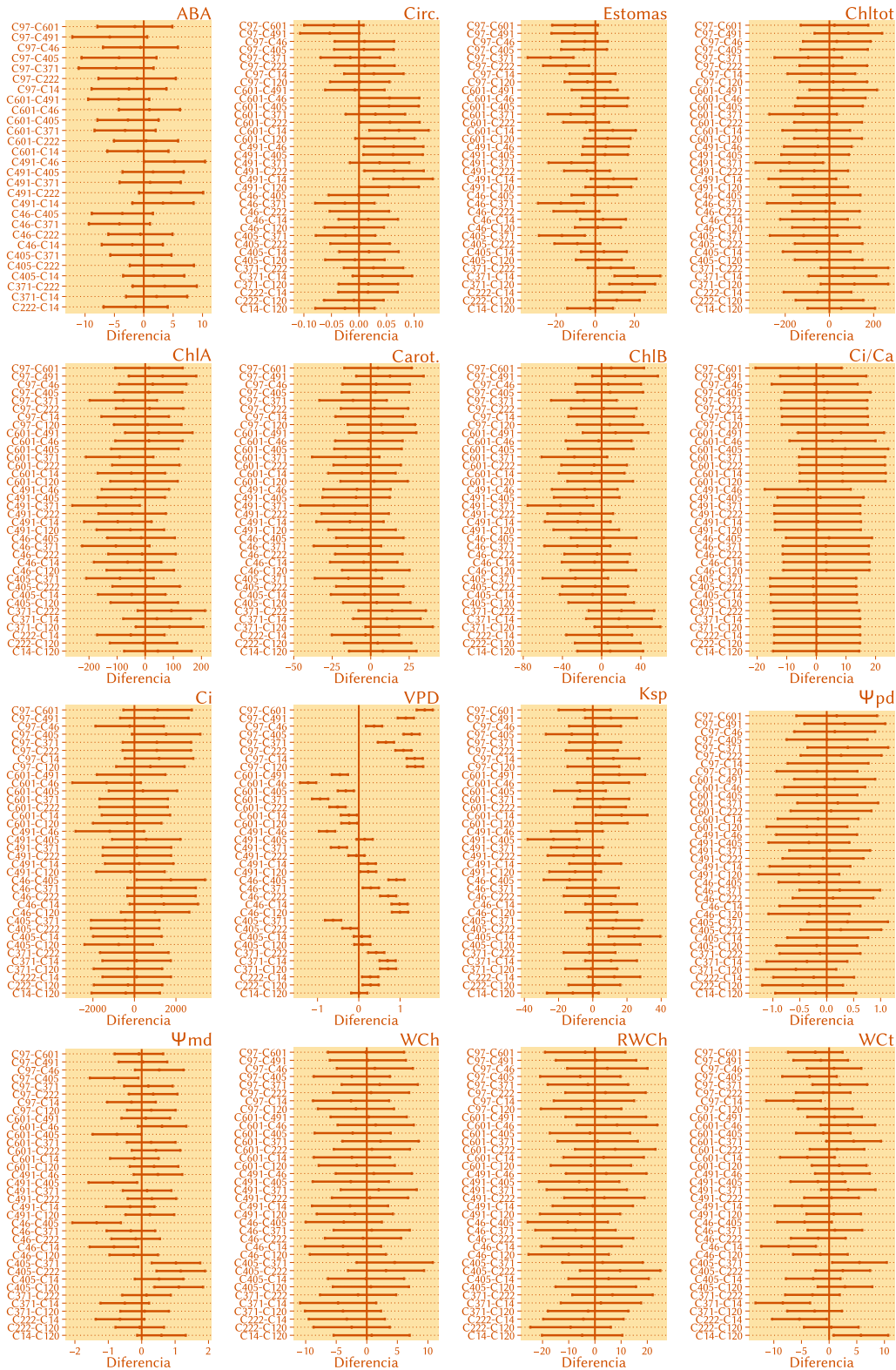


Figura A.1: Comparaciones dos a dos del test de Tukey a nivel de Clon para las variables analizadas en el ensayo de estrés hídrico a largo plazo. Se muestran las primeras 16 variables.

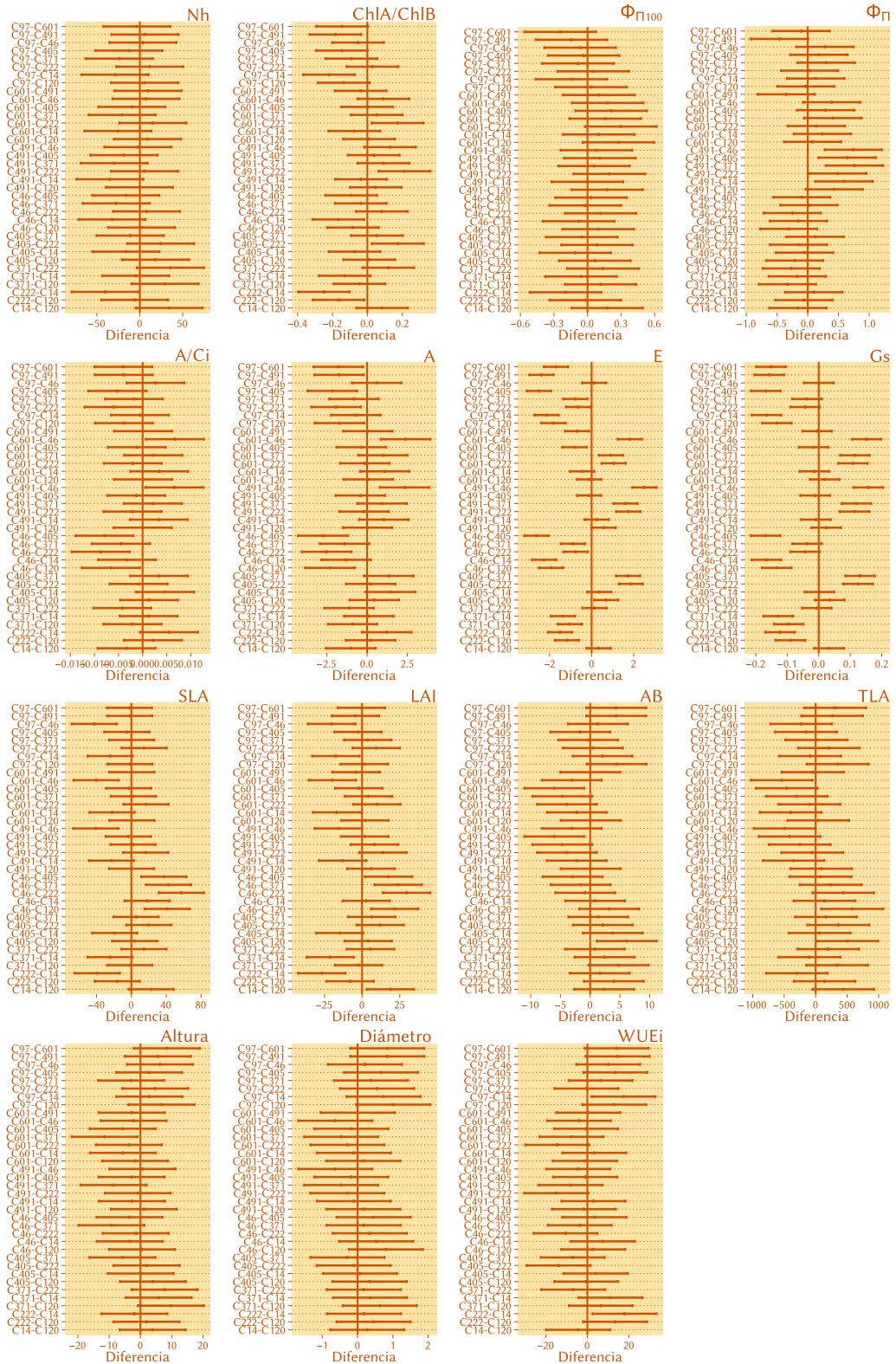


Figura A.2: Comparaciones dos a dos del test de Tukey a nivel de Clon para las variables analizadas en el ensayo de estrés hídrico a largo plazo. Se muestran las últimas 15 variables.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- ACHARYA, B.R. & ASSMANN, S.M. (2009). Hormone interactions in stomatal function. *Plant molecular biology*, 69(4): 451–462. (Citado en las páginas 39, 40, 57 y 66.)
- ADDICOTT, F., LYON, J., OHKUMA, K., THIESSEN, W., CARNS, H., SMITH, O., CORNFORTH, J., MILBORROW, B., RYBACK, G. & WAREING, P. (1968). Abscisic acid: a new name for abscisin II (dormin). *Science*, 159: 1493. (Citado en la página 10.)
- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHÄFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. & LIPMAN, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17): 3389–3402. (Citado en la página 45.)
- ANDERSEN, C.L., JENSEN, J.L. & ØRNTOFT, T.F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research*, 64(15): 5245–5250. (Citado en la página 46.)
- ARKHIPOVA, T., PRINSEN, E., VESELOV, S., MARTINENKO, E., MELENTIEV, A. & KUDOYAROVA, G. (2007). Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil. *Plant and Soil*, 292(1-2): 305–315. (Citado en la página 40.)
- ARNON, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant physiology*, 24(1): 1. (Citado en la página 73.)
- AZCÓN-BIETO, J. & TALÓN, M., *Fundamentos de Fisiología Vegetal. 2da reimpresión España: Ed (Univ. Barcelona, 2001)*. (Citado en las páginas 11 y 14.)
- BARTHOLOMÉ, J., SALMON, F., VIGNERON, P., BOUVET, J.M., PLOMION, C. & GION, J.M. (2013). Plasticity of primary and secondary growth dynamics in *Eucalyptus* hybrids: a quantitative genetics and QTL mapping perspective. *BMC plant biology*, 13(1): 120. (Citado en la página 43.)
- BEDON, F., MAJADA, J., FEITO, I., CHAUMEIL, P., DUPUY, J.W., LOMENECH, A.M., BARRE, A., GION, J.M. & PLOMION, C. (2011). Interaction between environmental factors affects the accumulation of root proteins in hydroponically grown *Eucalyptus globulus* (Labill.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(1): 69–76. (Citado en la página 53.)
- BIELESKI, R.L. (1964). The problem of halting enzyme action when extracting plant tissues. *Analytical biochemistry*, 9(4): 431–442. (Citado en la página 29.)
- BOAVA, L.P., LAIA, M.L., JACOB, T.R., DABBAS, K.M., GONÇALVES, J.F., FERRO, J.A., FERRO, M.I. & FURTADO, E.L. (2010). Selection of endogenous genes for gene expression studies in *Eucalyptus* under biotic (*Puccinia psidii*) and abiotic (acibenzolar-S-methyl) stresses using RT-qPCR. *BMC research notes*, 3(1): 43. (Citado en la página 51.)



- BOYER, G.L. & ZEEVAART, J.A. (1982). Isolation and quantitation of  $\beta$ -D-glucopyranosyl abscisate from leaves of Xanthium and spinach. *Plant physiology*, 70(1): 227–231. (Citado en la página 11.)
- BOYER, J.S. (1982). Plant productivity and environment. *Science*, 218(4571): 443–448. (Citado en la página 5.)
- BRAY, E.A. (1997). Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*, 2(2): 48–54. (Citado en la página 7.)
- BRAY, E.A., Plant Response to Water-deficit Stress. En: A.M. Hetherington (Ed.), *eLS* (John Wiley & Sons, Ltd, 2001). (Citado en la página 5.)
- BRAY, E.A. (2002). Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: An analysis using microarray and differential expression data. *Annals of Botany*, 89(7): 803–811. (Citado en la página 55.)
- BRAY, E.A. (2004). Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 55(407): 2331–2341. (Citado en la página 65.)
- BRUNNER, A.M., YAKOVLEV, I.A. & STRAUSS, S.H. (2004). Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC plant biology*, 4(1): 14. (Citado en las páginas 45 y 46.)
- BURTON, R.A., SHIRLEY, N.J., KING, B.J., HARVEY, A.J. & FINCHER, G.B. (2004). The CesA gene family of barley. Quantitative analysis of transcripts reveals two groups of co-expressed genes. *Plant physiology*, 134(1): 224–236. (Citado en la página 65.)
- CALLISTER, A.N., ARNDT, S.K., ADES, P.K., MERCHANT, A., ROWELL, D. & ADAMS, M.A. (2008). Leaf osmotic potential of *Eucalyptus* hybrids responds differently to freezing and drought, with little clonal variation. *Tree physiology*, 28(8): 1297–1304. (Citado en la página 69.)
- CARUSO, A., MORABITO, D., DELMOTTE, F., KAHLEM, G. & CARPIN, S. (2002). Dehydrin induction during drought and osmotic stress in *Populus*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(12): 1033–1042. (Citado en la página 26.)
- CENTENO, M. & GRANDA, V. (2009). Anticuerpos policlonales anti ácido (+)-2cis-4trans abscísico ((+)ABA). Oficina Española de Patentes y Marcas. 2 304 896. (Citado en las páginas 30, 54 y 73.)
- CENTENO, M., RODRÍGUEZ, A., FEITO, I. & FERNÁNDEZ, B. (1996). Relationship between endogenous auxin and cytokinin levels and morphogenic responses in *Actinidia deliciosa* tissue cultures. *Plant Cell Reports*, 16(1-2): 58–62. (Citado en la página 30.)
- CHAVES, M.M., PEREIRA, J.S., MAROCO, J., RODRIGUES, M.L., RICARDO, C.P.P., OSÓRIO, M.L., CARVALHO, I., FARIA, T. & PINHEIRO, C. (2002). How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. *Annals of Botany*, 89(7): 907–916. (Citado en las páginas 25 y 81.)
- CHAVES, M.M., MAROCO, J.P. & PEREIRA, J.S. (2003). Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 30(3): 239–264. (Citado en las páginas 5, 6, 7 y 9.)

- CHEFDOR, F., BÉNÉDETTI, H., DEPIERREUX, C., DELMOTTE, F., MORABITO, D. & CARPIN, S. (2006). Osmotic stress sensing in *Populus*: components identification of a phosphorelay system. *FEBS letters*, 580(1): 77–81. (Citado en la página 38.)
- CHINNUSAMY, V., GONG, Z. & ZHU, J.K. (2008). Abscisic Acid-mediated Epigenetic Processes in Plant Development and Stress Responses. *Journal of integrative plant biology*, 50(10): 1187–1195. (Citado en las páginas 57, 65 y 86.)
- CHOW, B. & MCCOURT, P. (2004). Hormone signalling from a developmental context. *Journal of experimental botany*, 55(395): 247–251. (Citado en la página 64.)
- COMSTOCK, J.P. (2002). Hydraulic and chemical signalling in the control of stomatal conductance and transpiration. *Journal of Experimental Botany*, 53(367): 195–200. (Citado en las páginas 9, 25 y 85.)
- CORREIA, B., PINTÓ-MARIJUAN, M., NEVES, L., BROSSA, R., DIAS, M.C., COSTA, A., CASTRO, B.B., ARAÚJO, C., SANTOS, C., CHAVES, M.M. *et al.* (2014). Water stress and recovery in the performance of two *Eucalyptus globulus* clones: physiological and biochemical profiles. *Physiologia plantarum*, 150(4): 580–592. (Citado en las páginas 43, 70 y 82.)
- CUTLER, S.R., RODRIGUEZ, P.L., FINKELSTEIN, R.R. & ABRAMS, S.R. (2010). Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. *Annual Review of Plant Biology*, 61: 651–679. (Citado en la página 85.)
- DAVIES, P.J., The plant hormones: Their nature, occurrence and function. En: P.J. Davies (Ed.), *Plant Hormones*, 95–114 (Springer Netherlands, 2010). (Citado en la página 15.)
- DAVIES, W.J. & ZHANG, J. (1991). Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual review of plant biology*, 42(1): 55–76. (Citado en la página 64.)
- DAVIES, W.J., KUDOYAROVA, G. & HARTUNG, W. (2005). Long-distance ABA signaling and its relation to other signaling pathways in the detection of soil drying and the mediation of the plant's response to drought. *Journal of Plant Growth Regulation*, 24(4): 285–295. (Citado en las páginas 9, 15 y 87.)
- DE ALMEIDA, M.R., RUEDELL, C.M., RICACHENEVSKY, F.K., SPEROTTO, R.A., PASQUALI, G. & FETT-NETO, A.G. (2010). Reference gene selection for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction normalization during in vitro adventitious rooting in *Eucalyptus globulus* Labill. *BMC molecular biology*, 11(1): 73. (Citado en la página 51.)
- DE DIEGO, N., PÉREZ-ALFOCEA, F., CANTERO, E., LACUESTA, M. & MONCALEÁN, P. (2012). Physiological response to drought in radiata pine: phytohormone implication at leaf level. *Tree physiology*, 32(4): 435–449. (Citado en las páginas 70 y 82.)
- DE OLIVEIRA, L.A., BRETON, M.C., BASTOLLA, F.M., DA SILVA CAMARGO, S., MARGIS, R., FRAZZON, J. & PASQUALI, G. (2012). Reference genes for the normalization of gene expression in *Eucalyptus* species. *Plant and Cell Physiology*, 53(2): 405–422. (Citado en las páginas 43 y 51.)

- DE OLLAS, C., MANZI, M. & ARBONA, V. (2014). Interacciones hormonales en la respuesta frente al estrés abiótico. *Boletín de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal*, (58): 5–17. (Citado en las páginas 40 y 58.)
- DGDRPF (2012). Cuarto Inventario Forestal Nacional. Inf. téc., Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. (Citado en la página 3.)
- DIEDRICH, G., SPAHN, C.M., STELZL, U., SCHAEFER, M.A., WOOTEN, T., BOCHKARIOV, D.E., COOPERMAN, B.S., TRAUT, R.R. & NIERHAUS, K.H. (2000). Ribosomal protein L2 is involved in the association of the ribosomal subunits, tRNA binding to A and P sites and peptidyl transfer. *The EMBO journal*, 19(19): 5241–5250. (Citado en la página 51.)
- DOBREV, P.I. & KAMÍNEK, M. (2002). Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 950(1): 21–29. (Citado en la página 29.)
- DODD, I.C., Root-to-shoot signalling: assessing the roles of up in the up and down world of long-distance signalling in planta. En: *Root physiology: from gene to function*, 251–270 (Springer, 2005). (Citado en las páginas 9, 39, 65 y 85.)
- DREW, D.M., DOWNES, G.M., O'GRADY, A.P., READ, J. & WORLEDGE, D. (2009). High resolution temporal variation in wood properties in irrigated and non-irrigated *Eucalyptus globulus*. *Annals of Forest Science*, 66(4): 1–10. (Citado en la página 69.)
- ELDRIDGE, K.G., DAVIDSON, J., HARWOOD, C., WYK, G.v. et al., *Eucalypt domestication and breeding*. (Clarendon Press, 1993). (Citado en la página 3.)
- ENCE (). Comunicación personal. Note. (Citado en las páginas 3, 25 y 69.)
- ERDEI, L., TARI, I., CSISZÁR, J., PÉCSVÁRADI, A., HORVÁTH, F., SZABÓ, M., ÖRDÖG, M., CSEUZ, L., ZHIPONOVA, M., SZILÁK, L. et al. (2002). Osmotic stress responses of wheat species and cultivars differing in drought tolerance: some interesting genes (advice for gene hunting). *Acta Biol Szeged*, 46(3-4): 63–65. (Citado en la página 38.)
- FAO (2011). State of the world's forests. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (Citado en las páginas 3, 4 y 69.)
- FERNÁNDEZ, B., CENTENO, M., FEITO, I., SÁNCHEZ-TAMÉS, R. & RODRÍGUEZ, A. (1995). Simultaneous analysis of cytokinins, auxins and abscisic acid by combined immunoaffinity chromatography, high performance liquid chromatography and immunoassay. *Phytochemical Analysis*, 6(1): 49–54. (Citado en las páginas 30 y 54.)
- FORRESTER, D.I., MEDHURST, J.L., WOOD, M., BEADLE, C.L. & VALENCIA, J.C. (2010). Growth and physiological responses to silviculture for producing solid-wood products from *Eucalyptus* plantations: an Australian perspective. *Forest Ecology and Management*, 259(9): 1819–1835. (Citado en las páginas 53 y 69.)
- FRANKS, S.J. (2011). Plasticity and evolution in drought avoidance and escape in the annual plant *Brassica rapa*. *New Phytologist*, 190(1): 249–257. (Citado en la página 6.)

- FREEMAN, J.S., POTTS, B.M., DOWNES, G.M., PILBEAM, D., THAVAMANIKUMAR, S. & VAILLANCOURT, R.E. (2013). Stability of quantitative trait loci for growth and wood properties across multiple pedigrees and environments in *Eucalyptus globulus*. *New Phytologist*, 198(4): 1121–1134. (Citado en las páginas 4 y 53.)
- FU, W., WU, K. & DUAN, J. (2007). Sequence and expression analysis of histone deacetylases in rice. *Biochemical and biophysical research communications*, 356(4): 843–850. (Citado en la página 65.)
- GHANEM, M.E., ALBACETE, A., MARTÍNEZ-ANDÚJAR, C., ACOSTA, M., ROMERO-ARANDA, R., DODD, I.C., LUTTS, S. & PÉREZ-ALFOCEA, F. (2008). Hormonal changes during salinity-induced leaf senescence in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Experimental Botany*, 59(11): 3039–3050. (Citado en la página 39.)
- GOICOECHEA, N., ANTOLIN, M. & SÁNCHEZ-DÍAZ, M. (1997). Gas exchange is related to the hormone balance in mycorrhizal or nitrogen-fixing alfalfa subjected to drought. *Physiologia Plantarum*, 100(4): 989–997. (Citado en la página 64.)
- GOODGER, J.Q., SHARP, R.E., MARSH, E.L. & SCHACHTMAN, D.P. (2005). Relationships between xylem sap constituents and leaf conductance of well-watered and water-stressed maize across three xylem sap sampling techniques. *Journal of experimental botany*, 56(419): 2389–2400. (Citado en la página 38.)
- GRANDA, V., CUESTA, C., ÁLVAREZ, R., ORDÁS, R., CENTENO, M.L., RODRÍGUEZ, A., MAJADA, J.P., FERNÁNDEZ, B. & FEITO, I. (2011). Rapid responses of C14 clone of *Eucalyptus globulus* to root drought stress: Time-course of hormonal and physiological signaling. *Journal of plant physiology*, 168(7): 661–670. (Citado en las páginas 44, 54 y 64.)
- GRANDA, V., DELATORRE, C., CUESTA, C., CENTENO, M.L., FERNÁNDEZ, B., RODRÍGUEZ, A. & FEITO, I. (2014). Physiological and biochemical responses to severe drought stress of nine *Eucalyptus globulus* clones: a multivariate approach. *Tree Physiology*, 34(7): 778–786. (Citado en la página 85.)
- GRAZIANI, M., MACCAFERRI, M., ROYO, C., SALVATORELLI, F. & TUBEROSA, R. (2014). QTL dissection of yield components and morpho-physiological traits in a durum wheat elite population tested in contrasting thermo-pluviometric conditions. *Crop and Pasture Science*, 65(1): 80–95. (Citado en la página 43.)
- GUÓTH, A., TARI, I., GALLÉ, Á., CSISZÁR, J., CSEUZ, L. & ERDEI, L. (2008). Changes in photosynthetic performance and ABA levels under osmotic stress in drought tolerant and sensitive wheat genotypes. *Acta Biologica Szegediensis*, 52(1): 91–92. (Citado en la página 38.)
- HARE, P., CRESS, W. & VAN STADEN, J. (1997). The involvement of cytokinins in plant responses to environmental stress. *Plant Growth Regulation*, 23(1-2): 79–103. (Citado en la página 40.)
- HARTUNG, W., SAUTER, A. & HOSE, E. (2002). Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? *Journal of Experimental Botany*, 53(366): 27–32. (Citado en las páginas 11 y 39.)

- HIRAGA, S., YAMAMOTO, K., ITO, H., SASAKI, K., MATSUI, H., HONMA, M., NAGAMURA, Y., SASAKI, T. & OHASHI, Y. (2000). Diverse expression profiles of 21 rice peroxidase genes. *FEBS letters*, 471(2): 245–250. (Citado en la página 64.)
- HUANG, D., WU, W., ABRAMS, S.R. & CUTLER, A.J. (2008). The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. *Journal of Experimental Botany*, 59(11): 2991–3007. (Citado en la página 13.)
- HUSSON, F., JOSSE, J., LE, S. & MAZET, J. (2012). *FactoMineR: Multivariate Exploratory Data Analysis and Data Mining*. R package version 1.20. (Citado en la página 74.)
- IUCHI, S., KOBAYASHI, M., TAJI, T., NARAMOTO, M., SEKI, M., KATO, T., TABATA, S., KAKUBARI, Y., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. & SHINOZAKI, K. (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 27(4): 325–333. (Citado en la página 65.)
- JIA, W. & ZHANG, J. (1999). Stomatal closure is induced rather by prevailing xylem abscisic acid than by accumulated amount of xylem-derived abscisic acid. *Physiologia Plantarum*, 106(3): 268–275. (Citado en las páginas 39, 57 y 66.)
- JIA, W. & ZHANG, J. (2008). Stomatal movements and long-distance signaling in plants. *Plant signaling & behavior*, 3(10): 772–777. (Citado en la página 25.)
- KANG, J., HWANG, J.U., LEE, M., KIM, Y.Y., ASSMANN, S.M., MARTINOIA, E. & LEE, Y. (2010). PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of sciences*, 107(5): 2355–2360. (Citado en las páginas 65 y 86.)
- KATO, Y., HIROTSU, S., NEMOTO, K. & YAMAGISHI, J. (2008). Identification of QTLs controlling rice drought tolerance at seedling stage in hydroponic culture. *Euphytica*, 160(3): 423–430. (Citado en la página 26.)
- KUDOYAROVA, G.R., VYSOTSKAYA, L.B., CHERKOZYANOVA, A. & DODD, I.C. (2007). Effect of partial rootzone drying on the concentration of zeatin-type cytokinins in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) xylem sap and leaves. *Journal of Experimental Botany*, 58(2): 161–168. (Citado en las páginas 39, 54 y 58.)
- KUROMORI, T. & SHINOZAKI, K., ABA Transport by ABCG Transporter Proteins. En: *Plant ABC Transporters*, 39–47 (Springer, 2014). (Citado en la página 57.)
- LA BILLARDIÈRE, J.H. (1799). Relation du voyage à la recherche de La Pérouse, 1791–1794, vol. 2. Paris, Imprimeries de La Sorbonne. (Citado en la página 3.)
- LAMBERS, H., CHAPIN, F. & PONS, T., *Plant Physiology Ecology, 2nd Edition* (Springer, 2008). (Citado en la página 7.)
- LEI, Y., YIN, C. & LI, C. (2006). Differences in some morphological, physiological, and biochemical responses to drought stress in two contrasting populations of *Populus przewalskii*. *Physiologia Plantarum*, 127(2): 182–191. (Citado en la página 69.)

- LIU, C., LIU, Y., GUO, K., FAN, D., LI, G., ZHENG, Y., YU, L. & YANG, R. (2011). Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst habitats of southwestern China. *Environmental and Experimental Botany*, 71(2): 174–183. (Citado en las páginas 69 y 81.)
- LIVAK, K.J. & SCHMITTGEN, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25(4): 402–408. (Citado en las páginas 46 y 56.)
- LØVDAL, T. & LILLO, C. (2009). Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress. *Analytical biochemistry*, 387(2): 238–242. (Citado en la página 51.)
- LUDLOW, M.M. (1989). Strategies of response to water stress. *Structural and functional responses to environmental stresses*, 269–281. (Citado en las páginas 7, 82 y 85.)
- LUDWIG, S.R., OPPENHEIMER, D.G., SILFLOW, C.D. & SNUSTAD, D.P. (1987). Characterization of the alpha-tubulin gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(16): 5833–5837. (Citado en la página 50.)
- MA, X., MA, F., LI, C., MI, Y., BAI, T. & SHU, H. (2010). Biomass accumulation, allocation, and water-use efficiency in 10 *Malus* rootstocks under two watering regimes. *Agroforestry systems*, 80(2): 283–294. (Citado en la página 80.)
- MAEHLER, M., ROUSSEUW, P., STRUYF, A., HUBERT, M. & HORNIK, K. (2012). *cluster: Cluster Analysis Basics and Extensions*. R package version 1.14.2. (Citado en las páginas 56 y 74.)
- MAGRAMA (2002). Plan Forestal Español 2002–2032. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. (Citado en las páginas 3, 4 y 69.)
- MAROCO, J.P., PEREIRA, J.S. & CHAVES, M.M. (2000). Growth, photosynthesis and water-use efficiency of two C<sub>4</sub> Sahelian grasses subjected to water deficits. *Journal of Arid Environments*, 45(2): 119–137. (Citado en la página 6.)
- MAUCH-MANI, B. & MAUCH, F. (2005). The role of abscisic acid in plant–pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(4): 409–414. (Citado en la página 11.)
- MEDRANO, H., ESCALONA, J.M., BOTA, J., GULÍAS, J. & FLEXAS, J. (2002). Regulation of photosynthesis of C<sub>3</sub> plants in response to progressive drought: stomatal conductance as a reference parameter. *Annals of Botany*, 89(7): 895–905. (Citado en la página 81.)
- MENG, F.Z., HU, L.P., WANG, S.H., SUI, X.L., WEI, L., WEI, Y.X., SUN, J.L. & ZHANG, Z.X. (2008). Effects of exogenous abscisic acid (ABA) on cucumber seedling leaf carbohydrate metabolism under low temperature. *Plant growth regulation*, 56(3): 233–244. (Citado en las páginas 46, 52 y 65.)
- 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 & Environment*, 29(11): 2017–2029. (Citado en la página 69.)

- MERCHANT, A., CALLISTER, A., ARNDT, S., TAUSZ, M. & ADAMS, M. (2007). Contrasting physiological responses of six *Eucalyptus* species to water deficit. *Annals of botany*, 100(7): 1507–1515. (Citado en la página 81.)
- MICHEL, B.E. (1983). Evaluation of the water potentials of solutions of polyethylene glycol 8000 both in the absence and presence of other solutes. *Plant Physiology*, 72(1): 66–70. (Citado en la página 26.)
- MICHEL, B.E. & KAUFMANN, M.R. (1973). The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant physiology*, 51(5): 914–916. (Citado en la página 26.)
- MILBORROW, B. (2001). The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 52(359): 1145–1164. (Citado en la página 10.)
- MONCALEÁN, P., RODRÍGUEZ, A. & FERNÁNDEZ, B. (2003). Effect of different benzyladenine time pulses on the endogenous levels of cytokinins, indole-3-acetic acid and abscisic acid in micropropagated explants of *Actinidia deliciosa*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41(2): 149–155. (Citado en la página 40.)
- MONCLUS, R., DREYER, E., VILLAR, M., DELMOTTE, F.M., DELAY, D., PETIT, J.M., BARBAROUX, C., LE THIEC, D., BRÉCHET, C. & BRIGNOLAS, F. (2006). Impact of drought on productivity and water use efficiency in 29 genotypes of *Populus deltoides* × *Populus nigra*. *New phytologist*, 169(4): 765–777. (Citado en la página 80.)
- MOURA, J.C.M.S., BONINE, C.A.V., DE OLIVEIRA FERNANDES VIANA, J., DORNELAS, M.C. & MAZZAFERA, P. (2010). Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(4): 360–376. (Citado en la página 65.)
- MOURA, J.C.M.S., ARAÚJO, P., DOS S BRITO, M., SOUZA, U.R., VIANA, J.O.F. & MAZZAFERA, P. (2012). Validation of reference genes from *Eucalyptus* spp. under different stress conditions. *BMC research notes*, 5(1): 634. (Citado en las páginas 48 y 51.)
- MYBURG, A.A., GRATTAPAGLIA, D., TUSKAN, G.A., HELLSTEN, U., HAYES, R.D., GRIMWOOD, J., JENKINS, J., LINDQUIST, E., TICE, H., BAUER, D. *et al.* (2014). The genome of *Eucalyptus grandis*. *Nature*, 510(7505): 356–362. (Citado en la página 53.)
- NAMBARA, E. & MARION-POLL, A. (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 56: 165–185. (Citado en las páginas 10, 11 y 12.)
- NGUYEN-QUEYRENS, A. & BOUCHET-LANNAT, F. (2003). Osmotic adjustment in three-year-old seedlings of five provenances of maritime pine (*Pinus pinaster*) in response to drought. *Tree physiology*, 23(6): 397–404. (Citado en la página 73.)
- NICOT, N., HAUSMAN, J.F., HOFFMANN, L. & EVERS, D. (2005). Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of experimental botany*, 56(421): 2907–2914. (Citado en las páginas 45, 46 y 51.)
- NISHIYAMA, R., WATANABE, Y., FUJITA, Y., LE, D.T., KOJIMA, M., WERNER, T., VANKOVA, R., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SHINOZAKI, K., KAKIMOTO, T. *et al.* (2011). Analysis of

- cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis. *The Plant Cell Online*, 23(6): 2169–2183. (Citado en la página 53.)
- NISHIYAMA, R., LE, D.T., WATANABE, Y., MATSUI, A., TANAKA, M., SEKI, M., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SHINOZAKI, K. & TRAN, L.S.P. (2012). Transcriptome analyses of a salt-tolerant cytokinin-deficient mutant reveal differential regulation of salt stress response by cytokinin deficiency. *PLoS One*, 7(2): e32124. (Citado en la página 53.)
- NOUVELLON, Y., LACLAU, J.P., EPRON, D., KINANA, A., MABIALA, A., ROUPSARD, O., BONNEFOND, J.M., LE MAIRE, G., MARSDEN, C., BONTEMPS, J.D. *et al.* (2010). Within-stand and seasonal variations of specific leaf area in a clonal *Eucalyptus* plantation in the Republic of Congo. *Forest ecology and management*, 259(9): 1796–1807. (Citado en la página 82.)
- OAKLEY, R.V., WANG, Y.S., RAMAKRISHNA, W., HARDING, S.A. & TSAI, C.J. (2007). Differential expansion and expression of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin gene families in *Populus*. *Plant Physiology*, 145(3): 961–973. (Citado en la página 50.)
- OKSANEN, J., BLANCHET, F.G., KINDT, R., LEGENDRE, P., MINCHIN, P.R., O'HARA, R.B., SIMPSON, G.L., SOLYMOS, P., STEVENS, M.H.H. & WAGNER, H. (2012). *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.0-5. (Citado en la página 73.)
- PAOLACCI, A.R., TANZARELLA, O.A., PORCEDDU, E. & CIAFFI, M. (2009). Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC molecular biology*, 10(1): 11. (Citado en la página 43.)
- PARDOS, J. (2007). Perspectiva fisiológica en la producción y mejora del eucalipto (con énfasis en *Eucalyptus globulus* Labill.). *Boletín del CIDEU*, 3: 7–55. (Citado en la página 3.)
- PÉREZ, M., VIEJO, M., LACUESTA, M., TOOROP, P. & CAÑAL, M.J. (2015). Epigenetic and hormonal profile during maturation of *Quercus suber* L. somatic embryos. *Journal of plant physiology*, 173: 51–61. (Citado en la página 55.)
- PEREZ-MARTIN, A., MICHELAZZO, C., TORRES-RUIZ, J.M., FLEXAS, J., FERNÁNDEZ, J.E., SEBASTIANI, L. & DIAZ-ESPEJO, A. (2014). Regulation of photosynthesis and stomatal and mesophyll conductance under water stress and recovery in olive trees: correlation with gene expression of carbonic anhydrase and aquaporins. *Journal of experimental botany*, 65(12): 3143–3156. (Citado en la página 57.)
- PETIT, J.R., JOUZEL, J., RAYNAUD, D., BARKOV, N.I., BARNOLA, J.M., BASILE, I., BENDER, M., CHAPPELLAZ, J., DAVIS, M., DELAYGUE, G. *et al.* (1999). Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature*, 399(6735): 429–436. (Citado en la página 5.)
- PITA, P. & PARDOS, J.A. (2001). Growth, leaf morphology, water use and tissue water relations of *Eucalyptus globulus* clones in response to water deficit. *Tree Physiology*, 21(9): 599–607. (Citado en las páginas 25, 43, 69, 81 y 82.)
- PITA, P., CAÑAS, I., SORIA, F., RUIZ, F. & TOVAL, G. (2005). Use of physiological traits in tree breeding for improved yield in drought-prone environments. The case of



- Eucalyptus globulus*. *Forest Systems*, 14(3): 383–393. (Citado en las páginas 69, 81 y 85.)
- PORRA, R.J., The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. En: *Discoveries in Photosynthesis*, 633–640 (Springer, 2005). (Citado en la página 73.)
- POSPÍŠILOVÁ, J., SYNKOVA, H. & RULCOVA, J. (2000). Cytokinins and water stress. *Biologia plantarum*, 43(3): 321–328. (Citado en la página 40.)
- POU, A., FLEXAS, J., ALSINA, M.D.M., BOTA, J., CARAMBULA, C., DE HERRALDE, F., GALMÉS, J., LOVISOLO, C., JIMÉNEZ, M., RIBAS-CARBÓ, M. *et al.* (2008). Adjustments of water use efficiency by stomatal regulation during drought and recovery in the drought-adapted *Vitis* hybrid ichter-110 (*V. berlandieri* × *V. rupestris*). *Physiologia Plantarum*, 134(2): 313–323. (Citado en las páginas 53 y 72.)
- PRADO, M.J., LARGO, A., DOMÍNGUEZ, C., GONZÁLEZ, M.V., REY, M. & CENTENO, M.L. (2014). Determination of abscisic acid and its glucosyl ester in embryogenic callus cultures of *Vitis vinifera* in relation to the maturation of somatic embryos using a new liquid chromatography-ELISA analysis method. *Journal of plant physiology*, 171(10): 852–859. (Citado en las páginas 54 y 73.)
- R CORE TEAM (2012). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. (Citado en las páginas 47, 56 y 74.)
- RAHAYU, Y.S., WALCH-LIU, P., NEUMANN, G., RÖMHELD, V., VON WIRÉN, N. & BANGERTH, F. (2005). Root-derived cytokinins as long-distance signals for NO<sub>3</sub>-induced stimulation of leaf growth. *Journal of Experimental Botany*, 56(414): 1143–1152. (Citado en las páginas 39 y 87.)
- RAMANJULU, S. & BARTELS, D. (2002). Drought-and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant, Cell & Environment*, 25(2): 141–151. (Citado en la página 7.)
- RAMÍREZ-CARVAJAL, G.A., MORSE, A.M., DERVINIS, C. & DAVIS, J.M. (2009). The cytokinin type-B response regulator PtRR13 is a negative regulator of adventitious root development in *Populus*. *Plant physiology*, 150(2): 759–771. (Citado en la página 66.)
- RANIK, M. & MYBURG, A.A. (2006). Six new cellulose synthase genes from *Eucalyptus* are associated with primary and secondary cell wall biosynthesis. *Tree physiology*, 26(5): 545–556. (Citado en la página 65.)
- RAYMOND, C.A. (2002). Genetics of *Eucalyptus* wood properties. *Annals of Forest Science*, 59(5-6): 525–531. (Citado en la página 3.)
- RESENDE, M.D., RESENDE, M.F., SANSALONI, C.P., PETROLI, C.D., MISSIAGGIA, A.A., AGUIAR, A.M., ABAD, J.M., TAKAHASHI, E.K., ROSADO, A.M., FARIA, D.A. *et al.* (2012). Genomic selection for growth and wood quality in *Eucalyptus*: capturing the missing heritability and accelerating breeding for complex traits in forest trees. *New Phytologist*, 194(1): 116–128. (Citado en la página 4.)

- RIVERO, R.M., SHULAEV, V. & BLUMWALD, E. (2009). Cytokinin-dependent photorespiration and the protection of photosynthesis during water deficit. *Plant Physiology*, 150(3): 1530–1540. (Citado en la página 64.)
- ROMANO, P.G., HORTON, P. & GRAY, J.E. (2004). The *Arabidopsis* cyclophilin gene family. *Plant Physiology*, 134(4): 1268–1282. (Citado en la página 51.)
- ROSE, T.M., HENIKOFF, J.G. & HENIKOFF, S. (2003). CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design. *Nucleic Acids Research*, 31(13): 3763–3766. (Citado en la página 55.)
- ROSSEEL, Y. (2012). lavaan: An R Package for Structural Equation Modeling. *Journal of Statistical Software*, 48(2): 1–36. (Citado en la página 56.)
- RUIJTER, J., RAMAKERS, C., HOOGAARS, W., KARLEN, Y., BAKKER, O., VAN DEN HOFF, M. & MOORMAN, A. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic acids research*, 37(6): e45–e45. (Citado en la página 46.)
- SAKAKIBARA, H. (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57: 431–449. (Citado en las páginas 13 y 14.)
- SAKAKIBARA, H., Cytokinin Biosynthesis and Metabolism. En: P.J. Davies (Ed.), *Plant Hormones*, 95–114 (Springer Netherlands, 2010). (Citado en la página 15.)
- SANGUINETI, M., DUVICK, D., SMITH, S., LANDI, P. & TUBEROSA, R. (2006). Effects of long-term selection on seedling traits and ABA accumulation in commercial maize hybrids. *Maydica*, 51(2): 329. (Citado en la página 25.)
- SAUTER, A., DAVIES, W.J. & HARTUNG, W. (2001). The long-distance abscisic acid signal in the droughted plant: the fate of the hormone on its way from root to shoot. *Journal of Experimental Botany*, 52(363): 1991–1997. (Citado en la página 39.)
- SCHACHTMAN, D.P. & GOODGER, J.Q. (2008). Chemical root to shoot signaling under drought. *Trends in plant science*, 13(6): 281–287. (Citado en las páginas 25 y 86.)
- SCHLIEP, K. (2011). phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics*, 27(4): 592–593. (Citado en la página 55.)
- SCHOLANDER, P.F., BRADSTREET, E.D., HEMMINGSEN, E. & HAMMEL, H. (1965). Sap Pressure in Vascular Plants: Negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science*, (148): 339–46. (Citado en las páginas 28 y 72.)
- SCHURR, U., HECKENBERGER, U., HERDEL, K., WALTER, A. & FEIL, R. (2000). Leaf development in *Ricinus communis* during drought stress: dynamics of growth processes, of cellular structure and of sink–source transition. *Journal of Experimental Botany*, 51(350): 1515–1529. (Citado en la página 6.)
- SCHWARTZ, S.H. & ZEEVAART, J.A., Abscisic acid biosynthesis and metabolism. En: P.J. Davies (Ed.), *Plant Hormones*, 137–155 (Springer Netherlands, 2010). (Citado en la página 11.)

- SEKI, M., NARUSAKA, M., ABE, H., KASUGA, M., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., CARNINCI, P., HAYASHIZAKI, Y. & SHINOZAKI, K. (2001). Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *The Plant Cell Online*, 13(1): 61–72. (Citado en la página 50.)
- SEKI, M., UMEZAWA, T., URANO, K. & SHINOZAKI, K. (2007). Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current opinion in plant biology*, 10(3): 296–302. (Citado en las páginas 85 y 86.)
- SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58(2): 221–227. (Citado en las páginas 7, 55 y 85.)
- SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. & SEKI, M. (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current opinion in plant biology*, 6(5): 410–417. (Citado en la página 86.)
- SHIPLEY, B. (2009). Confirmatory path analysis in a generalized multilevel context. *Ecology*, 90(2): 363–368. (Citado en las páginas 57 y 66.)
- SHVALEVA, A., E SILVA, F.C., SCOTTI, P., OUFIR, M., HAUSMAN, J.F., CEDRIC, G., RAMOS, P., ALMEIDA, M.H., RODRIGUES, M.L., PEREIRA, J.S. *et al.* (2008). Physiological and biochemical responses to low non-freezing temperature of two *Eucalyptus globulus* clones differing in drought resistance. *Annals of forest science*, 65(2): 1–10. (Citado en la página 69.)
- SHVALEVA, A.L., SILVA, F.C.E., BREIA, E., JOUVE, J., HAUSMAN, J.F., ALMEIDA, M.H., MAROCO, J., RODRIGUES, M., PEREIRA, J.S. & CHAVES, M.M. (2006). Metabolic responses to water deficit in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought sensitivity. *Tree Physiology*, 26(2): 239–248. (Citado en las páginas 25, 69 y 81.)
- SILVA, F.C.E., SHVALEVA, A., MAROCO, J.P., ALMEIDA, M.H., CHAVES, M.M. & PEREIRA, J.S. (2004). Responses to water stress in two *Eucalyptus globulus* clones differing in drought tolerance. *Tree Physiology*, 24(10): 1165–1172. (Citado en la página 25.)
- SREENIVASULU, N., HARSHAVARDHAN, V.T., GOVIND, G., SEILER, C. & KOHLI, A. (2012). Contrapuntal role of ABA: does it mediate stress tolerance or plant growth retardation under long-term drought stress? *Gene*, 506(2): 265–273. (Citado en la página 81.)
- STACKPOLE, D.J., VAILLANCOURT, R.E., ALVES, A., RODRIGUES, J. & POTTS, B.M. (2011). Genetic variation in the chemical components of *Eucalyptus globulus* wood. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 1(2): 151–159. (Citado en la página 53.)
- SUZUKI, T., HIGGINS, P., CRAWFORD, D. *et al.* (2000). Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques*, 29(2): 332–337. (Citado en la página 51.)
- TAIZ, L. & ZEIGER, E., *Plant physiology* (New York: Sinauer, 2002). (Citado en las páginas 10 y 11.)
- TAUSZ, M., MERCHANT, A., KRUSE, J., SAMSA, G. & ADAMS, M.A. (2008). Estimation of drought-related limitations to mid-rotation aged plantation grown *Eucalyptus globulus* by phloem sap analysis. *Forest ecology and management*, 256(4): 844–848. (Citado en las páginas 53 y 69.)

- TIBBITS, W., BOOMSMA, D. & JARVIS, S., Distribution, biology, genetics, and improvement programs for *Eucalyptus globulus* and *E. nitens* around the world. En: *Proceedings of the 24th biennial southern tree improvement conference*, 9–12 (1997). (Citado en la página 3.)
- TRISTAN, C., SHAHANI, N., SEDLAK, T.W. & SAWA, A. (2011). The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. *Cellular signalling*, 23(2): 317–323. (Citado en la página 50.)
- TURNER, N.C. (1981). Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. *Plant and Soil*, 58(1-3): 339–366. (Citado en la página 73.)
- TURNER, N.C. (1988). Measurement of plant water status by the pressure chamber technique. *Irrigation science*, 9(4): 289–308. (Citado en las páginas 28 y 72.)
- UNTERGASSER, A., NIJVEEN, H., RAO, X., BISSELING, T., GEURTS, R. & LEUNISSEN, J.A. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic acids research*, 35(suppl 2): W71–W74. (Citado en las páginas 46 y 55.)
- URAO, T., YAKUBOV, B., SATOH, R., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SEKI, M., HIRAYAMA, T. & SHINOZAKI, K. (1999). A transmembrane hybrid-type Histidine Kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *The Plant Cell Online*, 11(9): 1743–1754. (Citado en la página 7.)
- VALDÉS, A.E., IRAR, S., MAJADA, J.P., RODRÍGUEZ, A., FERNÁNDEZ, B. & PAGÈS, M. (2013). Drought tolerance acquisition in *Eucalyptus globulus* (Labill.): A research on plant morphology, physiology and proteomics. *Journal of proteomics*, 79: 263–276. (Citado en la página 53.)
- VAN DEN BRÛLE, S. & SMART, C.C. (2002). The plant PDR family of ABC transporters. *Planta*, 216(1): 95–106. (Citado en las páginas 57 y 65.)
- VANDESOMPELE, J., DE PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., VAN ROY, N., DE PAEPE, A. & SPELEMAN, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, 3(7): research0034. (Citado en la página 46.)
- WANG, C., YANG, A., YIN, H. & ZHANG, J. (2008). Influence of water stress on endogenous hormone contents and cell damage of maize seedlings. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(4): 427–434. (Citado en la página 40.)
- WARREN, C., BLEBY, T. & ADAMS, M. (2007). Changes in gas exchange versus leaf solutes as a means to cope with summer drought in *Eucalyptus marginata*. *Oecologia*, 154(1): 1–10. (Citado en las páginas 69 y 81.)
- WELLBURN, A. & LICHTENTHALER, H., Formulae and program to determine total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. En: *Advances in photosynthesis research*, 9–12 (Springer, 1984). (Citado en la página 73.)
- WERNER, T., KÖLLMER, I., BARTRINA, I., HOLST, K. & SCHMÜLLING, T. (2006). New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biology*, 8(3): 371–381. (Citado en la página 64.)

- WHITE, D.A., CROMBIE, D.S., KINAL, J., BATTAGLIA, M., MCGRATH, J.F., MENDHAM, D.S. & WALKER, S.N. (2009). Managing productivity and drought risk in *Eucalyptus globulus* plantations in south-western Australia. *Forest Ecology and Management*, 259(1): 33–44. (Citado en las páginas 4, 53 y 69.)
- WILKINSON, S. & DAVIES, W.J. (2002). ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant, cell & environment*, 25(2): 195–210. (Citado en la página 39.)
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., KASUGA, M., LIU, Q., NAKASHIMA, K., SAKUMA, Y., ABE, H., SHINWARI, Z.K., SEKI, M. & SHINOZAKI, K. (2002). Biological mechanisms of drought stress response. *JIRCAS working report*, 23: 1–8. (Citado en la página 7.)
- YESBERGENOVA, Z., YANG, G., ORON, E., SOFFER, D., FLUHR, R. & SAGI, M. (2005). The plant Mo-hydroxylases aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase have distinct reactive oxygen species signatures and are induced by drought and abscisic acid. *The plant journal*, 42(6): 862–876. (Citado en la página 46.)
- ZAHARIA, L.I., WALKER-SIMMON, M.K., RODRÍGUEZ, C.N. & ABRAMS, S.R. (2005). Chemistry of abscisic acid, abscisic acid catabolites and analogs. *Journal of Plant Growth Regulation*, 24(4): 274–284. (Citado en la página 11.)
- ZDUNEK, E. & LIPS, S.H. (2001). Transport and accumulation rates of abscisic acid and aldehyde oxidase activity in *Pisum sativum* L. in response to suboptimal growth conditions. *Journal of experimental botany*, 52(359): 1269–1276. (Citado en la página 64.)