



8º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

La **Ciencia forestal** y su contribución a
los **Objetivos de Desarrollo Sostenible**



8CFE

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales

Cataluña | Catalunya - 27 junio | juny - 1 julio | juliol 2022

ISBN 978-84-941695-6-4

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Organiza



Potencial de la atmósfera enriquecida en CO₂ para amortiguar la respuesta ecofisiológica y metabólica a la sequía en *Pinus* spp.

FERNÁNDEZ DE SIMÓN, B., ARANDA, I., FÉRRIZ, M., MARTIN BENITO, D., GEA IZQUIERDO, G.

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Centro de Investigación Forestal (CIFOR). Carretera de la Coruña Km 7.5, 28040 Madrid, Spain. Tel: 913476789. fdesimon@inia.es.

Resumen

La sequía es el estrés abiótico con mayor impacto sobre las plantas en la región mediterránea. Además, otros motores del cambio climático y global, como altos niveles de CO₂ atmosférico, pueden modular y suavizar la respuesta funcional de las especies forestales a la sequía. Esta influencia en la fisiología de la planta se establece a diferentes escalas de organización biológica: desde una respuesta en la plasticidad de distintos rasgos funcionales hasta a nivel bioquímico en diferentes órganos. En este trabajo se presentan los primeros resultados de la respuesta ecofisiológica y metabolómica al déficit hídrico en plantas jóvenes de dos especies de *Pinus* con diferente sensibilidad a la sequía, y bajo ambientes contrastados de CO₂ atmosférico. Se sometieron plantas de *P. pinaster* y *P. pinea* en cámaras de crecimiento controlado a dos regímenes de riego (control y sequía) y dos niveles de CO₂ atmosférico (ambiente- 400 ppm- y elevado - 800 ppm). Los resultados preliminares pusieron de manifiesto diferencias entre las especies en distintos rasgos funcionales y en la bioquímica de diferentes órganos. Pese a su proximidad ecológica y taxonómica, las especies presentan una respuesta característica a los motores de cambio climático ensayados relativa a su distinta tolerancia a la sequía.

Palabras clave

Estrés por sequía, CO₂, coníferas, metaboloma, ecofisiología.

1. Introducción

Pinus pinaster y *Pinus pinea* son dos coníferas estrechamente relacionadas, que sin embargo muestran diferencias en su distribución y su tolerancia a la sequía. Pese a que ambas especies prosperan en las condiciones propensas a la sequía propia de la cuenca mediterránea, pudiéndose encontrar incluso en suelos arenosos, con baja capacidad de retención de agua. Aunque *P. pinea* es una especie más termófila que *P. pinaster*, una especie submediterránea con menor tolerancia a la sequía, sus requisitos ecológicos se superponen, existiendo rodales mixtos de ambas especies. Sin embargo, *P. pinaster* muestra una mayor amplitud ecológica, particularmente en relación con la disponibilidad de agua, aunque como otros pinos es una especie que evita la sequía gracias a la sensibilidad de sus estomas (De Miguel et al., 2012), pero teniendo cierta capacidad de tolerancia a través de mecanismos como el ajuste osmótico ante el déficit hídrico (De Miguel et al. 2016). *P. pinea* es una especie más termófila y xerofítica, y generalmente se encuentra en suelos más pobres, mostrando alta plasticidad fenotípica, con un patrón de variación en los rasgos morfológicos y fisiológicos que permite la adaptación a la falta de agua a corto plazo (Sánchez-Gómez et al., 2011).

La tolerancia a la deshidratación de las hojas en contextos ecológicos de poca disponibilidad de agua es un rasgo funcional importante, en el que los potenciales osmóticos en los puntos de pérdida de turgencia (Ψ_{TLP}) y de plena turgencia (Ψ_{T100}) se consideran indicadores clave en las relaciones entre plantas y agua, manteniendo una estrecha relación funcional con la capacidad de ajuste osmótico. El ajuste osmótico es un proceso complejo que responde al estrés que sufren las plantas durante los períodos secos estacionales (Aranda et al. 1996, Forner et al. 2018). Puede ser un

proceso pasivo, resultante de la reducción del volumen celular en los tejidos deshidratados, o puede deberse a un aumento activo de la concentración de compuestos con actividad osmótica (Turner, 2018). Por tanto, el alcance del ajuste osmótico se puede inferir de los cambios en Ψ_m entre plantas control y estresadas en respuesta a la escasez de agua, pero también por la diferente acumulación neta de solutos como aminoácidos, azúcares y otros metabolitos, que puede producirse tanto en las hojas como en otros órganos de la planta como tallo y raíz, aunque la mayoría de los estudios se han realizado solo en hoja.

La acumulación de carbohidratos es una respuesta rápida y ubicua al estrés hídrico en especies de árboles forestales (Rodríguez-Calcerrada et al., 2011, Martínez-Vilalta et al., 2016), pudiendo contribuir de forma relevante a cambios en el potencial osmótico en turgencia total (Aranda et al., 2021). La intensidad del cambio de los diferentes azúcares varía según la especie. En *P. pinaster*, es el polialcohol pinitol el que experimenta un incremento más relevante en respuesta al déficit de agua, con pocas variaciones en el resto de los carbohidratos, a pesar de que constitutivamente son los componentes más abundantes del metaboloma (Fernández de Simón et al., 2017). Algo similar ocurre con los diferentes ácidos orgánicos, que, aunque también se acumulan en gran cantidad en las acículas de *P. pinaster*, su incremento como consecuencia de la sequía es poco significativa (Fernández de Simón et al., 2017). Se disponen de muy pocos datos de los cambios metabólicos en el proceso de ajuste osmótico en *P. pinea*, pero llama la atención que Deligoz & Gur (2015) detectan en hoja, por métodos espectrofotométricos, una disminución de azúcares solubles y el incremento de los niveles de prolina, aminoácido relacionado con la capacidad de osmoregulación.

Una concentración elevada de CO₂ en la atmósfera puede reducir, e incluso eliminar o contrarrestar muchos de estos cambios bioquímicos inducidos por la sequía en *Pinus* spp., sugiriendo que las plantas en ambientes enriquecidos con CO₂ podrían percibir menos estrés oxidativo bajo sequía, y demostrando que juntos, estos dos factores abióticos desencadenan una respuesta metabólica diferente (Fernández de Simón et al., 2020). Además, los metabolomas de los órganos aéreos y subterráneos de las diferentes especies podrían verse afectados de manera desigual por estos dos factores del cambio climático, escasez de agua y alta [CO₂], mostrando una respuesta química diferente para modular la adaptación de los árboles a los marcos climáticos futuros.

2. Objetivos

En este trabajo queremos conocer si la respuesta fisiológica a sequía diferenciada entre las dos especies puede relacionarse con los cambios en los metabolitos más abundantes en los diferentes órganos (raíz, tallo y acícula), con reconocida actividad osmótica, y si hay un patrón característico de especie en esta respuesta. Por otra parte, la incidencia de la [CO₂] atmosférico en esta respuesta a sequía podría verse condicionada por la especie, y posiblemente puede presentar diferencias en los distintos órganos.

3. Metodología

3.1. Material vegetal

El ensayo consistió en un diseño factorial con dos concentraciones de CO₂, dos tratamientos de riego y dos especies de pino. Se plantaron plántulas de *P. pinaster* y *P. pinea* germinadas a partir de semillas en un sustrato de perlita dentro una cámara a 25°C. Aproximadamente 25 días tras la germinación, cuando las radículas fueron visibles y alcanzaron 1,5 cm de longitud, se seleccionaron 136 plántulas de cada especie, las cuales se plantaron en macetas (2 plantas por maceta) rellenas con un sustrato de turba y arena (2:1, v:v) y un fertilizante NPK + micronutrientes (Nutricote). Ya que el experimento se realizó en dos cámaras climáticas idénticas (Fitoclima 10000EHHF, Aralab Ltd, Sintra, Portugal), se asignaron aleatoriamente 34 macetas de cada especie a cada cámara. Pasados

dos semanas en cada cámara, se dejó solamente una de las dos plántulas en cada maceta. Las condiciones de cultivo fueron idénticas en las dos cámaras excepto en los niveles de CO₂. Fijamos el fotoperíodo a 14/10 horas luz/oscuridad. Los parámetros diarios se mantuvieron a 24.8 ± 0.7°C, 64.7 ± 1.3% humedad relativa y 762 ± 127 mol fotones m⁻² s⁻¹. Durante la fase oscura las condiciones se mantuvieron a 20.0 ± 0.4°C y 60.0 ± 1.1% de humedad relativa. El CO₂ atmosférico en la cámara de CO₂ ambiente (aCO₂) se mantuvo a 383 ± 32 ppm mientras que la cámara enriquecida con CO₂ (eCO₂) se mantuvo a 808 ± 15 ppm. Dentro de cada cámara las macetas se distribuyeron equidistantes y su posición fue cambiada aleatoriamente cada semana. De igual manera, para evitar un posible efecto de la cámara, se rotaron los dos tratamientos de CO₂ cada 60 días.

Además, se implementaron dos tratamientos de riego en el experimento. Durante la fase inicial, todas las macetas se mantuvieron a un 75 % de la capacidad de campo (FC), equivalente a un 20 % de contenido volumétrico de agua en suelo (VWC) medido con un sensor de humedad (ProCheck, Decagon Devices). Tres veces por semana las macetas se pesaron individualmente y se regaron hasta un peso objetivo definido por el VWC. Las plantas control (bien regadas) se mantuvieron a un 75 % de FC durante todo el experimento. Se realizaron tres cosechas, presentándose en este trabajo los resultados de la última (M3). Tras la primera cosecha (M1), el día 77, se comenzó el tratamiento de estrés hídrico en 16 plantas de cada especie y 12 se mantuvieron bajo las condiciones del tratamiento control. En esta primera fase del tratamiento de estrés (entre M1 y M2) se redujo la humedad al 40 % de FC (10 % VWC), hasta el día 136 que se realizó la segunda cosecha (M2). A partir de ese día y hasta el día de la tercera cosecha (día 161, M3) se intensificó el tratamiento de estrés hídrico al 10 % de FC (equivalente a 5 % VWC), manteniéndose estas condiciones hasta el día de la cosecha M3, cuyos resultados se presentan en este trabajo. Se muestraron el día 161, M3, 6 plantas control (bien regadas, C) y 10 plantas de tratamiento de sequía (D) de cada especie de pino y de cada tratamiento de CO₂.

3.2. Rasgos ecofisiológicos

Al objeto de establecer el estado hídrico de las plantas, se midió el potencial hídrico de todas las plantas cosechadas al amanecer ($\Delta_{amanecer}$) y al mediodía ($\Delta_{mediodia}$) en dos fechas, coincidiendo con el comienzo de los tratamientos de estrés hídrico (M2, M3). Los potenciales hídricos se midieron en los tallos principales de cada plántula con una cámara de Scholander (PMS Instrument Co. 7000, Corvallis, OR, USA).

3.3. Muestreo y extracción de metabolitos

Se muestraron acículas (A), tallos (T) y raíces finas (R) de las 63 plantas estudiadas de las dos especies, en el momento del pico del estrés. El material vegetal se mantuvo en condiciones de oscuridad, siendo inmediatamente congelado con nitrógeno líquido y almacenado a -80°C, hasta el momento de su liofilización. Una vez liofilizado, el material vegetal se molvió en molino de bolas (Retsch Mm 300) y se almacenó a 4°C en un ambiente seco y en la oscuridad hasta su análisis. La extracción de metabolitos se realizó por duplicado según lo descrito en Fernández de Simón et al. (2017).

3.4. Análisis metabolómico por CG-EM

Se utilizó un sistema de cromatografía de gases Agilent 6890N (Palo Alto, CA) equipado con un espectrómetro de masas de quadrupolo simple Agilent 5973N, siguiendo las condiciones descritas en Agilent G1979AA Fiehn GC/MS Metabolomics RTL Library Software (2013). Para la identificación de los metabolitos se utilizaron tanto librerías comerciales de espectros de masas (Wiley7/Nist05 GC/MS Library; Agilent Fiehn GC-MS Metabolomics RTL Library), como una librería propia con más de 300 espectros de masas obtenidos analizando en las mismas condiciones compuestos conocidos. El

criterio fue obtener una similitud superior al 95%, tanto de espectro de masas como de tiempo de retención. Se utilizaron las áreas de los picos obtenidos en modo SIM (Selected Ion Monitoring) y rectas de calibración construidas a partir de compuestos puros de referencia, analizados en las mismas condiciones, para calcular la concentración de cada metabolito, según el método del patrón interno.

3.5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron transformados logarítmicamente, escalados según Pareto y sometidos a análisis univariante y multivariante. Para ello se utilizó el software de acceso abierto MetaboAnalyst 4.0 (Chong et al., 2018). Para cada metabolito se hizo un test univariante (ANOVA) teniendo en cuenta los factores especie, órgano, disponibilidad de agua y $[CO_2]$ durante el experimento, así como la interacción entre los factores. Para analizar las diferencias significativas aplicamos las pruebas post hoc de Tukey-HSD y la Tasa de Descubrimiento Falso (FDR), obteniendo p (valores q) ajustados, y estableciendo un valor q umbral <0.05 a partir de la corrección FDR para considerar medias como significativamente diferentes. Con el fin de encontrar metabolitos clave que pudieran discriminar entre órganos y condiciones de crecimiento, se llevaron a cabo diferentes análisis multivariantes: Análisis de Componentes Principales (PCA) para comparar el metaboloma cuantitativo de cada órgano estudiado (acícula, tallo y raíz) entre las dos especies; y Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA) para evaluar las diferencias en los perfiles de metabolitos cuantitativos en cada órgano en relación con el nivel de riego y concentración de CO_2 . Identificamos los metabolitos con mayor carga en los modelos predictivos de S-Plots, teniendo en cuenta los que presentan mayores cargas p . La capacidad predictiva (Q^2) del modelo se utilizó como criterio de calidad.

4. Resultados

4.2. Potencial hídrico de las plantas.

Los potenciales hídricos de las plantas, tanto el $\Psi_{amanecer}$ como el $\Psi_{mediodía}$, fueron menores bajo ambas atmósferas de crecimiento (Figura 1). En términos comparativos, el pino piñonero tendió a presentar valores ligeramente inferiores de $\Psi_{amanecer}$ y $\Psi_{mediodía}$ que el pino marítimo. En cuanto al efecto del CO_2 , tan sólo el $\Psi_{amanecer}$ es algo menor en el tratamiento de estrés hídrico en atmósfera enriquecida ($CO_2=800$ ppm) en los pinos de las dos especies, pero no se observaron diferencias reseñables en las dos especies en respuesta a los tratamientos de CO_2 en el potencial del mediodía (Figura 1).

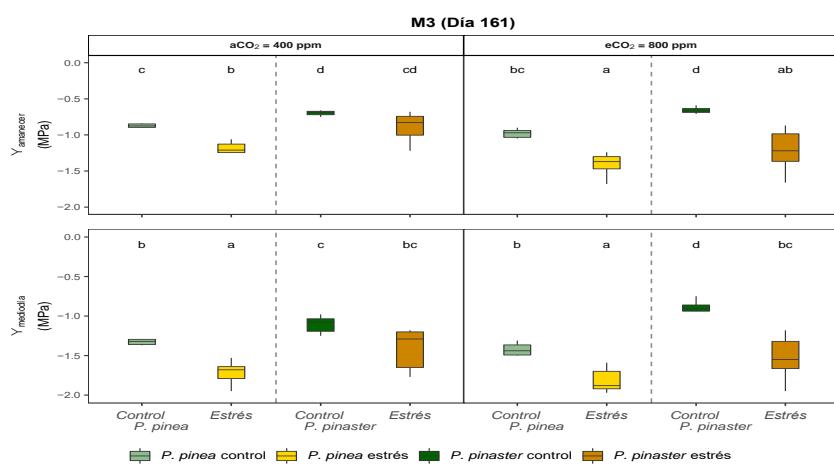


Figura 1. Potenciales hídricos de las plantas cosechadas al mediodía y al amanecer el día 161 del experimento. Letras diferentes expresan diferencias significativas en cada uno de los momentos de toma de muestra.

4.2. Cambios metabolómicos

Los tres órganos estudiados muestran metabolomas complejos, con muy pocas diferencias constitutivas entre especies a nivel de órgano. En este trabajo se presentan los metabolitos más abundantes en los tres órganos, cuyos cambios por efecto de la sequía podrían tener posiblemente una alta incidencia en el proceso de ajuste osmótico. Incluyen algunos azúcares solubles como los monosacáridos glucosa, fructosa y galactosa, los disacáridos sacarosa y trehalosa, y los trisacáridos rafinosa y melecitosa, el polialcohol pinitol, y los ácidos orgánicos quínico y shikímico.

Constitutivamente, e independientemente del riego o atmósfera de crecimiento, las diferencias cuantitativas más importantes fueron entre órganos. Incluso fueron de mayor relevancia que entre especies, para las que solo se apreció una clara diferenciación en lo relativo a la composición metabólica en el caso de las acículas (Figura 2).

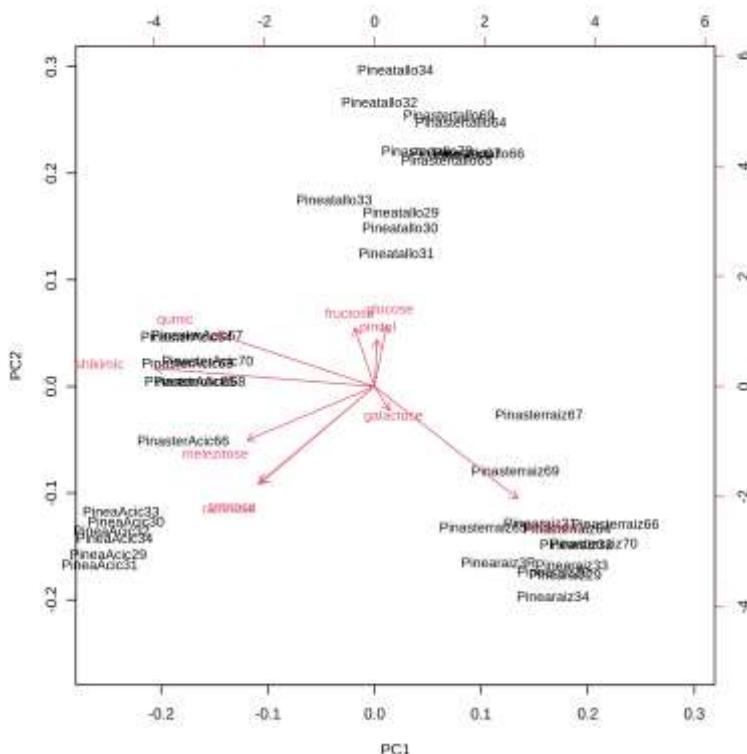


Figura 2. PCA de la distribución cuantitativa de metabolitos en los diferentes órganos de las dos especies en condiciones control de riego y [CO₂]. PC1 y PC2 explicaron un 52% y un 18,3% de la varianza, respectivamente.

Se detectaron mayores niveles de rafinosa, sacarosa y melecitosa en las acículas de *P. pinea*, y de ácidos quínico y shikímico en las de *P. pinaster*. La trehalosa fue el rasgo distintivo de la raíz, ya que solo se detectó en este órgano, de las dos especies. Por último, los tallos se distinguen de los otros dos órganos por sus mayores niveles de fructosa, glucosa y pinitol. El análisis estadístico de estas diferencias mediante PCA permite el agrupamiento de las muestras en relación con el órgano, solo distinguiéndose la especie en el caso de la acícula, como puede verse en la Figura 2, que muestra el gráfico relacionando las distancias estadísticas entre muestras y el peso de los metabolitos.

La sequía provoca cambios en las concentraciones de los metabolitos estudiados, pero estos cambios presentan algunas diferencias no sólo con relación a la especie y el órgano, sino también a la concentración de CO₂ atmosférico (Tabla1).

Tabla 1. Veces de cambio para cada uno de los metabolitos entre plantas control y estresadas por sequía en los diferentes órganos de las dos especies estudiadas, según la $[CO_2]$. aC = 400 ppm; eC = 800 ppm. Celdas sombreadas entre 2 y -2 en gradiente de azul a naranja, respectivamente.

Especie	<i>Pinus pinea</i>						<i>Pinus pinaster</i>							
	Órgano		tallo		raíz		acicula		tallos		raíz		acicula	
[CO ₂]	aC	eC	aC	eC	aC	eC	aC	eC	aC	eC	aC	eC	aC	eC
galactosa	2.8	0.2	-0.5	0.3	2.5	-1.4	-0.5	-0.2	0.0	0.0	0.1	0.0		
ac. shikimico	3.8	0.1	-0.1	0.2	-0.2	0.0	-0.3	0.1	-1.6	-1.3	0.1	0.2		
ac. quinico	3.8	0.2	-0.2	0.2	0.6	-0.3	0.6	0.1	-1.1	-1.3	0.0	-0.1		
pinitol	3.4	0.5	1.0	1.3	0.8	-0.5	1.0	0.2	0.7	0.5	1.1	0.5		
fructosa	2.3	-0.1	-0.7	-0.7	1.9	-0.6	0.8	0.1	-1.2	-1.2	0.0	0.3		
glucosa	2.5	0.0	-0.7	-0.8	2.1	-0.5	0.4	0.4	-1.3	-1.0	-0.3	0.6		
sacarosa	3.5	0.5	-1.0	0.5	0.3	-2.2	-1.2	0.0	-0.6	0.6	-0.3	0.7		
trehalosa			-0.2	0.7					-0.1	1.3				
rafinosa	2.0	0.1	-1.3	0.0	-1.5	-2.1	1.0	-1.5	-1.7	-0.7	0.6	1.3		
melecitosa	2.4	0.6	-1.4	0.3	-2.2	-1.9	1.3	0.4	-1.7	-0.2	0.6	1.7		

Los cambios que se producen en los órganos de *P. pinaster* fueron de poca intensidad, manteniéndose las diferencias en el metaboloma entre distintos órganos como el factor de mayor relevancia (Figura 2) y destacando el pinitol como el único metabolito que incrementa su concentración en los tres órganos por efecto de la sequía, tanto en condiciones de $[CO_2]$ atmosférico de 400 ppm como de 800 ppm, si bien en $[CO_2]$ elevada el impacto de la sequía sobre el incremento de este metabolito es mucho menor. Las variaciones más relevantes se produjeron en los trisacáridos (rafinosa y melecitosa), con un importante descenso en las raíces como consecuencia de la sequía a 400 ppm, mientras que se produce un incremento en acícola y especialmente en tallo. El crecimiento en una atmósfera enriquecida en CO_2 da lugar a que la disminución de estos compuestos en raíz sea menor que bajo aCO₂, disminuyendo incluso en tallo la rafinosa, y mostrando por el contrario en acícola incrementos significativos.

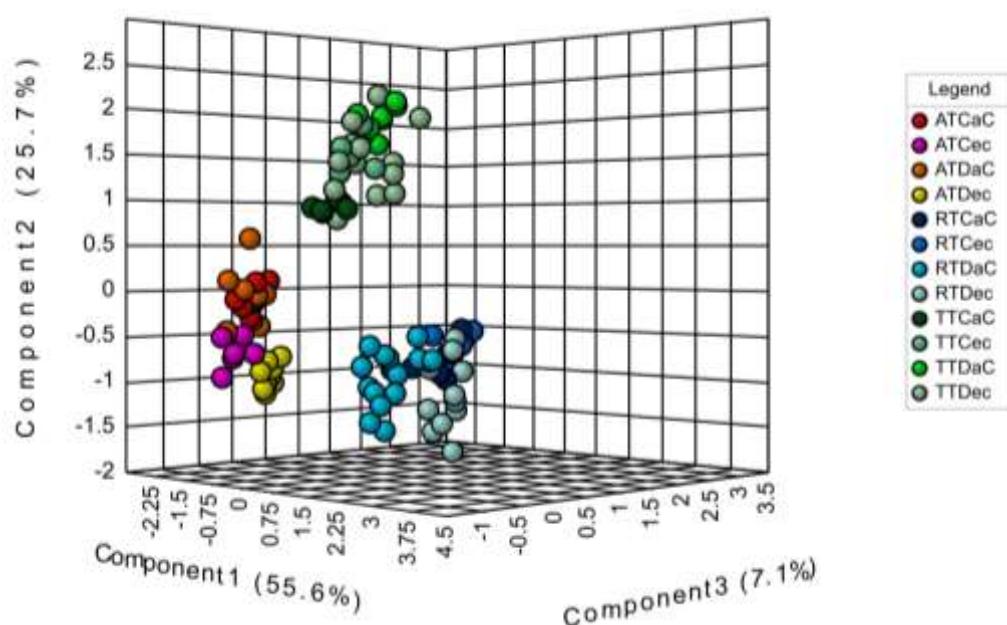


Figura 3. Score plot del modelo PLS-DA de la distribución cuantitativa de metabolitos en acícola (AT), raíz (RT) y tallo (TT) en plantas de *Pinus pinaster* bien regadas (C) y con estrés hídrico (D) en condiciones de $[CO_2]$ de 400 ppm (aC) y 800 ppm (eC) ($R^2 = 0,75$, $Q^2 = 0,52$ para los tres primeros componentes).

En *Pinus pinea* los cambios provocados por la sequía en la concentración de los diferentes metabolitos son más importantes que en el caso de *Pinus pinaster*, especialmente en ambientes de 400 ppm de [CO₂], y en acícula y tallo (Figura 4). En tallo se detectan cambios significativos en respuesta a la sequía, pero únicamente en ambiente de 400 ppm de [CO₂], con incrementos notables de todos los metabolitos estudiados. En acículas, el incremento se produce en los tres monosacáridos, pinitol y ácido quirílico, mientras que descienden los trisacáridos. El incremento en la concentración de CO₂ provoca, en las plantas estresadas por sequía, la disminución de todos los compuestos estudiados en acículas. En raíz los cambios son menos intensos, con incrementos del pinitol a causa de la sequía independientemente del nivel de CO₂ atmosférico. El resto de los compuestos disminuyen por efecto de la sequía en condiciones de 400 ppm de CO₂, especialmente trisacáridos, mientras que en condiciones de 800 ppm solo disminuyen los niveles de glucosa y fructosa.

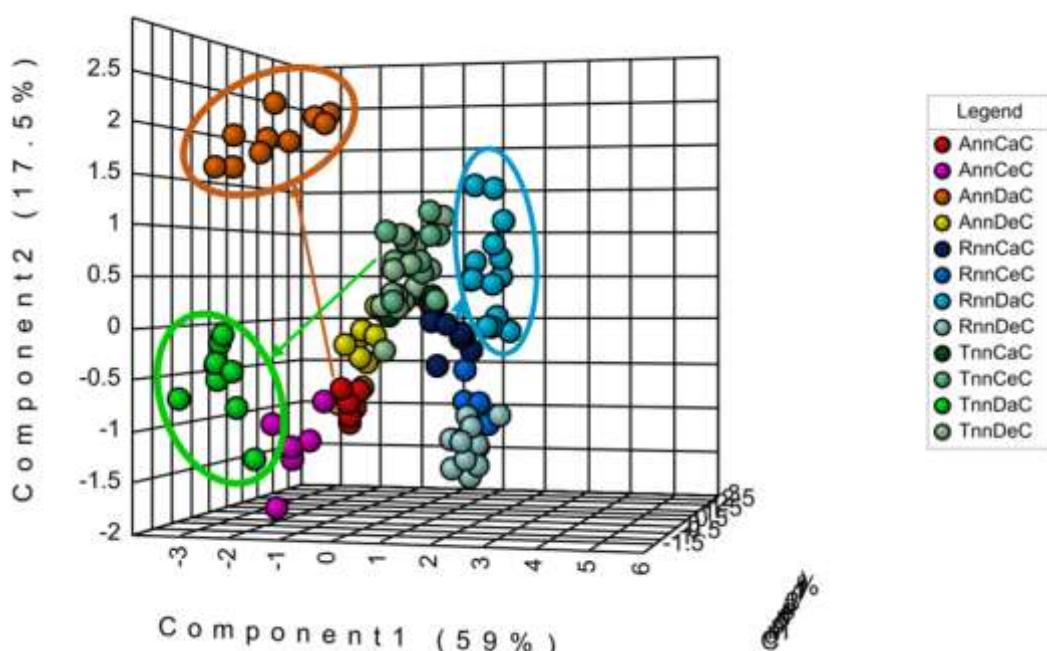


Figura 4. Score plot del modelo PLS-DA de la distribución cuantitativa de metabolitos en acícula (Ann), raíz (Rnn) y tallo (Tnn) en plantas de *Pinus pinea* bien regadas (C) y con estrés hídrico (D) en condiciones de [CO₂] de 400 ppm (aC) y 800 ppm (eC) ($R^2 = 0,55$, $Q^2 = 0,35$ para los tres primeros componentes, Componente 1 (59 %), Componente 2 (17.5%) y Componente 3 (9.8%)). Las flechas se han añadido para mostrar el desplazamiento en el espacio estadístico de las muestras DaC respecto a las CaC, en cada uno de los órganos.

5. Discusión

El efecto del tratamiento de sequía aplicado se reflejó en los cambios que se producen en los potenciales hídricos de las plantas, tanto al amanecer como al mediodía. Ambos fueron buenos descriptores del nivel de estrés hídrico real soportado por cada planta. A pesar de que el agua disponible en el suelo no varió entre especies, los potenciales hídricos reflejan la diferente sensibilidad a eventos de sequía de ambas especies, con potenciales hídricos ligeramente menores bajo condiciones control y mayores disminuciones en respuesta a sequía en *P. pinea* que en *P. pinaster*, especialmente al mediodía. El enriquecimiento de la atmósfera en CO₂ parece que tiene un efecto en el potencial de base que es menor en condiciones de sequía en ambas especies, a diferencia de lo que ocurre a mediodía, que tiene un comportamiento igual que en condiciones de aCO₂.

Esta diferente respuesta a sequía a nivel fisiológico se produjo también a nivel bioquímico, en los tres órganos estudiados de las dos especies. En *P. pinaster* el factor órgano gobierna las características de los componentes mayoritarios del metaboloma, aunque también muestra algunos cambios desencadenados por el estrés hídrico y el nivel de CO₂ en la atmósfera de crecimiento, confirmando estudios anteriores que exponen que los cambios metabolómicos provocados por la sequía incluyen la acumulación de osmolitos en acículas y raíces, principalmente pinitol y varios aminoácidos, así como cambios en los metabolitos secundarios en las acículas (de Miguel et al., 2016; Fernández de Simón et al., 2017). El aumento en la [CO₂] alivia este estrés oxidativo, lo que se ve acompañado por una menor afección del metabolismo de azúcares (Fernández de Simón et al., 2020). Además, la abundancia relativa y diferencial entre órganos aéreos y subterráneos de los metabolitos mayoritarios parece coordinada, en una respuesta conjunta de toda la planta a la escasez de agua y matizada por los niveles de CO₂ en la atmósfera de crecimiento. Dicha respuesta está determinada por una activa participación especialmente de los trisacáridos.

En *P. pinea*, si bien el factor órgano también contribuye a los rasgos distintivos del metaboloma, los niveles de disponibilidad de agua y CO₂ tienen una incidencia mucho más relevante que en *P. pinaster*, en los tres órganos, en especial los aéreos, más sensibles a los motores de cambio climático ensayados. *P. pinea* muestra una respuesta metabólica intensa a la disminución en la disponibilidad de agua, con una importante acumulación de osmolitos, que sin embargo se ve suavizada y modulada cuando el nivel de CO₂ atmosférico es elevado. De tal forma que esta respuesta bioquímica disminuye, se anula o incluso se produce en el sentido contrario al de los niveles actuales de CO₂. Es decir, la percepción de estrés hídrico cambia.

6. Conclusiones

Las dos especies de pino estudiadas, a pesar de estar estrechamente relacionadas ecológica y filogenéticamente, muestran un patrón específico de especie para enfrentarse a la sequía, y con una modulación diferencial según los niveles de CO₂ en la atmósfera. Este patrón específico de respuesta se produce a nivel funcional, como refleja el potencial hídrico al amanecer y al mediodía, pero también a nivel bioquímico, con visibles diferencias en la acumulación desencadenada por la sequía de los osmolitos más abundantes, que aparece claramente condicionada por el CO₂ atmosférico. La mayor plasticidad fenotípica observada en *Pinus pinea* que en *Pinus pinaster* tiene su correlato en la respuesta a nivel molecular. Variación genética y plasticidad fenotípica son los elementos que explican la respuesta a la selección natural. La primera especie es conocida por su baja variabilidad genética, que quedaría compensada por unos altos niveles de plasticidad fenotípica (Sánchez-Gómez et al. 2011; Sáez-Laguna et al. 2014). En el caso de la segunda, es la variabilidad genética la que explicaría el éxito de la especie en cuanto a su capacidad de ocurrencia en ambientes mediterráneos muy diferentes. Variabilidad que se expresa a distintos niveles desde la diferenciación morofuncional en poblaciones y dentro de poblaciones (Aranda et al. 2010, Sánchez-Gómez et al. 2010), hasta la variación entre individuos (De Miguel et al. 2012; Sánchez-Gómez et al. 2017). En este último caso dicha variación se hace extensible a la respuesta bioquímica (Fernández de Simón et al. 2017, 2020).

7. Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio de Economía y Competitividad por financiar los proyectos en los cuales se enmarca este trabajo, incluyendo los proyectos AGL2014-61175-JIN, AGL2015-73190-JIN; RYC-2014-15864, RYC-2017-23389, y PID2019-110273RB-I00, así como la beca de doctorado a M.F FPI-SGIT2016-03. También agradecen a S. Rodríguez, D. Pérez y R. de Pedro su colaboración en los análisis metabolómicos.

8. Bibliografía

- ARANDA, I.; GIL, L.; PARDOS, J. A.; 1996. Seasonal water relations of three broadleaved species (*Fagus sylvatica* L., *Quercus petraea* (Mattuschka) Liebl. and *Quercus pyrenaica* Willd.) in a mixed stand in the centre of the Iberian Peninsula. *For Ecol Manag.* 84: 219–229.
- ARANDA, I.; ALÍA, R.; ORTEGA, U.; DANTAS, A.; MAJADA, J.; 2010. Intra-specific variability in biomass partitioning and carbon isotopic discrimination under moderate drought stress in four maritime pine (*Pinus pinaster* L.) populations. *Tree Gen. Gen.* 6: 169-17
- ARANDA, I.; CADAHÍA, E.; FERNÁNDEZ DE SIMÓN, B.; 2021. Specific leaf metabolic changes that underlie adjustment of osmotic potential in response to drought by four *Quercus* species. *Tree Physiol.* 41: 728-743.
- CHONG, J.; SOUFAN, O.; LI, C., CARAUS, I.; LI, S.; BOURQUE, G.; WISHART, D.S.; XIA, J.; 2018. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res.* 46: 486–494
- DE MIGUEL, M.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, D.; CERVERA, M.T.; ARANDA, I.; 2012. Functional and genetic characterization of gas exchange and intrinsic water use efficiency in a full-sib family of *Pinus pinaster* Ait. in response to drought. *Tree Physiol.* 32: 94e103.
- DE MIGUEL, M., GUEVARA, A.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, D.; DE MARÍA, N.; DÍAZ, L.; MANCHA, J.A.; FERNÁNDEZ DE SIMÓN, B.; CADAHÍA, E.; DESAI, N. ARANDA, I.; CERVERA, T.; 2016. Organ-specific metabolic responses to drought in a Mediterranean conifer species. *Plant Physiol. Biochem.* 102:17-26.
- DELIGOZ, A.; GUR, M.; 2015. Morphological, physiological and biochemical responses to drought stress of Stone pine (*Pinus pinea* L.) seedlings. *Acta Physiol. Plant.* 37: 343-350.
- FERNÁNDEZ DE SIMÓN, B.; SANZ, M.; CERVERA, M.T.; PINTO, E.; ARANDA, I.; CADAHÍA, E.: 2017. Leaf metabolic response to water deficit in *Pinus pinaster* Ait. relies upon ontogeny and genotype. *Environ. Exp. Bot.* 140: 41–55
- FERNÁNDEZ DE SIMÓN, B.; SANZ, M.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, D.; CADAHÍA, E.; ARANDA, I.; 2020. Rising [CO₂] effect on leaf drought-induced metabolome in *Pinus pinaster* Aiton: ontogenetic- and genotypic-specific response exhibit different metabolic strategies. *Plant Physiol. Biochem.* 149: 201–216.
- FORNER, A.; VALLADARES, F.; ARANDA, I.; 2018. Mediterranean trees coping with severe drought: avoidance might not be safe. *Environ. Exp. Bot.* 155: 529–540.
- MARTINEZ-VILALTA, J.; SALA, A.; ASENSIO, D.; GALIANO, L.; HOCH, G.; PALACIO, S.; PIPER, F.I.; LLORET, F.; 2016. Dynamics of non-structural carbohydrates in terrestrial plants: a global synthesis. *Ecol. Monogr.* 86: 495–516.

RODRIGUEZ-CALCERRADA, J.; SHAHIN, O.; DEL REY, M. C.; RAMBAL, S.; 2011. Opposite changes in leaf dark respiration and soluble sugars with drought in two Mediterranean oaks. *Funct. Plant Biol.* 38: 1004–1015.

SÁEZ-LAGUNA, E.; GUEVARA, A.; DÍAZ, L.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, D.; ARANDA, I.; CERVERA, T.; 2014. Epigenetic variability in the genetically uniform forest tree species *Pinus pinea* L. *PlosOne* 9: e103145.

SÁNCHEZ-GÓMEZ, D., MAJADA, J.; FEITO, I.; ALÍA, R.; ARANDA, I.; 2010. Intraspecific variation in growth and allocation patterns in seedlings of *Pinus pinaster* Ait. submitted to contrasting watering regimes: can water availability explain regional variation? *Ann. For. Sci.* 67:505-512

SÁNCHEZ-GÓMEZ, D.; VELASCO-CONDE, T.; CANO-MARTÍN, F. J.; GUEVARA, A.; CERVERA, M. T.; ARANDA, I.; 2011. Inter-clonal variation in functional traits in response to drought for a genetically homogeneous Mediterranean conifer. *Environ. Exp. Bot.* 70: 104–109.

TURNER, N.C.; 2018. Turgor maintenance by osmotic adjustment: 40 years of progress. *J Exp Bot* 69: 3223–3233