

# Diferencias genéticas en la tolerancia a la sequía de portainjertos de *Prunus* spp. Papel del almendro y los ciruelos

**B. BIELSA<sup>1,2</sup>, C.M. GÓMEZ-AGUAS<sup>1</sup>, M.J. RUBIO-CABETAS<sup>1,2</sup>**

(1) Departamento de Ciencia Vegetal, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Zaragoza, España.

(2) Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), Zaragoza, España.

## RESUMEN

El aumento de los periodos de sequía extrema que están teniendo lugar en la cuenca mediterránea debido al cambio climático provoca un impacto negativo en la producción de frutales. Este escenario supone un desafío para el programa de mejora de portainjertos de *Prunus* spp. del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), marcándose como uno de sus objetivos el desarrollo de portainjertos adaptados a estas nuevas condiciones climáticas. Para ello se centra en estudiar la adaptación y tolerancia a la sequía en portainjertos híbridos, mediante la caracterización de su respuesta fisiológica, tanto a corto como a largo plazo, así como determinar el papel del ácido abscísico (ABA) en dicha respuesta y cómo esta fitohormona desencadena la respuesta molecular al estrés hídrico, activando genes implicados en la adaptación a la sequía y relacionados con el uso eficiente del agua. El conocimiento generado de este trabajo no solo contribuye a comprender mejor las estrategias que siguen estos portainjertos frente al estrés hídrico, sino que también permitirá su aplicación en el desarrollo de marcadores moleculares útiles en la selección asistida (SAM) para la obtención de nuevos patrones con un mayor uso eficiente del agua (UEA) tan demandados por los nuevos sistemas de producción que buscan una mayor sostenibilidad.

**Palabras clave:** Almendro, Ciruelo, Estrés hídrico, Mejora genética, Melocotonero, Raíces.

## ABSTRACT

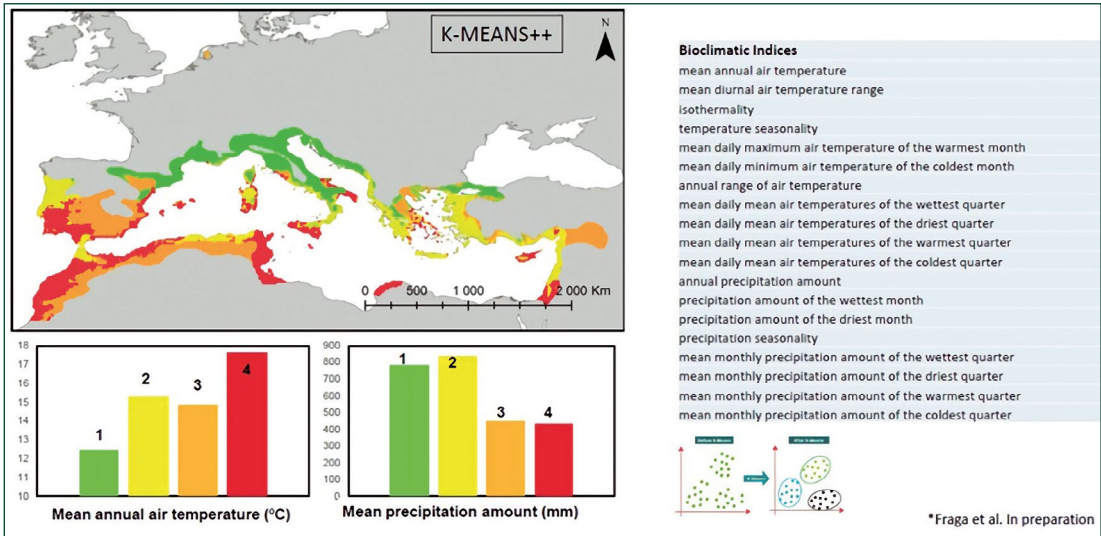
**Genetic differences in drought tolerance in *Prunus* spp. Rootstocks: the role of almond and plums.** The increase in periods of extreme drought occurring in the Mediterranean basin due to climate change has a negative impact on fruit tree production. This scenario poses a challenge for the rootstock improvement program of *Prunus* spp. at the Center for Research and Agri-Food Technology of Aragón (CITA), setting one of its objectives as the development of rootstocks adapted to these new climatic conditions. To achieve this, the program focuses on studying the adaptation and drought tolerance in hybrid rootstocks by characterizing their physiological response in both the short and long term. Additionally, it aims to determine the role of abscisic acid (ABA) in this response and how this phytohormone triggers the molecular response to water stress by activating genes involved in drought adaptation and related to efficient water use. The knowledge generated from this work not only contributes to a better understanding of the strategies these rootstocks use to cope with water stress but also facilitates the development of useful molecular markers for marker-assisted selection (MAS) to obtain new rootstocks with higher water use efficiency (WUE), which is in high demand by new production systems seeking greater sustainability.

**Key words:** Almond, Breeding, Peach, Plum, Roots, Water stress.

## Portainjertos de *Prunus*: ciruelos e híbridos de almendro y melocotonero

En la actualidad, el cambio climático genera un impacto negativo en la agricultura al aumentar la frecuencia de los periodos de sequía extrema (IPCC, 2023) y provocar cambios en los climas regionales, como ocurre en la cuenca mediterránea, donde la escasez de agua se ve cada vez más agravada (TEJEDOR *et al.*, 2016). La sequía es uno de los principales estreses abióticos con un gran impacto ecológico y socioeconómico en España para los frutales de hueso, perjudicando el crecimiento y el rendimiento de estos cultivos. Por ello, el desarrollo de portainjertos adaptados a las nuevas condiciones edafoclimáticas derivadas del cambio climático está siendo un reto necesario en los programas de mejora. Existe una necesidad urgente de identificar patrones adaptados a la sequía, que permitan un uso eficiente del agua (UEA) y, así, una gestión más sostenible del sistema productivo.

Existen modelos teóricos de predicción de clima (temperatura, precipitación, evapotranspiración, etc.) desarrollados por el IPCC, Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático. Se trata de cinco escalas diferentes desde el más débil SSSP 1 al más severo SSSP 5, teniendo en cuenta la evidencia científica. Estos modelos han tomado datos recopilados de diferentes estudios científicos que analizan los diferentes parámetros mencionados y su evolución en los últimos años.



**Figura 1.** Índices bioclimáticos donde se observa el aumento de la temperatura anual del aire (°C) y el descenso de la precipitación media (mm) en diferentes regiones y registros de la Cuenca mediterránea (FRAGA *et al.*, 2023).

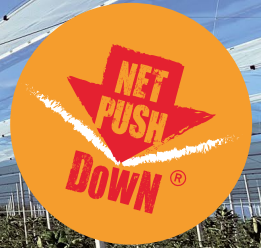
La mayoría de estos estudios constatan el aumento de las temperaturas y el descenso de las precipitaciones (FRAGA *et al.*, 2023), con un efecto más acentuado en los países de clima mediterráneo que atlántico (Figura 1). A lo largo de los registros históricos, conocidos, se han documentado períodos de sequía que, correlacionados con estos eventos, han llevado a episodios de hambruna (REIG *et al.*, 2023). La sequía es un tema complejo y un fenómeno en el que intervienen diferentes factores y que se manifiesta de diversas formas. El más importante es quizá la evidencia del registro de las temperaturas y por ello, aunque el régimen de lluvia ha cambiado, lo importante es el efecto de las temperaturas, hablando así de la sequía meteorológica, que se obtiene a través de dos índices climáticos: el Índice de Precipitación Estandarizado (SPI), que se obtiene con datos de precipitación; y el Índice de Precipitación Evapotranspiración Estandarizado (SPEI), que utiliza datos de precipitación y demanda de agua por parte de la atmósfera (REIG *et al.*, 2023) (Figura 2). Así, se aporta la información que permite identificar la anomalía climática considerando períodos previos más o menos largos y que informan de la posible severidad de diferentes tipos de sequía meteorológica. Además

de ello, se muestra la duración la sequía meteorológica desde el inicio de la misma (considerando un umbral de condiciones secas) y su magnitud acumulada.

Desde el programa de mejora genética de portainjertos *Prunus* spp., el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) se centra en los cultivos mediterráneos de mayor importancia económica de frutales de hueso, en especial melocotonero y almendro, sin olvidar ciruelos y, en menor medida,

cerezo por la distinta genética de este. Dentro de nuestro programa durante los últimos años se ha estudiado en profundidad la respuesta adaptativa y de tolerancia a la sequía en portainjertos híbridos interespecíficos almendro × melocotonero y selecciones derivadas de cruzamientos de estos híbridos con genotipos de ciruelo para incorporar un mayor número de tolerancias abióticas, así como de resistencias a enfermedades, ofreciendo nuevas oportunidades en los programas de mejora de *Prunus* y distintas escalas de vigor (RUBIO-CABETAS *et al.*, 2017). En general, los híbridos almendro × melocotonero son más tolerantes a la sequía, carácter que le viene dado por el almendro, que los ciruelos diploides y hexaploides (Figura 3). Los ciruelos se consideran plantas derrochadoras

# Protecciones eficientes



## novafrut

Servicios  
a  
medida

Planos GPS  
y marcajes

Montaje  
integral

Maquinaria  
especializada



antigranizo



antilluvia



sombreo



anti insectos



climática



anti pájaros



emparrados



cortavientos



tela reflectante



deportes



ceramientos



helicicultura piscifactoría



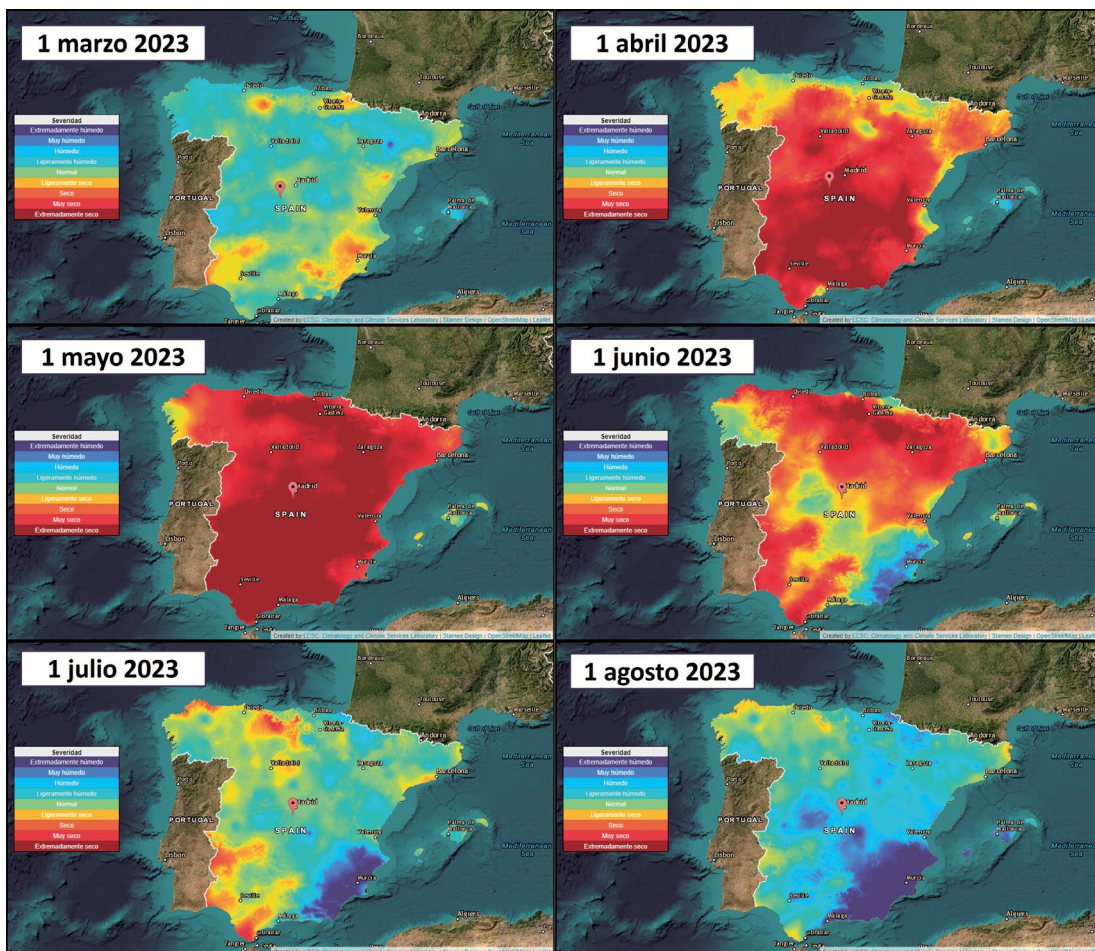
helicicultura piscifactoría

NOVA FRUTICULTURA, SL - [www.novafrutprotect.com](http://www.novafrutprotect.com) - [info@novafrutprotect.com](mailto:info@novafrutprotect.com)

Girona: Terres Blanques, 10  
17600 Figueres . Tel. +34 972 510 685

Lleida: Pol. Ind. Vila-sana,  
Pla de la Cometa, 3 . 25245 Vila-sana





**Figura 2.** Monitor de sequía meteorológica de los meses de marzo, abril, mayo, junio, julio y agosto de 2023. Estos datos explicarían el menor tamaño del fruto de la almendra y la disminución de cosecha de la misma (AEMET–CSIC, 2023).

que utilizan toda el agua para seguir creciendo, mientras que no profundizan ni desarrollan más tejido radicular, al contrario que los híbridos almendro × melocotonero, los cuales son plantas ahorradoras, es decir, cierran estomas, cesando su crecimiento mientras siguen explorando y desarrollando tejido de raíces (Figura 4).

Estos estudios que comparan ciruelos e híbridos almendro × melocotonero de distinta procedencia han posibilitado la identificación de genes relacionados con el UEA y su caracterización mediante tres enfoques diferentes: fisiológico, bioquímico y molecular cuyos resultados más relevantes se detallan a continuación.

## Caracterización de la respuesta fisiológica al estrés hídrico

En las plantas, la reducción de la disponibilidad de agua produce un descenso de la conductividad hidráulica en las raíces que prepara a la planta para las condiciones de déficit hídrico, aumentando la resistencia al flujo de agua y, por tanto, reduciendo las pérdidas por evaporación (CHAVES *et al.*, 2009). Bajo el estrés provocado por la sequía, las plantas desencadenan diferentes mecanismos de respuesta asociados a la regulación de distintos procesos fisiológicos y bioquímicos, afectando a la morfología de la planta. Mediante la regulación del cierre estomático



**Figura 3.** Experimento de sequía de dos portainjertos de *Prunus* sometidos a sequía durante 10 días en invernadero: 'Mariana 2624' (*P. munsoniana* x *P. besseyi*), ciruelo diploide, color rojo; y 'Hansen 536' (*P. amygdalus* x *P. persica*), color verde).

y un ajuste osmótico, se produce una disminución de la expansión foliar y de la actividad fotosintética, regulando el crecimiento para minimizar la pérdida de agua (BELIN *et al.*, 2010; LIND *et al.*, 2015; VERSLUES *et al.*, 2006). Esta respuesta fisiológica ha sido estudiada a través de numerosos parámetros, incluyendo la conductancia estomática (gs), el potencial hídrico de la hoja (LWP), el contenido relativo en agua foliar (RWC) y la estabilidad de la membrana citoplasmática

(CMS), así como sus relaciones, aportando una visión amplia de la capacidad para tolerar el estrés provocado por la sequía en las plantas (VERSLUES *et al.*, 2006).

Para comprender los mecanismos fisiológicos implicados en el estrés hídrico a largo y corto plazo en distintos genotipos de híbridos interespecíficos, se desarrollaron diferentes ensayos de sequía donde se monitorizaron los parámetros fisiológicos relacionados con el UEA anteriormen-



**Figura 4.** Experimento de sequía de dos portainjertos de *Prunus* sometidos a sequía durante 10 días en invernadero: ‘Mariana 2624’ (*P. munsoniana* x *P. besseyi*), ciruelo diploide; y ‘Hansen 536’ (*P. amygdalus* x *P. persica*).

te citados como son LWP), gs, RWC, además de la estabilidad de la membrana citoplasmática mediante el estudio de la fuga de electrolitos (EL). En un ensayo a largo plazo (15 días sin riego, seguidos de 15 días de restauración del riego), se comprobó como el híbrido almendro x melocotonero [*P. amygdalus* Batsch. x *P. persica* (L.) Batsch.] Garnem® se comporta como una planta derrochadora durante los primeros días de estrés (10 días), consumiendo rápidamente sus reservas hídricas para

mantener la tasa de crecimiento; transformándose en planta ahorradora cuando el estrés es más severo (15 días) y así, controlar a bajos potenciales la pérdida de conductividad hidráulica, a diferencia de los otros dos genotipos híbridos interespecíficos como son Mirobolán ‘P.2175’ x Garnem®-3 (*P. cerasifera* Ehrh. x ‘Garnem’) y el híbrido OP-‘P.2175’ (*P. cerasifera* Ehrh.) analizados (Figura 5). Sin embargo, la estrategia adoptada por estos dos últimos genotipos fue de plantas ahorradoras

# geoactive



## ACTIVADOR DE MICROBIOMA DEL SUELO

**geoactive** es un producto prebiótico y posbiótico con bioactivadores, formulado a base de biofermentados y extractos de plantas, que activa el microbioma del suelo, favoreciendo los microorganismos beneficiosos nativos de la rizosfera y mejorando la salud del suelo.



Activa el microbioma, aumentando la salud del suelo.



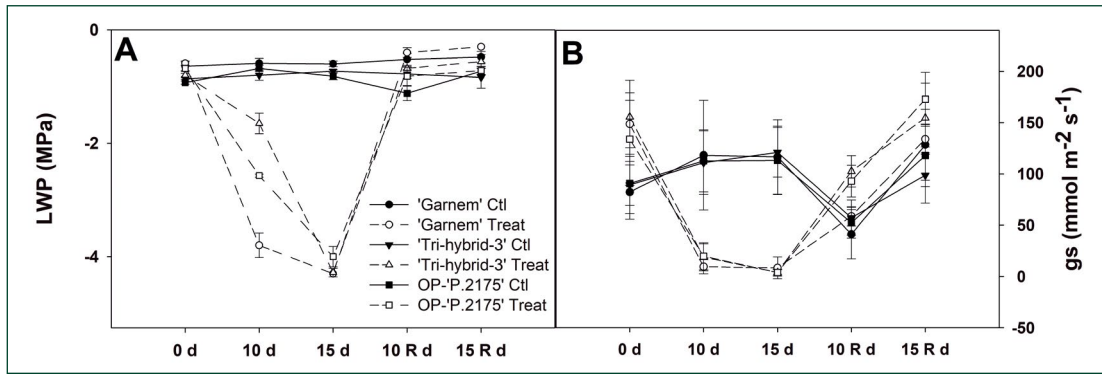
Mayor disponibilidad de nutrientes.



Mayor tolerancia al estrés.



Mayor producción, calidad y rentabilidad



**Figura 5.** Valores de (A) potencial hídrico foliar (LWP) y (B) conductancia estomática (gs) en plantas control y plantas estresadas de los genotipos Garnem®, Mirobolán 'P.2175' × Garnem®-3 y OP-'P.2175' durante un experimento de sequía a largo plazo. Las barras de error representan el error estándar de la media. (d: días; R: recuperación).

desde el primer momento (Figura 5). La recuperación de los valores de LWP y gs, además del rebrote foliar durante el periodo de recuperación de 15 días, sugirió que los tres genotipos presentaban un rápido restablecimiento de sus funciones homeostáticas (Figura 5) (BIELSA *et al.*, 2016).

A corto plazo se llevaron a cabo dos experimentos: (i) el primero en el que las raíces de las plantas de Garnem® estresadas fueron introducidas en membranas de diálisis con su sustrato de turba y se sumergieron en una solución de polietilenglicol, PEG-6000, para simular condiciones de estrés hídrico durante 24 h (BIELSA *et al.*, 2018b); (ii) y otro experimento en el que a plantas de Garnem® con sustrato de perlita se les restringió el riego durante 24 h, con un posterior periodo de restablecimiento de riego de 24 h (BIELSA *et al.*, 2019b). Los mecanismos de evitación, explicados anteriormente, presentes en Garnem® fueron confirmados en ambos experimentos. La tasa de RWC en las plantas estresadas disminuyó, pero aún mantenía valores altos, mientras que el porcentaje de EL fue incluso menor a las 24 h en ambos ensayos. Es decir, Garnem®, a bajos potenciales hídricos, es capaz de mantener altos sus valores de RWC y baja su porcentaje de EL, lo cual confirma ese ajuste osmótico, evidenciando un mecanismo de tolerancia a la sequía por parte de Garnem® (BIELSA *et al.*, 2018b; BIELSA *et al.*, 2019b).

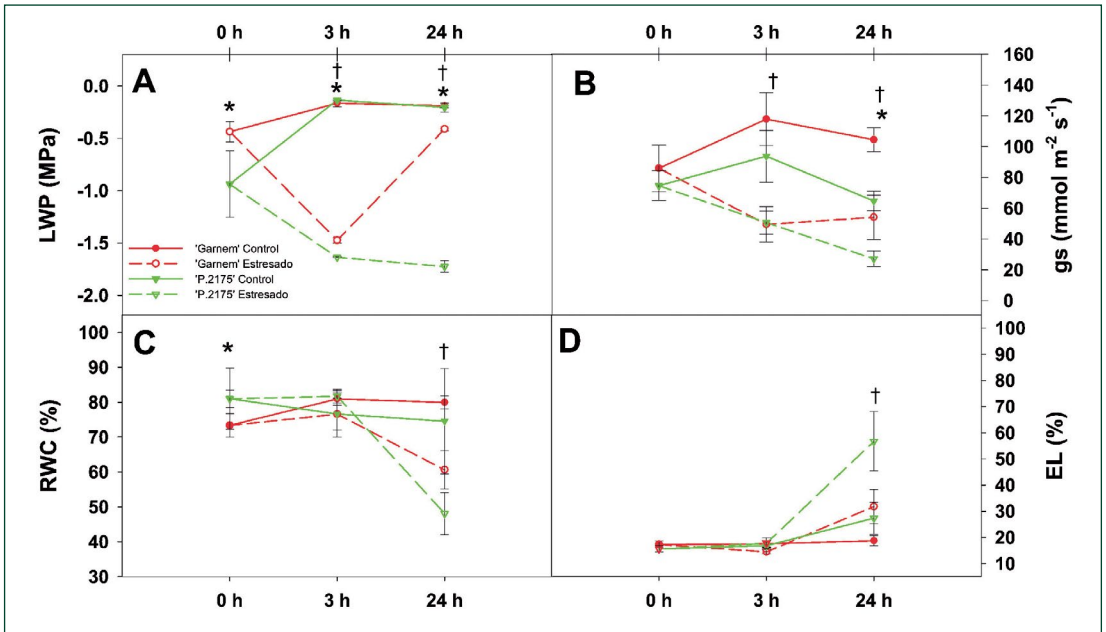
Cuando estos experimentos se realizan a corto plazo con el híbrido Garnem® y un ciruelo *P. cerasifera* se observan igualmente la rápida res-

puesta adaptativa de Garnem® frente al ciruelo que sigue disminuyendo a las 24 h del estrés hídrico (Figura 6) (BIELSA *et al.*, 2021).

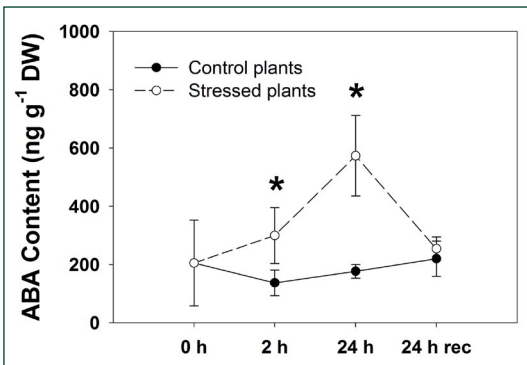
### Caracterización de la respuesta bioquímica al estrés hídrico

La ruta de señalización del ácido abscísico (ABA) es una de las vías más importantes que regula el cierre estomático (KIM *et al.*, 2010) e induce la expresión de diversos genes de respuesta a la sequía con funciones protectoras (TAKAHASHI *et al.*, 2018). Esta fitohormona se acumula en primer lugar en las raíces expuestas al estrés por hídrico. Luego, el ABA actúa como una molécula de señalización de la raíz al brote, transportando la señal de estrés a las hojas y promoviendo así el cierre estomático (CHRISTMANN *et al.*, 2013).

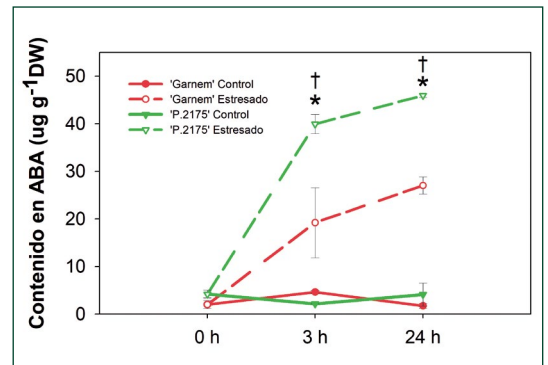
Para determinar la inducción bioquímica provocada por el ácido abscísico (ABA) y dilucidar su implicación en la respuesta al estrés hídrico, además de su participación en el desencadenamiento de los mecanismos fisiológicos y moleculares, se realizó el cálculo del contenido de ABA en el experimento a corto plazo en el que se sometieron plantas de Garnem® con sustrato de perlita a estrés hídrico durante 24 h, seguidos de 24 h de recuperación del suministro hídrico. Se observó un crecimiento exponencial del contenido de ABA desde las 0 h hasta las 24 h en las plantas estresadas, disminuyendo a valores iniciales a las 24 h de recuperación del estado hídrico (Figura 7). Igualmente se observó el aumento de la hor-



**Figura 6.** Valores de (A) potencial hídrico foliar (LWP), (B) conductancia estomática (gs), (C) contenido relativo en agua (RWC) y (D) fuga de electrolitos (EL) durante un experimento a corto plazo (24 h) en plantas control y plantas sometidas a estrés de Garnem® (*P. amygdalus* × *P. persica*) y Mirobolán P.2175® (*P. cerasifera*). \* Representa diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre genotipos. † Representa diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre tratamientos (control y estresado).



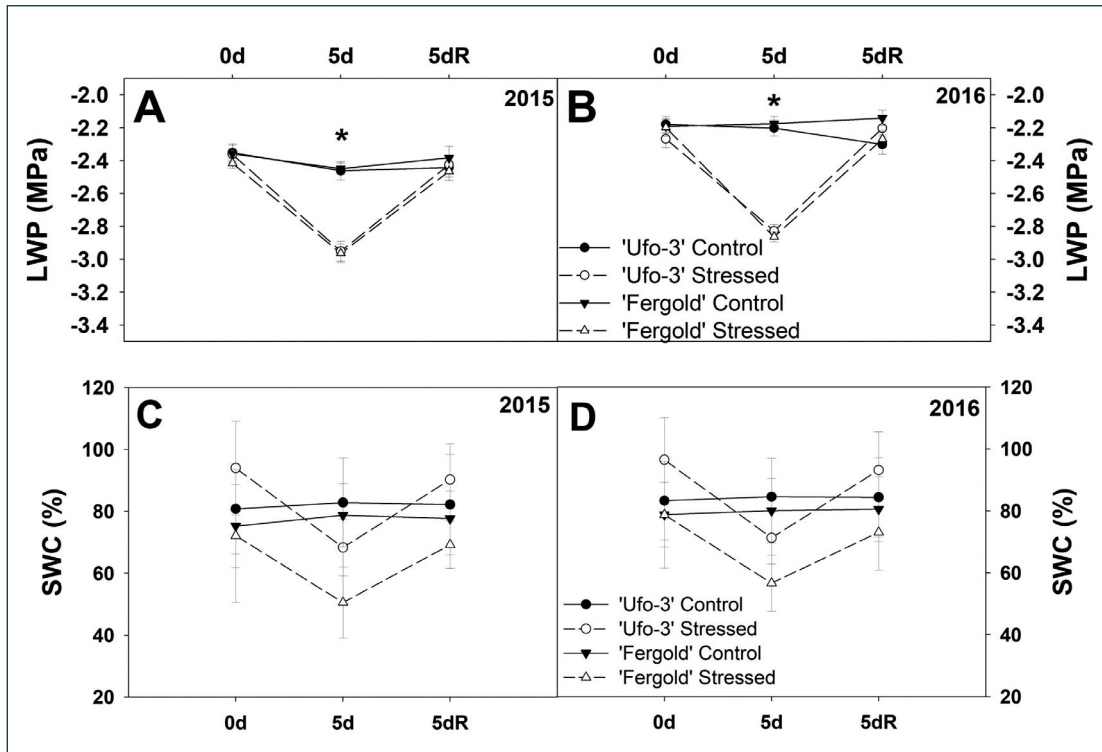
**Figura 7.** Contenido foliar de ácido abscísico (ABA) en plantas control y estresadas de Garnem® en un ensayo a corto plazo con sustrato de perlita. Las barras de error representan el error estándar de la media. \* Representa diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre tratamientos (control – estresado) para cada punto temporal del ensayo. (h: horas; rec: recuperación).



**Figura 8.** Contenido foliar de ácido abscísico (ABA) en plantas control y estresadas de Garnem® y ciruelo mirabolán P.2175® en un ensayo a corto plazo de 24 h con sustrato de perlita. \* Representa diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre genotipos; † Representa diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre tratamientos (control y estresado).

mona IBA en las plantas estresadas de Garnem® pero en menor medida que en las plantas estresadas del ciruelo Mirabolano (Figura 8). El ABA es una de las fitohormonas de respuesta a estrés

hídrico más importante ya que su acumulación está relacionada con diferentes rutas de señalización cruciales como la regulación del cierre estomático, el ajuste osmótico, la estabilidad de la



**Figura 9.** Evolución del (A y B) potencial hídrico foliar (LWP) y el contenido hídrico del suelo (C y D) acumulado en los primeros 30 cm de profundidad a lo largo del experimento para los dos años estudiados y las dos variedades de melocotón analizadas en el experimento de sequía a largo plazo llevado a cabo en condiciones de campo. Las barras de error representan el error estándar de la media. \* Representa las diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre tratamientos para cada punto temporal del experimento. (d = día; R = recuperación).

membrana e incluso está implicada en regulaciones del crecimiento radicular. Procesos que mejoran el UEA. Por tanto, Garnem® volvería a presentar un claro mecanismo de tolerancia que le lleva a la adaptación bajo condiciones de sequía (BIELSA *et al.*, 2019b, BIELSA *et al.*, 2021).

Con el fin de completar los ensayos realizados en condiciones controladas, se llevó a cabo un experimento de sequía en campo, en una de las regiones más áridas de España como es Murcia (BIELSA *et al.*, 2019a). Los árboles en producción de las variedades de melocotonero 'Fergold' y 'UFO-3' injertadas en Garnem® fueron sometidos a 5 días sin riego, con 5 días de recuperación de riego en dos años, 2015 y 2016. En cuanto a su respuesta fisiológica, el LWP indicó estrés en los árboles, con valores de LWP cercanos a  $-2$  MPa (Figuras 9 A y B). A través de sondas se midió el conteni-

do hídrico del suelo (SWC) y se observó cómo descendía en ambas variedades, pero este descenso del contenido de agua fue más acusado en 'Fergold' que en 'UFO-3' (Figuras 9 C y D). Este hecho puede ser debido a que la cosecha de los frutos no se hizo en el mismo día. En 'UFO-3', los frutos se recogieron antes, entrando en parada vegetativa antes y por tanto con menos necesidades de agua que 'Fergold' que hacía menos tiempo que se había cosechado el fruto. Las tasas de intercambio gaseoso estudiadas variaron entre los árboles control y los estresados, pero no se observaron diferencias genotípicas en los árboles estresados. En cuanto al RWC, este se mantuvo alto durante todo el ensayo (BIELSA *et al.*, 2019a).

Teniendo en cuenta todo esto, se puede decir que las dos variedades injertadas sobre Garnem® fueron capaces de mantener su contenido hídri-



# La mejor solución nutricional para el Olivo

**HaifaStim™**



**Haifa Bonus™**

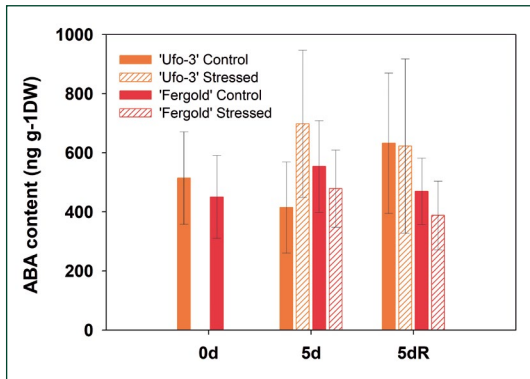
Suplementos nutricionales para cultivos de calidad. Maximizan el rendimiento, potencian los procesos de crecimiento y reducen el estrés

Fertilizante foliar con efecto prolongado Stop & Go para una óptima absorción.



Pioneering the Future.

Haifa Iberia | Telf: 91 591 2138 | E-mail: iberia@haifa-group.com | www.haifa-group.com



**Figura 10.** Contenido foliar de ácido abscísico (ABA) en dos variedades de melocotón analizadas en el experimento de sequía a largo plazo llevado a cabo en condiciones de campo. Las barras de error representan el error estándar de la media.

co, a pesar de los bajos potenciales, presentando esa estrategia de evitación ya mencionada. A nivel bioquímico, se comprobó que la variación en el contenido de ABA no siguió la misma tendencia que en el experimento realizado en condiciones controladas (Figura 10). En condiciones de campo, la respuesta fisiológica no fue debida a los mecanismos de señalización provocados por el contenido de ABA como se había comprobado en el ensayo con condiciones controladas. La falta de correlación entre la respuesta bioquímica y fisiológica, en este ensayo, sugirió que bajo condiciones de campo los cambios fisiológicos permiten la evitación al estrés. Mientras que el mecanismo de señalización del ABA desde la raíz hasta las hojas necesitaría un nivel de estrés más severo que el experimentado durante estos 5 días en estas condiciones edafoclimáticas áridas (BIELSA *et al.*, 2019b; BIELSA *et al.*, 2019a).

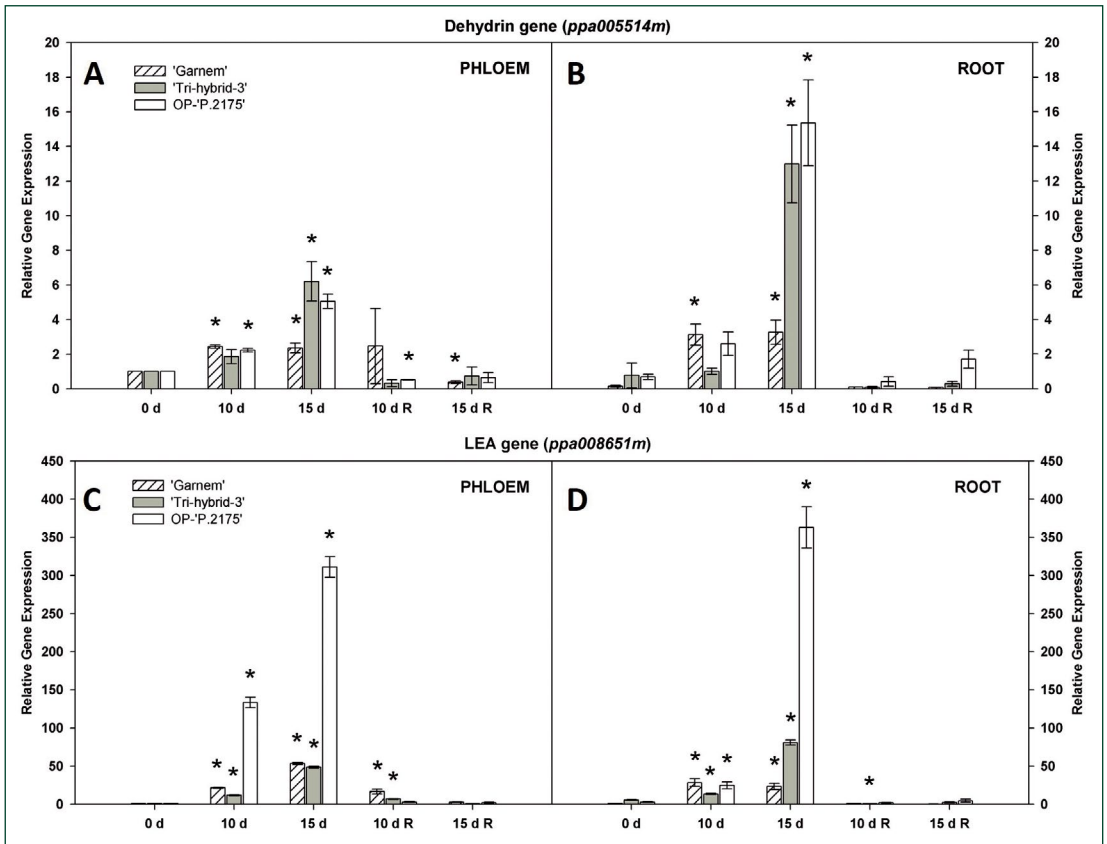
## Caracterización de la respuesta molecular al estrés hídrico

El mecanismo de señalización del ABA desencadena una cascada de procesos moleculares que permiten el mantenimiento de la homeostasis celular, conduciendo a la adaptación de la planta a la sequía (TAKAHASHI *et al.*, 2018). Estos procesos están involucrados genes reguladores como son factores de transcripción (FTs), quinasas y fosfatasas, y enzimas para la biosíntesis

de fitohormonas; y genes efectores que incluyen chaperonas, proteínas abundantes de embriogénesis tardía (LEA), enzimas implicadas en la biosíntesis de osmolitos, y proteínas canalizadoras de agua (TAKAHASHI *et al.*, 2018).

Con el fin de caracterizar ese mecanismo de señalización, se evaluó la respuesta genética a niveles transcriptómico (a largo y corto plazo) y proteómico (a corto plazo) para identificar genes candidatos involucrados en la respuesta a la sequía y caracterizar fuentes naturales de tolerancia a esta. Para ello, se analizó la expresión génica de dos genes reguladores: el gen que codifica para una proteína con dominio de zinc A20/AN1 dedo de zinc (*ppa012373m*) relacionado con la respuesta a bajas temperaturas, salinidad y sequía, y un factor de transcripción (TF) bZIP (*ppa013046m*), homólogo al gen *BZIP3*, que actúa como regulador postranscripcional del gen *ProDH*, involucrado a su vez en el metabolismo de la prolina; y dos genes efectores: el gen *Dhn1* (*ppa005514m*) y el gen que codifica para una proteína LEA homóloga a LEA D29 (*ppa008651m*) en tejidos de floema y raíz procedentes de los tres genotipos (Garnem<sup>®</sup>, 'P.2175' × Garnem<sup>®</sup>-3 y OP-'P.2175') estudiados en el ensayo a largo plazo (15 días sin agua, seguidos de 15 días recuperación del riego). La expresión relativa de los dos genes efectores fue mayor en raíz que en floema (Figura 11), indicando que la respuesta primaria se realiza antes en el sistema radicular. El máximo nivel de expresión se alcanzó a los 15 días, siendo mayor en los genotipos Garnem<sup>®</sup>-3 y OP-'P.2175', que en Garnem<sup>®</sup> (BIELSA *et al.*, 2016). Por otro lado, la alta expresión relativa presente en el gen codificante de la proteína LEA revelaría un papel osmoprotector bajo condiciones de sequía (BIELSA *et al.*, 2016).

A corto plazo, se realizó un análisis del transcriptoma (RNA-seq) de tejido radicular en Garnem<sup>®</sup> tomado a las 0 h, 2 h y 24 h, procedente del ensayo con PEG-6000. Mediante la secuenciación con tecnología Illumina se obtuvieron 10 bibliotecas con un total de 0,4 billones de lecturas brutas. Tras un filtrado y ensamblaje *de novo*, se obtuvieron 147742 contigs, que se normalizaron mediante el método RPKM, calculando la expresión diferencial con el dato de corte log5. Así se



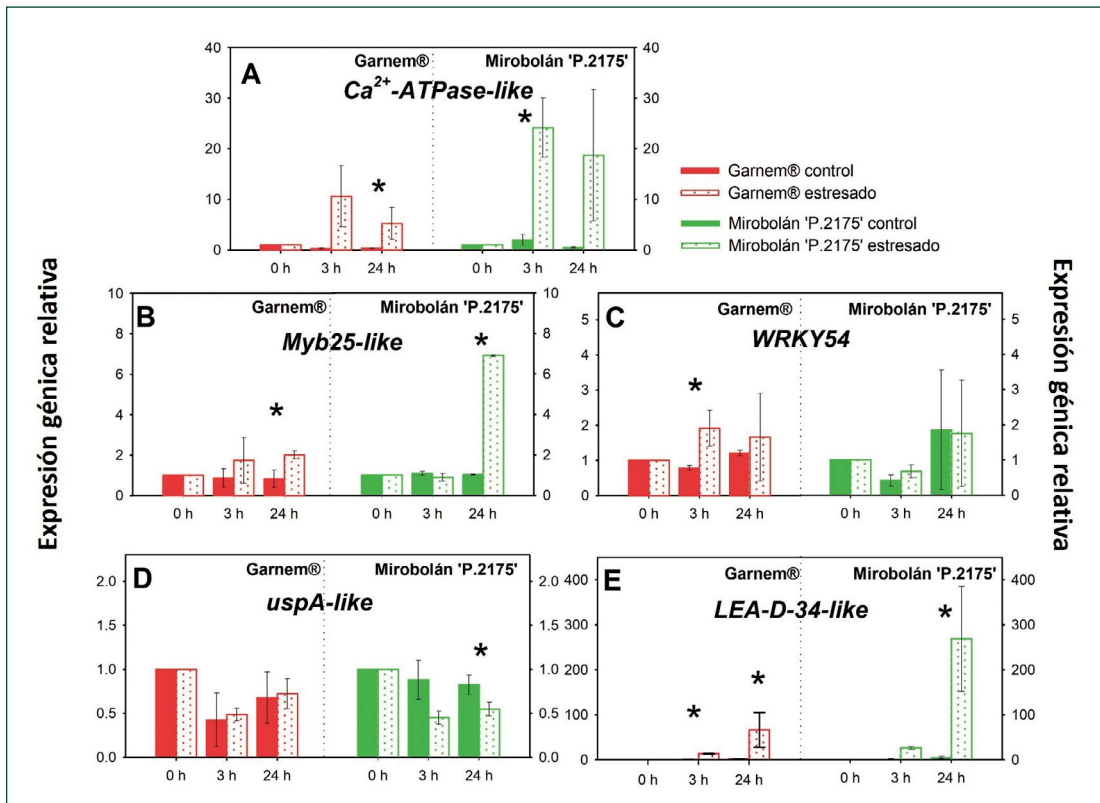
**Figura 11.** Expresión génica de los dos genes efectores analizados en tejidos de floema y raíz en los tres genotipos Garnem®, 'P.2175' × Garnem®-3 y OP-'P.2175' sometidos a estrés hídrico a largo plazo con periodo de recuperación. Las barras de error representan el error estándar de la media. \* Representa las diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) para cada genotipo con respecto al día 0. (d = día; R = recuperación).

obtuvieron un total de 83.110 DECs (*Differential Expression Contigs*). Finalmente, se llegaron a anotar funcionalmente 26.700 DEGs (*Differential Expression Genes*), de entre los cuales se identificaron 655 enzimas participantes en 140 rutas metabólicas que se desencadenan en la respuesta a estrés hídrico. Estas son, entre otras, el metabolismo de la purina, tiamina, el almidón y la sacarosa, y la ruta de la glicólisis. Así pues, se identificaron genes involucrados en las cascadas de señalización y control transcripcional, genes osmoprotectores y los genes implicados en el transporte de agua e iones (BIELSA *et al.*, 2018b).

Cuando se ha estudiado la expresión diferencial de los genes identificados como responsables a la sequía, siempre se ha observado una ex-

presión diferencial entre el híbrido de almendro × melocotonero Garnem® y el ciruelo mirabolán 'P.2175'. La respuesta y adaptación a la sequía se desencadena en tres etapas con distintos genes implicados en cada uno de ellos. Estas son:

- Percepción y propagación de la señal, donde se activan genes como el gen que codifica una ATPasa transportadora de  $Ca^{2+}$  de la membrana plasmática (*Ca<sup>2+</sup>-ATPasa-like*) que actúa como mensajero secundario (Figura 12 A).
- Traducción de la señal, etapa en la que actúan factores de transcripción (FTs) *MYB25-like* y *WRKY54* (Figuras 12 B y C).
- Expresión génica hacia la adaptación a la sequía, donde se activan los genes efectores



**Figura 12.** Expresión relativa (A) de una ATPasa transportadora de  $Ca^{2+}$  de la membrana plasmática (*Ca<sup>2+</sup>-ATPase-like*); (B) del factor de transcripción *Myb25* (*Myb25-like*); (C) del factor de transcripción *WRKY54* (*WRKY54 TF*); (D) del gen que codifica una proteína universal A del estrés (*uspA-like*); y (E) del gen que codifica para una proteína abundante de embriogénesis tardía D-34-like (*LEA-D-34-like*). Las barras de error representan el error estándar de la media. \* Representa valores de expresión significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ) tras la prueba *t* de Student entre tratamientos (control – estrés) dentro de cada genotipo (Garnem®– Mirobolán 'P.2175') para cada punto temporal del experimento (0 h–3 h–24 h).

como el gen que codifica una proteína universal A del estrés (*uspA-like*); y un gen que codifica una proteína abundante de embriogénesis tardía D-34 (*LEA-D-34-like*) (Figuras 12 D y E) (BIELSA *et al.*, 2021).

Por otro lado, a nivel proteómico, tras un análisis proteómico realizado en raíces de Garnem® procedentes del experimento de sequía a corto plazo (24 h sin riego, seguidas de 24 h de recuperación) con plantas en sustrato de perlita, se observaron cambios significativos en los niveles de abundancia de una serie de proteínas a las 24 h de estrés hídrico. De estas, 15 proteínas fueron identificadas en diferentes procesos biológicos, descritos también en el análisis transcriptómico

descrito anteriormente como son el metabolismo lipídico, el metabolismo de amino ácidos y nitrógeno, en procesos de actividad del transporte de iones, el metabolismo del carbono, en procesos de modificación y síntesis de proteínas, en la respuesta transcripcional, la respuesta defensiva y en la hormonal, además de otras proteínas relacionadas con los procesos de edición del ARN y por tanto con la inducción de genes de respuesta a sequía (BIELSA *et al.*, 2019b).

Además, se llevó a cabo la caracterización de fuentes naturales de tolerancia a sequía mediante un fenotipado analizando el contenido foliar en minerales y la discriminación del isótopo  $^{13}C$  ( $\Delta^{13}C$ ) en hojas, parámetros relacionados

negativamente con el UEA, y un estudio de las regiones promotoras de dos genes implicados en la respuesta a estrés hídrico (*PpDhn2* y *DREB2B*) en 48 genotipos de *Prunus* (BIELSA *et al.*, 2018a; Cuadro 1). Se comprobó la relación positiva entre el contenido foliar en minerales y  $\Delta^{13}C$  (Figura 13). Esta relación, en función de los genotipos, reveló que *P. davidiana* es el genotipo con el mayor UEA, seguido por las especies silvestres relacionadas con almendro estudiadas. Estos genotipos silvestres, cuyo origen son principalmente las zonas áridas y montañosas, muestran una adaptación genética a las condiciones climáticas extremas, pudiendo ser seleccionados para la mejora de patrones tolerantes a la sequía como fuente potencial de genes relacionados con un mejor UEA. Por otra parte, con un menor UEA se encontraban la serie almendro  $\times$  melocotonero: Garnem<sup>®</sup>, Felinem<sup>®</sup> y Monegro<sup>®</sup>, y su parental masculino, 'Nemared'. En cambio, su parental femenino, el almendro 'Garfi', tenía un UEA similar a las especies silvestres relacionadas con almendro. Además, al comparar los resultados entre Garnem<sup>®</sup>, Felinem<sup>®</sup> y Monegro<sup>®</sup>, destaca este último por su UEA superior (BIELSA *et al.*, 2018a) y así se ha comprobado en una variedad extratardía Vialfas<sup>®</sup>. Y como el uso eficiente del agua está relacionado con el vigor, se puede observar con el portainjerto Pilowred<sup>®</sup>, posee un UEA mayor que sus tres hermanos híbridos más vigorosos, siendo su valor y correlación cercano al del almendro 'Garfi' que es su parental femenino (Figura 13). El análisis de las regiones promotoras de los genes *PpDhn2* y *DREB2B* reveló el importante papel de los elementos cis identificados (elementos ABRE, Myc, Myb, HSE, etc.) en las rutas de señalización ABA-dependiente e -independiente, poniendo de manifiesto su interconexión. También se encontraron elementos LTRE en el promotor de *DREB2B* que evidencian su posible implicación en el estrés por bajas tempera-

## Maquinaria Agrícola de referencia



SECADEROS



ABONADORA  
RATM 20 PES



LÍNEA ROMPEDORA



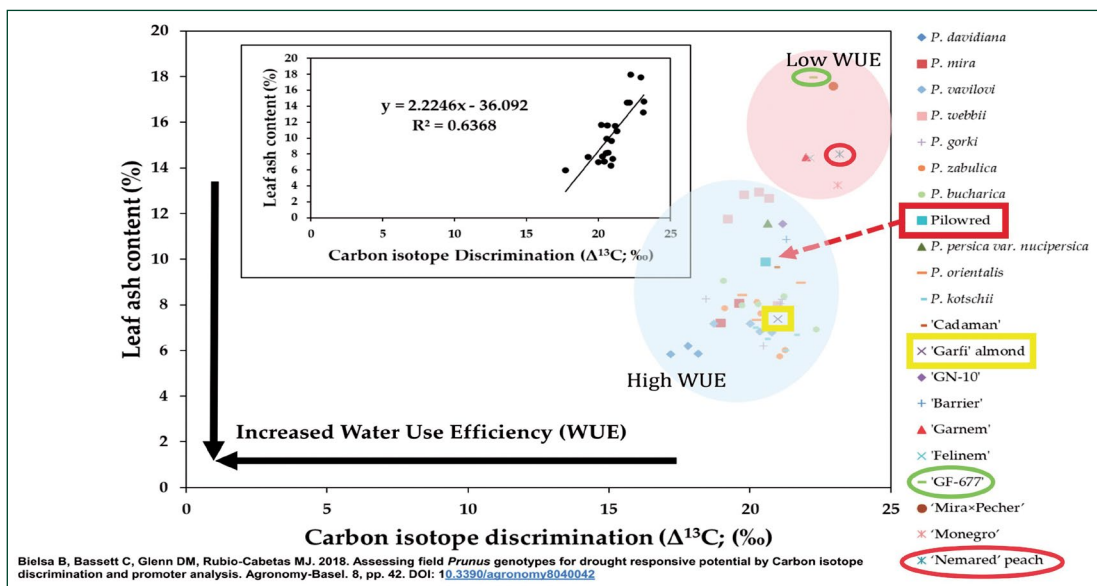
[www.segues.es](http://www.segues.es)

+34 973 524 336

[segues@seguessl.com](mailto:segues@seguessl.com)

Genotipos parentales				Nº individuos
<i>P. davidiana</i> (Carr.) Franch				3
<i>P. mira</i> Koehne kov et. kpst				2
<i>P. persica</i> (L.) Batsch				1
'Garfi' ( <i>P. amygdalus</i> (L.) Batsch)				1
'Nemared' ( <i>P. persica</i> (L.) Batsch)				1
Especies silvestres				
<i>P. bucharica</i> (Korsh.) Fetdsch.				5
<i>P. zabalica</i> Seraf.				5
<i>P. webbii</i> (Spach) Vieh.				5
<i>P. Vavilovi</i> (Spach)				4
<i>P. orientalis</i> (Mill.) [syn. <i>P. argentia</i> (Lam)]				4
<i>P. garki</i> (Fristch)				4
<i>P. kotschii</i> (A. kotschii Boiss.)				4
Genotipos híbridos				
'MiraxPecher'	<i>P. mira</i> Koehne kov et. kpst	<i>P. persica</i> (L.) Batsch		1
'Barrier'	<i>P. davidiana</i> (Carr.) Franch	<i>P. persica</i> (L.) Batsch		1
'Cadaman'	<i>P. persica</i> (L.) Batsch	<i>P. davidiana</i> (Carr.) Franch		1
'GF-677'	'Garfi' ( <i>P. amygdalus</i> (L.) Batsch)	<i>P. persica</i> (L.) Batsch		1
'Garnem'	'Garfi' ( <i>P. amygdalus</i> (L.) Batsch)	'Nemared' ( <i>P. persica</i> (L.) Batsch)		1
'Felinem'	'Garfi' ( <i>P. amygdalus</i> (L.) Batsch)	'Nemared' ( <i>P. persica</i> (L.) Batsch)		1
'Monegro'	'Garfi' ( <i>P. amygdalus</i> (L.) Batsch)	'Nemared' ( <i>P. persica</i> (L.) Batsch)		1
'GN-8'	'Garfi' ( <i>P. amygdalus</i> (L.) Batsch)	'Nemared' ( <i>P. persica</i> (L.) Batsch)		1
'GN10'	'Garfi' ( <i>P. amygdalus</i> (L.) Batsch)	'Nemared' ( <i>P. persica</i> (L.) Batsch)		1

**Cuadro 1.** Genotipos de *Prunus* utilizados en el análisis de las regiones promotoras de dos genes implicados en la respuesta a estrés hídrico, *PpDhn2* y *DREB2B*.



**Figura 13.** Relación entre el contenido mineral foliar y la discriminación del isótopo del carbono ( $\Delta^{13}C$ ), y su relación inversa con el uso eficiente del agua (UEA).

turas. En el promotor de *PpDhn2* se localizaron, a su vez, elementos relacionados la respuesta a frío, ritmos circadianos, el desarrollo meristemático y la expresión hormonal, entre otros, destacando un papel más amplio en otros procesos metabólicos (BIELSA *et al.*, 2018a).

Tras el análisis en conjunto de todos los resultados obtenidos se puede concluir que las alteraciones fisiológicas, bioquímicas, transcriptómicas y a nivel proteómico revelarían la puesta en marcha de mecanismos de evitación, primeramente, y de tolerancia después, que permitirían la adaptación de Garnem® bajo condiciones de sequía. Además, destacan ocho genes candidatos para la selección de portainjertos *Prunus* tolerantes a la sequía: los genes *ppa008651m*, *PpDhn1*, *PpDhn2* y *DREB2B*; además de los DEGs: *ERF023*; *LRR receptor-like serine/threonine-kinase ERECTA* y *NFYB3*, por su relación con una mejor UEA; y finalmente el gen *Myb25-like*, represor de la fosfatasa *PPC2*, validado mediante qRT-PCR. Estos resultados pueden contribuir a mejorar el conocimiento existente sobre los cambios en respuesta a la sequía. La comprensión de estas estrategias de evitación y tolerancia ayudarán a proponer nuevos retos en la mejora de la tolerancia a la sequía en portainjertos *Prunus*. •

## Agradecimientos

Este trabajo forma parte del Proyecto de I+D+i RTI2018-094210-R-I00 financiado por MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033, además de por el Gobierno de Aragón (Grupo Consolidado A12\_20R).

## Bibliografía

AEMET-CSIC. (2023). Informe anual sobre el clima en España. Recuperado de sitio web de AEMET, [https://aemet.es/es/serviciosclimaticos/monitor\\_sequia\\_met](https://aemet.es/es/serviciosclimaticos/monitor_sequia_met)

BELIN, C., THOMINE, S., & SCHROEDER, J. I. (2010). Water Balance and the Regulation of Stomatal Movements. En A. Pareek, S. K. Sopory y H. J. Bohnert (Eds.), *Abiotic Stress Adaptation in Plants: Physiological, Molecular and Genomic Foundation* (pp. 283–305). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-3112-9>

BIELSA, B., BASSETT, C., GLENN, D. M., & RUBIO-CABETAS, M. J. (2018a). Assessing field *Prunus* genotypes for drought responsive potential by Carbon isotope discrimination and promoter analysis. *Agronomy*, 8, 42. <https://doi.org/10.3390/agronomy8040042>

BIELSA, B., GARCÍA-BRUNTON, J., SANZ, M. A., & RUBIO-CABETAS, M. J. (2019a). Caracterización de la respuesta adaptativa a sequía de dos cultivares de melocotonero en condiciones de aridez. ITEA-Información Técnica Económica Agraria, 115(4), 307–325. <https://doi.org/10.12706/itea.2019.010>

BIELSA, B., HEWITT, S., REYES-CHINO-WO, S., DHINGRA, A., & RUBIO-CABETAS, M. J. (2018b). Identification of water use efficiency related genes in 'Garnem' almond-peach rootstock using time-course transcriptome analysis. *PLoS ONE*, 13(10), e0205493. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205493>

BIELSA, B., LEIDA, C., & RUBIO-CABETAS, M. J. (2016). Physiological characterization of drought stress response and expression of two transcription factors and two LEA genes in three *Prunus* genotypes. *Scientia Horticulturae*, 213, 260–269. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.11.006>

BIELSA, B., SANZ, M. Á., & RUBIO-CABETAS, M. J. (2019b). Uncovering early response to drought by proteomic, physiological, and biochemical changes in the almond × peach rootstock 'Garnem'. *Functional Plant Biology*, 46(11), 994. <https://doi.org/10.1071/FP19050>

BIELSA, B., SANZ, M. Á., & RUBIO-CABETAS, M. J. (2021). 'Garnem' and Myrobalan 'P.2175': Two Different Drought Responses and Their Implications in Drought Tolerance. *Horticulturae*, 7, 299. <https://doi.org/10.3390/horticulturae709029>

CHAVES, M. M., FLEXAS, J., & PINHEIRO, C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 103(4), 551–560. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn125>

CHRISTMANN, A., GRILL, E., & HUANG, J. (2013). Hydraulic signals in long-distance signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(3), 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.02.011>

FELIPE, A. J., RIUS, X., & RUBIO-CABETAS, M. J. (2022). El cultivo del almendro. Segunda Edición. En Felipe, Rius X. Rubio-Cabetas MJ, (Eds.), 567pp ISBN: 978-0-646-85851-7

FRAGA, *et al.*, (2023). Efficient water uses in olive groves in a context of climate change. En CIHEAM. IAMZ. OliveGroves. Recuperado de <https://edu.iamz.ciheam.org/OliveGroves/en/Septiembre2023>.

IPCC. (2023). Summary for Policymakers. En H. Lee y J. Romero (Eds.), *Climate Change 2023: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (pp. 1–34). IPCC. <https://doi.org/10.59327/IPCC/AR6-9789291691647.001>

KIM, T.-H., BÖHMER, M., HU, H., NISHIMURA, N., & SCHROEDER, J. I. (2010). Guard Cell Signal Transduction Network: Advances in Understanding Abscisic Acid, CO<sub>2</sub>, and Ca<sup>2+</sup> Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 561–591. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112226>

LIND, C., DREYER, I., LÓPEZ-SANJURJO, E. J., *et al.*, (2015). Stomatal Guard Cells Co-opted an Ancient ABA-Dependent Desiccation Survival System to Regulate Stomatal Closure. *Current Biology*, 25(7), 928–935. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.01.067>

REIG, F., VICENTE-SERRANO, S. M., BEGUERÍA, S., LATORRE, B., LUNA, Y., MORATA, A. (s.f.). Monitor de Sequía. Recuperado de <https://monitordesequia.csic.es/>

RUBIO-CABETAS, M. J., FELIPE, A. J., & REIGHARD, G. L. (2017). Rootstock Development. En R. Socias i Company y T. M. Gradziel (Eds.), *Almonds: Botany, Production and Uses* (pp. 209–227). CABI.

TAKAHASHI, F., KUROMORI, T., SATO, H., & SHINOZAKI, K. (2018). Regulatory Gene Networks in Drought Stress Responses and Resistance in Plants. En M. Iwaya-Inoue, M. Sakurai, & M. Uemura (Eds.), *Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1081. Springer. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-1244-1\\_11](https://doi.org/10.1007/978-981-13-1244-1_11)

TEJEDOR, E., DE LUIS, M., CUADRAT, J. M., ESPER, J., & SAZ, M. A. (2016). Tree-ring-based drought reconstruction in the Iberian Range (east of Spain) since 1694. *International Journal of Biometeorology*, 60, 361–372. <https://doi.org/10.1007/s00484-015-1033-7>

VERSLUES, P. E., AGARWAL, M., KATIYAR-AGARWAL, S., & ZHU, J. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal*, 45(4), 523–539. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02593.x>