



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Mecanismos de aclimatación a la sequía extrema en especies tolerantes al estrés

Sabina Villadangos Redondo



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

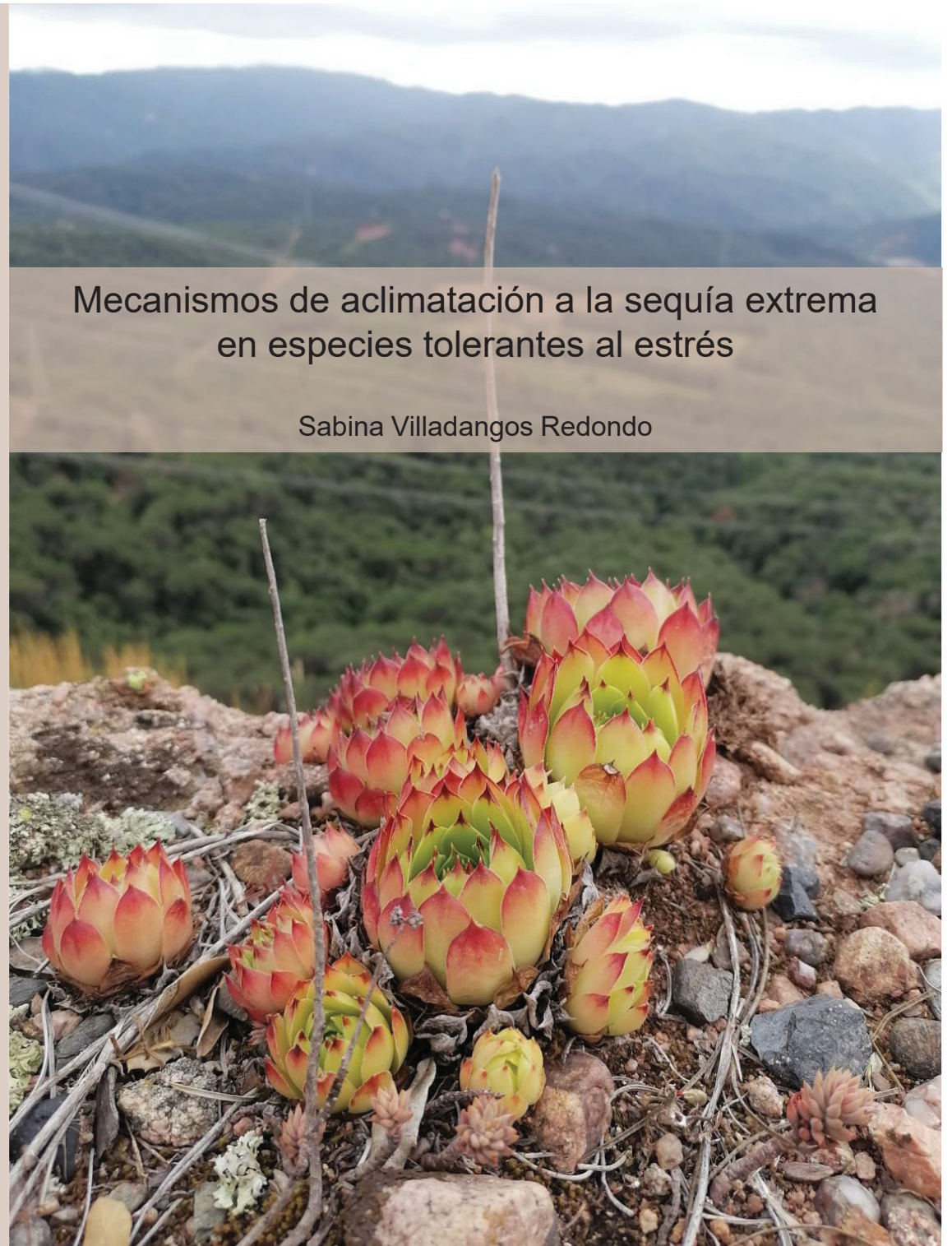
This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**



Tesis doctoral 2024

Mecanismos de aclimatación a la sequía extrema
en especies tolerantes al estrés

Sabina Villadangos Redondo



Mecanismos de aclimatación a la sequía extrema
en especies tolerantes al estrés

Sabina Villadangos Redondo



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA



Institut de Recerca
de la Biodiversitat
UNIVERSITAT DE BARCELONA

Barcelona, octubre de 2024

Facultad de Biología

Departamento de Biología Evolutiva, Ecología y Ciencias Ambientales

Programa de Doctorado en Ecología, Ciencias Ambientales y Fisiología Vegetal

Mecanismos de aclimatación a la sequía extrema en especies tolerantes al estrés

Mecanismes d'acclimatació a la sequera extrema en espècies tolerants a l'estrès

Memoria presentada por Sabina Villadangos Redondo para optar al grado de
Doctora por la Universitat de Barcelona.

Doctoranda:

Sabina Villadangos Redondo

Director

Sergi Munné Bosch

Tutor

Sergi Munné Bosch

Puedo enseñar a mi cuerpo muchas habilidades
con las que aprehender la naturaleza de la montaña.

Y una de las más emocionantes es la quietud.

Nan Shepherd – La montaña viva

AGRADECIMIENTOS

Hasta que no escriba estas líneas no daré por finalizada esta tesis doctoral, pues todas y cada una de las personas que aparecen en ellas han sido imprescindibles y han formado parte de una manera o de otra de este proyecto vital que inicié hace 3 años y quisiera agradecerles ahora.

A mi director de tesis, Sergi Munné Bosch, por brindarme la oportunidad de hacer un doctorado y buscar siempre la manera. Gracias por abrirme la puerta y enseñarme el mundo de la fisiología vegetal. Aprender de ti sin duda ha sido la apuesta ganadora. Gracias por la confianza y la libertad que nos das para avanzar en el conocimiento, pero también por la motivación y apoyo constante que nos impulsan en el camino de la ciencia. Gracias por enseñarme a observar y pensar. Siempre estaré agradecida por los valores que me has transmitido, científicos y humanos, porque la ciencia forma parte de la vida y para andar por ella se necesitan ambos.

Al grupo de investigación ANTIOX – ahora PLANTsynergy –, por trabajar siempre en equipo y mostrarnos que con una red de apoyo así podemos llegar más lejos de lo que pensamos. Cuidarnos unos a otros siempre ha sido un objetivo clave. Gràcies Marta, pel suport i les teves converses a les 7am, per ensenyar-nos que hem de cuidar la docència a la universitat i que aquesta val molt la pena. Gracias Melanie, por ser una mujer científica referente y valiente, por inspirarme con tus plantas extremófilas (es un gusto poder compartir esta pasión), y con todas tus aventuras científicas, estoy segura de que conseguirás lo que te propones, ¡nunca abandones tu esencia! Gracias Paula, no puedo no emocionarme al recordar todo lo que me has enseñado desde que empecé en el grupo. No solo a trabajar con rigor en el laboratorio, sino también a hacerme preguntas. Gracias por enseñarme a ser crítica, a profundizar siempre más allá. Aprender de una científica brutal como tú ha sido enriquecedor en todos los sentidos. Gracias también por las risas, por las comidas con charlas interminables que siempre acababan en postres, y por poner la música ideal para separar pedúnculos de oliva diminutos durante horas. Gracias por enseñarme a coordinar un equipo. Espero que sigas creciendo como mujer y científica siempre allá donde vayas. Gràcies Erola, per la teva perspectiva científica, admiro la teva capacitat per fer una recerca disruptiva, ets una inmensa divulgadora i és un plaer haver coincidit i haver-te vist en plena acció, gràcies també pels consells quan ho necessitàvem (i no nomès d'estadística).

Cuando entré en el grupo, me di cuenta de inmediato de la cohesión que había en nuestro grupo de PhDs. Gracias Celia, por tu felicidad contagiosa, por acogerme desde el minuto 1 y por llevarme a escalar en roca cuando estabas en la recta final de la tesis, Montserrat sigue en la cima de este escritorio que heredé de ti y que espero haber cuidado bien. Gràcies Andrea, per ensenyar-me què és la passió científica quan parlaves de la teva recerca i pels debats filosòfics, per l'entusiasme. Gracias David, por poner siempre un poco de cordura en el despacho, por mediar en las batallas contra las temibles plagas con tu super kit (lo echamos en falta) y por ayudarme siempre con tu inabarcable sed de conocimiento, aún poniendo la vida en peligro cuando te atacó una gaviota mientras estudiábamos a *Endophyllum sempervivi*. Gracias Camila

por ponerle esa dulzura a la vida, fue bonito escuchar todas tus luchas mientras separaba bayas contigo, por instaurar el “qui fa el que pot no está obligat a més”. En esta vida quedan muchos bailes, espero que puedas disfrutarlos todos.

Ahora ha llegado el momento de agradecer a las tres personas sin las que esta tesis no habría sido posible ni el camino habría sido igual, tres compañeras de doctorado a las que tengo la increíble suerte de poder llamar amigas. Las cuatro empezamos este camino juntas y ahora lo estamos terminando también juntas. No és nomès la vostra ajuda i l'equip que formem el que vull agrair, sino també el suport emocional i el fet d'haver-me sentit com a casa amb vosaltres. Però es que no cal demostrar res més després d'aquell experiment de 22h seguides totes juntes. Gràcies Alba per la teva energia incansable, per ser una persona riallera que contagia a tothom les seves ganes i la seva alegria. Ja sabem sempre quan vens al despatx, t'escoltem des de lluny i sabem que el dia començarà amb una abraçada i un somriure. Gràcies per posar sempre les emocions a flor de pell, per permetre't sentir, i per totes les teves preguntes que ens porten sempre a reflexionar sobre la nostra recerca. Ets una científica brutal, i és un plaer aprendre de tu dia a dia, mai oblidis la teva força. Gràcies sempre per ajudar-me “con gusto” i per omplir els nostres dies més complicats i posar-los colors vius, com el de totes les teves fruites vermelles. Gràcies Laia per posar-li il·lusió a tot el que fas, per ser la nostra *Cuscuteta* amb una motxilla plena de coneixements que portes sempre amunt i avall (també a les muntanyes). Per tots els mostrejos de camp compartits, on el sol sempre surt i si no doncs posarem una cançó que ja saps a tot volum i demà hi haurà soooo! Ets la meva companya ecophys i em fa molt molt feliç compartir amb tu aquesta i les noves aventures que vindran. Gràcies per ensenyar-me de prop el meravellós món de les plantes paràsites, ara veig *Orobanches* per tot arreu i no puc evitar fixar-me a què paràsita, quina planta serà la seva hoste. És un regal tenir-te a prop i veure't florir en la ciència. Gracias Tania por ese corazón tan grande que tienes que hace que lo imposible sea posible, y por compartirlo. Por hacernos un *regreening* cuando tenemos un mal día. Gracias por todo lo que me has enseñado desde mis inicios en el grupo y hasta ahora, sigo aprendiendo de ti. Hemos vivido tanto juntas...desde los miedos a lanzarnos a lo nuevo hasta nuestras aventuras en el mar, donde aprendimos tanto, los inventos para hacer los muestreos a pie de playa, el dolor de espalda de estar bajo aquella tienda de camping o dentro del coche...pero lo volvería a repetir de nuevo! Llegarás tan lejos como te propongas, confía siempre en ti y recuerda que brillas con luz propia.

Gracias Clara, por ser la viva alegría y por la calma que transmites, me enseñaste a bajar las revoluciones cuando lo necesitaba. Gracias por acompañarme en los muestreos más extremos mostrando tus raíces extrem-eñas, y por dejarme enseñarte lo que sé (que no es mucho). Gracias Ot, por las charlas inspiradoras de camino a La Bonaigua y por la ilusión científica que desprendes, espero que los pinos y otros árboles tengan muchas historias longevas aún que contarte. Gracias Núria, por los ratos compartidos en el lab, estoy segura de que el doctorado te depara mucho aún, ten paciencia, ya sembraste la semilla. Y a ti, Elena, que empezaste hace nada esta aventura, recuerda que poco a poco van saliendo las cosas, no tengas prisa en acabar, lo conseguirás.

A Adelle, obrigada por atravessar toda Catalunya comigo (sem exagero) e pelos momentos maravilhosos que passamos juntas, incluindo os espinhos de *Opuntia* e da burocracia. Conhecer você foi um presente que sempre levarei comigo.

Gràcies a l'equip de Camps Experimentals de la Facultat (Francesc, Josep i Xavi) per tota l'ajuda i el suport a l'hora de fer els experiments a l'hivernacle, també per les xerrades amenes entre plantes. Gràcies també a Esther, Olga i Regina per l'ajuda amb l'HPLC i el masses al Parc Científic.

A mis amigas por estar siempre cerca, incluso a pesar de la distancia. Gracias Ana por compartir todo, hasta una pandemia encerradas y un doctorado. Gracias Alejandra por motivarme a ir siempre más lejos. Gracias Lauriña por enseñarme con tu valentía, lanzándote por el mundo a perseguir tus sueños. Gracias Tais, por reconectar juntas con la naturaleza. A mis amigos y amigas de la carrera, por veros crecer científica y personalmente allá donde estéis, siempre.

A mi familia, por ser la base de quien soy ahora, por apoyarme siempre en todos los pasos que he dado, aunque estos me distanciasen más de casa. Por haberme inculcado la curiosidad desde pequeña, entre libros y montañas, por enseñarme a amar la naturaleza viviendo en Cantabria, y por haber sembrado la semilla de la libertad para convertirme en la persona consciente que soy hoy. A mi padre, por ser mi cordada de debates vitales y enseñarme a caminar despierta por el mundo. A mi madre, por ser la persona más creativa que conozco y por transmitirme su sensibilidad. A mi hermano, por orientarnos con su brújula y las ganas de comerse el mundo, por darnos calidez.

A mi tía Bea, por mostrarme desde pequeña el reino vegetal, por inspirar sin pretenderlo.

A Carmen y Jesús, por escucharme, cuidarme y preguntarme. Por estar siempre presentes.

A Héctor, mi compañero de vida, por cuidarme y quererme desde antes que empezara este viaje. Por compartir el amor por las montañas, por ser equipo. Por sostener mi motivación en las semanas más cansadas, por los días que llegaba tarde y estaba la cena lista. Por las noches que me has acompañado acabando el post-muestreo. Por la paciencia que has tenido, la parte difícil que también te has llevado. Por presentarme a las alpis, traer a Taga a casa y enseñarme a vivir en Collserola. Por mantenerme *siempre viva*, gracias a ti esta tesis ha sido posible.

Y ahora sí, gracias a todas las personas que habéis leído estas líneas y me habéis acompañado durante esta tesis. Espero que disfrutéis mucho leyéndola. ¡Hasta pronto!

ABSTRACT

Drought exerts an abiotic stress on plants, causing a water deficit which, if severe and/or prolonged over time, may compromise their physiological status. Thus, drought acclimation is essential to survive, and it will depend on the ability of the plant to respond. In the present study, we explored extreme drought acclimation mechanisms in two stress tolerant species: the oreophyte clonal species *Sempervivum tectorum* L., and the agroeconomically valuable species *Olea europaea* L. On the one hand, *S. tectorum* activated responses at the leaf level that may be simultaneously mediated by abscisic acid and the bioactive jasmonate form, jasmonoyl-isoleucine, modulating antioxidants content and composition, such as tocopherols (vitamin E). Likewise, this species was endowed with strategies that operate at the whole-plant level, allowing for a high stress tolerance and resilience, establishing a gradual leaf senescence across the rosette and a quiescent-like strategy to maintain low oxidative levels in leaves during prolonged periods of stress, thus ensuring a rapid restoration of growth during stress recovery. By further exploring the acclimation response in *S. tectorum* in its natural habitat, we found that this species adjusted clonal offset production and activated a complex hormonal response to survive an extreme drought event. By addressing clonal reproduction as a possible stress escape strategy, in this thesis we revealed a prioritization of clonal offspring survival under stress, where unrooted ramets presented higher viability than their parents under a mild stress and that they were still alive and attached to the parent plant under severe stress. We explored this behavior in three natural populations of *S. tectorum* and found that this species kept the connected offsets alive until they rooted into the soil without compromising the survival of the parental rosette. On the other hand, we selected the olive tree as the model species to elucidate if oxylipins were involved in the drought-induced leaf abscission process. Our spatial basipetal leaf sampling revealed that photo-oxidative stress led to jasmonoyl-isoleucine accumulation in the petiole of water-stressed leaves, suggesting a previous conditioning of the abscission zone through oxylipins. It is concluded that stress tolerant plant species display acclimation mechanisms to face extreme droughts such as (i) photoprotective response in leaves modulated by abscisic acid and jasmonoyl-isoleucine; (ii) quiescence-like strategy to avoid oxidative stress burden during clonal reproduction to extend stress survival of the whole genet; (iii)

spatiotemporal leaf senescence to protect apical meristems; and (iv) drought-induced leaf abscission conditioned by oxylipins.

RESUMEN

La sequía ejerce un estrés abiótico en las plantas, causando un déficit hídrico que, de ser severo y/o prolongado, puede comprometer su estado fisiológico. Por lo tanto, la aclimatación a la sequía es esencial para sobrevivir y dependerá de la capacidad de respuesta de la especie. En este trabajo se exploraron mecanismos de aclimatación a la sequía extrema, en dos especies tolerantes al estrés: la especie clonal subalpina *Sempervivum tectorum* L., y la especie de gran interés agronómico *Olea europaea* L. Por un lado, *S. tectorum* activó respuestas a nivel de hoja que podían ser simultáneamente mediadas por ácido abscísico y la forma bioactiva de jasmonatos, la jasmonoil-isoleucina, modulando la composición y el contenido de antioxidantes, como los tocoferoles (vitamina E). Así mismo, esta especie contaba con estrategias que operan a nivel de toda la planta que permiten una gran tolerancia y resiliencia al estrés, estableciendo una senescencia foliar gradual a través de la roseta o estrategias similares a la quiescencia para mantener niveles oxidativos bajos en hojas durante períodos prolongados de estrés, garantizando así restaurar rápidamente el crecimiento durante la recuperación. Al profundizar en la respuesta de aclimatación de *S. tectorum* en su hábitat natural, encontramos que esta especie ajustó la producción de nuevos ramets clonales y activó una respuesta hormonal compleja para sobrevivir a un evento de sequía extrema. Abordando la reproducción clonal como posible estrategia de escape del estrés, en esta tesis revelamos una priorización de la descendencia clonal bajo estrés, donde los ramets no enraizados presentaban una mayor viabilidad que sus rosetas parentales ante un estrés moderado y que ante un estrés severo estos ramets permanecían aún vivos unidos a la roseta parental. Este comportamiento fue explorado también en el hábitat natural, donde encontramos que esta especie mantenía los nuevos ramets unidos hasta que encontrasen la oportunidad de enraizar sin comprometer la supervivencia de la roseta parental. Por otro lado, seleccionamos el olivo como modelo para evaluar si las oxilipinas estaban implicadas en el proceso de abscisión foliar inducida por sequía. Mediante un muestreo espacial basipétalo de hojas, encontramos que el estrés foto-oxidativo produjo una acumulación de jasmonoil-isoleucina en el peciolo de hojas estresadas, sugiriendo un acondicionamiento previo de la zona de abscisión a través de oxilipinas. Se concluye que las plantas tolerantes al estrés tienen mecanismos de aclimatación

que les permite afrontar sequías extremas como (i) respuesta fotoprotectora en hojas modulada por el ácido abscísico y la jasmonoil-isoleucina; (ii) estrategia de tipo quiescente para evitar la carga de estrés oxidativo durante la reproducción clonal y prolongar la supervivencia al estrés de todo el genet; (iii) senescencia foliar gradual para proteger los meristemas apicales; (iv) abscisión foliar inducida por sequía condicionada por oxilipinas.

PALABRAS CLAVE

Aclimatación, Estrés, Fotoprotección, Hormonas, Jasmonatos, Sequía

RESUM

La sequera exerceix un estrès abiòtic en les plantes, causant un dèficit hídric que, d'ésser sever i/o prolongat, pot comprometre el seu estat fisiològic. Per tant, l'aclimatació a la sequera és essencial per a sobreviure i dependrà de la capacitat de resposta de l'espècie. En aquest estudi es van explorar mecanismes d'aclimatació a la sequera extrema, en dues espècies tolerants a l'estrès: l'espècie clonal subalpina *Sempervivum tectorum* L., i l'espècie de gran interès agronòmic *Olea europaea* L. D'una banda, *S. tectorum* va activar respostes a nivell de fulla que podien ser simultàniament mediatas per l'àcid abscísic i la forma bioactiva de jasmonats, la jasmonoil-isoleucina, modulant la composició i contingut d'antioxidants, com els tocoferols (vitamina E). Així mateix, aquesta espècie comptava amb estratègies que operen a nivell de planta sencera i que permeten una gran tolerància i resiliència a l'estrès, establint una senescència foliar gradual a través de la roseta o estratègies similars a la quiescència que mantenen nivells oxidatius baixos en fulles durant períodes prolongats d'estrès, garantint així restaurar ràpidament el creixement durant la recuperació. En aprofundir en la resposta d'aclimatació de *S. tectorum* al seu hàbitat natural vam trobar que aquesta espècie va ajustar la producció de nous ramets clonals i va activar una resposta hormonal complexa per sobreviure a un episodi de sequera extrema. Abordant la reproducció clonal com a possible estratègia d'escapar de l'estrès, en aquesta tesi revelem una prioritització de la descendència clonal sota estrès, on els ramets no arrelats presentaven una major viabilitat que les seves rosetes parentals davant un estrès moderat, i que davant un estrès sever aquests ramets romanien encara vius units a la roseta parental. Aquest comportament va ser explorat també al seu hàbitat natural, on trobem que aquesta espècie va mantenir els nous ramets units fins que trobessin l'oportunitat d'arrelar sense comprometre la supervivència de la roseta parental. D'altra banda, vam escollir l'olivera com a model per a avaluar si les oxilipines estaven implicades en el procés d'abscisió foliar induïda per sequera. Mitjançant un mostreig espacial basipètal de fulles, vam trobar que l'estrès foto-oxidatiu va produir una acumulació de jasmonoil-isoleucina en el pecíol de fulles estressades, suggerint un condicionament previ de la zona d'abscisió a través d'oxilipines. Es conclou que les plantes tolerants a l'estrès tenen mecanismes d'aclimatació que els permet afrontar sequeres extremes com (i) resposta

fotoprotectora en fulles modulada per l'àcid abscísic i la jasmonoil-isoleucina; (ii) estratègia de tipus quiescent per a evitar la càrrega d'estrès oxidatiu durant la reproducció clonal per a prolongar la supervivència a l'estrès de tot el genet; (iii) senescència foliar gradual per a protegir els meristemes apicals; (iv) abscisió foliar induïda per sequera condicionada per oxilipines.

PARAULES CLAU

Aclimatació, Estrès, Fotoprotecció, Hormones, Jasmonats, Sequera

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	3
1. Estrés	5
1.1 Estrategias en plantas: escapar, evitar y tolerar el estrés	6
1.2 Estrés abiótico: características específicas de la sequía	7
2. Aclimatación de las plantas a estreses abióticos	9
2.1 Fotoinhibición y estrés foto-oxidativo	10
2.2 Protección antioxidante	12
2.3 Respuesta hormonal	14
2.4 Características diferenciales de la respuesta al estrés severo	21
3. Senescencia foliar	23
3.1 Definición	23
3.2 Características y regulación de la senescencia foliar inducida por sequía.....	24
3.2 Implicaciones fisiológicas a nivel de planta entera	26
4. Abscisión foliar	27
4.1 Definición	27
4.2 Regulación hormonal y redox de la abscisión foliar.....	28
4.3 Implicaciones fisiológicas a nivel de planta entera	29
5. Modelos de estudio	30
5.1 <i>Sempervivum tectorum</i> L.....	30
5.2 <i>Olea europaea</i> L.	32
OBJETIVOS	37
INFORME DEL DIRECTOR DE TESIS	41
RESULTADOS	47
Capítulo 1. Aclimatación a una combinación de déficit hídrico y de nutrientes mediante aumentos simultáneos de ácido abscísico y jasmonatos bioactivos en la planta suculenta <i>Sempervivum tectorum</i> L.	49
Capítulo 2. Impacto de un evento de sequía extremo en la reproducción clonal y la capacidad de aclimatación de la planta suculenta <i>Sempervivum tectorum</i> L.	69
Capítulo 3. Tolerancia extrema al estrés durante la reproducción clonal en una planta monocárpica, <i>Sempervivum tectorum</i>	87

Capítulo 4. La acumulación de oxilipinas debida al estrés foto-oxidativo puede desencadenar la abscisión foliar inducida por sequía en olivos	139
DISCUSIÓN	159
1. Tolerancia al estrés severo por sequía: efectos a nivel de hoja y de planta entera	161
2. Relación entre aclimatación, senescencia y abscisión en plantas	169
3. Implicación de los jasmonatos en las respuestas al estrés abiótico severo	174
4. Relación entre jasmonatos, ácido abscísico y vitamina E para la fotoprotección en plantas	179
5. Resistencia al estrés extremo durante la reproducción clonal	181
6. Implicación del estrés severo en la aclimatación y adaptación de las especies vegetales	186
CONCLUSIONES	191
BIBLIOGRAFÍA.....	197
ANEXOS	239
Anexo I. Test de tetrazolio: revivir un antiguo pero útil marcador de estrés.....	241

ABREVIATURAS

ABA: ácido abscísico

ACC: ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico

AOC: aleno óxido ciclasa

AOS: aleno óxido sintasa

ATP: adenosín trifosfato

CAM: metabolismo ácido de las crasuláceas

Chl a/b: relación entre clorofila a y b

CKs: citoquininas

ERFs: factores de respuesta al etileno

ET: etileno

F_v / F_m : eficiencia cuántica máxima del fotosistema II

GAs: giberelinas

JA: ácido jasmónico

JA-Ile: jasmonoil-isoleucina

LMA: relación entre la masa y el área foliar

LOOH: hidroperóxidos lipídicos

MDA: ácido malondialdehído

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

OPDA: ácido 12-*oxo*-fitodienoico

PSI: fotosistema I

PSII: fotosistema II

PUFA: ácido graso poliinsaturado

ROS: especies reactivas del oxígeno

RWC: contenido hídrico relativo

SA: ácido salicílico

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1. Estrés

El concepto de estrés en los seres vivos fue originalmente desarrollado por Selye (1936) en el ámbito de la medicina, pero fue Levitt (1980) quien, a partir de teorías de la física, abordó el estrés desde una perspectiva biológica, definiendo el estrés como “cualquier factor ambiental capaz de inducir una tensión potencialmente nociva en los organismos vivos”. Durante un estrés, las funciones biológicas de la planta se ven desestabilizadas, y cuando se exceden los límites en la tolerancia y la capacidad adaptativa, podría resultar en daños permanentes que pueden conducir a la muerte del organismo (Larcher, 1980). El estrés juega un papel indispensable en la modulación de la vida de las plantas, ya que incluye elementos constructivos y destructivos, siendo una fuerza motora en la adaptación de los organismos. Así, podemos distinguir entre eu-estrés, donde el estrés es suave y estimula positivamente el desarrollo de la planta, y el disestrés, cuando causa daños severos y permanentes en la planta (Lichtenthaler, 1988). De manera que la duración y la intensidad del estrés ejercido por los factores ambientales, y los mecanismos de percepción y de respuesta de la planta, condicionan el resultado final.

Estos factores ambientales pueden ser abióticos, como la irradiación solar, la temperatura, la disponibilidad hídrica o de nutrientes; o bióticos como los herbívoros, los patógenos o los parásitos. A menudo, diversos factores a(b)ióticos pueden actuar de manera simultánea o secuencial en la planta, dando lugar a una combinación de estreses que causarán, dependiendo de su interacción, una respuesta diferencial (Atkinson & Urwin, 2012; Zhang & Sonnewald, 2017). La respuesta de la planta a los estreses combinados es compleja e implica cambios transcripcionales específicos, por lo que no puede extrapolarse de la suma de los estreses individuales, pues su combinación puede generar efectos sinérgicos o antagónicos (Prasch & Sonnewald, 2013; Rivero et al., 2014; Suzuki et al., 2016). Recientemente se ha demostrado que, con el aumento del número y la complejidad de los estreses combinados, la capacidad de crecimiento y supervivencia de las plantas disminuye drásticamente, aunque el nivel de cada estrés individual sea lo suficientemente bajo como para no afectar negativamente al estado fisiológico de la planta (Zandalinas et al., 2021). Por

último y debido a la intensa actividad humana, factores antropogénicos como la contaminación del suelo o del aire añaden complejidad a la ecuación, sometiendo a las plantas a estreses combinados que desencadenan una respuesta fisiológica aún más severa (Zandalinas & Mittler, 2022).

1.1 Estrategias en plantas: escapar, evitar y tolerar el estrés

Ante un estrés, las plantas disponen de tres estrategias posibles: escapar, evitar y tolerar (Ludlow, 1989). Las características de cada estrategia se resumen en la **Figura 1**. Escapar del estrés es típico en plantas anuales de crecimiento rápido que completan su ciclo vital y reproductivo antes del comienzo del estrés, de manera que no llegan ni siquiera a enfrentarse a éste. Esta estrategia requiere de altas tasas fotosintéticas y de concentración de nutrientes en hojas para conseguir tasas mayores de adquisición de recursos y crecimiento que permitan una floración temprana (Kooyers et al., 2015; Blanco-Sánchez et al., 2022). La estrategia de evitar el estrés consiste en no permitir que afecte a la fisiología de la planta, por ejemplo, manteniendo la turgencia a nivel celular y de planta ante una sequía. Las plantas que siguen esta estrategia aumentan la eficiencia en el uso del agua mediante la reducción de la pérdida de agua cerrando estomas, o bien aumentando la absorción de agua a través de sistemas radiculares más profundos (Peguero-Pina et al., 2020, Ren et al., 2024). Finalmente, las plantas tolerantes al estrés consiguen resistir mediante ajustes fisiológicos que les permiten soportar daños asociados sin llegar a comprometer la supervivencia, como es el caso de las plantas que poseen tejidos tolerantes a la deshidratación. En casos de tolerancia extrema, la planta mantiene la turgencia y una asimilación aún significativa de carbono, sustentando así el crecimiento incluso durante un estrés prolongado (Volaire, 2018).

Cada una de estas estrategias tiene una combinación específica de rasgos asociados basados en la adaptación específica de la planta y se pensaba que eran mutuamente excluyentes, donde las plantas con capacidad de escapar de un estrés no podían haber evolucionado estrategias de tolerancia a su vez. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que hay especies adaptadas a ambientes áridos que emplean varias estrategias a la vez, como una rápida floración y un aumento de la biomasa radicular, que corresponderían a estrategias de escape y de tolerancia, respectivamente (Welles & Funk, 2021).

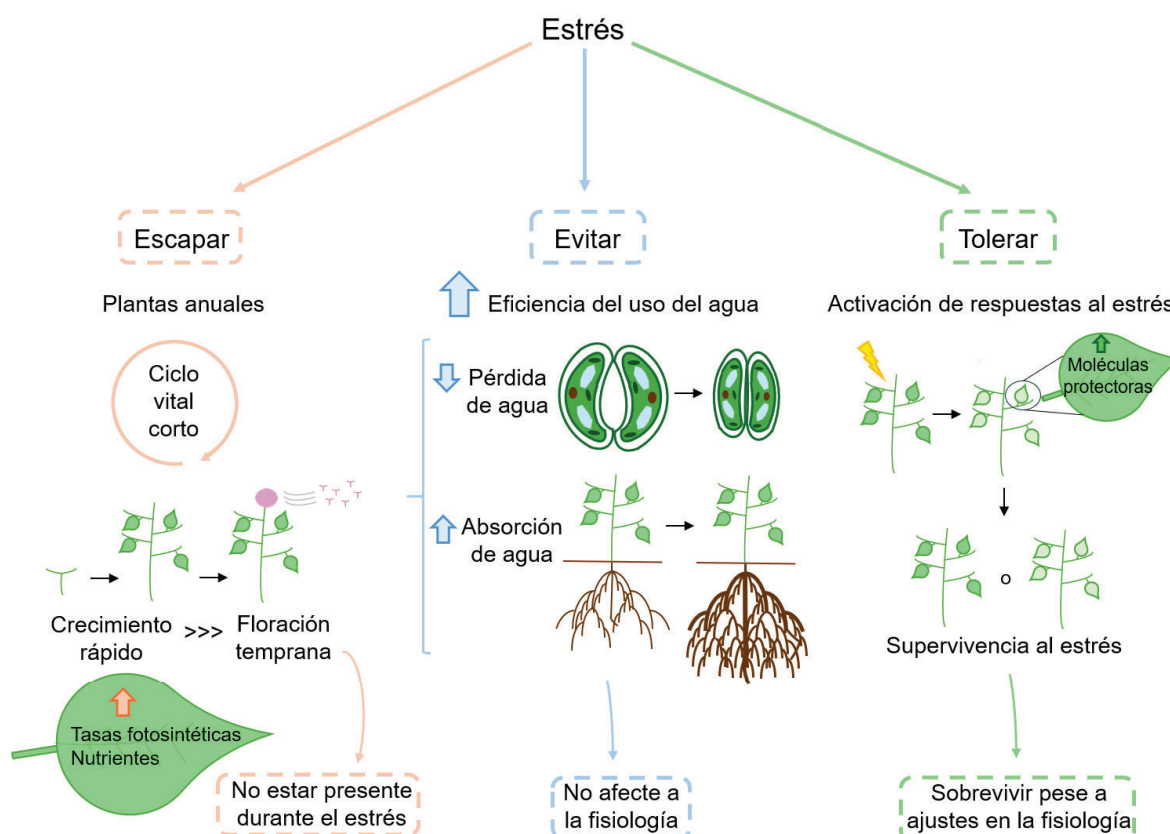


Figura 1. Estrategias en plantas ante un estrés: escapar, evitar y tolerar. La estrategia de escapar es característica de plantas anuales con ciclo vital corto que no llegan a enfrentarse al estrés. La estrategia de evitar incluye mecanismos que permiten que el estrés no afecte a la fisiología de la planta. La estrategia de tolerar consiste en activar respuestas fisiológicas al estrés que permitan la supervivencia.

1.2 Estrés abiótico: características específicas de la sequía

Dentro de los estreses abióticos, la sequía está considerada uno de los más perjudiciales para la producción agrícola (Zhao & Running, 2010; García-León et al., 2021) y la conservación de la biodiversidad (Archaux & Wolters, 2006; Feeley et al., 2020). La sequía es un evento climático transitorio en el que la precipitación se encuentra por debajo de los valores habituales para un área geográfica concreta (Wilhite, 2000; Crausbay et al., 2017). Al contrario que otros eventos climáticos severos, una sequía a menudo se desarrolla lentamente, por lo que su detección temprana es imprescindible para poder mitigar sus efectos. Desde un punto de vista meteorológico, la sequía ocurre cuando la cantidad de precipitación que recibe un área es menor que la media en un periodo de tiempo determinado; pero la sequía hidrológica comienza cuando esta reducción en la precipitación

repercute en el suministro de agua, en la disponibilidad hídrica (Mishra & Singh, 2010). La transición de la sequía meteorológica a la hidrológica se conoce como propagación de la sequía y depende en gran medida del clima y de las características de la cuenca hidrográfica (Van Lanen et al., 2013).

Esta sequía la perciben las plantas cuando la demanda de agua debido a la sequedad de la atmósfera supera la que hay disponible en el suelo, provocando un estrés en la planta que, de ser severo, puede amenazar su supervivencia (Tian et al., 2018). De hecho, la respuesta inicial de una planta ante un estrés es una reducción en su crecimiento, para después desencadenar respuestas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas a diferentes niveles organizativos en la planta (Gupta et al., 2020). Al final de una sequía prolongada, el estrés impacta directamente en el funcionamiento hidráulico de la planta porque, debido al déficit hídrico, el agua perdida por transpiración en las hojas es mayor que la absorbida por las raíces, generando una alta tensión en el xilema. Esta tensión en aumento puede dar lugar a la cavitación, un proceso caracterizado por la entrada de burbujas de aire en el xilema, que se van expandiendo por el vaso conductor hasta que terminan por bloquearlo completamente, generando un fallo hidráulico que puede conducir incluso a la muerte de la planta (Tyree & Sperry, 1988; McDowell et al., 2022; Mencuccini et al., 2024). Otro impacto directo de la sequía en las plantas es el cierre de estomas que, en un intento de evitar la cavitación, limita la absorción de carbono a través de la fotosíntesis, lo que podría conllevar igualmente la muerte de la planta por inanición de carbono (McDowell et al., 2008).

El impacto de una sequía depende de tres características principales: la intensidad, la duración y la extensión espacial (Wilhite, 2000). La intensidad se refiere al grado de escasez de precipitaciones y de los impactos asociados. La duración de una sequía es relevante, puesto que puede variar entre unos pocos meses o unos años, llegando incluso a durar décadas (Stahle et al., 2007). Es el parámetro más difícil de determinar, ya que muchas veces los efectos de una sequía no son detectables hasta meses después de su comienzo. Por último, el tamaño del área que se encuentra en sequía es importante por la magnitud de los impactos ocasionados y su consiguiente gestión, poniendo en riesgo ecosistemas enteros (Allen et al., 2010; Mencuccini et al., 2019). Otra característica significativa de la sequía es la frecuencia, que es el número de episodios de sequía ocurridos en un periodo de tiempo determinado. Para monitorear la sequía se han desarrollado índices elaborados a partir de

parámetros hidro-meteorológicos que permiten relacionar todas sus características (McKee et al., 1993; Beguería et al., 2014).

Debido a los efectos del cambio climático, se predice un aumento en la frecuencia, la severidad y la duración de las sequías (Samaniego et al., 2018; IPCC, 2023). Además, como consecuencia de un aumento previsto en las temperaturas, se prevén sequías más extremas, en las que la combinación con el calor agravará enormemente el estrés producido en las plantas (Smith, 2011; Allen et al., 2015; Zandalinas et al., 2017). Por ello, estudiar cómo responden a la sequía extrema las plantas tolerantes al estrés permitirá encontrar mecanismos clave en la aclimatación y adaptación de las plantas a ambientes en constante cambio.

2. Aclimatación de las plantas a estreses abióticos

La aclimatación es la capacidad de las plantas de ajustar rápidamente su fisiología ante cambios ambientales desfavorables, alterando su metabolismo y patrones de expresión génica para compensar así la reducción en el crecimiento tras la respuesta inicial al estrés (Lambers & Oliveira, 2019). Es una consecuencia directa de la vida sésil de las plantas, en la que muchos parámetros morfológicos y fisiológicos están sujetos a rápidas fluctuaciones. En la coordinación de las respuestas de aclimatación de las plantas, los cloroplastos juegan un papel central, pudiendo estos orgánulos celulares comunicarse con el núcleo mediante señalización retrógrada, lo que permite a las plantas percibir y responder ante estreses ambientales (Chan et al., 2016; Pfannschmidt et al., 2020). De esta manera, en la señalización retrógrada del cloroplasto, las señales producidas en respuesta a un estímulo ambiental regulan la expresión de genes en el núcleo. Además, los cloroplastos son los encargados de realizar la fotosíntesis, un proceso de alta actividad energética en el que las reacciones de reducción-oxidación (redox) en los complejos proteicos del sistema de transporte de electrones permiten la conversión de energía lumínica en poder reductor (NADPH) y energía química (ATP) que se usarán para fijar el CO₂ asimilado. Estos cambios redox de la fotosíntesis están asociados a una mayor producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), las cuales ejercen una función señalizadora retrógrada al núcleo (Foyer & Hanke, 2022; Mittler et al., 2022). De hecho, cada estrés o la combinación única de varios estreses puede generar una señalización ROS específica que adaptará a medida la respuesta

de aclimatación de la planta (Choudhury et al., 2017). Sin embargo, cuando las ROS son producidas de manera incontrolada debido a, por ejemplo, un estrés sostenido, pueden dañar los sistemas fotosintéticos, los orgánulos celulares e incluso inducir la muerte celular (Van Breusegem & Dat, 2006; Laloi & Havaux, 2015).

2.1 Fotoinhibición y estrés foto-oxidativo

Las reacciones fotosintéticas de la luz ocurren en los fotosistemas, complejos multiproteicos unidos a pigmentos como clorofilas y carotenoides que forman una unidad funcional y están localizados en las membranas tilacoidales de los cloroplastos. Los fotosistemas I y II (PSI y PSII) contienen cientos de pigmentos que capturan la luz en el complejo de antena y la canalizan a los centros de reacción fotoquímica, donde se cataliza la conversión a energía química (Nelson & Yocum, 2006; Croce & van Amerongen, 2011).

Ante un estrés abiótico como la sequía, las plantas cierran estomas y se producen limitaciones en la fijación del carbono que promoverán un exceso de fotones en la cadena de transporte de electrones. La capacidad fotosintética de las plantas se verá sobrepasada por este exceso de fotones, ya que la conversión a energía química ocurre de manera más lenta que el proceso de absorción de luz (Takahashi & Badger, 2011). Para evitarlo, las plantas disponen de diferentes estrategias, entre ellas, la disipación en forma de calor mediante disipadores no fotoquímicos. Un exceso energético promueve la producción de ROS en los complejos fotosintéticos, como el singlete de oxígeno (1O_2), el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo ($\cdot OH$) o el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), generando un estrés foto-oxidativo si se producen en concentraciones elevadas (Asada, 2006). Mientras que el 1O_2 se forma principalmente en el PSII a partir de clorofilas en forma de triplete ($^3Chl^*$) (Krieger-Liszka, 2005), el $O_2^{\cdot-}$ se produce a partir de la transferencia de electrones al O_2 y, dado que el PSI es donde los electrones se transfieren a aceptores solubles fuera de la membrana, es el lugar predominante de la generación de $O_2^{\cdot-}$ mediante la reacción de Mehler (Foyer & Hanke, 2022). El ciclo del agua-agua, que comienza con la oxidación del agua en el PSII, se considera un sistema de fotoprotección muy eficiente, ya que de cerrarse bien no se producen ROS de forma neta. Durante este ciclo, la fotoreducción del O_2 genera $O_2^{\cdot-}$ y estos radicales $O_2^{\cdot-}$ son convertidos a H_2O_2 por la acción de la superóxido dismutasa (SOD), y a su vez este H_2O_2 es reducido a agua y a las formas oxidadas del ascorbato, monodehidroascorbato o dehidroascorbato, por la ascorbato peroxidasa (APX),

completando el ciclo del agua-agua (Asada, 2000). Por otro lado, si la velocidad de reacción de los pasos catalizados por la SOD y la APX son más lentos que la fotorreducción del O_2 , se prolonga la vida útil del $O_2^{\cdot-}$ y del H_2O_2 y podría formarse el radical tóxico $\cdot OH$ en presencia de centros metálicos en la reacción de Fenton (Foyer & Hanke, 2022). Si estas ROS se producen en concentraciones elevadas y de forma prolongada, pueden provocar modificaciones oxidativas en la maquinaria fotosintética, como es el caso de las proteínas D1 y D2 del PSII (Kale et al., 2017); y también afectar a su síntesis *de novo*, interfiriendo con el factor de elongación de proteínas G (Nishiyama et al., 2006). Aunque el PSII, muy sensible a la saturación de la luz, es dañado con frecuencia debido a la alta demanda de transferencia de electrones asociada a la conversión lenta a energía química, esto es contrarrestado por el rápido recambio de la subunidad proteica D1 dañada (Nickelsen & Rengstl, 2013). Sin embargo, un exceso de energía lumínica provoca que la tasa de daño de la proteína D1 sea superior a su tasa de reparación, y es entonces cuando ocurre la fotoinhibición del PSII, resultando en su inactivación (Melis, 1999; Takahashi et al., 2007; Demmig-Adams & Adams, 2018).

Asimismo, las ROS pueden modificar oxidativamente otras moléculas de los cloroplastos y de otros orgánulos celulares, como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos, induciendo un estrés oxidativo que puede desencadenar la muerte celular (Gill & Tuteja, 2010). El 1O_2 está considerada la principal ROS implicada en el daño foto-oxidativo en las plantas e inicia la peroxidación lipídica en las membranas tilacoidales (Triantaphylidès et al., 2008; Farmer & Mueller, 2013). Aunque la peroxidación lipídica ocurre de forma natural en los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) mediante las enzimas lipooxigenasas, las ROS promueven una mayor peroxidación lipídica no enzimática, ya sea a través de radicales libres o del 1O_2 . En el mecanismo radical, el $\cdot OH$ abstrae un hidrógeno del ácido graso, generando un radical alquilo lipídico ($L\cdot$), el cual es inestable y reacciona con el O_2 generando los radicales peroxilo ($LOO\cdot$). En un siguiente paso de propagación, los $LOO\cdot$ abstraen un hidrógeno de otro ácido graso adyacente, generando los hidroperóxidos lipídicos ($LOOH$) y otro radical $L\cdot$, continuando así la peroxidación (Pospíšil & Yamamoto, 2017). En el mecanismo no radical, el 1O_2 genera directamente $LOOH$ al unirse al doble enlace de un PUFA. Los $LOOH$ son los productos primarios de la peroxidación lipídica y se pueden descomponer en productos secundarios, como el ácido malondialdehído (MDA), que

provoca aductos en las proteínas, siendo muy tóxico para las células, por lo que es ampliamente usado como marcador de estrés oxidativo (Pospíšil & Yamamoto, 2017; Morales & Munné-Bosch, 2019). De manera que la peroxidación lipídica derivada de ROS puede dañar las membranas plastidiales, eventualmente aumentando su permeabilidad e interfiriendo con la función de sus proteínas (Farmer & Mueller, 2013).

Pese a los efectos perjudiciales descritos para el metabolismo, es relevante destacar que las ROS forman parte del sistema de alarma de las plantas cuando se encuentran ante un estrés. De hecho, el concepto biología redox hace referencia a la señalización por parte de las ROS, donde encontramos ejemplos como el del H_2O_2 , que es considerado un mensajero secundario capaz de modificar la estructura y función de proteínas a través de la oxidación de cisteínas (Gill & Tuteja, 2010). El H_2O_2 es la más estable de las ROS y difunde a través de las membranas gracias a las acuaporinas (Bienert & Chaumont, 2014), puede ser transferido al núcleo ejerciendo una señalización retrógrada (Exposito-Rodriguez et al., 2017; Leister, 2019), y activa respuestas de defensa frente a patógenos (Gill & Tuteja, 2010). Además, la peroxidación lipídica genera oxilipinas, que son derivadas de ácidos grasos insaturados oxigenados y participan en la señalización plastidial retrógrada en respuesta al estrés (Farmer & Mueller, 2013; Muñoz & Munné-Bosch, 2020). Entre las oxilipinas fuertemente electrofílicas que contribuyen a la aclimatación al estrés de la planta destaca el MDA, con un sesgo hacia la activación de genes relacionados con el estrés abiótico (Weber et al., 2004). Por lo tanto, producidas de manera transitoria, las ROS participan en cascadas de señalización e incluso inducen cambios en la expresión génica, siendo esenciales para la activación de respuestas de aclimatación al estrés (Foyer & Hanke, 2022).

2.2 Protección antioxidante

Las plantas cuentan con mecanismos protectores para hacer frente a la fotoinhibición y al estrés foto-oxidativo. Uno de estos mecanismos es el sistema antioxidante que permite lograr el equilibrio entre la producción y neutralización de las ROS en los diferentes compartimentos celulares. Los antioxidantes pueden ser enzimáticos o no enzimáticos y permiten desactivar física y/o químicamente las ROS (Halliwell, 2006).

Los antioxidantes no enzimáticos son aquellos que desactivan o eliminan las ROS mediante un mecanismo de transferencia de energía o bien actuando como donador de

electrones en reacciones enzimáticas, modificando su estado redox. Pueden ser hidrofílicos o lipofílicos, en función de si se encuentran solubles o anclados a las membranas lipídicas de los plastidios. El antioxidante hidrofílico más abundante en los cloroplastos es el ascorbato o vitamina C, el cual elimina el H_2O_2 formando dehidroascorbato (Asada, 2006), además de ser cofactor de la violaxantina-depoxidasa, siendo esencial para la disipación del exceso de energía en forma de calor (Demmig-Adams et al., 2012), y regenerando otros antioxidantes como los tocoferoles (Szarka et al., 2012). El segundo antioxidante hidrofílico más abundante es el glutatión, el cual participa en el ciclo ascorbato-glutatión permitiendo reciclar el ascorbato, además de eliminar tanto el H_2O_2 como el $OH\cdot$. Reciben especial atención los antioxidantes lipofílicos, entre los que se encuentran los carotenoides y los tocoferoles, puesto que al estar localizados cerca de las membranas lipídicas cloroplásticas y de los fotosistemas donde se producen las ROS, son mecanismos de protección esenciales para combatir el estrés foto-oxidativo.

Los carotenoides son pigmentos fotosintéticos que además de asistir en la captación de la luz cuentan con una doble función fotoprotectora y antioxidante porque están implicados en la disipación del calor a través del ciclo de las xantofilas y también tienen la capacidad de desactivar física y químicamente ROS. En función de su estructura química, encontramos los carotenos como el α -caroteno, siendo a su vez el precursor de la luteína; o el β -caroteno, que es precursor de la zeaxantina y la violaxantina (Liu et al., 2004). Estas últimas están implicadas en disipar el exceso de energía que reciben los fotosistemas mediante la conversión en dos pasos de la violaxantina en zeaxantina a través de la violaxantina-depoxidasa, conocido como el ciclo de las xantofilas (Demmig-Adams & Adams, 1996). Por su parte, funcionando en paralelo y con el mismo sistema enzimático, el ciclo de la luteína epóxido es considerado otro mecanismo fotoprotector eficiente descrito solo en algunas plantas no modelo creciendo en ambientes sombríos, siendo más difícil de elucidar su rol (García-Plazaola et al., 2007). Su papel en la disipación térmica se ha demostrado en mutantes de *Arabidopsis* (Li et al., 2009), y recientemente mediante líneas transgénicas (Leonelli et al., 2017). El principal mecanismo de los carotenoides para desactivar el 1O_2 es la desactivación física, por la cual mediante una transferencia energética se produce el carotenoide en forma de triplete, que será desactivado por decaimiento térmico (Triantaphylidès & Havaux, 2009). Además, el β -caroteno puede eliminar químicamente el

$^1\text{O}_2$ generando como producto de su propia oxidación el β -caroteno endoperóxido o el β -ciclocitral, con capacidad de regular la expresión génica (Ramel et al., 2012).

Por otra parte, los tocoferoles forman parte junto con los tocotrienoles de una familia de compuestos anfipáticos más extensa: los tococromanoles o vitamina E. Los tococromanoles están formados por una cabeza de cromanol polar y una cola prenilo apolar, totalmente saturada para los tocoferoles y con enlaces insaturados para los tocotrienoles. Tanto para los tocoferoles como para los tocotrienoles existen 4 isoformas con diferente actividad biológica dependiendo del número y la posición de los grupos metilos en la cabeza de cromanol: α , β , γ , y δ (Müller et al., 2010). El α -tocoferol es la forma activa mayoritaria en los tejidos fotosintéticos y es el único antioxidante conocido con capacidad de prevenir la propagación de la peroxidación lipídica en las membranas plastidiales (Munné-Bosch & Alegre, 2002; Muñoz & Munné-Bosch, 2019). Así pues, la vitamina E tiene dos funciones antioxidantes esenciales en los cloroplastos: la desactivación física y química del $^1\text{O}_2$ y la prevención de la propagación de la peroxidación lipídica. Cada molécula de α -tocoferol puede eliminar físicamente hasta 120 moléculas de $^1\text{O}_2$ (Fahrenholtz et al., 1974), mientras que, en la desactivación química, el α -tocoferol detoxifica el $^1\text{O}_2$ dando lugar a la α -tocoferol quinona, la cual puede ser reciclada y volver a formar α -tocoferol (Munné-Bosch & Alegre, 2002). Por otro lado, el α -tocoferol desactiva los radicales lipídicos peroxil formados durante la propagación de la peroxidación lipídica mediante la donación de un hidrógeno del anillo de cromanol, generando LOOH y el radical α -tocoferoxilo, que será reciclado de nuevo a α -tocoferol a través del ciclo ascorbato-glutathión (Szarka et al., 2012). El mecanismo más probable para esta desactivación de radicales peroxilo es un movimiento de *flip-flop* por parte del α -tocoferol en la bicapa lipídica (Boonnoy et al., 2018). La protección antioxidante conferida por la vitamina E ha sido estudiada en la respuesta de las plantas a la sequía, donde el α -tocoferol confiere tolerancia al estrés (Munné-Bosch, 2005). Sin embargo, los mecanismos relacionados con el posible papel no antioxidante de la vitamina E no están del todo claros y se cree que está asociado a su función antioxidante en los cloroplastos a través de la regulación del estado redox (Mesa & Munné-Bosch, 2023).

2.3 Respuesta hormonal

Las fitohormonas son moléculas señalizadoras de bajo peso molecular que activan respuestas al estrés, al crecimiento o al desarrollo, estando pues implicadas en la respuesta

de aclimatación de las plantas a estreses abióticos y bióticos (Davies, 2010). Pese a que la clasificación tradicional divide a las hormonas en aquellas relacionadas con el estrés y aquellas relacionadas con el crecimiento, es relevante incluirlas todas en el estudio de las respuestas al estrés, ya que, como se ha mencionado previamente, el estrés implica por definición una reducción del crecimiento. Además, las interacciones hormonales son responsables de una respuesta al estrés orquestada y precisa (Verma et al., 2016). Por lo tanto, se introducen aquí las hormonas relacionadas con el estrés: ácido abscísico (ABA), salicilatos, jasmonatos, y etileno (ET); pero también las hormonas relacionadas con el crecimiento, como son las auxinas, las citoquininas (CKs) y las giberelinas (GAs).

El ABA es la hormona principalmente implicada en las respuestas al estrés abiótico en plantas, regulando procesos fisiológicos clave como la regulación de la transpiración mediando el cierre estomático en la respuesta temprana al estrés hídrico (Kim et al., 2010), la conductividad hidráulica de las raíces (Thompson et al., 2007), o la inhibición del crecimiento foliar durante el estrés (Raghavendra et al., 2010). El ABA es un sesquiterpeno cuya biosíntesis comienza en los cloroplastos y otros plastidios. Entre los genes biosintéticos, el NCED es el más regulado por estrés y su enzima 9-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenasa cataliza la conversión de 9'-*cis*-neoxantina o 9'-*cis*-violaxantina en xantoxina, la cual es exportada al citosol y convertida a ABA aldehído mediante una alcohol deshidrogenasa, para después formar finalmente ABA a través de una oxigenasa (Thompson et al., 2000; González-Guzmán et al., 2002). Además, el ABA estimula su propia biosíntesis en un bucle autorregulador mediante una cascada de fosfoproteínas dependiente de Ca^{2+} (Kobayashi et al., 2005).

Como molécula señalizadora, el ABA regula la transcripción de muchos genes que inducen tolerancia al estrés abiótico (Tuteja et al., 2007). El primer paso de la señalización por ABA consiste en la activación de los receptores PYL que inhiben las fosfatasa de tipo 2C (PP2C) y que permite entonces activar las quinasas SnRK2s que median las respuestas a ABA a través de la fosforilación de factores diana, como es el caso de los canales iónicos SLAC1 y KAT1 implicados en el cierre estomático (Geiger et al., 2009; Sato et al., 2009; Ng et al., 2014). Los principales factores de transcripción implicados en las respuestas al estrés abiótico mediadas por ABA incluyen los AREBs/ABFs que se unen a elementos de respuesta en genes que promueven la tolerancia al estrés, como las dehidrinas, enzimas que

detoxifican ROS, o fosfatasa y quinasas reguladoras (Choi et al., 2000; Urano et al., 2009; Yoshida et al., 2015). Entre los compuestos cuya biosíntesis regula el ABA está la vitamina E, habiendo varios estudios que proponen su modulación tras encontrar elementos de respuesta a ABA en los promotores de genes de la biosíntesis del α -tocoferol en diferentes modelos (El Kayal et al., 2006; Chaudhary & Khurana, 2009; Munné-Bosch et al., 2009). Por lo tanto, el ABA es una hormona esencial en la regulación del balance hídrico de la planta y la tolerancia al estrés abiótico. Sin embargo, esta relación entre vitamina E y ABA no se ha estudiado en plantas no modelo en condiciones de sequía severa.

En cambio, el ácido salicílico (SA) ha estado comúnmente relacionado con el estrés biótico, siendo una hormona clave en las respuestas de defensa frente a patógenos biotróficos (Raskin, 1992; Ding & Ding, 2020). Esta fitohormona pertenece químicamente al grupo de compuestos fenólicos y en condiciones de estrés es sintetizada en un 95% a través de la vía de la isocorismato sintasa y en menor medida a través de la vía de la fenilalanina amonio liasa (Garcion et al., 2008; An & Mou, 2011). Además, la biosíntesis del SA puede ser regulada por factores abióticos como el ozono (Ogawa et al., 2005) o el déficit hídrico y la radiación ultravioleta (Bandurska & Cieślak, 2013). De esta manera, el SA también media la tolerancia al estrés abiótico al inducir la acumulación de osmolitos, como la glicina betaína o la prolina; y al modular el metabolismo antioxidante de la planta, ejerciendo un rol importante en la respuesta a la sequía (Khan et al., 2015; Hussain et al., 2021). Además, el ABA y el SA modulan la biosíntesis del otro (Muñoz-Espinoza et al., 2015; Chojak-Koźniewska et al., 2017; Prodhan et al., 2018), apoyando el hecho de que su señalización ocurre a través de vías independientes antes de la acumulación de ROS.

Los jasmonatos son fitohormonas derivadas de la peroxidación lipídica en las membranas cloroplásticas y se encuentran presentes en todas las plantas. Pertenecen a la familia metabólica de las oxilipinas, dado que son productos de oxidación de los ácidos grasos, y ejercen funciones señalizadoras participando en la regulación de diversos procesos fisiológicos en plantas. Desde el primer aislamiento de una forma de jasmonatos, el metil jasmonato, en las flores de *Jasminum grandiflorum* (Demole et al., 1962), y del ácido jasmónico (JA) en cultivos del hongo *Lasiodiplodia theobromae* (Aldridge et al., 1971); se han identificado diversas formas de jasmonatos, incluyendo isómeros, con actividad específica dependiente de su estructura (Heitz et al., 2016). Así mismo, se han caracterizado aspectos

relativos a su biosíntesis, distribución, percepción, señalización y función en plantas modelo (Wasternack & Hause, 2013; Wasternack, 2015; Howe et al., 2018).

La ruta biosintética de los jasmonatos comienza con la liberación del ácido α -linolénico a partir de fosfolípidos presentes en las membranas del plastidio mediante la acción hidrolítica de la fosfolipasa A1. El paso inicial es la oxigenación del ácido α -linolénico en el carbono 13 mediante la lipoxigenasa 13, dando lugar al ácido 13(S)-hidroperoxioctadecatrienoico. Este hidroperóxido lipídico es el sustrato de la aleno óxido sintasa (AOS), que forma un óxido de aleno muy inestable que es ciclado por la aleno óxido ciclasa (AOC), formando el ácido *cis*(+)-12-*oxo*-fitodienoico (OPDA), considerado el precursor de los jasmonatos (Vick & Zimmermann, 1984; Hamberg & Fahlstadius, 1990; Song & Brash, 1991; Feussner & Wasternack, 2002). El OPDA es transportado hasta el peroxisoma y reducido mediante la acción de la OPDA reductasa 3 (OPR3), seguido por tres rondas de β -oxidación de las cadenas laterales pentenil que lleva a la formación del JA, en la forma estereoquímica (+)-7-*iso*-JA (Stintzi & Browse, 2000; Koo et al. 2006). A partir del JA exportado al citosol, se producen otros derivados de jasmonatos mediante reacciones metabólicas como la hidroxilación, la descarboxilación, la glucosilación o la conjugación con aminoácidos, dando lugar a compuestos con función biológica como la *cis*-jasmona o la jasmonoil-isoleucina (JA-Ile), siendo (+)-7-*iso*-JA-Ile la forma más bioactiva de los jasmonatos (Staswick & Tirryaki, 2004; Fonseca et al., 2009).

Respecto a la señalización ejercida por parte de los jasmonatos, encontramos dos posibles vías en función de la dependencia o no del complejo COI. En la vía clásica de señalización COI dependiente, la JA-Ile es el único ligando de la proteína F-box COI-1, la cual se estabiliza formando parte del complejo co-receptor SCF^{COI1}-JAZ con función E3-ubiquitin ligasa (Xie et al., 1998; Xu et al., 2002). La unión de JA-Ile a COI-1 permite la ubiquitinación y la degradación proteasomal de las proteínas represoras JAZ, liberando así el factor de transcripción MYC2 que activará la expresión de genes de respuesta a jasmonatos, mediante la unión a elementos de respuesta a JA en los promotores (Thines et al., 2007; Wasternack & Hause, 2013). Por otro lado, la vía de señalización COI independiente está mediada por el OPDA, activando por ejemplo genes de respuesta a las heridas (Taki et al., 2005). Aunque se desconocen los mecanismos específicos de esta vía, diversos estudios apuntan a una señalización redox basada en las propiedades electrofílicas del OPDA como oxilipina (Farmer

& Mueller, 2013; Heitz et al., 2016), y se ha demostrado la implicación de los factores de transcripción TGA en la inducción de genes de respuesta a OPDA de manera independiente de jasmonatos (Stotz et al., 2013). Esto es especialmente relevante, y de forma muy particular desde un punto de vista evolutivo, en especies de briófitos como *Marchantia polymorpha*, la cual no sintetiza JA-Ile, pero sí acumula OPDA y activa genes de termotolerancia de forma COI independiente (Monte et al. 2020).

Las primeras funciones del JA descritas en plantas fueron su implicación en la inhibición del crecimiento y la promoción de la senescencia foliar (Dathe et al., 1981; Ueda & Kato, 1980). Desde entonces, se han descrito numerosas funciones para los jasmonatos, desde su implicación en el desarrollo de la floración (Mandaokar et al., 2006; Song et al., 2011) hasta su papel en la defensa frente a estreses bióticos, principalmente ejercidos por necrótrofos (Glazebrook, 2005). Asimismo, su rol en las respuestas a estrés abiótico se está revelando progresivamente en los últimos años (Kazan, 2015), donde la activación temprana de la biosíntesis de jasmonatos confiere tolerancia a la sequía (De Domenico et al., 2012). Dado que la señalización puede ser dependiente o independiente de ABA (Savchenko et al., 2014), su interacción en las respuestas a la sequía permite una regulación precisa y desencadenar respuestas específicas a diferentes niveles organizativos en la planta. Así, se ha demostrado la implicación de los jasmonatos en la regulación estomática junto con el ABA (Suhita et al., 2004; Munemasa et al., 2007), en la modulación de la conductividad hidráulica de las raíces (Sánchez-Romera et al., 2014), y en la activación de la biosíntesis de vitamina E (Sandorf & Holländer-Czytko, 2002; Siles et al., 2018; Casadesús et al., 2021). Sin embargo, la relación entre la vitamina E y los jasmonatos no se ha estudiado en plantas no modelo que sean tolerantes al estrés, ni tampoco en condiciones de sequía severa, donde podría haber una respuesta diferencial.

El ET también ha sido tradicionalmente asociado a la defensa de la planta, formando parte esencial de la red de señalización inmune de las plantas (Kim et al., 2014). La síntesis de esta hormona ocurre en dos pasos, primero la S-adenosil-metionina se convierte en el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxilo (ACC) y después este precursor formará etileno por acción de la ACC oxidasa (Wang et al., 2002). La transducción de su señal se logra cuando se une a sus receptores como los ETR1 y los ERS1, induciendo una cascada de señalización que previene la degradación de los reguladores EIN2, EIN3 y EIL1, que finalmente activarán los

factores de respuesta al etileno (ERFs) (Kendrick & Chang, 2008). Los ERFs actúan como un centro regulador clave en las respuestas al estrés abiótico, integrando la señalización no solo de ET sino también de ABA y de JA (Müller & Munné-Bosch, 2015). De hecho, se ha sugerido que los ERFs establecen un vínculo entre el estrés oxidativo y la regulación hormonal en las respuestas al estrés, como se ha visto en la inducción de la expresión de ERF6 por estrés oxidativo (Sewelam et al., 2013). También se ha revelado previamente la implicación del ET en la regulación de osmolitos y del sistema antioxidante que elimina ROS durante la sequía (Wu et al., 2022). Por lo tanto, es imprescindible la integración de la señalización por ABA, jasmonatos y ET en respuestas a estrés por sequía y entender las posibles sinergias que se establecen entre estas hormonas.

Las auxinas son fitohormonas implicadas en los procesos de diferenciación celular, permitiendo establecer la polaridad en patrones del desarrollo de la planta y promover la expansión celular (Majda & Robert, 2018). Así, el transporte polar de auxinas establece un gradiente de auxinas en los tejidos del cual depende la morfogénesis y el desarrollo celular (Grunewald & Friml, 2010). Su biosíntesis puede ser dependiente o independiente de triptófano, pero siempre a partir de los precursores indoles, siendo el ácido indolacético (IAA) la auxina más abundante (Tognetti et al., 2012). La producción de ROS debido a un estrés abiótico puede alterar los gradientes de auxinas, así como reducir la señalización mediada por esta hormona (Xia et al., 2015). Las consiguientes alteraciones en el crecimiento y desarrollo de la planta pueden verse como estrategias de aclimatación al estrés para evitar o atenuar sus efectos perjudiciales en la planta. Además, hay una relación entre el metabolismo del cloroplasto y la homeostasis de las auxinas, donde las auxinas pueden afectar a los componentes fotosintéticos y la estructura del cloroplasto (Salazar-Irbe & De-la-Pena, 2020), lo que ha sido planteado como un efecto protector en el que las auxinas podrían promover la tolerancia al estrés (Tognetti et al., 2012). Sin embargo, por ahora no se han identificado los componentes regulados por auxinas que ajustarían el metabolismo cloroplástico ante un estrés ambiental.

Las citoquininas modulan la división celular y las relaciones fuente-sumidero, ejerciendo un feedback positivo entre ambos procesos que lleva rápidamente al crecimiento y desarrollo de la planta (McIntyre et al., 2021). Son hormonas derivadas de adenina que contienen una cadena isopentenil unida a un grupo amino en su estructura química, cuya

conformación permite categorizarlas en los dos tipos más abundantes en las plantas: las isopentenil adeninas y las *trans*-zeatinas. El primer paso de la biosíntesis consiste en la transferencia por las IPT de un grupo isopentenilo del dimetilalilo difosfato a un nucleótido de adenina, ya sea AMP, ADP o ATP, lo que lleva a la síntesis de los derivados de adenina N⁶ prenilados. La desfosforilación de los derivados da lugar a las citoquininas precursoras isopentenil-adenosina (IPA) y ribósido de *trans*-zeatina (*t*-ZR), que a su vez serán desribosiladas para formar las citoquininas activas isopentenil adenina (iP) y *trans*-zeatina (*t*-Z). La formación de estas citoquininas activas también puede darse de manera directa a partir de los derivados a través de las enzimas LOG, que eliminarán un grupo ribosa 5'-monofosfato, lo que activará a las citoquininas para que puedan unirse a sus receptores (Svolacchia & Sabatini, 2023). Respecto a su función en estreses abióticos, estas hormonas promueven roles antagónicos al ABA, y en general su aumento durante el estrés está asociado a una peor tolerancia, pues es un momento vulnerable para la planta, no óptimo para el crecimiento (Hwang et al., 2012). Así, se ha visto que mutantes *ipt* de *Arabidopsis*, con niveles reducidos de citoquininas, son más resistentes a la sequía en comparación con las plantas salvajes (Nishiyama et al., 2011). En este mismo estudio, la aplicación exógena de ABA reprimió la expresión de genes biosintéticos de las citoquininas, sugiriendo que, ante un estrés abiótico, la acumulación de ABA puede disminuir los niveles de citoquininas. También, plantas de tabaco que sobreexpresan las enzimas de degradación de las citoquininas activas (citoquininas oxidasas) durante el desarrollo tienen después una mayor tolerancia a la sequía debido a un sistema radicular reforzado (Macková et al., 2013).

Las giberelinas también pueden promover el crecimiento, pero influyendo sobretudo en el tamaño de la planta (Wang et al., 2017), además de estimular la germinación de las semillas (Groot & Karssen, 1987), la floración (Fukazawa et al., 2021) y otros procesos clave del desarrollo (Sponsel, 2016). Las giberelinas son ácidos diterpenoides sintetizadas a partir del geranilgeranil difosfato, el cual es transformado en el cloroplasto a *ent*-copalil difosfato y después a *ent*-kaureno, que tras varios pasos de oxidación en las membranas del retículo endoplasmático dará lugar a la primera giberelina de la vía, la GA₁₂ (Helliwell et al., 1999; Hedden, 2020). Esta giberelina dará lugar en el citosol y mediante la acción de diferentes oxidasas a las giberelinas GA₁ y GA₄. Además, la GA₃, conocida como ácido giberélico, y la GA₇ se forman a partir de GA₁ y GA₄, respectivamente (Hedden, 2020). Estas 4 GAs son las

consideradas bioactivas y su metabolismo está regulado por la propia señalización de GA, que induce la degradación del regulador transcripcional DELLA, lo que permite aumentar la expresión de genes de la biosíntesis, así como la del receptor GA, además de activar las respuestas de GAs (Sun, 2011). Dado su rol central en el crecimiento, al igual que con las citoquininas, un estrés abiótico impacta en la síntesis y señalización de estas hormonas. Por ello, se ha visto su implicación en el retraso del crecimiento en la respuesta de adaptación al estrés a través de la acumulación del represor DELLA, lo que facilita la supervivencia de la planta (Achard et al., 2008). Además, las proteínas DELLA parecen ser centros de regulación en la interacción entre otras hormonas con la vía de señalización de las GAs (Maitra et al., 2021). Así, se ha demostrado que los jasmonatos interfieren con la señalización de GAs a través de la interacción de los represores JAZ con el represor DELLA (Yang et al., 2012). Así, las JAZ inhiben la respuesta de jasmonatos y estimulan las respuestas de GAs mostrando una interacción antagónica entre ambas para los roles de defensa frente a crecimiento (Um et al., 2018). Otros estudios también han descrito el efecto negativo de un incremento de GAs en la tolerancia a la desecación (Nir et al., 2014).

2.4 Características diferenciales de la respuesta al estrés severo

La severidad de un estrés viene dada por las consecuencias que éste tiene en el estado fisiológico de la planta y depende de su fase de crecimiento, de lo adaptada que esté una especie, así como del grado de tolerancia exhibido. Esto es relevante, porque dependiendo de la resistencia de la planta a un estrés específico, éste puede o no percibirse o percibirse como estrés leve, moderado o severo (Niinemets, 2010). Además, la exposición a un estrés leve desencadena mecanismos de aclimatación en la planta que le dotarán en el futuro de una tolerancia mejorada al estrés severo (Sadhukhan et al., 2022). En condiciones naturales, las plantas experimentan a menudo diferentes grados de estrés o incluso ciclos estacionales de estrés, para los que requieren mecanismos de respuesta diferenciales (Claeys & Inzé, 2013). Además, la respuesta al mismo estrés puede ser distinta dependiendo de la edad de la planta (Abarca et al., 2001). Por otro lado, dado que una mayor supervivencia al estrés severo no está precisamente ligada a un mejor crecimiento en condiciones de estrés más leve, se sugiere que ambos procesos están regulados por mecanismos diferentes (Skirycz et al., 2011). Por lo tanto, existe un compromiso intrínseco entre supervivencia y crecimiento, donde aquellas especies con mayor capacidad de

supervivencia al estrés tienen un coste en su crecimiento y vigor. Sin embargo, este coste no siempre resulta tan elevado para algunas especies o ecotipos en concreto, que son capaces de mantener la productividad a la vez que la resistencia a estreses (Bechtold et al., 2018).

En efecto, ante un estrés hídrico severo las plantas responden con una reducción en el crecimiento en la fase de alarma inicial, o incluso su detención (Chaves et al., 2003). En especies tolerantes a la sequía, la reducción del crecimiento está considerada una estrategia para invertir el carbono en moléculas protectoras o estructuras radiculares para mejorar así la absorción de agua. Una mejora adaptativa en la arquitectura del sistema radicular hacia una mayor absorción y utilización del agua disponible es esencial para la adaptación a la sequía (Ranjan et al., 2022). Por ejemplo, las plantas freatofitas que han desarrollado raíces profundas para aprovechar los recursos hídricos subterráneos (Thomas, 2014). Un paso más allá es el de las plantas que entran en ecodormancia, deteniendo el metabolismo y el crecimiento temporalmente hasta que las condiciones ambientales vuelvan a ser favorables, siendo un proceso regulado principalmente por ABA (Horvath et al., 2003). Esta situación difiere de la endodormancia estacional cíclica que presentan en los meristemas algunas especies perennes (Rohde & Bhalerao, 2007). Por otro lado, está el caso de las plantas resurrectoras, que tienen la capacidad de tolerar la pérdida casi completa de agua en sus tejidos y seguir vivas tras la rehidratación (Scott, 2000; Oliver et al., 2020). Estas plantas cuentan con una tolerancia extrema a la desecación y su estrategia es opuesta a la de las plantas suculentas, las cuales almacenan agua durante largos periodos de escasez hídrica, evitando la pérdida y permitiendo la continuidad del metabolismo (Eggli & Nyffeler, 2009). Sin embargo, en especies no tolerantes, la falta de CO₂ debido al cierre estomático, la inhibición de la fotosíntesis y la pérdida de turgencia por déficit hídrico llevan a una limitación en el crecimiento de la planta que, de prolongarse en el tiempo, puede ser irreversible y conducir a su muerte (McDowell et al., 2008). Anteriormente se mencionaban las dos principales causas de muerte de la planta por estrés hídrico severo: el fallo hidráulico y la inanición de carbono (McDowell, 2011). Pero antes de llegar a este punto de no retorno, las plantas tolerantes o evasoras cuentan con una serie de mecanismos morfológicos y fisiológicos para evitar entrar en colapso.

A nivel morfológico, un déficit hídrico severo causa reducciones en el área foliar debido a una inhibición de la expansión celular y de la actividad fotosintética (Avramova et al., 2015). Esta reducción del área foliar viene acompañada de una disminución en el número de estomas, un aumento en la densidad de tricomas, un engrosamiento de las paredes celulares o un enrollamiento de las hojas para reducir la absorción de la luz y ahorrar agua (Chaves et al., 2003). Los tricomas presentes en la cara adaxial de la hoja pueden atenuar la radiación fotosintética actuando como reflectores de la luz (Bickford, 2016). El cambio en el ángulo de la hoja hacia una orientación más vertical también está relacionado con una disminución de la energía absorbida y es característico en especies adaptadas a ambientes áridos o semiáridos (Feistler & Habermann, 2012; Leigh et al., 2017). No obstante, todos estos cambios estructurales en la hoja impactan de lleno en el área fotosintética de la planta y, por lo tanto, en su capacidad de hacer la fotosíntesis.

A nivel subcelular, en especies no tolerantes, la maquinaria fotosintética se verá gravemente dañada por el exceso de ROS que no puede ser detoxificado por los sistemas antioxidantes y por los cambios metabólicos que afectan al recambio de proteínas, como ocurre con la Rubisco (Demirevska et al., 2009; Perdomo et al., 2017). Además, la sequía severa inhibe la síntesis de clorofilas y reduce el contenido de proteínas de unión a clorofilas, afectando gravemente los complejos captadores de luz del PSII (Anjum et al., 2011; Ashraf & Harris, 2013). En especies tolerantes, la reducción en el contenido de clorofilas se contempla como un mecanismo fotoprotector para evitar un exceso de fotones en los fotosistemas, normalmente acompañado de un aumento en pigmentos fotoprotectores como las xantofilas que disipan el exceso de energía (Batra et al., 2014), o el aumento en antioxidantes fotoprotectores como la vitamina E (Munné-Bosch & Alegre, 2000). Sin embargo, un exceso de degradación clorofílica puede llevar a la senescencia foliar, la cual es irreversible y comporta la muerte del órgano (Hörtensteiner & Kräutler, 2011).

3. Senescencia foliar

3.1 Definición

La senescencia foliar constituye la etapa final del desarrollo de una hoja y está cuidadosamente controlada para la descomposición óptima de las estructuras celulares y la cesión de nutrientes y fotoasimilados resultantes a hojas más jóvenes, así como a otros

órganos activos de la planta, como pueden ser los reproductores (**Figura 2**). La regulación hormonal modula la senescencia foliar integrando señales del desarrollo y ambientales (Jibran et al., 2013). Cuando una hoja entra en senescencia, los cloroplastos transicionan de sumidero a fuente, se produce un exceso de ROS y de estrés foto-oxidativo porque la tasa fotosintética se ve reducida por el desensamblaje del aparato fotosintético y la degradación de clorofilas (Juvany et al., 2013). De manera que la senescencia foliar puede desencadenarse por señales del desarrollo, como la edad de la hoja o el inicio de la etapa reproductiva (Jing et al., 2002); o bien por señales ambientales, como puede ser un estrés por sequía o alta irradiación (Quirino et al., 2000). Al implicar la muerte celular programada, la senescencia foliar es un proceso coordinado a nivel molecular, celular, de órgano y de planta entera (Noodén, 1988; Lim et al., 2007).

3.2 Características y regulación de la senescencia foliar inducida por sequía

Dependiendo de su severidad, una sequía puede inducir la senescencia foliar de forma prematura, acelerando este proceso para lograr la removilización de nutrientes a otras zonas de la planta (Quirino et al., 2000). El proceso ocurre gradualmente en tres fases: la fase de iniciación, la fase de reorganización y la fase terminal; y en cada una de ellas se producen cambios en la expresión génica, en el metabolismo y en la estructura celular (Munné-Bosch & Alegre, 2004). En la fase de iniciación la sequía desencadena una señalización específica que conducirá a la expresión de genes asociados a la senescencia (SAG), lo que promoverá el paso a la fase de reorganización. En esta segunda fase se produce un declive en la fotosíntesis, una degradación de las clorofilas y un desmantelamiento de la estructura celular. Finalmente, en la fase terminal ocurre la muerte celular, es un punto de no retorno en el que la hoja está abocada a la muerte. Los cambios en la estructura celular, como la condensación de la cromatina, la acumulación de plastoglóbulos en el estroma de los cloroplastos y el desensamblaje de las membranas tilacoidales son síntomas tempranos de senescencia foliar que también ocurren cuando es inducida por sequía (Munné-Bosch et al., 2001). Además, la degradación de clorofilas ocurre de manera progresiva, siendo compatible con la removilización de nutrientes, especialmente el nitrógeno (Hörtensteiner & Feller, 2002). También se sabe que el estrés oxidativo media la progresión de la senescencia foliar inducida por sequía, ya que un exceso de ROS y de peroxidación lipídica supera la capacidad antioxidante que inicialmente era elevada (Munné-Bosch et al., 2001).

Pese a que varias clases de hormonas regulan la senescencia foliar, únicamente el ABA, el ET y las citoquininas han demostrado tener un papel directo en la regulación de la senescencia foliar inducida por sequía. Tanto el ABA como el ET son promotores del proceso, donde se ha demostrado que el primero aumenta la removilización de carbono desde las hojas senescentes hasta los granos en plantas de cereales sometidas a sequía (Yang et al., 2002, 2003), y la implicación del segundo ha sido demostrada mediante mutantes de ACC sintasa en maíz, los cuales retrasan la senescencia en condiciones de sequía (Young et al., 2004). El ABA participa en la regulación de la senescencia foliar a través de su unión al receptor PYL9, que induce la fosforilación y activación de factores de transcripción que activan a otros como *ORE1* y *NAP*, los cuales activan finalmente genes SAG, como el SAG₁₁₃ codificante para una fosfatasa que regula el movimiento de estomas en hojas senescentes (Zhang & Gan, 2012; Zhao et al., 2016). Además, la degradación de clorofilas que promueve la senescencia está inducida por la señalización de ABA (Yang et al., 2015; Gao et al., 2016; Mao et al., 2017). En cambio, las citoquininas están relacionadas con la inhibición de la senescencia, como se ha demostrado en plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan el gen *IPT* (implicado en la biosíntesis de citoquininas) y que retrasan la senescencia foliar inducida por sequía (Rivero et al., 2007), y en plantas de algodón ante un estrés salino (Liu et al., 2012). En *Arabidopsis* se ha demostrado la implicación de la fosforilación de receptores de citoquininas en el retraso de la senescencia foliar (Kim et al., 2006). CRF6 es un regulador negativo de la senescencia inducida por oscuridad (Zwack et al., 2013), y se ha visto que reprime genes asociados a las citoquininas durante estrés oxidativo (Zwack et al., 2016). Aunque su señalización como tal no desencadena el inicio de la senescencia, la reducción de citoquininas endógenas en la hoja es esencial para la progresión del proceso (Yang et al., 2002; Munné-Bosch & Alegre, 2004; Nakanishi et al., 2024).

Por último, las ROS regulan el proceso de la senescencia porque dependiendo de su concentración se inducirán unas respuestas fisiológicas determinadas, hasta terminar en la degradación de los cloroplastos (Khanna-Chopra, 2012; Foyer, 2018). Además, la interacción de las ROS con las hormonas podría ser clave en la regulación de la senescencia foliar inducida por sequía, como ya se ha visto en otros procesos. En hojas senescentes, las NADPH oxidasas interactúan con el ABA, aumentando la síntesis de ROS (Li et al., 2018). Además, los SAG pueden estar regulados por el estrés oxidativo (Navabpour et al., 2003), y en éste

están implicadas hormonas como los jasmonatos o el ABA, por lo que la integración de la señalización redox y hormonal promueve la senescencia foliar (Zhao et al., 2020).

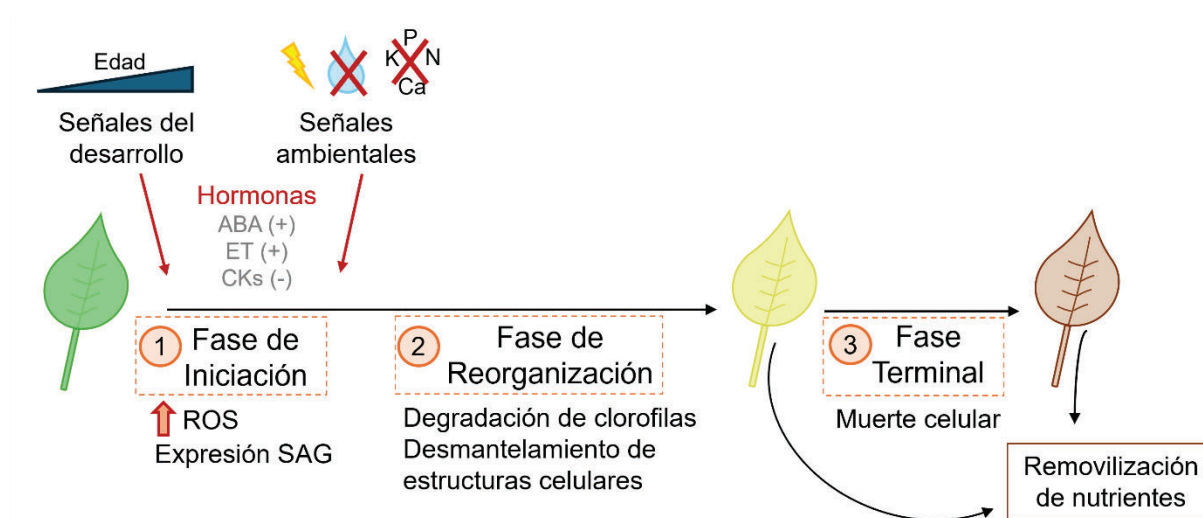


Figura 2. Resumen del proceso de senescencia foliar. Las hormonas que integran las señales pueden ejercer una regulación positiva (+) (ABA y ET) o negativa (-) (CKs) de la senescencia. ABA: ácido abscísico; CKs: citoquininas; ET: etileno; ROS: especies reactivas de oxígeno; SAG: genes asociados a la senescencia.

3.2 Implicaciones fisiológicas a nivel de planta entera

La senescencia foliar no tiene por qué tener una implicación negativa en la planta, sino que además puede ser beneficiosa para su supervivencia, siendo un rasgo evolutivo que permite a las plantas adaptarse al ambiente (May & Killingbeck, 1992). Así, al estar inducida por sequía, la senescencia foliar puede servir como estrategia para sobrevivir a nivel de planta entera. La removilización de nutrientes de hojas senescentes hacia hojas más jóvenes para lograr la supervivencia de estas últimas es considerada una gestión eficaz de los recursos cuando la planta está en alerta por estrés. Pese a no contribuir más a la fotosíntesis, las hojas senescentes tienen aún una reserva de nutrientes importante que la planta puede metabolizar y aprovechar en tejidos en crecimiento, especialmente en órganos como flores o frutos, aumentando así la capacidad reproductora de la planta (Munné-Bosch & Alegre, 2004; Bazargani et al., 2011). Además, la senescencia foliar ayuda a reducir la pérdida de agua por transpiración durante un evento de sequía, y permite mantener el crecimiento de las raíces para la búsqueda de nuevos recursos de nutrientes (Higuchi et al., 2014). En casos muy avanzados de senescencia foliar, podría llegar a inducirse la abscisión, aunque no en todas las plantas.

4. Abscisión foliar

4.1 Definición

La abscisión foliar consiste en el desprendimiento de las hojas por parte de la planta, siendo un proceso esencial de ahorro energético para las plantas caducifolias en otoño, y también un mecanismo de defensa en situaciones críticas (Taylor & Whitelaw, 2001; Patharkar & Walker, 2018). Por ejemplo, para reducir la transpiración a nivel de planta entera durante un evento de sequía extrema (Street et al., 2006; Agustí et al., 2012), o para separar a patógenos de la planta, aumentando su mortalidad al ser más susceptibles a la depredación o a la inanición en el suelo (Faeth et al., 1981). La abscisión foliar se produce en cuatro etapas principales en la denominada zona de abscisión (AZ), que se establece en la base del peciolo a medida que se desarrolla el órgano (**Figura 3**; Patterson, 2001). En un primer paso, las células de la AZ que forman parte de la capa de separación se diferencian en células que adquirirán la competencia de responder a señales ambientales y del desarrollo. El segundo paso consiste en la activación de esta señalización y la adquisición de competencia de la AZ. Cuando se activa la AZ, en un tercer paso, las enzimas hidrolíticas separarán las dos capas de células que se expanden, disolviendo la laminilla media de pectina que las unía, provocando así la caída de la hoja. Por último, la cicatriz de la zona de abscisión se diferenciará y sellará con una capa protectora (Kim, 2014; Patharkar & Walker, 2018). La abscisión de órganos florales en *Arabidopsis* ha sido el modelo de estudio durante años para averiguar los mecanismos moleculares que promueven el desarrollo de la AZ (McKim et al., 2008; Gómez-Mena & Sablowski, 2008; Patharkar & Walker, 2015), así como la activación de la señalización de la abscisión donde se requiere el péptido señal *INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION* (Butenko et al., 2003; Schardon et al., 2016), y de la amplificación de esta señal a través de la retroalimentación positiva de los receptores HAE (Jinn et al., 2000; Patharkar & Walker, 2015). Sin embargo, este modelo de abscisión es desencadenado por un estadio del desarrollo y no por condiciones ambientales. Recientemente, se ha demostrado que la abscisión inducida por sequía de hojas caulinares de *Arabidopsis* requiere el mismo mecanismo de señalización que el de la abscisión floral (Patharkar & Walker, 2016).

4.2 Regulación hormonal y redox de la abscisión foliar

Pese a los mecanismos moleculares descritos que regulan la abscisión, aún queda por entender su conexión con los cambios fisiológicos que ocurren en la AZ, y en ello las hormonas tienen un papel esencial. Las hormonas que principalmente regulan el proceso son el etileno, que es inductor de la abscisión (Jackson & Osborn, 1970), y las auxinas, que son supresoras (Abeles & Rubinstein, 1964). Así, mutantes defectivos en elementos de percepción del etileno como *etr1* y *ein2* retrasan la abscisión floral (Patterson & Bleeker, 2004). La relación antagónica entre ambas hormonas se evidencia cuando el contenido de auxinas en la AZ controla la sensibilidad de ésta al etileno y, por su parte, el etileno inhibe el transporte polar de auxinas (Meir et al., 2015). Se sabe que cuando el flujo polar de auxinas en transporte basipétalo dirigido hacia la AZ se reduce, ya sea por una disminución de su biosíntesis o bien por la inhibición de su transporte, la AZ adquiere la competencia para responder al etileno y ejecutar la abscisión (Basu et al., 2013). En la abscisión foliar inducida por sequía se ha observado una reducción en el transporte polar de auxinas (Davenport et al., 1977) y una disminución de la expresión de genes de respuesta a las auxinas (Street et al., 2006; Agustí et al., 2012). Además, otras hormonas como los jasmonatos parecen estar implicadas en la abscisión, como se demostró en un inicio en explantes de judía, donde el JA y el MeJA promovían la abscisión del peciolo (Ueda et al., 1996). Muchos de los estudios en abscisión se han realizado en explantes, porque permiten aplicar tratamientos en la superficie cortada del explante y así dilucidar el mecanismo de acción en la zona de abscisión. Asimismo, mutaciones en el co-receptor COI retrasan la abscisión floral en *Arabidopsis* (Kim et al., 2013), y el factor de transcripción *SIHB15A* inducido por auxina regula la abscisión del pedicelo de tomate disminuyendo los niveles de JA-Ile, modulando su biosíntesis al reprimir a JAR1 (Liu et al., 2022). De manera que, cuando el flujo de auxinas se ve interferido, la regulación a la baja de *SIHB15A* permite aumentar la expresión de *SIJAR1*, llevando a una acumulación de JA-Ile que puede acelerar la abscisión de manera dependiente o independiente de etileno (Liu et al., 2022). Sin embargo, su implicación en la abscisión foliar inducida por sequía se desconoce.

Además de las hormonas, las ROS también están implicadas en la regulación de la abscisión mediante la señalización redox (Sakamoto et al., 2008 a). Es el caso del H₂O₂, que ha demostrado estar implicado en la señalización de la abscisión foliar inducida por estrés

en plantas de chile (Sakamoto et al., 2008 b). En este estudio *in vitro*, no solo se mostró una producción prolongada de H_2O_2 en la AZ, sino que su aplicación también promovió la abscisión y la expresión de celulasa. Además, sus resultados indican que el H_2O_2 actúa por debajo del etileno en la señalización de la abscisión *in vitro*. De hecho, el estrés oxidativo atenúa la señalización de auxinas (Peer et al., 2013), y el etileno induce la expresión de genes detoxificantes de ROS como peroxidasas o catalasas durante la abscisión foliar en cítricos (Agustí et al., 2008). Por lo tanto, la interacción hormonal y redox en la abscisión foliar parece de vital importancia para el estudio de la regulación de este proceso.

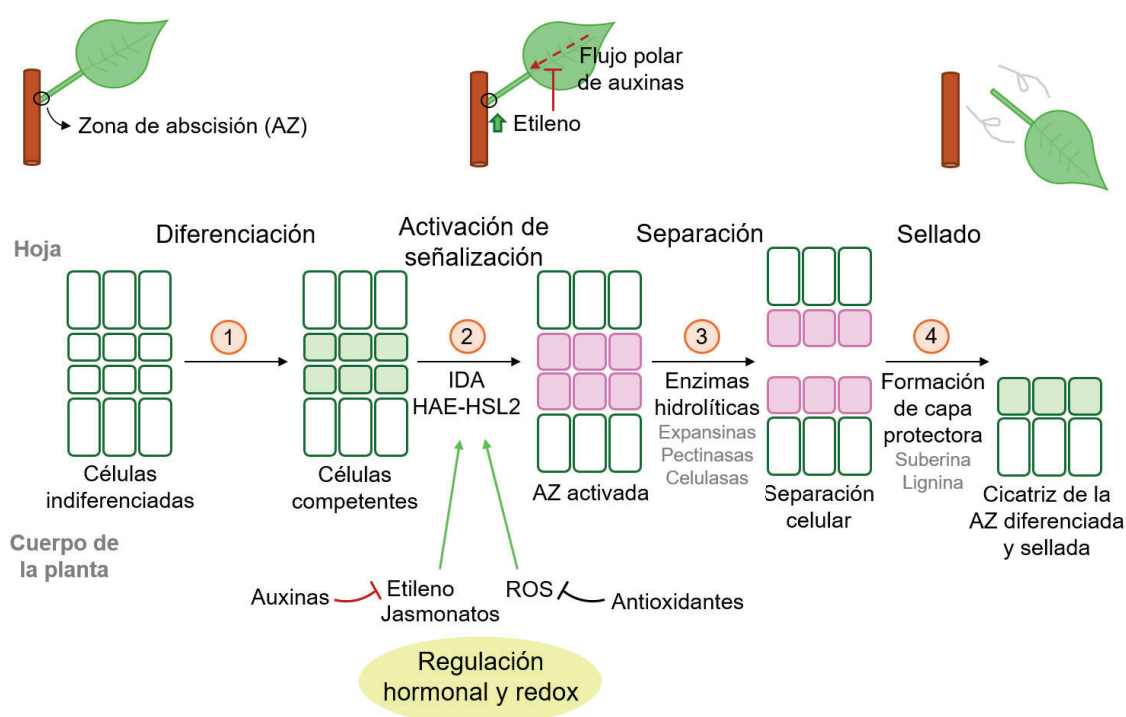


Figura 3. Esquema del proceso de abscisión foliar que muestra las etapas del proceso y la regulación hormonal y redox en la activación de la señalización. AZ: zona de abscisión; HAE-HSL2: proteínas quinasas de tipo receptor HAESA y HAESA-LIKE₂; IDA: péptido INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION; ROS: especies reactivas del oxígeno.

4.3 Implicaciones fisiológicas a nivel de planta entera

La abscisión foliar constituye un desprendimiento activo de hojas que han llegado al final de su rendimiento útil para la planta, es decir, que son ya prescindibles por un motivo o por otro. El momento de la abscisión foliar está fuertemente determinado por las condiciones ambientales, como puede ser el fotoperiodo más corto y temperaturas más frías del otoño en el caso de los árboles caducifolios del hemisferio norte (Addicot, 1982). Al

escindir las hojas en otoño se minimiza la energía respiratoria y la pérdida de agua asociada durante el invierno, cuando la ganancia fotosintética de carbono es mínima (Primka & Smith, 2019). Si estas hojas permanecen en el árbol durante el invierno, las ramas se podrían romper por el peso de la nieve, por lo que la abscisión foliar ejerce una función protectora a nivel de planta entera (Patharkar & Walker, 2018). Además, despeja el espacio en la copa del árbol, permitiendo que la luz llegue a los nuevos brotes que surgirán en primavera. También las sequías estacionales y posteriores lluvias desencadenan la abscisión foliar comúnmente en especies tropicales, donde la edad de la hoja no determina por sí sola el momento de la abscisión, siendo los factores ambientales más determinantes (Borchert et al., 2002; Gutiérrez-Soto et al., 2008). En el caso de la abscisión foliar inducida por sequía, la pérdida de hojas está considerada una estrategia para evitar el estrés hídrico en aquellas plantas adaptadas a la sequía, porque reduce la superficie de transpiración, reduciendo así la demanda de agua y el riesgo de fallo hidráulico, siendo especialmente eficiente en situaciones de estrés severo (Street et al., 2006). En plantas tolerantes a la desecación, la abscisión de las hojas permite mantener fotosintéticamente activo el tallo para sobrevivir, reactivando la formación de nuevas hojas durante la recuperación hídrica (Liu et al., 2007).

5. Modelos de estudio

5.1 *Sempervivum tectorum* L.

La siempreviva mayor (*Sempervivum tectorum* L.) también conocida como barbas de Júpiter, es una planta suculenta que pertenece a la familia Crassulaceae (**Figura 4**). Esta especie es nativa de las altas montañas europeas como los Balcanes, los Alpes y los Pirineos, donde crece en roquedales abiertos con escaso sustrato o pastos pedregosos, generalmente en orientación sur y en suelos calizos, en un rango altitudinal amplio que abarca desde altitudes montanas (600 m) hasta las alpinas (2800 m) (Praeger, 1932; Klein & Kadereit, 2015). Además, se distribuye naturalmente en algunas sierras montañosas de menor altitud y/o latitud, como en el Sistema Ibérico, la Cordillera Cantábrica o el Parque Natural del Montseny (Smith, 1981), y también ha sido cultivada fuera de su rango de distribución (Parnell & Favarger, 1993). Tradicionalmente, se creía que protegía de los rayos de las tormentas y del fuego, ya que la asociaban con Zeus (Júpiter) y de ahí su nombre común. Además, sus hojas se han utilizado por las propiedades antiinflamatorias y astringentes. En

el género *Sempervivum*, la hibridación interespecífica es muy común en la naturaleza, generándose híbridos de *S. tectorum* con *S. montanum* y *S. arachnoideum*, las tres especies más conocidas (Klein & Kadereit, 2016). Sin embargo, el reconocimiento de la especie *tectorum* no es muy difícil si se tienen en cuenta ciertas características botánicas diferenciales (Praeger, 1932; Smith, 1981).

S. tectorum es una planta plurianual que crece disponiendo las hojas oblongo-lanceoladas de márgenes ciliados en forma de roseta de unos 3 a 12 cm de diámetro. Las hojas son gruesas y carnosas, de color verde intenso con la base rosada y las puntas purpúreas, dependiendo a veces de la irradiación solar que reciben. Al ser una especie monocárpica, una vez que la roseta florece, normalmente durante el verano, ésta muere. El tallo floral puede alcanzar los 40 cm de alto, tiene hojas inferiores glabras y dispone de 15-30 flores de color rosado, con fruto en polifolículo y las semillas piriformes alveoladas. No solo se reproduce sexualmente, sino que además cuenta con reproducción clonal, propagándose vegetativamente a través de estolones axilares durante la época de crecimiento (mayo-junio). Cada roseta producirá nuevos clones que quedarán colgando de la roseta madre unidos por los estolones y que, al enraizar alrededor de ésta, permitirán la expansión del genotipo del individuo, a veces formando matas extensas de hasta varios metros.

El género *Sempervivum* crece especialmente bien bajo condiciones ambientales extremas en su hábitat natural, mostrando una tolerancia no solo a heladas repentinas sino también a temperaturas elevadas (Larcher et al., 2010; Zaharia et al., 2010). Pueden sobrevivir siete meses protegidas bajo la nieve durante el invierno (Larcher & Wagner, 1983), registrándose resistencia a temperaturas de hasta -25°C en los clones vegetativos en el caso de *S. montanum* (Larcher et al., 2010). Al contrario que su congénere, *S. tectorum* crece en las laderas sur de las montañas, lo que comporta que esta especie soporte periodos de sequía en su hábitat natural (Larcher et al., 1989). Aunque sus mecanismos de tolerancia no han sido estudiados, sí se conocen características estructurales y anatómicas de la especie. Tanto el sistema radicular como el tallo hinchado le permiten almacenar agua, siendo estos órganos reservorios de agua esenciales para la planta durante la ausencia de precipitaciones. El tallo dispone de una corteza bien desarrollada, formada por grandes células parenquimáticas, y además todo el parénquima posee una función de

almacenamiento de agua (Kirilenko, 2016). También sus hojas succulentas acumulan agua, considerándose una de las adaptaciones más exitosas frente a la sequía en el reino vegetal (Leverett et al., 2023). Además, la disposición de las hojas en modo de roseta permite condensar la humedad cerca de la base del tallo. Al igual que muchas otras especies de la familia Crassulaceae, el género *Sempervivum* tiene metabolismo ácido crasuláceo (CAM), el cual solo es revertido cuando es sometida a temperaturas experimentales extremas, con temperaturas de más de 35°C por las noches y menos de 10°C durante el día (Wagner & Larcher, 1981). El metabolismo CAM evolucionó en plantas adaptadas a ambientes áridos y permite mantener estomas cerrados durante el día para evitar así la pérdida de agua (Osmond et al., 1975; Heyduk et al., 2019). De esta manera, la fotosíntesis se realiza en dos fases: durante la noche los estomas se abren para fijar CO₂ en forma de ácidos orgánicos, y durante el día este carbono almacenado en vacuolas se libera al estroma de los cloroplastos y entrará en el Ciclo de Calvin.



Figura 4. *Sempervivum tectorum* L. en su hábitat natural en una población situada en el Espai Natural de Les Guílleries, Barcelona. A la izquierda, un individuo con reproducción clonal. Se aprecia una roseta madre central a partir de la cual se propaga vegetativamente a través de estolones la descendencia clonal aún sin enraizar. A la derecha, una roseta con reproducción sexual, donde se aprecia la inflorescencia. Fotografías de la autora.

5.2 *Olea europaea* L.

El olivo (*Olea europaea* L.) es un árbol esclerófilo perenne de la familia Oleaceae caracterizado por su gran longevidad y tolerancia a la sequía (**Figura 5**). El olivo es el principal

árbol frutal comestible en la cuenca del Mediterráneo con gran relevancia agroecológica y socioeconómica (Loumou & Giourga, 2003), siendo el sector oleícola uno de los principales del sistema agroalimentario español. El olivo florece durante la primavera (abril-mayo) y el fruto alcanza la maduración comercial entre los meses de noviembre y enero, dependiendo de la variedad y de la región. Del cultivo del olivo no solo se extraen como producto sus frutos, las olivas, sino también el aceite, el cual puede ser embotellado y almacenado durante meses. La producción española de aceite de oliva supone el 70% de la producción de la UE y el 45% de la mundial, siendo la producción media de aceite de oliva entre 2019 y 2023 de 1.168.700 toneladas (MAPA, 2024 a). La campaña de 2022/2023 del sector del olivar en España obtuvo 666.013 toneladas de aceite de oliva, una reducción del 55% respecto a la campaña anterior y la mayor bajada en la producción de los últimos años (MAPA, 2024 b). Esto fue debido en parte a la sequía prolongada en nuestro país y a las altas temperaturas durante la primavera que afectaron negativamente a la floración y al cuajado del fruto en 2022, el año más caluroso desde que hay registros (Serrano-Notivoli et al., 2023).

La domesticación del olivo a partir de su progenitor silvestre (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *sylvestris*) ocurrió hace unos 6000 años a.c. de acuerdo con estudios arqueológicos y genéticos (Besnard et al., 2013; Langgut et al., 2019). Así, el cultivo del olivo se remonta a la antigüedad y ha acompañado la aparición de civilizaciones enteras, extendiéndose a lo largo del Mediterráneo a partir de dos áreas originarias: el Levante sur calcolítico y el sur de Grecia (Langgut et al., 2019). Además, según la mitología griega Zeus “*morios*” era el protector del olivo sagrado, el “*moria elaia*”, y la diosa Atenea lo ofreció a la ciudad de Atenas plantando el primer olivo en la Acrópolis, conservándose este árbol en el templo del Erecteión (Letsas, 1949). Según la mitología, fue la diosa Atenea quien enseñó al pueblo cómo cultivar el olivo y el tratamiento que debía dársele a su fruto (Kakridis, 1986). A partir de entonces, su cultivo ha causado que la especie sobrepase sus límites bioclimáticos naturales, creciendo a mayores altitudes y latitudes, así como en áreas más áridas. Así, aunque son habituales los cultivos intensivos bien irrigados, esta especie se ha cultivado tradicionalmente en secano, y algunas variedades son productivas en áreas semiáridas donde otros árboles frutales no podrían llegar a crecer (Connor & Fereres, 2005).

De manera que el olivo es una especie adaptada a la sequía y, aunque depende de la variedad, está provisto de mecanismos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos para lidiar

con el déficit hídrico (Bacelar et al., 2006). Entre los rasgos que le conceden esta resistencia, encontramos hojas pequeñas y escleróticas, con una alta densidad de tejido foliar, cutícula gruesa y tricomas (Chartzoulakis et al., 1999; Trabelsi et al., 2024). Bajo déficit hídrico, los olivos controlan el cierre estomático, pudiendo regular así el intercambio de gases, y ajustan también su potencial osmótico para poder mantener la turgencia celular pese a una disminución de la actividad fotosintética (Nogués & Baker, 2000; Dichio et al., 2009; Perez-Martin et al., 2014). Además, disponen de un potente sistema radicular para absorber agua en capas más profundas del suelo (Tognetti et al., 2006). De hecho, la conductancia hidráulica de las raíces constituye el mayor regulador del uso del agua en olivo bajo déficit hídrico moderado (Rodríguez-Dominguez & Brodribb, 2020). Esta especie leñosa es capaz de mantener suficientes reservas de carbonos no estructurales, lo que podría apoyar una estrategia de supervivencia para asegurar la recuperación tras largos períodos secos (Bustan et al., 2011). Por otro lado, la protección antioxidante explica en parte la tolerancia a la sequía severa de algunos genotipos de olivo (Baccari et al., 2020). Por último, esta especie cuenta con la abscisión foliar como estrategia para reducir la pérdida de agua por evapotranspiración ante un estrés hídrico severo, pero en exceso puede afectar negativamente al desarrollo del árbol y a la productividad, ocasionando daños irreversibles (Trabelsi et al., 2019). En esta tesis se estudió el proceso de abscisión foliar en olivos jóvenes de 1,5 años de la variedad Manzanilla.



Figura 5. *Olea europaea* L. cv. Manzanilla Cacereña en una finca agroecológica en Cáceres, Extremadura. A la izquierda, un ejemplar productivo de unos 60 años. A la derecha, detalle de la disposición foliar y de los frutos, las olivas. Fotografías cedidas por Beatriz Redondo.

OBJETIVOS



OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis doctoral fue estudiar los mecanismos fisiológicos en respuestas de aclimatación a la sequía en especies tolerantes al estrés sometidas a diversos grados de severidad, incluyendo respuestas de senescencia y abscisión foliar inducidas por estrés.

Para llevar a cabo el objetivo general de esta tesis, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- (i) Estudiar si los jasmonatos están implicados junto con el ácido abscísico y la vitamina E en el proceso de aclimatación a la sequía en la especie *Sempervivum tectorum* L.
- (ii) Determinar los mecanismos morfológicos y fisiológicos que permiten la tolerancia a una sequía prolongada y posterior recuperación en *S. tectorum*.
- (iii) Evaluar la implicación de la respuesta hormonal en la aclimatación a un evento de sequía extremo en la especie clonal *S. tectorum* en su hábitat natural.
- (iv) Estudiar el impacto de un evento de sequía extremo en la reproducción clonal y la capacidad de aclimatación de *S. tectorum* en su hábitat natural.
- (v) Evaluar mecanismos de aclimatación a la sequía durante la reproducción clonal, analizando la respuesta fisiológica en la roseta parental y en los ramets enraizados y no enraizados en plantas de *S. tectorum*.
- (vi) Analizar respuestas diferenciales estacionales entre la roseta parental y los ramets enraizados y no enraizados en tres poblaciones naturales de *S. tectorum* en un gradiente altitudinal.
- (vii) Determinar el patrón de senescencia foliar de *S. tectorum* a lo largo de la roseta durante condiciones extremas de estrés severo.
- (viii) Elucidar si los jasmonatos y la vitamina E están implicados en la regulación de la abscisión foliar inducida por sequía en la especie *Olea europaea* L.

INFORME DEL DIRECTOR DE TESIS





Barcelona, 21 de octubre de 2024

El Dr. Sergi Munné Bosch, como director de la Tesis Doctoral titulada “Mecanismos de aclimatación a la sequía extrema en especies tolerantes al estrés” presentada por la doctoranda Sabina Villadangos Redondo,

INFORMA sobre el factor de impacto y la participación de la doctoranda en cada uno de los artículos incluidos en la memoria de esta Tesis Doctoral

Capítulo 1. Artículo “Acclimation to a combination of water deficit and nutrient deprivation through simultaneous increases in abscisic acid and bioactive jasmonates in the succulent plant *Sempervivum tectorum* L.”, publicado en la revista Journal of Plant Physiology, índice de impacto (2023) de 4.0. En este primer trabajo se describe la importancia de varios mecanismos fisiológicos que subyacen a la tolerancia al estrés de la siempreviva de los tejados (*Sempervivum tectorum* L.), una especie de gran interés ecofisiológico por su capacidad de sobrevivir en situaciones extremas. Este es el primer estudio en que se demuestra la importancia de la forma bioactiva de los jasmonatos (jasmonoil isoleucina) junto al ABA en la regulación de varios procesos de fotoprotección en esta especie. La doctoranda ha realizado todos los muestreos, el análisis de las muestras, el tratamiento estadístico y la elaboración de los resultados, y además ha participado en el diseño experimental y discusión de los resultados, constanding por tanto como primera autora del trabajo. La doctoranda ha demostrado una gran capacidad de trabajo, así como un excelente manejo de las principales medidas ecofisiológicas y una excelente predisposición en la introducción al uso del HPLC y del UHPLC-MS/MS para el análisis de vitamina E y hormonas vegetales, respectivamente. La doctoranda demuestra una gran capacidad de análisis e interpretación de los resultados, y empieza a mostrar también excelentes aptitudes para la escritura y comunicación en el ámbito científico.

Capítulo 2. Artículo “Impact of an extreme drought event on clonal reproduction and the acclimation capacity of the succulent plant *Sempervivum tectorum* L.”, aceptado para su publicación en la revista Basic and Applied Ecology, índice de impacto (2023) de 3.0. En este trabajo se evalúa el impacto de un evento

de sequía extremo en la reproducción clonal y los mecanismos hormonales subyacentes a la aclimatación de la siempreviva de los tejados. Este es el primer estudio en que se demuestra que la reproducción clonal puede verse afectada por la sequía estival en esta especie de plantas de gran interés ecológico. Además, el estudio utiliza medidas de varios marcadores de estrés en condiciones de campo junto con el perfil hormonal mediante un enfoque metabolómico utilizando LC-MS/MS lo que permite vislumbrar la importancia de varias hormonas como el ABA, la jasmonoil isoleucina y las citoquinas en la respuesta de esta especie a la sequía extrema en condiciones naturales. La doctoranda ha realizado todo el muestreo en condiciones de campo, el análisis posterior de las muestras, el tratamiento estadístico y la elaboración de los resultados, y además ha participado en el diseño experimental y discusión de los resultados, constanding por tanto como primera autora del trabajo. Asimismo, ha contribuido de forma sustancial en la redacción del artículo. La doctoranda ha demostrado de nuevo un gran conocimiento del tema e interés en realizar nuevas aproximaciones que se distancian de lo que el grupo había hecho hasta el momento pero que son de gran valor para el trabajo del grupo. La doctoranda ha demostrado iniciativa, gran capacidad de resolver problemas y un excelente manejo del tratamiento, elaboración y discusión de los resultados, mostrando ya un excelente grado de madurez científica a aproximadamente la mitad del periodo de realización de la tesis doctoral.

Capítulo 3. Artículo “Extreme stress tolerance during clonal reproduction in a monocarpic plant *Sempervivum tectorum*”, enviado para su publicación a la revista *Plant Physiology*, índice de impacto (2023) de 6.5. Como continuación del capítulo anterior, en este trabajo se evalúa, aquí de forma mucho más completa y extensa, el efecto de la sequía en varias poblaciones de siempreviva de los tejados. Se demuestran los mecanismos subyacentes a la capacidad de esta especie de mantener bajos niveles oxidativos en las hojas ante un estrés severo incluso con una disponibilidad de recursos muy baja, manteniendo vivos los hijos unidos durante el tiempo necesario hasta el enraizamiento en el suelo (a veces durante varios meses), sin comprometer la roseta parental. La doctoranda ha realizado todos los muestreos, ha participado en el análisis de las muestras, y se ha encargado principalmente de realizar todo el tratamiento estadístico y la elaboración de los resultados, además de participar activamente en el diseño experimental y la discusión de los resultados, constanding por tanto como primera autora del trabajo. Asimismo, ha contribuido de forma muy sustancial en la elaboración del manuscrito mostrando grandes capacidades de liderazgo lo que le ha permitido ser la autora de correspondencia del trabajo, confirmando su excelente madurez como investigadora.

Capítulo 4. Artículo “Photo-oxidative stress leading to oxylipin accumulation may trigger drought-induced leaf abscission in olive trees”, publicado en la revista *Physiologia Plantarum*, índice de impacto (2023) de 5.4. En este trabajo se estudia el proceso de abscisión foliar inducido por sequía realizando una aproximación espaciotemporal del proceso a nivel de la zona de abscisión y utilizando herramientas tanto ecofisiológicas como bioquímicas para la determinación de reguladores del proceso. Este es el primer estudio en que se demuestra que los procesos de fotooxidación pueden influir en la abscisión foliar en olivo mostrando que las oxilipinas que regulan la abscisión foliar, como los jasmonatos, están siendo modulados por el grado de fotoprotección y procesos de fotooxidación que ocurren en la hoja. Este trabajo complementa perfectamente los conocimientos establecidos en el capítulo anterior sobre los mecanismos de tolerancia a la sequía pero añade un nivel mayor de complejidad al estudiar procesos a un nivel de concreción espaciotemporal muy elevado, además de tratarse de un modelo de estudio completamente diferente pero complementario, en este caso de gran interés agronómico, lo que conlleva importantes implicaciones aplicadas para este estudio. La doctoranda ha realizado todo el muestreo, el análisis de las muestras, el tratamiento estadístico y la elaboración de los resultados, y además ha participado en el diseño experimental y discusión de los resultados, constando por tanto como primera autora del trabajo. Asimismo, ha contribuido de forma sustancial en la redacción del artículo. La doctoranda ha demostrado un gran conocimiento del tema e interés en realizar nuevas aproximaciones que se distancian de lo que el grupo había hecho hasta el momento pero que son de gran valor para el trabajo del grupo. La doctoranda ha demostrado iniciativa, gran capacidad de resolver problemas y un excelente manejo del tratamiento, elaboración y discusión de los resultados, mostrando un extraordinario grado de madurez científica.

Y, para que así conste a los efectos oportunos,

SERGI MUNNE BOSCH - DNI 38092418W
Firmado digitalmente por
SERGI MUNNE BOSCH -
DNI 38092418W
Fecha: 2024.12.06 10:05:12
+01'00'

Dr. Sergi Munné-Bosch

RESULTADOS



CAPÍTULO 1

Aclimatación a una combinación de déficit hídrico y de nutrientes mediante aumentos simultáneos de ácido abscísico y jasmonatos bioactivos en la planta suculenta *Sempervivum tectorum* L.



Chapter 1. Acclimation to a combination of water deficit and nutrient deprivation through simultaneous increases in abscisic acid and bioactive jasmonates in the succulent plant *Sempervivum tectorum* L.

Sabina Villadangos^{1,2}, Sergi Munné-Bosch^{1,2}

¹Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

²Institute of Research in Biodiversity (IRBio), Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Publicado en **Journal of Plant Physiology** (2023) 287:154040.

RESUMEN

La activación de respuestas hormonales define la capacidad de aclimatación a la sequía de las plantas y puede condicionar su supervivencia. Sin embargo, aparte del ácido abscísico (ABA), poco se conoce sobre la posible contribución de otras fitohormonas, como los jasmonatos y los salicilatos, en la respuesta de plantas CAM al déficit hídrico. Aquí, nos propusimos estudiar los mecanismos fisiológicos que subyacen a la tolerancia al estrés de la siempreviva de los tejados (*Sempervivum tectorum* L.), una planta CAM adaptada a sobrevivir en ambientes adversos, a una combinación de déficit hídrico y privación de nutrientes. Expusimos plantas a la combinación de estos dos estreses abióticos mediante la retirada de solución nutritiva durante 10 semanas y monitoreamos su respuesta fisiológica cada dos semanas midiendo varios marcadores de estrés junto con la acumulación de fitohormonas relacionadas con el estrés y moléculas fotoprotectoras, como los tocoferoles (vitamina E). Los resultados mostraron que el contenido de ABA se multiplicó por 4,2 tras cuatro semanas de déficit hídrico para mantenerse después constante hasta las 10 semanas de estrés, variaciones que se produjeron concomitantemente con reducciones en el contenido hídrico relativo de la hoja, que solo disminuyó un 20%. El jasmonato bioactivo, la jasmonoil-isoleucina, fue la otra fitohormona del estrés que aumentó simultáneamente bajo estrés junto con el ABA. Mientras que los contenidos de ácido salicílico y los precursores de la jasmonoil-isoleucina, el ácido 12-oxo-fitodienoico y el ácido jasmónico, disminuyeron con el déficit hídrico, los de jasmonoil-isoleucina aumentaron 3,6 veces a las cuatro semanas de estrés. Los contenidos de ABA y jasmonoil-isoleucina correlacionaron positivamente entre sí y con el contenido de α -tocoferol por unidad de clorofila, sugiriendo así un rol de activación fotoprotectora. Se concluye que *S. tectorum* no solo resiste a una combinación de déficit hídrico y privación de nutrientes durante 10 semanas sin ningún síntoma de daño, sino que también activa estrategias de defensa efectivas a través de la acumulación simultánea de ABA y de la forma bioactiva de jasmonatos, jasmonoil-isoleucina.



Acclimation to a combination of water deficit and nutrient deprivation through simultaneous increases in abscisic acid and bioactive jasmonates in the succulent plant *Sempervivum tectorum* L

Sabina Villadangos^{a,b}, Sergi Munné-Bosch^{a,b,*}

^a Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 643, 08028, Barcelona, Spain

^b Institute of Research in Biodiversity (IRBio), Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 643, 08028, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Absciscic acid
Jasmonates
Photoprotection
Sempervivum tectorum
Stress acclimation
Vitamin E

ABSTRACT

Activation of hormonal responses defines the drought acclimation ability of plants and may condition their survival. However, aside ABA, little is known about the possible contribution of other phytohormones, such as jasmonates and salicylates, in the response of CAM plants to water deficit. Here, we aimed to study the physiological mechanisms underlying the stress tolerance of house leek (*Sempervivum tectorum* L.), a CAM plant adapted to survive harsh environments, to a combination of water deficit and nutrient deprivation. We exposed plants to the combination of these two abiotic stresses by withholding nutrient solution for 10 weeks and monitored their physiological response every two weeks by measuring various stress makers together with the accumulation of stress-related phytohormones and photoprotective molecules, such as tocopherols (vitamin E). Results showed that ABA content increased by 4.2-fold after four weeks of water deficit to keep later constant up to 10 weeks of stress, variations that occurred concomitantly with reductions in the relative leaf water content, which decreased by up to 20% only. The bioactive jasmonate, jasmonoyl-isoleucine was the other stress-related phytohormone that simultaneously increased under stress together with ABA. While contents of salicylic acid and the jasmonoyl-isoleucine precursors, 12-oxo-phytodienoic acid and jasmonic acid decreased with water deficit, those of jasmonoyl-isoleucine increased 3.6-fold at four weeks of stress. The contents of ABA and jasmonoyl-isoleucine correlated positively between them and with the content of α -tocopherol per unit of chlorophyll, thus suggesting a photoprotective activation role. It is concluded that *S. tectorum* not only withstands a combination of water deficit and nutrient deprivation for 10 weeks without any symptom of damage but also activates effective defense strategies through the simultaneous accumulation of ABA and the bioactive jasmonate form, jasmonoyl-isoleucine.

1. Introduction

Stress-related phytohormones are low-molecular-weight compounds synthesized at very low amounts that activate a signaling response with a consequent physiological action and play an essential role in plant response to stress, which is an unfavorable environmental (abiotic) or biotic condition for growth. Among the various phytohormones described thus far, it is known that, aside from interacting with one another, some of them are especially important to activate defense responses. ABA is one of the best-known phytohormones in this regard since it has been shown to be very effective in modulating key aspects of

plant responses to water deficit such as transpiration efficiency, hydraulic conductivity and leaf growth (Thompson et al., 2007; Davies, 2010). Other stress-related phytohormones, such as salicylates and jasmonates, have also been shown to be very effective in the activation of defense strategies to prevent or withstand stress. Better known for their role in acclimation to biotic stresses, the role of salicylates and jasmonates in abiotic stress responses, such as to water deficit, is more slowly but also progressively being revealed, particularly with the progress made during the last two decades (Davies, 2010; Kazan, 2015; Khan et al., 2015; Ilyas et al., 2021).

Together with ABA, jasmonates have been implicated in promoting stomatal closure (Suhita et al., 2004; Munemasa et al., 2007).

* Corresponding author. Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Biology, University of Barcelona, Avinguda Diagonal 643, 08028, Barcelona, Spain.

E-mail address: smunne@ub.edu (S. Munné-Bosch).

<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2023.154040>

Received 28 April 2023; Received in revised form 12 June 2023; Accepted 12 June 2023

Available online 18 June 2023

0176-1617/© 2023 The Authors. Published by Elsevier GmbH. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abbreviations

ABA	Absciscic acid
CAM	Crassulacean acid metabolism
Chl	Chlorophyll
JA	Jasmonic acid
JA-Ile	Jasmonoyl-isoleucine
MDA	Malondialdehyde
OPDA	12-oxo-phytodienoic acid
SA	Salicylic acid

Jasmonates have also been shown to be involved in the modulation of root hydraulic conductivity which can contribute to water uptake from soil under water deficit (Sánchez-Romera et al., 2014). Moreover, jasmonates have also been proposed to activate vitamin E biosynthesis in plants (Sandorf and Holländer-Czytko, 2002; Siles et al., 2018; Casadesús et al., 2021), as it occurs with ABA (El Kayal et al., 2006; Chaudhary and Khurana, 2009; Muñoz and Munné-Bosch, 2019). However, whether the jasmonates role in these processes is exerted through ABA-dependent or independent pathways, and specifically which jasmonate forms (either 12-oxo-phytodienoid acid [OPDA], jasmonic acid [JA] or its conjugated form, jasmonoyl-isoleucine [JA-Ile]) are the bioactive ones regulating these processes, appear to be less clear and results seem to be influenced by the study model and the experimental approach used (Savchenko et al., 2014; Hewedy et al., 2023).

Crassulacean acid metabolism (CAM) is one of the most important adaptive mechanisms allowing succulent plants to survive in drought-prone environments. Previous studies have shown that ABA can induce CAM metabolism and modulate stomatal closure in several constitutive or facultative species (Taybi et al., 2002; Fleta-Soriano et al., 2015; Cela et al., 2009; Wakamatsu et al., 2021), as well as induce chloroplast clumping (Kondo et al., 2004) and modulate vitamin E accumulation (Fleta-Soriano et al., 2015; Cela et al., 2009), thus playing a role in photoprotection. Unfortunately, however, extraordinarily little is still known about the role of other stress-related phytohormones, such as salicylates and jasmonates in the adaptive responses to water deficit in this interesting group of species. The contents of JA and JA-Ile decreased during the salt-induced transition from C3 to CAM metabolism in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*, specifically at night, when stomatal closure occurs, thus suggesting stomatal closure is modulated by ABA independently of jasmonates (Wakamatsu et al., 2021). Furthermore, ABA, but not salicylic acid (SA) or JA contents correlated with γ -tocopherol accumulation in water-stressed *Aptenia cordifolia* (Fleta-Soriano et al., 2015; Cela et al., 2009). However, in these latter studies neither OPDA nor JA-Ile, which are generally considered to be bioactive jasmonate forms for several physiological processes (Fonseca et al., 2009; Bosch et al., 2014; De Ollas et al., 2018), were measured, thus potentially masking a jasmonate-mediated effect. Aside from these previous observations, to our knowledge no additional studies have been performed in CAM plants to elucidate the role of stress-related phytohormones other than ABA in their acclimation to water deficit. Furthermore, in drought-prone environments CAM plants usually survive under a combination of water deficit and nutrient deprivation, since drought stress events usually bring together periods of nutrient starvation due to the poor soils where these plants are usually growing (Forseth, 2010; Yu et al., 2017).

Sempervivum tectorum L. (Crassulaceae) is a monocarpic oreophyte CAM plant native from the European high mountains located in the Alps, Pyrenees, and Balkans (Praeger, 1932; Klein and Kaderit, 2015). Besides, it is also widespread through Mediterranean rocky locations where it is naturally distributed (Smith, 1981) and it is also cultivated outside its original range (Parnell and Favarger, 1993). This species can grow well under extreme conditions in its natural habitat surviving up to

seven months of snow in winters (Larcher and Wagner, 1983), having its main growing period in spring (May–June) and flowering during summer (July–September). Several studies have previously shown the extreme tolerance of *Sempervivum* species to harsh environments such as sudden frost or heat (Larcher et al., 2010; Zaharia et al., 2010). Unlike its congener *S. montanum*, which is located at the highest altitudes, *S. tectorum* is generally found in south-facing slopes of mountains at lowest altitudes which makes the plant to be particularly exposed to periodic drought events (Larcher et al., 1989). To our knowledge, there is only a previous study showing the physiological response to water stress of this plant species (Glušac et al., 2013), however, the hormonal response was not examined. Furthermore, no studies have examined thus far their response to a combination of water deficit and nutrient deprivation. Here, we aimed to study the physiological mechanisms underlying stress tolerance in *S. tectorum* L., a CAM plant adapted to survive harsh environments, with an emphasis on evaluating the time-course evolution of the contents in endogenous stress-related phytohormones to a combination of water deficit and nutrient deprivation. We hypothesized that not only ABA but also JA-Ile may be involved in the plant stress response in *S. tectorum*, both simultaneously increasing with vitamin E accumulation in leaves.

2. Materials and methods

2.1. Plant material, growth conditions, treatments, and samplings

House leek (*Sempervivum tectorum* L.) individuals, which were grown in 0.3 L-pots of peat:perlite:vermiculite (2:1:1, by volume), were purchased in a local garden (Jardiland S.A., Sant Cugat del Vallès, Spain) and immediately transferred to a greenhouse situated at the Faculty of Biology of the University of Barcelona (Barcelona, NE Spain), where they grew for four additional weeks before experiments started on November 18, 2021. Plants used for the study were selected considering the lack of visual pathogens, the diameter of the rosette and the number of offspring clones, so that all plants were healthy, and their size was very similar (for an example of plant phenotype at the start of experiment, see Fig. 1). Potted plants growing in the greenhouse were exposed to direct natural sunlight but a constant 16h photoperiod throughout the study, which was achieved by using high pressure sodium lamps supplying an additional photosynthetically active photon flux density (PPFD) of $\sim 50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Plants were watered twice a week with half-diluted Hoagland nutrient solution prior to the start of the experimental period.

Two water regimes were imposed on plants at the start of the experiment: well-irrigated control plants, which were kept watered with the same nutrient solution twice a week, and stressed plants, for which irrigation with nutrient solution was withheld during the whole experiment. Samplings were performed at the beginning of the experiment (time 0) and after 2, 4, 6, 8 and 10 weeks of treatments. All samplings were performed at maximum diurnal PPFD at midday (between 11 and 13h solar time). At each sampling point, fully-expanded leaves from the mid part of the mother rosette were used for measurements and immediately frozen in liquid nitrogen to store them later at -80°C for posterior biochemical analyses. Daily maximum air temperature and relative humidity ranged between 19 and 35°C and 28–89%, respectively, during the study; and the maximum daily PPFD received by plants was $\sim 950 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Therefore, although for simplicity, we will refer here to stressed plants, plants from this treatment were exposed to a combination of water deficit and nutrient deprivation, all in an environmental context characterized by a long photoperiod, and occasional periods of combined abiotic stress due to high temperatures occurring simultaneously with low relative humidity in the air at midday. As all samplings were performed at midday on sunny, clear days, the monitoring of parameters related to the combination of water deficit and nutrient deprivation really reflects a situation of severe abiotic stress that occurs in combination with other environmental

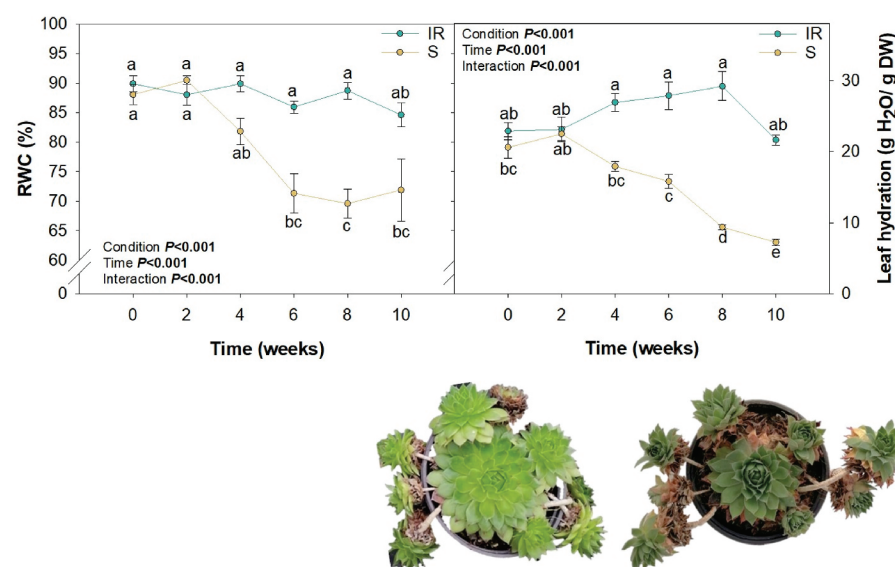


Fig. 1. Leaf water status, estimated as the relative leaf water content (RWC) and leaf hydration (H) of *Sempervivum tectorum* of both irrigated and non-irrigated groups through the stress acclimation process over 10 weeks. *P* values of two-way ANOVAs are shown. Different letters indicate significant differences between treatment conditions and time. Data are mean of $n = 8$ plants for the irrigated (IR) group and $n = 9$ plants for the stressed (S) group. As a representative individual from the latter group, the same plant is shown at week 0 (left) and week 10 (right) from the onset of nutrient solution withdrawal.

stresses at midday.

2.2. Chlorophyll fluorescence, leaf water status and leaf mass

The maximum quantum efficiency of PSII photochemistry (F_v/F_m) was used as a photoinhibition indicator (*sensu* Takahashi and Badger, 2011) and was measured in dark-adapted leaves (at least for 1h) by chlorophyll (Chl) fluorescence using the Mini-PAM II portable fluorimeter Photosynthesis Yield Analyzer (Walz, Germany). The same leaves were then used to estimate the relative leaf water content (RWC) and leaf hydration (H). For that purpose, fresh leaves were weighed to estimate the fresh matter (FW), then immersed in distilled water at 4 °C for 24h to obtain the turgid matter (TW) and oven-dried at 65 °C until constant weight to estimate the dry matter (DW). RWC was calculated as follows: $100 \times (FW-DW)/(TW-DW)$; whereas H was calculated as $(FW-DW)/DW$. Furthermore, leaf mass was measured by weighing fresh and dried leaves (oven-dried to constant weight as described before) and expressed per g of FW or DW.

2.3. Chlorophyll content

To determine Chl content in leaves, 100 mg of fresh material was ground in liquid nitrogen and extracted in 1.2 mL of cold methanol containing 0.01% of butylated hydroxytoluene. Supernatants were pooled after a three-step extraction, each step consisting of 30 min of cold ultrasonication (Branson 2510 ultrasonic cleaner, Branson, Danbury, CT, USA), vortexing and centrifugation at 15,980g for 10 min at 4 °C (PrismR, Labnet International Inc.). Then, 200 μ L of extracts were diluted 1/4 (v/v) with cold methanol and absorbances were read by UV/Visible spectrophotometry at 470, 653, 666 and 750 nm (CE7400 Aquarius, Cecil Instruments Ltd, Cambridge, UK). Chl *a* and Chl *b* contents were calculated as described by Lichtenthaler and Wellburn (1983).

2.4. Lipid peroxidation analyses

To determine the extent of lipid peroxidation, malondialdehyde (MDA) content was determined spectrophotometrically by using the thiobarbituric acid-reactive-substances assay as described in Hodges et al. (1999). In brief, 100 mg of fresh leaves were ground in liquid nitrogen and extracted with 1 mL of 80% (v/v) cold ethanol with 0.01% (w/v) BHT. A three-step extraction was performed, each step consisting in 30 min of cold ultrasonication, vortexing the extract before, during

and after sonication, followed by a 10 min centrifugation at 9402g at room temperature. The final extract volume was 3 mL. Then, 1.5 mL of supernatants were pipetted to an eppendorf with 5% (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVPP), a reagent to reduce cross-reactivity of phenolic compounds that could interfere in the assay. *S. tectorum* is known to have high phenolic content in leaves (Abram and Donko, 1999), being the reason why PVPP was needed in the protocol. After vortexing and a 10 min centrifugation, 0.75 mL of supernatant + PVPP were incubated with -TBA solution and another 0.75 mL were incubated with +TBA solution in glass tubes during 25 min at 95 °C. Then, the reaction was stopped by placing the tubes at 4 °C for 10 min and were centrifuged for 5 min at 9402 g at room temperature. Finally, 200 μ L of each sample were pipetted per triplicate in a 96-well plate and absorbances were read spectrophotometrically at 440, 532, 600 and 800 nm, after which MDA concentrations were quantified following the equations described by Hodges et al. (1999).

2.5. Tocopherols analyses

Quantification of tocopherols (vitamin E) was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) as described by Amaral et al. (2005). From the previous methanolic extracts detailed above (section 2.3.), 250 μ L were transferred into vials by passing through hydrophobic 0.45 μ m PTFE filters (Phenomenex, Torrance, CA, USA) and injected in the HPLC system. The HPLC system consisted of a Waters 600 controller pump, a Waters 717 plus auto-sampler and a Jasco FP-1520 fluorescence detector). Tocopherols were separated by using a mobile phase of *n*-hexane and 1,4-dioxane (95.5:4.5, v/v) at a flow rate of 0.7 mL/min using an Inertsil 100A, 5 μ m, 250 $\times$ 3.0 mm column (GL Sciences, Torrance, CA, USA). Fluorescence was measured with an excitation at 295 nm and emission at 330 nm. A calibration curve with standards of α -tocopherol and γ -tocopherol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) was established for correct quantification.

2.6. Stress-related phytohormones analyses

Endogenous contents of stress-related phytohormones, including ABA, the jasmonates OPDA, JA and JA-Ile, and SA were determined by using ultrahigh-performance liquid chromatography (UHPLC) coupled to tandem mass spectrometry (MS/MS) as previously described by Morales et al. (2015). Briefly, 200 μ L of methanolic extracts containing deuterium-labeled internal standards were passed onto 0.22 μ m PTFE filters (Phenomenex, Torrance, CA, USA) in vials and were injected into

the UHPLC-MS/MS system, consisting in an HPLC coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (QTRAP 4000, AB Sciex, Concord, Ontario, Canada). Hormones were quantified in the negative ion mode, considering the recovery rates of each sample with the deuterium-labeled internal standards and generating calibration curves for each analyte by using the MultiQuant TM 3.0.1 software.

2.7. Statistical analysis

To determine the effect of “condition” and “time”, mean values were tested by two-way analyses of variance (ANOVA). Condition refers here to treatment effects (comparison of stressed plants with irrigated plants). Multiple comparisons were tested with Tukey’s post hoc test. All statistical differences were considered significant when $P \leq 0.05$. Both data normality (Shapiro-Wilk test) and homocedasticity of residuals (Levene’s test) were previously checked as described by Zuur et al. (2009). Whenever necessary, data was transformed logarithmically to achieve normality and homocedasticity requirements to perform ANOVAs. A Pearson’s correlation was performed for all parameters using a total of 102 observations. All statistical tests were performed with RStudio (RStudio Team, 2021).

2.8. Analysis of responsive elements of tocopherol biosynthetic genes

Analysis of ABA and jasmonates responsive elements (ABREs and JREs, respectively) in promoter regions of genes involved in tocopherol biosynthesis in the CAM species *Kalanchoë fedtschenkoi*, which was the species most closely related to *S. tectorum* for which genetic sequence data was publicly available (both from family *Crassulaceae*), was performed. DNA sequences were obtained from Phytozome database (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>), where we identified the coding sequence (CDS), the 5′ untranslated region (5′UTR), including the promoter region, and the 3′ untranslated region (3′UTR, Suppl. Figs. 1–4).

3. Results

3.1. Time-course evolution of leaf water content and visual phenotype

The stress treatment imposed on *S. tectorum* plants affected their leaf water status over the weeks, with the relative water content decreasing up to 20% and the leaf hydration values decreasing from 20 to 7 g H₂O/g dry matter, which was a 65% reduction from the initial levels in the stressed group (Fig. 1). A differential dynamic in the reductions of these two parameters (RWC and H) was observed. While RWC decreased clearly from week 4 to kept constant later from week 6–10 in stressed plants, H started to differentiate between non-irrigated and irrigated plants at week 6 and then decreased progressively up to the end of the experiment, so that minimum levels were attained after 10 weeks of

stress. An analysis of the visual phenotype of plants revealed that the rosette structure of the stressed plants remained intact during the experiment, although the leaves were smaller, and the outermost leaves were drying out at week 10 (Fig. 1). However, apart from this dehydration in the outer part of the rosette, which was also reflected in the monitored mid part of the rosette with the leaf fresh mass, no reductions in leaf dry mass occurred in the sampled leaves (Fig. 2).

3.2. Time-course evolution of stress-related phytohormones contents

Endogenous foliar ABA content showed a 4.2-fold increase at four weeks of stress. This sharp increase occurred specifically from two to four weeks of starting the combination of water deficit and nutrient deprivation stresses and then the levels remained constant at around 600 ng/g DW up to ten weeks of stress (Fig. 3). In contrast, foliar ABA content in irrigated plants remained constant throughout the experiment, always at values below 170 ng/g DW. Compared to ABA content, SA content in these irrigated plants was at least one order of magnitude higher ranging between 2200 and 3400 ng/g DW throughout the study. Foliar SA content decreased in stressed plants, particularly from week 6–8, reaching minimum levels below 900 ng/g DW at the end of the experiment, which represents a 60% reduction relative to controls at the end of the experiment (Fig. 3).

Moreover, the combination of water deficit with nutrient deprivation altered jasmonates metabolism, particularly from week 4 and onwards (Fig. 4). The JA precursor, OPDA decreased progressively with stress, but particularly from week 2 to week 4 of stress, during which period levels decreased from 120 to 49 ng/g DW. Later, levels decreased even further, attaining values of 15 ng/g DW at week 6 in stressed plants, remaining then that low but constant until week 10 (Fig. 4). Also, free JA showed a 66% reduction on its content after ten weeks, which dropped from 15 to 5 ng/g DW in the stressed plants, whereas JA values kept virtually constant at around 20 ng/g DW in irrigated plants (Fig. 4). Reductions in JA content were particularly evident at week 4 of stress, in which minimum values were already attained. In contrast, JA-Ile levels increased 3.6-fold after four weeks of stress, simultaneously to ABA increases and OPDA and JA reductions, to increase even further as the stress progressed, attaining maximum levels that were 5-fold higher compared to irrigated plants after ten weeks of treatments. JA-Ile ranged always at levels that were quantitatively much lower than those of JA, and the latter at lower values than those of OPDA (Fig. 4).

3.3. Linking phytohormones with photoinhibition and photoprotection

Chl loss was observed in stressed plants when compared to irrigated plants, as reflected by their total Chl content, which were 50% lower in stressed plants than in controls at week 10 (Fig. 5). This was accompanied by a reduction of 20% in the Chl *a/b* ratio at week 10 (Fig. 5).

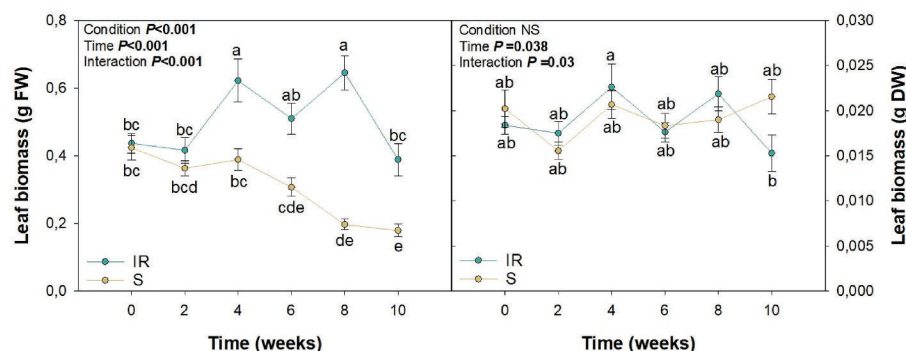


Fig. 2. Leaf mass estimation of *Sempervivum tectorum* plants during the stress acclimation process over 10 weeks. Leaf mass was expressed per gram of fresh matter (FW) and per gram of dry matter (DW). P values of two-way ANOVAs are shown (values above 0.05 were considered not significant [NS]). Different letters indicate significant differences between conditions and time. Data are the mean of $n = 8$ plants for the irrigated (IR) group and $n = 9$ plants for the stressed (S) group.

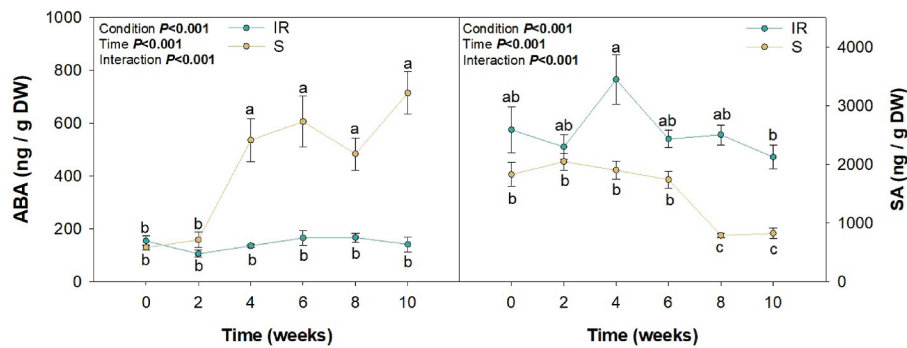


Fig. 3. Abscisic acid (ABA) and salicylic acid (SA) contents in *Sempervivum tectorum* leaves of both irrigated and non-irrigated groups through the stress acclimation process over 10 weeks. *P* values of two-way ANOVAs are shown. Different letters indicate significant differences between conditions and time. Data are the mean of *n* = 8 plants for the irrigated (IR) group and *n* = 9 plants for the stressed (S) group.

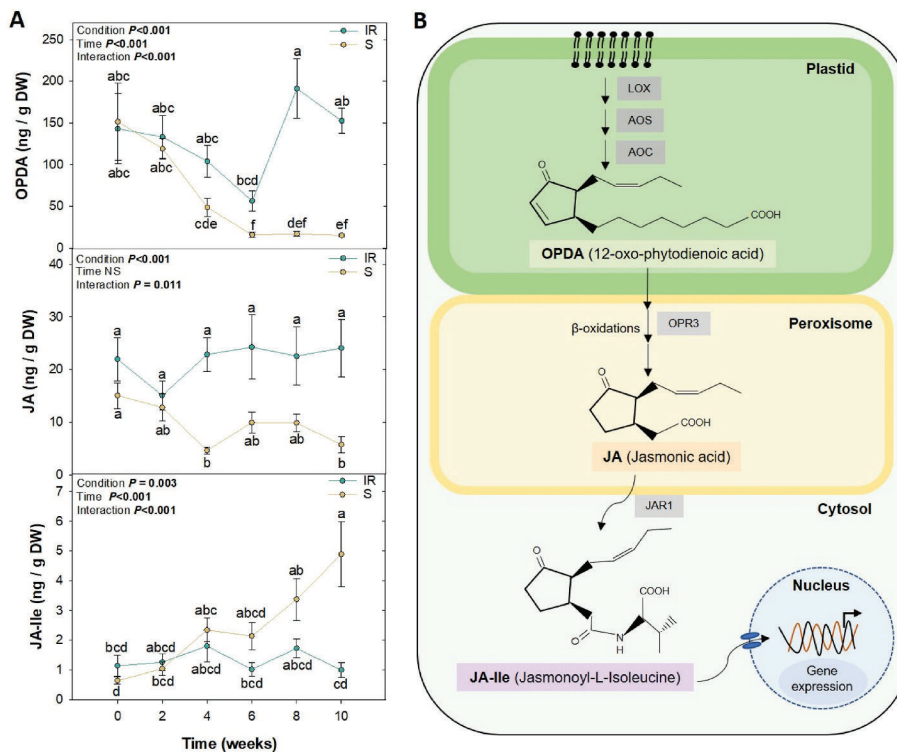


Fig. 4. Time-course evolution of jasmonate contents during the acclimation of *Sempervivum tectorum* to a combination of water deficit and nutrient deprivation. (A) Endogenous contents of the bioactive jasmonate, jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) and its precursors, 12-oxo-phytyldienoic acid (OPDA) and jasmonic acid (JA) in leaves of *S. tectorum* during the stress acclimation process. *P* values of two-way ANOVAs are shown (values above 0.05 were considered not significant [NS]). Different letters indicate significant differences between conditions and time. Data are the mean of *n* = 8 plants for the irrigated (IR) group and *n* = 9 plants for the stressed (S) group. (B) Diagram showing the jasmonates biosynthetic pathway. AOC: allene oxide cyclase; AOS: allene oxide synthase; JAR1: jasmonic acid reductase; LOX: lipoxygenase; OPR3: 12-oxo-phytyldienoic acid reductase.

However, stressed plants did not show any symptom of neither photo-inhibition nor photo-oxidative damage, as indicated by F_v/F_m values above 0.75 and constant MDA content throughout the experiment (Fig. 5). Although the effect of treatment was significant ($P = 0.038$) for MDA, its content ranged around 20 nmol/g DW throughout the experiment in both treatments and no significant differences were found at any specific time point of measurement between non-irrigated and irrigated plants.

Despite being the major vitamin E form in *S. tectorum*, α -tocopherol content did not vary significantly throughout the study between treatments with values ranging between 220 and 300 $\mu\text{g/g DW}$ (Fig. 6). In contrast, γ -tocopherol (the immediate precursor of α -tocopherol) was present at lower, although still quite remarkable amounts, with a content 65% lower to that observed for α -tocopherol. Notably, γ -tocopherol content decreased progressively in the stressed plants and it was significantly lower in the non-irrigated than in the irrigated group at week 8. No differences were observed in irrigated plants over time, but a significant reduction was found for the stressed plants at weeks 8 and 10

compared to the initial values (Fig. 6).

When expressed on a Chl basis, α -tocopherol content showed more remarkable significant differences between treatments, but those previously observed for γ -tocopherol almost disappeared (Fig. 6). Although treatment had a significant effect ($P = 0.021$) in the γ -tocopherol content expressed on a Chl basis, no significant effect of the interaction between condition and time was found and post hoc treatment analysis did not reveal any significant difference at specific time points between controls and stressed plants (Fig. 6). This indicates that Chl loss occurred quite in parallel with γ -tocopherol reduction when expressed on a dry matter basis (Figs. 5 and 6). A completely different result due to Chl loss was observed for α -tocopherol. An increase of 44% in α -tocopherol per unit of Chl was observed at four weeks of water deficit, being the levels significantly different from this week onwards relative to controls. Besides, α -tocopherol levels per unit of Chl in plants exposed to a combination of water deficit and nutrient deprivation attained maximum levels of 405 mmol/mol at week 10, values that were 2.3-fold higher than those of irrigated plants (Fig. 6). This time-course evolution

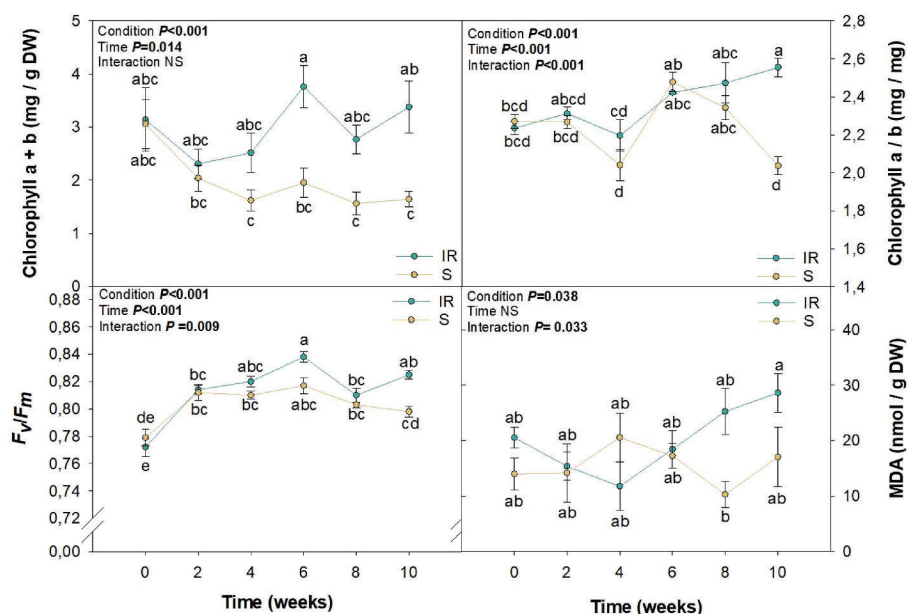


Fig. 5. Time-course evolution of total chlorophyll contents (chlorophyll *a*+*b*), chlorophyll *a*/*b*, the maximum efficiency of photosystem II (F_v/F_m) and the lipid peroxidation product, malondialdehyde (MDA) in *Sempervivum tectorum* leaves of both irrigated (IR) and stressed (S) plants over 10 weeks. *P* values of two-way ANOVAs are shown (values above 0.05 were considered not significant [NS]). Different letters indicate significant differences between conditions and time. Data are the mean of *n* = 8 plants for the IR group and *n* = 9 plants for the S group.

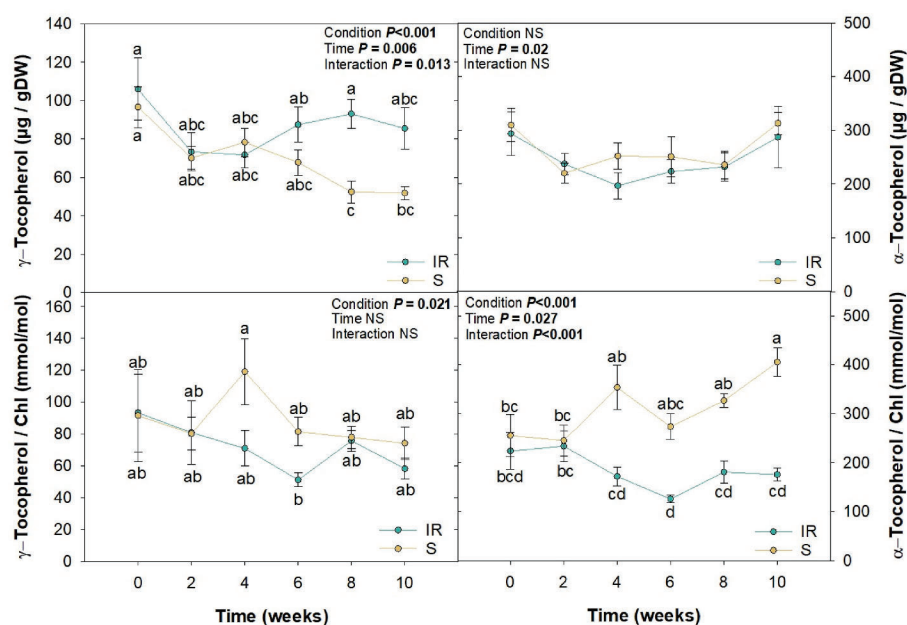


Fig. 6. Foliar vitamin E (including both α and γ -tocopherol) contents in *Sempervivum tectorum* leaves of both irrigated and non-irrigated groups through the stress acclimation process over 10 weeks. Data was expressed in both on a dry mass (DW) and on a chlorophyll *a*+*b* (Chl) basis. *P* values of two-way ANOVAs are shown (values above 0.05 were considered not significant [NS]). Different letters indicate significant differences between conditions and time. Data are the mean of *n* = 8 plants for the irrigated (IR) group and *n* = 9 plants for the stressed (S) group.

paralleled that of ABA (Fig. 2) and JA-Ile (Fig. 3), which was confirmed by correlative studies. Pearson correlation showed that among the stress-related phytohormones measured, the highest positive correlation for α -tocopherol levels per unit of Chl was observed with JA-Ile followed by ABA (Fig. 7). This ratio also highly negatively correlated, indeed even slightly better, with leaf hydration. A remarkable negative correlation for α -tocopherol levels per unit of Chl was also observed with leaf fresh mass, whereas the correlation was positive with γ -tocopherol levels per unit of Chl (Fig. 7). In contrast, remarkable correlations (with *r* and *P* values above 0.4 and below 0.001, respectively, *sensu* Zuur et al., 2009) were not observed for α -tocopherol content expressed per unit of dry mass with any other studied parameter, except with its precursor γ -tocopherol and with Chl content. However, a moderate correlation was also observed with ABA (*r* = 0.30, *P* < 0.01, Fig. 7). Analysis of ABA and jasmonates responsive elements in promoter regions of genes involved in tocopherol biosynthesis in the CAM species *Kalanchoë*

fedtschenkoi, which was the species most closely related to *S. tectorum* for which genetic sequence data was publicly available, revealed that both ABA and jasmonates-related cis-regulatory elements are present in genes encoding biosynthetic enzymes of tocopherol (Fig. 8). More specifically, we found JREs in the promoter of the gene encoding for *p*-hydroxyphenolpyruvate dioxygenase (HPPD), which is essential for providing homogentisate building blocks for the chromanol ring of all tocopherols, and ABREs in the promoter of the gene encoding for γ -tocopherol methyl transferase (VTE4), which catalyses the last step of α -tocopherol biosynthesis from γ -tocopherol (Fig. 8).

4. Discussion

An early plant response to drought events clearly defines the drought acclimation ability of a plant species and may condition its survival during later stages of stress. CAM plants have convergently evolved

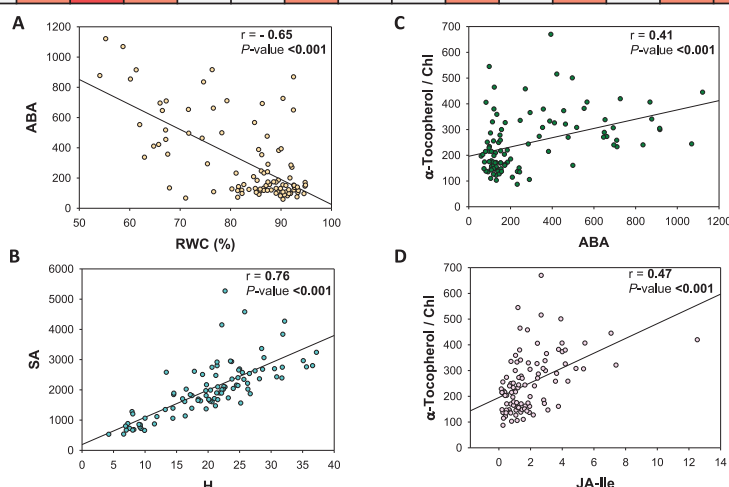
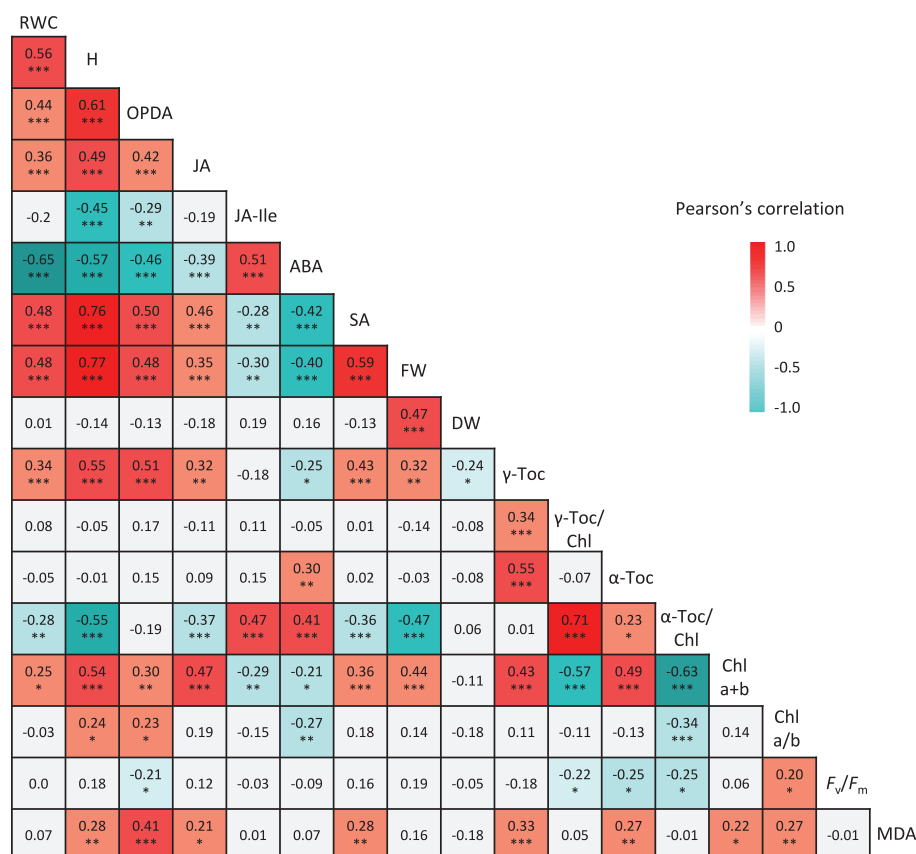


Fig. 7. Pearson correlation matrix showing r coefficient values between the different studied parameters. One, two and three asterisks indicate P values < 0.05 , < 0.01 and < 0.001 , respectively. The color gradient indicates ranges of correlation from red (positive) to blue (negative) and only significant correlations (p value < 0.05) are shown in color. Graphs below show the most biologically significant correlations including: (A) Negative correlation between abscisic acid (ABA) and relative water content (RWC), (B) Positive correlation between salicylic acid (SA) and leaf hydration (H), (C) Positive correlation between ABA and α -tocopherol per unit of chlorophyll (α -Toc/Chl), and (D) Positive correlation between jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) and the α -Toc/Chl ratio with a total of $N = 102$ observations. Chl, total chlorophyll; DW, dry matter; Fv/Fm, maximum photochemical efficiency of photosystem II; FW, fresh weight; JA, Jasmonic acid; MDA, malondialdehyde; OPDA, 12-oxo-phytodienoic acid; γ -Toc, γ -Tocopherol. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

many times among distant lineages, through generations of acclimation to drought stress in their arid natural habitats, which may face water deficit with combined nutrient deprivation in poor nutrient soils and has resulted in genetic changes that have provided their current metabolic adaptation to several abiotic stress (Heyduk et al., 2019). Thus, it is known that CAM plants can quickly respond to water deficit and withstand long dry spells, but their drought response acclimation mechanisms are still being disentangled, particularly when water deficit occurs in combination with nutrient deficiency. Here, we showed that the contents of endogenous stress-related phytohormones follow a very specific time-course evolution in *S. tectorum*, with simultaneous increases in ABA and JA-Ile at four weeks of combined water deficit and nutrient deprivation stress, in which the content of OPDA and JA decrease while those of JA-Ile increase, thus suggesting a specific activation of JASMONATE RESISTANT 1 (JAR1), the enzyme responsible

for conversion from JA to JA-Ile, under stress. These findings support our initial hypothesis that not only ABA but also JA-Ile may be involved in the plant response to a combination of water deficit and nutrient deprivation in *S. tectorum*. However, our hypothesis that ABA and JA-Ile simultaneously increase with vitamin E accumulation in leaves resulted to be untrue, at least in part. ABA, but not jasmonates (including JA-Ile), positively correlated with α -tocopherol, but intriguingly both ABA and JA-Ile contents correlated with the accumulation of α -tocopherol per unit of Chl, although not with the content of γ -tocopherol per unit of Chl.

The water stress response was characterized by an increase in ABA concentrations at four weeks of stress to keep later constant at high levels throughout the experiment. Although ABA is the phytohormone promoting stomatal closure in plants (Suhita et al., 2004), measurements were always performed at midday on clear sunny days in which CAM plants show severe stomatal closure, so this peak seemed more

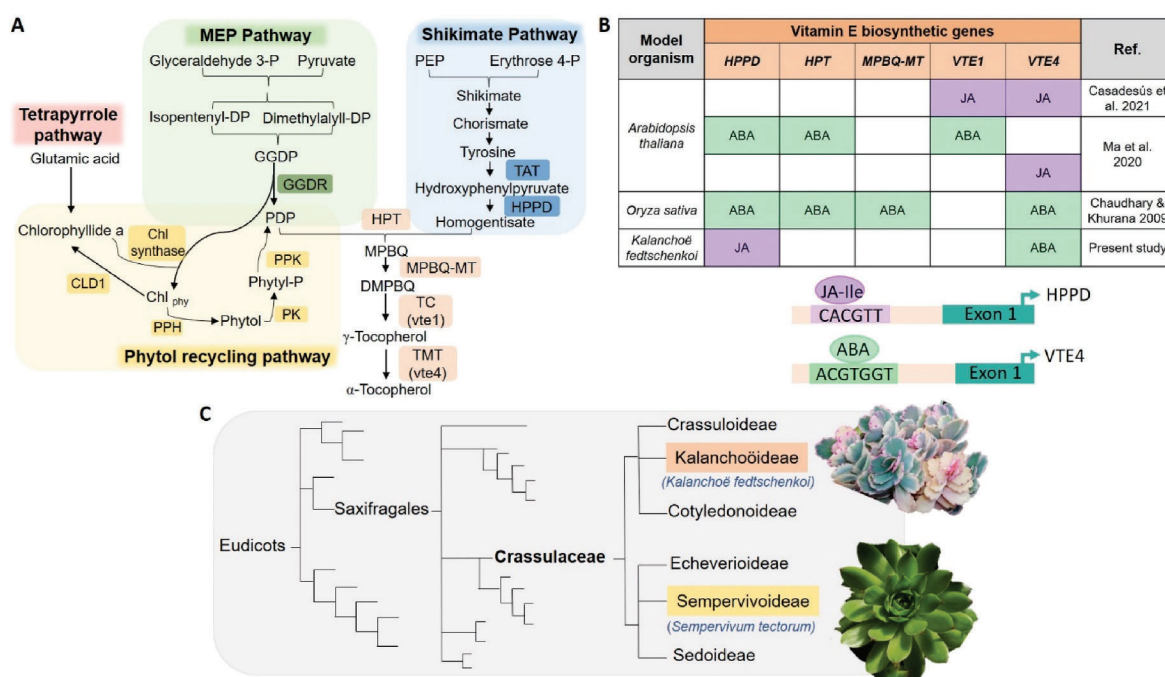


Fig. 8. Tocopherol biosynthesis regulation in a CAM plant. (A) Scheme of tocopherol biosynthetic pathway in plants. (B) Table showing the vitamin E biosynthetic genes in which regulatory sequences responsive elements to abscisic acid (ABA) and/or jasmonates (JA) have been found in either the model organism *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* or the CAM species *Kalanchoë fedtschenkoi*. Sequences with JRE or ABRE in promoters of the *HPPD* and *VTE4* genes found in the CAM plant *K. fedtschenkoi* are shown below (see also Suppl. File 1). (C) Evolutionary classification of *Crassulaceae* family, in which the *Sempervivoideae* and *Kalanchoideae* subfamilies are found, to which *Sempervivum tectorum* and *Kalanchoë fedtschenkoi* belong, respectively. CLD1 chlorophyll dephytylase, DMPBQ dimethylphytylbenzoquinol, GGDP geranylgeranyl diphosphate, GGDR geranylgeranyl diphosphate reductase, HPPD hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, HPT homogentisate phytol transferase, MEP methylerythritol phosphate, MPBQ methylphytylbenzoquinol, MPBQ-MT methylphytylbenzoquinol methyltransferase, PEP phosphoenolpyruvate, PDP phytol diphosphate, PK phytol kinase, PPH pheophytin pheophorbide hydrolase, PPK phytol phosphate kinase, TAT tyrosine aminotransferase, TC tocopherol cyclase, TMT tocopherol methyltransferase.

related to preserve plant water status during these first weeks of stress by modulating other physiological processes related to water relations. Previous evidence shows that ABA is involved in the activation of non-stomatal, morphological and biochemical mechanisms modulating water-use efficiency, such as changes in leaf size, osmotic adjustment, and even root development, thus favouring acclimation to nutrient poor soils (Negin and Moshelion, 2016). Intriguingly, among the various parameters studied, ABA content not only strongly negatively correlated with the relative water content and leaf hydration, but also with OPDA and α contents and with leaf fresh mass, and it positively correlated with α-tocopherol per unit of Chl. In turn, SA content strongly positively correlated with leaf hydration, relative water content and contents of both OPDA and JA; and while relative water content did not decrease further after four week of stress, leaf hydration continued slightly decreasing throughout the experiment. These results suggest that ABA may antagonistically modulate together with SA some aspects related to water deficit-induced morphological changes. Most notably, visual symptoms of combined water deficit and nutrient deprivation stress and the reductions in leaf hydration suggest that leaves were simply smaller and showed desiccation at 10 weeks of stress. The fact that relative leaf water content and leaf dry mass kept constant from week 6–10 onwards suggests that these smaller leaves (very likely with thicker cell walls and smaller vacuoles) are tolerant to desiccation. Indeed, this is consistent with previous studies evaluating the tolerance of this plant species to high temperatures, showing a tremendous degree of tolerance (Larcher and Wagner, 1983; Larcher et al., 1989, 2010).

Biosynthesis of the bioactive jasmonate form, JA-Ile, increased in the stressed plants at week 4, with values reaching their maximum levels at week 10. Despite its strong association with the biotic stress response (Heyer et al., 2018), the role of jasmonates in abiotic stress tolerance, including drought stress, has also been previously described

(Sánchez-Romera et al., 2014; Cotado et al., 2018), although not in CAM plants. Here, we showed for the first time a JA-Ile accumulation in a CAM plant facing a combination of water deficit and nutrient deprivation, while OPDA and JA decreased, suggesting that JA-Ile is the bioactive molecule of the jasmonate signaling pathway involved in the response in *S. tectorum* to this stress combination, which has been previously described for other species (more specifically in the model plant *A. thaliana*) in the case of water deficit stress or nutrient deprivation (such as P starvation) applied alone, but neither with both stresses combined nor in CAM plants (Fonseca et al., 2009; Wasternack and Hause, 2013; Khan et al., 2015). Regulation of vitamin E synthesis by ABA and jasmonates has been proposed in several studies for other species (Sandorf and Holländer-Czytko, 2002; El Kayal et al., 2006; Siles et al., 2018), and interestingly both ABA and JA-Ile contents correlated with the accumulation of α-tocopherol per unit of Chl in *S. tectorum*, although not with the content of γ-tocopherol per unit of Chl. Several genes from the vitamin E biosynthetic pathway have been examined in their promoter regions to detect responsive elements to specific hormones, but mostly in model organisms (Fig. 8A). For instance, ABREs were found in *HPPD*, *MPBQ-MT* and *TMT* (*VTE4*) genes in the C3 plant *Oryza sativa*, and a motif IIb was also found in *OsHPT* (Chaudhary and Khurana, 2009), suggesting a specific regulation of vitamin E by ABA. Likewise, jasmonates responsive elements were found in *VTE1* and *VTE4* in *Arabidopsis thaliana*, encoding genes for the tocopherol cyclase and tocopherol methyl transferase, respectively (Ma et al., 2020; Casadesús et al., 2021). Although much less research about responsive elements of vitamin E-related biosynthesis genes has been performed in non-model organisms, such as CAM species, advances on the sequencing of whole genomes of CAM plants have recently been made, including both monocots, with the orchid *Phalaenopsis equestris* (Cai et al., 2015) and the pineapple *Ananas cosmosus* (Ming et al., 2015), and one eudicot of

the *Crassulaceae* family, *Kalanchoë fedtschenkoi* (Yang et al., 2017). Since *K. fedtschenkoi* belongs to the same family as *S. tectorum* and it is the phylogenetically closest obligate CAM species with available genome sequences of vitamin E biosynthetic genes, we explored the possibility of finding JREs and ABREs in this species (Fig. 8C). Here, we identified a JRE in the promoter region of *HPPD* and an ABRE in the promoter region of *VTE4* in the CAM plant *K. fedtschenkoi* (Suppl. File 1), thus suggesting that both jasmonates and ABA might synergistically enhance α -tocopherol biosynthesis, which is consistent with biochemical data. Thus, our results, although limited by its correlative nature, suggest a photoprotective activation role for these phytohormones in which ABA and JA-Ile may cooperatively promote vitamin E biosynthesis in *S. tectorum*. Most importantly, results suggest that both group of hormones complement each other to specifically increase the content of α -tocopherol per unit of Chl, a ratio that reflects the capacity of photoprotection of this antioxidant molecule per number of photons absorbed (*sensu* Kyparissis et al., 1995; see also Munné-Bosch and Alegre, 2000). α -Tocopherol plays an essential role in chloroplasts in the protection of the photosynthetic apparatus preventing the propagation of lipid peroxidation, both by scavenging lipid peroxyl radicals and eliminating reactive oxygen species, such as singlet oxygen and hydroxyl radicals (Havaux et al., 2005; Mesa and Munné-Bosch, 2023), as well as in the protection of PSII from photoinhibitory damage by preventing singlet oxygen-related net loss of the D1 protein (Kumar et al., 2021). Thus, an increase in α -tocopherol per unit of Chl in the stressed *S. tectorum* plants may be very helpful to reduce photo-oxidative stress in chloroplasts working at high oxygen tensions and excess light. In this regard, it is also very important to consider the biological significance of Chl loss throughout the study, which up to week 8 was accompanied by a constant Chl *a/b* ratio, thus suggesting a reduction in the light harvesting antennae that may strongly decrease the number of excess photons received during the day. Since ABA and jasmonates have also been implicated in the regulation of Chl degradation and leaf senescence (Tsuchiya et al., 1999; Zhao et al., 2016), it is noteworthy that a part of the photoprotective response observed here was simply related to an induction of leaf senescence, a process that may occur slowly and progressively to provide sufficient time for nutrient remobilization, a process that results to be essential for acclimation to a combination of water deficit and nutrient deprivation (Munné-Bosch and Alegre, 2004; Zhao et al., 2016). Interestingly, at the end of the experiment the Chl *a/b* ratio decreased significantly together with total Chl loss, which may be associated with a reduction in reaction centers, as only Chl *a* is located in them, whereas both Chl *a* and Chl *b* occur in light harvesting complexes (Croce and van Amerongen, 2011). Therefore, it is very likely that sampled leaves in the mid rosette will suffer from photoinhibition and advanced symptoms of leaf senescence under more severe stress. Future studies are warranted to unravel the limits of stress tolerance in this plant species and what are the underlying mechanisms.

5. Conclusions

It is concluded that *S. tectorum* can withstand a combination of water deficit and nutrient deprivation for almost three months without suffering signs of photoinhibition, avoiding photo-oxidative stress and photo-oxidative damage in the central part of its rosette. Also, results show that this species is endowed with a physiological mechanism in which not only ABA but also the bioactive jasmonate form, JA-Ile, may induce photoprotection, particularly by increasing the α -tocopherol per unit of Chl ratio, thus displaying an early effective stress acclimation strategy. The exact signaling pathways underlying this response remain, however, elusive, but results shown here suggest that both ABA and jasmonates may interact in the observed response and add to our current knowledge that both groups of phytohormones interact in the modulation of plant responses to abiotic stress, also in CAM plants.

Funding

This research was funded by the Catalan Government with the ICREA Academia award, and the 2021 SGR 00675 grant given to SMB.

CRediT authorship contribution statement

Sabina Villadangos: Formal analysis, Conceptualization, Data curation, Investigation, Methodology, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Sergi Munné-Bosch:** Conceptualization, Funding acquisition, Investigation, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

We are indebted to Tania Mesa for her help with samplings. We are very grateful to the *Serveis Científico-tècnics* and *Servei de Camps Experimentals* of the University of Barcelona for their technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2023.154040>.

References

- Abram, V., Donko, M., 1999. Tentative identification of polyphenols in *Sempervivum tectorum* and assessment of the antimicrobial activity of *Sempervivum* L. J. Agric. Food Chem. 47, 485–489.
- Amaral, J.S., Casal, S., Torres, D., Seabra, R.M., Oliveira, B.P.P., 2005. Simultaneous determination of tocopherols and tocotrienols in hazelnuts by a normal phase liquid chromatographic method. Anal. Sci. 21, 1545–1548.
- Bosch, M., Wright, L.P., Gershenzon, J., Wasternack, C., Hause, B., Schaller, A., Stintzi, A., 2014. Jasmonic acid and its precursor 12-oxophytodienoic acid control different aspects of constitutive and induced herbivore defenses in tomato. Plant Physiol. 166, 396–410.
- Cai, J., Liu, X., Vanneste, K., Proost, S., Tsai, W.C., Liu, K.W., Chen, L.J., He, Y., Xu, Q., Bian, C., Zheng, Z., Sun, F., Liu, W., Hsiao, Y.Y., Pan, Z.J., Hsu, C.C., Yang, Y.P., Hsu, Y.C., Chuang, Y.C., Dievart, A., Dufayard, J.F., Xu, X., Wang, J.Y., Wang, J., Xiao, X.J., Zhao, X.M., Du, R., Zhang, G.Q., Wang, M., Su, Y.Y., Xie, G.C., Liu, G.H., Li, L.Q., Huang, L.Q., Luo, Y.B., Chen, H.H., Van de Peer, Y., Liu, Z.J., 2015. The genome sequence of the orchid *Phalaenopsis equestris*. Nat. Genet. 47, 65–72.
- Casadesús, A., Bouchikh, R., Pérez-Llorca, M., Munné-Bosch, S., 2021. Linking jasmonates with vitamin E accumulation in plants: a case study in the Mediterranean shrub *Cistus albidus* L. Planta 253, 36.
- Cela, J., Arrom, L., Munné-Bosch, S., 2009. Diurnal changes in photosystem II photochemistry, photoprotective compounds and stress-related phytohormones in the CAM plant, *Aptenia cordifolia*. Plant Sci. 177, 404–410.
- Chaudhary, N., Khurana, P., 2009. Vitamin E biosynthesis genes in rice: molecular characterization, expression profiling and comparative phylogenetic analysis. Plant Sci. 177, 479–491.
- Cotado, A., Müller, M., Morales, M., Munné-Bosch, S., 2018. Linking jasmonates with pigment accumulation and photoprotection in a high-mountain endemic plant, *Saxifraga longifolia*. Environ. Exp. Bot. 154, 56–65.
- Croce, R., van Amerongen, H., 2011. Light-harvesting and structural organization of Photosystem II: from individual complexes to thylakoid membrane. J. Photochem. Photobiol., B 104, 142–153.
- Davies, P.J., 2010. Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction. Action! Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- De Ollas, C., Arbona, V., Gómez-Cadenas, A., Dodd, I.C., 2018. Attenuated accumulation of jasmonates modifies stomatal responses to water deficit. J. Exp. Bot. 69, 2103–2116.
- El Kayal, W., Keller, G., Debayles, C., Kumar, R., Weiher, D., Teulieres, C., Marque, C., 2006. Regulation of tocopherol biosynthesis through transcriptional control of

- tocopherol cyclase during cold hardening in *Eucalyptus gunnii*. *Physiol. Plant.* 126, 212–223.
- Fleta-Soriano, E., Pintó-Marijuan, M., Munné-Bosch, S., 2015. Evidence of drought stress memory in the facultative CAM, *Aptenia cordifolia*: possible role of phytohormones. *PLoS One* 10, e0135391.
- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., Miersch, O., Wasternack, K., Solano, F., 2009. (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat. Chem. Biol.* 5, 344–350.
- Forseth, I.N., 2010. The ecology of photosynthetic pathways. *Nat. Educ. Knowl.* 3, 4.
- Glusac, J., Morina, F., Veljović-Jovanović, S., Boroja, M., Kukavica, B., 2013. Changes in the antioxidative metabolism induced by drought and Cd excess in the leaves of houseleek (*Sempervivum tectorum* L.). *Fresenius Environ. Bull.* 22, 1770–1776.
- Havaux, M., Eymery, F., Porfirova, S., Rey, P., Dörmann, P., 2005. Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 17, 3451–3469.
- Hewedy, O.A., Elsheery, N.I., Karkour, A.M., Elhamouly, N., Arafa, R.A., Mahmoud, G.A., Dawood, M.F.A., Hussein, W.E., Mansour, A., Amin, D.H., Allakhverdiev, S.I., Zivcak, M., Brestic, M., 2023. Jasmonic acid regulates plant development and orchestrates stress response during tough times. *Environ. Exp. Bot.* 208, 105260.
- Heyduk, K., Moreno-Villena, J.J., Gilman, I.S., Christin, P.A., Edwards, E.J., 2019. The genetics of convergent evolution: insights from plant photosynthesis. *Nat. Rev. Genet.* 20, 485–493.
- Heyer, M., Reichelt, M., Mithöfer, A., 2018. A holistic approach to analyze systemic jasmonate accumulation in individual leaves of *Arabidopsis* rosettes upon wounding. *Front. Plant Sci.* 9, 1569.
- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F., Prange, R.K., 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207, 604–611.
- Ilyas, M., Nisar, M., Khan, N., Hazrat, A., Khan, A.M., Hayat, H., Fahad, S., Khan, A., Ullah, A., 2021. Drought tolerance strategies in plants: a mechanistic approach. *J. Plant Growth Regul.* 40, 926–944.
- Kazan, K., 2015. Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 20, 219–229.
- Khan, G.A., Vogiatzaki, E., Glauser, G., Poirier, Y., 2015. Phosphate deficiency induces the jasmonate pathway and enhances resistance to insect herbivory. *Plant Physiol.* 171, 632–644.
- Khan, M.I.R., Fatma, M., Per, T.S., Anjum, N.A., Khan, N.A., 2015. Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Front. Plant Sci.* 6, 462.
- Klein, J.T., Kaderit, J.W., 2015. Phylogeny, biogeography, and evolution of edaphic association in the European oreophytes *Sempervivum* and *Jovibarba* (Crassulaceae). *Int. J. Plant Sci.* 176, 44–71.
- Kondo, A., Kaikawa, J., Funaguma, T., Ueno, O., 2004. Clumping and dispersal of chloroplasts in succulent plants. *Planta* 219, 500–506.
- Kumar, A., Prasad, A., Sedlarova, M., Kale, R., Frankel, L.K., Sallans, L., Bricker, T.M., Prospisil, P., 2021. Tocopherol controls D1 amino acid oxidation by oxygen radicals in Photosystem II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 118, e2019246118.
- Kyparissis, A., Petropoulou, Y., Manetas, Y., 1995. Summer survival of leaves in a soft-leaved shrub (*Phlomis fruticosa* L., Labiatae) under Mediterranean field conditions: avoidance of photoinhibitory damage through decreased chlorophyll contents. *J. Exp. Bot.* 46, 1825–1831.
- Larcher, W., Wagner, J., 1983. Ökologischer Zeigerwert und physiologische Konstitution von *Sempervivum montanum*. *Verh. Ges. f. Ökol.* 11, 253–264.
- Larcher, W., Holzner, M., Pichler, J., 1989. Temperaturreisistenz inneralpiner Steppengräser. *Flora* 183, 115–131.
- Larcher, W., Kainmüller, C., Wagner, J., 2010. Survival types of high mountain plants under extreme temperatures. *Flora* 205, 3–18.
- Lichtenthaler, H., Wellburn, A., 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.* 11, 591–592.
- Ma, J., Qiu, D., Pang, Y., Gao, H., Wang, X., 2020. Diverse roles of tocopherols in response to abiotic and biotic stresses and strategies for genetic biofortification in plants. *Mol. Breed.* 40, 18.
- Mesa, T., Munné-Bosch, S., 2023. α -Tocopherol in chloroplasts: Nothing more than an antioxidant? *Curr. Opin. Plant Biol.* 74, 102400.
- Ming, R., VanBuren, R., Wai, C.M., Tang, H., Schatz, M.C., Bowers, J.E., Lyons, E., Wang, M.L., Chen, J., Briggers, E., Zhang, J., Huang, L., Zhang, L., Miao, W., Zhang, J., Ye, Z., Miao, C., Lin, Z., Wang, H., Zhou, H., Yim, W.C., Priest, H.D., Zheng, C., Woodhouse, M., Edger, P.P., Guyot, R., Guo, H.B., Guo, H., Zheng, G., Singh, R., Sharma, A., Min, X., Zheng, Y., Lee, H., Gurtowski, J., Sedlazeck, F.J., Harkess, A., McKain, M.R., Liao, Z., Fang, J., Liu, J., Zhang, X., Zhang, Q., Hu, W., Qin, Y., Wang, K., Chen, L.Y., Shirley, N., Lin, Y.R., Liu, L.Y., Hernandez, A.G., Wright, C.L., Bulone, V., Tuskan, G.A., Heath, K., Zee, F., Moore, P.H., Sunkar, R., Leebens-Mack, J.H., Mockler, T., Bennetzen, J.L., Freeling, M., Sankoff, D., Paterson, A.H., Zhu, X., Yang, X., Smith, J.A.C., Cushman, J.C., Paull, R.E., Yu, Q., 2015. The pineapple genome and the evolution of CAM photosynthesis. *Nat. Genet.* 47, 1435–1442.
- Morales, M., Garcia, Q.S., Munné-Bosch, S., 2015. Ecophysiological response to seasonal variations in water availability in the arborescent, endemic plant *Vellozia gigantea*. *Tree Physiol.* 35, 253–265.
- Munemasa, S., Oda, K., Watanabe-Sugimoto, M., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., Murata, Y., 2007. The *coronatine-insensitive1* mutation reveals the hormonal signaling interaction between abscisic acid and methyl jasmonate in *Arabidopsis* guard cells. Specific impairment of ion channel activation and second messenger production. *Plant Physiol.* 143, 1398–1407.
- Munné-Bosch, S., Alegre, L., 2000. Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta* 210, 925–931.
- Munné-Bosch, S., Alegre, L., 2004. Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Funct. Plant Biol.* 31, 203–216.
- Muñoz, P., Munné-Bosch, S., 2019. Vitamin E in plants: biosynthesis, transport, and function. *Trends Plant Sci.* 24, 1040–1051.
- Negin, B., Moshelion, M., 2016. The evolution of the role of ABA in the regulation of water-use efficiency: from biochemical mechanisms to stomatal conductance. *Plant Sci.* 251, 82–89.
- Parnell, J., Favarger, C., 1993. In: Tutin, T.G., Burges, N.A., Chater, A.O., Edmondson, J. R., Heywood, V.H., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Europa, Webb D. A. Flora (Eds.), *Sempervivum* L., Jovibarba Opiz. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 425–428.
- Praeger, R.L., 1932. An Account of the *Sempervivum* Group. Royal Horticultural Society, London.
- RStudio Team, 2021. RStudio. integrated development environment for R. RStudio, PBC, Boston, MA, USA.
- Sánchez-Romera, B., Ruiz-Lozano, J.M., Li, G., Luu, D.T., Martínez-Ballesta, M.D., Carvajal, M., Zamarréno, A.M., García-Mina, J.M., Maurel, C., Aroca, R., 2014. Enhancement of root hydraulic conductivity by methyl jasmonate and the role of calcium and abscisic acid in the process. *Plant Cell Environ.* 37, 995–1008.
- Sandorf, I., Holländer-Czytko, H., 2002. Jasmonate is involved in the induction of tyrosine aminotransferase and tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 216, 173–179.
- Savchenko, T., Kolla, V.A., Wang, C.Q., Nasafi, Z., Hicks, D.R., Phadungchob, B., Chehab, W.E., Brandizzi, F., Froehlich, J., Dehesh, K., 2014. Functional convergence of oxylipin and abscisic acid pathways controls stomatal closure in response to drought. *Plant Physiol.* 164, 115–160.
- Siles, L., Alegre, L., González-Solís, A., Cahoon, E.B., Munné-Bosch, S., 2018. Transcriptional regulation of vitamin E biosynthesis during germination of dwarf fan palm seeds. *Plant Cell Physiol.* 59, 2490–2501.
- Smith, M.C., 1981. *Sempervivum* (Crassulaceae) in Spain and the Pyrenees. *Lagascalia* 10, 1–23.
- Suhita, D., Raghavendra, A.S., Kwak, J.M., Vavasseur, A., 2004. Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate-and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiol.* 134, 1536–1545.
- Takahashi, S., Badger, M.R., 2011. Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends Plant Sci.* 16, 53–60.
- Taybi, T., Cushman, J.C., Borland, A.M., 2002. Environmental, hormonal and circadian regulation of crassulacean acid metabolism expression. *Funct. Plant Biol.* 29, 669–678.
- Thompson, A.J., Andrews, J., Mulholland, B.J., McKee, J.M.T., Hilton, H.W., Horridge, J. S., Farquhar, G.D., Smeaton, R.C., Smillie, I.R.A., Black, C.R., Taylor, I.B., 2007. Overproduction of abscisic acid in tomato increases transpiration efficiency and root hydraulic conductivity and influences leaf expansion. *Plant Physiol.* 143, 1905–1917.
- Tsuchiya, T., Ohta, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Shimada, H., Masuda, T., Takamiya, K., 1999. Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 15362–15367.
- Wakamatsu, A., Mori, I.C., Matsuura, T., Taniwaki, Y., Ishii, R., Yoshida, R., 2021. Possible roles for phytohormones in controlling the stomatal behavior of *Mesembryanthemum crystallinum* during the salt-induced transition from C3 to crassulacean acid metabolism. *J. Plant Physiol.* 262, 153448.
- Wasternack, C., Hause, B., 2013. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review. *Ann. Bot. Ann. Bot.* 111, 1021–1058.
- Yang, X., Hu, R., Yin, H., Jenkins, J., Shu, S., Tang, H., Liu, D., Weighill, D.A., Yim, W.C., Ha, J., Heyduk, K., Goodstein, D.M., Guo, H.B., Moseley, R.C., Fitzek, E., Jawdy, S., Zhang, Z., Xie, M., Hartwell, J., Grimwood, J., Abraham, P.E., Mewalal, R., Beltrán, J.D., Boxall, S.F., Dever, L.V., Palla, K.J., Albion, R., Garcia, T., Mayer, J.A., Lim, S.D., Wai, C.M., Peluso, P., Van Buren, R., De Paoli, H.C., Borland, A.M., Guo, H., Chen, J.G., Muchero, W., Yin, Y., Jacobson, D.A., Tschaplinski, T.J., Hettich, R.L., Ming, R., Winter, K., Leebens-Mack, J.H., Smith, J.A.C., Cushman, J.C., Schmutz, J., Tuskan, G.A., 2017. The *Kalanchoe* genome provides insights into convergent evolution and building blocs of crassulacean acid metabolism. *Nat. Commun.* 8, 1899.
- Yu, K., D'Odorico, P., Carr, D.E., Personius, A., Collins, S.L., 2017. The effect of nitrogen availability and water conditions on competition between a facultative CAM plant and an invasive grass. *Ecol. Evol.* 7, 7739–7749.
- Zaharia, A., Zaharia, D., Cantor, M., Buta, E., 2010. Research regarding the effects of water retention mechanisms, resistance to drought, heatstroke and high temperatures of the *Sempervivum* rosettes. *Analele Universitatii Din Craiova* 90, 568–573.
- Zhao, Y., Chan, Z., Gao, J., Xing, L., Cao, M., Yu, C., Hu, Y., You, J., Shi, H., Zhu, Y., Gong, Y., Mu, Z., Wang, H., Deng, X., Wang, P., Bressan, R.A., Zhu, J.-K., 2016. ABA receptor PYL9 promotes drought resistance and leaf senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113, 1949–1954.
- Zuur, A., Ieno, E., Elphick, C., 2009. A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods Ecol. Evol.* 1, 3–14.

Supplementary Fig. S1. DNA sequence of *VTE1* gene of *Kalanchoë fedtschenkoi* (*Crassulaceae*) encoding for the tocopherol cyclase (TC). Gene accession number in Phytozome: Kaladp0058s0095. Green color marks the upstream region 5'UTR in which the promoter region is found, yellow color represents the coding sequence (exons) with the first possible starting codon highlighted and blue color indicates the downstream region 3'UTR. Jasmonates responsive elements (JRE) are highlighted in purple.

ACAGAAGCACTCTCTTCTAATAGAGTTTATTCAAGTATCGCGCTATAGTTTTGAATTGAACAAAATCAGAGATTAGTTTTGTTCAAGCAGTATTAA
CTAATTATTGATTATGGTGAATAATTACATATTAGTGTTCAGATTAGTACAAAATCAGTTCAATTTGAGAGGTTTATATTGAACAGCTGGTTA
GGTCAAGTTCGATTTGATTCACCTTGTCTATCCATATCCGAACCAATAGAACATAGTTATAAGAACTGGACCGGATCGGCCGGTTCGACCATTTG
GATCGAGAACCGGATCTAGTACCGATCTGATTTGAAATTAATATCGGATTGCAATTTGAACAGATAAAATCTGATAAACCGGCCGATATTATT
AAAATATTGAATCGGACCGAACCGGTTGAACCGATTATTGTAATTAATGACTTAAGTACATATAATATAAATCTAAAACTCA
TTTTACTAAAATTACACAGCTCTCATGAGGCGATCAACCTGTTTGATTTCTTTGAAAATCAACATAAGATTTCATTATGAAAAATATTACAT
GAACCAACGATCGAATCAATTTAAATCGTCGGTTCAAACCGAAAAATTAAGAACCAGAACCTAACCGATTGACTTCGGATCCGACTCTGATAA
ATATGGATTAGAATCTAGGCTGGTACCGATCCAACAAATCGGATAAACCGGTCTCATTCTAATAACTATAATGGTCATATTTTCGAGCCGGCCCA
AAACATCGAGGGCCATAAAATCGCCCGTACAATCATCTCGTCCGTCGCCGGCGGCGAGTTTCTGACAAAGCGTCAATGTCAGAGTTGACTTA
GCAGACTGGATAGCTGTCCGAAATTAACACATTCCTATCTCCATCCAAACCGAAGCTTTCATCGTTATCCAGTAACCCACAAGTACAACATCTCC
CAAACTCTAGTCAAAACCGCATTAAATTCACACTTATACGGCCATGAGCAGCACCCGATCGGGAGCTTGGGGTCTCTCCCTCATCCCGGACCCGA
TTCCGCCGCGACACGGCTCGGTCTCCGACCAAGTCCCGTCCGGGAAGCTCGCCGCGCCGAAGCGAGCTATTACACGACGATTACGAGCGGTTTC
GTCGGACGCGGCTGCGCGGGGAGTGTGAAGCCTGTTACATTCGACGCGCGCTGATCGCGGTCTCCGGACGCTCACAGCGGGTAAGATTA
GGGCTAGATCCGACTCTCGGATTTGAGAATCGTTGGAAGCTCAGTGTATAAATAAGATTTGATTTCTCTTTGGGAAAGTTACTTTGATTCCA
ATGTTGAGCATTGATTTCCATTTTGGAGCTGTTCTAAAAAGCCGTAGCTGCTGATTTAAATTTAATTTGATTTACTGTTTTCAATATAATATTT
CGATATATATATAGAATGAGTTCAATTGAACCTCAAATCCAGATGAAACGAGAACTCAATTTTACTGTTGGATGAGATGATATAAAGACT
GAGTGGGTGGAACAGTGTCAAAACACACAAGACGCAACACGTTATTTTTCGTTGAGTTCTCAGTTCTTACCAGATTTATGATTTCAATGGAACCGC
CCCTGTATATATATATAATTCGAATACTGTATGATCGGCCAAGTTGGATTACTTGAGCAGGTATCATTTTATGGAAGCAGGAGGCCATTCT
TTCGAGGGATGGTACTTCAAGTGGCGATTCCGAAATAAGGCAGAGCTTCTGCTCATGTACAGGTGGAGAATCCGGCGTTGAGGAAGATGTT
GAGCCCGCTGGAAGTGTGAAAAATGGGCTCTGTATACAGGAACCTGGGGTTCAGATACTCGGTGCCGATGACAAGTACATTGTCGGTATTCT
CAAGAATCAGGATCTCTGGGGAAGTAAGTTACTACTACATTTTATGCTATTTTATAGCCATTTCTGCTTTTGGTTAGAGAGCTTGGTGGTTTT
TATCATACTGATGTTGGTAGTTGTGAAATTTGATATTCATTGATGACGATTGGTACCTATCTGATCAACACGAGTCAATTTTGGAGAGCTGCCA
CGCTGCAGTTTGAACAACCATGTGGCGGTTAAAAATTTATCAATCAATGAATGTTTGTACGATCACTTTGATTTTTAACGTGATAGCTAGA
CAATAGTCGTGTCTATGTTATACGTGATGATTGATCCACCAAGAAGATCATTCTTATTGATATGGGAAACATGGCTTTAAGAATATA
AACTCTATATTTTGTAAAAAGGCCATTACTCCATTTATCTAGACAGGCATGAGCTAATGCTAGGCAATCTTTCTGTGCAAGGACAACCTGCCC
CTCCGGACGCGGAAGTTACCCCTCAGGTTGGTACTGCACTGTTTATAGGTGACGGGTGAAGTAGCTTTTATGTAACCTGTGTGTTCTATAAC
TGATATCTTCACTCTCAACCTGTTGACGTCAAAATTTGGCTTTTACGTAAAGAAAATTAAGACGTCAGCGTCTGCCGTTGCGGGTTTATCAT
TTTACTGCCATTCTGCAGGAATTTAATAGTAGAGTTTCGGAAGTTTCCAGGTGACCCCACTGGAATCAAGGTTTCTTATCATGGTGATGATG
GCAGGTTGAGTACTCGTCGATATTCTGCGTGTGGCTCGATTTTACATTGCTTTCAAGCTGCGGTTGATTTCTAAGCTATTTTTTTTATTACAA
CGGTGCGTTTTGGTTACAGGACAGATCACAACAAATCTGGAAGACTGCAAGGTGGGAGTACAGCACGCTCCCGTCTATGGCTGGGCAATG
TCAACTCCAAGCAAAAGGCCACTGCTTGGTGGCTGGCGGCTTTCTGTTATTTGAACCTCATTGGCAAATATGCATGGCCAGTGGACTCTCAACC
GGTATGACGTTTTTCAAGTCGTCTCTGCGCAATGGCAGATTTTCACTATGGTGCTCGTGCATTCCAGGTTGGATAGAATGGGATGGTGA
AATGTTTGAAGTTTCAAGATGCTTCATCGTATTTCGAGAAAACTGGGAGGAGCCTTCTTAGGAAGTGGTTTTGGGTGATTTTCAAGATCCCTTCG
GATTTTACCTATTTTAAAGGCTATGTTTGGTTAAGGAAAAATTTGGTGGAAAGAAAAATTTGAGGGAAATAGAAAGGAAATGAAATTTCTGGAGG
ATTCCATCTAATTTTTCTTGTGTTGTTTATTAGGAAATGTCAAGGAAATGTTTGGAAATCCATTTTCAATTTCCATGAGCATGGAATTTTTAT
GGAAAAATATGTCAAAATATCAACATTTTCACTCTCATACATTGAATTTGTTTAAAAATTCATTATTTGTTGAGATACATTGAATTTGACTGGA
TTGATTTGTTAGAGATAAGAATTACATTTTCCATTAATTTTCCACTAATTTTTTCCCTTCTATTTTCACTAAACCAAAATGAATTTTATTA
ATTTTCCATCAAAATTTTCTTCTCCAAATTTTCTAAACCAACACACCTTAAAGTTGATGATCAGAAATATCAGGATGAGTAAATCCGCTGGATA
TCAGAAGTGGATTGCCTTAAGATTTTGTAGTTGCACTGTATTTTGGCTCTGACAATGCGGATCACTGTGTTTACTGATTACAGATCCAGTGTA
ACGCTTTCGAAGGAGCAAGGGGAGAAGTTTCAATTGACTGTGCTGGTGGCTTAAAGGCAGTACCAGGGCCATTGACTACTATGAAAATGCTGC
TCTGGTACATATTTATTTGCAATTTCAACTTTAAACACTCACAACCAATATTAACTGTTGTGTTCTTCAATCACCATTATATTTACTCGTGGTGGCT
ATGTGGATTACTGATTCGAGATTGCACTGCACTATAATGGAGTCTTTTACGAATTCGTGCCGTGGAATGGAGTGGTTACTTGGGAGGTGCTGTG
GTGGGGTTACTGGCAGATGTCTGCCGAGAATGAACTCATATTGTAAGTTCTGTCTGCCCATGGTTGATTTCTTTTCTTAATATTTCAATTTGT
ATTACGATGCCTTCCCAAGTCCAGAAATGGTGTGTATATGTTTATTACAAATGTGATGTTTTTGCAGGCAGAGCTGGAAGGAACGACGGA
GGAGTCAGGGACAATGTTGCTCGCTCCAACATCCGAAGCCGGGCTCGCCCACTGTAAAGATGCGTGTCCGGTTGCTTAGATTACGAATCT
GGGAAAAAGGATCAAAATGGGATCAAGGGAAGGTATGCTGCGCTGTCTGGTTTTTGTGCGAGGATAGTTGTAGATTAGTCGGATCCCACTG
AAAACCAATTGACAATGAGTGGAGGATCAATCTGAGCTCAACTGGGCGATGTGGGATAATACCATTGTCTCAACAATAGTGTCTGTATATG
TGCGCACATTTGTTATGCCCTGACCCGAATCCGTGATTTCAAAATCTGTAAGTGTATTGGACGTGACGAGCAATATGGCAGCGTTGGAGGTC
GGTGGGGGGCGCTGGTTCAATACATGGAGCGGCCAAACCAACACCGCGGAACCTTGAAAGGGCTCTCAGGTTCCGTGTGGACGTGGAGGGC
TTTTATAATTTGGCTCCGCTACTTAAACCCCTGGGTTGTAGAGTTGCTGAGGCTGTACGGCAGTCTTTTGAATGAAAGTTGTTTCTTCTGATTTT
CGTCTGCGTGTCTGTGTGGATGTTGTTCTTCTTCTCATGGAAGTCCGGTATCATCTCATCTGATTGAGTATTTCTCTGTGGAAGTTGT
CTGTTGTCTGTCTGTCCAGCGTGCCATTGTACGTGCCATGTTGTCTGTCCAGCGCGGCCATTGTACACGTGCCATTATAGTGCTATGTGC
GACTTGTGCATAGTGTGAGATATAATGTAGCGTGAAATATTGAGTGACTGTAAAAAATGAATTTTCAACGTGATTCATGTCTATTAATTTT
CACGCTGATAGCTTCTCATGAGTTGATTGATGGTACACATGTCCATTCAAGAAAGATTTTGAACACATATTTTATCCCTTTAAATCAATTGCAATGAG
CTGCTTTGTTCTGTCTAAAGTCAATTCATCTAAACCTCAATTAACAGGTGTTCTACTAAAGTCAATTCATTAAATGGATTGAATTTTATTATA
AAATTATAACAAATATTTATCTGATGAACATATCAACACTGAATGTAATAACTCATCTGATGAACATAATAATCTCTAATGAACATAATAACA
TCTGTTGAATGAAAAACTCATTTGAAAAACATGTATCCCTAAAAAGTTATGATTTTGTCTATGAATATAAATGACAACATTTGAAATTTGTTAACTT
TAATGCATAAAAAATGAATAATTAGTGAATACAAAATCTTAATTTGTCAATTTATATTTGATTTTCAATTTGTTGAACATGAATATATTTGAAAC
TTTCTCTTATTTTATATTTTATTTTGTATTTGTTGATTTGATTTGAACTGCTGAAATAACTACTGAATAACAGCTTTGGAAATGAGAGCACCC
AATAATGTGATTACTATAAGTAATACAAAATCAATAATTTTGATATCATTAACCAATCAATATTAACATATATATTTAATTTAAAAAATATTA

Supplementary Fig. S2. DNA sequence of the *VTE4* gene of *Kalanchoë fedtschenkoi* (*Crassulaceae*) encoding for the tocopherol methyl transferase (TMT). Gene accession number in Phytozome: Kaladp0032s0090. Green color marks the upstream region 5'UTR in which the promoter region is found, yellow color represents the coding sequence (exons) with the first possible starting codon highlighted and blue color indicates the downstream region 3'UTR. Jasmonates responsive elements (JRE) and abscisic acid responsive elements (ABA) are highlighted in purple and green, respectively.

```

AGGTGAGATGAAAAGAAAATTGGATTGATTTTCTAAAATAAAATTCACCATTACATTCCAAAACATATTATTATTAGACTTAAATTTGTGTGTG
AAAATTACGTGGTTTGATTTTCAAAGATGTCATTTTCTTATGTGCGCAAAACGATATAATTTATTTTGATAACCAACACGACGTAATTTTGACAA
AAGTCTAAGTCTTATAATAATATTATTTAGGAATATAATGATAAATTTATTTAGAAAATAAGTCCAATTTTTTTTTCATCACACTTTTTTGAA
ATCATAATAGTCTGACCTTAATAAATAAGTGTGATAGTTAAGGGTCCCTTTTGAATTTTATCCCTAAAAAAACATAAATATTTCCCTGATTTG
ATGTGATTTACTCCCTGTGCGGTATTAGATGTGCGCGAGCCAAAAGCTCGTGAATTAAGGAGTAATTTATGGAAGAGAGAATAAGATAAAAT
ATGGAAGGTAGTTGAGATGAGAGAGAAGTAAAAATAGATAGGATTTGTGAGTATTTGAATTTGTTGTTGAAAAGATAAAATTTTATAATTAATGTTT
GACTTTTAAGGAAGTTATGAGAATTAATGTGCGTTGGAATTTGTGAGTGACAAGTAAAAATGGATAAATAATTTGATTAAGTGACATGTGAA
AGAGGACAGAGAAAATATATGACTAATGTCAGTCTTAGAACGAACCCAGATTCAATTAGATCCAAAATCCAATAGACCGAACTCCCATCCGGCT
CAACTGCCCAACCGAGCCTGATTGTAAGAAGTTTGTAGATGACAAGTACACTGCTTTCCCATATACCAAAATGGCAAATAAATGAACTTCG
AGGGCAACATTGCCAATCACATACACTGAAACACTCTCCAAAATCTCAATAAAAAAAGTGAATCCATCCGAATATACAAATAAATAAAAAA
TGCCACATTCGTCTCATCAGCACTATAAAACCTCCGCATCAATGGCAGCCACCACCACATCTCTGCACGCTCTTCAACCCCAACTCTCTCAC
TCCCTCAACCTACTTCCGAGCCACTGTCGCCGAGACCGTCCGCGGTTCCCGAGGATGTGCGCGTCTTCCGGGCGGCGGTGATGGAGGCCG
AGAGAGACGAGAAGGAGGCCGTGATGCTGAAGAAGGCATCGCGGAGCTGTACGACGAGAGCTCCGGGATGTGGGAGGACATCTGGGCGCA
CCATATGCACCACGGGTTCTACGACGCGGAGAGGACACCGTCTGACAGCTCTCCGACCATCGTCCGCCAGATTCCGATGATCGAGGAGGCG
CTGAGTTTCGTGGATTGTCTGGTGAGCGTCTCTCATCCATCGATCGTCCATACATCTCGTTATCTTTCATCTAATATAACAAATAAATAATGTC
TGTCGAACATTCAGTACGTGATCCATCTCTCCGTCACCATATTATACGTCCATTGAGACTCTCTCAACCGCTTCTCATCGCTATCCCTCCATGC
CAAAATAGCAAAACACTATTGTTTTGTTAAATTTTGTATAATTTCTAATAATTTTCTTCTTTCTTTTATAAACCAACCAAAAAATCTTTT
CATTTTTTCATAAATTTTCAATTCATTAATAATTTCTGATATCTATGCAATTTGTATAAAATATTCAAATCAATAAATAAAGGGAAAAACCCAA
AAGGCGTTTGAATATCAACGTTTATCCAATTGCGGTTAGAATACCATGATTTCCAAAAGGGTGAATGAAAAAAATCGTACTGATTTTTTA
AATTAATTTTACCATACATTCCAACTAATAATTAACACAGACTAAATTTGTGTGCAAAATTAATTCATTTGATTATCAAAAGACGTTGTTTT
CTTTATGTGCGTAAATGATATAATTTTGTATAATCAAAACGACATAATTTTCGCACACAAATCAAGTCTTGTAAATAATATTAGGTCAGGAATG
TAATGTAATTTTATTTAGAAAATCAGTCTGATTTTTTTTTCATCGCACTTTTTTGGAAATCGTGGTAGTTCTGACCGCAATGGGTAAGCGGT
GGTAGTTCAGGGCCCTTTTGGGTTTTATCCCTAAATATAATGACTTAATTTCAAGTTTGCAATTACATTTTTAGAGAATTGCTATTTTTATTTT
CATTTTAGTGTTTTAGGATATTGGATAGAGTCTAGTCATATGTACCGAAACCTTTAAATCTTAAAAAAATAAAAATAAATCTGAAAATCTTA
AAAATTCCTAAACTTTATAGATCTAACACACTAAATATTAATACATTATAACTCTAAATGAAATAAATAAATAAATCTTAATTTTCTTA
TCGCCCTATATTCTATTCTCGTGTCTTTATTTGTAATTTATTTTAATAACAACATACACAATTTAATATTTCTTCTTCTGAACTAATGATTTA
GTATCTTATTTTATTTACATACACATGTGATGTTTAATATGTCTCATGTTGAAAATAGGTTCTCACTTTTACTCTATCCCATAGCACCCGGGCT
CATCATGGGAGACTTTGGATTCAAAAAAATTTTTTAGGCTGCTTTAGGGAAATAGTAGGGAGAGGAAATTTGATGAAAAGTAAATTC
ATGATGGATTTTATCTTATTTTCTTTATTTGGTTTATAATGAAAAATTTGAAGGAAAGTTTCAAAACTCATTTAATTTACCTTAATTTCTCTCTAA
CTTCCACATAATTTTCTCCCTCATATTATCCATCTAAACCAACATTGAATTTTACTATTTTCTCCACATTTTCTTCCACCAATTTTTTCTCTAA
CCAAACACACCTTAATGAATGCATTATCAAAATTAATAAATTTTCAAATTTAATTCATTTTTCTGACTGTAAAACCTCTCACTTTGATTGGCTT
GTAGCCTAAACAGATTTGTGTTGTAGCTTTTAAAGTTGAACCACTCTTTGTGGTATGATTTTGTGTTGAAATTTTCTTTAATAGTCTATGG
TGAAGAATTGGGTCTCACAAAGTTTATCAGAGGACGAACTAATACGAAAATTAACAAAAAATTTTTTTTATTTTACTGTAAATTTGACGAT
GAGTCTGGGAAGAAGCCGAAAAGAAATAGTGGATGTTGGGTGTGGGATTGGTGGGAAGTCCAGATACTTAGCCAAAAGTATGAGGAGGAGAA
GCGCAGTGGAGCCGAGACCCGAGGGATCACGCTGAGCCCTTCAAGCTCAGCGAGCGCAGGCTCTTCCGCTGCGCAAGGGTTGGCCGATCA
GGTACAATTTTACACTGTTAGTTAATTTAGTTGGTAGTTAGTGTGATGATTAAGAAATAATTCTTACGGATTGTTGCTGAGACCTGGAACTGA
CGAGGTGAAGTGGTGAGCAGGTTTCTTCAAGTTGCGGACGCGCTGAACCAGCCGTTCCCGATGAGCAGTTCGATCTGGTGTGGTCAATGGA
AAGCGGCGAGCAGCATGCCAACCAAGGTCGACCTGACGAATCTTTTAACTAACTAGTCGAATGCATATATTGGCTATTTTTGTGAT
GCTTTTGTGGCTGATCCACTGGCAGTTTGTGAGTGAGCTGGCGCGCTAGCCGCCCTGGCGCAACGATAATAATCGTCACGTGGTGCCACAG
GGATCTGTCCCTGGCGAGACCTCTTGAAGCCTGACGAGAAGGCGCTCTCGGCAAGATCTGCAAGTCTTCTATCTCCCGACTGGTGCTCCG
CCGCTGATTATGTTAATTTACTCCGATCCCTCAATCTCAAGGTAATCAAAATCCCATCAATCATTAAAAAATTCGACTTCTATCGTGTGAATGTCA
GTAATCATTTCTCACCTGCTAACACAAGACGACCTTATGACAATTTAGAGTATTTCCGAATAGGGAAATTTACAAATTTGCTTTTATTATT
GGCTGGCCAGCAGCATGACATGTTACTATCTGGCACCATCAAACTATTGCTAGTTTCTGAAGCCTGCACATATGCGCAGGACATAAAATCGG
CTGACTGGTCTCCGACAGTGGCCCCCTTCTGGCCAGCGGTCTCCGACATGCGCTGACATGGAAGGGTGTGACATGATGACATGGAAGGTA
GTTACTCTAAGTTGATGCTAATTTAGAACTTTAGTTTGGGTTGCGGGAGGTGAGATTTTGAAGTGGGCAGGGTGGGAAGAGCATAAAAGCGC
GATGGCCATGCCGCTGATGATCGAAGGGTACAAGAATGATCTGATCAAGTTTCGCCATCATAACTTGTGAAGAAGCCGAATAGAGGAGGAGAAG
CGCAGTGCATCAGAATAAGGCGCGGATTGTTGATGCTGCGGCTCAAAGGCCATCACTCATTTTTGCGCAAAATCTTACGCTCCGTCTGTATT
TTTTTTTTCTAACTCACGACCGAATTTGAATCGAAAATCACAAGATGACAGACTGCACCTTATTTGATGGTATTAATAATGGATGTTTCA
ATGATAACAAAGTATGGTCGTTTTGCAATATGTTACTCAGGTTTCATATAATTTGTATTGATTGGATTATGTTGGATCGGATCAAACTTGCTTA
GGGACGTAATAAATGAGCGTGATATGTTGTTGGTTCAGAATAGAATTAGGGTGACTTCAGGTAAATTTGAGTTTGAAGTTAGAATATTAATG
GGAAAAATATTGTGAAGAAAACTAATGCGTATATGAAAGTTGGCCAAATTTTTTACCAGAAATATCAGTTTGTATTGAAATTTAGTGAAT
TTAACATAAAAAATAAGAGGAAAAATTTAAAAAGGGTTTTCTATATCACCCTTCTCTTGTAGTTGTTGAAAGAGTGCATGAAAAAATTTGAA
CTGGTTTTATAAAATTAATTTACATCTACACTTCCAACTAATGTTACTATAGCAACAACTTGTGCATGAAAACACGTAGTTTGGTCGTTTCG
TTACATAAAACAAATGACGTCTTTTACACTCAATTAACCAACATCAATTTACAAATTTAATAAATTAATTAATTTAATTAATTAATTAATTA
TTAAGCAACAACTATAATTTGAATTTTTGCATCGCACCCCTTTCCCAATTCAGATAGTTTAGACTGTTTTGAAATGTGGTGGTAGTTTCAAAG
CCCATTTTTGTGTTTTCCCTAAAAATTAATTAATAAATTAATATGAAGTTAATGAAATGAATGAACAATTTGATTCTATTTAAATAGGGAG
TTGGCATGGTGGTTACAATATTGTCTAA

```


CAPÍTULO 2

Impacto de un evento de sequía extremo en la reproducción clonal y la capacidad de aclimatación de la planta suculenta *Sempervivum tectorum* L.



Chapter 2. Impact of an extreme drought event on clonal reproduction and the acclimation capacity of the succulent plant *Sempervivum tectorum* L.

Sabina Villadangos^{1,2}, Sergi Munné-Bosch^{1,2}

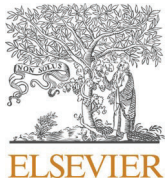
¹Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

²Institute of Research in Biodiversity (IRBio), Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Publicado en **Basic and Applied Ecology** (2024) 81: 96-105.

RESUMEN

Los rasgos funcionales se han definido como aquellos que afectan al rendimiento del organismo, es decir, al crecimiento y desarrollo, la reproducción y supervivencia, por lo que se han asociado generalmente a la aclimatación y la adaptación. Aquí, nos propusimos estudiar el impacto de un evento de sequía extremo en la reproducción clonal y los mecanismos hormonales subyacentes a la aclimatación de la siempreviva de los tejados (*Sempervivum tectorum* L.), una planta CAM adaptada a sobrevivir en ambientes adversos. También exploramos la validez de las fitohormonas relacionadas con el crecimiento y el estrés como rasgos funcionales para evaluar estos procesos en el campo. Comparamos la respuesta de las plantas, considerando tanto las rosetas madre como los nuevos clones producidos, a un evento de sequía estival muy extremo ocurrido en pequeños acantilados de las montañas de Les Guilleries (NE Spain). Medimos varios marcadores de estrés en el campo junto con el perfil hormonal mediante un enfoque metabolómico utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. Los resultados mostraron que la propagación clonal se detuvo durante el periodo de estudio y revelaron un aumento de 100 veces en el contenido de ácido abscísico de la primavera al verano tanto en las madres como en los nuevos clones, concomitantemente con reducciones en el contenido hídrico relativo, que disminuyó solo en un 20%. El jasmonato bioactivo relacionado con el estrés, jasmonoil-isoleucina, aumentó simultáneamente al ácido abscísico, mientras que las hormonas relacionadas con el crecimiento, incluyendo las citoquininas bioactivas (2-isopentenil adenina y *trans*-zeatina) disminuyeron de primavera a verano, lo que fue coherente con la detención del crecimiento. Se concluye que *S. tectorum* ajusta el reclutamiento de nuevos clones durante periodos de baja disponibilidad hídrica y resiste eventos de sequía extrema durante el verano (previniendo la pérdida severa de turgencia celular a contenidos de agua del suelo inferiores al 2% y temperaturas superiores a 43°C) activando con éxito una compleja respuesta hormonal que subyace a la gran capacidad de esta especie para sobrevivir a eventos climáticos extremos.



Ac l i natorti tbfabc btevor dfiatbub ato tnp i pvl voer naxo ti etafib i nmpc i axo tnil i mhtortafibtr nmr pb al pi atSempervivum tectorum sj

Li Sv i tVppi ei dog^{i,S}, tLbwvMr b-Bognfi^{i,S,*}

ⁱ Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 643, Barcelona, 08028, Spain

^S Institute of Research in Biodiversity (IRBio), Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 643, 08028, Spain

R T I A C S E t A N F O

Keywords:

RSgngnti me
Cp i pvl voer naxo
Fr naxo i pvl vag
Jig: o i abg
Sempervivum tectorum
Lwbggi nmpc i axo

R B L I T R C I

Fr naxo i pvl vagfii ubtSbb tebP beti gfiogbfaii ati mntatovdi vgc i pl bmvve i nb,tafi atgdvov afiti etebubplc b at
vbl voer naxo ti etgr vuvui ptgotafibhtfii ubtSbb tdb bwphiti ggoni abety vafiti nmpc i axo ti etieila i axo jt. bvb,ty bt
i v betatgarehtafibv l i natorti tbfabc btevor dfiatbub ato tnp i pvl voer naxo ti etfiowe o i pte bnfi vgc gr -
ebvghv diti nmpc i axo tortior ghpbHkSempervivum tectorum sj,(ti l pi ati eil abetator vuvubfii vgfib uwo c b agt) bt
i pgotbfl pwbetafibui pevhtortdvoy afi-ti etgavgg-vopi abetl fihafiove o bgti gtr naxo i pvl vagtobui pri abt gavbgg
i nmpc i axo tvbgl o gbtv tafibPbjeit) btnc li vbetafibtvbgl o gbtortl pi agtno gebw dtSoafitc oafibvovghabgti et
by phl voer nbt nmpc bgtatitubvhtbfabc btrcc btevor dfiatbub atonmr v w dtv tgc i ptpungtv tsbg Wv vpbwbg
c or ai v gikNEtLl i v (jt) bte bi gr vbetui vvor gtagvggic i Hvgtv tafibPbjeitadbfibv vafitfiowe o i pl vopv dtafivordit
itc bai Sopoc vni l l vni ntr gv dtpxrvetnfioc i advrl fihtrnrl phtaotai ebc tc iggtgl bnaxoc bawhjtTbgr pgtgfoy bet
afii atnp i pl vol i di axo ty i gti vwbgbeter w dtafibtgar ehtl bwoti etvubi pbeti t100-npctv mbi ghtv ti Sgngnti met
no ab atvov tgl w dtaotgr c c bvtSoafitc tc oafibvgti et by tnp bgtno nmc vai qhty vafitvber naxo gtv tvopi aubty i abv
no ab aty finfitebmvi ghetSht402 to phjtl fibtgavgg-vopi abetSvoi navubt%gc o i ab,t%gc o ohpvgopr nv btv mbi gbet
gvc rpi bor ghgy vafiti Sgngnti me,ty fivbtvov afi-vopi abetfiowe o bgtv npre v dtSvoi navubtmhaoHv v gik4-vgol b ab hpt
ieb v bti ettrans-3bi av (tebmvi gbetnvc tgl w dtaotgr c c bwtv finfity i gtno gvgab aty vafitdvoy afiti vwbgti At vgt
no npre betafii atSx tectorum i e%gag vbmrvac b atort by tnp bgtv w dtl bwogtortpy ty i abv i ui vi Spahiti et
y vafigai egbfabc btevor dfiatbub agter w dtafibtgr c c bvtl vub av dtgbubvtrnbgtr vdvovpogti agovty i abvno ab agt
Sbpy t42 ti etab l bvir vgti Soubt6zt&C(tShtgr nmoggr phti navui av diti tnc l pftfiowe o i pvl o gbtaii atr ebvpgt
afibtdvbi atnil i mhtortafivgl bmbgtatgr vuvubtfabc btrnc i antub ag

1. Int r o d u c t .

Cpnti vbtafibtl w i vntfii Svai atortc i htwvoti etb ei dbvbetl pi at
gl bmbgtuv div tvbgor vmb-l oovgvg,SR atafibvtagvgtvogl o ghgi vbl oovht
r ebvgaoetk i vgo tbat i j,t4000(jtl fivgti nhtonH oy pbedbtvgtl i vwnr pi vht
i nmb ari abetv tc o ai btfii Svai agty vafitMbeavwv bi tnp i abv ty finfity
l vop dtevor dfiagti etv mbi gv dtab l bvir vgti vbtv l bwv dtSvoev-
ubvgvhtk 7 3; ogoibati j,t404z (jt or ghpbHkSempervivum tectorum sj(tvgti t
c o oni v vntvobol fihabtortafib. rassulaceae ni c vht i aubtaotafibtfvdfibgat
Er vol bi tc or ai v gtl vni ghv fii Svav diti pl v bti etgr Si pl v bti vbi gt
kDpvt Di ebvbat401K(jtl fivgtl bmbgtvgtl vovebety vafitnp i pvl vo-
er naxo ,ti pgotH oy ti gtno i ptdvov afitovrubdai aubtl vol i di axo ,tafi at
i ppy gtafibt voer naxo tortv ebl b eb atongl w dtkfibvov i mntvovrbvbetat

igt by tnp bg(jtCp i phtdubgtl pi atgl bmbgtafibti Spahitortwvdbtkaot
bfl pva by tvbgor vmbgtShtc ouv dtafivorditri uovi Spbt i anfibg, tv abdv abt
kShtgfii w dtvgor vmbgtic o dtvrc bag(tti etgavvbtShtav gromi av dtv-
gor vmbgtv aotui vwor gtovti gtovtub tnp bg(tkbtDvoo t ui tWob-
b ei bpt155U(jtq bgl vbt i tv fibv abvber naxo tv tdb bantui vi Spahit
vopi aubtaotgbf r i pvl voer naxo ,tafibt npi ptagv abdtffii gSbb tgfioy taotSbt
ortavb b eor gvc loval nbtrovtrvl vetdvoy afiti etnno vSi axo tort by t
fii Svai agtv ui go tgr nmoggi etgr vuvui pt oato phtr ebvovl ac i ptdvov afit
no evao gSratipgotv tgoe btgavbggr pib uwo c b agikLo dtabi j,t40048@t
bati j,t4016,t401: 8Fb opngi tbat i j,t401: 8sbnfir di -si dotbati j,t401: (jt
Aebbe,tfior ghpbHm tdvoy ty bptv ebvbfabc btnc evao gty vafitl v-
uvor gtagv bvggfioy v dtafibtvdfitgavbggaopv nbtortior ghpbHk etoafibv
gl bmbgtortafibgti c btd r gtaotfii vgfib uwo c b agt oato phtaotgreeb t

* Covvogl o ev diti rafiovti atqbl i vac b atortEuoprao i vntBvopdh,tEnopdhiti etE uwo c b ai pLmb nbgtFi nrphtortBvopdh,tú vubvgv i abtBi vmbp i,tRuv dre i
qi do i p: 6z,tBi vmbp i,t09049,tLL i v j

E-mail address: gc_r_b@rsjber.kljtMr b-Bognfi(j

fial_gj@eoyowd10j101:1%Si i bj4046j10j011

Tbnubet49tMi vntit40468Rnmbl abet45tOnaoSbvt4046tt

Available online 12 November 2024

1439-1791/© 2024 The Author(s). Published by Elsevier GmbH on behalf of Gesellschaft für Ökologie. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

C

Lv nbtl pi affiove o bgtvbdr pi abtdvoy afiti etgavbggtvbl o gbgtr ebw
gai ev dtfioy tfiove o i ptl vopbgtnfii dbty vafitevor dfiat vgt nvaani ptv tit
no abf atordiposi pnfiii dbjtl fibtpbpetortl pi affiove o oc vgtgnnrb gbgto tafibt
xripai aubti etxri aai aubti iphgvtortl pi affiove o bgktVvoSbpt li w
Hby gkt 404z(jt ; pi a fiove o bg t i ggot ni ppet l fihafiove o bg t i vbt
py-c opnpi nri vy bdfiat ovdi vnt noclor egt nre et v i ubvht cvr abt
oy o agtgr gri phty vafit bdt tdtetvhty bdfiatYq) Ziv db(jt. ove o i p
i navo tgvatvdbvbeti nbtvSv ev dtaoti tgl bmtPntvbnbl aovti etafibtno gbxrb at
i navui ao torti tgd i pr dtvbl o gbtpti ev dtaotnfii dbgtv tdb btbl vbggo t
v tafibgtc btovi tevga atovdi tki nbtvav gl ovatShtafibtui gnr pi vghgabc (t
kq i uvbg,t4010(jtRc o dtafibtui wor gl fihafiove o bgtevgnoubvetaotei abt
i Sgmgni metkRBR(tvgo btortafibSbg-H oy tgvabgg-vbp abet l fihafiove
c o bg t i gtvagubvhtbntvnaubtv tafibtvbdr o ao totav i ,tfihv i r pnt
no er navuhti i et pht r dvoiy afiti i vbgat afir gt no nbwv dtevor dfiat gavggt
aopbw nbtkl fioc l go tbat i j,t400U8q i uvbg,t4010(jtOafibvrgavbgg-vbp abet
l fihafiove o bg t gr nfit i gt gi pnlp abgt i et%gc o i abgt i vbt l i vavnr pi vht
H oy trovtafibtvwtvptv tSvoantgavbggaopbw nbtkl i vavnr pi vhtv tafibt pi at
vbl o gbtatSvoavol figti et bmvavol figtvbl bnavubhtkq i uvbg,t4010((jt
. oy bubvtafibtvwtvptvRBRtv tSvoantgavbggaopbw nbt etafii atongi pnlp abgt
i et%gc o i abgtv t i Svoantgavbggtvbl o gbgtr nfiti gtevor dfiat gavggtvgt
gny phtSr al vdvbgvgubvhtSbv dtvubti phtkDfii tbat i j,t401K8Ahi gbat i j,t
4041,(tafir gt gfioy v dtafi al fihafiove o bg t i nat v tno nbtv v afibvafii t
i p btkMGppw Mr b-Bognii,t4041(jtl odbafibvry vafitRBR,t%gc o i abgt
fii ubtSbb tgfioy taotlvoc oabt gac i a i pnog vbt kLrfvai tbat i j,t40068
Mr bc i gi tbat i j,t400U,tce oer pi abt vooat fihev i r pnt no er navuht afir gt
Soogav dtgotpy i abvrl i a Htr ebvry i abvtebPmetkl i nfiB3-Toc bw tbat i j,t
4046(t i et i navui abt uvai cvt Et Svogh afibvgv t v l pi agt kLi eowt
. onp i ebwC3ha b,t40048Lrvbgat i j,t40198Cl gi ebg-gbat i j,t4041,(ti gva

Sxtectorum sjvgti tovbol fihabtgrrnmrpb agl bmbgt i aubtaotafibtRpl g
; hwb bbgti etBi pHi gahl vni phtv fii Svaw dtvnihtor arwöl gty vafit pægt
gr Sgavibv ti pl v bti etgr Si pl v bti vbi gtdpvn Di ebbva401K(jtr vw dt
afibty v abvg tafibgt bmbgtvbc iv betnubvbtv vafitg oy ,ty fvnifid vwbmagafibgt
lpi ætnvot fii vefitno evaog grnfiti gnetætabc lbværvgti etnvlb3v dt

y v egksi vnfibvt) i d bwt159z(jtAgfioy gi ti namubd bwoetortubdbai aubt dvoy afit er w dt gl w dt kMi h-Jr b(t i et Qoy bw dt er w dt gr c bvt kJr ph-Lbl abc Sbv(jtEi nfitm i p tmgbat vgtubdbai aubhtl voernbeti etvbc iv gmo bnbetaotafibc oafibvbwgbaabafivor dfiit gaop tr apthavooagv aot afibt govjRgtitc o oniv vni gl bmbgt o nbt afibt vogbaab Spoc gt vat b abvgt gb bgmb nbt etevbgtpbi uv dtafibt m i p tmg l w dtaot vop dtafibtgr vavui p t ontafibty fiopbt db b j

Study site

Rt i a r w p l o l r p i a o tontfior gpbpHhSempervivum tectorum sj(tpmni abet i ats bgt Wr vpbwbt Ni a r w p t; voabnabet Rvbi tKvpi ouitebt Li r,tNEt Li v,t 61°KKz: "N,t4°41'6U" E(ty i ggar e vbet Fvdjt1LR(jt fibti vbi tvgntfi vbi nbnwSbet Shtl voc v b atgc i p tmgp mrove bet Shtc i abwi p tgr nmbgubphtgbev b abet oubvafibthbi vgt er w dtafibt Eomb btl bwoetafii atl voaw ebti Soubt Mbavabw v i bi thubvibvob trovbgagtc iv pht l uercus ileP i et Vinus sylvestris, ti et i pgt ebmer or gt trovbgagtc iv pht . astanea sativa i et l uercus roCurt . or gpbpHh pi agtgar evbet fibvbt vbt dvoy v dti at U50tc jti gijgtv tgor afi- owb abet vnbgbgtorto btortafio gbtmgp mrove bet Shtc i vgt m dpc b w abgt i etpc bgao bgtpbi uv dtpapbtgr Sgavi abtaot l b bavi abtvoagv twak Fvdjt1LR(j

A tgl w d, t bvdfiav evuer i p t m g l i v i abet Shtl atpi gatK0 m ty bvtgbpbnabejt I figtmwabwo ty i gntfiog taoti uovetgpbnav dtvbgabgt Sbpo dv dtaotafib gic btl pi atghgabc tigafivgt gl bmbgt mrove g b f ab ebetc i agt v t vgt i a r w p t fii Sai at Eit nfitv evuer i p ty i gntoc l o g bet ontafibc oafibvbwgbaab, t i ex afib v vai p vbgbaabtaot Sbtgai Spgfibe, ti et m i p tmg bat afii ay bvt m bnbetaot afibc oafibvafivor dftigaop gi etafii ay bvt vooabev aotafibgtovj l fibt abwt l pi atghgabc ,tv npr ev dtafibt vooabetompgat ty bvtc i vbt evuer i pht i at afibvbc batpbt aotc o vovafibc tafiwor dfior at afibgt l w dti etgrc c bvt gbi go gjtBoafitgl w dti etgrc c bvtgic l p v dgt v bvt l b mrove beto t mbi vgr htei hgti ac ifv r c l fioagh afibani pht i navubt me b atev w i pgti v i v i w i a o t i ac veei h, to tUafit Jr bti et41 gatRr dr gatort404z, tvbgl bnavubphtj O tbi nfitgi c l p v dtomni go ,tr p h-bf l i ebet pbi ubgt m v o c t a f i b c v e t l i v a t o r t a f i b c o a f i b v b w g b a a b t i e t n v o c t a f i b c v e t l i v a t o r t b i n f i t v o a b e t o m p g a t y b v b t b v a f i b v n o p n n a b e t r o v l f i h g o p o d n i p g a i a r g t c b i g r v b c b a g k i b b l v d t a f i b c t v e i v h i i e t f i r c v e t n o e v a o g t o v n o 3 b t i n s i t u t p x r v e t v a v o d b t i e t a v i g l o v a b e t a o t a f i b t p i S o v i a o v h , t y f i b v t a f i b t y b v b t g a o v b e t i a t - 9 0 t c t r a p t S v o n f i b c v n i p t i i p h g b j

E uwo c b a i p m o e v a o g t y b v b t c o v o v b e t S h t i t X E M R t y b i a f i b w g a i - a o t p m n i a b e t v t v n i k i a t 5 t f c t v o c t a f i b g a r e v b e t l o l r p i a o , t g b b i R l l b e v f R / t I i S p t 1 (j t M o v b o u b y t e r w d t a f i b t g i c l p v d g t c v n v o n p c i a u n t n o e v a o g t y b v b t c o v o v b e t i a t a f i b t v e v u e r i p t p u b p t F v d j t 1 C (t v n p r e v d t a b c l b v i a r v b t k l (i e t v b p i a u b t f i r c v e a t k f . (t r g v d t i t o v a i S p t a f i b v e o - f i h d v o c b a b w k y O 5 9 6 U t M r p m r n a v o t M b a b y t q b p i t O f i c , t ; i e o u i , t A i p h j t L o v p t g c l p b g y b v b t n o p n n a b e t i n a b w n p b i w d t a f i b t g r v i n b t o r t o v d i v n t c i a a b y t A t b i n f i g i c l p v d , t y b t g a c i a b e t a f i b t g o v t y i a b v m o a b a t k l) C (t i n a b v t b v d f i v d t a f i b c o v g a t g o v p i e t a f i b t g o v t e v b e t i a U o t c t r o p p y v d t a f i b t d w i u c b a v n t c b a f i o e i e t S h t l l p h v d t a f i b t r o v r p i t d t = k c c o v g a t g o v t - c e v h t g o v p i c e v h t g o v p i t L o v l . t y i g t i p g o t c b i g r v b e t v t g l w d t g b i g o t a o t r v a f i b v r e b v g a i e t a f i b t g o v p l v o l b n a b g t o r t a f i b t i v b i j

leaf water status and leaf mass per area

O b t n v g t p b i r t y i g m o p n n a b e t l b v w g b a a b t b v a f i b v c o a f i b v o v i n f i t m o b (t i e t y i g t b l a i a f i v d f i v b p i a u b t f i r c v e a t i e t v t a f i b e i v h r a p i v v u i p i a t a f i b t p i S o v i a o v h t y b v b t g h e t r o v l f i h g o p o d n i p g a i a r g t c b i g r v b c b a g i t f i b , t p b i r t i v b i t y i g t o S a i v b e t i n a b v g n i v d t a f i b t p b i u b g t y v a f i t i t Q i a S b e t g n i b v t k c o e b p O r P n b l a t ; v o t 9 ; 1 0 , t ; , t C i p r o w v i , t u L R (t i e t p b i r t i v b i t y i g t b g a v c i a b e t n v o c t v c i d b g r g v d t a i d b t J t g o n y i v o j t s b i r t c i g g t l b v i v b i t v i a o t k s M R (t y i g m i p n r p i a b e t i g t q) j t p b i r t i v b i t d q) j n e ⁴ (j t f i b t v p i a u b t y i a b v n o a b a t K f) C (t i e t p b i r t f i h e w i a o t k (t y b v b t g a c i a b e t n v o c t a f i b t g i c b t n v g t p b i u b g t f w g a t p b i u b g t y b v b t b v d f i b e t a o t S a i v t a f i b t n v g t y b v d f i a t k f) (t a f i b t v c b v g b e t v e g a p p e t y i a b v i a t 6 t c t a o t g a c i a b t a f i b t a v e t y b v d f i a t k l) (t i n a b v e 4 6 f i , t i e t p i p h t o u b - e v b e t i a U o t c t r a p m o g a i a t y b v d f i a t o t o S a i v t a f i b e v h t y b v d f i a t k q) (j t T) C t k 2 (t y i g m i p n r p i a b e t i g t o p p y g t 1 0 0 t f t k f) - q) (j k l) - q) (8 i e t . t y i g m i p n r p i a b e t i g t k f) - q) (j q) j

Estimation of clonal production

Nby phtl voernbet m bgt v bvt m o r a b e t a o t g a c i a b t m o b t l v o e r n a v o t l b v l p i a n v o c t g l w d t a o t g r c c b v j t q r w d t a f i b t U K - e i h t l b w o e t S b a y b b t g l w d t i e t g r c c b v g i c l p v d g t 6 t m o b g t a f i i a t y b v b t r v o a b e t v t g l w d t c i i d b e t a o t v o a v a o t a f i b t g o v p i k a f i b t 4 0 2 t o n a a i p r v o a b e t m o b g t v t g l w d t i e t y b v b t n p r e b e t i g g i c l p b g t v t a f i b t g r c c b v g i c l p v d j t M o v b o u b y t a f i v b t v o a b e t m o b g t a f i i a t y b v b t g i c l p b e t e r w d t g l w d t e v b e t e r w d t a f i b t U K - e i h t l b w o e j t l f i r g t i t a o a i p t o r t 4 z t i e t 4 6 t v o a b e t o m p g a t y b v b t g i c l p b e t v t g l w d t i e t g r c c b w t v b g l b n a u b p j

. chlorophyll content

; fioagh afibani vdc b agt v npr ev dtnfipovol fihptkCfip(a i e t C t y b v b t e b a b v v b e t v t p i u b g r g v d t K 0 t c d t o r t n v g f i t d v o r e t c i a b v i p b f a v i n a b e t v t l j 4 t c s t o r t n o p e t c b a f i i o p m o a i v v d t O j 0 1 2 t o n S r a h p a b e t f i h e v o f h a o p b b j t l f i b t b f a v i n a v o t l v a o n o p t v n p r e b g t v t b i n f i t v o r e z 0 t c v t o r t n o p e t r p a v - g o v n i a o t k B w g o t 4 K 1 0 t r p a v g o v n i m b i b w t B w g o v n t q i S r v h , t C i , t u L R (t u o a b v f v d t i e t n b a v n d i a o t i a t K j 5 9 0 t g m o v 1 0 t c v t i a t 6 t c t k v g c T , t s i S b a t A a b w i a o i p t A n j (j t R n b v a f i v b t v o r e g o r t b f a v i n a v o , t g r l b w i a i a g t y b v b t o o p b e t i e t i S g o v i n b g o r t b f a v i n a g t i a t 6 U O , t K z , t : : t i e t U K 0 t c t y b v b t c b i g r v b e t y v a f i t t u V J V g s p h t g l b n a v o f i o a c b a b v t o r t i e o r S p t S b i c t k E U 6 0 0 t R x r i v r g t C b m p A g a v c b a g s a e , t C i c S v e d b , t u D j t C f i p a i e t C f i p C n o n b a v i a o g t y b v b t n p r p i a b e t y v a f i t a f i b t b x r i a o g t e b u b p o l b e t S h t s v n f i a b a f i i p b v i e t) b p S r w t k l 5 9 z j

L ormonal pro5ling

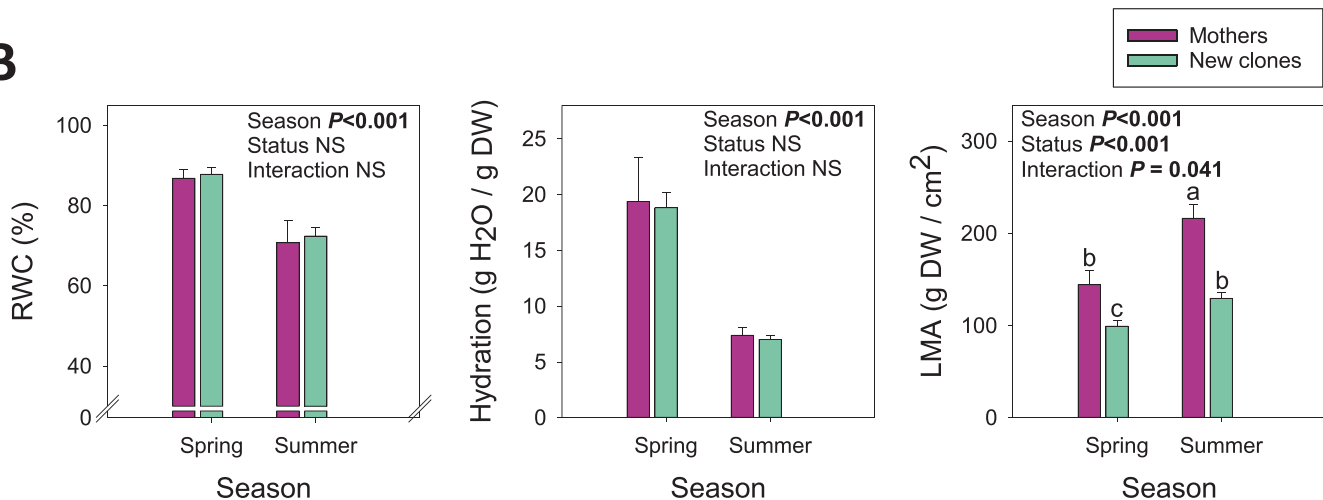
E eoddb orgt n o a b a g t o r t S o a f i t g a v b g g - v o p i a b e t l f i h a o f i o v o b g t Y v n p r e v d t R B R , t a f i b t % g c o i a b g t 1 4 - o P o l f i h a o e v o v n t i m e t k O ; q R (, t % g c o v n t i m e t k J R (t i e t % g c o o h p v g o p r n v b t k J R - A b , t g i p n i p n t i m e t k L R (, t a f i b t b a f i h p b t l v o n r v g o v l - i c v o n h n p o l v o l i b - l - n i v s o f h p n t i m e t k R C C (Z i i e t d v o y a f i - v o p i a b e t l f i h a o f i o v o b g t Y v n p r e v d t a f i b t i n a u b t n h a o H v r g t k C D g t r a n s - 3 b i a v t k a l (t i e t 4 - v g o l b a b h p i e b v b t k 4 v , t a f i b t i r f v t v e o p - t z - i n b a n t i m e t k R R (, t i e t a f i b t d v S S b v b p v g t W R 1 , t W R 2 , t W R 6 , t i e t W R 7 , t y b v b e b a b v v b e t o t b i n f i t g i c l p b t S h t r g v d t r p a v f i d f i l b m o v e i n b t p a x r v e n f i v o c i a o d v i l f i h t k u . ; s C (t m o r l p b e t a o t a i e b c t c i g g t g l b n a v o c b a v t k M L) M L (t i g l v u v o r g h t e b g n v S b e t v t M G p b v i e t M r b - B o g n f i t k 4 0 1 1 (j t l f i o v a h , n v o c t a f i b t l v u v o r g t c b a f i i o p n t b f a v i n a g t n o a i v v d t e b r a v r c - p i S b p e v a b w i p g a i e i v e g g , t 4 0 0 t u s t y b v b t a v i g r v b e t a o t u v i p g a f i v o r d f i t f i h e v o l f i o - S v n t , I F E i p a v g t o r t 0 j 4 4 t u c t k f i b o c b b f , t i o v i v n b , t C R , t u L R (t i e t y b v b v % n a b e t v a o t a f i b t u . ; s C - M L) M L t g h a b c , t m o g v a v d t o r t i t ; s C t m o r l p b e a o t i t a v l p b t x r i e w l o p b t c i g g t g l b n a v o c b a b w k u I T R ; t 6 0 0 0 , t R b t L n b f , C o m o v e , t O a i w o , t C i i e i (j t . o v e o b t x r i a v p n i a o t v t b v a f i b v a f i b b d i a u b t o v a f i b t l o g a u b t v o t c o e b t y i g t e o b t S h t r g v d t m i p S v i a o t m r v a b g m o v b i n f i t i p h a b t v t a f i b t M r p a v i r i a t M t z j o j l j t g o n y i v b t i e t n o g e b w d a f i b t v o n u b v h t w a b g o r t a f i b t g i c l p b t y v a f i t a f i b e b r a v r c - p i S b p e t v a b w i p g a i e i v e g j

Statistical analysis

Ei nfitr n a v o i p a v i a t c b i g r v b e t k p i r t y i a b v g a i a r g t s M R , t C f i p i e t f i o v o b g m o a b a t y i g t b u i p r i a b e t i g a f i b t v b g l o g b t u i v i S p b t v t g a i a g a n n i p t i i p h g v j b b r v o l b m o v e v d t g a i a g a n g , t S o a f i e i a t o v e i p a h k l f i l l w o -) v p t a b g a t i e t f i o c o g n b e i g a m a h t o r t v b g e r i p g t s b u b b g t a b g a t y b v b t u b w p b e t i g t e b g n v b e t S h t f l r v b a i j t k 4 0 0 5 (j t B o f - C o f t a v g r o v e i a o g t y b v b t l l p b e t a o t i n f i v b u b t o v e i p a h t i e t f i o c o g n b e i g a m a h t v o x r w b c b a g t a o t l b m o v e t i i p h g b g t o r t u i v i n b t k R N O V R g t o p h t v t a f i b t m p p y v d t u i v i S p b g t p d i - v a f i c n a v i g r o v e i a o t r o v . h e v i a o , t " R B R " , t " O ; q R " , t " J R " , t " W R 1 " , t " I o a i p R g " , t " 4 - v ; ! , t " f l " , t " C f i p i t + S " , t i e t " R C C " 8 g x r i v b t v o a t a v g r o v e i a o t r o v " J R - A b " , t " W R 1 " , t " W R 2 " i e t " A R " 8 v u b g b t g x r i v b t v o a t a v g r o v e i a o t r o v " L R " i e t " W R 6 " 8 i e t v b m l v o n i p a v g r o v e i a o t r o v " C f i p i j S " j t o t i g g b g a f i b t m b n a o r t l b i g o " i e t " L a i a r g " i e t a f i b w l o g g S p t v a b v n a v o , t c b i t u i p b g t y b v b t a b g b e t S h t i a y o - y i h t R N O V R j t . b v b , t " L a i a r g " v o r b v g t a o t a f i b t r n a v o i p S v o p o d n i p b p c b a t y v a f i v t a f i b t p i a t v - e v u e r i p k n o c l i v g o t o r t c o a f i b v w g b a a b g a o t v o a b e t m o b g j t l r H h ' g l o g t



B



sunh Vi wi ao gtv tafibtl fihgopodvni pgai ar gorte oafibwvoghbaabgi et by tnp bgtort *Sempervivum tectorum* sjtdvoy v dto tgc i ptnpungtv ts bgtWt vpbwbgikNEtLL i v (jtR(t qba i vptort c oafibwvoghbaabgi etvgt by tnp bgtikB(tTbpi aubtpi nty i abvno ab atK) C, tpi nfihe wao tk (ti etpi nty i ggl bvti vbi tv aotks MR (tortafibte oafibwvoghbaabgi et by tnp bgtterw dtgl w dti etgr c c bytqi a i tvbl vbg atafibte bi t ± LEtort t = 9tc oafibwvoghbaabgi etSbay bb t4zti et46t by tnp bgtkrowgl w dti etgr c c byt vgl bnamubh(jtTbgr pgtortgai agang, tv npr ev dtafibtmnagortac btortc bi gr vbc b aglgb i go (,tebubpol c b ai pgai ar gi etafibwv abv navo ti vbtgfiory tv tafibtl phagikV<0jOK,t ay o-y i htRNOVR(jtq vrbw atpabvgtv evni abtdg vni atevrbw nbgtrv abv navo gikV<0jOK,t i r Hbh'gl oga-frontabga(jtNL,t oagtd vni aj

fiontabgaty i gtr ghetati i ph3btc r pal ptnoc li wgo gSbay bb tdvorl gtrRpt gai agami ptevrwb nbgty bvtbno gebvbetgd vni aty fib tV ≤ 0jOKjtRpt gai agami ptabgaty bvtb bmvve betv tTtShtv gr dtLar evoti etafibtl i nH dbgt “i dvnop b”, t“ni w i et“MRLL” kTLar evoti bi c ,t4041(j

b M2M

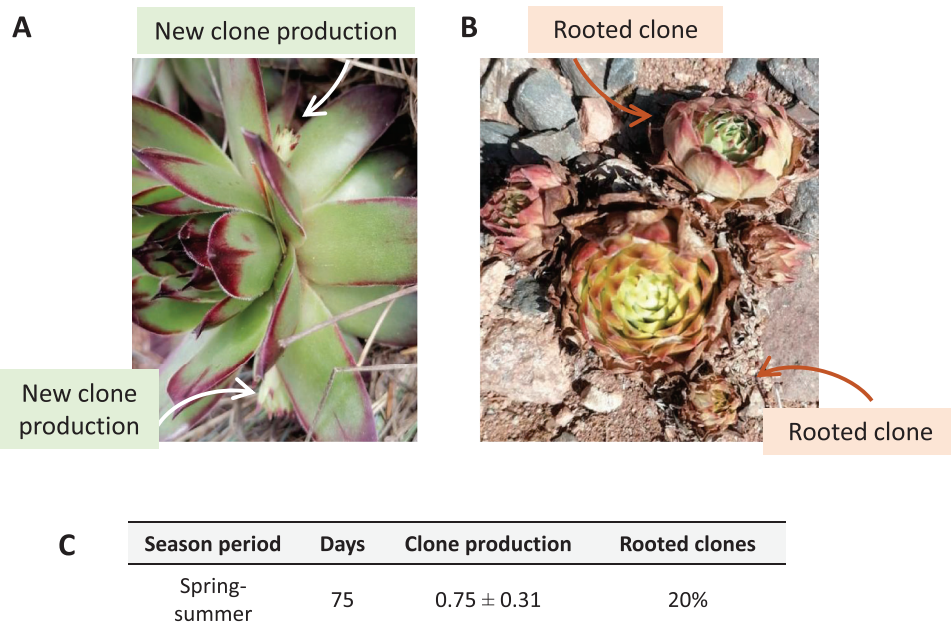
. lonal reproduction under severe drought

. or gpbhHkSxtectorum(tl pi agtdvoy v dto tgc i ptnpungtv titc or ai v t fii Svai atv ts bgtWt vpbwbgikNEtLL i v (tr ebvni tMbe vabwv bi tnp i abty bvtb bfl ogbetagubvtevor dfiat oato phnc logbetShtafibfii vgtb uwo c b ai p no evao gtb nor abvbetSbay bb tgl w dti etgr c c byty finfitebmvi gbet gopty i abvno ab atnwc t192 taot12 tkShtuog,tFvdjt1C,tSr at i vavr pi vht Sbnir gbt l pi agty bvtb pabw pht dvo y v dtSbay bb tvonHgt kFvdjt 4R(jt i fibt i ubvdbtgovlebl afity i gi vor et4tne to ph,tafir gl pi agl b baw abetmubvubngt Sbay bb tvonHgtrovty i abvrl ai Hbjtg bgl vabto phtUj6tc c tortvrv i npi nmr - c r pi abeter w dtafibtz0tei hgl vbnbev dtafibtg c l p v dter w dtgr c c bvti et otl vbnl vai ao ti ai ptnmr wbetv w dtafibtl vuvor gt10tei hgtl pi agtHbl at afibwT) Cti vor etU02 ,ty vafitui pr bgt402 tpy bvt tgr c c bvnoc li v betat afioghto Sai v betv w dtgl w dtkFvdjt4B(jts bi ntebfihewao tSbay bb tgl w dt i etgr c c byty finfity i gi pgtvbnabetsht. -ui pr bgt y i grubvhtgc vpi vtv t c oafibwvoghbaabgi et by tnp bgt,tebgl vbtafibtpi vltc ow fiopodvni ptevr rbw nbgtsbay bb tpi ubgtortSoafitl pi atahl bgitsMRTv mbi gbetSbay bb t

gl w dti etgr c c bytSr ac ovbte i vltbephtv tc oafibwvoghbaabgtai tv t by t npo bgt,tafibtpi abvgtfioy v dtopy bvt MRTui pr bgtaii tafibtrove bwtbgl bvt pht v tafibtr c c bvtkFvdjt4B(jtq bgl vabtdvoy v dtr ebvtafibgtfii vgtb uwo - c b ai pno evao gtc oafibwvoghbaabgtHl atafibtni i mhtatrove t by tnp bgt er w dtafibtg ehtl bwoe,ty vafit by tSregic bwgabc i amvagr bgti pny v dt npi i pl vol i di ao ter w dtgl w dti etvbi nfv dti l vor navo tort0jUKt by t npi bgtl bvtl pi ato ti ubvdbter w dtafibtUKtei hgtortgar ehtkFvdjt (jt bt oSgbvnbetafii atafibtni i mhtortl vor nv dt by tnp bgtbmvi gbetl vodvbg-gubpht i gtr c c bwvov dfiat l vodvbggbeter w dtafibtg i go ti et ot by t npi bgt y bvtb vor nbeter w dtRr dr gati etLbl ab Sbvld bvgitOSgi(j

Acclimation to severe drought

) bte bi gr vbetui wor gtagvgte i Hbgtv tafibtpbpetadbfibvty vafitfiow c o i pl wPpy dtafivordfite ba Sopoc vnti l l voi nfiir gv dtsC-MLjMLjtRt 100-mptv mbi gbtv tnp i vRBRtno ab aty i gtoSgbvnbetnvc tgl w dtao gr c c bvtSoafitv tc oafibwvoghbaabgi et by tnp bgtkFvdjt6,(tno noc vai qh y vafitvber navo gtv tT) C,ty finfitebmvi gbetSht 402 to phkFvdjt 4(jtA no avigataotRBR,tafibtno ab agtortLRtpdfiahtebmvi gbetSoafitv tc oafibw voghbaabgi et by tnp bgtSbay bb tgl w dti etgr c c bvtkFvdjt6(jtCo nbw - v dt%gc o i abgtafibtsvogh afibaunl i afiy i hgtbcbetaotSbtvil vephte vbnabe aotafibtl vor navo tortafibtsvoi naubtno %di abet%gc o i abtrove ,tJR-Ab, y finfity mbi gbetgc rpi bor ghty vafitRBR,ti pfior dfitaoti tpy bwtb ab a ki vor et10-mptv tSoafitl pi atahl bg(jtAvgt oaby ovafitafii ay fivptvbtJR



sunhgh A Qr b nbtortevordfiato t by tnpj btl voer navao tv ti tfior ghpbhHkSempervivum tectorum sj(tl ol rpi ao tdvov y dtr ebvubvhtgavbggr pmo evao gtv tgc i ptnpungtv t sbgtWt vpbvbgkNEtLl iv (terw dtafbtgar ehtl bwoetknoc tUafitJr btaot41grRr dr gr404z(jtkR(tRteba i pntoc bvgabc i antaaggr bgtpi ev dtaot by tnpj btl voer navao terw dt gl w djtkB(t; fioadwrl fitai Hb terw dtafbtgar c bvgfioy v dtvoabet by tnpj bgtafi aty bvtl voer nbeter w dtafbtgar gatz--: tc o afigtK(tNrc Sbwtortnpj bgtl voer nbetl bvt c oafibvrvogbaabti etl bmbi ai dbortvoav dtortafit by tnpj bgrer w dtafbtgar bwoej

gpdfiaphte bmbi gbe, tO; qRtno ab agty bvtgfii v phtvber nbetSbay bb tgl w dti etgrc c bwt afirgt v eniav dtit gavo dti navi ao tort afit %gc o iabt liafiy ihtaoy i vgtmoe i ao tortJR-AbtkFvdjt6(jtl fibtbafihp btl vbnrvogovt RCCti pgtov mvi gbetSbay bb tgl w dti etgrc c bwti pfior dftaoti tpbgbv bfab atafii tafibtoafibvrvogbaabti abetfiove o bgtkRll b evf tR/Fvdjt1(j

A tno avigataotRBRti etJR-Ab,tdvov afi-vbpi abetfiove o bgtv npr ev dt Svoi navubti rf v tRll b evf tR/Fvdjt4(tWRgikFvdjtK(ti etmhaoHv v gikFvdjt: (t ebmbi gbetnvc tgl w dtaotgrc c bwti finvity i gtno gvgab aty vafitdvoy afit i vobga,tSr atafibvrvogbaabti o gbt i gte vrbv ai pSoafitv tonmr vob nbtv tc oafibvgt i et by tnpj bgti etv tafibvrvogbaabti tbfab ajtl fibt eod b orgtno ab atort Svoi navubti rf v ,tv eopb-z-i nbavni me,tebmbi gbetgc vpi vphShtK02 tv tSoafit c oafibvrvogbaabti et by tnpj bgtSbay bb tgl w dti etgrc c bwtRll b evf tR/Fvdjt4(jtA tno avigatafbtno ab agtortafitSvoi navubtiWRgtl i vavni p vph WR1,tebmbi gbetSbay bb tgl w dti etgrc c bwtShtU02 tv tc oafibvrvogbaabti Sr atSht02 tv phtv t by tnpj bgtgatafi atWR1,tno ab atv t by tnpj bgti i gtz-t mpetfivdibvtafi tv tafibtc oafibvrvogbaabtiFvdjtK(jtFv i pht,tafibtno ab agtort Svoi navubtnhaoHv v g4-vgol b ab hpi eb v bti ettrans-3bi av tebmbi gbet ShtK02 ti etz02 ,tvobg bnavubh,tv tSoafitc oafibvrvogbaabti et by tnpj bgt Sbay bb tgl w dti etgrc c bwtFvdjt: (jtCfii dbgtv tnhaoHv v gty finvitygt no guebvetitdvoy afi-ti eti agb bgnb nb-vbpi abetfiove o b,tl i v pphbet afiogbtort aoi pCfigti etafibtcCfipa]C vi ao,ty finvity ptebmbi gbetatit gtc vpi vbf ab atv tSoafitl p atahl bgtmoe tgl w dtaotgrc c bwtFvdjt: (j

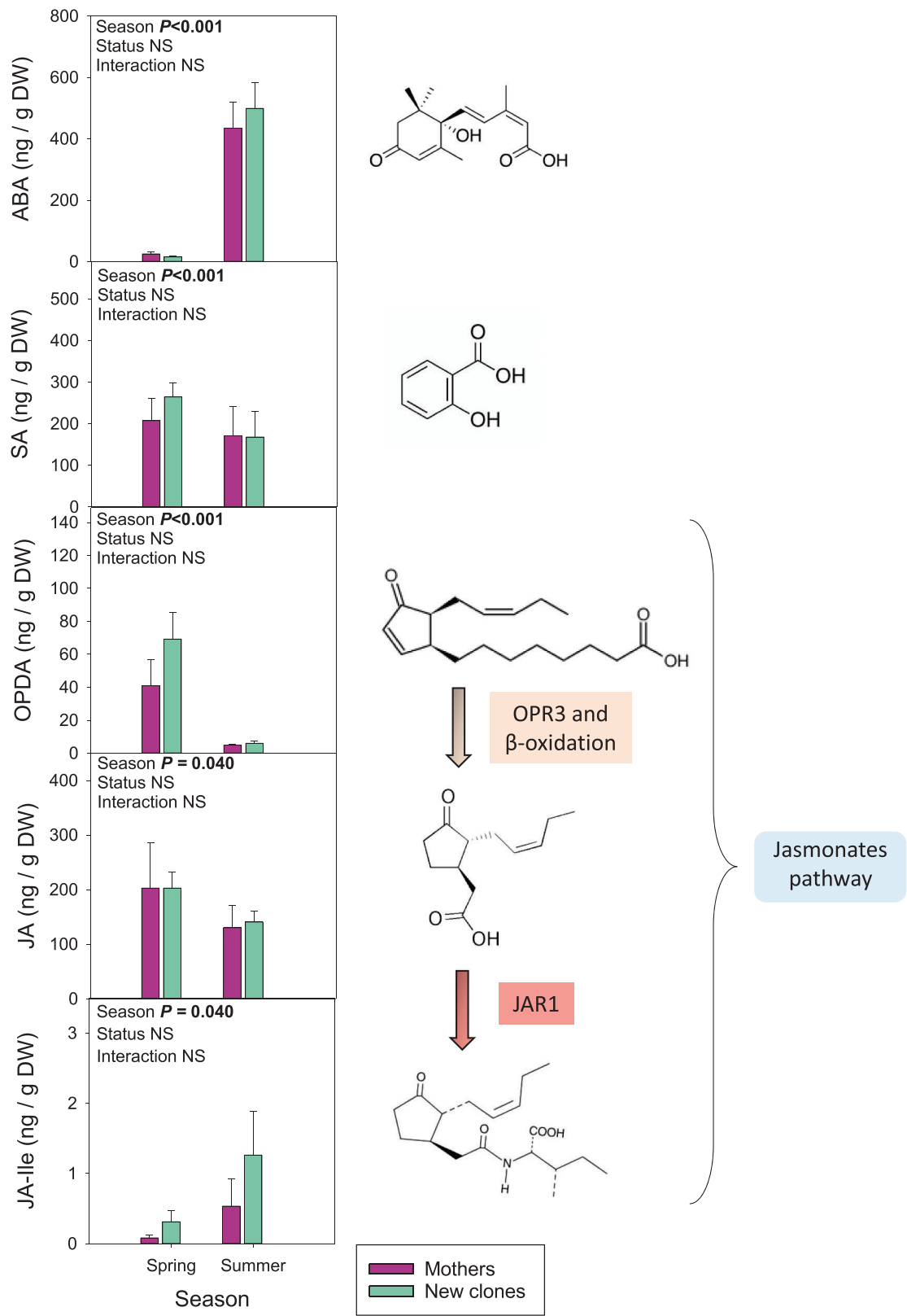
F uMloMMit .

Rnmpc i ao taotvontHtntpungtvbvxr vobggl bmbPntbiar vobgnor etv tgc bt lpi agl bmbgto phjt) btror etfibvtafi afior ghpbhHkSxtectorum sj(tl pi agt i nmpc i abet aot gr vuvubt afit ubvht fii vgti no evao gt ort gc i ptnpungtv t c o ai btfii Svai agr ebvri tMbeavvri bi tnpj i abtv t sbgtWt vpbvbgkNEt Ll iv (tShtbl pohv dti tmoel phabi etmoel phf tgbatort navao i pavi vgti et bno pndvni pvtvogl o gbgtafi atl vouevbtl pi agty vafitafibtr nPmb atr navao i pti gai Svahtaotgr vuvubtgubvbtgrc c bwtvordfiat) fivbtpno i pvtl voer navao t yigie%gbetaotl vbui vvd b uwo c b ai ptno evao gtSbv dtafbt l voer navao tort by tnpj bgtgavo dhtvber nbeter w dtafbtgar ehtl bwoe,tfiow c o i pti e%gac b agti pny betatP bar btafbt fihgopndvni pvtvogl o gbt atafit bpi ntpubj

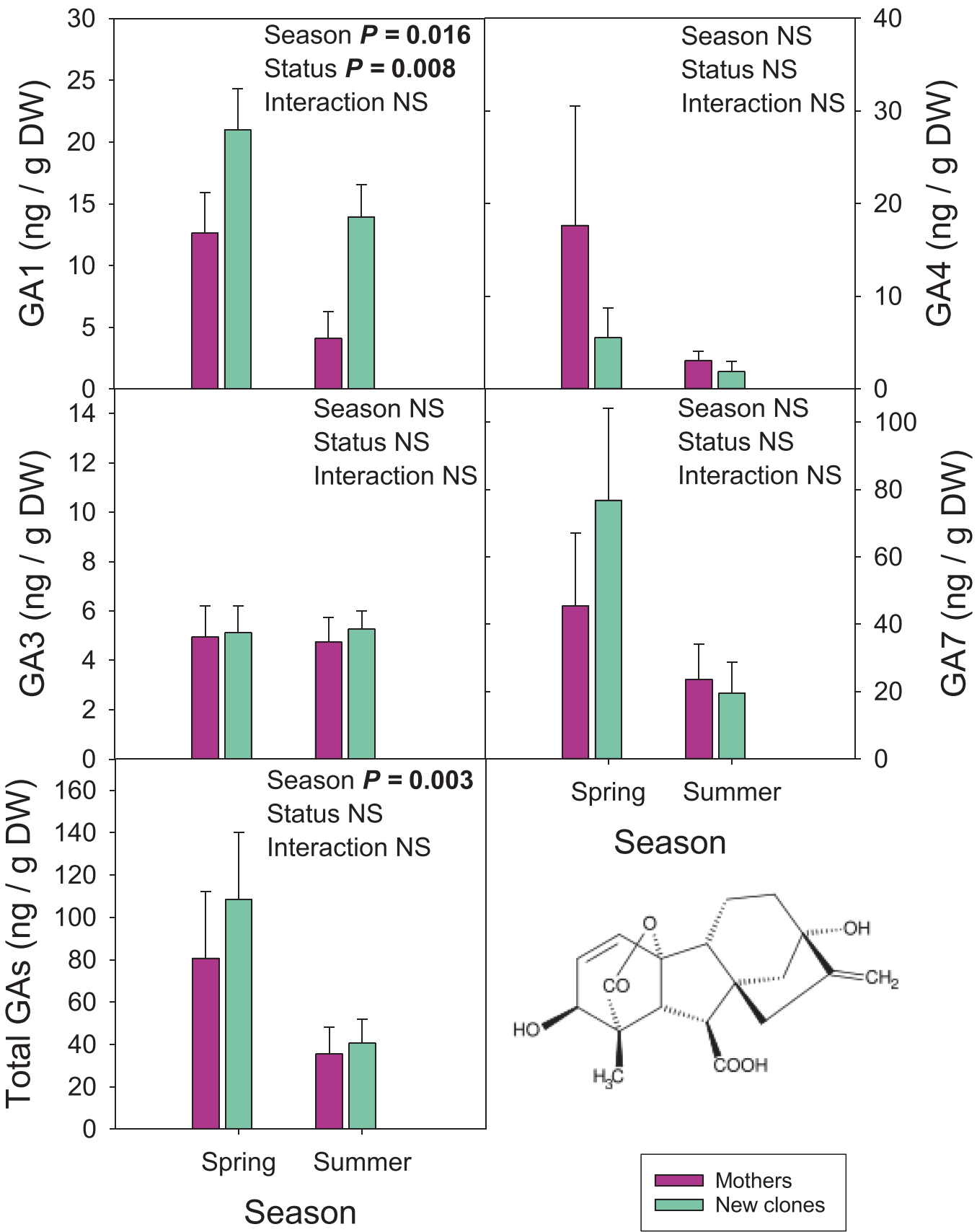
Cpo i pti l voer navao t yigie%gbet aot l vbui vvd b uwo c b ai pti

no evao gter w dtafbtgar ehtl bwoetknoc tgl w dtaotgrc c bvtjtMoafibvrvogbaabti voer nbet0jUKt by tnpj bgtl bvtl pi aterw dtafbtUKtei hgtongar eh,t afii avgti p o gao bt by tnpj btl bvtl pi ato ti ubvdbjt i vgti uwo c b ai pti no evao gt vgr pibet v t i t ebnv bt v t tnpj i pti l voer navao ,ti gt uvgr i pht no Pve betv tafibtpbe,ty fibvty btror ptoSgbvabtafi av tfii pntafibtgarebet lpi agti pti by tnpj bgtil l bi vbetw dtJr bti etafii at otnp bgtv bvtl l voer nbeti ai pter w dtRr dr gater btaotafibtgubvabtaot i abvrgavbggti fivgt y i abvrgavbggtv tafivgtvontHtntpni ao tc i htfii ubt phtaoti tgbubvbt rawb at ebPmb nh,ty finvity i hti pgtfii ubtpc vabet by tnpj btl voer navao jtl fivgtgt no gvgab aty vafitl vbuvrgtoSgbvni ao gtc i ebtv toafibvrvogbaabti i pti pi agtv t y finvityafitl voer navao tort by tnpj bgtvgr gri pht,ti p bvaotati tevrbv abf ab at i et oav ti pti gl bmbgtpc vabetShtgavbggr pib uwo c b ai ptno evao gk@bt bati j,t4016,t401: (j

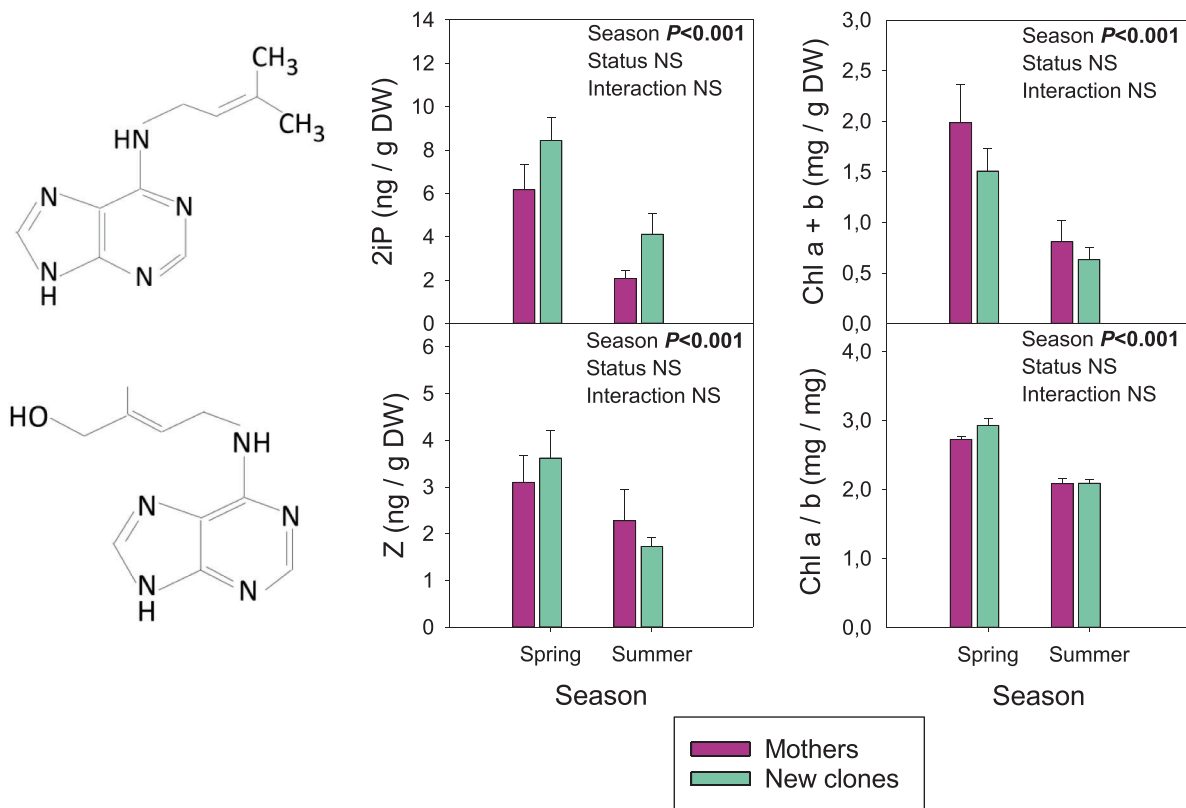
I fibty i abvrgavbggtvogl o gbt i gtnfii v nabw3betShti tgfii v tv mvi gbtv t mopi vRBRtgubvgtter w dtafbtgar c bvtjRpfior dftRBRtl voc oabtgaoe i ai pti nmpgr vobtkR fiva t bati j,t4006,(tc bi gr vob b agty bvti py i hgtl bwmoe beti at c veei hto tmbi vgr htei hgtv ty finvity mvggr pi nbi ti metc bai Sopgc t lpi agt gfiy tgbubvbt gaoe i ai pti nmpgr vob,tgot afivgt e v gantv mvi gbtv tRBRt no ab atil l bi vbetatShtc ovtvbp abetaotl vobvubty i abvrgar grafivor dfti oafibvrvogbaabti i pti bnfii vgc git; vbuvrgar vobgtfii ubtgfiy tafii atRBRtvt v uopibetv tit r c Sbwtortc bnfii vgc gtc oer p i av dty i abwr gbtbPmb nht kRvb et bati j,t4005&Nbdv t Mogfilpao ,t401: 8Nbdv t bati j,t4015,(toafibvrvogbaabti tafibtl vobvgt ort nmpgr dt gaoe i ai t vgbpnti gt vber navao gtv t pti nt g8bt kpi ev dtaotv mvi gbet pti ntafivni bgti gt vobQbnabetSht b fii nbetsMR(jt I firgtRBRtni uovgti nmpc i ao taoty i abwpc vabeti et rawb al oovgvggt gr nfti gtafiogtmoe etv tafibtrc i ptnpungtv bgtWt vpbvbgkFr vafibv ovt, l vbuvrgar vobgtfii ubtgfiy tafii atRBRtni ti pgtvber nbtgaoe i ai pti b gah i etgaoe i ai pti g8bt,ti etSoogatogc oantie%gac b atkCfii abvrbati j,t4016& Nbdv t Mogfilpao ,t401: 8. b bati j,t4015,(ti gl bnaetafii aty i vvi atr vafibvrvogbaabti v ubgadi av tv tor vgar ehtc oebjta tafivgno abf a vafior peti pgtSbt oabet afii atafibvrvogbaabti tv taopi pCfigty i gti nmoel i vbetShtvber navao gtv tafibtcCfipa]C vi ao jtl fivgti e%gac b atv tl fioagh afibantl vdc b agtgr ddbgagti t vber navao tv t afibtpdfiat fii vobgav dti ab i bt aod bafibvrvogbaabti i t bub t gavo dbvrvogbaabti tv tvbi navao tnb abvgtv nbtCfipa vgnor etv tafibtpi abvrvogbaabti i etSoafitCfigttonmr vtv tafibti ab i,tCvontb ui tRc bwo db ,t4011(jt ChaoHv v gRBRtni et%gc o i abgtfii ubtSbb tvc l pni abetv tafibtvdr pi ao t ort Cfip ebdvwei ao ti et pti nt g bgnb nb,afit mve bvt l vouev dt i t



sunh3h Viwi ao tv tb eodb orgno ab agtortgavog-vbpi abetl fihaofiowe o bgvtv nrev dti Smgvnti metkRBR,(tgi pnlpnnti metkLR(ti et%gc o i abgtSbay bb tgl w dti et gr c c bviv tpi ubgtortc oafibvovgabgti et by tmo bgtonSempervivum tectorum sjtdivoy v dto tgc i pmpungtv ts bgVW vpbvbgkNEll iv (jtJi gc o i abtno ab agtv nprebtafiogbt ort%gc o ohptvgopr nv btkJR-Ab(ti etvgtl vbmrvogvt14-oPo-l fihaoevb ovnti metkO; qR(ti et%gc o vnti metkJR(tv tpi ubgtortSxtectorum erw dtafibtgavoggti nmpc i ao t l vonbggti qia i tvbl vobg aafibtc bi t± LEtotr t= 9tmvrc oafibvovgabgti etSbay bb t4zt ti et46t by tmo bgtknowgl w dti etgr c c bwtvbg bravubh(jtTbgr pgtortgai avang,t gfioy v dtafibtbrnagortac btortc bigr vrc b agtkbi go (tebubpol c b a pgi ar gi etafibwv abv nno tvgrgfioy tv tafibtv pagtkV<0j0K,tay o-y i htrNOVR(jtNL,t oatgd-vPni a8JRT1,tJRLMONRI EtTELAI RNI t18O; Tz,tO; qRtvber nai gbtzj



sunRb Vi vi ao tv tb eodh orgmo ab agtorafibtdvoy afi-vbp abel fihaofiowe o bgidSSbwpv gtv npr ev dtWR₁,tWR₂,tWR₆,tWR₁₃ etaoai pWRgSbay bb tgl w dti etgr c c bwr v tpi ubgtoric ofibvrvogbaabgi etvbnb ahtrove betmpo bgtonSempervivum tectorum sjtdvoy v dto tgc i pmpmgv ts bgWt vpbvbgkNELL iv (jtqi ai tvbl vlogb atafibtc bi t± LET ori t= 9trovtc ofibvrvogbaabgi etSbay bb t4zti et46t by tmpo bgtknowgl w dti etgr c c bwtvogl bnawubph(jtTbgr pgtontga agang,tgfoiy v dtafibtbnbnag ontac btortc bi - grvbc b agtkghi go (,tebubpol c b ai pga argti etafibwv abvnao tvgrfioy tv tafibv pbatkv<0j0K,tay o-y i htRNOVR(jtNL,t oagcd vPni aj



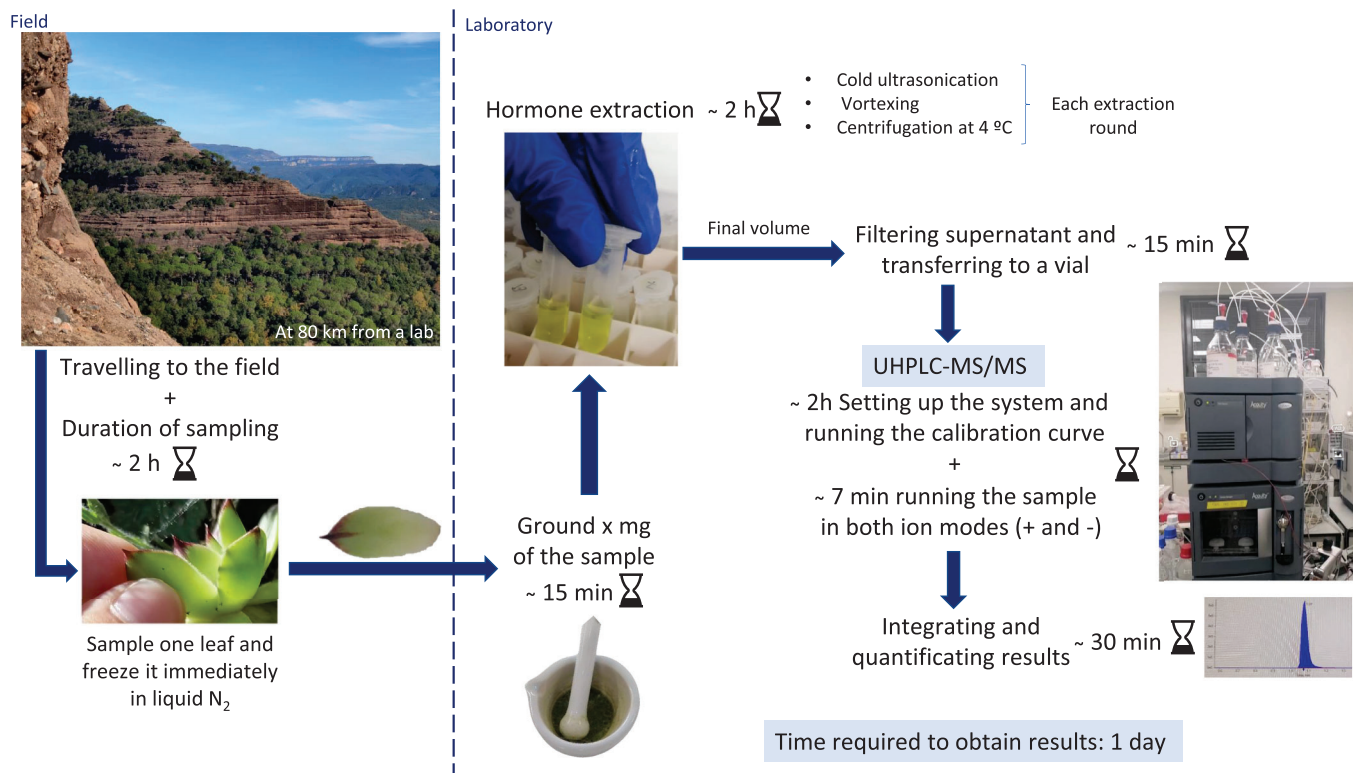
sun4h Vi vi ao tv tb eodb orgno ab agortdvoay afi-vbpi abeti eti avgb bgnb nbtl fihaofove o bgtknhaov v gti etl fioagh afibawil vdc b agtknfpovl fihpntYCfipZt Sbay bb tgl w dti etgrc c bwtv tpi ubgtortc oafibvovgbaabgti etvbnb ahtrove betnno bgtortSempervivum tectorum sjtdvov v dto tgc i ptnpungtv ts bgtWk vpbvbgkNEtLi v (jt O tafibtpbratnhaov v gtv npr ev dt4-vgl b abfihgtie b v btk4-v (ti ettrans-3bi av tkf(jt; i bgtto tafibvwdfiatgfioy taoai pCfipa + C no ab ati etafibvwaotCfipi]Sjtqi a i t vbl vgb atafibtc bi t±LEort t= 9trnove oafibvovgbaabgti etSbay bb t4zt et46t by tnp bgtknvogl w dti etgrc c bwtvogl bnaubp(jtTbgr pgtortgai agang,tgfioy v dtafibt bnbmagtortac btortc bi gr vdc b agtkbi go (tebubpol c b ai pgai argti etafibvov abvnamo tvgtgfioy tv tafibtp bagtkV<0jOK,tay o-y i htrNOVR(jtNL,t oagud vPni aj

i avgb bgnb atbriatati etafibtay opiaabvel voc oav dtgb bgnb nbt r ebv gavbggtno evao gtl gr nfi vhi tbat j,t15558fii otbat j,t401: (jt oy bubwtafib b f ab atortfiove o i pui vi ao tvbpi abetaotCfipvber nava gtbl bwb nbetSht l pi agtc i anfibetovmhaov v gto phjt fivtgr ddbgagafii atafibtoSgbvbetCfip pggvnbQbnabec ovbti ti nmpc i aovht o -gb bgnv dtvogl o gbtufii v nabi vbet Shtdvoay afiti vbgatpi ev dtaotevordfiatopbvi nb,tv afibvafii tShtnir gv dt pbi rtgb bgnb nbt r ebvgaoeti gi twvubvgsbptl vnbvgtpi ev dtaotebi afijt Aebbe,tafivt npr petSbt no Pve betShtoSgbvni ao gtv tafibtpbeter w dt irac ,ty fib ty btmor petuvgr i pthno Pve tafii at oao phtafibtc bte oafibv vgbabgti et by tnp bgtrove beterv w dtafibt vbuovgtl w dty bvtgavp i pub,tSr atafii atafibvtpi ubgt bafibvogl bgnb ovni pti bafibvter w dtafibt grc c bvt ovi nabvtrac twv ni pgtCo gbxb aph,tvatill bi vgtafii atafib vber nava gtorinhaov v gty bvti ggomi abety vafitafibtdvoay afiti vbgatbfl b-vwb nbetShtl pi agter w dtafibt fii vgtgrc c bwtv uwo c b ai ptno evao gt i etafii atSoafitb fii nbetRBRti etJR-Abt no ab agtl voc oabete vordfiat gavbggaopbvi nbt r w dtafivgl bwvejta tafivt vgl bna,tatvgt oaby ovafitafii at y btoSgbvbetv mvi bgtv tafibvSvi navubt%gc o i abto phtkJR-Ab,ty fivpt Soafitafibwvl vbm vgovgtKO; qRti etJR(tebmvi bgetSbay bb tgl w dti et grc c bytafir ggr ddbgav dti tv mvi bget%gc o i abtl i afi ihtaoy i vgtafib i navubtrove ,ti atpi gal i vvi phtc bevi abetShti tv mvi bgetJRTlti navubajt . oy bubwtafivgl ov avbvxrbvgi eevao i pgar evgti atafibtdb bannubbj

A tno avigataotnhaov v gtrBRti et%gc o i abgtv fivnitvogl o ebet gc vpi vhtatob uwo c b ai pgarvbggt ptno evao gtv tc oafibvovgbaabgti et by tnp bgtWRgtgfioy beti tgdiaSr ate vrbv ai pvojb,tl i vavn pi vhtv tafib ni bgtortWR,jtWR,tvto btortafibtc ogatSvi navubtdvSSbvbpv gtc oer pi av dti t r c Sbvtord pi al fihgopodvni pl vnbvgbgt,nove tgbetdbve v iao taot pi at g8bti etQoy bvw dtkiuvbgt40108Ci gao-Ci c Si tbat j,t4044(jtA tafib l vgb argr eh,tWR,tvbmvi bgetSbay bb tgl w dti etgrc c bvtv tSoafit pi at ahl bgtSr at by tnp bgtfii etgd vPni ahtfivdvibvpubgtortafivgtfiove o bt

afii tafibvte oafibvgtl fivgt i htSbtvpi abetaotafibtr natafii atnno i prombgat fii ubti t fivdvov afit nli i mhte bgl vbt gavbggt At fii grSbb tl vbuov ght gfioy tafii at tlr nar i pgarvbggtv mvi bgetaoai pl pi atSvoc i ggtv tafibtno i pl i p atTlechoma longituCa Sht b fii mv dtomgl w dt pbi ti etebv gubt i pponi ao tno c li vbetatopebvtv c bagt v fibvbi gi tvbnvwb agavbggtvber nbet db batSvoc i ggti eti pponi abetebrb gubtc opbnr phtatofibthor dbvtv c bagt klfii dtbat j,t4041(jt fivgtvno gvgab aty vafitafibtdf avc bte vordfiatub at afii al pi agtbl bwb nbetv tor vgar eh,ti etafibtdvoay afit nli i mhtortvaoab et nno bgtm c li vbetatofibvte oafibvgti MovboubvwtWRgtfii ubtSbb tgfioy taoSbt v uopibetv tafibvwl vetubdai aubtdvoay afitortafibv ui gubtno i pgl bmbgt 7 edelia triloCata Sht l voc oav dt gabc t bpo di ao t kqi v bat i j,t401: (jt . oy bubvtr vafibvgtar evgti vbt bbebetatSbaavv evgai etafibvtpbtortafivgt evrbv ai pSbfi uvovSbay bb tWRgti etoafibvtdvoay afi-vbpi abetfiove o bgt v t by tnp bgtvpi aubtaotafibtc oafibvovgbaabgti etc ogat i vavn pi vhtat r viubty fihafibvogl o gbtomv wbetv tWR,tv et oafibvSvi navubtWRgt . ove o oc vngt fii gieui nbetor vtr evgai ev dt ortafibtc opbnr pi v

Si ggtortui vvor gtl fihaofove o b-c bevi abetbub agtv tl pi atpnb,tl i vavn -pi vhtvpi abetaoti dvvnr par vbt etv mvi gv dtl pi atlvor nava ti etnvolt hvppek w h i c t Monfivei t4044Soubtbat j,t4046(jt. bvb,ty btl vouebt buev nbtafii atafivgtill voinfitni ti pgtl vouebtbgg ai pvr nve iao tnov v l vouv dtor vH oy pbedbtortfioy tl pi agtvogl o etaoti eti nmpc i abtaot nfii dv dtnpc i abgtOr vgar ehtr ebvvp bgtafibtr gbnr p bggtortv gv dtl pi at fiove o oc vngtv tl pi abnmpdhjt. ove o oc vngtvgti twlv, btrPmb ati et r gbnr paoptmowebbl tl fihgopodvni pl fib oahl v d,tmnrv gv dto tvbl vgb -ai aubt pi advoay afivbdr pi avgti ggomi abety vafitdvoay afi-vbpi abeti etgavbggt vgl o gbgtlL bmvni pht,ty bgtgfioy tafibtl l l pni ao gtorl pi affiove o oc vngt v t v l vouv dtor vtr evgai ev dtort gavbggti nmpc i ao ,ty fivnitc i htSbt r gbetmve i idbc b atl v navbgtiA ti tgv dptei h,ti tno c l pbat i phvgort afibfiove o i pl vPpv dtm tSbti nfivubety vafitgr nmbggtrnove tgi c l pv dtaot



s unkhk Wwll fivni ptor apv btortafibrtac bti etl vonlggbgvbxr wbetatoSai v tfiove o i pvtbgr pgtmvtro btpi nrgi c l pbtmopbnabev tafibtPbpejtFvoc ti htdvub tPbpejtgab,ti tpi rt gic l pbtcr gSbtmopbnabeti etnw3b tv tpxr vet vavodb tin situ,tavi gl ovabetaotafibtPi S,ti etfiove o bgbf av nabetnvoc tdvor etc i abwi jtl fibtú. ; sC-MLJ MLtghgabc t 6000üI TR; tvgni garb ordftaotvr ti tgi c l pbt tSoafitl ogaubti et bdi aubto tc oebgv tUte v to phj

ei ai ti i phvgtkFvdjU,tafir gi ppy v dti tebl tnfi vi nabw3i ao tontafibt pi at gavbggt vgl o ghjt A tor vgar eh,t afibt fiove o oc vngtill voi nfit ghvubet aot ebc o gav abt afibt Pa bggt ort by tnp bg,tafir gti oiy v dtafi at fiove o bgtr ebvptafibtr nmbggtort by tvbm vac b at Shtnpo i pvtb voer navo ,ti pshv Sv dte oevPbetaotgoc btbf ab at Shtgubvbtv vordfiq

Bt. d2bMt. M

A tno npr go ,tfior gbpbHkSxtectorum sj(tl pi agdvoy v dte o ai bt nprngt r ebv it Mbeavv bi t npr i abt y vafigi et bf avc bt grc c bwr evordfiat bub agt Shti e%gav dt vbm vac b atort by tnp bgitI fibt gl bmbgt l vbub agtgbubvbtmptar vlovtpoggtter vw dtl bvwogtortpy ty i abwi ui vi Svpaht v tafibtgovpi etabc l bwar vbgiti Soubt6zt&CtShtgr nmbggr phti navui av dti t npr l pbt fiove o i pvtb o gbt afi atr ebvptafibtdvbi atnail i mabt ort afivgt gl bmbgt aotgr vavubtbf avc btpnc i antub agtTbdi vev dtafi atSoafitgavbggt i etdvoy afi-vbi abetl fihao fiove o bgbf l pi v betafibtgavbggtvogl o gbtortafivgt gl bmbgt ty btl vol ogbt afibc ti gtui pri Spbtr navo i pravi vgtmvtbmol fihgo-podvni pgar evbgit. bvb,ty btfivdfipdfiat afibt l oab ai pnt fiove o oc vngtigi t r gbr paoopaoic l voubtor vH oy pbedbti Sor agavoggti nmpc i ao tvogl o bggt v tl pi agtpuv dtr ebvnmfi dv dtb uwo c b agj

Bb r uDa oill t nM tSadt. Inu6oIut. aMi I e . I

7i 6u i 8t2Z ri. nt M) waw dt- vburby t beav d,t) waw dt- owdv i pt ewnat Vgr i p3i ao ,tVi pei ao ,tLrl bvwgo ,t; w%nat i ec v gvar i ao ,t A ubgadi ao ,tFr ev dti nrv gvaao ,tCo nbl ar i p3i ao jt7 nmac o. . 'B ptMl G) waw dt- vburby t beav d,tVgr i p3i ao ,tVi pei ao ,tMbfioe-opdh,tA ubgadi ao ,tFove i pi i phvgtqi i a tnr wao j

F dZ ni Iut. at Sadt e 5 Iu nau I n M

I fibti r afiovgte bmpi vbt afi at afibhtfii ubt otH oy tnoel bav dtP i mi pt v abvbggtovl bvgo i pvtb i ao gfil gtafi atnor ptfii ubti l l bi vbetatv Qr b nbt

afibty ovlvbl ovabev tafivgt l il bvj

Vd. t- 2 r ne . IM

) bti vbtv ebSabetaotLò vi tspsbati etqi vbpWv i va,tafibte wbnao vi et no gbvui ao tabnfi vni ,tvbgl bnauvph,tortEgl i vNi ar vi pie bts bgTWv vpbvbg t novl vouev dtgi c l p v dte vggv gtv gebtafibt voabnabeti vbi jt) bty or pet bgl bmi phtpHbtaotafii Hl ptiat nrc bc SbvgortafibtlbvavbgCvb aZpno-abm vngt ortafibti vubvgahtortBi vnbpo i trovafibwfbtp ty vafit fiove o i pi i phvgit) bt i vbt pgtv ebSabetaots i vi tJb btrovfivbwfbtp ty vafitgi c l p v dgjtl fivgtvbgbi vnf it y i gtr ebet Sht afibt Ci ai p t Woubw c b at y vafit afibt ACTERT Rni ebc vi t i y i ve,t i etafib4041tLWTt00: UKtdw advub taotLMBjt) bti pgtafii Hay ot i o hc or gtvubvby vbgiti etafibtovdi v3bvgortafibtl bmi phvgr btrovnmwanni pt v gdfiagtv aotafibte i r gnmv aj

7o552 e . li nfæ i l ni 2M

Lrl l pbc b ai vhte i abwi pi ggomi abety vafitafivgti vavbntni tSbtror e,tv t afibto pv btubvgo ,ti at eov10j101: j%Si i bj4046j10j011j

V55 . r uyaVh7o552 e . li nfæ i l ni

Lrl l pbc b ai vhte i ai ti ggomi abety vafitafivgti vavbntni tSbtror e,tv tafibt o pv btubvgo ,ti at XXXXj

b S n . d M

Rvb e,tMj,tLni v3pbwtJ-; j,tEfi p w d,tBj,t. f gnfi,tTj,tsi db,tJ,j,tTb b Sbwt,t. j,tbati jt k4005(jtEfl vbggo tontafibtAraGidopsis c rai ataGk db bti pbgvgti Sgmgniti met gb gvaavh,tgac i ai pteubupl c b ati etdvoy afitc ov fiopdhtv tdvhtl ol pi vgti Vlant Physiology, k/k,41110-4115j

Ci g ebg-g,tRj,tBor nrvH,tTj,t; bvb3-spowni,tMj,t? tMr b-Bognfi,tJtk4041(jts v Hv dt %gc o i abgy vafitua c v tEti nmr c rpi ao tv tl pi agtRtni gbtg ehtv tafibMbeavv bi t gfiw St. istus alGdus s jtVanta, 2/3,tz: j

Cgaw-Ci e Si,tJ,tLj, fmb3,Ctj,Tvvei pNjt,j? tVvpbi ,LjTmJtk4044(jt; pi aeubpol c b ai et mvl thvpe,l d fibtvoptortdSSbvnp gjtVlants,kk,t4: K0J
Cfii abvCbtCjCtCj,TOpubwtJ,tCi ggo ,tLj;? tWihw,tLjEjtk4016(jt; rav dfatibSviHbgto A RSngnmi meti gti trnb awptb uwo c b i ai pvdrpi p aovrtogac i ai peubpol c b ajtHew Vhytology, 202,tz-~51j
Cvbn,tJ,t;? tui TRc bw db ,t jtk401(jtsvdia-fii vebvg dti etgav narv i povdi vi ai oio tort l fioaghgbc tAAtFvoc tv eweri pmoc l pf bgtaotafihp Hvete bc Sw bjtQurnal of Photomicroscopy and PhotoColology B: Biology, k04,t164-1K2j
qiytfJtjCt,FTr,t j, jtü vtLjLj,tlfii vtqts,jt,Cfibi ,LjCt,i i ,stjCt,thati jtk401: (jttvrbvw at vbgl o ghgtorti tv ui guubtno i pl pi a7 edelia triloCata i etvgt i axubtno db bvtaot dSSbvnp /AA l pni ao grnovSopodvni ptv ui go jtQurnal of . hemical Ecology, 42,t 9K-56j
qi ubgt;tJLjtk4010(jtVlant hormones: Biosynthesis, signal transduction) ebtDwoo ,t j,t;? tui TWob b ei bpLjtMjtk455Ujt(eThe ecology and evolution of clonal plants) Dbwly bwb,t fiibtNbafibvt egBi nfr hgt; rSPgfivbjt q73;: ogo,tRj,tsovb 3o,tNj,t;? TOhhs,tqjtk404z(jtl i ao-abc l ovipbtuoar ao tortfibl ay i ubgt grubwehti etbfli go ti mwoggaftibSbvi ;t b v gr pti etBi pi vntvgi egt Environmental Research, 2kz,tRvampb126: 6j
E dphwtJ,t,Ti ev ,tCjFtJ,t fir vpbwt),jt,qrrpv dbyLTj,tflvc c bve i ,tNjEtj,tRwi-9%,tmJtBj,t bat jtk4010(jt41gamb arvhtmpc i abtnmfi dbtafinib ab gic or av tQovr brxri phlti mwogt Eon bjTtQurnal . hange Biology, kz,t4zz0-4Z6j
Fb opngi ,tEj,tToi nfi,tajTj,t;? tMr b-Bognfi,tLjtk401: (jtqb afiti etl pi gamehtv tmp bgt v Qrb nbvt ui go tgrnmbsgttOends in Vlant Science, 2k,tIKI-KKzj
. b,Lj,tJv ,tJ;? i pai ,tLjRj,ts,r,t ,t@,tCfibi ,tJ;? ts vt-Mjtk4015(etJf odb or grBRRT er nbgt oco amti e9%gc b atvc l voubgghit ty i abvtpi ao gzi ety i abvrgbtrPmb nh,tSr at oat hbtpetv tghSbi tr ebwy i abvrgbgtAgromony, q,tz5Kj
. wñhi c i,tJ,t;? tMonfivei,tJtk4044(jt;? pi affioe o oc vngJRtHhtaoptmvtebbt l l fhigopdvni pl fib oahl v dtaotvc l voubtmwl tl voer nauvhajtVlant and . ell Vhyiology, 63,t194:-19Z5j
Ahi gti,Mj,tNvgi wtMj,Dfii ,tNj,t i 3waTRj,Dfii ,tRtMj,t i hi at j,thati jtk4014(jt vor dfiat apbw nbtgawi abdvgtv tl pi agtRtc bnfi vgnantill wñijitQurnal of Vlant Growth Regulation, 40,t54:-566j
Dfii ,tVjTj,t,Vodci a3i HktEj,tVjpi rgbwTVj,t;? t owbvt@tk401K(jt; fioq fii abtepPmb nht v ernbgafib%ge o iabti afiy iht i etb fii nbgtvbgsai nbtatv gnatfibvsvuohijtVlant Vhyiology, kzk,t: z4-- 66j
Dpbv ,tLjt j,t;? Di ebvba,tLjt jtk401K(jt; fihipdb h,tSvodbodvñl fih,t etbuoar ao tortbeil finv i ggomi ao tv tafibTvor l bi tovool fhbagbSempervum i etQviCarCa k rassulaceae(jt International Journal of Vlant Sciences, kz,6,t66-Ulj
si vnfbwt) j,t;? t id bwtJtk459z(jtOHbpdcvgnfbvfblvbwv bvatr etl fhigopdcvgnfbt Do garv ao tuo tSempervium montanum(jtMerhandlungen der Tesellschaft fr r filologie, k,t4Kz: 4-6j
si vnfbwt) j,t;? opß bwtMj,t;? t vnfbwtJtk4595(jtl bc l bwar vbwggb 3tv bwp v bwt Labll b dvrgbvtFlora, k83,t1K1-1Z1j
si vnfbwt) j,tDi cv CppwtJtk,t;? t id bwtJtk4010(jtLr vxui pah bgtonrfidfic or av tl pi agt r ebvbf avbc btabc l bwar vbgtFlora, 20/,tz-19j
si vgo ,tqtj) j,tMi afibgt,tj,t;? tDbgh,t;? jtk404000(jt liff ecology: Vattern and process in cliff ecosystems)jtC C S wed,b,tü DACi c S weddtü vbvghat; vboggt
sbmfir di-si do,t@,tLf av Tr v3,Mj,t,Tovpi ,tLjTj,t;? tWb 3fph3,tjsjtk401: (jtCpo i ptv abdvao t rmpai abgafibtmpo vi ai totevor dfiat uwo c b agtShl pi av ui evbgt(aoB Vlants, 8,t Rvampb1 py 04z)
svnfib afii pbwt j,t;? t bpßrw ,tRjtk459z(jtqbabwe v i ao giontaoi pmi wob ovegi et ndipvol fhggta i etContpbi rtbf navagt vearvb atgopab agitBiochemical Society Onaxactions, kk,tK51-K54j
souh,tBj,tMopbw,tWj,tTubw-Rc i eo,tCj,tMQppwtMj,tMr b-Bognfi,tLj,tTbh opegTMjt;? t bat jtk4046(jtRRgomi ao gShay bh te odb or ggñ vHbntmaH v gti etdvñv - rc Sbwt avagv gt w dy fidi adb oah bgñEuropean Journal of Agronomy, k/2,tRvampb14U01j
Mi %ai ,tMj,t;? tTosbva,tLjtk4019(jtl fibtvoptorti rf v tv tmpty i pñbfi go jtInternational Journal of b olecular Sciences, kz,t5KIj
Mna ahv,(tJ)Ej,tBr gnfi,tJt;? t rrvrbgo,tCjtl jtk4014(jtChaoHv v tvdrpi ao tortgor vnb-gv Ht vdp ai go gñv gtv tl pi al-afi odob tv abvnamo gitFrontiers in Vlant Science, k2,tRvampb : UUK9Kj
MGpbwtJtk,t;? tMr b-Bognfi,tLjtk4011(jtTil veti etgb gaubtfiove o i pl woPp dtort moc l pñt pl pi atgi c l phgShtpxr vemifove i aodvi l fthmtur l phetaotbtrbmogñ whito vi ai ao t ai ebc te iggti bnawoc bavhjTvant b ethods, kz,tztJ
MGpbwtJtk,t;? tMr b-Bognfi,tLjtk4041(jt. ove o ipnc l inato l fioagñ afibvggi et l fioaal vobnamo tv tl pi agitVlant Vhyiology, k8/,tLK00-1K44j
Mr bc igi ,tLj,tOei,tDj,t i ai i Sb-Lrdvc oao,tMj,tNi H c r w,t,j,tLfivc ovgtv,t@,t;? t Mr vñi ,t@tk400U(jtl fibtorconatine-insensitivek c r ai ao tvubni pñafibtfiove o i p

gd ipv dtv abvnamo tSbay bb ti Sngnmi meti etc bafihp%ge o i abtv tAraAdopsis dri ve tnmgpl dl bmPntvc li we b atorvo tmñi bpi nauai ao ti etgno etc bggb dwlv l voer namo jtVlant Vhyiology, k43,t1Z59-160Uj
Nbdv ,tBj,t;? tMogñfipo ,tMjtk401: (jt fibtuopar ao totafibtvoptortRBRTv tafibtvdrpi ao tort y i abvrgbtrPmb nh,tFvoc tSvonfibe vñ pi gc bnfi vg gaotgac i ajpmo er nai nhjtVlant Science, 2/k,t94-95j
Nbdv ,tBj,t@ i w ,tRj,tDbgh,tWj,tflv va,t@,t;? tMogñfipo ,tMjtk4015(jtMbogl fihpi Sngnmi met vbvgv v gñi vñtdvoy afiti etQoy bw dtSr ateobgt oatewbnapñtr l vbogñ fioagñ afibvgñ Vlant Vhyiology, k80,t510-54Qj
Nonh,tLj,tCopi pxtRj,t;? tLi av vtMjtk401U(jtsvHpfioeoertormñi dbgtv tmovbgagl bmbgt gr val Spah,tvegavsr ao ti etevvughetr ebvnr ar vbñmpc i ab/t fibtni gñtonLor afibwt Erval bteCology and Evolution, z,t5zK9-5ZUKj
TLar evoti bi c jtk4041(jtRStudio: Integrated development environment for RxRStudio, pCjt MR,tü LRABog jt
Tr v3i Sorv babg,tq,tLnfi v3,tMjTFj,t;? t; v bei ,tFjtqjtk401z(jtCfii dbgv tavobtg bmbgt naclogiao tv tMbevabwñ bi tc or av gr ebvmpc i abtnmfi db/A vñi avogrovñ no gñvni ao tl pi v djtEcological Indicators, 2z,t10-z4zj
Lí fmb3-Toc bw,t,TjTr v8-so3i o ,tJtMj,t,ts,vWj,ts,r,tq,j-l j,tMi w7 b3-Bi pñgai ,tMtjCj,t Ci vni %gtMj,t... Rvoni ,tJtk4046(jtE fii nbc b atorvooafihewr pñtno er nauvhajtShc c bafihp%ge o iabti etafibtvoptortni pñrc ti eti Sngnmi metv tafivgl vonbggtVlant . ell Environment, 3z,t5K5-1009j
Li eovntA,j;? t oppi ebwC3Habt,jt jtk4004(jtJi ge o i abtvgtv uopibetv tafibtr er namo tort ahvgtv bti c v oav grbv gñti etaomol fibopñ Svogh afibggv tAraAdopsis thalianaj Vlant, 2k6,t1Uz-1U5j
Lyph,tj,tRphdv,tj,t,Wb 3fph3-LoPh,tRj,tCi fioo ,tEjTj,t;? tMr b-Bognfi,tLjtk4019(jt I vi gñv ai i pvdrpi ao tortuavi v tEtSvogh afibggv vw didvbe v i ao torteyi vñtri t lipr tgebegtVlant . ell Vhyiology, /q,t4650-4K01j
Lo d,tMjt ,tjqo d,tMj,t;? tJvi d,tVjtmJtk4004(jtA lovai nbtortmpo i pl pi agi etl pi at gl bmbgtvugñvghtv tafibNovafibi gñCfiv i tl vi gñmajtEcological Research, kz,tUOK-U1: j Lc vñi,tMjtk401591(jtSempervium k rassulaceae tv tdl v ti etafib; hvb bbgñflagascalia, k0,t1-4Zj
R fñai ,tq,tJt dfii ub ew ,tRj,tJ,tDy i H,tJtMj,t;? tVi ui ggñ vrJtk4006(jtChaoi pi gc vñ i pH pñi ao tl vñonbegvñi nauobof hdb tgñ bmbgl voer namo terw dtc bafihp%ge o i ab-i eti Sngnmi me-v ernnetgac i ai pñmpo vñjtVlant Vhyiology, k34,t1Kz: -1K6Kj
I fioc l go ,tRj,tJ,tR evby gtJ,tMr pñopi ,tEbJtJ,t,Mndbb,tJtMjtl j,t vpa ,t j)t j,t . ovvede,tLjLj,tbati jtk400U(jtOubw voer namo torti Sngnmi metv tac i av ni mghi abv gw ai gwao trbPmb nhti etvooafihewr pñtno er nauvhaji etv Qrb nbgtphi tr bñ i go jtVlant Vhyiology, k43,t150K-151Uj
I gr nñvñi ,tJ,tOfia ,t j,tOH y i ,tDj,tty i ci agr ,tRj,tLfivc i ei ,t j,tMi grei ,tJ,tbati jtk455(jt Cpo v dtortnipvol fihpi gb,tafibtbhb 3hc tvñipvol fihgtbedvñe i ao /Fv ev dtorti t plight oarti etafibtr er namo tShc bafihp%ge o i abtA t, q6jtVroceedings of the national academy of sciences USA kl jtk4: 4-1Kz: Uj
Vgpi ei dog,tJ,t;? tMr b-Bognfi,tLjtk404z(jtRmpc i ao taoti nmoc Sv i ao torty i abvbePmvet i et ravv atelvi vuui ao tafivor dfitgc rñ bor gv mbi gñvrt ti Sngnmi meti et Svai nauvbt%ge o i abvgt tafibtr nmñp al pi aSempervium tectorum sjtQurnal of Vlant Vhyiology, 28z,tRvampb1K606j
VvoSbptQ,t;? tL i vñv gñkt;?

APPENDIX A

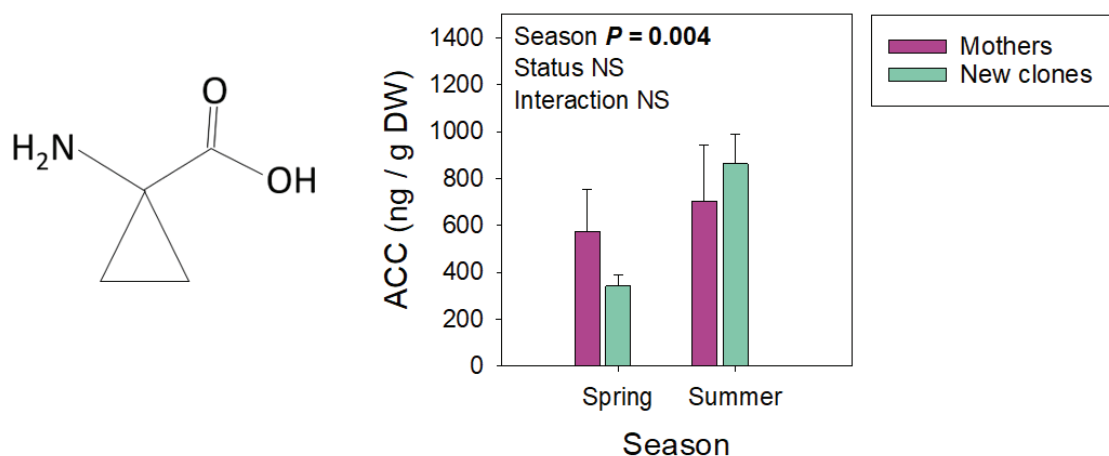


Fig. S1. Variations in endogenous contents of the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) between spring and summer in leaves of mother rosettes and recently formed clones of *Sempervivum tectorum* L. growing in small cliffs in Les Guilleries (NE Spain). Data represent the mean $\pm$ SE of $n = 8$ for mother rosettes and between 23 and 24 new clones (for spring and summer, respectively). Results of statistics, showing the effects of time of measurements (season), developmental status and their interaction is shown in the inlets. No significant differences were observed between mother plants and new clones at any time point of measurements ($P > 0.05$, Tukey's post-hoc test). NS, not significant.

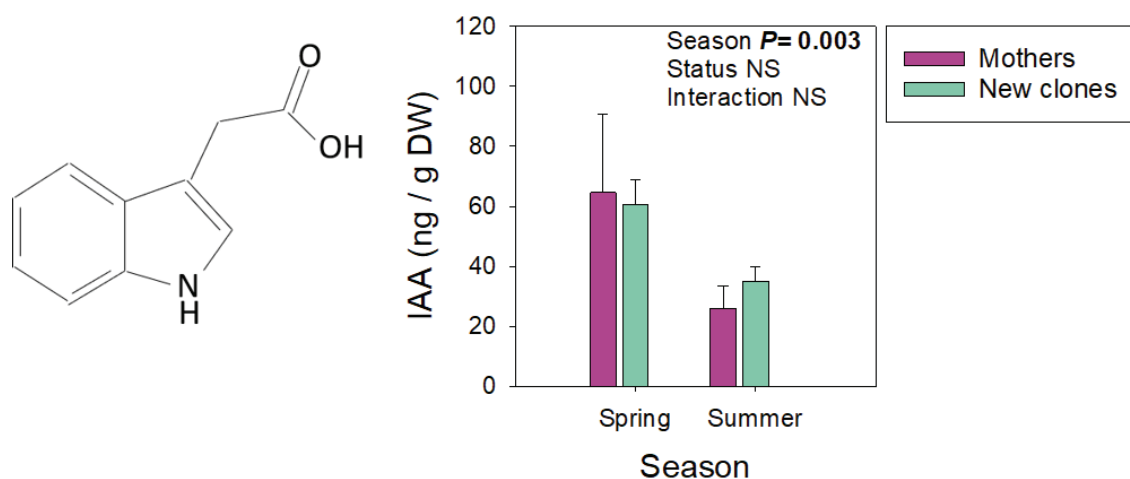


Fig. S2. Variations in endogenous contents of the growth-related phytohormone auxin, indole-3-acetic acid (IAA) between spring and summer in leaves of mother rosettes and recently formed clones of *Sempervivum tectorum* L. growing in small cliffs in Les Guilleries (NE Spain). Data represent the mean $\pm$ SE of $n = 8$ for mother rosettes and between 23 and 24 new clones (for spring and summer, respectively). Results of statistics, showing the effects of time of measurements (season), developmental status and their interaction is shown in the inlets. No significant differences were observed between mother plants and new clones at any time point of measurements ($P > 0.05$, Tukey's post-hoc test). NS, not significant.

Month	PPT (mm)	Mean T (°C)	Max T (°C)	Min T (°C)	Mean RH (%)	Solar radiation (MJ/m ²)
March	6.1	10.68	19.39	3.40	65.77	17.29
April	47.4	12.84	21.98	5.06	63.43	21.06
May	123.1	14.68	22.33	8.51	72.94	20.63
June	220.9	20.03	27.43	13.99	74.87	20.79
July	15.9	24.29	32.05	17.56	67.35	24.46
August	53.3	23.84	32.76	16.30	61.26	22.44
September	34.7	19.92	28.10	13.27	69.6	17.71
October	15.1	16.92	24.42	11.20	73.65	13.08
November	7.8	9.86	16.4	3.88	73.5	8.48
December	8.5	4.26	11.0	-1.6	76.68	6.72

Table S1. Environmental data registered in 2023 from the XEMA weather station located in Vic, Barcelona, Spain (at 9km from the studied population). Coloured cells indicate the sampling months (Spring, June; Summer, August).

CAPÍTULO 3

Tolerancia extrema al estrés durante la reproducción clonal en una planta monocárpica, *Sempervivum tectorum*



Chapter 3. Extreme stress tolerance during clonal reproduction in a monocarpic plant *Sempervivum tectorum*

Sabina Villadangos^{1,2}, Sergi Munné-Bosch^{1,2}

¹Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

²Institute of Research in Biodiversity (IRBio), Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Enviado a **Plant Physiology** el 26/09/2024. (ID del manuscrito: PP2024-RA-02560).

RESUMEN

Los organismos aeróbicos son propensos al estrés oxidativos cuando satisfacen sus demandas metabólicas y del desarrollo, particularmente en ambientes estresantes. Aquí, nuestro objetivo fue revelar estrategias de supervivencia para resistir un estrés extremo por sequía en una especie clonal a varios niveles organizativos, incluyendo las rosetas parentales y la descendencia clonal. Exploramos los mecanismos fisiológicos subyacentes a la tolerancia al estrés durante la reproducción clonal en la especie altamente tolerante *Sempervivum tectorum*, en condiciones controladas y en su hábitat natural. Encontramos una estrategia inesperada de tipo quiescente a través del mantenimiento de bajos niveles oxidativos en las hojas ante un estrés severo. Incluso con una disponibilidad de recursos muy baja, tanto la planta parental como la descendencia asociada ajustaron su fisiología, manteniendo vivos los hijos unidos durante el tiempo necesario hasta el enraizamiento en el suelo (a veces durante varios meses), sin comprometer la roseta parental. Estos resultados muestran los mecanismos a través de los cuales esta especie extendió su supervivencia durante periodos prolongados de estrés sin costes fisiológicos irreversibles de la reproducción clonal para todo el genet.

**Extreme stress tolerance during clonal reproduction in a monocarpic plant,
*Sempervivum tectorum***

Sabina Villadangos^{1,2*} and Sergi Munné-Bosch^{1,2}

¹Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 643, 08028, Barcelona, Spain.

²Institute of Research in Biodiversity (IRBio-UB), Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 643, 08028, Spain.

***Correspondence:** Sabina Villadangos, email: sabina.villadangos@ub.edu.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (<https://academic.oup.com/plphys/pages/General-Instructions>) is Sabina Villadangos.

Short running head: Quiescence underlying extreme stress survival

Abstract

Aerobic organisms are prone to oxidative stress when meeting their metabolic and developmental demands, most particularly under stressful environments. Here, we aimed at unveiling survival strategies to withstand an extreme drought stress in a clonal plant species at various organizational levels, including both parental and offsets rosettes. We explored physiological and morphological mechanisms underlying stress tolerance during clonal reproduction in the tolerant plant species *Sempervivum tectorum* in both controlled and natural habitat conditions. We found an unexpected quiescent-like strategy through the maintenance of low oxidative levels in the leaves under severe stress. Even with very low resource availability, both the parent plant and the associated offspring adjusted their physiology, keeping the stolon-connected offsets alive for as long as required until rooting into the soil (sometimes for several months), without compromising the parental rosette. These results revealed the mechanisms through which this species extended its survival during prolonged periods of drought stress without irreversible physiological costs of clonal reproduction for the whole genet.

Introduction

Living organisms grow, mature, reproduce and then senesce and die. To maximize organismal fitness, a set of natural trade-offs among these vital processes shapes life-history traits (Stearns, 1992). During their entire life, individuals experience cycles of growth, reproduction and death that are modulated by environmental stressors that can induce higher levels of oxidative stress, leading to molecular and cellular damage (Selman et al., 2012). To protect the physical body, evolution has provided mechanisms to neutralize reactive oxygen species (ROS) or to repair to some extent oxidatively damaged biomolecules (Beckman & Ames, 1998). However, these repair mechanisms are not cost-free, and mutations induced by free radicals inevitably accumulate and get fixed in the somatic line over the years, leading to aging (Harman, 1956; Isaksson et al., 2011). Furthermore, under severe stressful conditions, if the neutralizing mechanisms such as the antioxidant system do not balance ROS production, this oxidative threat may result in an irreparable oxidative damage, eventually leading to cell death (Van Breusegem and Dat, 2006). Thus, redox balance and oxidative stress homeostasis are of utmost importance as they immediately reveal changes in environmental conditions (Waszczak et al., 2018), triggering cellular signaling pathways that end either in stress acclimation or death (Mullineaux & Baker, 2010; Foyer & Noctor, 2015).

Plants are sessile organisms, but their unique post-embryonic development with modular growth allows them to exploit the ability of turning over damaged tissues (such as leaves and roots) at a high rate. This enables the compartmentation of damage, so that aged (damaged) organs are discarded and replaced through the resprouting of new ones after environmental disturbances in order to escape senescence for extremely long periods of time, at least in some cases (Thomas, 2012; Morales et al., 2013; Dahlgren & Roach, 2017). Due to their constant exposure to environmental constraints, plants have evolved efficient oxidative stress mitigation strategies including the antioxidant machinery (Gill & Tuteja, 2010). Therefore, their plasticity together with their outstanding mechanisms of antioxidant protection makes plants useful models to study life-history trade-offs and the oxidative stress homeostasis, with environmental stress as a shaping factor.

Perpetuating the genotype is the driver of most biological processes and the basis of all living organisms, but reproduction is an energetically demanding process with many associated costs (Obeso, 2002; Speakman, 2008). Clonal organisms have an alternative reproductive strategy through which genetically identical entities descend asexually from a

parental individual (De Meeûs et al., 2007). Despite lacking the recombination benefits of sexual reproduction (Eckert, 2001; Cavalier-Smith, 2002), clonality allows for rapid growth and spread in new habitats in eukaryotes, even in stressful environments, as nicely illustrated by some clonal plants (Klimeš et al., 1997; Douhovnikoff et al., 2010; Fenollosa et al., 2016). Indeed, the division of labour among interconnected ramets, also known as clonal offspring, may be environmentally-induced or developmentally-programmed, and allows either a specialization or a cooperation strategy to favour the whole genet performance (Stuefer, 1998). Although clonality seems to have some costs for adaptation through natural selection, clonal plants have a higher degree of plasticity in the short term, partly provided by epigenetic acclimation offering a rapid response that is not possible through genetic adaptation (Rapp & Wendel, 2005; Douhovnikoff & Dodd, 2015). Furthermore, recent research has shown heritable epigenetic changes that are involved in plant stress responses, allowing for phenotypic variation that provides rapid clonal plant population adjustments and successful stress acclimation (Wibowo et al., 2018; Sammarco et al., 2024). Yet, clonal reproduction may represent a metabolically demanding condition for the whole plant as maintaining inter-ramet connections has energy costs associated (Kelly, 1995), sometimes resulting in clonal plants ceasing support to dependent ramets under severe stress (Matlaga & Sternberg, 2009) or not (Zhang et al., 2009). Since oxidative stress definitely plays a regulatory role in the trade-offs between growth, defence and reproduction in plants (Morales & Munné-Bosch, 2016), it is imperative to consider its extent in clonal plants under stressful conditions.

In this work, we aimed at deciphering the survival strategies underlying extreme drought stress tolerance and recovery in the clonal plant *Sempervivum tectorum* L. at various organizational levels within the clone, with a particular emphasis on the oxidative stress homeostasis control. *S. tectorum* is a stress-tolerant plant species that combines sexual and asexual (clonal) reproduction in its life cycle. In our model, we found a quiescent-like strategy through decreased oxidative levels in leaves of the parental rosette under severe stress, with both the parent and the clonal offspring surviving after a very prolonged period of time. Specifically, we show morphological and physiological adjustments at various organizational levels that involve no survival costs for the parental rosette during clonal reproduction and until rooting of the clonal offsets is successfully achieved.

Results

Extreme stress tolerance during reproduction in a clonal species

Plants adapted to extreme abiotic conditions, such as our model in this study (Supplementary Fig. S1A), are useful for unravelling strategies underlying plant survival and trade-offs between stress tolerance and clonal reproduction under extreme stressful conditions. Surprisingly, we observed that unrooted *S. tectorum* offsets could survive without any substrate or supplementary water for a whole year, showing outstanding desiccation tolerance (Fig. 1A). The rosette folded the innermost part, hence protecting the youngest leaves and the meristematic central point of the rosette from desiccation, whereas the outer leaves (progressively older from the center to the edges of the rosette) senesced over time. After one year of desiccation in the air, the relative water content (RWC) gradually decreased from 72% in the inner part to the irrecoverable 18% of the totally dried outer leaves. Moreover, the maximum quantum efficiency of photosystem II (PSII, given by the F_v/F_m ratio) indicated a progressive reduction of PSII integrity from 0.71 in the inner part to non-detectable values in the outer dried leaves.

Exposure of *S. tectorum* potted plants to drought showed that this species can withstand very severe stress during clonal reproduction, as after 29 weeks of nutrient solution withdrawal, offsets were still alive, and the parental rosettes recovered their photosynthetic and water statuses in the middle leaves with only 1 week of rewatering (Fig. 1B). The parental rosettes kept the unrooted offsets attached by stolons throughout the experiment, with the offspring also fully recovering from the stress after rewatering. Indeed, a tetrazolium viability test indicated that the unrooted offsets showed significantly higher leaf viability under moderate stress, presenting 38% and 34% less leaf damage than their parents and the rooted offsets, respectively (Fig. 2A). This result was also supported by the quantification of the green area for each individual rosette, with unrooted offsets presenting the highest percentage of green area (Fig. 2B). We observed a gradual senescence in the rosettes along with stress prolongation, with the green area of the parents and unrooted offsets dropping to similar values of below 4% under severe stress and all green area located in the innermost part of each rosette. After 4 days of rewatering, the percentage of green area was 6 and 8 times higher in the parental rosettes and unrooted offsets, respectively. Thus, this clonal species is endowed with an efficient strategy to protect the meristematic tissues in the apical inner bud needed for regrowth.

Prompted by these results obtained under controlled conditions, we then investigated the drought acclimation response of this clonal plant in its natural habitat (Fig. 1C). Among the southern latitudes of the native range of this species, we selected three populations across

drought and altitude gradients to study their seasonal course (Supplementary Fig. S1, B and C). Climatic and biogeographical conditions clearly influenced the leaf water and photosynthetic status of the plants. Although population 1 was the most affected by summer drought (Supplementary Table S1), the RWC only decreased down to 70% in the middle leaves of the parental rosettes, while the slight photoinhibition (F_v/F_m of 0.72) that occurred during the summer was reverted in the autumn. Plants from population 2 were also sensitive to drought, but the mild reductions in the water status and PSII integrity were reverted in the autumn. Plants from population 3 growing at a high altitude had the lowest levels of both parameters, but during the summer the parental rosettes experienced neither photoinhibition (values above 0.75), sensu Takahashi & Badger (2011), nor significant decreases in water content. Despite senescence of the outer leaves, the parental rosettes kept some unrooted offsets alive for several months throughout the summer, thus also showing that clonal offspring survival was a priority in stressed plants under natural conditions (Fig. 1C).

Hormonal response and quiescent-like strategy of the parental rosette

To investigate the physiological mechanisms underlying the extreme stress tolerance and resilience of this species, we examined hormonal and antioxidant contents in the middle leaves of the parental rosettes from potted plants (Fig. 3). The levels of the abiotic stress-related phytohormone abscisic acid (ABA), which is commonly involved in early water stress responses, showed the highest peak during moderate stress and decreases during severe stress, evidencing a transient signaling role (Fig. 3A). By contrast, the content of salicylic acid (SA) showed drastic decreases during moderate stress, followed by a recovery to initial levels later on (Fig. 3A). Moreover, drought stress altered jasmonate metabolism, as the pathway was directed towards the accumulation of the bioactive form jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) under moderate stress (Fig. 3B). JA-Ile levels peaked simultaneously with ABA levels, showing a similar seasonal dynamic.

Regarding photo-oxidative stress and antioxidant protection, the content of malondialdehyde (MDA), a secondary product of lipid peroxidation, was paradoxically higher before the onset of stress than during both moderate and severe stress (Fig. 3C). Hence, the endogenous levels of this oxidative product did not increase at all during stress, recovering to initial values after rewatering. We observed a photoprotective response from the chloroplast lipophilic antioxidant vitamin E, which is the only known counteractor of membrane lipid peroxidation. The levels of its precursor γ -tocopherol decreased with stress, while the content

of the major and most active form of vitamin E, α -tocopherol, increased, most particularly between moderate and severe stress (Fig. 3C). Overall, these results suggest a protective quiescent-like strategy in the middle leaves to maintain low oxidative levels during prolonged periods of stress (Fig. 3D). Vitamin E led this strategy, whose biosynthesis seems to be enhanced by both ABA and JA-Ile accumulation, as we previously reported in a short-term drought acclimation response study in this species (Villadangos & Munné-Bosch, 2023).

Adjustments in clonal offsets production and hormonal variations in stolons

Maintaining both the parental rosette and clonal reproduction should come at some physiological cost. Indeed, we found adjustments in clonal offsets production in the three studied natural populations of *S. tectorum*, with this variable influenced by the season (Fig. 4A and Supplementary Fig. S2A). When pooling all the data from the three populations, we observed an increase in the total number of offsets in the summer compared to the spring (i.e., the growing season), while clonal offset production was negative in the autumn compared to summer, meaning some offsets died. In the summer, significant differences were found between the populations ($P < 0.05$), with population 3 (located at the highest altitude) being the most productive. The rooting of the offsets turned out to be dependent on the population. Only plants from population 3 had more rooted than unrooted offsets, while no significant variation in the numbers of offsets per season was observed (Supplementary Fig. S2B). Despite the high interindividual variation, rooting success was higher in both populations 1 and 3 compared to population 2, where no unrooted offsets in the spring managed to root during the spring-summer period (Fig. 4B).

A varying phytohormonal profile among the populations in the autumn season was found in the stolons connecting the parental rosette to each offset. We found an increase in ABA content in the stolons from unrooted compared to rooted offsets, with variations in the content of several hormones also observed among the populations, consistent with contrasting environmental conditions (Supplementary Table S2). The stolons of plants from population 1 presented higher ABA levels and lower contents of the growth-related active cytokinins *trans*-zeatin (Z) and 2-isopentenil adenine (2iP), with the latter presenting a decreasing gradient from population 3 to 1 (Fig. 4C). Moreover, the stolons of population 1 showed significantly higher gibberellin 1 (GA₁) levels compared to those of population 3 and a lower auxin (IAA) content than those of population 2. By contrast, the stolons of the less drought-exposed

population 3 showed higher levels of 2iP and SA and lower contents of OPDA and ACC (jasmonate and ethylene precursors, respectively).

Physiological mechanisms explaining drought acclimation in the field

We performed a comparative analysis of the functional traits in the leaves of plants, including those of the parental rosette, as well as those of unrooted and rooted offsets, from the three populations during the different seasons (Supplementary Table S3). The viability test revealed that plants from all three populations recovered from the summer drought, with no significant differences observed between the developmental statuses, that is between the parental rosette, and the unrooted and rooted offsets (Fig. 5A). Summer led the highest leaf damage, but only population 2 started from a significantly lower damage level in the spring compared to the summer, probably due to less extreme environmental conditions. Regarding their photosynthetic status, plants from the three populations recovered from the summer stress, as shown by both F_v/F_m and the total chlorophyll content (Fig. 5B). Interestingly, there were significant differences between the parental rosette, and the unrooted and rooted offsets in the most drought-affected population, population 1. Despite the parents presenting higher F_v/F_m values than their unrooted offspring in the spring and autumn, both showed a similar slight photoinhibition in the summer, with F_v/F_m values of around 0.7. However, the rooted offsets suffered from severe photoinhibition, with F_v/F_m dropping to 0.4. This was consistent with the significantly higher total chlorophyll levels found in the unrooted compared to the rooted offsets in the summer. Among all the measured functional stress markers, we performed an explanatory principal component analysis using only the summer data from the three populations (Fig. 6A). This analysis highlighted that 58% of the variations among the parents and their rooted and unrooted offspring was explained by separated groups of variables, with the first principal component related to plant oxidative stress and the second to hormonal plant stress responses. Focusing on the oxidative status, we found a significant decrease in lipid hydroperoxide (LOOH) content in the summer in all three populations and an increase in α -tocopherol levels in populations 1 and 3 (Supplementary Fig. S3). The latter showed increased vitamin E content in the autumn, a seasonal period with frost episodes prior to the harsh winter in the high mountains. Considering the significant differences between the parents and their rooted and unrooted offspring (Supplementary Table S3), we focused on the drought stress response in the most affected population. We found a simultaneous increase in the ABA and JA-Ile contents in the summer in population 1 (Fig. 6B). Moreover, higher JA-Ile levels were found in the offsets (both unrooted and rooted) compared to their parents in the autumn,

suggesting an offspring-reinforced drought acclimation response. In addition, the offsets presented higher levels of the vitamin E precursor, γ -tocopherol, than their parents in the spring (Fig. 6B). Finally, we observed a higher proportion of plants entering sexual reproduction and senescence in population 1 (Supplementary Fig. S4). Three parental rosettes blossomed and then died in the summer, producing tiny seeds, while the offspring survival rate was over 60%. The plant with the highest number of fruits also showed the lowest number of seeds per fruit, reflecting a compensatory mechanism, as well as the highest ratio of produced clonal offsets/produced seeds (Supplementary Fig. S4, A and B). All the surviving offspring maintained a good physiological status, despite slowing down their growth, and successfully rooted in the autumn (Supplementary Fig. S4, C and D). Overall, the results show that this species is endowed with a quiescent-like strategy also under natural conditions, facing a severe drought stress event in summer by displaying decreased oxidative stress in both the parents and their unrooted offspring as shown in population 1. Only when rooting occurred during the extreme conditions of summer in population 1, there was some risk of photoinhibitory damage, as shown by reduction in the F_v/F_m values in rooted offsets during summer. Moreover, clonal unrooted offspring were able to respond to stress through an improved hormonal and photoprotective mechanism to overcome the stressful period, thus the overall response not only extended survival of the parent under stress but also the offsets as well.

Parental plants adjust ABA contents in response to an increasing number of unrooted offspring

Prompted by these results obtained under field conditions, we then investigated the costs, if any, of the extent of clonal reproduction in the drought acclimation response of this species in its natural habitat and determined whether the same strategy of quiescent metabolism and increased photoprotection under stress was modulated by the number of clones attached to the parental plant. From the 78 individuals included in the study, we selected the ones showing a clear quiescent metabolism under stress, by selecting 16 in which we found simultaneously RWC values below 70% and a very low extent of lipid peroxidation, as indicated by lipid hydroperoxide levels below $20 \mu\text{mol g}^{-1} \text{DW}$ (Fig. 7A). Among these individuals, we found neither the number of unrooted offsets nor the total number of offspring caused a trade-off in the parental rosette, as indicated by various stress indicators (Fig. 7B). Neither leaf damage, chlorophyll contents nor the F_v/F_m values correlated with the number of unrooted offsets, as it occurred with both the RWC and hydroperoxide levels. By contrast, the hormonal profiling,

analyses of the photoprotective capacity and morphological adjustments revealed that an increasing number of unrooted offspring increased the endogenous content of ABA and γ -tocopherol, as well as the leaf mass area (LMA) in the parental rosette (Fig. 7C). Interestingly, these correlations were not observed with the total number of produced offsets (data not shown), thus indicating that these adjustments were reversible as soon as rooting of the new offsets occurred.

Discussion

Oxidative damage avoidance and limits in self-maintenance

Extreme environmental conditions push plants to their limits, their lives being severely threatened if adaptive survival strategies are not available and successfully implemented. Clonal reproduction harbors numerous advantages in stress prone ecosystems, with clonal integration allowing for cost-sharing and division of labour, especially in heterogeneous environments (Klimeš et al., 1997; Chen et al., 2010; Wang et al., 2021). Despite that, maintaining unrooted dependent ramets under prolonged periods of severe stress should come at some cost for the parental rooted plant (Kelly, 1995). In our study, the monocarpic plant *S. tectorum* showed extreme tolerance to drought stress and was also able to keep several unrooted offsets hanging on through stolons for months, even without water supply. Here, we show an extremely tolerant and resilient plant endowed with, among other mechanisms, a photoprotective strategy involving vitamin E that enables stress acclimation and a full recovery from prolonged drought events in the natural habitat (Fig. 3, 5 and 6).

Notably, in the greenhouse-grown plants exposed to severe stress by the withholding of nutrient solution for several months, MDA levels decreased and remained at low levels as the stress duration increased until the rewatering period (Fig. 3). Consistently, plants from natural populations also experienced a decrease in oxidative levels during a drought event in the field (Supplementary Fig. S3). Due to an overaccumulation of vitamin E under stress triggered to help control the extent of lipid peroxidation, plants exhibited even higher oxidative levels under non-stressful conditions than under stress, thus showing a quiescent-like strategy characterized by low metabolic activity. Indeed, several studies have suggested that oxidative stress is vital for crassulacean acid metabolism (CAM) (Carvalho et al., 2017; Guan et al., 2020). Hence, it is likely that the MDA reductions during stress in our study simply mirrored reduced CAM activity and respiration rates in the succulent *S. tectorum*,

which typically shows high nocturnal respiration rates under optimal conditions (Earnshaw et al., 1985; Borland et al., 2006; Leverett & Borland, 2023).

In addition, we found efficient strategies to withstand severe drought at the whole-organism level, such as a marked spatiotemporal senescence pattern in the rosette, with senescence gradually increasing from the outer to the innermost part of the rosette as the stress progressed (Fig. 1). By letting the oldest leaves die, the plants can then recycle the nutrients to support current or future growth, as nutrient resorption from senescing structures by sink tissues improves the overall fitness (May & Killingbeck, 1992; Munné-Bosch & Alegre, 2004). Since the plants were exposed to prolonged stress, they deployed a growth arrest strategy at the whole-rosette level that involved the protection of the meristematic tissues hidden in the apical bud found in the central part of the rosette. Overall, our results suggest a quiescent-like strategy under prolonged stress, with a highly reduced photosynthetically active green area and suppressed production of new leaves and new offsets. Notably, the parental rosettes were able to combine this strategy with keeping their unrooted offsets alive, thus suggesting that the whole genet survival is prioritized here.

Universality of clonal offspring care, but at what cost?

Although there is plenty of evidence of parental ramets supporting their offset clones prior to their establishment (Ma et al., 2021) or when the connected offspring are under stress (Roiloa et al., 2014), here we found a behavior in a clonal plant species that goes far beyond that. In our study, despite enduring seven months of no water, the parental rosettes maintained attached through stolons their clonal unrooted offsets, which were water and nutrient dependent on the parent and survived (Fig. 2). There are some other situations in nature replicating this extreme process in which the offsets remain hanging onto their parent plant for a while, but, to our knowledge, not for such a long period of time. Vivipary, a rare event in angiosperms, is an efficient strategy that increases the survival of seedlings before they reach maturity (Cota-Sánchez & Abreu, 2007; Karmakar et al., 2019). This is the case of viviparous seeds in mangroves, which complete their maturation and germinate while attached to the maternal tree for several days or even weeks (to protect the embryos from high saline concentrations) (Tomlinson & Cox, 2000; Hong et al., 2018).

Aside from reporting this exceptional case in nature, in which this plant species was capable of keeping their offspring attached to the parental plant for several months under extreme stress before rooting occurred, we also found evidence of a drought acclimation and

growth arrest response taking place in the whole organism. Indeed, the unrooted offspring in the most drought-affected population showed higher ABA and JA-Ile contents in their leaves than their parents (Fig. 6), with both hormones being previously related to a drought acclimation photoprotective response in this and other plant species in their natural habitat (Villadangos & Munné-Bosch, 2023; Morales & Munné-Bosch, 2024). Also, we found markers of a hormonal drought stress response in the stolons, with higher levels of ABA and lower contents of cytokinins in the autumn in this population (Fig. 4). This suggests an orchestrated acclimation and growth arrest strategy induced by drought that is occurring simultaneously in the whole genet to further survive. In this way, quiescent metabolism and increased photoprotective capacity of the parental plant during clonal reproduction led to an extended survival under stress in this highly stress-tolerant plant.

Benefits and costs of clonal reproduction

Clonality produces modular independent units that propagate, usually thriving in heterogeneous environments. Thus, each unit or ramet represents a unique opportunity to expand the genet (Hutchings, 1999), as seen in our study with *S. tectorum*, which combines sexual with asexual (clonal) reproduction. This succulent plant with CAM metabolism and a great capacity to adapt to drought and extreme temperatures has monocarpic rosettes that complete their life cycle every 3-4 years, while also reaching immortality for the genotype each spring by additionally propagating vegetatively. The number of new offsets produced each year strongly depends on the prevailing growth conditions, with stressful conditions reducing new offset production, as reflected in our field study during the dry season (Fig. 4). Interestingly, adjustments in ABA levels, which may indeed account for increased photoprotection capacity (γ -tocopherol increases) and morphological adjustments (through LMA increases) (Negin & Moshelion, 2016), were sufficient for the parental rosettes hanging the highest number of offsets to prevent damage under very stressful conditions in the field (Fig. 7). Other well-known costs of clonal reproduction include increased selfing and inbreeding depression or self-incompatibility (Vallejo-Marín et al., 2010); however, *S. tectorum* reduces this limitation by also reproducing sexually every 3-4 years. Furthermore, clonal integration usually implies the division of labor among the connected ramets, allowing the sharing of the sexual reproductive costs (Wang et al., 2017). However, if the ramets are already independent, only the reproductive ramet suffers the costs, as we observed in *S. tectorum* in which the genet escapes death through the rooted offsets (Supplementary Fig. S4 and Fig. 8). This study has very important implications because it significantly contributes to

unveiling successful strategies underlying tolerance to very severe stress by avoiding oxidative stress burden and maintaining mechanisms to reach near immortality through clonal reproduction.

In conclusion, reaching immortality may have huge costs for species adaptation, except for some species like *S. tectorum* that combine sexual and asexual reproduction to escape genet mortality not only through the germ line, but also through the formation of new clonal offsets. This is particularly surprising in this case because of the great capacity of *S. tectorum* to adapt to abiotic stress and the fact that the parental rosette thrives in very harsh environments, even with several new offsets attached to it through stolons. Overall, our findings support an unusual change in oxidative stress homeostasis in leaves achieved via down-regulation of the metabolism to a quiescent-like stage under extreme stress conditions. *S. tectorum* displays fine-tuned strategies and stress adjustments that maintain the whole genet alive (both parental rosettes and their unrooted offsets survive for long periods of time) under very demanding environmental and developmental conditions, thus showing a huge capacity for extended survival under stress in this highly stress-tolerant plant.

Materials and methods

Plant species

Sempervivum tectorum L. is a clonal plant species that is native to the highest mountains of Europe (Supplementary Fig. S1) (Larcher et al., 2010; Klein & Kaderit, 2015; Villadangos & Munné-Bosch, 2023). It is a clonal perennial species with evergreen leaves in rosette and CAM metabolism. The plant propagates vegetatively through axillary stolons (aboveground horizontal stems), with the parental rosette producing several stolons during its lifespan and each stolon bearing only one offset ramet in its end. The new offsets remain attached to the parental rosette until rooting into the soil to become an independent ramet. Thus, there is a period in which the new offsets are completely unrooted and dependent on resources translocated from the parent plant. Each rosette is monocarpic pluriannual, growing for 3-4 years until it flowers and fruits only once under optimal conditions before the leaves senesce and the rosette dies.

Plant material and experimental design

For the first experiment, 18 potted *S. tectorum* plants purchased from a local garden were placed in trays inside a greenhouse at the Faculty of Biology of the University of Barcelona

(Barcelona, NE Spain). Each parental rosette and clonal offset per plant were labeled to enable their monitoring. Plants were grown under 16-h photoperiod conditions and watered twice a week with a half-diluted Hoagland nutrient solution. After one month of adaptation, the plants were randomly divided into two groups: control plants, which were kept watered twice a week for seven months (twenty-nine weeks), and water-stressed plants, which were not irrigated for the entire regime duration of seven months (twenty-nine weeks). The middle leaves from parental rosettes were sampled over time, including time 0 (T0), at 14 weeks of stress (moderate stress), at 29 weeks of stress (severe stress) and after one week of rewatering. For the second experiment, three natural populations of *S. tectorum* from the southern latitudes of its native distribution range were selected according to the gradient of the precipitation regime and altitude (for a description of the sites, see Fig. S1c and Table S1). In each population, 12 individuals were randomly selected, including the 12 parental rosettes and all their rooted and unrooted offspring (for a detailed description of the parental rosettes sizes and offsets number per individual, see Supplementary Table S4). Individual rosettes, both parents and offsets, were labeled in the spring and monitored throughout the spring (pre-stress), summer (maximum drought stress) and autumn (recovery).

Growth, rooting status and survival rate

For the greenhouse-grown plants, the parental and offspring rosette diameters were recorded, as well as the rooting status of each individual ramet throughout the experiment. All plants survived the seven months of the study and none of the individuals studied entered reproduction during this period. For plants grown in their natural habitat, field annotations for new offspring production, the rooting status of each individual ramet and plant growth (in rosette diameter) were performed. Rooting success was calculated as the number of rooted offsets for any given season in relation to the total number of unrooted offsets of the previous season. The offspring survival rate per plant and the number of plants entering sexual reproduction were also recorded in each population.

Green area estimation

The progression of senescence within the rosette (always occurring from the outer to the inner part) was followed in the greenhouse-grown plants through the individual monitoring of the plants by taking photographs twice a week. These photographs were processed with the FIJI software (an open-source image processing platform based on ImageJ, Schindelin *et al.*, 2012). Images were cropped to the desired size, excluding pixels not corresponding to the

rosette, converted from RGB to 8-bit-grayscale and treated by setting a threshold and selecting the percentage of the pixels' specific hue, saturation and brightness values. The green area was calculated by selecting the hue angle values between 35° and 120° out of 255°, the saturation values between 45° and 255° and the brightness values between 0° and 255° in all the images. Then, the green area (%) was calculated as $100 \times (\text{green area}/\text{total area})$.

PSII integrity and water content

For both the greenhouse-grown plants and the plants growing in the natural habitat, the maximum efficiency of PSII photochemistry, given by the ratio of the variable ($F_v = [F_m - F_0]$) to the maximal (F_m) fluorescence yield (F_v/F_m) sensu Takahashi & Badger (2011), was measured by determining the chlorophyll fluorescence of leaves with a portable pulse-amplitude modulated fluorometer (Mini-PAM II, Photosynthesis Yield Analyzer, Walz, Germany). The fresh (FW), turgid (TW) and dry (DW) weights of leaves were measured to obtain the relative water content (RWC), calculated as $100 \times (FW-DW)/(TW-DW)$.

Leaf mass per area

Leaves collected in the field experiment were scanned in a flatbed scanner (model Officejet Pro 8610, HP, California, USA), and leaf area was measured using Image J software. Then, leaf mass per area ratio (LMA) was calculated as $DW/\text{leaf area (gDW/cm}^2\text{)}$.

Tetrazolium viability test

To determine leaf damage, a tetrazolium viability test (TTC) was performed in another set of collected middle leaves, in both experiments, according to previous protocols (Larcher et al., 2010; Villadangos et al., 2023). In viable tissues, dehydrogenase activity reduces the colorless salt 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride into red-colored triphenyl formazan. After incubation with 0.5% TTC solution at 30°C for 24 h, stained leaves were rinsed and tested immediately by scanning and using the FIJI image processor to measure the color parameters. Among these parameters, the hue angle describes the relative amounts of redness and yellowness, where 0°/360° is defined as red, 90° as yellow, 180° as green and 270° as blue. In our case, where the green leaves were red-stained, the hue angle varied from 0° (red, fully stained, non-damaged tissue) to 180° (green, non-stained, fully damaged tissue). Leaf damage (%) was calculated as $(\text{hue value} \times 100)/180$.

Samplings for biochemical analyses

In both experiments, samples of the middle leaves from 8-9 parental rosettes and all their unrooted and rooted offsets were collected at midday at each sampling time/season and frozen in liquid nitrogen *in situ*. They were then transported to the laboratory and kept at -80°C until biochemical analysis.

Hormonal profiling

Stress-related phytohormones (including abscisic acid [ABA], salicylic acid [SA], the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid [ACC], and the jasmonates such as the precursor 12-*oxo*-phytodienoic acid [OPDA], jasmonic acid [JA] and its conjugate bioactive form jasmonoyl-isoleucine [JA-Ile]) and growth-related phytohormones (including the auxin indole-3-acetic acid [IAA], the cytokinins isopentenyl adenosine [IPA], 2-isopentenyl adenine [2-iP] and *trans*-zeatin [Z], and the gibberellins GA₁, GA₃, GA₄ and GA₇) were measured in methanolic extracts. In brief, 50 mg of frozen material were ground in liquid nitrogen and repeatedly extracted in cold methanol containing 0.01% of butylated hydroxytoluene and the appropriate deuterium-labeled internal standards for each hormone (ABA, SA, JA, ACC, IAA, IPA, 2iP, Z, GA₁ and GA₄). The samples were then subjected to cold sonication in an ultrasonic bath for 30 min, vortexing and a centrifugation at 4°C and 15980 g for 10 min. The supernatants were recovered in each step, pooled together and used for subsequent analyses. Phytohormones were quantified by ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) as previously described (Müller & Munné-Bosch, 2011) and by using standard calibration curves for each analyte (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and deuterium standards (OlChemim Ltd, Olomouc, Czech Republic).

Pigments, vitamin E and lipid peroxidation

Foliar pigments (chlorophylls and carotenoids) were estimated spectrophotometrically (Lichtenthaler & Welburn, 1983) using the same methanolic extracts, as well as lipid hydroperoxides (LOOH), which are the primary products of lipid peroxidation, that were estimated using the FOX-2 assay as previously described (Bou et al., 2008). To reduce the cross-reactivity of interfering phenolic compounds in this assay, the supernatants were mixed with 5% (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVPP) and centrifuged before plating. Tocopherols were also measured by HPLC using a mobile phase of *n*-hexane and 1,4-dioxane (95.5:4.5, v/v), a normal phase column (Inertsil 100A, 5 µm, 250 x 3.0 mm, GL Sciences, Torrance,

California, USA) and fluorescence detection (Amaral et al., 2005). Tocopherol standards (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) were used for the quantification.

The content of malondialdehyde (MDA), a secondary product of lipid peroxidation, was determined spectrophotometrically using the thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) assay, as previously described (Hodges et al., 1999). Briefly, 100 mg of the sample were repeatedly extracted with 80% (v/v) cold ethanol containing 0.01% (w/v) butylated hydroxytoluene, before being subjected to 30 min of cold ultrasonication, vortexing and a 10-min centrifugation at 9402 g. Again, to reduce cross-reactivity, supernatants were mixed with 5% PVPP and centrifuged. After incubation of the supernatants with -TBA and +TBA solutions in separated glass tubes for 25 min at 95°C, the reactions were stopped with a cold temperature and samples were centrifuged to clarify the solutions. Finally, 200 µL from each tube were plated per triplicate and absorbances read at 440, 532, 600 and 800 nm, before the quantification of the MDA equivalents using the Hodges equations.

Data analyses

All statistical analyses (ANOVAs, individual Kruskal-Wallis non-parametric tests, Tukey's or Bonferroni post-hoc tests for multiple comparisons, principal component analysis and Spearman's correlations) were performed in RStudio (RStudio Team, 2021). The R packages "agricolae" version 1.3-5, "car" version 3.1-1 and "MASS" version 7.3-54 were used. Both data normality and the homoscedasticity of residuals were verified before performing the statistical analyses (Zuur et al., 2009). Whenever possible, data was transformed through Box-Cox transformations and when not, non-parametric tests were performed instead of ANOVAs. $P < 0.05$ was considered to indicate significant differences.

For the worldwide map distribution of the species, the R package "maptools" version 1.1-9 was used and the coordinates were occurrences downloaded from the Global Biodiversity Information Facility (GBIF), filtering the Taxon Key by "*Sempervivum tectorum* L". The occurrences dataset was filtered in the *Scientific Name* column by "*Sempervivum tectorum*" to discard observations of hybrids, as well as in the *Basis of Record* column by eliminating "Fossil Specimen" and "Machine Observation".

Acknowledgments

We would like to express our gratitude to Sònia Llobet and Daniel Guinart, the director and conservation technician, respectively, of *Les Guilleries* Natural Protected Area for the

research permissions. We thank Laia Jené, Clara Julián, Tania Mesa, Ot Pasques and Jessyca Adelle S. Santos for their essential help with the field samplings. We are also very grateful to the *Serveis Científico-tècnics* from the University of Barcelona for their technical assistance.

Author contributions

S.V. and S.M.-B. conceived and designed the project; S.V. conducted all the experiments, including data collection and processing; S.V. performed data analyses with the help of S.M.-B; S.V. and S.M.-B. wrote the manuscript.

Supplementary data

The following materials are available in the online version of this article:

Supplementary Figure S1. Model species justification and selected population characteristics.

Supplementary Figure S2. Adjustments in clonal offset production and offsets' rooting status of *S. tectorum* plants in their natural habitat.

Supplementary Figure S3. Quiescent-like mechanisms of *S. tectorum* in its natural habitat.

Supplementary Figure S4. Clonal plasticity in parental plants undergoing sexual reproduction and senescence.

Supplementary Table S1. Climatic data recorded during each field sampling.

Supplementary Table S2. Statistical analyses results of hormonal variations in stolons.

Supplementary Table S3. Statistical analyses results of functional traits in leaves.

Supplementary Table S4. Size of the parental rosettes and number of unrooted and rooted offsets for each selected individual in the field.

Funding

This research was financed by the Catalan Government through an ICREA Academia award and the 2021 SGR 00675 grant.

Conflict of interest statement. None declare

Data availability

All the data used in this study are included in the manuscript and/or Supplementary data.

References

- Amaral JS, Casal S, Torres D, Seabra RM, Oliveira BPP. Simultaneous determination of tocopherols and tocotrienols in hazelnuts by a normal phase liquid chromatographic method. *Anal. Sci.* 2005;21:1545–1548. <https://doi.org/10.2116/analsci.21.1545>
- Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 1998;78(2):547–581. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.2.547>
- Borland AM, Elliott S, Patterson S, Taybi T, Cushman J, Pater B, Barnes J. Are the metabolic components of crassulacean acid metabolism up-regulated in response to an increase in oxidative burden? *J. Exp. Bot.* 2006;57(2):319–328. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj028>
- Bou R, Codony R, Tres A, Decker EA, Guardiola F. Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation-xylenol orange method: a review of the factors that influence the method's performance. *Anal. Biochem.* 2008;377(1):1–15. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.02.029>
- Carvalho V, Abreu ME, Mercier H, Nievola CC. Adjustments in CAM and enzymatic scavenging of H₂O₂ in juvenile plants of the epiphytic bromeliad *Guzmania monostachia* as affected by drought and rewatering. *Plant Physiol. Biochem.* 2017;113:32–39. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.01.024>
- Cavalier-Smith T. Origins of the machinery of recombination and sex. *Hered.* 2002;88:125–141. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800034>
- Chen J-S, Lei N-F, Dong M. Clonal integration improves the tolerance of *Carex praeclara* to sand burial by compensatory response. *Acta Oecol.* 2010;36(1): 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2009.09.006>
- Cota-Sánchez JH, Abreu DD. Vivipary and offspring survival in the epiphytic cactus *Epiphyllum phyllanthus* (Cactaceae). *J. Exp. Bot.* 2007;58(14):3865–3873. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm232>
- Dahlgren JP, Roach DA. Demographic senescence in herbaceous plants. In *The Evolution of Senescence in the tree of life*, eds. R. P. Shefferson, O. R. Jones, and R. Salguero-Gómez. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2017:303–319. <https://doi.org/10.1017/9781139939867.015>

- De Meeûs T, Prugnolle F, Agnew P. Asexual reproduction: Genetics and evolutionary aspects. *Cell. Mol. Life Sci.* 2007;64(11):1355–1372. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6515-2>
- Douhovnikoff V, Goldsmith GR, Tape KD, Huang C, Sur N, Bret-Harte MS. Clonal diversity in an expanding community of arctic *Salix* spp. and a model for recruitment modes of arctic plants. *Arct. Antarct. Alp. Res.* 2010;42(4):406–411. <https://doi.org/10.1657/1938-4246-42.4.406>
- Douhovnikoff V, Dodd RS. Epigenetics: a potential mechanism for clonal plant success. *Plant Ecol.* 2015;216:227–233. <https://doi.org/10.1007/s11258-014-0430-z>
- Earnshaw MJ, Carver KA, Lee JA. Changes in leaf water potential and CAM in *Sempervivum montanum* and *Sedum album* in response to water availability in the field. *Oecologia* 1985;67:486–492. <https://doi.org/10.1007/BF00790018>
- Eckert CG. The loss of sex in clonal plants. *Evol. Ecol.* 2001;15:501–520. <https://doi.org/10.1023/A:1016005519651>
- Fenollosa E, Roach DA, Munné-Bosch S. Death and plasticity in clones influence invasion success. *Trends Plant Sci.* 2016;21(7):551–553. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.05.002>
- Foyer CH, Noctor G. Defining robust redox signalling within the context of the plant cell. *Plant Cell Environ.* 2015;38(2):239. <https://doi.org/10.1111/pce.12487>
- GBIF.org (3 April 2024). GBIF Occurrence Download <https://doi.org/10.15468/dl.k4njdy>
- Gill SS, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 2010;48(12):909–30. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Guan Q, Tan B, Kelley TM, Tian J, Chen S. Physiological changes in *Mesembryanthemum crystallinum* during the C3 to CAM transition induced by salt stress. *Front. Plant Sci.* 2020;11:283. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00283>
- Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 1956;11(3):298–300. <https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 1999;207:604–611. <https://doi.org/10.1007/s004250050524>

- Hong L, Su W, Zhang Y, Ye C, Shen Y, Li QQ. Transcriptome profiling during mangrove viviparity in response to abscisic acid. *Sci. Rep.* 2018;8(1):770. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19236-x>
- Hutchings M. Clonal plants as cooperative systems: Benefits in heterogeneous environments. *Plant Species Biol.* 1999;14(1):1-10. <https://doi.org/10.1046/j.1442-1984.1999.00001.x>
- Isaksson C, Sheldon BENC, Uller T. The challenges of integrating oxidative stress into life-history. *Bio-Science* 2011;61(3):194–202. <https://doi.org/10.1525/bio.2011.61.3.5>
- Karmakar NC, Hazra A, Das S. *Bidens pilosa* L.: Exclusive report of vivipary in a non-mangrove taxa from the eastern Himalayas. *Plant Species Biol.* 2019;34(3):122–126. <https://doi.org/10.1111/1442-1984.12237>
- Kelly CK. Thoughts on clonal integration: Facing the evolutionary context. *Evol. Ecol.* 1995;9:575–585. <https://doi.org/10.1007/BF01237656>
- Klein JT, Kaderit JW. Phylogeny, biogeography, and evolution of edaphic association in the European oreophytes *Sempervivum* and *Jovibarba* (Crassulaceae). *Int. J. Plant Sci.* 2015;176(1):44-71. <https://doi.org/10.1086/677948>
- Klimeš L, Klimešova J, Hendriks R, van Groenendael J. Clonal plant architecture: a comparative analysis of form and function. In: *The ecology and evolution of clonal plants*, eds. H. de Kroon, J. van Groenendael. Backhuys Publishers, Leiden, 1997:1–29.
- Larcher W, Kainmüller C, Wagner J. Survival types of high mountain plants under extreme temperatures. *Flora* 2010;205(1):3–18. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2008.12.005>
- Leverett A, Borland AM. Elevated nocturnal respiratory rates in the mitochondria of CAM plants: current knowledge and unanswered questions. *Ann. Bot.* 2023;132(4):855-867. <https://doi.org/10.1093/aob/mcad119>
- Lichtenthaler H, Wellburn A. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.* 1983;11(5):591-592. <https://doi.org/10.1042/bst0110591>
- Ma X, Li Y, Yu H, Liu C. Support from mother ramets declines with increasing independence of daughter ramets in submerged clonal *Vallisneria natans*. *Aquat. Ecol.* 2021;55(1):299–308. <https://doi.org/10.1007/s10452-021-09831-y>
- Matlaga DP, Sternberg LSL Ephemeral clonal integration in *Calathea marantifolia* (Marantaceae): Evidence of diminished integration over time. *Am. J. Bot.* 2009;96(2): 431–438. <https://doi.org/10.3732/ajb.0800164>

- May JD, Killingbeck KT. Effects of preventing nutrient resorption on plant fitness and foliar nutrient dynamics. *Ecology* 1992;73(5):1868–1878. <https://doi.org/10.2307/1940038>
- Morales M, Oñate M, García MB, Munné-Bosch S. Photo-oxidative stress markers reveal absence of physiological deterioration with ageing in *Borderea pyrenaica*, an extraordinarily long-lived herb. *J. Ecol.* 2013;101(3):555–565. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12080>
- Morales M, Munné-Bosch S. Oxidative stress: a master regulator of plant trade-offs? *Trends Plant Sci.* 2016;21(12): 996–999. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.09.002>
- Morales M, Munné-Bosch S. Hormonal response to recurrent seasonal stress in coastal and mountain scabiouses growing in their natural habitat: linking ABA and jasmonates with photoprotection. *Physiol. Plant.* 2024;176(2):e14265. <https://doi.org/10.1111/pp.14265>
- Mullineaux PM, Baker NR. Oxidative stress: antagonistic signaling for acclimation or cell death? *Plant Physiol.* 2010;154(2):521–525. <https://doi.org/10.1104/pp.110.161406>
- Müller M, Munné-Bosch S. Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Plant Methods* 2011;17:37. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-7-37>
- Munné-Bosch S, Alegre L. Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Funct. Plant Biol.* 2004;31(3):203–216. <https://doi.org/10.1071/FP03236>
- Obeso JR. The costs of reproduction in plants. *New Phytol.* 2002;155(3):321–348. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00477.x>
- Rapp RA, Wendel JF. Epigenetics and plant evolution. *New Phytol.* 2005;168(1):81–91. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01491.x>
- Roiloa SR, Antelo B, Retuerto R. Physiological integration modifies $\delta^{15}\text{N}$ in the clonal plant *Fragaria vesca*, suggesting preferential transport of nitrogen to water-stressed offspring. *Ann. Bot.* 2014;114(2):399–411. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu064>
- RStudio Team. 2021. RStudio: integrated development environment for R. RStudio, PBC, Boston, MA, USA.
- Sammarco I, Díez Rodríguez B, Galanti D, Nunn A, Becker C, Bossdorf O, Münzbergová Z, Latzel V. DNA methylation in the wild: epigenetic transgenerational inheritance can mediate adaptation in clones of wild strawberry (*Fragaria vesca*). *New Phytol.* 2024;241(4):1621–1635. <https://doi.org/10.1111/nph.19464>

- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 2012;9(7):676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Selman C, Blount JD, Nussey DH, Speakman JR. Oxidative damage, ageing, and life-history evolution: where now? *Trends Ecol. Evol.* 2012;27(10):570–577. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.06.006>
- Speakman JR. The physiological costs of reproduction in small mammals. *Phil. Trans. Roy Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2008;363(1490):375–398. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2145>
- Stearns S. The evolution of life histories. Oxford, UK: Oxford University Press. 1992.
- Stuefer JF. Two types of division of labour in clonal plants: benefits, costs and constraints. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 1998;1(1):47–60. <https://doi.org/10.1078/1433-8319-00051>
- Takahashi S, Badger MR. Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends Plant Sci.* 2011;16(1):53–60. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.10.001>
- Thomas H. Senescence, ageing and death of the whole plant. *New Phytol.* 2012;197(3): 696–711. <https://doi.org/10.1111/nph.12047>
- Tomlinson PB, Cox PA. Systematic and functional anatomy of seedlings in mangrove Rhizophoraceae: vivipary explained? *Botanical J. Linn. Soc.* 2000;134(1-2):215–231. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2000.tb02352.x>
- Vallejo-Marín M, Dorken ME, Barret SCH. The ecological and evolutionary consequences of clonality for plant mating. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2010;41:193–213. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.110308.120258>
- Van Breusegem F, Dat JF. Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiol.* 2006;141(2):384–390. <https://doi.org/10.1104/pp.106.078295>
- Villadangos S, Mesa T, Muñoz P, Munné-Bosch S. The tetrazolium test: reviving and old but useful stress marker. *Trends Plant Sci.* 2023;28(5):609–610. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2023.01.003>
- Villadangos S, Munné-Bosch S. Acclimation to a combination of water deficit and nutrient deprivation through simultaneous increases in abscisic acid and bioactive jasmonates in the succulent plant *Sempervivum tectorum* L. *J. Plant Physiol.* 2023;287:154040. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2023.154040>
- Wang J, Xu T, Wang Y, Li G, Abdullah I, Zhong Z, Liu J, Zhu W, Wang L, Wang D, Yu F-H. A meta-analysis of effects of physiological integration in clonal plants under

homogeneous vs. heterogeneous environments. *Funct. Ecol.* 2021;35(3): 578-589.
<https://doi.org/10.1111/1365-2435.13732>

Wang L, Wang H, He C, Sheng L, Tang Z. An irreversible division of labor through a sexually dependent system in the clonal plant *Iris laevigata* (Iridaceae). *Ecosphere* 2017;8(3):e01757. <https://doi.org/10.1002/ecs2.1757>

Waszczak C, Carmody M, Kangasjärvi J. Reactive oxygen species in plant signaling. *Ann. Rev. Plant Biol.* 2018;69:209–236. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040322>

Wibowo A, Becker C, Durr J, Price J, Spaepen S, Hilton S, Putra H, Papareddy R, Saintain Q, Harvey S. *et al.* Partial maintenance of organ-specific epigenetic marks during plant asexual reproduction leads to heritable phenotypic variation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2018;115(39):E9145–E9152. <https://doi.org/10.1073/pnas.1805371115>

Zhang Y, Zhang Q, Luo P, Wu N. Photosynthetic response of *Fragaria orientalis* in different water contrast clonal integration. *Ecol. Res.* 2009;24(3):617-625.
<https://doi.org/10.1007/s11284-008-0533-x>

Zuur A, Ieno E, Elphick C. A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods Ecol. Evol.* 2009;1(1):3-14. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2009.00001.x>

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Extreme tolerance and resilience under drought stress in the clonal plant species *Sempervivum tectorum*. Extremes were found for this species in the laboratory, in the greenhouse under controlled conditions and in its natural habitat. **(A)** An offset of *S. tectorum* shed from the parental rosette survived for a whole year in the laboratory, fully unrooted, without any substrate or supplementary water. **(I)** Photograph showing the offset location within the parental rosette 4 days before shedding on 15th March 2022. Visible signs of initial desiccation were found in the outermost older leaves. **(II)** Photograph of the unrooted rosette one year later on 29th March 2023. The inner, middle and outer leaves within the rosette are indicated. For each rosette part, the relative water content (RWC%) and the maximum quantum efficiency of photosystem II (F_v/F_m) are shown as physiological stress markers. **(B)** *S. tectorum* potted plants withstood complete water withdrawal for seven months, experiencing moderate and severe stress, before recovering their physiological status in one week after rewatering. Photographs of a representative individual during all stages of the experiment. Arrows indicate the middle part of the parental rosette, whose leaves were sampled throughout the study. Time-course evolution of RWC% and F_v/F_m from the onset of the stress (T0), during moderate stress (MS), during the maximum stress or severe stress (SS) and after 1 week of rewatering (recovery, R). Data are the mean $\pm$ SE of $n = 9$. P -values of one-way ANOVA are shown. Different letters indicate significant differences between the sampling points ($P < 0.05$, Tukey's post-hoc test). **(C)** Evaluation of the drought response throughout the seasons (spring, summer and autumn) in three natural populations of *S. tectorum* with different precipitation regimes (see Figure S1). On the left, photographs of *S. tectorum* individuals showing tubular structures of senescent organs on which clonal offsets can grow, taking advantage of the dry matter, with the parental rosettes keeping many clonal offsets alive during a drought stress event that could lead to the death of the parental rosette. On the right, a season-course development of RWC% and F_v/F_m in the *S. tectorum* parental rosettes from the three populations. Data are the mean $\pm$ SE of $n = 8$. P -values of one-way ANOVA are shown when significant differences between the seasons were found ($P < 0.05$). NS, not significant. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$, Tukey's post-hoc test).

Figure 2. Leaf viability and morphological strategy to survive along a drought gradient. **(A)** Tetrazolium viability test in *S. tectorum* middle leaves from control, mildly stressed and

moderately stressed potted plants, with parental rosettes holding 92%, 87% and 53% of the RWC, respectively. Leaf damage was calculated from the Hue angle (see materials and methods for further details). Data from 8 parental rosettes, 17 unrooted offsets and 28 rooted offsets for the control, 9 parental rosettes, 38 unrooted offsets and 20 rooted offsets for the mildly stressed plants, and 9 parental rosettes, 37 unrooted offsets and 17 rooted offsets for the moderately stressed plants are shown. Different capital letters indicate significant differences between the stress conditions and different lower-case letters indicate significant differences between the developmental statuses (Tukey's post-hoc test, ANOVA, $P < 0.05$). **(B)** A representative individual showing gradual senescence from the outer leaves to the innermost part of the rosettes (both parental and offsets rosettes) as stress duration increased. Folding and total closure of the inner leaves of the apical bud occurred during severe stress. After rewatering, rosettes reopened the inner leaves, and the remaining middle leaves were fully recovered. Below, green area measured in the parental, the unrooted and the rooted rosettes during both moderate and severe stress and during the recovery. Data from 9 parental rosettes, 37 unrooted offsets and 17 rooted offsets for the moderately stressed plants, and 9 parental rosettes, 34 unrooted offsets and 13 rooted offsets for both the severely stressed plants and the recovery plants are shown. P-values from one-way ANOVA are shown when significant differences were found ($P < 0.05$). NS, not significant.

Figure 3. Hormonal response and quiescent-like strategy to avoid oxidative stress. **(A, B)** Endogenous contents of stress-related phytohormones, including abscisic acid (ABA) and salicylic acid (SA), and the jasmonate family including the precursor 12-*oxo*-phytodienoic acid (OPDA), free jasmonic acid (JA) and the aminoacidic conjugate jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) at 0 weeks (T0), 14 weeks (moderate stress, MS) and 29 weeks (severe stress, SS) without water supply and one week after rewatering (recovery, R) in the greenhouse experiment. **(C)** Endogenous contents of malondialdehyde (MDA), a secondary product of lipid peroxidation, and the photoprotective lipophilic antioxidant vitamin E (both γ - and α -tocopherol forms). Data are the mean $\pm$ SE of $n = 9$. P-values of one-way ANOVA are shown. Different letters indicate significant differences between the sampling points. **(D)** Graphical summary of the quiescent-like strategy displayed by the plant at the leaf level, avoiding oxidative stress by maintaining extremely low oxidative levels during prolonged periods of stress and by activating the jasmonate (JA) pathway during moderate stress, allowing oxylipin signaling to induce drought tolerance

responses including the modulation of tocopherol biosynthesis. $\text{LOO}^\bullet$, lipid peroxy radical; LOOH, lipid hydroperoxides; PUFA, polyunsaturated fatty acids; ROS, reactive oxygen species.

Figure 4. Adjustments in clonal offset production and hormonal variations in stolons along a drought severity gradient in the field. **(A)** Clonal offset production evaluated in the same three natural populations of *S. tectorum*. On the left, a boxplot pooling all the data showing clonal offset production, i.e., increases in the number of offsets in the summer with respect to the spring and in the autumn with respect to the summer. On the right, clonal offset production in the summer analyzed by population. Data show the mean $\pm$ SE of $n = 12$ parental rosettes ($P < 0.05$, one-way ANOVA). Asterisk (*) indicates significant differences between the populations according to Tukey's post-hoc test. **(B)** Percentage of rooting success of the unrooted offsets from the spring to the summer and from the summer to the autumn in the three populations. Data show the mean $\pm$ SE of $n = 12$, 12 and 11 parental rosettes for population 1, 2, and 3, respectively, during the spring-summer period and 9, 10 and 8 parental rosettes for population 1, 2, and 3, respectively, during the summer-autumn period. P -values from the Kruskal-Wallis non-parametric tests for both season and population are shown when significant differences were found ($P < 0.05$). NS, not significant. Photographs showing a representative plant with unrooted and rooted offsets (indicated by an arrow). **(C)** Hormonal variations in the stolons from all the offsets among the three populations in the autumn. Colored boxes indicate significant differences according to Tukey's post-hoc test ($P < 0.05$). Dark and light blue colors indicate significantly higher or lower contents, respectively. Colored boxes with intermediate intensities indicate that there are no significant differences. See Supplemental Table 2 for P -values from ANOVAs.

Figure 5. Seasonal changes in leaf viability and photosynthetic status in the field. **(A)** Leaf damage (%) in the seasons (spring, summer and autumn) calculated from a tetrazolium viability test in the leaves from parental rosettes (P) and the unrooted (U) and rooted (R) offsets from 3 populations of *S. tectorum* in their natural habitat (see photographs of a representative individual per population). **(B)** Photosynthetic status indicated by the maximum quantum efficiency of photosystem II (F_v/F_m) and endogenous total chlorophyll contents (Chl a + b) in the leaves of parents and unrooted and rooted offsets from the 3 populations during the different seasons. Data shown are for $n = 8$ individuals (8 parental rosettes and all their offsets) in each population. P -values from the Kruskal-Wallis non-parametric tests for both season and developmental status

are shown for when significant differences were found ($P < 0.05$). Otherwise, NS is shown when differences were not significant. Different letters show significant differences ($P < 0.05$) between the seasons using the Bonferroni post-hoc test. Individual Kruskal-Wallis non-parametric tests were performed between the statuses from the same season and significant differences ($P < 0.05$) between them are indicated with asterisks (*).

Figure 6. Physiological mechanisms explaining drought acclimation in the field. **(A)** Principal component analysis (PCA) of the relevant variables related to drought stress responses explaining 58.2% of the total variance. On the left, a biplot representing all the individuals from the three populations during the summer season. Ellipses define the 95% confidence intervals for each developmental status group: parental rosettes (P, purple), rooted offsets (R, brown) and unrooted offsets (U, green). Axis percentages indicate the amount of variation accounted for by each principal component. Black arrows point to where the variables increase the most. On the right, bar plots for the contributions of each variable to the principal components PC1 and PC2. **(B)** Changes in the drought acclimation response in population 1 between the parental rosettes and unrooted offsets, including the hormonal drought response led by abscisic acid (ABA) and the bioactive jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile). Other relevant changes, such as variations in the photoprotective system, are shown (chlorophyll a/b ratio and the precursor of vitamin E, γ -tocopherol). Data shown are for $n = 8$ individuals (8 parental rosettes and all their offsets) in each population. P -values from the Kruskal-Wallis non-parametric tests for both season and developmental status are shown for when significant differences were found ($P < 0.05$). Otherwise, NS is shown when differences were not significant. Different letters show significant differences ($P < 0.05$) between the seasons using the Bonferroni post-hoc test. Individual Kruskal-Wallis non-parametric tests were performed between the statuses from the same season and significant differences ($P < 0.05$) between them are indicated with asterisks (*).

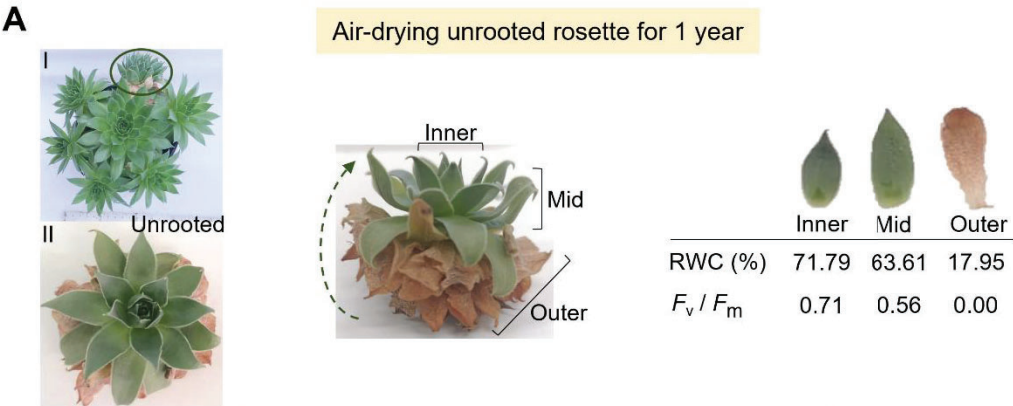
Figure 7. The quiescent-like strategy of the parental rosette is modulated by ABA when the number of unrooted offsets increases, but at no cost for survival. **(A)** Only parental rosettes from the field experiment with a RWC $< 70\%$ and LOOH $< 20\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$ were selected for the analysis. From 78 total observations, only 16 met both criteria. **(B)** The number of (unrooted or total) offsets produced by the parental rosette does not affect stress damage markers, including RWC, LOOH, leaf damage, Chl a + b, Chl a / b, and F_v/F_m . Both rho and p -values from Spearman

correlations are shown. (C) Physiological adjustments in the parental rosette as the number of clonal offsets increases. Both rho and *p*-values from Spearman correlations, including stress and growth-related phytohormones, photoprotective molecules, and leaf mass area (LMA) are shown. On the right, a simplified picture showing the biological significance of the most biologically significant correlations with abscisic acid (ABA), γ -tocopherol, and LMA.

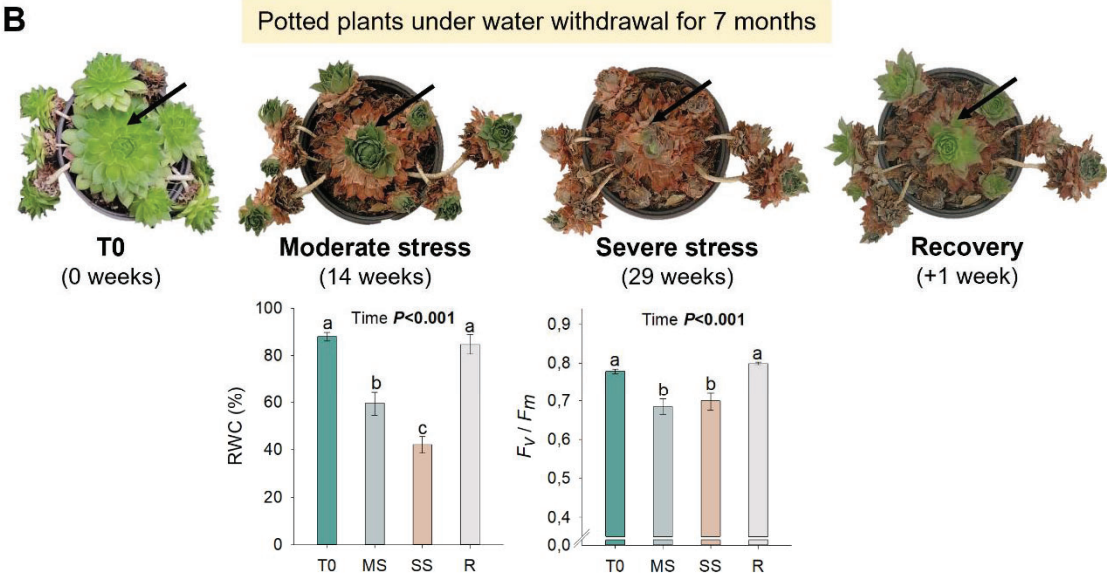
Figure 8. Key life-traits to maintain quiescence and survival of the whole genet under extreme stress in a highly stress-tolerant species. *S. tectorum* is endowed with both morphological and physiological strategies spatiotemporally displayed to protect the meristematic tissues in the inner apical bud. Being tolerant to severe stress allows clonal offspring production and maintenance attached to the parental plant during prolonged periods of time until rooting occurs. Moreover, the quiescent-like strategy displayed by the parental rosette is modulated by ABA adjustments when the number of unrooted offsets increases, but at no cost for survival. By prioritizing the survival of the clonal offsets, the whole genet survives even when the parental rosette reproduces sexually and then enters senescence, reaching near immortality for the genotype. ABA, abscisic acid; Chl, chlorophyll; JA-Ile, jasmonoyl-isoleucine; MDA, malondialdehyde; VitE, vitamin E.

Figure 1

A



B



C

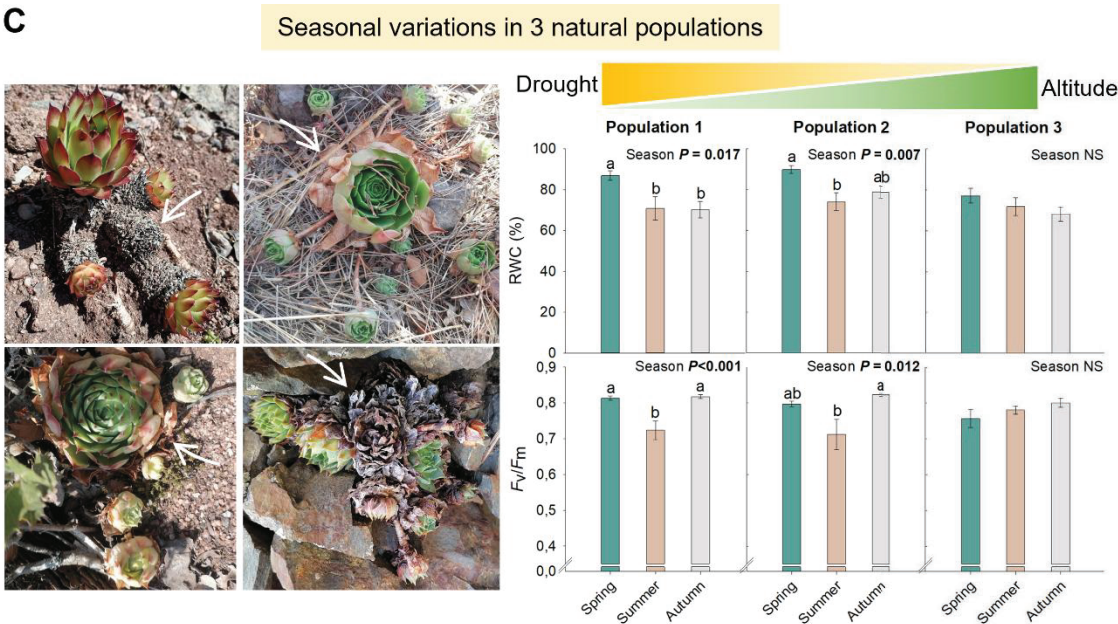


Figure 2

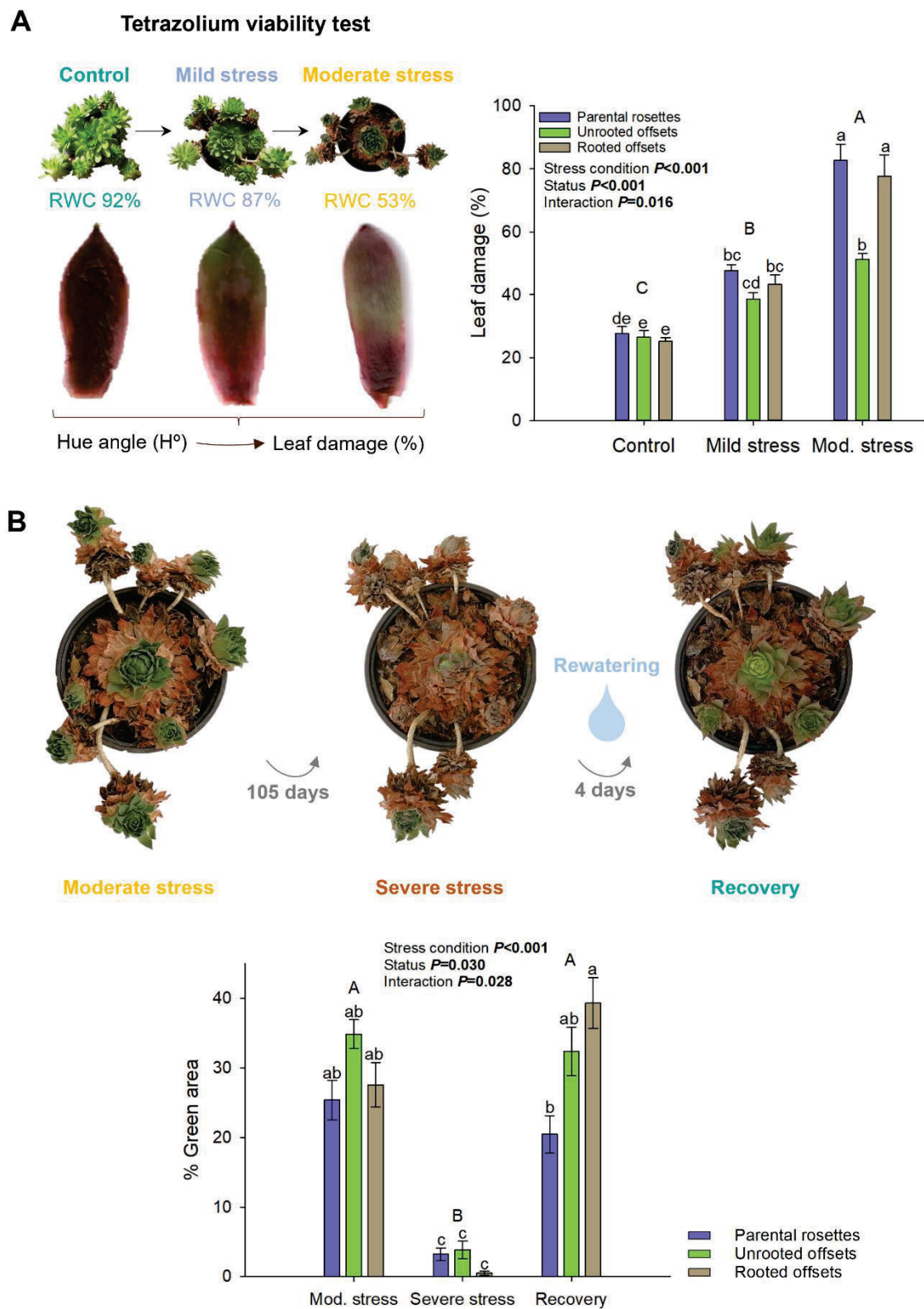


Figure 3

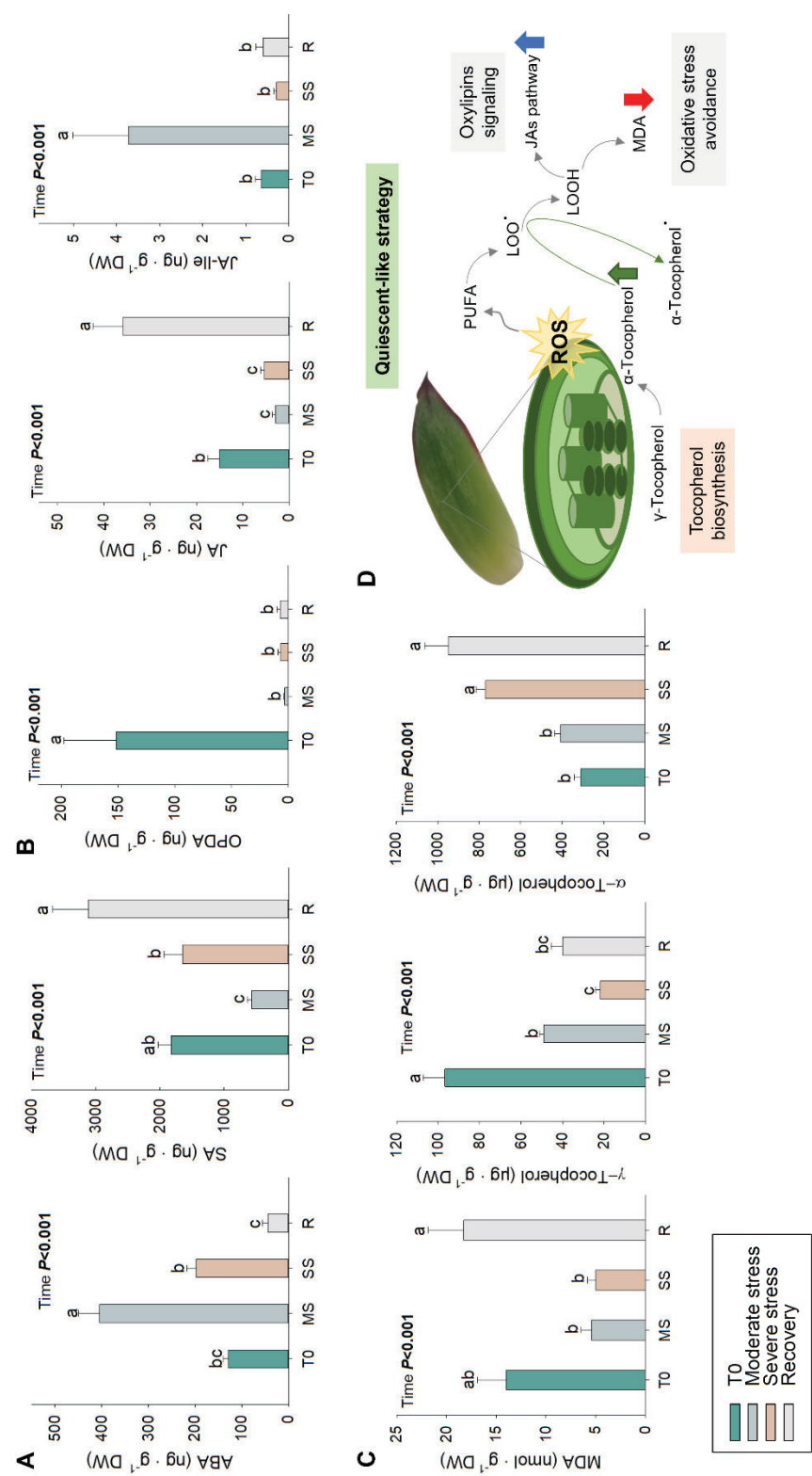


Figure 4

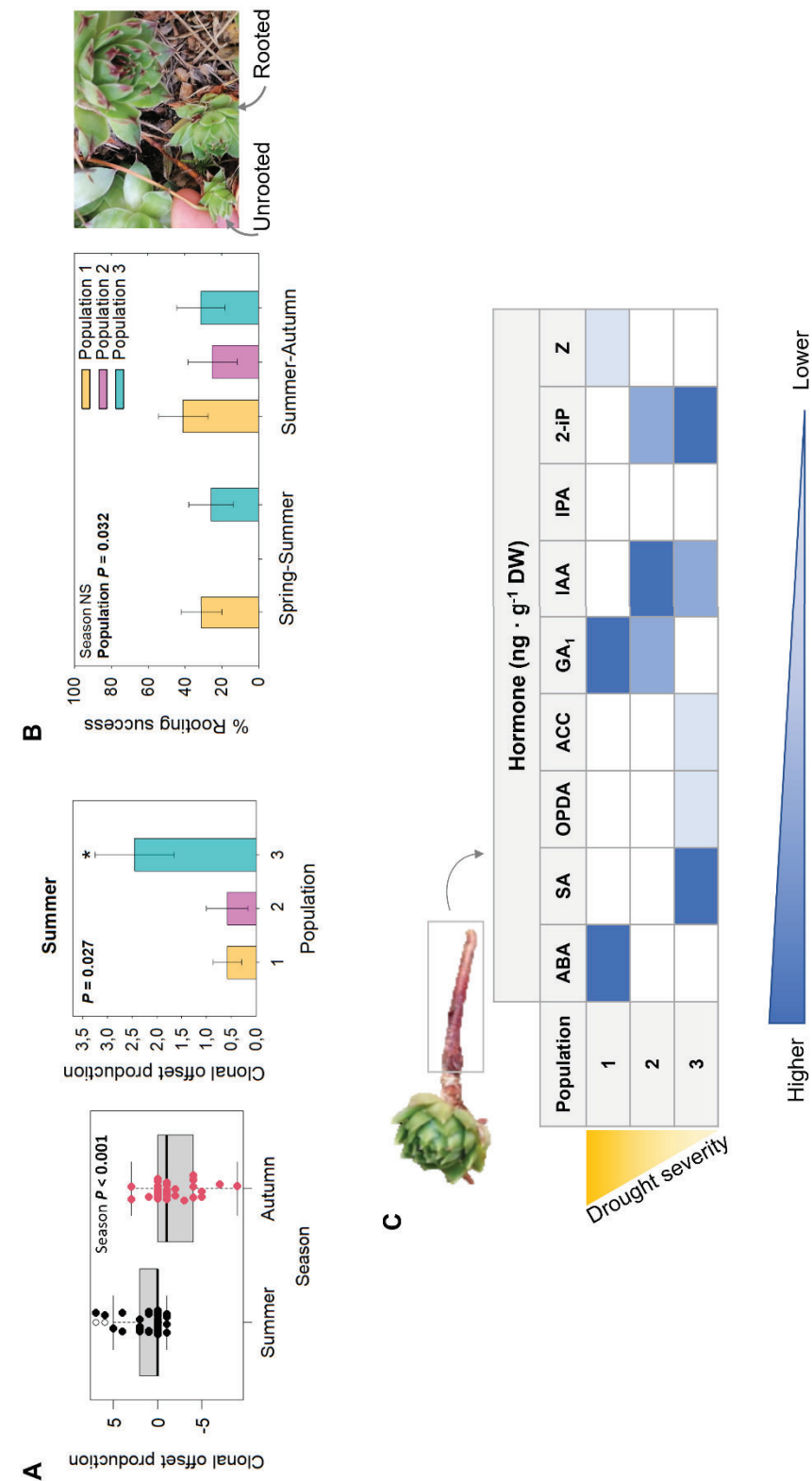


Figure 5

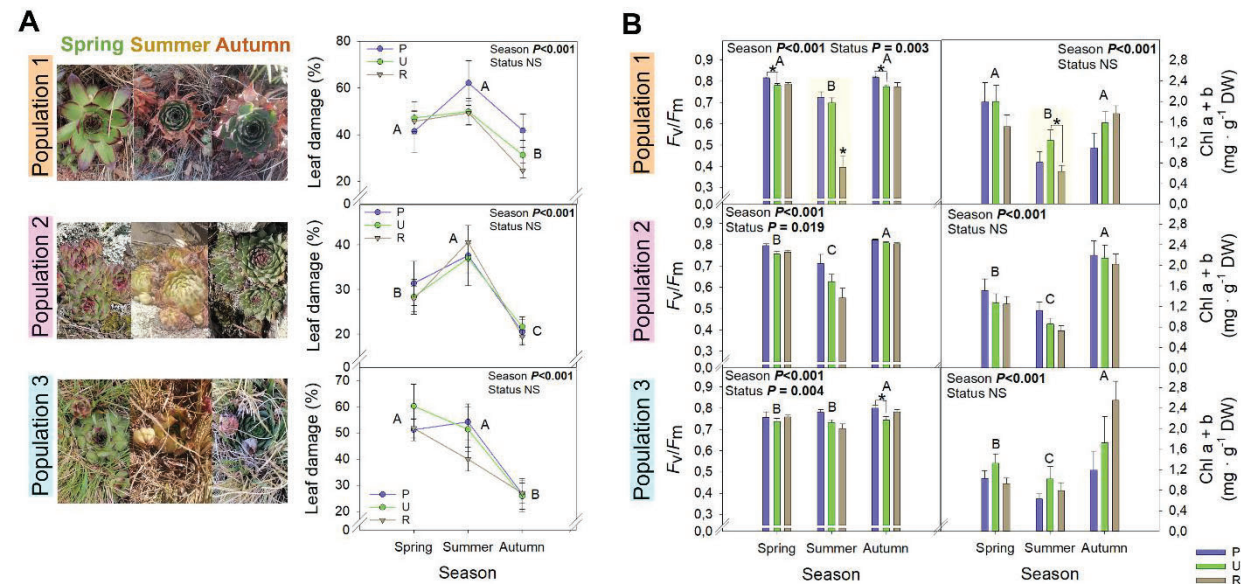


Figure 6

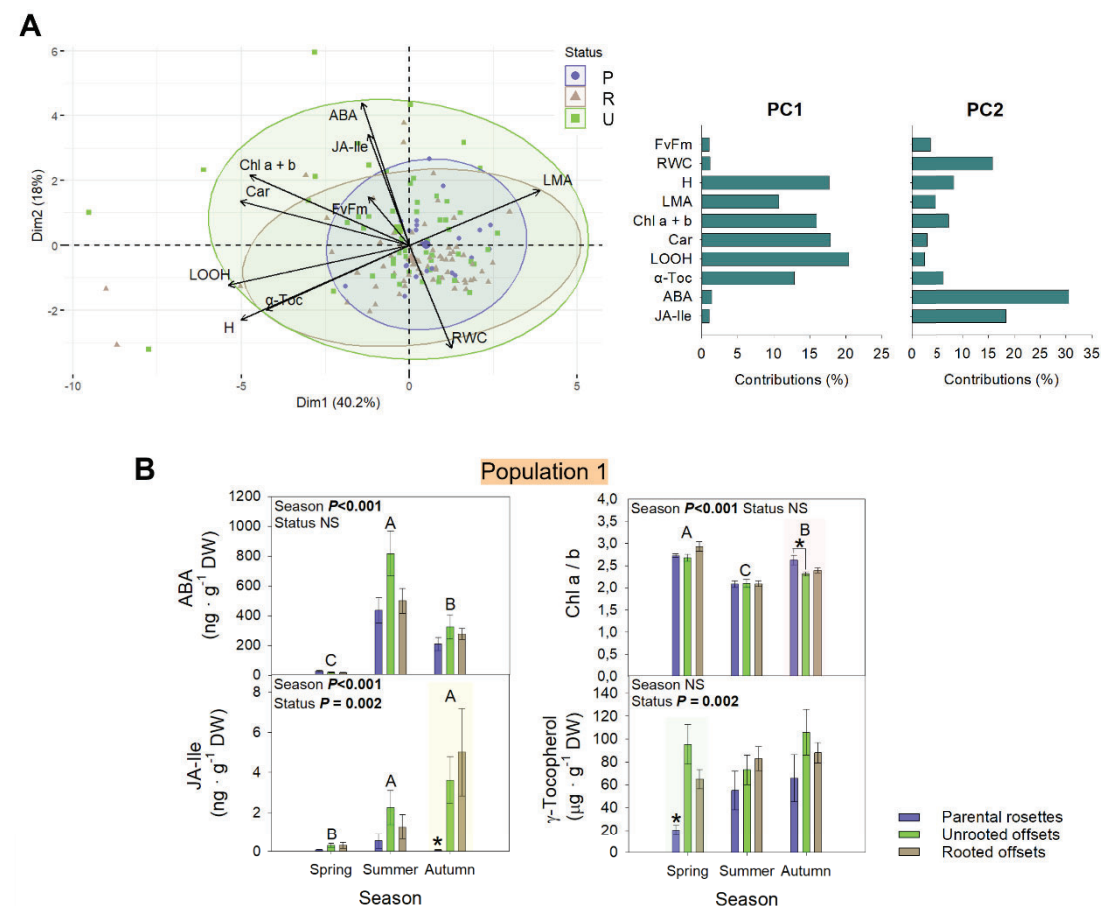


Figure 7

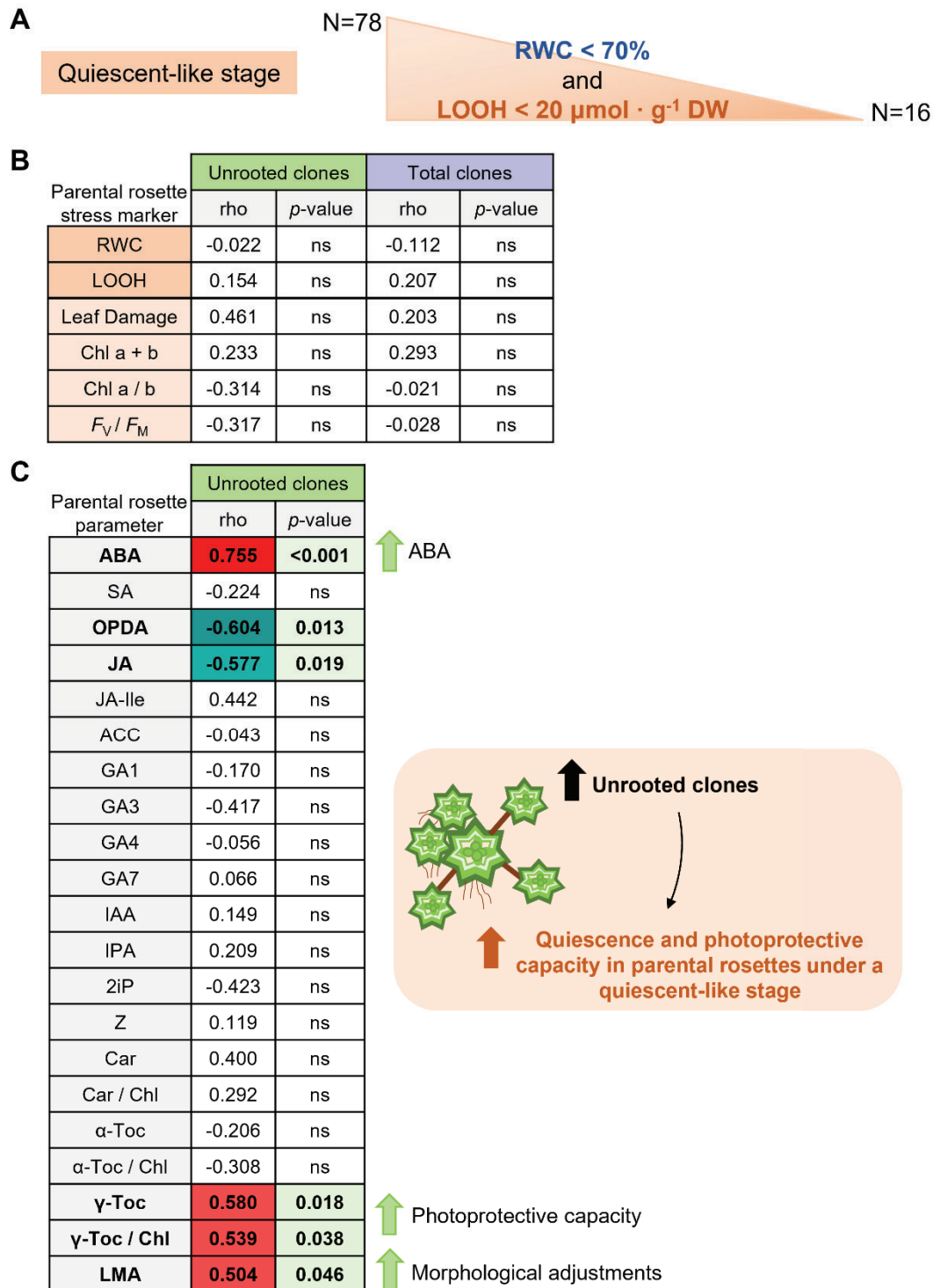
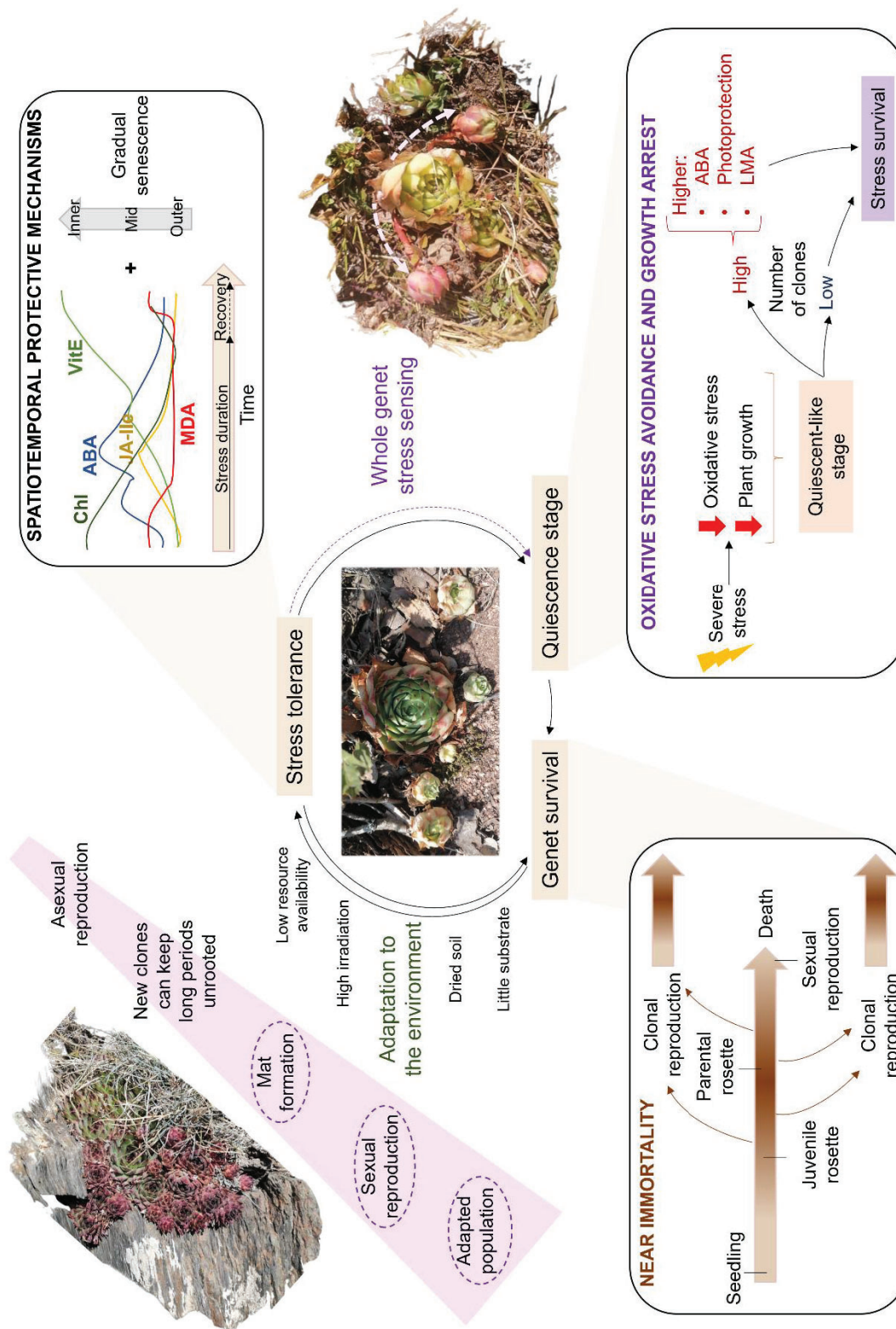


Figure 8

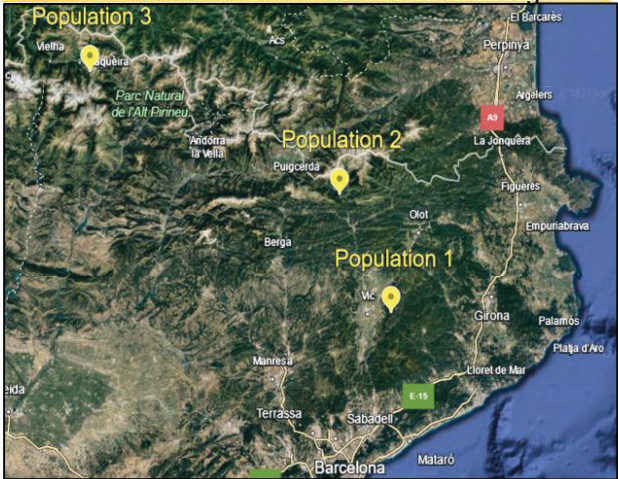
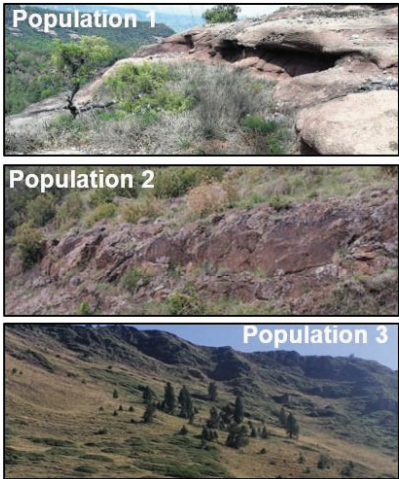
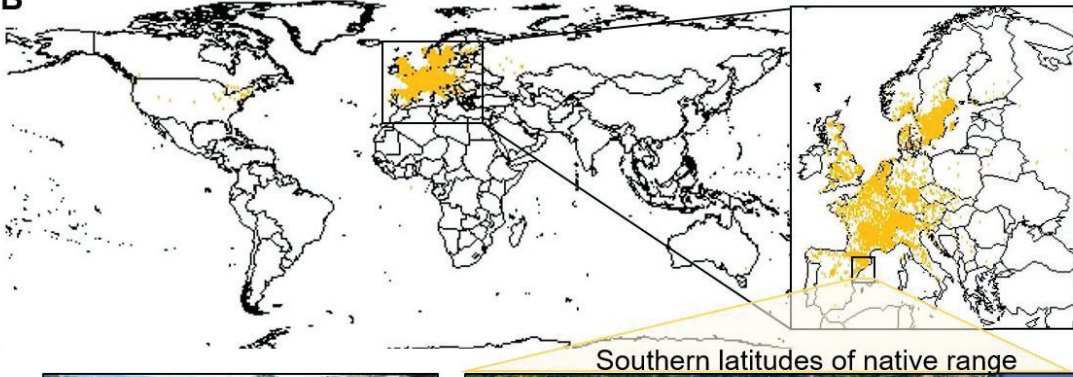


SUPPLEMENTARY DATA

A

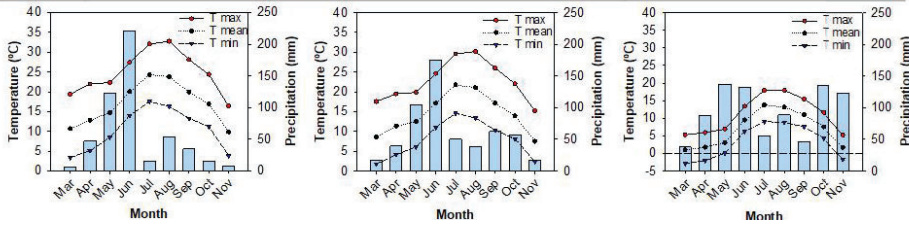
Abiotic stress	Extreme tolerance recorded data	Species	Reference
Heat			
Hot period in summer	64°C (rosette leaves)	<i>S. tectorum</i>	Larcher <i>et al.</i> , 2010
Frost			
Early freezings	-9°C (apex, all rosette leaves)	<i>S. montanum</i>	Larcher <i>et al.</i> , 2010
Winter conditions	-20°C (apex, all rosette leaves) -25°C (vegetative clonal rosettes)	<i>S. montanum</i>	Larcher <i>et al.</i> , 2010

B

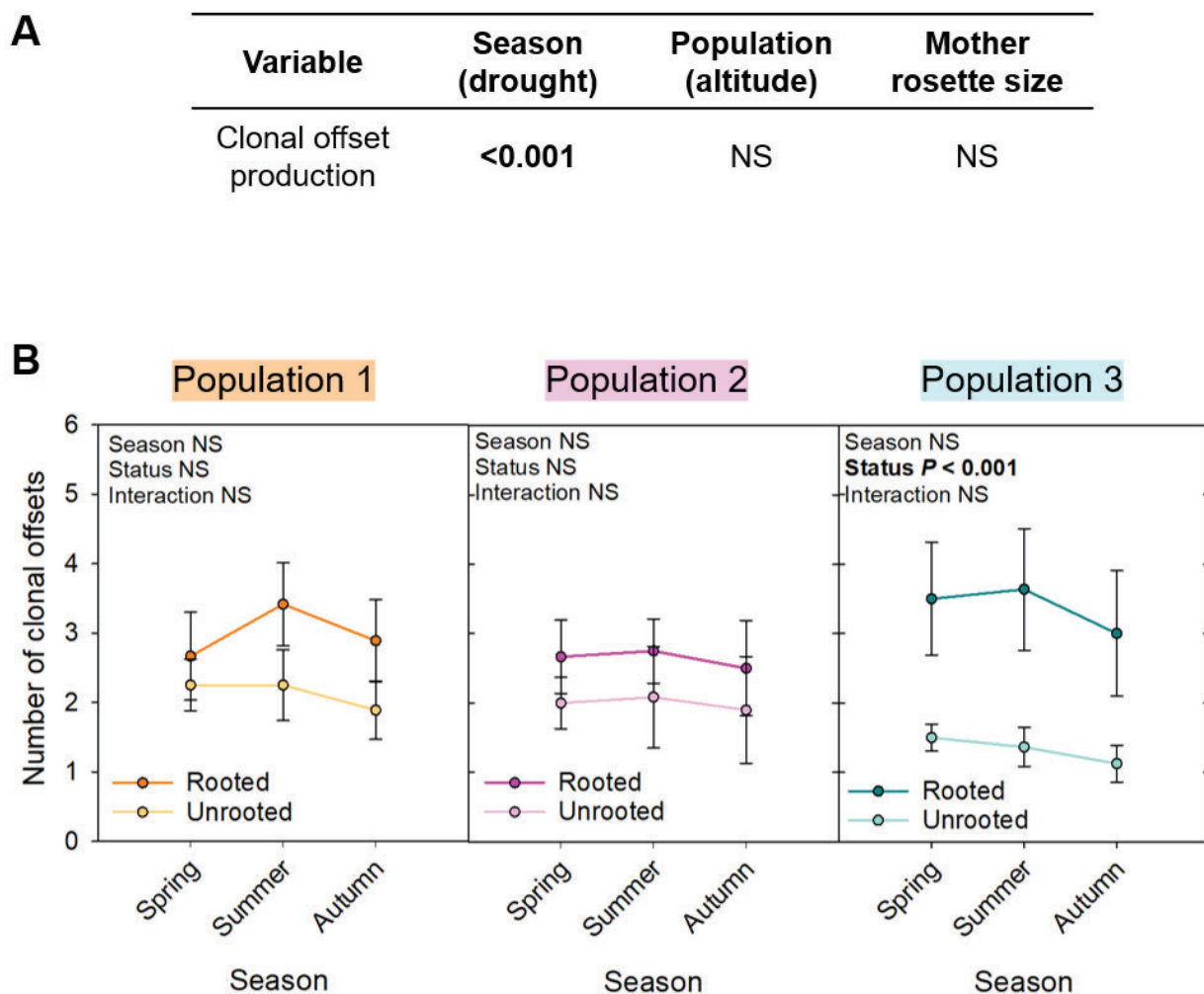


C

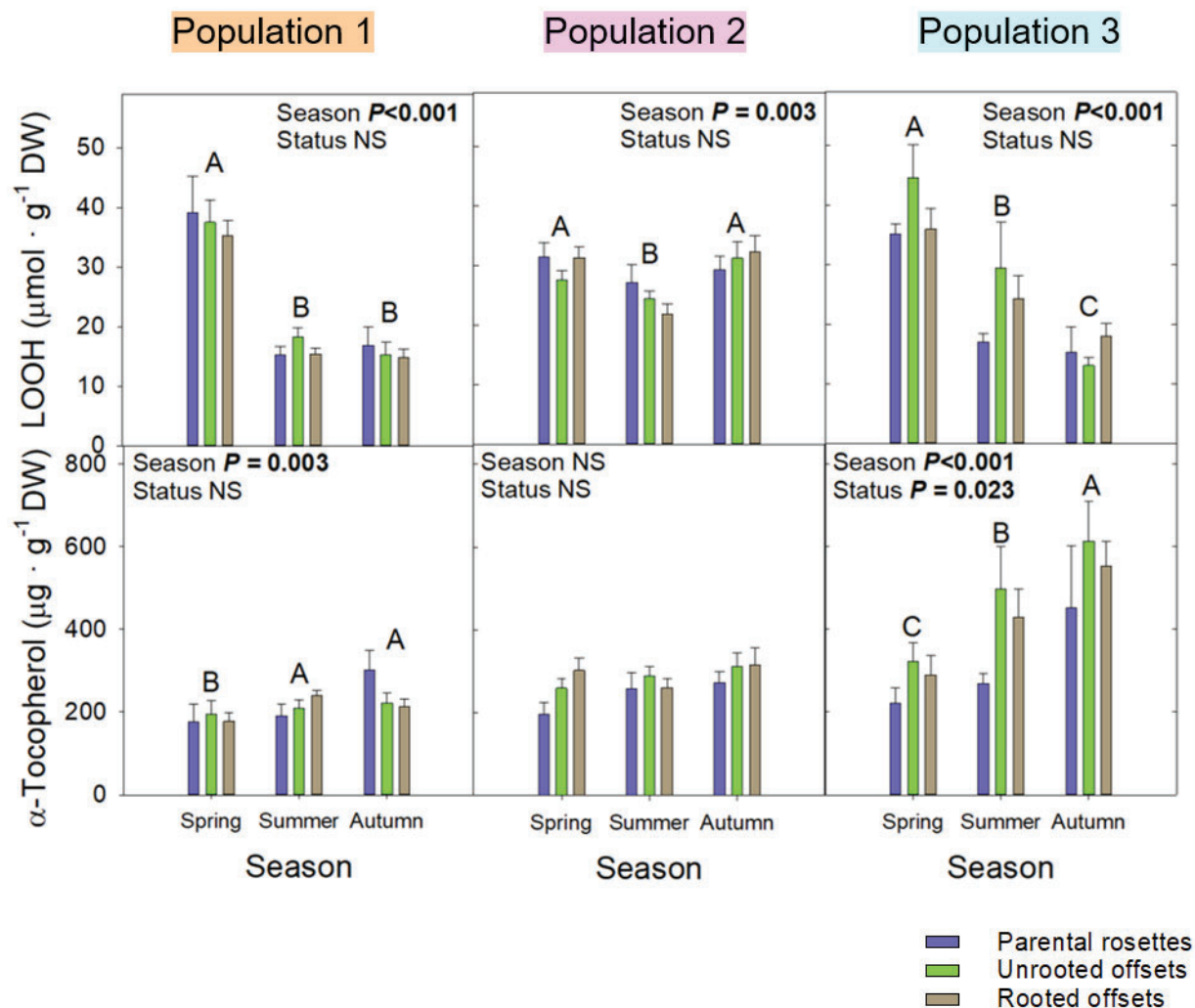
	Population 1	Population 2	Population 3
Geographical location	Les Guilleries, Barcelona, ES	Campelles, Girona, ES	Port de La Bonaigua, Lleida, ES
Coordinates	41°55'36"N, 2°21'47"E	42°17'31"N, 2°07'46"E	42°39'51"N, 0°58'54"E
Altitude (m.a.s.l.)	789	1308	2067
Slope orientation	South	South	South
Soil pH	Alkaline, pH 7.83	Acid, pH 5.87	Acid, pH 5.70



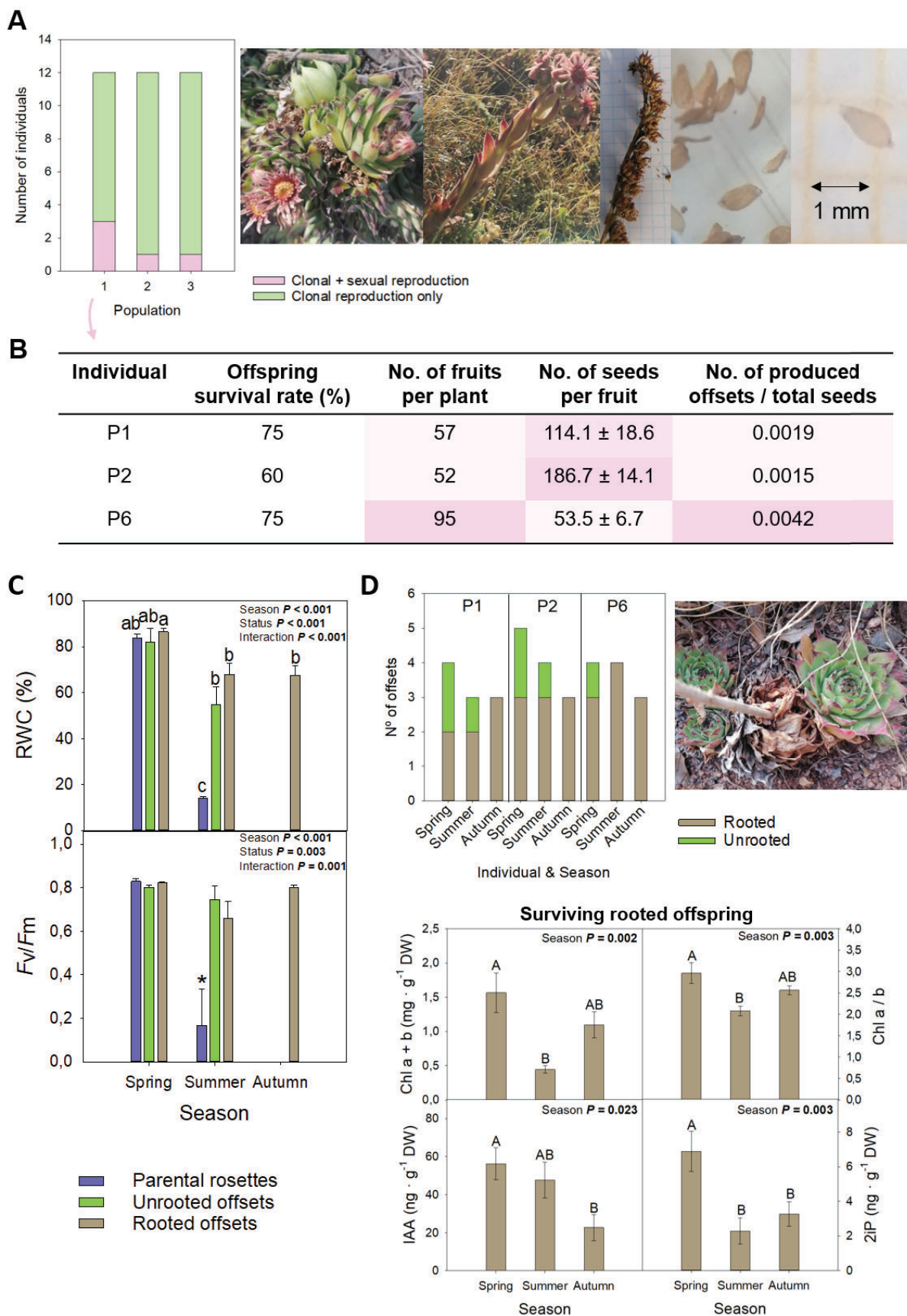
Supplementary Figure S1. Justification for choice of model species due to its high tolerance to abiotic stresses and selected populations distributed in southern latitudes of its native range to study drought tolerance in *Sempervivum tectorum*. **(A)** Extreme tolerance to abiotic stress previously recorded in the *Sempervivum* genus in natural conditions, including heat and frost stresses. **(B)** Worldwide distribution map of *Sempervivum tectorum*, a species native from the European highest mountains (source of data: GBIF.org 03 April 2024)²⁴. Below, photographs and geographical locations of the three selected populations from the present study, which are indicated in the map on the right. (satellite image, Google Earth). Populations located at southern European latitudes were selected to study tolerance of this species to drought stress. **(C)** Geographical location and environmental conditions of the three natural populations of *S. tectorum* studied, including altitude, slope orientation and soil classification according to the measured pH. Below, seasonal dynamics of main environmental factors (temperature and precipitation) in the three natural populations during 2023. See Supplemental Table S1 for climatic data recorded during each sampling.



Supplementary Figure S2. Adjustments in clonal offset production and rooting status of the offsets of *S. tectorum* plants in their natural habitat. (A) Table summarizing the three-way ANOVA results showing the effects of season, population and the mother rosette size on clonal offset production. **(B)** Number of rooted and unrooted clones in the different seasons in the three populations. Differences between the seasons and status (rooted vs. unrooted) were evaluated by two-way ANOVA and the P-values are shown in the inlets when they were significant ($P < 0.05$). NS, not significant. Data show the mean $\pm$ SE of $n = 12$, 12 and 12 parental rosettes for population 1, 2, and 3, respectively during the spring, 12 , 12 and 11 parental rosettes for population 1, 2 and 3, respectively during the summer, and 9 , 10 and 8 mother rosettes for population 1, 2, and 3, respectively during the autumn.



Supplementary Figure S3. Quiescent-like strategy in leaves of *S. tectorum* plants in their natural habitat. Endogenous content of lipid hydroperoxides (LOOH, a primary product of lipid peroxidation) and endogenous levels of their only counteractor, the lipophilic antioxidant vitamin E (α -tocopherol) in leaves of parental rosettes, unrooted and rooted offsets from the 3 populations along seasons. Data shown are for $n = 8$ individuals (8 parental rosettes and all their offsets) in each population. P -values from the Kruskal-Wallis non-parametric tests for both season and developmental status are shown when significant differences were found ($P < 0.05$). Otherwise, NS is shown when differences were not significant. Different letters show significant differences ($P < 0.05$) between the seasons using the Bonferroni post-hoc test.



Supplementary Figure S4. Clonal plasticity where the parental rosette senesces, but already rooted offspring survived. (A) Reproduction modes (sexual vs. clonal reproduction) presented in the 12 studied individuals from the three populations of *Sempervivum tectorum*. From left to right, a flowering *S. tectorum* individual at the very beginning of the blooming process, a flowering *S. tectorum* individual with the bloom stalk fully developed, a dried stalk containing fruits, seeds and details of a seed. **(B)** Clonal offspring survival rate, number of fruits per plant and the number of seeds per fruit (18 fruits) in three individuals (P1, P2 and P6 from population 1 entering sexual reproduction during the summer), and the ratio of produced clonal offsets per total number of produced seeds. **(C)** Physiological stress markers, including the relative water content (RWC) and the maximum quantum efficiency of the photosystem II (Fv/Fm ratio), showing the status of the parental rosettes and their offsets (both rooted and unrooted) before the start of sexual reproduction and senescence (during the sexual reproduction stage) and the status of the surviving offsets. Data are mean of $n = 3$ parental rosettes in each season, 5 and 2 unrooted offsets in the spring and summer, respectively; and 8, 9 and 9 rooted offsets in the spring, summer and autumn, respectively. P values of two-way ANOVA are shown. Different letters indicate significant interactions between seasons and developmental status and asterisk (*) is indicative of significant difference (Tukey's post-hoc test, $P < 0.05$). **(D)** Numbers of rooted and unrooted offsets in each individual plant in the different seasons showing the offspring status. All the unrooted offsets died. Photograph of P1 in autumn, showing the surviving rooted offsets. Variations in endogenous contents of chlorophylls (Chl a + b and Chl a/b) and growth-related phytohormones, both (auxin [indole-3-acetic acid, IAA] and the active cytokinin 2-isopentenyladenine [2-iP]) the surviving rooted offspring between the seasons. Data are the mean $\pm$ SE of $n = 9$. P-values of one-way ANOVA are shown. Different letters indicate significant differences between the seasons.

Supplementary Table S1. Climatic data recorded during each sampling (spring, summer and autumn seasons) in each population. For temperature (°C) and relative humidity (%), data are mean of 9-12 individual microclimatic measurements (one per plant). For soil water content (%), data are mean of 2 (population 1) and 3 soil samples (in population 2 and 3). Soil samples were immediately weight to obtain the moist soil and then dried at 70°C to obtain the dried soil, and we estimate the soil water content (%) by applying the gravimetric method formula $\theta_g = (m_{\text{moist soil}} - m_{\text{dry soil}}) / m_{\text{dry soil}}$. Samplings were performed on 7th June, 21st August and 14th November for population 1; on 3rd July, 24th August and 7th November for population 2; and on 25th June, 25th August and 8th November for the population 3, in the late spring, late summer and mid-autumn seasons of 2023, respectively. Conducting late autumn samplings in December were not possible due to snowfall and expected winter climatic conditions for population 3 on that month where plants would be covered by a snow layer.

	Sampling season	T°C	RH%	Soil water content (%)
Population 1	Spring	24.31	60.26	18.23 ± 9.23
	Summer	43.68	20.03	1.16 ± 0.19
	Autumn	22.99	45.97	1.67 ± 0.55
Population 2	Spring	31.87	41.13	38.00 ± 5.53
	Summer	39.61	23.95	15.24 ± 6.99
	Autumn	16.71	39.06	26.67 ± 3.38
Population 3	Spring	25.46	29.75	16.92 ± 1.52
	Summer	31.90	27.45	6.98 ± 3.52
	Autumn	8.59	43.09	26.46 ± 4.71

Supplementary Table S2. Results of two-way ANOVAs for each hormone measured in stolons during the autumn sampling to evaluate the possible effect of both stolons status belonging to unrooted or rooted offsets (status) and the geographical location (population), and the interaction between factors. P-values are shown when significative differences were found ($P < 0.05$). Otherwise, NS is considered when differences were not significant. See Materials and Methods for additional information about statistical analysis.

Hormone	Status	Population	Status x Population
ABA	0.044	< 0.001	NS
SA	NS	< 0.001	NS
OPDA	NS	< 0.001	NS
JA	NS	NS	NS
JA-Ile	NS	NS	NS
ACC	NS	0.003	NS
GA ₁	NS	0.004	0.006
GA ₃	NS	NS	NS
GA ₄	NS	NS	NS
IAA	NS	0.044	NS
IPA	NS	0.047	NS
2-iP	NS	0.019	NS
Z	NS	0.009	NS

Supplementary Table S3. Results of Kruskal-Wallis tests for each functional trait measured in leaves from *S. tectorum* individuals from 3 natural populations to evaluate the possible effect of geographical location and altitude (population), season (spring, summer or autumn) and developmental status (either parental rosette, unrooted or rooted clonal offset). P-values are shown when significative differences were found ($P < 0.05$). Otherwise, NS is considered when differences were not significant. See Materials and Methods for additional information about statistical analysis.

Variable	Population	Season	Status
$F_V F_M$	NS	< 0.001	< 0.001
RWC	0.012	< 0.001	NS
Hydration	< 0.001	< 0.001	NS
Leaf damage	< 0.001	< 0.001	NS
LMA	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Rosette size	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Chl a + b	NS	< 0.001	NS
Chl a / b	< 0.001	< 0.001	NS
Car	NS	< 0.001	NS
LOOH	< 0.001	< 0.001	NS
α -Tocopherol	< 0.001	< 0.001	NS
γ -Tocopherol	< 0.001	< 0.001	0.014
ABA	< 0.001	< 0.001	0.022
SA	< 0.001	< 0.001	NS
OPDA	0.011	< 0.001	NS
JA	< 0.001	< 0.001	NS
JA-Ile	0.007	< 0.001	< 0.001
ACC	< 0.001	0.045	NS
GA ₁	NS	0.005	NS
GA ₃	< 0.001	NS	NS
GA ₄	NS	0.001	NS
GA ₇	0.039	0.001	NS
IAA	< 0.001	0.016	NS
IPA	0.014	< 0.001	NS
2-iP	NS	< 0.001	NS
Z	< 0.001	< 0.001	NS

Supplementary Table S4. Size of the parental rosettes and number of unrooted and rooted offsets for each selected individual of *S. tectorum* in the field.

Population	Individual	Parental rosette diameter (cm)	Nº Unrooted offsets	Nº Rooted offsets
Population 1	1	8.0	2	2
	2	8.0	2	3
	3	6.5	2	2
	4	6.0	3	3
	5	10.0	1	9
	6	12.0	1	3
	7	5.0	3	2
	8	13.0	4	2
	9	9.5	2	2
	10	10.0	1	1
	11	12.0	1	3
	12	14.0	5	0
Population 2	13	6.5	2	3
	14	7.0	2	1
	15	4.0	1	1
	16	6.0	1	0
	17	5.0	2	4
	18	7.0	4	6
	19	9.0	1	2
	20	4.0	5	4
	21	5.0	2	2
	22	5.0	1	5
	23	11.0	1	1
	24	4.5	2	3
Population 3	25	7.0	1	2
	26	5.0	1	3
	27	4.0	1	2
	28	5.5	1	6
	29	5.5	1	6
	30	3.5	2	0
	31	4.1	3	3
	32	2.2	1	1
	33	3.0	2	1
	34	5.6	1	2
	35	4.0	2	7
	36	3.0	2	9

CAPÍTULO 4

La acumulación de oxilipinas debida al estrés foto-oxidativo puede desencadenar la abscisión foliar inducida por sequía en olivos



Chapter 4. Photo-oxidative stress leading to oxylipin accumulation may trigger drought-induced leaf abscission in olive trees

Sabina Villadangos^{1,2}, Carmen González¹, Sergi Munné-Bosch^{1,2}

¹Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

²Institute of Research in Biodiversity (IRBio), Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Publicado en **Physiologia Plantarum** (2023) 175:e13941.

RESUMEN

Los olivos se desprenden de sus hojas durante la sequía severa como un mecanismo de defensa. La abscisión foliar inducida por sequía es un proceso programado que ocurre en una capa celular diferenciada en la base del peciolo. Considerando las propiedades antioxidantes de la vitamina E y su relación con los jasmonatos derivados de la peroxidación lipídica en respuestas de estrés abiótico, hipotetizamos sobre su posible rol en la señalización de abscisión mediante la formación de un gradiente de jasmonatos basipétalo creciente a lo largo de la hoja hasta la zona de abscisión. Expusimos a olivos jóvenes a una retirada de agua durante 21 días, tras lo cual, se muestrearon cinco secciones de hoja, desde el ápice hasta el peciolo, en hojas caídas y no caídas de árboles irrigados y estresados hídricamente. Encontramos que el estrés por sequía prolongado resultó en una reducción drástica de la eficiencia del fotosistema II, y de los contenidos de clorofila y vitamina E en hojas, llevando a un estrés foto-oxidativo, reflejado por el aumento de la peroxidación lipídica. Además, aumentó el contenido de oxilipinas derivadas del cloroplasto y fitohormonas, tales como la jasmonoil-isooleucina y el ácido salicílico. Al mismo tiempo, el α -tocoferol disminuyó en el peciolo de hojas no caídas estresadas hídricamente, sugiriendo un condicionamiento para el proceso de abscisión. Aunque no se observaron diferencias en peciolo de hojas caídas y no caídas, las hojas caídas mostraron mayor estrés oxidativo en la lámina foliar. Se concluye que la señalización redox a través de la acumulación de oxilipinas puede desencadenar la abscisión foliar en olivos estresados por sequía. El estrés mecánico es, sin embargo, necesario adicionalmente para ejecutar la abscisión foliar una vez que la zona de abscisión está debidamente acondicionada.

ORIGINAL RESEARCH

Photo-oxidative stress leading to oxylipin accumulation may trigger drought-induced leaf abscission in olive trees

Sabina Villadangos^{1,2} | Carmen González¹ | Sergi Munné-Bosch^{1,2} 

¹Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

²Institute of Research in Biodiversity (IRBio-UB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Correspondence

Sergi Munné-Bosch, Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 643, 08028, Barcelona, Spain.
Email: smunne@ub.edu

Funding information

Generalitat de Catalunya, Grant/Award Number: ICREA Academia

Edited by C.H. Foyer

Abstract

Olive trees shed their leaves under severe drought as a defence mechanism. Foliar drought-induced abscission is a programmed process occurring in a differentiated cell layer at the base of the petiole. Considering the antioxidant properties of vitamin E and its interplay with lipid peroxidation-derived jasmonates in abiotic stress responses, we hypothesized about their possible role in abscission signaling by forming a jasmonates-increasing basipetal gradient along the leaf up to the abscission zone. We exposed young olive trees to water withdrawal for 21 days, after which five leaf sections, from the apex to the petiole, were sampled on both attached and detached leaves of irrigated and water-stressed trees. We found that prolonged drought stress resulted in a sharp reduction in the photosystem II efficiency, chlorophyll and vitamin E contents in leaves, leading to photo-oxidative stress, reflected by the increase in lipid peroxidation. In addition, the content of chloroplast-derived oxylipins and phytohormones, such as jasmonoyl-isoleucine and salicylic acid, increased. At the same time, α -tocopherol decreased in the petiole of water-stressed attached leaves, suggesting a conditioning for the abscission process to occur. Although no differences were observed in petioles from attached and detached leaves, the dropped ones showed higher oxidative stress in the leaf blade. It is concluded that redox signaling through oxylipins accumulation may trigger leaf abscission in drought-stressed olive trees. Mechanical stress is, however, additionally needed to execute leaf abscission once the abscission zone is properly conditioned.

1 | INTRODUCTION

Prolonged droughts are continuously threatening arid and semi-arid agroecosystems, such as the Mediterranean ones. The future scenario does not look any better due to climate change, with scarce precipitation and greater inter-annual variability (Fischer & Schär, 2010; IPCC, 2022). The olive tree (*Olea europaea* L.) is the major edible fruit tree in the Mediterranean basin with ecological and socioeconomic relevance (Abbo et al., 2015; Loumou & Giourga, 2003). Its agricultural activity boosts olive tree propagation beyond its natural habitat

(Langgut et al., 2019). As a long-lived drought-tolerant species, the olive tree has been widely cultivated under rainfed conditions in semi-arid regions as it is broadly endowed with morphological and physiological mechanisms to deal with water deficit imposition: small leaves, osmotic adjustment, low xylem hydraulic conductivity and a potent root system to uptake water in deeper soil layers (Brito et al., 2019; Chartzoulakis et al., 1999; Tognetti et al., 2006). Indeed, olive genotypes with specific hydraulic traits have higher relative growth rates under water deficit (Hernandez-Santana et al., 2019). However, severe drought is considered one of the most restricting

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2023 The Authors. *Physiologia Plantarum* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of Scandinavian Plant Physiology Society.

environmental factors in olive tree cultivars as it affects growth and biomass production, thus leading to yield loss (Bacelar et al., 2007).

Regarding the physiological strategies to cope with drought, olive trees shed their leaves under severe water deficit to decrease evapotranspiration surface area and avoid excessive water loss, but this negatively impacts crop yield and long-term tree development and survival (Bacelar et al., 2007; Trabelsi et al., 2019). This defence mechanism is known as abscission, when plants shed undesired entire organs, such as leaves, under critical situations (Patharkar & Walker, 2018). Notably, leaf abscission occurs in four main stages in a specific location called abscission zone (AZ) (Patterson, 2001). There, specific cells comprising a separation layer differentiate into target cells that will acquire competence to respond to environmental and developmental signals, thus triggering abscission (Taylor & Whitelaw, 2001). When the AZ is activated, two cell layers are separated by the action of hydrolytic enzymes and the leaf sheds from the plant. In cv. “Manzanillo” olive tree, the foliar AZ has been located at the base of the petiole, in a differentiated cell layer linking the leaf to the mother plant (Goldental-Cohen et al., 2017). Among the determining abscission signals, ethylene was discovered to be the predominant inductive factor (Jackson & Osborne, 1970), being the main inductor in several crops such as citrus (Agustí et al., 2008) and olive (Lavee & Martin, 1981). In addition, auxin is generally accepted as the negative regulator of the AZ sensitivity to ethylene, as an auxin depletion in the AZ by reducing its supply from the leaf blade is required to promote leaf abscission (Basu et al., 2013; Meir et al., 2006). Yet, the ethylene-auxin balance is not the unique process controlling leaf abscission and there seems to be a complex signaling pathway behind. Particularly, in exogenous ethylene-induced abscission, a previous production of reactive oxygen species (ROS) leading to oxidative stress has been found, and a possible counteracting antioxidant response may alleviate the outcome in olive trees (Goldental-Cohen et al., 2017). Indeed, ROS play a dual role in plants. When produced in excess, oxidative stress causes irreparable damages in plant cells, but ROS are known to participate in redox signaling when transient increases occur and basal levels are then re-established, thus being essential for several plant biology processes (Mittler, 2017). Notably, lipid peroxidation by ROS has been heavily related to cytotoxic effects in plants by affecting photosynthetic reactions in chloroplasts (Winger et al., 2007) or modification of essential PSII proteins (Yamauchi & Sugimoto, 2010). However, oxygenated lipids could also perform a protective role by activating transcriptional reprogramming in stress responses (Farmer & Mueller, 2013; Matthes et al., 2010).

Oxylipins are lipid peroxidation-derived compounds formed in plastids with the ability to perform retrograde signaling to the nucleus, and thus participate in plant developmental and stress responses (Muñoz & Munné-Bosch, 2020). Jasmonates are well-characterized oxylipins, including 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA), jasmonic acid (JA) and its bioactive conjugated form jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile), as the main components with known signaling functions, mainly in biotic stress responses (Browse, 2009), but also in abiotic stress responses such as drought (Savchenko et al., 2014). Vitamin E is a group of nonenzymatic lipophilic chloroplastic antioxidants, of which

α -tocopherol is the major form in leaves, that scavenge ROS (mainly singlet oxygen) and lipid peroxyl radicals, preventing lipid peroxidation propagation in the thylakoid membranes of chloroplasts (Falk & Munné-Bosch, 2010; Muñoz & Munné-Bosch, 2019). Due to the lipidic peroxidation origin of jasmonates, vitamin E could substantially condition their accumulation (Casadesús et al., 2021; Demmig-Adams et al., 2013; Morales et al., 2015). However, despite its regulatory link with oxidative stress, to our knowledge, the role of vitamin E and jasmonates in leaf abscission has not been explored so far.

In this study, we aimed to decipher whether vitamin E and jasmonates are involved or not in the regulation of leaf abscission by evaluating possible differences in the endogenous contents of these compounds between attached and detached leaves from irrigated and water-stressed olive trees. Particular emphasis was given to the influence of water stress on the establishment of physiological and biochemical basipetal leaf gradients (from the leaf apex to the base of the petiole) that might influence leaf abscission. Here, we hypothesized that the jasmonates' content increases basipetally from the leaf apex to the AZ in the petiole to induce leaf abscission in water-stressed olive trees.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Experimental design

Twenty olive trees (*Olea europaea* L.), aged 1.5 years old and growing in 4 L pots in a silty-clay substrate, were purchased in a local garden (Jardiland S.A., Sant Cugat del Vallès, Spain). Olive trees were placed in trays inside a greenhouse located at the Faculty of Biology (University of Barcelona, Spain) on 20th October 2021, where they acclimated to a 16 h-photoperiod, achieved through high-pressure sodium lamps supplying an additional photosynthetically active photon flux density (PPFD) of $\sim 50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Olive trees were watered twice a week with half-diluted Hoagland solution (Hoagland, 1938) until the experiment started. One month later, on 29th November 2021, two water regimes were imposed for three weeks on randomly distributed trees: 10 irrigated (IR) plants, which were used as controls and were kept watered twice a week, and 10 water-stressed (WS) plants, to which irrigation was withheld for 21 days. Daily minimum and maximum air temperatures respectively ranged between 19.5 and 22°C, and between 25.5 and 33°C throughout the experiment, with 23.1°C mean temperature and 55.8% mean relative humidity. The maximum daily PPFD to which plants were exposed during the experiment was of $\sim 950 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Leaf abscission and nondestructive physiological stress markers were monitored every 48 h for three weeks until severe stress occurred. At this point, severe abscission occurred in response to a minimum tree shaking, which is the mechanical stress mimicking windy conditions used to monitor differences between attached (nonabscised) and detached (abscised) fully-developed (mature, non-senescent) leaves. Samplings of both leaf types were performed at

midday (between 12 and 14 h solar time) in WS olive trees after a prior light manual shaking (two shakes of 10 s each). A minimum of 30 attached and 30 detached leaves were sampled from each tree. No abscission was observed in IR trees. To establish a gradient along the leaf, collected leaves were quickly separated into five sections: apical, mid, basal, petiole 1 and petiole 2 (see Figure S1 for details). Thus, pools of each leaf part for each of the 10 trees sampled at every leaf condition (IR attached, WS attached and WS detached) were obtained, frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until biochemical analyses.

2.2 | Physiological stress markers

For a period of three weeks and every 48 h, physiological stress indicators were measured. The maximum photosynthetic efficiency of photosystem II (F_v/F_m) was measured in the middle of the lamina of three dark-adapted leaves of each olive tree in a nondestructive manner as described in Van Kooten and Snel (1990) by determining chlorophyll fluorescence with a portable fluorimeter (Mini-PAM II Photosynthesis Yield Analyser, Walz).

2.3 | Soil water content and leaf hydration content

To determine soil water content, soil samples of each olive tree were collected in 50 mL Falcon tubes immediately after leaf sampling. We performed the gravimetric method, in which the mass of water in the soil was obtained from the weight difference between the moist soil and the soil dried at 70°C for a month, by applying the following formula $\theta_g = (m_{\text{moist soil}} - m_{\text{dry soil}})/m_{\text{dry soil}}$.

Leaf hydration (H) was estimated in one attached leaf per olive tree collected after leaf sampling. Leaves were weighed to estimate fresh matter (FW) and dried at 70°C until constant weight to determine the dry matter (DW). H was calculated as $(\text{FW}-\text{DW})/\text{DW}$.

2.4 | Chlorophyll and carotenoid contents

Chlorophyll and carotenoid contents in leaves were quantified in methanolic extracts. Briefly, 50 mg of each frozen leaf part ground with liquid nitrogen was extracted in 1.2 mL of cold methanol with 0.01% butylated hydroxytoluene (BHT). A three-step extraction was considered, in which 30 min of cold ultrasonication (Branson 2510 ultrasonic cleaner, Branson), vortexing and centrifugation at 15.980 g for 10 min at 4°C (PrismR, Labnet International Inc.) were performed in each step. From pooled supernatants, 400 μL of extracts were diluted 1/2 (v/v) with methanol for petiole sections, whereas extracts were diluted 1/8 or 1/16 (v/v) in the case of apical, mid and basal leaf sections. Then, absorbances were read by UV/Visible spectrophotometry using the CE7400 Aquarius (Cecil Instruments Ltd.). Pigment contents were calculated following the equations described in Lichtenthaler and Wellburn (1983).

2.5 | Lipid peroxidation analyses

The extent of lipid peroxidation extent was determined by analyzing the content of lipid hydroperoxides (LOOH). From the above methanolic extracts, 100 μL were taken to prepare two different aliquots for each sample: 50 μL of extract + 50 μL of solvent, and 50 μL of extract + 50 μL of 10 mM triphenylphosphine (TPP) as the negative control. Aliquots were incubated at room temperature in darkness for 30 min. Then, 10 μL volume per aliquot was pipetted in triplicate in a 96-well plate incubated for 45 min with the reagent FOX-2 (90% methanol (v/v) with 4 mM BHT, 250 mM sulfuric acid, 0.25 mM ammonium iron (II) sulfate hexahydrate and 0.1 mM xylene orange) as described in Bou et al. (2008). Absorbances were read at 560 and 800 nm with a spectrophotometer (xMarkTM Microplate Absorbance Spectrophotometer, Bio-Rad). Quantifications were made by using a H_2O_2 calibration curve as the standard.

2.6 | Tocochromanol analyses

Quantification of tocochromanols, including the four tocopherol homologues (α -, β -, γ - and δ -tocopherol) and plastochromanol 8 (PC-8), was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) as described in Amaral et al. (2005). Shortly, from the previous methanolic extracts, 250 μL were passed onto hydrophobic 0.45 μm PTFE filters (Phenomenex), introduced into vials and injected in the HPLC system (Waters 600 controller pump + Waters 717 plus autosampler and Jasco FP-1520 fluorescence detector). Vitamin E compounds were separated in a normal-phase column (Inertsil 100A, 5 μm , 250×3.0 mm, GL Sciences) by using a mobile phase of *n*-hexane and 1,4-dioxane (95.5:4.5, v/v) at a flow rate of 0.7 mL/min and then detected using a fluorescence detector (excitation at 295 nm and emission at 330 nm). Quantification was performed by establishing a calibration curve with authentic standards of each of the forms analyzed (Sigma-Aldrich). Due to its chloroplastic location, tocochromanols were expressed both on a dry mass and on a chlorophyll basis.

2.7 | Stress-related phytohormones analyses

Endogenous contents of stress-related phytohormones, including abscisic acid (ABA), jasmonates (including OPDA, JA and JA-Ile) and salicylic acid (SA) were determined from the above methanolic extracts by ultrahigh-performance liquid chromatography (UHPLC) coupled to tandem mass spectrometry (MS/MS) as previously described in Müller and Munné-Bosch (2011). In brief, 200 μL of extracts containing deuterium-labeled internal standards were transferred into vials by passing through a 0.22 μm PTFE filter (Phenomenex). Vials were injected into the UHPLC-MS/MS system, consisting of a HPLC coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (QTRAP 4000, AB Sciex). MultiQuantTM 3.0.1 software was used to quantify ABA, JA, JA-Ile, OPDA and SA with the negative ion mode,

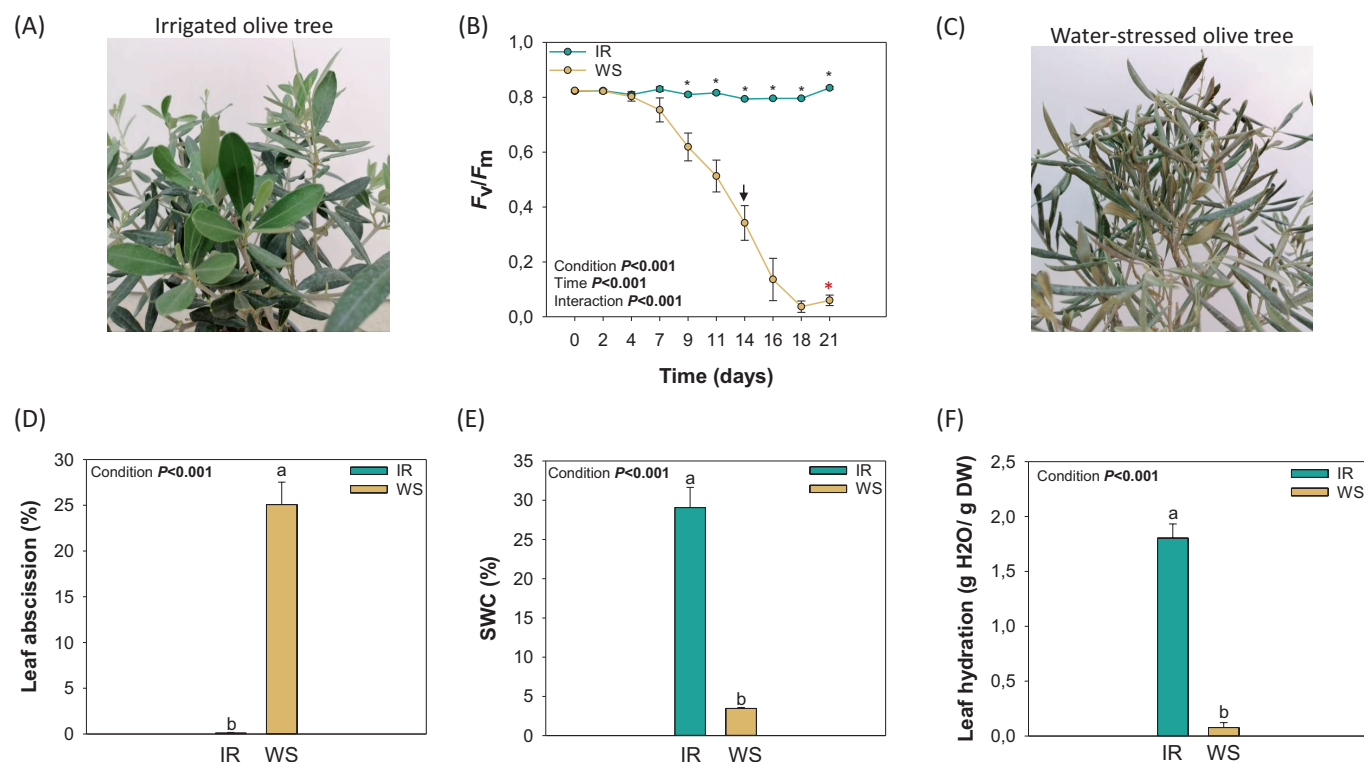


FIGURE 1 Nondestructive monitoring of the olive tree physiological status during water deficit. While irrigated plants (A) were unaltered throughout the study, leaf abscission started after two weeks of water deficit (indicated by an arrow), when the maximum efficiency of PSII photochemistry (F_v/F_m ratio, B) dropped below 0.4 in water-stressed plants (C). Samplings (indicated by a red asterisk) were performed at 21 days of water irrigation and stress treatments. (D) Leaf abscission (%), (E) soil water content (SWC) and (F) leaf hydration in both plant groups. Data represent the mean and standard error of $n = 10$ trees for each condition. p values of two-way or one-way ANOVAs are shown in the inlets. Asterisks indicate significant differences between conditions at given times ($p < 0.05$). Different letters reflect differences between conditions. IR, irrigated plant; WS, water-stressed plant.

extracting the recovery rates of each sample with the deuterium-labeled internal standards and generating calibration curves for each analyte. Since jasmonates initiate their biosynthetic pathway in the chloroplasts, results were expressed both on a dry mass and on a chlorophyll basis.

2.8 | Statistical analysis

The effects of “condition” and “time” during the monitoring of F_v/F_m were tested by two-way analyses of variance (ANOVA). Effects on leaf abscission, SWC and leaf hydration were tested by one-way analyses of variance (ANOVA). For the rest of the parameters, we analyzed the effect of the “condition” (IR and WS attached; and WS attached and WS detached) by leaf section (apical, mid, basal, petiole 1 and petiole 2) with a one-way ANOVA. To study the interaction between “condition” and “leaf section” we performed a two-way ANOVA. The Tukey’s post-hoc test was used to detect significant differences in all statistical analyses. In all cases, differences were considered significant when $p \leq 0.05$. Both data normality (Shapiro–Wilk test) and homocedasticity of residues (Levene’s test) were previously checked as described by Zuur et al. (2009). All

statistical tests were performed with RStudio using the agricolae and car packages.

3 | RESULTS

3.1 | Severe drought stress compromises olive trees’ physiological status towards leaf abscission

Monitoring a nondestructive stress marker such as F_v/F_m throughout the study allowed us to progressively evaluate the physiological status of the trees and anticipate the right time for sampling (Figure 1). Water-stressed olive trees went into photoinhibition on day 9 and onwards, when F_v/F_m dropped below 0.75. Leaf abscission occurred from day 14 onwards when F_v/F_m values dropped below 0.40. However, while natural leaf abscission (i.e. leaves that dropped naturally) ranged between 0.2 and 0.6% daily during the third week of stress (from day 14 to day 21, data not shown), a slight mechanical shaking mimicking windy conditions induced immediate abscission of up to 25% of the leaves in water-stressed plants at day 21 (Figure 1).

The drought imposed on plants for 21 days severely affected olive trees’ physiological status, with their leaves curling progressively and

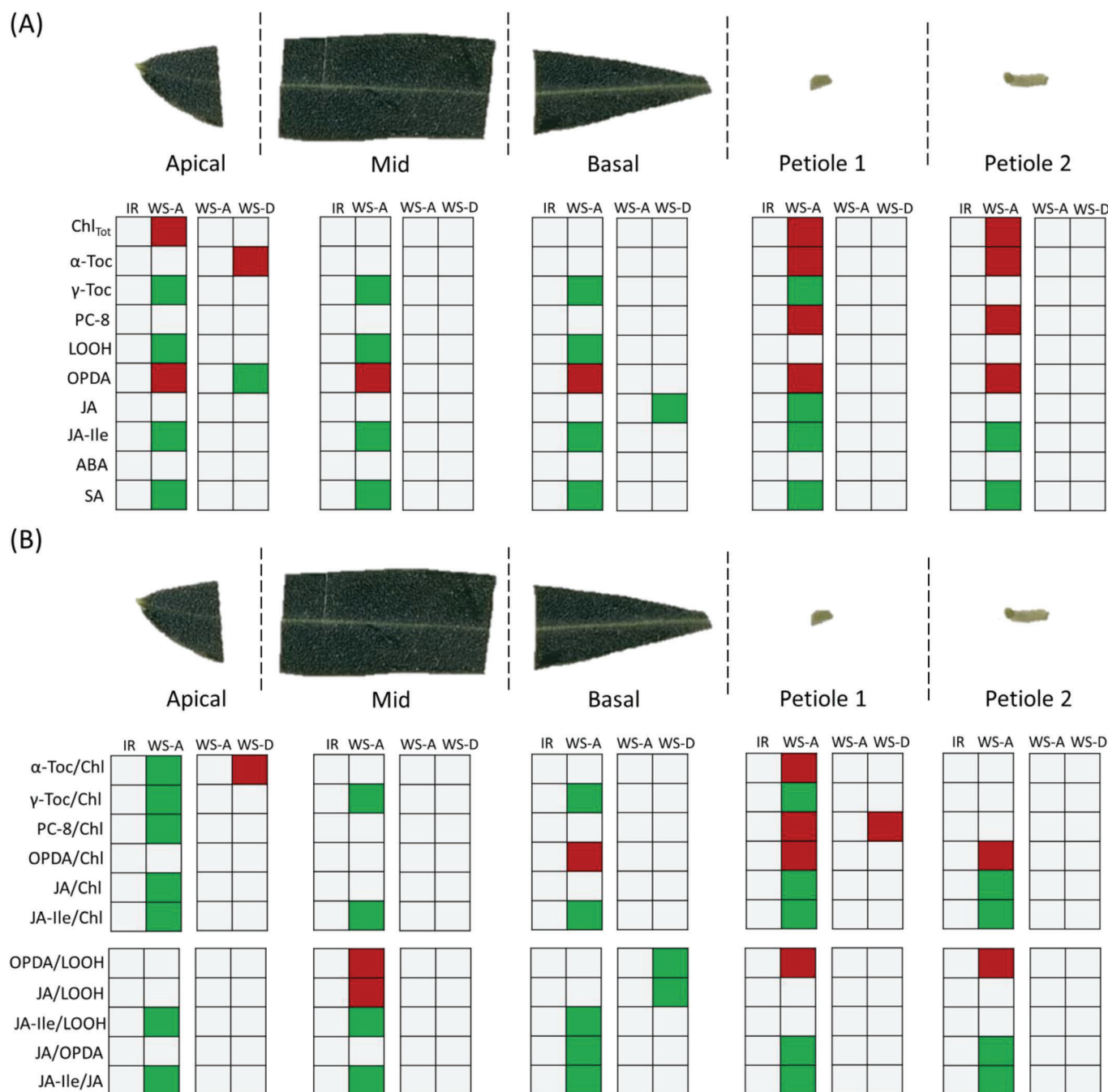


FIGURE 2 Summary of the influence of water stress and leaf abscission on chlorophyll (Chl) *a* + *b*, vitamin E, plastochromanol-8 (PC-8), lipid hydroperoxides (LOOH), jasmonates, abscisic acid (ABA) and salicylic acid (SA) contents in different leaf parts (from the apex, *left*, to the base, *right*, of both the leaf blade and the petiole). Olive trees were exposed to severe water stress for 21 days. Results are given on a dry matter basis (A) or expressed per unit of Chl or LOOH (B). For each leaf part, the left panel compares Irrigated (IR) to Water stress (WS-A) conditions (only data from attached leaves); and the right panel compares Attached leaves (WS-A) to Detached leaves (WS-D) within the WS plants. Colored boxes indicate significant differences according to Tukey's post-hoc test ($p < 0.05$). Green and red colors indicate an increase or decrease, respectively, in the values. p values are shown in Table S1. JA, jasmonic acid; JA-Ile, jasmonoyl-isoleucine; OPDA, 12-oxo-phytodienoic acid; Toc, tocopherol.

arresting growth. While new leaves were produced in plants growing under irrigated condition, water-stressed plants arrested growth, showed smaller and thicker leaves and these curled severely (Figure 1C). Abscission of these leaves, which occurred quite homogeneously throughout the canopy, was triggered by a slight manual shake when

soil water status was very low (3.5%, i.e. below accepted levels of plant water availability for the silty-clay soil type, Figure 1E) and leaf hydration decreased by up to 95% (with values of 0.07 compared to 1.8 g H₂O/g dry matter in water-stressed and irrigated plants, respectively, Figure 1F). Under these conditions, leaf abscission was 25% (Figure 1D).

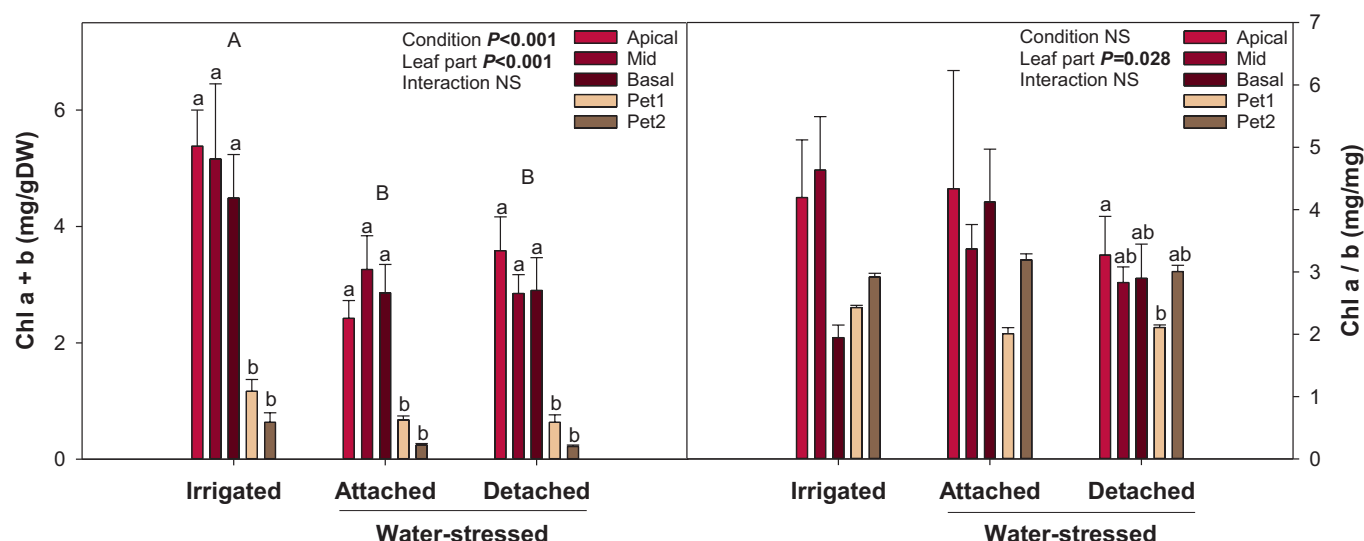


FIGURE 3 Chlorophyll (Chl) $a + b$ and Chl a/b ratio considering a leaf gradient in irrigated and water-stressed olive trees, including both attached and detached leaves. Olive trees were exposed to severe water stress for 21 days. Leaf gradient included the apical, mid, basal, petiole 1 (Pet1) and petiole 2 (Pet2) parts. p values of two-way ANOVA are shown in the inlets and p values >0.05 were considered not significant (NS). Different capital letters indicate significant differences between conditions and lower-case letters between leaf parts. Data represent the mean and standard error of $n = 10$ individuals (a pool of each specific part of the tissue taken from various leaves was used for each replicate in every condition, see materials and methods for details).

3.2 | Water stress leads to a decrease of tocopherol contents in the petiole

The leaf gradient study model shown in Figure 2 enabled a mechanistic and integrated understanding of what occurred spatiotemporally at the physiological level in attached (nonabscised) and detached (abscised) leaves of water-stressed plants. Chlorophyll loss under water-stress conditions, reflected by the total chlorophyll $a + b$ content (Chl_{Tot}), was significant in the apical zone and in the petiole, whereas no changes in chlorophyll contents occurred between attached and detached leaves (Figure 2A). When comparing data from leaf parts of the three conditions, other appreciations arise (Figure 3). First, chlorophylls decreased from the apical leaf part to the base of the petiole (Pet 2). Second, the leaf blade and the petiole were in a different chlorophyll value range, considering that there were significant differences between the three leaf blade parts and the two petiole parts in all three conditions. There were no differences in chlorophyll a/b among conditions (Figure 3).

Regarding tocopherol contents, though the γ -tocopherol (precursor of α -tocopherol) content was always low, it significantly increased under severe water stress in all the leaf parts, except in Petiole 2 that is the part of the petiole containing the abscission zone (Figure 2A). This compound increased from average values of 0.73 in irrigated plants to 4.25 $\mu\text{g/g DW}$ in the stressed plants (Figure 4). Although there was an overall increase in detached leaves compared to attached ones, none of the parts showed significant differences between the two conditions. In contrast to γ -tocopherol, the major tocopherol form in leaves, α -tocopherol, showed significant decreases in water-stressed plants in the petiole only (although in

both parts), decreasing from 293 $\mu\text{g/g DW}$ to 112 $\mu\text{g/g DW}$ in Pet 1 and from 210 $\mu\text{g/g DW}$ to 97 $\mu\text{g/g DW}$ in Pet 2 (Figures 2A and 4). Besides, α -tocopherol content significantly decreased from 477 $\mu\text{g/g DW}$ to 284 $\mu\text{g/g DW}$ in the apical part from the detached leaves compared to the attached ones. Remarkably, water stress induced a differential change between the leaf blade and the petiole (Figure 4). Despite being present at much lower contents compared to α -tocopherol, PC-8 showed a similar spatiotemporal variation to that observed for α -tocopherol, with a significant decrease in petioles of water-stressed plants compared to those of irrigated ones (Figures 2A and 4). Noteworthy, differences in tocopherol contents due to water stress changed when compounds were expressed on a chlorophyll basis (Figure 2B). Indeed, the significant reductions of both α -tocopherol and PC-8 in Petiole 2 of water-stressed leaves disappeared due to a large increase in the content of both antioxidants per unit of chlorophyll in Petiole 2 relative to Petiole 1, the latter being independent of plant water status (Figure 4, see also Figures 2 and 3).

3.3 | Specific accumulation of active jasmonates in the petioles of water-stressed plants

Water stress led to lipid peroxidation in the leaf blade, considering the increase in LOOH contents experienced in apical, mid and basal parts of leaves of water-stressed plants (Figure 2A). On average, the increase in LOOH content in the leaf blade was almost doubled under water stress, from 4.5 to 8.7 mmol/g DW . However, no differences were found between petioles from irrigated and water-stressed conditions, nor in any leaf section between attached and detached leaves

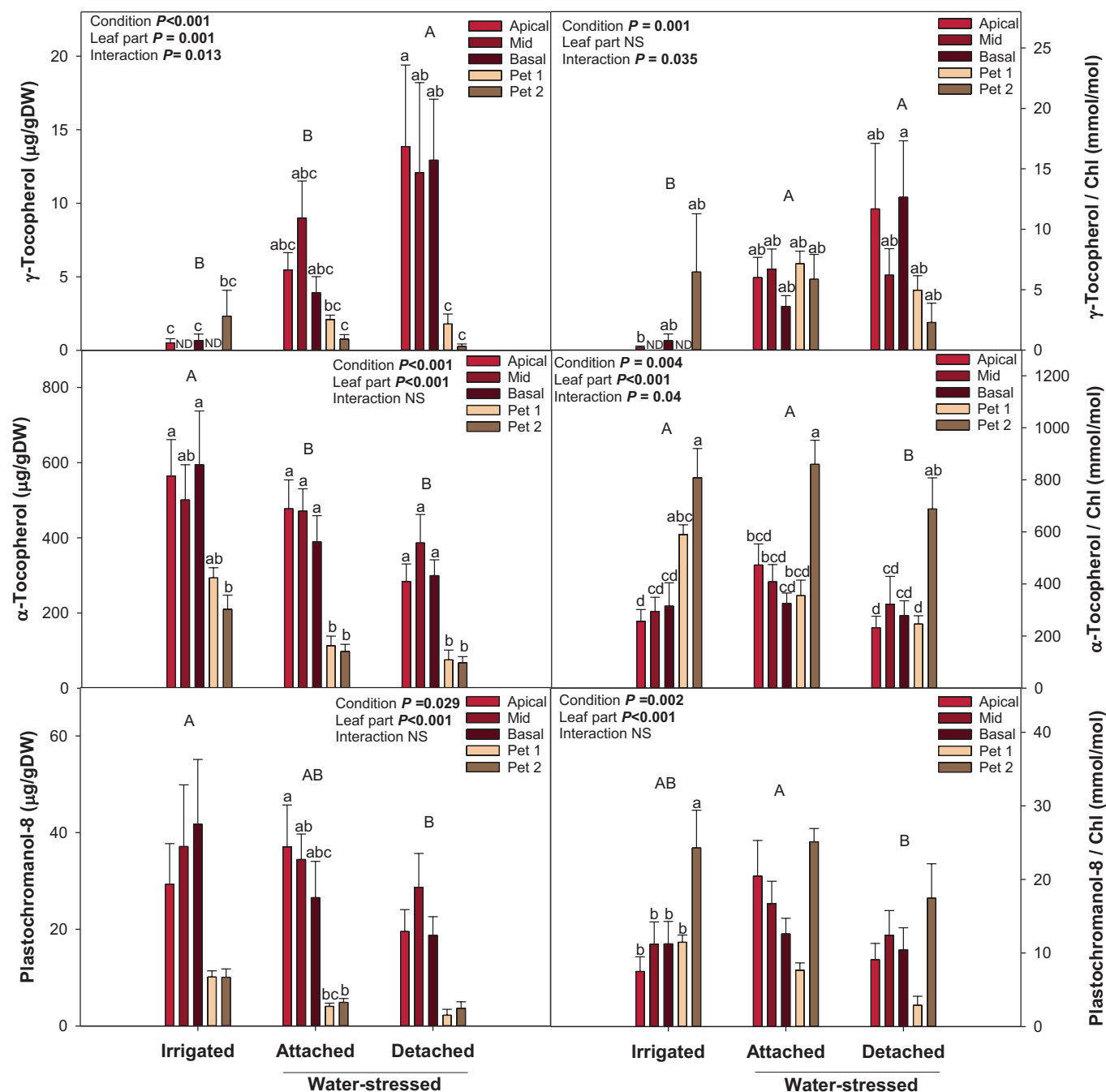


FIGURE 4 Vitamin E (including both γ - and α -tocopherol) and plastochromanol-8 contents in different parts of the leaf in irrigated and water-stressed olive trees, including both attached and detached leaves. Data was expressed both on a dry mass (DW) and chlorophyll (Chl) basis (see also legend of Figure 3 for further details).

(Figure 5). In contrast, water stress clearly altered jasmonates metabolism within the leaf. OPDA contents decreased in all leaf sections under water stress, with values in both petiole parts around 2000 ng/g DW in irrigated plants and 80 ng/g DW in water-stressed plants (Figures 2A and 5). Free JA significantly increased in Pet 1 only, while JA-Ile increased at least 5-fold in all leaf parts under water stress (Figure 2A). It is noteworthy that neither OPDA nor JA contents showed a leaf gradient under water stress, while JA-Ile did, showing a decreasing gradient towards the base of the petiole in stressed plants

(Figure 5). Nevertheless, there were no significant differences in any jasmonate form between petioles from attached and detached leaves, although an increase in oxylipin accumulation was experienced in detached leaves as shown in apical and basal parts with an increase in OPDA and JA contents, respectively (Figures 2A and 5). ABA content did not vary during the study, either between conditions or leaf sections (Figure 2A). In contrast, SA contents increased under water stress in all leaf sections (Figure 2A). Still, SA content did not vary among leaf parts or between attached and detached leaves.

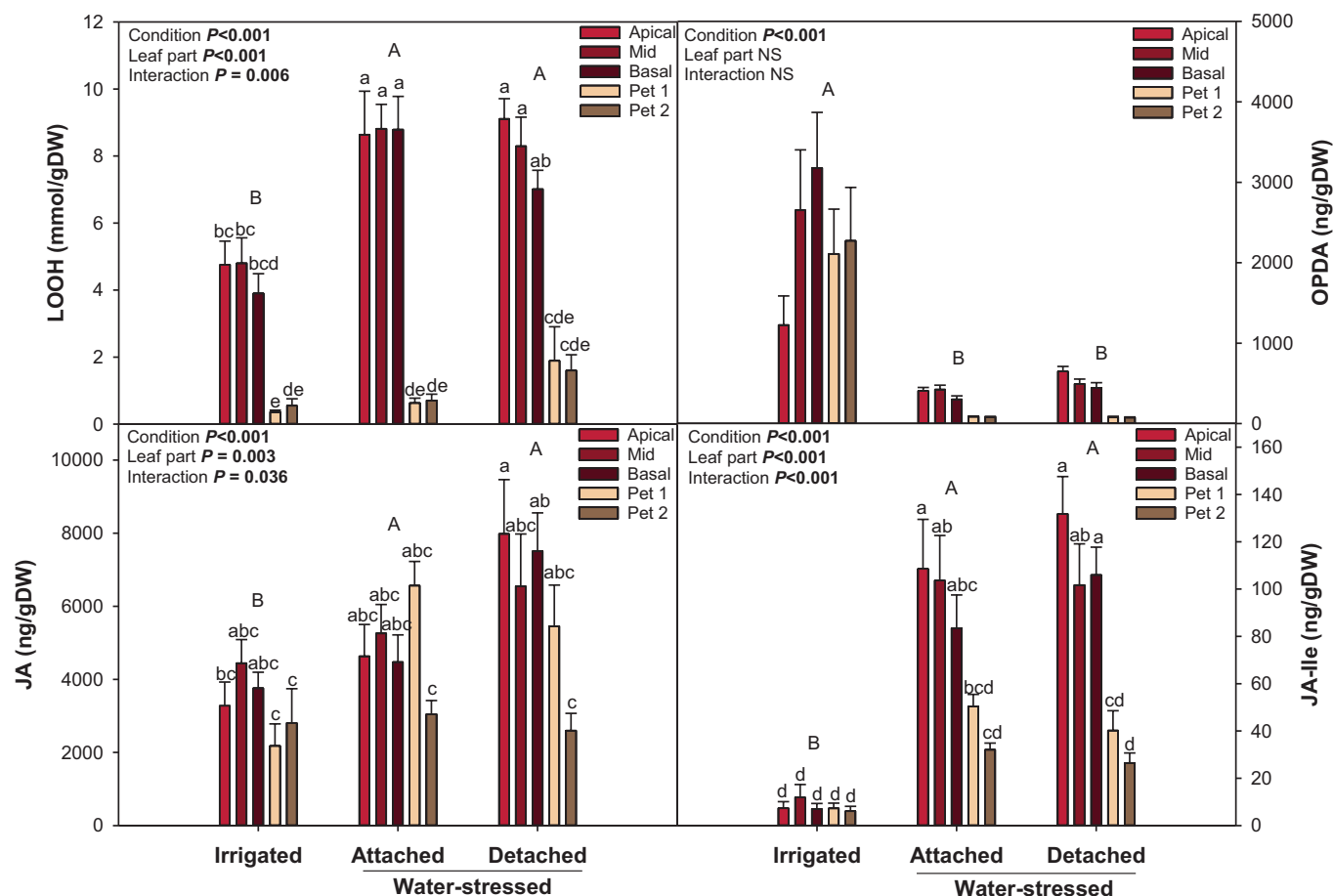


FIGURE 5 Lipid peroxidation products (oxylipin) contents in different leaf parts of irrigated and water-stressed olive trees, including both attached and detached leaves. Contents of lipid hydroperoxides (LOOH), 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA), jasmonic acid (JA) and jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) on a dry matter (DW) basis are shown (see also legend of Figure 3 for further details).

Given the chloroplastic origin of the synthesis of jasmonates, we explored variations in jasmonates contents on a chlorophyll basis. We found that the previous trend of decreased OPDA and increased JA-Ile in the water-stress condition was maintained (Figure 2B). Specifically, OPDA per chlorophyll unit significantly decreased but only in basal and both petiole parts, with the major reduction in Pet 2 from 109 to 11.8 mmol of OPDA per mol of chlorophyll (Figure 6). On the other hand, JA levels per chlorophyll unit increased sharply in both petiole parts, with 6- and 3-fold higher levels in Pet 1 and Pet 2, respectively, in the water-stress condition (Figure 6). JA-Ile content per chlorophyll unit significantly increased in all the leaf parts in the water-stressed group, including Pet 2, but the decreasing gradient was broken, with Pet 1 showing higher levels than the basal part and with the highest JA-Ile levels found in Pet2 (Figure 6). No differences between attached and detached leaves were found. Apparently, the jasmonate response to severe drought was focused in the petiole since the content of the precursor OPDA was reduced in both sections (Pet 1 and Pet 2), while the content of both JA and JA-Ile significantly increased (Figure 6).

To better understand how the metabolic pathway of jasmonates was working out along the leaf in the drought stress response, we

normalized the contents of each oxylipin per unit of the initial substrate, LOOH. We found that OPDA synthesis from LOOH was reduced in both petiole parts from water-stressed leaves, and slightly in the mid part (Figures 2B and 6). However, JA-Ile/LOOH increased, but only in the leaf blade, and JA synthesis from LOOH was slightly reduced in the mid part, just like its direct precursor OPDA. A significant increase in the ratios OPDA/LOOH and JA/LOOH was found in the basal part of detached compared to attached leaves, which further supports the higher JA content present in this leaf section (Figure 2B). Moreover, from available OPDA, free JA synthesis was enhanced in the basal part and in Pet 1 and Pet 2 of water-stressed leaves, as shown by the increase in JA/OPDA ratio. Furthermore, JA-Ile synthesis was promoted from JA in all leaf parts of water-stressed leaves, as JA-Ile/JA ratio increased (Figures 2B and 6).

4 | DISCUSSION

Plants continuously exposed to severe drought stress episodes have been evolutionarily forced to develop sophisticated protective mechanisms that can be activated at various organization levels to cope with

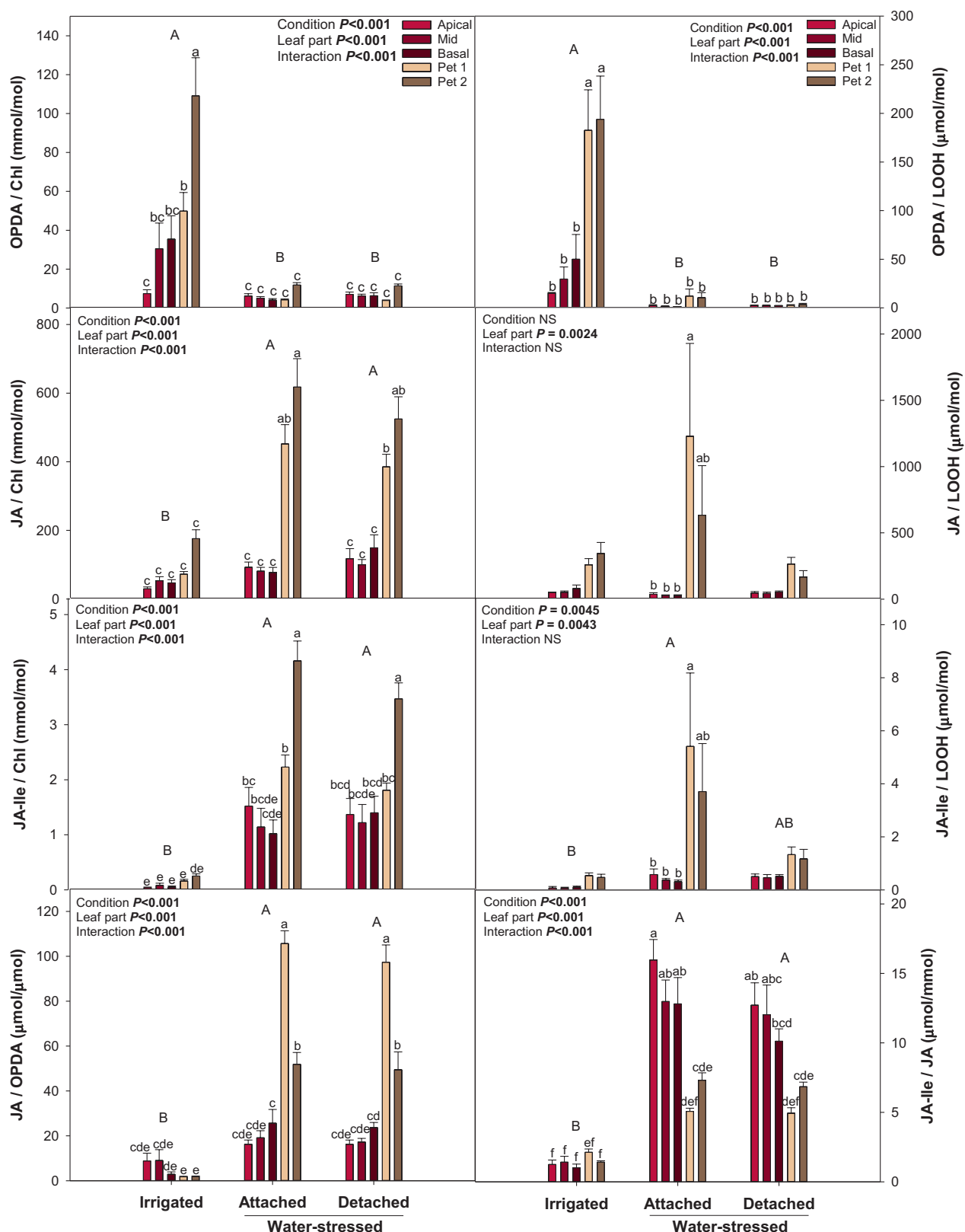


FIGURE 6 Jasmonates contents, expressed both on a chlorophyll (Chl) and lipid hydroperoxide (LOOH) basis, in different leaf parts of irrigated and water-stressed olive trees, including both attached and detached leaves. Contents 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA), jasmonic acid (JA) and jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) are shown (see also legend of Figure 3 for further details).

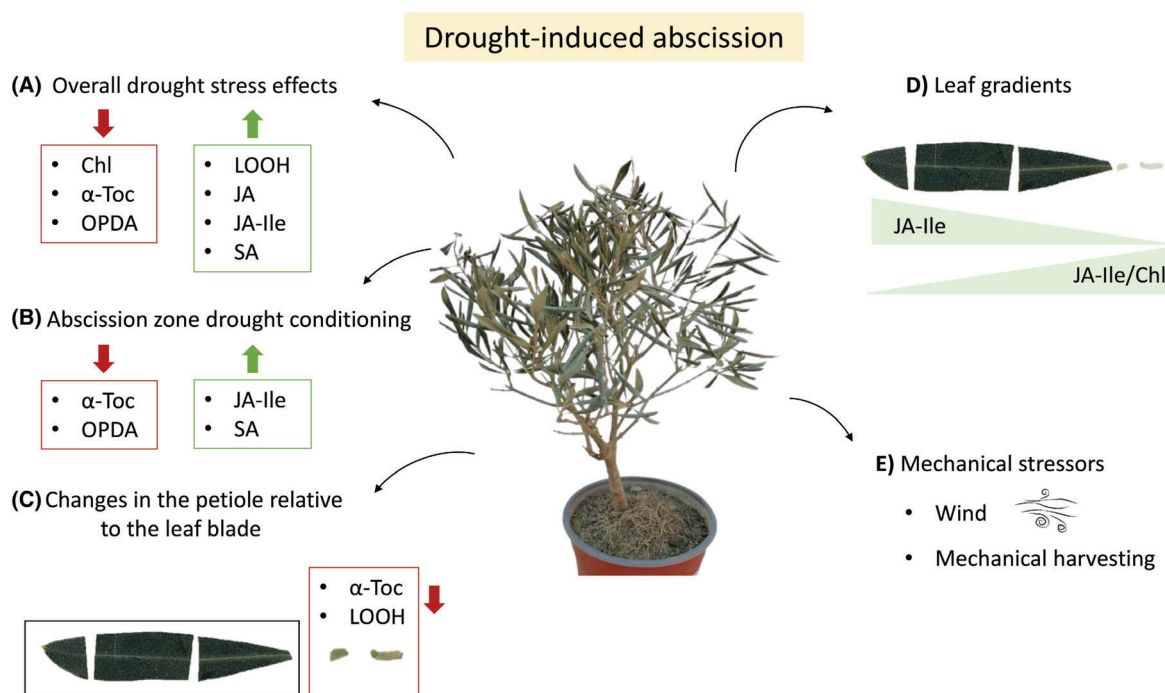


FIGURE 7 Model showing the mechanisms involved in drought-induced leaf abscission in olive trees. (A) Overall drought-stress effects in the leaves of olive trees. Red and green boxes indicate physiological parameters that decreased or increased with drought, respectively. (B) Specific drought-stress effects in the petiole 2 part of attached water-stressed leaves of olive trees. (C) Changes in the leaf blade with respect to the petiole upon drought stress. (D) Changes in foliar gradients along the leaf upon drought stress. (E) Mechanical stressors responsible for the final execution of the leaf abscission process.

stress (Fang & Xiong, 2015; Munné-Bosch, 2022). Drought-induced leaf abscission is considered a defence mechanism as it reduces the transpiration load on plants and avoids water losses under harsh environmental conditions (Patharkar & Walker, 2016). In this study, young olive trees shed their leaves after a very severe, short drought stress that pushed them to the limit, entering a critical photoinhibition of the photosynthetic apparatus that was the prelude to the abscission process. Leaves from water-stressed olive trees suffered a chlorophyll loss, as reported before in previous studies in olive trees (Guerfel et al., 2009). This event could be related to a photoprotective strategy, in which the photosynthetic structure is remodeled to avoid dissipation of excess light, but it is also a typical symptom of photo-oxidative stress. Indeed, drought stress led to oxidative stress in leaves, as evidenced by the increase in lipid peroxidation products such as LOOH and oxylipins such as jasmonates. The overall decrease in the chloroplastic antioxidant α -tocopherol in water-stressed leaves reflected once more the strong photoinhibition caused by such severe stress, drought stress that led to photo-oxidative stress characterized by antioxidant loss, which is typically indicating drought sensitivity (Munné-Bosch, 2005, see also Kumar et al., 2021). Drought also induced an increase in endogenous SA contents, as previously reported in other Mediterranean plant species from the same *Oleaceae* family (Munné-Bosch & Peñuelas, 2003) and supports a role in drought stress protection for this phytohormone (Khan et al., 2015). In contrast, ABA content did not vary under stress, which is not fully surprising as this phytohormone is more involved in early than late

response to water stress when stomatal closure is required (Lim et al., 2015). In this study, we found a differential physiological and hormonal response that might be involved in the drought-induced leaf abscission process. Detached, abscised leaves showed higher oxidative stress than attached, non-abscised leaves of water-stressed plants, as indicated by the contents of jasmonates OPDA and JA, which increased in apical and basal sections, respectively, of abscised leaves relative to non-abscised ones. Besides, the decreases in α -tocopherol (both expressed per unit of dry matter and per chlorophyll) in the leaf apex and in the PC-8 per unit of chlorophyll in the petiole 1 in the detached compared to the attached leaves reinforces the fact that detached leaves suffered from higher oxidative stress in chloroplasts than attached ones. However, regarding the AZ located in petiole 2, there were no differences between attached and detached petioles from water-stressed olive trees, and thus none of these molecules seemed to have a direct role in the execution of the abscission process. It appears that photo-oxidative stress and oxylipin accumulation trigger leaf abscission in water-stressed olive trees, although mechanical stress (a slight shaking mimicking wind is sufficient) executes the process. Here, we propose that a conditioning of the AZ by signaling molecules occurs in response to severe drought stress, including both JA-Ile and SA, whereas OPDA, α -tocopherol and PC-8 contents decrease (Figure 7).

The involvement of jasmonates in retrograde signaling for stress resilience responses has been reported previously (Howe et al., 2018; Muñoz & Munné-Bosch, 2020) and vitamin E has been suggested to

play a role in stress sensing and signaling (Munné-Bosch, 2019). Considering that the leaf blade and the petiole are organs with a completely different number of chloroplasts and photosynthetic structures (Sun et al., 2021), it is not surprising that significant differences in leaf gradients arise when expressing quantities of chloroplastic antioxidants (such as tocochromanols) and oxylipins (such as jasmonates) per mol of chlorophyll. Jasmonates contents per unit of chlorophyll were different in petiole 2 of water-stressed and irrigated plants, not only including OPDA and JA, but also JA-Ile. The sharp reduction in OPDA content linked to the increase in the downstream products of the pathway (JA and JA-Ile) suggested that jasmonates biosynthesis was induced, leading to the specific accumulation of the bioactive form JA-Ile (Wasternack & Hause, 2013). In fact, regarding the contents of each jasmonate by the initial LOOH substrate unit, a reduction in OPDA/LOOH in the petiole suggests that *de novo* OPDA formation was blocked. However, from the existent OPDA, free JA was forming as JA/OPDA increased in the petiole, thus suggesting that the enzyme OPR3 may be activated to synthesize JA in the peroxisome (Stintzi & Browse, 2000). The ratio JA-Ile/JA also increased in water-stressed petioles, thus suggesting an activation of the enzyme JAR1 and that the metabolic pathway of jasmonates was probably directed towards the formation of JA-Ile (Staswick & Tiryaki, 2004; Wasternack & Hause, 2013). It has been previously shown that exposure to drought induces jasmonate biosynthesis in various species (de Ollas et al., 2015), and a recent study suggested a drought stress tolerance priming effect of jasmonates via JAR-1 mediated accumulation of JA-Ile in *Arabidopsis* (Mahmud et al., 2022). Therefore, it appears that jasmonates, and more specifically the bioactive form JA-Ile, play a major role in drought stress tolerance, particularly in conditioning the tissue (petiole 2) containing the AZ for leaf abscission induced by mechanical stress to occur. Ethylene response factors (ERFs) have been involved in leaf abscission regulation of cassava plants (Liao et al., 2016), and ERF1 has been reported to be induced not only by ethylene but also by jasmonate signaling, then promoting expression of genes involved in drought tolerance (Cheng et al., 2013; Lorenzo et al., 2002; Müller & Munné-Bosch, 2015). Thus, we propose here that jasmonate signaling may trigger abscission by conditioning the AZ located in the petiole of drought-stressed leaves. In our study, the execution of the process itself may be related with the mechanical stress imposed at the time of sampling when olive trees were manually shaken and then leaves shed. In field conditions, olive trees are often exposed to mechanical stressors such as the wind and manual or mechanical harvesting methods. Depending on the force exerted, leaf detachment could increase, causing damages to the tree (Sola-Guirado et al., 2014; Wiesman, 2009). These mechanical stressors may provoke higher leaf abscission in drought-stressed trees (see Figure 7 for an overall model of drought-induced leaf abscission in olive trees).

In conclusion, our results show that severe drought induced photoinhibition and photo-oxidative stress in olive trees, accentuating the physiological differentiation between leaf blade and petiole, and altering oxylipin and hormonal gradients along the leaf. More specifically, jasmonates accumulated in the petiole of water-stressed leaves,

where the AZ is located, particularly in the form of the bioactive JA-Ile. Therefore, oxylipins signaling may trigger drought-induced abscission in olive trees, a process that appears to be executed by mechanical stress. Further research is needed to study the interaction of jasmonates with ethylene signaling in this model to better understand leaf abscission. This will undoubtedly help us better understand leaf abscission in olive trees, a very important physiological phenomenon, not only for basic biology but also with important implications in the agrifood biotechnology sector.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Sabina Villadangos and Sergi Munné-Bosch conceived and designed the experiments. Sabina Villadangos performed the experiments with the help of Carmen González. Sabina Villadangos wrote the manuscript with the help of Sergi Munné-Bosch. All authors contributed to the discussion of ideas and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Tania Mesa for her help with tocochromanols analyses. We are very grateful to the *Parc Científic* and *Servei de Camps Experimentals* of the University of Barcelona for technical assistance. This research was funded by the ICREA Academia award and the 2021SGR00675 grant given to S.M.B. by the Catalan Government.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that they have no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Sergi Munné-Bosch  <https://orcid.org/0000-0001-6523-6848>

REFERENCES

- Abbo, S., Gopher, A. & Lev-Yadun, S. (2015) Fruit domestication in the Near East. *Plant Breeding Reviews*, 39, 325–377.
- Agustí, J., Merelo, P., Cercós, M., Tadeo, F.R. & Talón, M. (2008) Ethylene-induced differential gene expression during abscission of citrus leaves. *Journal of Experimental Botany*, 59, 2717–2733.
- Amaral, J.S., Casal, S., Torres, D., Seabra, R.M. & Oliveira, B.P.P. (2005) Simultaneous determination of tocopherols and tocotrienols in hazelnuts by a normal phase liquid chromatographic method. *Analytical Sciences*, 21, 1545–1548.
- Bacelar, E.A., Moutinho-Pereira, J.M., Gonçalves, B.C., Ferreira, H.F. & Correia, C.M. (2007) Changes in growth, gas exchange, xylem hydraulic properties and water use efficiency of three olive cultivars under contrasting water availability regimes. *Environmental and Experimental Botany*, 60, 183–192.
- Basu, M.M., González-Carranza, Z.H., Azam-Ali, S., Tang, S., Shahid, A.A. & Roberts, J.A. (2013) The manipulation of auxin in the abscission zone cells of *Arabidopsis* flowers reveals that indoleacetic acid signaling is a prerequisite for organ shedding. *Plant Physiology*, 162, 96–106.
- Bou, R., Codony, R., Tres, A., Decker, E.A. & Guardiola, F. (2008) Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation-xylenol orange method: a review of the factors that

- influence the method's performance. *Analytical Biochemistry*, 377, 1–15.
- Brito, C., Dinis, L.T., Moutinho-Pereira, J. & Correia, C.M. (2019) Drought stress effects and olive tree acclimation under a changing climate. *Plants*, 8, 232.
- Browse, J. (2009) Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 183–205.
- Casadesús, A., Bouchikh, R., Pérez-Llorca, M. & Munné-Bosch, S. (2021) Linking jasmonates with vitamin E accumulation in plants: a case study in the Mediterranean shrub *Cistus albidus* L. *Planta*, 253, 36.
- Chartzoulakis, K., Patakas, A. & Bosabalidis, A.M. (1999) Changes in water relations, photosynthesis and leaf anatomy induced by intermittent drought in two olive cultivars. *Environmental and Experimental Botany*, 42, 113–120.
- Cheng, M.C., Liao, P.M., Kuo, W.W. & Lin, T.P. (2013) The Arabidopsis ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 regulates abiotic stress-responsive gene expression by binding to different cis-acting elements in response to different stress signals. *Plant Physiology*, 162, 1566–1582.
- de Ollas, C., Arbona, V. & Gomez-Cadenas, A. (2015) Jasmonic acid interacts with abscisic acid to regulate plant responses to water stress conditions. *Plant Signaling & Behavior*, 10, e1078953.
- Demmig-Adams, B., Cohu, C.M., Amiard, V., Zadelhoff, G., Veldink, G.A., Muller, O. et al. (2013) Emerging trade-offs-impact of photoprotectants (PsbS, xanthophylls, and vitamin E) on oxylipins as regulators of development and defense. *New Phytologist*, 197, 720–729.
- Falk, J. & Munné-Bosch, S. (2010) Tocochromanol functions in plants: anti-oxidation and beyond. *Journal of Experimental Botany*, 61, 1549–1566.
- Fang, Y. & Xiong, L. (2015) General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72, 673–689.
- Farmer, E.E. & Mueller, M.J. (2013) ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 429–450.
- Fischer, E. & Schär, C. (2010) Consistent geographical patterns of changes in high-impact European heatwaves. *Nature Geoscience*, 3, 398–403.
- Goldental-Cohen, S., Burstein, C., Biton, I., Ben Sasson, S., Sadeh, A., Many, Y. et al. (2017) Ethephon induced oxidative stress in the olive leaf abscission zone enables development of a selective abscission compound. *BMC Plant Biology*, 17, 87.
- Guerfel, M., Baccouri, O., Boujnah, D., Chaïbi, W. & Zarrouk, M. (2009) Impacts of water stress on gas exchange, water relations, chlorophyll content and leaf structure in the two main Tunisian olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Science Horticulturae*, 119, 257–263.
- Hernandez-Santana, V., Diaz-Rueda, P., Diaz-Espejo, A., Raya-Sereno, M.D., Gutiérrez-Gordillo, S., Montero, A. et al. (2019) Hydraulic traits emerge as relevant determinants of growth patterns in wild olive genotypes under water stress. *Frontiers in Plant Science*, 10, 291.
- Howe, G.A., Major, I.T. & Koo, A.J. (2018) Modularity in jasmonate signaling for multistress resilience. *Annual Review of Plant Biology*, 29(69), 387–415.
- IPCC. (2022) Cross-Chapter Paper 4: Mediterranean Region. Climate change 2022: impacts, adaptation, and vulnerability. In: Pörtner, H.-O., Roberts, D.C., Tignor, M., Poloczanska, E.S., Mintenbeck, K., Alegria, A. et al. (Eds.) *Contribution of working group II to the sixth assessment report of the intergovernmental panel on climate change*. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 2233–2272.
- Jackson, M.B. & Osborne, D.J. (1970) Ethylene, the natural regulator of leaf abscission. *Nature*, 225, 1019–1022.
- Khan, M.I.R., Fatma, M., Per, T.S., Anjum, N.A. & Khan, N.A. (2015) Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1–17.
- Kumar, A., Prasad, A., Sedlarova, M., Kale, R., Frankel, L.K., Sallans, L. et al. (2021) Tocopherol controls D1 amino acid oxidation by oxygen radicals in Photosystem II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118, e2019246118.
- Langgut, D., Cheddadi, R., Carrión, J.S., Cavanagh, M., Colombaroli, D., Eastwood, W.J. et al. (2019) The origin and spread of olive cultivation in the Mediterranean Basin: the fossil pollen evidence. *Holocene*, 29, 902–922.
- Lavee, S. & Martin, G.C. (1981) In vitro studies of ethephon-induced abscission in olive. II. The relation between ethylene evolution and abscission of various organs. *Journal of American Society of Horticultural Sciences*, 106, 19–26.
- Liao, W., Li, Y., Yang, Y., Wang, G. & Peng, M. (2016) Exposure to various abscission-promoting treatments suggests substantial ERF subfamily transcription factors involvement in the regulation of cassava leaf abscission. *BMC Genomics*, 17, 538.
- Lichtenthaler, H. & Wellburn, A. (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11, 591–592.
- Lim, C.W., Baek, W., Jung, J., Kim, J.H. & Lee, S.C. (2015) Function of ABA in stomatal defense against biotic and drought stresses. *International Journal of Molecular Science*, 16, 15251–15270.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J.J. & Solano, R. (2002) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathway in plant defense. *Plant Cell*, 15, 165–178.
- Loumou, A. & Giourga, C. (2003) Olive groves: the life and identity of the Mediterranean. *Agriculture and Human Values*, 20, 87–95.
- Mahmud, S., Ullah, C., Kortz, A., Bhattacharyya, S., Yu, P., Gershenzon, J. et al. (2022) Constitutive expression of JASMONATE RESISTANT 1 induces molecular changes that prime the plants to better withstand drought. *Plant, Cell & Environment*, 45, 2906–2922.
- Matthes, M.C., Bruce, T.J.A., Ton, J., Verrier, P.J., Pickett, J.A. & Napier, J.A. (2010) The transcriptome of *cis*-jasmonate-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* and its role in indirect defence. *Planta*, 232, 1163–1180.
- Meir, S., Hunter, D.A., Chen, J.-C., Halaly, V. & Reid, M.S. (2006) Molecular changes occurring during acquisition of abscission competence following auxin depletion in *Mirabilis jalapa*. *Plant Physiology*, 141, 1604–1616.
- Mittler, R. (2017) ROS are good. *Trends in Plant Science*, 22, 11–19.
- Morales, M., Garcia, Q.S. & Munné-Bosch, S. (2015) Ecophysiological response to seasonal variations in water availability in the arborescent, endemic plant *Vellozia gigantea*. *Tree Physiology*, 35, 253–265.
- Müller, M. & Munné-Bosch, S. (2011) Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Plant Methods*, 7, 37.
- Müller, M. & Munné-Bosch, S. (2015) Ethylene Response Factors: a key regulatory hub in hormone and stress signaling. *Plant Physiology*, 169, 32–41.
- Munné-Bosch, S. (2005) The role of alpha-tocopherol in plant stress tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 162, 743–748.
- Munné-Bosch, S. (2019) Vitamin E function in stress sensing and signaling in plants. *Developmental Cell*, 48, 290–292.
- Munné-Bosch, S. (2022) Spatiotemporal limitations in plant biology research. *Trends in Plant Science*, 27, 346–354.
- Munné-Bosch, S. & Peñuelas, J. (2003) Photo- and antioxidative protection, and a role for salicylic acid during drought and recovery in field-grown *Phillyrea angustifolia* plants. *Planta*, 217, 758–766.
- Muñoz, P. & Munné-Bosch, S. (2019) Vitamin E in plants: biosynthesis, transport, and function. *Trends in Plant Science*, 24, 1040–1051.
- Muñoz, P. & Munné-Bosch, S. (2020) Oxylipins in plastidial retrograde signaling. *Redox Biology*, 37, 101717.
- Patharkar, O.R. & Walker, J.C. (2016) Core mechanisms regulating developmentally timed and environmentally triggered abscission. *Plant Physiology*, 172, 510–520.
- Patharkar, O.R. & Walker, J.C. (2018) Advances in abscission signaling. *Journal of Experimental Botany*, 69, 733–740.

- Patterson, S.E. (2001) Cutting loose. Abscission and dehiscence in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 126, 494–500.
- Savchenko, T., Kolla, V.A., Wang, C.Q., Nasafi, Z., Hicks, D.R., Phadungchob, B. et al. (2014) Functional convergence of oxylipin and abscisic acid pathways controls stomatal closure in response to drought. *Plant Physiology*, 164, 1151–1160.
- Sola-Guirado, R.R., Castro-García, S., Blanco-Roldán, G.L., Jiménez-Jiménez, F., Castillo-Ruiz, F.J. & Gil-Ribes, J.A. (2014) Traditional olive tree response to oil olive harvesting technologies. *Biosystems Engineering*, 118, 186–193.
- Staswick, P.E. & Tiryaki, I. (2004) The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in Arabidopsis. *Plant Cell*, 16, 2117–2127.
- Stintzi, A. & Browse, J. (2000) The Arabidopsis male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 10625–10630.
- Sun, W., Ma, N., Huang, H., Wei, J., Ma, S., Liu, H. et al. (2021) Photosynthetic contribution and characteristics of cucumber stems and petioles. *BMC Plant Biology*, 21, 454.
- Taylor, J.E. & Whitelaw, C.A. (2001) Signals in abscission. *New Phytologist*, 151, 323–339.
- Tognetti, R., d'Andria, R., Lavini, A. & Morelli, G. (2006) The effect of deficit irrigation on crop yield and vegetative development of *Olea europaea* L., (cvs. Frantoio and Leccino). *European Journal of Agronomy*, 25, 356–364.
- Trabelsi, L., Gargouri, K., Hassena, A.B., Mbadra, C., Ghrab, M., Ncube, B. et al. (2019) Impact of drought and salinity on olive water status and physiological performance in an arid climate. *Agricultural Water Management*, 213, 749–759.
- Van Kooten, O. & Snel, J.F.H. (1990) The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthetic Research*, 25, 147–150.
- Wasternack, C. & Hause, B. (2013) Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany*, 111, 1021–1058.
- Wiesman, Z. (2009) The current status of and major trends in the world olive oil industry. In: *Desert olive oil cultivation. Advanced Bio Technologies*, 1st edition. Oxford, UK: Academic Press.
- Winger, A.M., Taylor, N.L., Heazlewood, J.L., Day, D.A. & Millar, A.H. (2007) The cytotoxic lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal covalently modifies a selective range of proteins linked to respiratory function in plant mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 37436–37447.
- Yamauchi, Y. & Sugimoto, Y. (2010) Effect of protein modification by malondialdehyde on the interaction between the oxygen-evolving complex 33 kDa protein and photosystem II core proteins. *Planta*, 231, 1077–1088.
- Zuur, A., Ieno, E. & Elphick, C. (2009) A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods in Ecology and Evolution*, 1, 3–14.

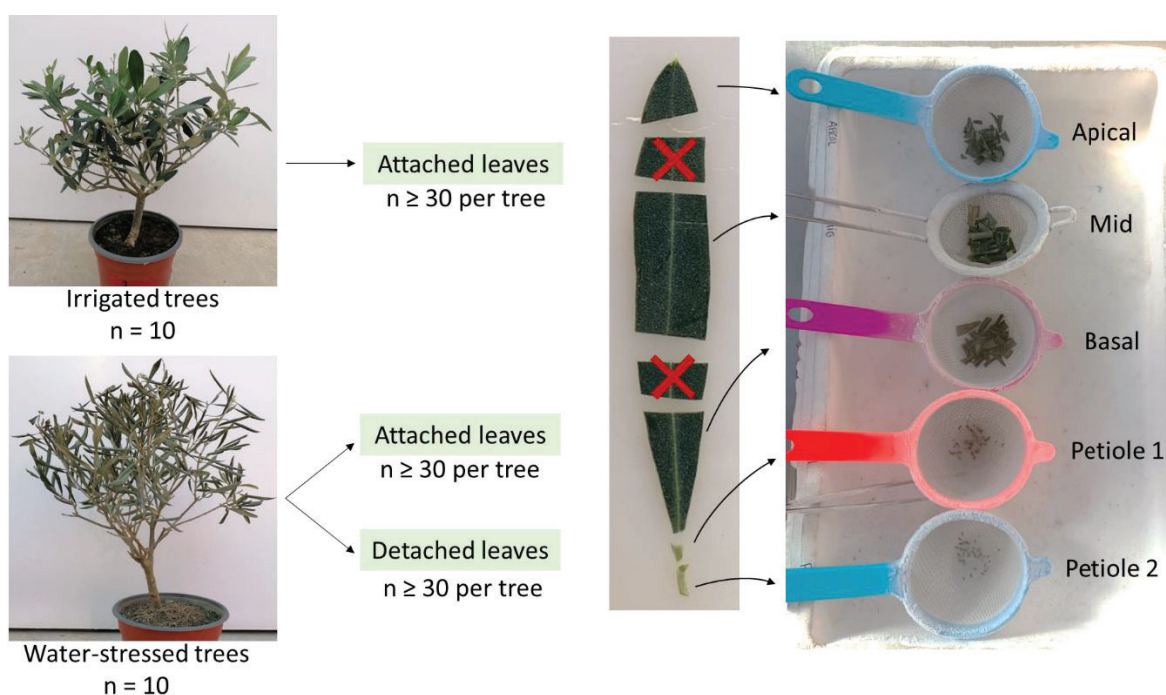
SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Villadangos, S., González, C. & Munné-Bosch, S. (2023) Photo-oxidative stress leading to oxylipin accumulation may trigger drought-induced leaf abscission in olive trees. *Physiologia Plantarum*, 175(3), e13941. Available from: <https://doi.org/10.1111/ppl.13941>

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary Figure 1. Experimental design used to study severe drought-induced leaf abscission in olive trees. From each leaf, five sections were dissected and separated: apical, mid, basal, petiole 1 and petiole 2. A pool of each specific part of the tissue taken from various leaves of the same olive tree was generated for each condition for further biochemical analyses. Tissue from 10 different trees was collected for each treatment.



Supplementary Table 1. Summary of results of one-way ANOVA statistical analyses. *P*-values are shown, indicating the effect of the “condition” (irrigated and water-stressed; attached and detached) by leaf section (apical, mid, basal, petiole 1 and petiole 2). Significant differences with a *P*-value < 0.05 are shown in bold. Pet 1: Petiole 1, Pet 2: Petiole 2.

Stress marker	<i>P</i> -values									
	Irrigated vs. Water-stressed					Attached vs. Detached				
	Apical	Mid	Basal	Pet 1	Pet 2	Apical	Mid	Basal	Pet 1	Pet 2
Chl a+b (mg/gDW)	0.00046	0.195	0.109	0.0337	0.0298	0.0906	0.246	0.966	0.776	0.555
α-Toc (μg/gDW)	0.489	0.785	0.157	0.00014	0.00208	0.0444	0.39	0.286	0.324	0.255
γ-Toc (μg/gDW)	0.0007	0.0036	0.0215	1.79e-06	0.338	0.0823	0.422	0.123	0.695	0.19
PC8 (μg/gDW)	0.531	0.842	0.314	0.00059	0.00121	0.101	0.517	0.37	0.203	0.429
LOOH(μmol/gDW)	0.017	0.0013	0.00047	0.0993	0.588	0.745	0.653	0.135	0.237	0.0839
OPDA (ng/gDW)	0.0364	0.0084	0.00059	0.00197	0.004	0.0051	0.422	0.0793	0.578	0.504
JA (ng/gDW)	0.229	0.437	0.415	0.00018	0.812	0.0675	0.442	0.0296	0.407	0.459
JA-Ile (ng/gDW)	0.00014	0.00021	4.23e-05	1.18e-06	7.12e-07	0.387	0.943	0.235	0.316	0.283
ABA (ng/gDW)	0.0996	0.734	0.953	0.978	0.628	0.821	0.72	0.517	0.329	0.399
SA (ng/gDW)	0.0224	0.0301	0.00186	6e-06	3.69e-07	0.297	0.683	0.0891	0.964	0.374
α-Toc / Chl	0.0319	0.21	0.911	0.00412	0.754	0.0143	0.481	0.518	0.126	0.266
γ-Toc / Chl	0.00307	0.00135	0.024	6.15e-06	0.813	0.309	0.857	0.0908	0.188	0.196
PC8 / Chl	0.0299	0.218	0.718	0.00888	0.714	0.056	0.375	0.575	0.00805	0.13
OPDA / Chl	0.597	0.071	0.0249	0.00017	0.000103	0.619	0.746	0.218	0.503	0.78
JA / Chl	0.00106	0.101	0.109	7.89e-06	7.5e-05	0.452	0.648	0.108	0.335	0.396
JA-Ile / Chl	0.000329	0.00611	0.00107	1.08e-07	3.11e-09	0.728	0.517	0.366	0.127	0.164
OPDA / LOOH	0.0711	0.0378	0.0707	0.0015	0.000673	0.866	0.224	0.01	0.217	0.221
JA / LOOH	0.496	0.0366	0.068	0.209	0.461	0.584	0.196	0.0144	0.186	0.258
JA-Ile / LOOH	0.0308	0.000464	0.0103	0.115	0.0907	0.743	0.494	0.0562	0.16	0.209
JA / OPDA	0.0783	0.0972	0.00186	3.3e-12	2.06e-08	0.999	0.597	0.772	0.397	0.797
JA-Ile / JA	1.35e-08	1.03e-06	8e-06	1.07e-07	2.58e-09	0.155	0.723	0.216	0.78	0.481

DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

1. Tolerancia al estrés severo por sequía: efectos a nivel de hoja y de planta entera

El estrés moldea la fisiología de las plantas a lo largo de su vida y la supervivencia a un determinado estrés está condicionada por el tipo de estrategias de respuesta constitutivas adquiridas por adaptación o inducibles por aclimatación. La capacidad de respuesta a las demandas exigidas por un cambio ambiental es fundamental para poder minimizar su impacto. Si una planta puede soportar un estrés sin daños graves en su fisiología se trata de una planta tolerante a este estrés concreto. Aun así, cuando el estrés es severo puede llevar al límite las capacidades adaptativas de la planta, entrando en una fase final de desgaste que resulta en una pérdida de viabilidad y que puede incluso terminar con la muerte del individuo (Lichtenthaler, 1996). Sin embargo, estudiar las respuestas de aclimatación que se dan en este límite en especies tolerantes al estrés es esencial para descifrar los mecanismos subyacentes a su tolerancia, y es lo que precisamente ha buscado esta tesis doctoral.

La respuesta fisiológica de las plantas a la sequía se ve reflejada en diferentes niveles de organización: celular, de órganos y planta entera (Gupta et al., 2020). En el **capítulo 1** observamos mecanismos de tolerancia a la sequía de *S. tectorum* en una escala espaciotemporal, incluyendo estrategias a nivel de hoja, así como a nivel de planta a lo largo de las 10 semanas de duración del estrés. Durante ese tiempo, las plantas de *S. tectorum* no mostraron síntomas de fotoinhibición ni de estrés foto-oxidativo en hojas maduras situadas en los verticilos intermedios de la roseta, manteniendo la F_v/F_m por encima de 0,75 (Takahashi & Badger, 2011), y con niveles constantes de peroxidación lipídica, similares a los de las plantas irrigadas. Mantener intactos los fotosistemas durante un estrés por déficit hídrico es propio de especies con metabolismo CAM, como es el caso de *Pyrrhosia piloselloides* (Griffits et al., 1989), *Peperomia carnevalli* (Herrera et al., 2000) o *Tillandsia flabellate* (Hu et al., 2023). El metabolismo CAM es considerado una estrategia fotosintética adaptativa que ha aparecido en varias ocasiones en distintos linajes filogenéticos de plantas que habitan en ambientes con escasez de agua (Heyduk et al., 2019). Debido a las bajas tasas

fotosintéticas presentes en una planta CAM, lo que se traduce en un consumo más lento de ATP y de poder reductor en el Ciclo de Calvin, son necesarios mecanismos de fotoprotección muy eficientes para hacer frente al exceso de luz (Lu et al., 2003). En el **capítulo 1**, se describen dos de ellos: la reducción en las clorofilas y el aumento de vitamina E por unidad de clorofila, concretamente en la forma α -tocoferol. Esta pérdida de clorofilas se ha descrito como una estrategia fotoprotectora porque al disminuir la luz absorbida se reduce la probabilidad de daño oxidativo (Anjum et al., 2011), y además aumenta la capacidad antioxidante de la planta en situaciones de estrés (Kyparissis et al., 1995; Munné-Bosch & Alegre, 2000). De manera que las plantas de *S. tectorum* bajo déficit hídrico y nutricional activan respuestas fotoprotectoras, aumentando los niveles de α -tocoferol para evitar tanto el estrés oxidativo (que detallaré más adelante) como la fotoinhibición, demostrándose recientemente su papel en el control de la oxidación de las proteínas D1 del PSII (Kumar et al., 2021). Además, la función fotosintética está fuertemente asociada al estado hídrico de la planta, como así se muestra en otros estudios donde la F_v/F_m solo disminuye cuando el RWC baja sustancialmente (Lawlor & Tezara, 2009; Dahal & Vanlerberghe, 2017).

Una característica relacionada con el metabolismo CAM es la succulencia y, aunque se desconoce si han evolucionado de forma dependiente o no, sin duda existe una relación entre ambos rasgos para optimizar las estrategias del uso del agua en ambientes secos (Ogburn & Edwards, 2010; Leverett et al., 2023). Pese a que la succulencia ha estado tradicionalmente asociada a especies que habitan en ambientes áridos (von Willert et al., 1992), también ocurre en especies de nichos alpinos, como es el caso de *S. tectorum* (Körner et al., 2003). Además, la relación entre el metabolismo CAM y la succulencia en hojas es particularmente estrecha en especies de la familia Crassulaceae, las cuales poseen succulencia en todas las células (Fradera-Soler et al., 2022), donde todas las células del parénquima realizan la fotosíntesis y almacenan agua; al contrario que en especies de los géneros Aizoaceae o Asphodelaceae, donde existe una especialización funcional entre las células fotosintéticas o clorénquima y las células almacenadoras de agua o hidrénquima, denominándose succulencia de almacenamiento (Ihlenfeldt, 1985). Al igual que el metabolismo CAM, un mayor grado de succulencia está asociado a mantener la integridad del PSII durante más tiempo ante la desecación mediante la disminución de las tasas de pérdida de agua (Ripley et al., 2013). En *S. tectorum*, disminuyó la hidratación de la hoja a

medida que pasaron las semanas, reflejado también en un menor peso fresco de la misma (**capítulo 1**). Sin embargo, el RWC disminuye en la semana 4 para después mantenerse constante en torno a un 70% hasta el final del experimento, manteniéndose intacta la biomasa en peso seco. Teniendo en cuenta el tamaño reducido de las hojas y posiblemente paredes celulares más gruesas (Körner, 2003), esto parece indicar una tolerancia a la desecación mantenida durante varias semanas de estrés. Las variaciones hídricas en las plantas están asociadas a la señalización de ABA y en *S. tectorum* encontramos que esta disminución del RWC ocurrió de manera simultánea al pico de ABA en las plantas sometidas a estrés. Pese a que el ABA promueve el cierre estomático como respuesta temprana al déficit hídrico (Suhita et al., 2004), estas plantas CAM a mediodía tendrían los estomas cerrados y por lo tanto el aumento de ABA podría estar más relacionado con otros mecanismos morfológicos y bioquímicos que modulan las relaciones hídricas de las plantas (Negin & Moshelion, 2016). En efecto, esta respuesta la observamos también en la población natural de *S. tectorum* estudiada en el **capítulo 2**, donde las condiciones de sequía en verano redujeron el RWC de las hojas hasta el 70%, obteniendo reducciones similares a las plantas en condiciones controladas del **capítulo 1**. También observamos un aumento del contenido de ABA en las hojas en el verano y un aumento del LMA, resultante de una reducción en el área foliar. Un mayor LMA requiere una mayor inversión en masa seca foliar por unidad de superficie foliar, pero implica una menor superficie de transpiración, por lo que es una estrategia propia de las especies adaptadas a hábitats deficitarios en agua y nutrientes (Wright et al., 2004). Tanto el ABA como el LMA son determinantes de la eficiencia del uso del agua (Negin & Moshelion, 2016; Reddy et al., 2020), de manera que esta variación morfológica es también una respuesta de aclimatación a la sequía y podría estar desencadenada por el ABA. Este mantenimiento parcial de la turgencia en *S. tectorum*, se confirma durante el **capítulo 3**, en el que alargamos la exposición a déficit hídrico y nutricional en las mismas plantas del capítulo 1 hasta siete meses, y el RWC baja hasta un 42%. Pese a que la reducción es sustancial, ocurre tras un largo periodo de tiempo sin disponibilidad hídrica y, por lo tanto, refleja una estrategia suculenta ahorradora de agua o de evitación del estrés; al contrario que las plantas resurrectoras, las cuales sí toleran la desecación casi total en hojas, disminuyendo su RWC hasta el 5% y recuperándose al acabar el estrés (Bernacchia et al., 1996; Oliver et al., 2020). En este contexto, la recuperación del estado hídrico de las hojas del medio de la roseta en tan solo una semana después de la

rehidratación muestra también la resiliencia a la sequía de esta especie. La resiliencia es la capacidad de soportar un estrés y retornar al estado estable, al estado pre-estrés (Hodgson et al., 2015), por lo que supone un paso más en la aclimatación de una especie. De hecho, se sabe que las paredes celulares de las hojas suculentas son elásticas, lo que les permite doblarse durante un estrés prolongado y tener cambios drásticos pero reversibles en el volumen sin comprometer su función (Fradera-Soler et al., 2022).

En este **capítulo 3** también descubrimos otro mecanismo de aclimatación a nivel de hoja en *S. tectorum*. Se trata de una estrategia de tipo quiescente en el que las plantas mantuvieron niveles oxidativos extremadamente bajos en las hojas durante los siete meses sin disponibilidad hídrica. Con la prolongación de las condiciones estresantes, las plantas de *S. tectorum* entran inevitablemente en fotoinhibición, aunque manteniendo unos valores constantes en torno a 0,7. De hecho, las plantas evitaron el estrés oxidativo, como se muestra con los bajos niveles de MDA. Disminuir la carga oxidativa durante un periodo de estrés tan prolongado sugiere una estrategia de tolerancia extrema a la sequía a través de una posible disminución en la actividad metabólica. Durante un estrés hídrico severo, las plantas de *S. tectorum* podrían haber reducido su actividad CAM para después retomarla durante la recuperación hídrica, como se ha visto en su congénere *S. montanum* ante un estrés hídrico prolongado (Earnshaw, 1985). Esto podría explicar el hecho de que las plantas de *S. tectorum* tengan mayores niveles oxidativos en condiciones irrigadas que durante un estrés hídrico severo. Además, el único antioxidante con capacidad conocida para contrarrestar la peroxidación lipídica, la vitamina E, aumenta con la prolongación del estrés, reflejando una gran estrategia fotoprotectora en *S. tectorum* (Munné-Bosch et al., 2005). El hecho de que la vitamina E siga aumentando durante la recuperación hídrica permite a las plantas protegerse del estrés oxidativo en un momento vulnerable como es la posible reactivación del metabolismo CAM, además de ser una necesidad descrita en otras plantas perennes (Munné-Bosch & Peñuelas, 2003; Cotado et al., 2020). Fisiológicamente, se definen la latencia o quiescencia como estados de evitación oportunista, en los que el crecimiento se reanuda en condiciones favorables (Considine & Considine, 2016). A diferencia de la dormición, la cual es más propia de semillas y yemas, la quiescencia es una detención del crecimiento y del metabolismo de poca duración, una latencia caracterizada por una menor división celular (Velappan et al., 2017). Este estado de quiescencia en las

hojas permitió detener el crecimiento en pro de la supervivencia en *S. tectorum*, pudiendo considerarse una respuesta de aclimatación al estrés o endurecimiento por estrés.

Así, esta estrategia de quiescencia a nivel de hoja pone en relieve el fuerte compromiso entre el crecimiento y la supervivencia en las plantas (Claeys & Inzé, 2013), y se vio también reflejado en la población natural estudiada en el **capítulo 2**. En este estudio en el Espacio Natural de Les Guillerries, observamos una detención del crecimiento en las plantas durante un evento de sequía estacional de verano, donde los niveles de citoquininas activas 2-iP y *t*-Z, las auxinas y la giberelina bioactiva GA₁ disminuyeron en las hojas. Tanto las citoquininas como las auxinas están relacionadas con el crecimiento de la hoja, las primeras por su implicación en el ciclo celular y las segundas en la modulación de la expansión foliar (Davies, 2010). Una reducción en el tamaño foliar, como refleja también el LMA en este estudio, reduce el área de transpiración ayudando a preservar el contenido hídrico en la hoja. Esta detención del crecimiento ocurrió simultáneamente a una respuesta de aclimatación a la sequía mediada por las hormonas relacionadas con el estrés, el ABA y la JA-Ile, cuyos niveles aumentaron significativamente durante el verano. Las respuestas fisiológicas descritas en *S. tectorum* parecen indicar que, ante situaciones de estrés severo, como una sequía, inclina la balanza a favor de la supervivencia, aunque esto restrinja su crecimiento.

Este compromiso por la supervivencia al estrés se evidenció también en las estrategias a nivel de planta, como es el caso de la senescencia foliar gradual en la roseta. En las plantas sometidas a estrés hídrico en el **capítulo 1** aparecen indicios de senescencia foliar en las hojas más viejas, aquellas localizadas en los verticilos más externos de la roseta. La removilización de nutrientes desde las hojas viejas hasta las hojas jóvenes de la planta se considera una estrategia adaptativa a la sequía (Munné-Bosch & Alegre, 2004; Zhao et al., 2017), siendo esencial para la aclimatación en ambientes con déficit hídrico. En efecto, en el **capítulo 3** se muestra que esta senescencia foliar ocurrió de manera gradual a lo largo de la roseta en las plantas de *S. tectorum*, sin llegar a las hojas más jóvenes internas de la yema apical, situadas en el centro de la roseta; protegiendo así los meristemos imprescindibles para permitir el rebrote durante la recuperación hídrica. Además, en las tres poblaciones naturales estudiadas en este capítulo, observamos en verano una disminución del diámetro de la roseta que encaja con la reducción del área foliar, pero también con el plegamiento

interno de las hojas hacia la yema apical en las plantas más estresadas. En ellas, solo las superficies abaxiales de los verticilos más viejos de la roseta estaban expuestas a la luz solar. El enrollamiento de órganos por desecación es un mecanismo morfológico de defensa más propio de plantas resurrectoras (Vicré et al., 2004), y sin embargo pudimos observarlo en *S. tectorum*. Por lo tanto, se trata de una especie adaptada a la sequía que cuenta con mecanismos de evitación del estrés y con mecanismos de tolerancia al estrés altamente relacionados entre sí y en diferentes niveles organizativos (**Figura 6**).

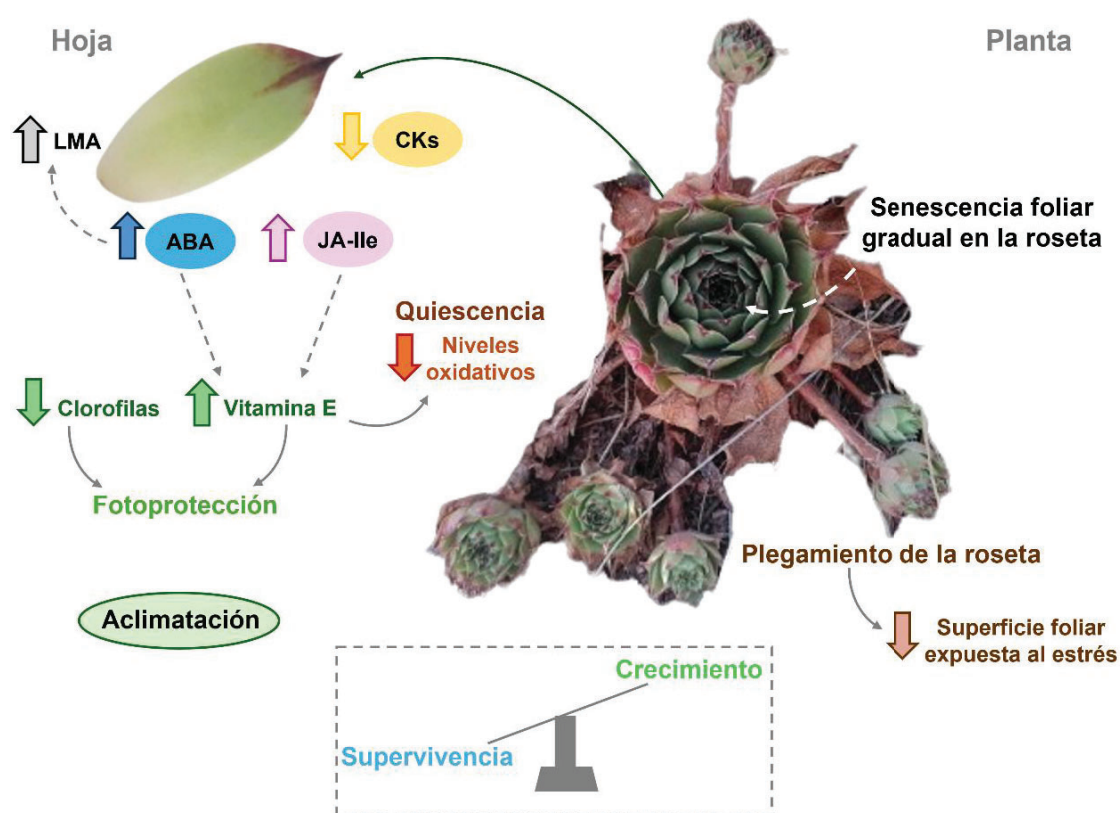


Figura 6. Mecanismos de tolerancia y de evitación del estrés severo por sequía a nivel de hoja y a nivel de planta en la especie *Sempervivum tectorum*. Ante un estrés severo esta especie inclina la balanza a favor de la supervivencia, aunque esto conlleve la detención temporal del crecimiento. ABA, ácido abscísico; CKs, citoquininas; JA-Ile, jasmonoil isoleucina; LMA, relación masa por área foliar.

En el **capítulo 4**, los olivos sometidos a estrés hídrico durante 21 días presentaron abscisión foliar, una respuesta a la sequía que no nos permitía estudiar el otro modelo. La abscisión foliar en olivos es una respuesta de protección frente a la sequía, pero comporta graves consecuencias para la fisiología y la productividad de los árboles en años venideros (Bacelar et al., 2007; Trabelsi et al., 2019). Aunque en este estudio se llevó al límite a olivos jóvenes cv. Manzanilla de tan solo 1,5 años, observamos durante el proceso algunos mecanismos de tolerancia a nivel de planta y de hoja. La retención del riego también ocasionó una parada en el crecimiento en esta especie, donde los árboles estresados no produjeron nuevas hojas, al contrario que los irrigados; siendo consistente con otros estudios realizados en olivos (Trabelsi et al., 2019). En cuanto a cambios morfológicos en las hojas, éstas comenzaron a curvarse, reduciendo así el área expuesta a transpiración. Además, el hecho de tener hojas escleróticas permite a los olivos resistir el colapso celular ante disminuciones en la turgencia, aumentando para ello la elasticidad de la pared celular (Oertli et al., 1990; Bacelar et al., 2006). Pese al control del cierre estomático que permite a los olivos mantener un potencial hídrico adecuado y soportar periodos de sequía (Torres-Ruiz et al., 2013), un estrés muy severo puede llevar al límite el estatus hídrico del olivo, como se ve en el contenido hídrico foliar medido en este capítulo y en el potencial hídrico en otros estudios (Boussadia et al., 2008; Baccari et al., 2020). No obstante, el daño causado por el estrés hídrico en olivos está asociado principalmente a una disminución en la actividad fotosintética (Tognetti et al., 2004; Guerfel et al., 2009). De hecho, estudios previos muestran que la inhibición de la fotosíntesis ocurre temprano en olivos bajo déficit hídrico severo y que la recuperación es gradual y depende del grado de estrés sufrido (Angelopoulos et al., 1996; Bacelar et al., 2006). En efecto, en nuestro estudio los árboles entraron inevitablemente en fotoinhibición tras 9 días sin aporte hídrico. Sin embargo, no fue hasta que la F_v/F_m descendió por debajo de 0,4 cuando se desprendió la primera hoja en los árboles estresados. Esto parece marcar un límite a partir del cual la abscisión foliar es inevitable, donde la vida del árbol se pone en peligro, como se muestra en algunos casos de declive en otras especies arbóreas (Poyatos et al., 2013). Este resultado concuerda con un estudio previo que muestra la recuperación tras un periodo de sequía progresivo, pero con la misma duración, en olivos de 2 años y de dos variedades distintas, Coratina y Biancolilla, donde la F_v/F_m se mantuvo por encima de 0,4 (Sofo, 2011). La fuerte fotoinhibición sufrida por los olivos, con valores de F_v/F_m cercanos a 0 al final del experimento, se vio asociada a una reducción de clorofilas y del α -tocoferol

en hojas estresadas, lo que probablemente refleja una degradación generalizada del aparato fotosintético, que fue el preludio de la abscisión foliar. Los síntomas de daño foto-oxidativo también fueron evidentes, con un aumento de la peroxidación lipídica en la lámina foliar en los árboles estresados en comparación con los árboles irrigados. En definitiva, bajo un estrés tan severo, los mecanismos de tolerancia ampliamente descritos en el olivo se ven superados (Baccari et al., 2020). En este caso, la disminución de clorofilas es indicativa de daño foto-oxidativo y no de fotoprotección, como así se muestra también con el aumento de la peroxidación lipídica y la disminución antioxidante, característica de una sensibilidad al estrés por sequía (**Figura 7**).

Estrés hídrico severo

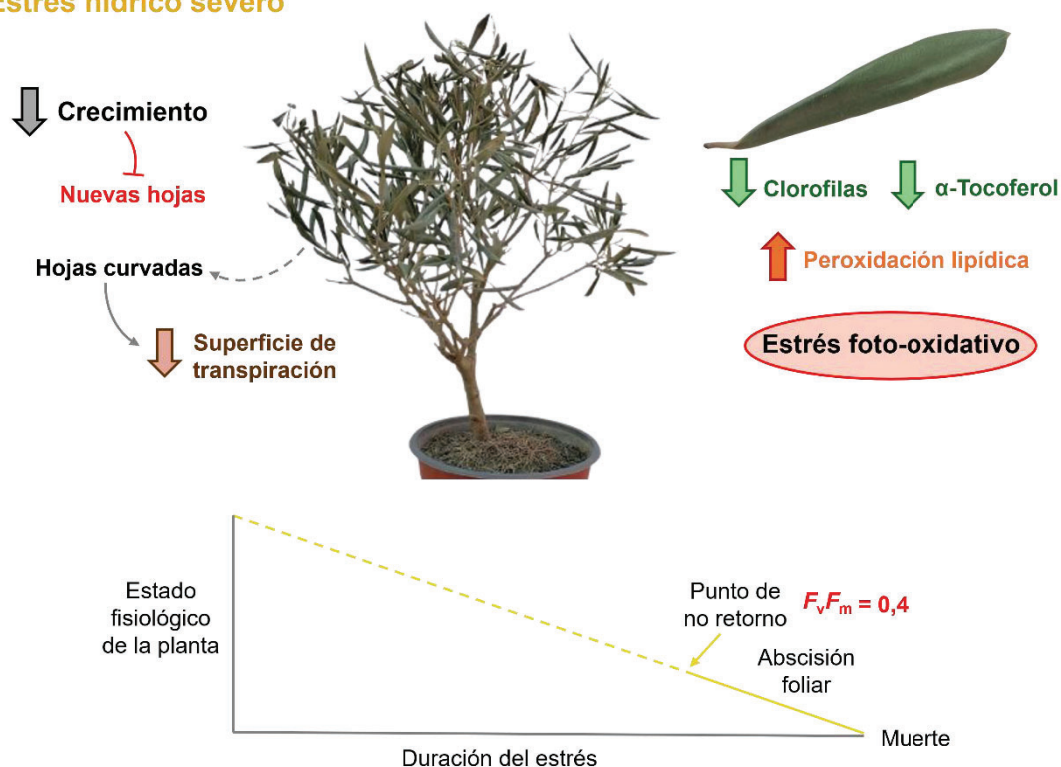


Figura 7. Estrategias de tolerancia al estrés hídrico severo en *Olea europaea* L. y mecanismos que se ven superados tras 21 días de estrés, con una pérdida de clorofilas, vitamina E y una marcada peroxidación lipídica que conlleva un estrés foto-oxidativo en hojas. Se muestra el límite fisiológico a partir del cual ocurre la abscisión foliar.

2. Relación entre aclimatación, senescencia y abscisión en plantas

La aclimatación de una especie a un determinado estrés abarca respuestas fisiológicas que varían dependiendo del grado de estrés, pudiendo incluso dar lugar a procesos de senescencia y abscisión foliar. De esta manera, la senescencia y la abscisión foliar no dejan de ser respuestas de aclimatación al estrés, ya que a través de ellas en muchos casos se logra la supervivencia de la planta (Munné-Bosch & Alegre, 2004; Schippers et al., 2015). A lo largo de esta tesis se han descrito respuestas de aclimatación a la sequía incluyendo aclimatación, senescencia y abscisión foliares, donde estos procesos no ocurren en todos los capítulos de esta tesis. Así, el proceso de senescencia foliar gradual en la roseta fue evidente en *S. tectorum*, mientras que en olivo se dio un proceso de abscisión foliar en ausencia de senescencia. La transición de una respuesta a otra depende en gran medida de la homeostasis del estado redox y del balance de las ROS. Dado que el cloroplasto es el orgánulo celular donde ocurre la fotosíntesis y donde se sintetizan compuestos esenciales del metabolismo de la planta, participa en la detección y aclimatación a estreses ambientales mediante la señalización retrógrada al núcleo (Fernández & Strand, 2008; Foyer, 2018), y además es la diana de muchos procesos de aclimatación celular, incluyendo su diferenciación a gerontoplasto y su desintegración a medida que progresa la senescencia foliar (Crosatti et al., 2013). La integridad de los cloroplastos durante la aclimatación a estreses abióticos parece recaer en los niveles de tres componentes clave relacionados entre sí: las clorofilas, el estrés oxidativo, y las fitohormonas, que regulan el alcance de los dos anteriores.

Un mecanismo común en los tres procesos es la reducción de las clorofilas. Esta respuesta la encontramos en todos los capítulos, pero con un resultado fisiológico diferencial para cada caso. Durante la aclimatación inicial a un estrés, una disminución en el contenido de estos pigmentos captadores de luz permite disminuir la tasa de luz absorbida y por tanto minimizar el posible daño por fotoinhibición (Kyparissis et al., 1995; Munné-Bosch & Alegre, 2000; Anjum et al., 2011). Esta respuesta representa un mecanismo de fotoprotección, y lo observamos en *S. tectorum* en el **capítulo 1**, donde la integridad del PSII se mantiene pese a una reducción de las clorofilas en la semana 10 del experimento. Esta reducción inicial de clorofilas puede deberse a una disminución en su síntesis (Makhmudov, 1983), o bien a una degradación que puede ser inducida por las ROS (Zhang et al., 2022), e

indica el comienzo del proceso de senescencia foliar, aún reversible (Lim et al., 2007). Cuando el estrés es severo, el aumento de las ROS provoca una mayor degradación de clorofilas, entrando en fases más avanzadas de la senescencia foliar, como se observa gradualmente en la roseta en esta especie tras un estrés hídrico prolongado en el **capítulo 3**. En este caso, la reducción de clorofilas ocurre junto con una fotoinhibición del PSII, mostrando síntomas de senescencia foliar inducida por sequía en las hojas muestreadas situadas en los verticilos del medio de la roseta. Sin embargo, el proceso de senescencia foliar llegó a la fase terminal únicamente en las hojas más externas, mientras que las hojas restantes de los verticilos intermedios recuperaron completamente el estatus hídrico y fotosintético, siendo por tanto una fotoinhibición transitoria. Este control espacial de los parámetros fotosintéticos es esencial durante la senescencia y se ha descrito en otras plantas con crecimiento en roseta como en *A. thaliana* (Wingler et al., 2004). Previos indicios de esta fotoinhibición aparecen en la semana 10 del estudio, con una disminución de la relación clorofila a/b (**capítulo 1**). Debido a que solo la clorofila a se encuentra en los centros de reacción de los fotosistemas mientras que la clorofila a y b están presentes en los complejos captadores de luz (Croce & van Amerongen, 2011), esta disminución indica que hay una reducción de los centros de reacción y por lo tanto afecta a la producción de la energía química, como se ha señalado previamente (Juvany et al., 2013). Este mismo patrón de reducción de los centros de reacción también se observa durante el verano en la respuesta de aclimatación a la sequía estacional severa de la población natural de *S. tectorum* estudiada en el **capítulo 2**, donde la marcada reducción de clorofilas es debida principalmente a una disminución de la clorofila a. Asimismo, en las tres poblaciones naturales estudiadas se da una reducción de clorofilas durante el verano acompañada de una fotoinhibición transitoria, para después recuperar los contenidos de clorofila en el otoño en las hojas intermedias de la roseta (**capítulo 3**), estrategia protectora que muestra una aclimatación exitosa a la sequía en esta especie. La degradación de clorofilas permitiría la removilización de nitrógeno a otras partes de la planta, como a las hojas jóvenes situadas en el interior de la roseta (Hörtensteiner & Feller, 2002). Además, las hojas viejas con senescencia irreversible no se desprendieron de la roseta, por lo que permiten mantener una fuente de nutrientes para el resto de la planta durante largos periodos de tiempo. La ausencia de abscisión foliar tras la senescencia permitiría mantener un reservorio de nutrientes para los tejidos supervivientes y asegurar la recuperación del estrés a nivel de

planta, sugiriendo una estrategia adaptativa en una especie que crece en hábitats rocosos pobres en nutrientes (Praeger, 1932). Por último, la degradación de clorofilas puede ser preludio en ocasiones de la abscisión foliar, como se muestra en *O. europaea* en el **capítulo 4**, donde la reducción de clorofilas está asociada a una fotoinhibición severa del PSII que es irreversible. Así, existe una relación entre la degradación de clorofilas y la formación de la capa de abscisión, siendo dependiente de especie (Primka & Smith, 2019), y se ha mostrado la implicación de la degradación de clorofilas en la inducción de la producción de etileno, hormona reguladora de la abscisión foliar (Ito et al., 2022). Esto se demostró en plantas de álamo transformadas que llevaban el gen *AtSGR* inducible por dexametasona, mediante el cual codificaban la enzima Mg-desquelatasa que cataliza el paso de Chl a a feofitina a. Esta relación entre la degradación de clorofilas y la producción de etileno durante la abscisión podría explicarse en parte porque los catabolitos de clorofilas producen ROS y se sabe que el estrés oxidativo induce la producción de etileno y amplifica su señalización (Xia et al., 2015; Zhu et al., 2018).

Un desbalance en la homeostasis del estado redox celular parece ser el factor determinante que distingue entre respuestas de aclimatación transitorias o irreversibles a nivel de hoja que terminan con la senescencia foliar definitiva o la abscisión foliar. La aclimatación a un estrés a nivel foliar podría conseguirse gracias a la señalización redox ejercida por las ROS, que en niveles basales actúan como moléculas señalizadoras retrógradas al núcleo, activando genes de respuesta al estrés (Mittler, 2017); mientras que en niveles citotóxicos podrían generar estrés oxidativo induciendo la senescencia foliar, como respuesta de muerte celular programada (Gill & Tuteja, 2010). Sin embargo, el estrés oxidativo también genera oxilipinas, las cuales pueden ejercer un rol protector al activar respuestas al estrés mediante la señalización retrógrada al núcleo (Farmer & Mueller, 2013). Un rasgo diferencial entre la tolerancia al estrés severo en *S. tectorum* y el inicio de la abscisión foliar en *O. europaea* es precisamente la ausencia o presencia de estrés oxidativo (Zimmermann & Zentgraf, 2005). Esto es porque la carga oxidativa controla la señalización al estrés y media el proceso de senescencia foliar (Bhattacharjee, 2005), por lo que la producción de ROS debe ser transitoria y controlada de manera eficiente por la maquinaria antioxidante de los cloroplastos, o de lo contrario se inducirá rápidamente la fase terminal (Foyer, 2018). Así, las hojas de *O. europaea* sufren una peroxidación lipídica que no puede

ser contrarrestada por este antioxidante lipofílico, ya que los niveles de α -tocoferol se ven reducidos en los árboles estresados (**capítulo 4**), pero no muestran síntomas de senescencia foliar inducida por sequía, como sí ocurre en otros estudios (Munné-Bosch et al., 2001; Prochazkova et al., 2001). En cambio, este estrés oxidativo desencadena la acumulación foliar de oxilipinas como los jasmonatos, cuya implicación en la señalización retrógrada mediando respuestas al estrés se ha documentado previamente (Howe et al., 2018; Muñoz & Munné-Bosch, 2020). De manera específica, esta acumulación de jasmonatos bioactivos ocurre en el peciolo, donde se encuentra la zona de abscisión, aunque ocurre tanto en hojas caídas como en hojas que permanecen en el árbol en los olivos estresados. En el caso de *S. tectorum*, esta especie dispone de mecanismos de tipo quiescente que le permite mantener unos niveles oxidativos bajos a través de la función antioxidante de la vitamina E durante largos periodos de estrés abiótico (**capítulos 1 y 3**). Pese a la disminución en las clorofilas y la leve fotoinhibición inducida por el estrés severo y prolongado en condiciones controladas, mantener bajo control el estrés oxidativo durante tanto tiempo fue lo que limitó el proceso de senescencia, ya que un aumento descontrolado del mismo conllevaría la degradación de componentes celulares y finalmente la muerte celular y del órgano entero. Estos resultados muestran que también en especies tolerantes al estrés los mecanismos fotoprotectores y antioxidantes están implicados en el mantenimiento de la función del cloroplasto durante la aclimatación a la sequía, en etapas iniciales de la senescencia y defoliación (Encinas-Valero et al., 2022), y durante la progresión de ésta (García-Plazaola et al., 2003); pero no en su fase terminal (Prochazkova et al., 2001; Munné-Bosch & Peñuelas, 2003; Juvany et al., 2012).

La concurrencia de la degradación de clorofilas y el aumento de las ROS durante las respuestas de aclimatación al estrés severo apunta a un mecanismo regulador común, cuya coordinación precisa permita adecuar la respuesta a la situación de estrés. Este tercer componente son las fitohormonas, las cuales desempeñan roles fundamentales en la aclimatación a estreses abióticos (Davies, 2010), mostrando la relevancia de la interacción entre la señalización redox y hormonal (Considine & Foyer, 2014), modulando no solo la fotosíntesis sino también la fotoprotección ante un estrés (Müller & Munné-Bosch, 2021), así como controlando la degradación de las clorofilas (Kocsy et al., 2013). Además de su rol en la preservación del estado hídrico de la planta durante un estrés por sequía, el aumento sostenido del ABA observado en las plantas de *S. tectorum* del **capítulo 1** podría promover

una respuesta de fotoprotección ante el déficit hídrico y nutricional. El papel del ABA en la fotoprotección se ha demostrado con su implicación en la regulación de genes que codifican para la violaxantina de-epoxidasa del ciclo de las xantofilas que confieren tolerancia al estrés por sequía (Guan et al., 2015), pero también en la regulación de genes de la biosíntesis de la vitamina E (El Kayal et al., 2006; Chaudhary & Khurana, 2009). Así, un aumento de ABA podría modular la composición y contenido de este antioxidante, incrementando los niveles de α -tocoferol en las plantas estresadas para controlar el balance de las ROS. La disminución progresiva de las clorofilas también podría estar relacionada con este aumento del ABA, ya que se ha descrito el papel de esta hormona en la regulación de la degradación de las clorofilas a través del factor de transcripción NAP (Yang et al., 2014), y por lo tanto en la senescencia foliar (Takasaki et al., 2015). Aunque la disminución de las clorofilas comienza antes que el aumento del ABA, como se ha visto en otras especies entrando en senescencia foliar (Zhang et al., 2020); se sabe igualmente que el ABA acelera el proceso de senescencia foliar en plantas estresadas hídricamente (Yang et al., 2003), lo que podría explicar la consiguiente disminución en las clorofilas. Sin embargo, durante el estrés prolongado los niveles de ABA disminuyen (**capítulo 3**), pero la fotoprotección mediada por la vitamina E continúa y la senescencia foliar es finalmente revertida durante la recuperación hídrica, sugiriendo así un papel fotoprotector en la aclimatación a la sequía en esta especie. Este resultado es consistente con lo hallado en dos de las tres poblaciones naturales de *S. tectorum* en los **capítulos 2 y 3**, en las cuales se observa un pico de ABA durante el verano junto con un aumento del α -tocoferol que prosigue hasta el otoño, mostrando una aclimatación a la sequía a nivel foliar en esta especie. En el caso de los olivos, el estrés fue tan severo que ya no encontramos una señalización por ABA a los 21 días (**capítulo 4**), la cual debió producirse antes, de acuerdo con estudios anteriores que muestran la implicación de esta hormona en respuestas tempranas al estrés hídrico (Harb et al., 2010). En cambio, sí que hay mayores niveles endógenos de SA en los olivos estresados y se ha demostrado la implicación de esta hormona en la aclimatación a estreses abióticos severos (Munné-Bosch & Peñuelas, 2003; Khan et al., 2015; Sharma et al., 2017). El contenido hídrico en hoja tan bajo y la fotoinhibición severa del PSII estarían mostrando niveles fisiológicos críticos para la vida de estos olivos, los cuales podrían haber entrado en fallo hidráulico. La abscisión foliar desencadenada tras una agitación mecánica solo en los árboles estresados por sequía muestra que este proceso fue inducido por la sequía, pero no hallamos ninguna

característica diferencial entre hojas caídas y no caídas. Esto podría explicarse por un condicionamiento de la zona de abscisión previo a la ejecución en sí del mecanismo, y en el cual los jasmonatos parecen estar implicados. Dada la implicación de los jasmonatos en esta y otras de las respuestas de aclimatación al estrés severo analizadas en esta tesis, se discutirá profundamente en el siguiente apartado. Todas estas respuestas de aclimatación diferenciales están relacionadas a través de los mecanismos de señalización hormonal y su coordinación con el estado redox (**Figura 8**). Además, los resultados muestran la importancia de la severidad del estrés y las respuestas a nivel de planta entera para la transición de un proceso a otro.

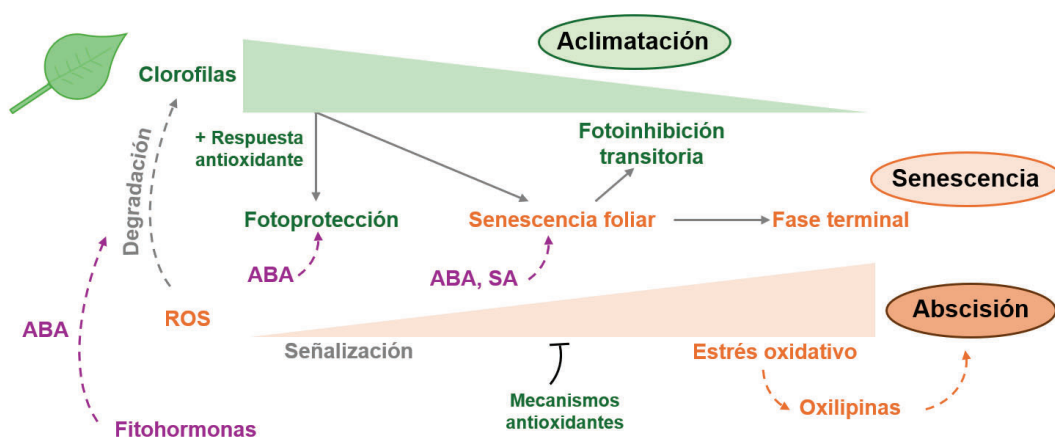


Figura 8. Relación entre los procesos de aclimatación, senescencia y abscisión foliar en plantas. Implicación de las clorofilas, las ROS y las fitohormonas en la coordinación de las respuestas. ABA, ácido abscísico; SA, ácido salicílico.

3. Implicación de los jasmonatos en las respuestas al estrés abiótico severo

La implicación de los jasmonatos en las respuestas de tolerancia a estreses abióticos como la sequía ha sido previamente documentada en plantas modelo como *Arabidopsis* (Munemasa et al., 2007; Grebner et al., 2013) arroz (Seo et al., 2011; Zhang et al., 2023) o tomate (Sánchez-Romera et al., 2014; Fresno & Munné-Bosch, 2023). Ahora bien, se desconoce este papel en plantas no modelo que sean tolerantes al estrés, así como el rol de los jasmonatos en situaciones límite de estrés severo. En esta tesis se describen diferentes respuestas a la sequía severa en las cuales están implicados los jasmonatos, como la

aclimatación a un déficit hídrico y nutricional en plantas de *S. tectorum* (**capítulo 1**), o el acondicionamiento de la abscisión foliar inducida por sequía en *O. europaea* (**capítulo 4**). Es relevante destacar que, en ambas especies y culminando en respuestas fisiológicas muy distintas, la JA-Ile fue la forma de jasmonatos acumulada en las hojas de las plantas estresadas, sugiriendo que fue la molécula bioactiva de la vía de señalización de jasmonatos involucrada en ambos casos. Estos resultados apoyan otros estudios en plantas modelo que muestran que la forma más bioactiva de los jasmonatos es la JA-Ile (Fonseca et al., 2009; Mahmud et al., 2022).

La acumulación de JA-Ile endógena en las plantas de *S. tectorum* estresadas en el **capítulo 1**, a la vez que disminuyen los niveles de sus precursores OPDA y JA, muestra una alteración del metabolismo de los jasmonatos favoreciendo la síntesis de esta forma bioactiva en condiciones de déficit hídrico y privación de nutrientes. Otros estudios avalan que estas deficiencias inducen la vía de los jasmonatos, pero en caso de estrés hídrico o nutricional aplicados solos y no en combinación de estreses (Seo et al., 2011; Khan et al., 2016). Por otro lado, el aumento de JA-Ile que se inicia en la semana 4 del estrés ocurre simultáneamente al de ABA, hormona con la que se correlaciona positivamente, sugiriendo una interacción hormonal entre ambas en la modulación de la respuesta de aclimatación al estrés observada en esta especie. Estos resultados en condiciones controladas se ven corroborados con el estudio de la aclimatación a la sequía en condiciones naturales, en la población de *S. tectorum* investigada en el **capítulo 2**. Durante los meses de verano de 2023, la escasez de precipitaciones cursó con varias olas de calor intensas, lo que llevó a calificar este año como el segundo más cálido desde 1950 en Cataluña (Servei Meteorològic de Catalunya, 2024). En particular, entre el 18 y el 25 de agosto de 2023 se produjo una de las olas de calor más intensas registradas hasta la fecha en el territorio, coincidiendo con el muestreo de verano que realizamos el día 21 de agosto y donde se registraron temperaturas elevadas con 43°C de media al mediodía solar. Una vez más, estos datos muestran que, en condiciones naturales, la sequía puede cursar con otros estreses abióticos, como un aumento de las temperaturas, y la combinación de estos estreses desencadena una respuesta grave y, en ocasiones, diferencial en la planta (Zandalinas et al., 2017). La severidad del estrés abiótico encontrada también en condiciones naturales permitió equiparar la respuesta fisiológica de ambos capítulos. En efecto, el evento de sequía

estacional promovió igualmente una alteración del metabolismo de los jasmonatos en las hojas, con disminuciones de los contenidos endógenos de OPDA y JA, y un aumento de JA-Ile en el verano. Esta acumulación de JA-Ile ocurrió de nuevo en paralelo al aumento de ABA, reforzando la hipótesis de que ambas hormonas participan en la aclimatación al estrés abiótico en esta especie. En especies con metabolismo C3 en hábitat natural se ha descrito un aumento de JA durante episodios estivales de estrés por sequía, como es el caso de la planta subalpina *Saxifraga longifolia* (Cotado et al., 2018); pero en otros casos se ha descrito un aumento de JA-Ile, como en especies del género *Scabiosa* (Morales & Munné-Bosch, 2024). En cambio, en especies con metabolismo CAM es la primera vez que se encuentra una respuesta de aclimatación a la sequía posiblemente mediada por JA-Ile. Sin embargo, un estudio en la especie *Mesembryanthemum crystallinum* que induce el cambio C3-CAM en condiciones de salinidad, muestra la disminución de los niveles de JA y de JA-Ile durante el cierre estomático, que parece modular el ABA de forma independiente (Wakamatsu et al., 2021). En relación, un análisis comparativo reciente entre la especie CAM obligada *Kalanchoë fedtschenkoi* y las plantas C3 *A. thaliana* y *Populus deltoides* revela cambios transcripcionales comunes implicados en la tolerancia al estrés por sequía, entre los que no se incluye la señalización por JA, presente de manera única en las especies C3 (Hu et al., 2022). En cambio, otro estudio en la especie *Acanthostachys pticairnioides* muestra un aumento de JA y de ABA durante la supresión prolongada del riego en condiciones controladas que cursa con metabolismo CAM (Batista et al., 2024). La hipótesis anteriormente mencionada de la posible supresión del metabolismo CAM en *S. tectorum* durante sequías prolongadas requiere no obstante de experimentos adicionales que lo demuestren. Por lo tanto, de los resultados obtenidos no podemos afirmar que el metabolismo CAM guarde una relación con la señalización de los jasmonatos, pero sí sugerimos que el aumento de JA-Ile observado en esta especie en los **capítulos 1 y 2** refleja una respuesta de tolerancia al estrés por sequía severa.

En las hojas de los olivos estresados hídricamente en el **capítulo 4** también se produce una acumulación de JA-Ile endógena, pero en este caso solo se produce una disminución de OPDA, mientras que el JA también aumenta, respecto a las hojas de olivos irrigados. El estatus fisiológico de los olivos estresados muestra evidencias de senescencia foliar, y los jasmonatos están implicados en la regulación de la senescencia (Ueda & Kato,

1980; Shan et al., 2011). De hecho, se ha demostrado que el JA promueve *degreening* en las hojas mediando la degradación de clorofilas a través de la regulación de sus genes catabólicos (Zhu et al., 2015). No obstante, mediante el muestreo basipétalo realizado, donde separamos la lámina foliar en las secciones apical, medio y basal, y el peciolo en dos partes, peciolo 1 y peciolo 2, pudimos encontrar gradientes bioquímicos a lo largo de la hoja y una diferenciación fisiológica entre la lámina foliar y el peciolo. Además, permitió descubrir respuestas diferenciales en el peciolo 2, donde se encuentra localizada la zona de abscisión foliar. De esta manera, únicamente la JA-Ile aumenta específicamente en el peciolo 2 de hojas estresadas, sugiriendo de nuevo que es la forma bioactiva de los jasmonatos también en esta especie. Además, la reducción de la relación OPDA/LOOH en el peciolo de las hojas estresadas sugiere que la formación *de novo* de OPDA a partir de la peroxidación lipídica se encuentra bloqueada, mientras que los aumentos de las relaciones JA/OPDA y JA-Ile/JA muestran que la vía de señalización está dirigida hacia la formación de JA-Ile, sugiriendo la activación de las enzimas OPR3 y JAR1, respectivamente (Stintzi & Browse, 2000; Staswick & Tiryaki, 2004). En este estudio fue relevante considerar el hecho de que la lámina foliar y el peciolo son órganos de la planta con diferente número y composición de cloroplastos y estructuras fotosintéticas (Sun et al., 2021). Dado que la mayor parte de la ruta biosintética de los jasmonatos ocurre en los cloroplastos, al expresar los niveles de cada forma por unidad de clorofila, encontramos cambios significativos en los gradientes foliares. El cambio más importante en relación con los jasmonatos fue que se invirtió el gradiente decreciente de JA-Ile, dando lugar a un gradiente creciente hacia el peciolo 2 de JA-Ile/Chl en hojas de los olivos estresados. Este resultado del gradiente se desmarca de una senescencia foliar generalizada y podría indicar una señalización por parte de esta hormona en la zona de abscisión foliar. Sin embargo, al no observar diferencias significativas en el grado de estrés oxidativo, ni en contenidos antioxidantes u hormonales entre hojas caídas y no caídas de los árboles estresados, todo parece indicar que ninguna de estas moléculas ejecutó como tal el proceso de abscisión foliar. No obstante, el acondicionamiento de la zona de abscisión foliar mediante la acumulación de oxilipinas producto del estrés foto-oxidativo y la posible señalización hormonal por parte de JA-Ile parece ser un requisito previo para desencadenar el proceso. La relación entre los jasmonatos y el etileno, la hormona inductora de la abscisión foliar (Jackson & Osborn, 1970), está extensamente descrita, incluso en respuestas de tolerancia a la sequía (Kazan, 2015). Los factores de respuesta al etileno (ERFs) están

implicados en la regulación de la abscisión foliar de las plantas de *Cassava* (Liao et al., 2016), y de entre ellos, se ha descrito que el ERF1 puede estar tanto regulado por el etileno como por los jasmonatos (Lorenzo et al., 2003; Cheng et al., 2013). Además, se ha demostrado que la aplicación exógena con etileno induce genes en la AZ relacionados con las ROS y el estrés oxidativo (Goldental-Cohen et al., 2017), y dado que los jasmonatos derivan de la peroxidación lipídica, podrían estar implicados, como así vemos en nuestro estudio. Aun así, será necesario investigar en el futuro la interacción entre ambas hormonas en este modelo para entender mejor el proceso de abscisión foliar, cuyo impacto negativo en la productividad de los árboles es crítico para el sector oleico y agro biotecnológico.

Por lo tanto, los jasmonatos están implicados en respuestas de aclimatación al estrés abiótico severo, y en todos estos casos parece ser a través de la hormona bioactiva JA-Ile (Figura 9). De manera que el estudio de los jasmonatos en poblaciones naturales y en especies no modelo tolerantes al estrés ayuda a elucidar mejor su papel, descifrar las formas bioactivas especie específicas y contribuir en el conocimiento sobre las respuestas de aclimatación al estrés abiótico severo en plantas.

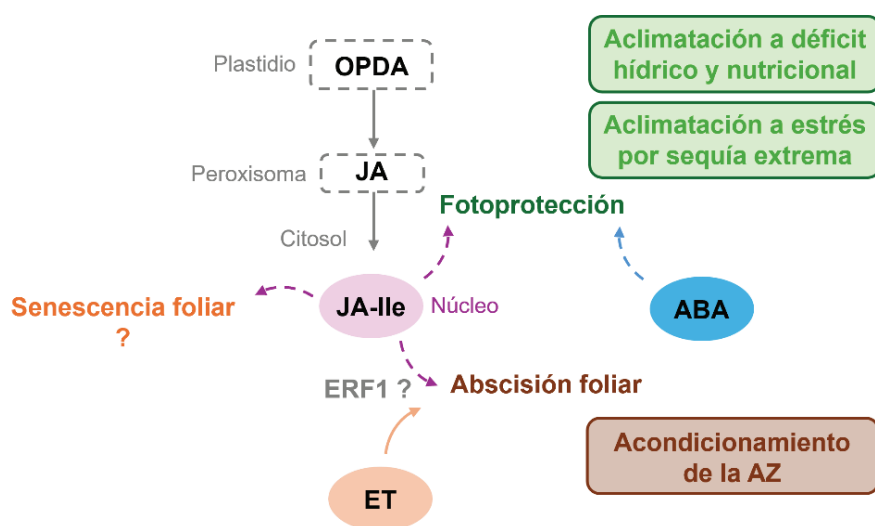


Figura 9. Respuestas de aclimatación al estrés abiótico severo en las que está implicada la JA-Ile, incluyendo la fotoprotección y el acondicionamiento de la abscisión foliar, proceso que podría estar regulando junto con el etileno a través de los factores de respuesta al etileno (ERFs). ABA, ácido abscísico; AZ, zona de abscisión; ERF1, factor de respuesta al etileno 1; ET, etileno; JA, ácido jasmónico; JA-Ile, jasmonoil-isoleucina; OPDA, ácido 12-oxo-fitodienoico.

4. Relación entre jasmonatos, ácido abscísico y vitamina E para la fotoprotección en plantas

La capacidad de ejercer señalización retrógrada al núcleo permite que los jasmonatos puedan activar genes de respuesta al estrés a través de la unión del factor de transcripción MYC2 a elementos de respuesta a los jasmonatos (JRE), modulando así la aclimatación de las plantas al estrés (Muñoz & Munné-Bosch, 2020). Entre los genes que contienen JRE se encuentran los de biosíntesis de la vitamina E, como se ha visto en los genes *VTE1* y *VTE4* en *A. thaliana* (Ma et al., 2020; Casadesús et al., 2021), y en esta tesis en el gen *HPPD* en *K. fedtschenkoi* en el **capítulo 1**. La implicación de los jasmonatos en la inducción de la biosíntesis de la vitamina E se ha propuesto y demostrado en otros estudios (Sandorf & Holländer-Czytko, 2002; Casadesús et al., 2021), de manera que el aumento previo de JA-Ile pudo ejercer una función señalizadora promoviendo la acumulación de α -tocoferol que resultó esencial para la fotoprotección durante el estrés abiótico en *S. tectorum* (Munné-Bosch, 2007). Así, el análisis realizado muestra una correlación positiva entre la JA-Ile y el α -tocoferol por unidad de clorofila, pero no con el precursor γ -tocoferol. Además, la relación de los jasmonatos y la vitamina E resulta ser bidireccional, ya que el α -tocoferol modula la acumulación de jasmonatos mediante la detoxificación de las ROS y el control de la propagación de la peroxidación lipídica, cuyos productos son las oxilipinas (Muñoz & Munné-Bosch, 2019). En otras especies en los que la forma activa es el JA, se da una correlación negativa entre la vitamina E y el OPDA (Morales et al., 2015; Casadesús et al., 2021). Sin embargo, en el **capítulo 1** observamos una correlación negativa entre el α -tocoferol/chl y el JA, precursor directo de la JA-Ile, lo cual tiene sentido con los estudios anteriores, en los que la vitamina E parece modular los niveles del precursor de la forma activa de los jasmonatos. Con la prolongación del estrés abiótico, el aumento de vitamina E ejerce una función fotoprotectora disminuyendo los niveles oxidativos y por ende también la vía de los jasmonatos, tal y como observamos en el **capítulo 3**. La recuperación hídrica de las plantas estresadas permite una reanudación del metabolismo, con niveles oxidativos elevados y un aumento de JA. La acumulación de jasmonatos durante una recuperación hídrica repentina, y no gradual como ocurriría en la naturaleza, se ha visto en otras especies como *Cistus albidus* (Jubany-Marí et al., 2010), y puede ser causado por un estrés de choque que produce cambios bruscos en las relaciones hídricas de la planta. No obstante, en dos de las

poblaciones de *S. tectorum* encontramos un aumento de OPDA y JA en los muestreos del otoño, mostrando una reanudación del metabolismo de jasmonatos también en condiciones naturales que podría guardar relación con la reactivación de las respuestas de defensa frente a estreses bióticos una vez ha terminado el estrés abiótico (Cotado & Munné-Bosch, 2020).

Por otra parte, también se ha propuesto el papel del ABA en la regulación de la biosíntesis de la vitamina E (El Kayal et al., 2006; Munné-Bosch et al., 2009; Siles et al., 2018), donde esta hormona ejercería una señalización retrógrada al núcleo activando los genes de biosíntesis de la vitamina E mediante la unión a elementos de respuesta (ABRE), encontrados en los genes *HPPD*, *MPBQ-MT* y *VTE4* en *Oryza sativa* (Chaudhary & Khurana, 2009), y en esta tesis también en el gen *VTE4* en *K. fedtschenkoi* (**capítulo 1**). Este gen codifica para la tocoferol metiltransferasa, enzima encargada de sintetizar α -tocoferol a partir de γ -tocoferol, y el ABA correlacionó positivamente con el primero y negativamente con el segundo en este estudio. Por ello, el aumento de ABA podría estar ejerciendo un rol fotoprotector, activando la biosíntesis de α -tocoferol que se acumula después en las plantas estresadas. Por otro lado, la degradación de clorofilas podría tener relación con la síntesis de vitamina E a través de la vía del reciclaje del fitol (Rise et al., 1989). Se ha demostrado durante el desarrollo de cerezas, que transcurre con una pérdida de clorofilas en el fruto, que el ABA exógeno promueve la transcripción de las enzimas fitol quinasa y fitil fosfato quinasa, promoviendo el aumento de vitamina E (Muñoz et al., 2024). Esta implicación requeriría validarse para la fotoprotección en hojas durante la aclimatación a un estrés abiótico. La relación entre el ABA, que es la hormona por excelencia que modula las respuestas al estrés abiótico, y la vitamina E, que ejerce una función antioxidante y fotoprotectora ante el mismo tipo de estrés, no es por lo tanto una novedad, sino un resultado en esta tesis que sustenta estudios anteriores realizados en otras especies (Cela et al., 2009; Morales et al., 2015).

Lo que sí resulta relevante es la posible interacción entre la señalización de JA-Ile y ABA en la modulación del contenido y composición de la vitamina E en hojas ante un estrés abiótico severo. Esta respuesta fotoprotectora no solo la vemos en el **capítulo 1** en condiciones controladas, sino también en condiciones naturales en el **capítulo 3**, en el que las plantas de *S. tectorum* de la población 1 que sufren estrés hídrico durante la sequía estival tienen aumentos consiguientes de ABA, de JA-Ile y de α -tocoferol en el verano. La necesidad

de esta interacción hormonal para desencadenar la fotoprotección mediada por vitamina E se ve respaldada en las sinergias entre estos dos grupos hormonales observadas en otras respuestas fisiológicas a la limitación hídrica (De Ollas & Dodd, 2016). En primer lugar, la señalización de ABA y de JAs confluyen en el cierre estomático en respuesta a la sequía (Savchenko et al., 2014), lo cual evidencia la relación existente entre ambas hormonas en las respuestas al estrés abiótico. Además, la interacción entre ABA y JA modula su biosíntesis y el metabolismo antioxidante ante déficit hídrico (Brossa et al., 2011). De manera que el ABA y el JA parecen influir en su biosíntesis mutuamente (Bandurska et al., 2003; De Ollas et al., 2013), e incluso se ha demostrado la implicación de los receptores de ABA en la señalización de jasmonatos mediante la regulación de los componentes COI o MYC2, estableciendo así una conexión entre la señalización mediada por ambas hormonas (Yu et al., 2021). La correlación positiva entre ABA y JA-Ile mostrada en el **capítulo 1** concuerda con la idea de una regulación génica entre ambas hormonas. Además, se ha demostrado en *A. thaliana* que la acumulación de JA-Ile es necesaria para la acumulación consistente de ABA en raíces bajo estrés hídrico (De Ollas et al., 2015), y que la exportación de jasmonatos desde el sistema radicular mejora la acumulación de ABA en las hojas inducida por el déficit hídrico del suelo (De Ollas et al., 2018). Aunque son necesarios futuros estudios que confirmen estos resultados a nivel molecular y genético, proponemos que el ABA y la JA-Ile podrían modular de forma sinérgica la acumulación de vitamina E en hojas ante déficit hídrico, promoviendo así la fotoprotección en plantas.

5. Resistencia al estrés extremo durante la reproducción clonal

Las plantas clonales son aquellas con capacidad de producir descendencia genéticamente idéntica mediante el crecimiento vegetativo, a través de órganos horizontales aéreos como los estolones o subterráneos como los rizomas. Cada descendiente clonal recibe el nombre de ramet y, aunque se trata de una unidad potencialmente independiente, a menudo permanece unido al progenitor a través del órgano conector durante largos periodos de tiempo, incluso después de enraizar y establecerse (Klimeš et al., 1997). Esto permite formar sistemas clonales formados por un único genet o unidad genética con los ramets conectados entre sí y cubriendo grandes extensiones, favoreciendo un crecimiento rápido de la planta y la colonización de nuevos hábitats. La conexión entre ramets permite la traslocación de recursos entre ellos, como

agua, nutrientes y fotoasimilados, y se rige por el principio de la fuente-sumidero, es decir, por las diferencias en la producción y demanda de recursos entre los distintos ramets (Pitelka & Asmund, 1985). Esto resulta en la integración fisiológica del clon, en el cual se da una división de tareas entre los distintos ramets que beneficia a todo el genet (Stuefer, 1998; Dong et al., 2015). Cuando la división de tareas es inducida ambientalmente conduce a la especialización en la captación de recursos, de manera que cada ramet tendrá un cometido en función de los recursos disponibles en su microhábitat. En cambio, la división de tareas programada en función del desarrollo o la edad del ramet restringe las tareas por ramet y aumenta así la eficiencia dentro del clon.

De esta manera, las especies con reproducción clonal cuentan con ventajas adaptativas en la respuesta al estrés, como son la integración clonal de los recursos y de la información ambiental, la explotación de nuevos recursos en zonas más favorables, o el almacenamiento de estos recursos en diferentes órganos o ramets (de Kroon & van Groenendael, 1997; Chen et al., 2010; Wang et al., 2021). Dado que en esta tesis se exploraron las respuestas de aclimatación al estrés severo en una especie clonal (*S. tectorum*), también evaluamos el impacto de un estrés por sequía en la reproducción clonal (**capítulo 2**), así como los costes fisiológicos del crecimiento clonal en la tolerancia a un estrés severo (**capítulo 3**).

Así, la tolerancia extrema a la sequía de *S. tectorum* viene acompañada de la capacidad de la roseta parental de mantener a la descendencia clonal viva colgando de los estolones y sin enraizar durante periodos de tiempo prolongados. Esta respuesta la observamos tanto en las plantas sometidas a 7 meses sin agua, como en las plantas de las poblaciones naturales, donde las rosetas parentales sostienen a través de estolones a los nuevos ramets durante algunos meses hasta que pueden enraizar (**capítulo 3**). Otros estudios muestran ejemplos de cooperación entre los ramets de un mismo clon para sobrevivir a un estrés, como el apoyo por parte de ramets en hábitats favorables a ramets en situaciones estresantes (Roiloa & Retuerto, 2006; Xiao et al., 2010; Roiloa et al., 2014). La característica que los agrupa es una integración fisiológica que permite ayudar a los ramets clonales estresados, pero ¿qué ocurre cuando todo el clon, toda la planta clonal, se encuentra bajo condiciones estresantes? Esto es precisamente lo que podemos observar en nuestro estudio. Pese a que la roseta parental enraizada percibe las condiciones hídricas del

suelo, como así vemos en las reducciones en el RWC de sus hojas, sostiene a las rosetas hijas incluso durante el estrés severo, y éstas dependen al menos nutricional e hídricamente de su progenitora. Aún más, cuando las plantas se encuentran bajo un estrés moderado, con las rosetas parentales alcanzando un RWC del 53%, el daño en hoja es significativamente inferior en los ramets colgando en comparación con los ramets enraizados y sus rosetas parentales. Este resultado muestra que los ramets no enraizados colgantes tienen una mayor viabilidad de la hoja y, por lo tanto, sugiere que se encuentran en mejores condiciones fisiológicas que las rosetas parentales para poder sobrevivir. Priorizar la supervivencia de la descendencia clonal incluso en detrimento de la parental encaja con una protección de los módulos más jóvenes de la planta, como se observa en las hojas más jóvenes respecto a las viejas (Munné-Bosch & Alegre, 2004; Schippers et al., 2015); y con un transoporte de los recursos desde las rosetas viejas a las jóvenes, como se ha visto en otras especies clonales (Jónsdóttir & Callaghan, 1989; Huber et al., 2004). El hecho de que la roseta de *S. tectorum* sea monocárpica guarda una gran relevancia con esta posible priorización, así como con la organización jerárquica establecida en la planta clonal. La inversión en reproducción sexual para escapar supone un coste energético que la roseta parental no puede asumir en las condiciones de estrés tan severo en las que se encuentra (Obeso, 2002). Por otro lado, precisamente esta situación estresante podría terminar con la desecación total de la roseta parental, evitando así el único evento de reproducción sexual posible para una planta monocárpica. Queda entonces la opción de escapar del estrés a través de sus nuevos módulos o ramets colgantes, tratando de llegar a nuevos ambientes favorables fuera de la maceta. Esto podría ocurrir a través de la integración clonal, aunque no se ha demostrado en este estudio. Lo que sí se muestra es la excelente capacidad de tolerar el estrés extremo y recuperarse de esta especie, manteniendo vivos tanto la roseta parental como los ramets colgantes durante un largo estrés por sequía, por lo tanto, logrando la supervivencia de todo el genet.

No obstante, esta resistencia al estrés ocurrió junto con ajustes en la nueva producción clonal, que observamos tanto en condiciones controladas como en el hábitat natural (**capítulos 2 y 3**), y como se sustenta en otros estudios (Ye et al., 2014). Durante el estrés prolongado tan severo del invernadero, las plantas de *S. tectorum* no produjeron nuevos clones aparte de los ya existentes. En efecto, la capacidad productiva de la planta se

vio fuertemente restringida por el estrés severo, tanto a nivel de crecimiento de la roseta y de formación de nuevas hojas como a nivel de producción clonal (**capítulo 3**). Como hemos visto previamente, esta restricción en el crecimiento está asociada a la respuesta de aclimatación a la sequía en *S. tectorum* y se ve especialmente reflejada en los **capítulos 2 y 3**, donde ante un evento de sequía durante el verano no solo las rosetas parentales y las hijas ya enraizadas detienen su crecimiento, sino también en los estolones encontramos niveles bajos de zeatina, sugiriendo una detención del crecimiento a nivel de planta clonal entera. Esto se asocia con el ajuste en la nueva producción clonal durante el verano en esta población, donde no se llega a 1 ramet nuevo de media por roseta parental. La nueva producción clonal solo se mantiene activa en la población 3, que es la situada a mayor altitud, y cuyas rosetas parentales no tienen variaciones estacionales en el estatus hídrico ni fotosintético (**capítulo 3**). Además, esta población presenta un mayor número de ramets totales por planta que en las otras dos poblaciones. Una mayor clonalidad asociada a la altitud se ha descrito en diversas especies alpinas (Stamati et al., 2007; Jaafry et al., 2016), mostrando de nuevo que la clonalidad está presente en adaptaciones a ambientes extremos.

Como la época de crecimiento vegetativo de esta especie coincide con la primavera o principios del verano (Larcher et al., 2010), los ramets colgando sin enraizar permanecen unidos a la roseta parental en la época más estresante, el verano. Esta capacidad de aguante estuvo asociada a ajustes fisiológicos a diferentes niveles organizativos en la planta clonal, tanto en las rosetas parentales como en las rosetas hijas (**capítulo 3**). Las ventajas de mantener las interacciones inter-ramets en la época estresante del verano se reflejan en la mayor F_v/F_m y contenido de clorofilas en hojas en los ramets colgando de la roseta parental respecto a los ya enraizados en la población 1. La fuerte fotoinhibición experimentada en el verano por aquellos ramets enraizados muestra el riesgo de daño fotoinhibitorio asociado a un enraizamiento en una época desfavorable. El sistema radicular no está tan desarrollado como el de la roseta parental y esta adquisición de independencia progresiva le conlleva un coste, aunque es temporal porque su supervivencia no se ve afectada, como observamos en la recuperación durante el otoño. Además, ambos ramets (enraizados y no enraizados) tienen una mayor capacidad fotoprotectora que la roseta parental, mostrada con el aumento en el precursor de la vitamina E, γ -tocoferol, durante la primavera; y mayores niveles de JA-Ile durante el otoño, mostrando una respuesta de aclimatación a la sequía

reforzada en la descendencia clonal. Además, la estrategia de tipo quiescente que mantiene niveles oxidativos bajos durante periodos de estrés se observó tanto en la roseta parental como en las descendientes, mostrando todo el genet la capacidad de aclimatación a la sequía.

Por último, los costes fisiológicos de la reproducción clonal en la capacidad de esta especie de tolerar la sequía a través de esta estrategia de tipo quiescente solo se vieron en la necesidad de ajustar parámetros fotoprotectores y morfológicos en la roseta parental en respuesta a un mayor número de ramets colgando (**capítulo 3**). Así, existe una correlación positiva entre el número de hijos colgando y el contenido en ABA, γ -tocoferol y el LMA de las rosetas parentales que se encuentran en quiescencia. Mediante estos ajustes fisiológicos, que solo ocurren con el número de hijos sin enraizar y no los hijos totales, las plantas de *S. tectorum* mantienen a los ramets colgando, evitando daños asociados durante épocas muy estresantes. En definitiva, estos resultados muestran a una especie clonal que tolera el estrés extremo y mantiene a los ramets clonales sin enraizar a través de ajustes fisiológicos reversibles que permiten lograr la supervivencia del genet (**Figura 10**).

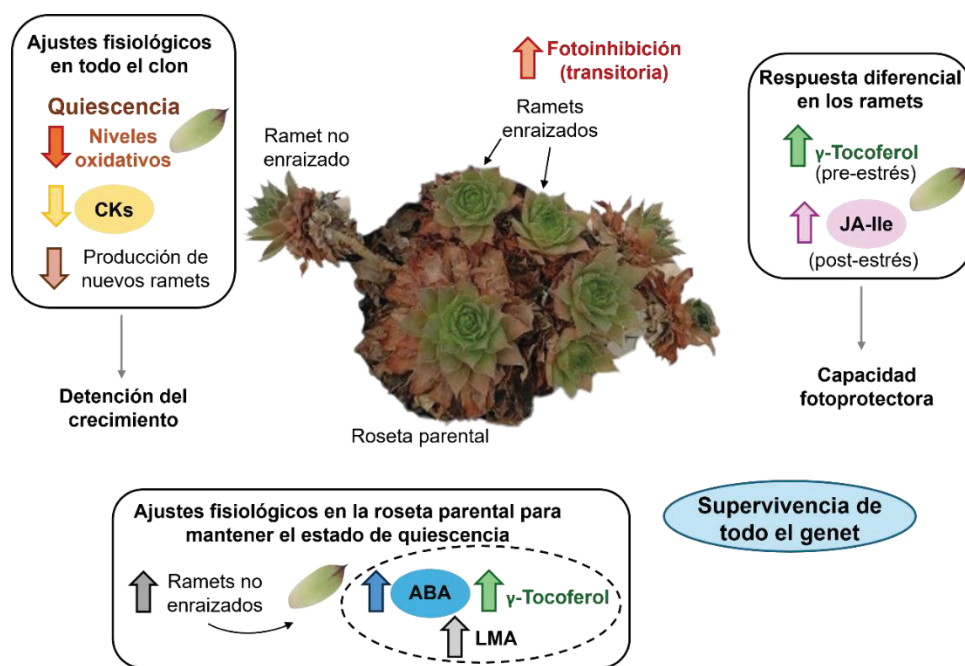


Figura 10. Ajustes fisiológicos a diferentes niveles organizativos en el clon durante un estrés severo por sequía en *Semperivum tectorum* que permite lograr la supervivencia de todo el genet. Los ajustes pueden ocurrir en todo el clon, exclusivamente en los ramets, o bien exclusivamente en la roseta parental. ABA, ácido abscísico; CKs, citoquininas; JA-Ile, jasmonoil-isoleucina; LMA, relación masa por área foliar.

6. Implicación del estrés severo en la aclimatación y adaptación de las especies vegetales

El estrés severo moldea la fisiología, en una primera instancia durante el proceso de aclimatación en un individuo, para después dar lugar a cambios en el genotipo a lo largo de generaciones sucesivas consiguiendo así la adaptación de la especie. Y la adaptación es lo que ha permitido a las especies aparecer, desarrollarse y mantenerse en el planeta. Además, la adaptación a nuevos ambientes a través de la plasticidad fenotípica, o grado de adaptación de un mismo genotipo al ambiente, permite a las plantas sobrevivir en nuevos escenarios climáticos (Valladares et al., 2006). Esta plasticidad adaptativa permite expandir así la tolerancia a cambios ambientales, contribuyendo por lo tanto a la dispersión de una especie. A largo plazo, la selección natural puede conducir al desarrollo de adaptaciones fisiológicas y morfológicas al nuevo entorno local, generando una diferenciación ecotípica en algunos rasgos funcionales (Oleksyn et al., 1998; Baquedano et al., 2008). La búsqueda de rasgos funcionales en la adaptación de las especies al ambiente ha sido incesante (Westoby, 1998; Pavanetto et al., 2024), y ha consolidado la idea de que existen compromisos entre las adaptaciones a hábitats contrastantes, de manera que se consigue la especialización ecológica (Laughlin, 2023). Así, se han podido agrupar algunos rasgos que resumen las adaptaciones de las plantas al entorno, como el espectro económico de la hoja (Wright et al., 2004).

La gran amplitud altitudinal hallada en la especie *S. tectorum*, cuyas poblaciones naturales estudiadas oscilan entre los 780m y los 2100m, nos permitió encontrar diferencias en algunos rasgos fisiológicos y morfológicos. La población situada a mayor altitud estaba caracterizada por plantas de menor tamaño, con menor diámetro de la roseta, como se ha descrito en otras especies alpinas y subalpinas (Körner, 2003). Este menor tamaño tanto de la planta como de las hojas minimiza la exposición a los fuertes vientos y al frío del invierno, siendo una adaptación morfológica protectora. Además, las plantas de esta población tenían los niveles endógenos más elevados de α -tocoferol, JA y SA incluso desde la primavera, lo que sugiere su alta preparación adaptativa para responder a estreses abióticos y bióticos en un ambiente tan extremo (Körner, 2003).

Los estreses abióticos son grandes impulsores de la evolución en plantas debido a la extrema presión selectiva ejercida sobre ellas, donde la supervivencia se vuelve todo un reto (Jackson et al., 2009). Sobre todo, cuando se trata de un evento climático extremo, un episodio caracterizado por un periodo climático estadísticamente inusual que altera la estructura o el funcionamiento de un ecosistema más allá de la variabilidad típica (Smith, 2011); y que además consigue superar la capacidad de aclimatación de un organismo o población, a menudo impactando en su fisiología a largo plazo (Gutschick & BassiriRad, 2003). Para considerar un evento climático extremo es tan importante que la parte climática sea extrema como que la respuesta o resultado en el organismo también lo sea. De hecho, la respuesta extrema dependerá del tipo de estrés, de la especie y del marco temporal en el que se mida. Para observar una respuesta extrema en *S. tectorum* tuvimos que alargar la duración del estrés, cuando activó una estrategia de tipo quiescente que le permitió tolerar la sequía prolongada como vimos en el **capítulo 3**. Además, no hubo efectos persistentes en esta planta clonal, la cual recuperó su estatus hídrico y fotosintético en tan solo una semana y continuó siendo productiva a posteriori. No obstante, detuvimos el estrés cuando estábamos a punto de perder la última hoja de los verticilos del medio de una de las rosetas parentales del estudio, fue un límite experimental y técnico, para poder mantener el criterio establecido de los muestreos. Por lo tanto, no sabemos cuánto tiempo más podría haber aguantado el estrés, pero probablemente la senescencia gradual hubiera alcanzado las hojas más jóvenes de la roseta junto con los meristemas de la yema apical del tallo. Explorar la integridad o dormición de los tejidos meristemáticos en esta especie podría ser relevante para profundizar aún más en su tolerancia a la desecación (Volaire, 2018). Además, podría darse un proceso conocido como memoria transgeneracional del estrés, donde el efecto de un estrés tan severo podría pasarse a las sucesivas generaciones a través de epialelos heredados durante la reproducción sexual o clonal, siendo una implicación más para la aclimatación y adaptación de la especie (Weigel & Colot, 2012; Thabet et al., 2024). Esta memoria del estrés se retiene mediante cambios epigenéticos que no modifican la secuencia del ADN pero que pueden afectar la expresión de genes relacionados con la aclimatación al estrés en las siguientes generaciones (Rapp & Wendel, 2005). Esto permite por ejemplo una variación fenotípica dentro de un mismo clon que fomenta una aclimatación al estrés exitosa a través de ajustes rápidos en las poblaciones clonales (Douhovnikoff & Dodd, 2015; Sammarco et al., 2024). Con todo ello, ambas especies demuestran ser tolerantes a la sequía,

contando con mecanismos adaptativos y de aclimatación específicos, exhibidos de una manera espaciotemporal.

Con el cambio climático se predice un aumento de eventos climáticos extremos como sequías más frecuentes, severas y prolongadas que impactarán negativamente en la productividad y el desarrollo de las plantas (Samaniego et al., 2018; IPCC, 2023). Por ello, el estudio de los mecanismos de tolerancia que poseen especies adaptadas a la sequía nos permite encontrar herramientas que poder emplear en la mejora de cultivos o en la gestión de la conservación de ecosistemas naturales. Además, establecer marcadores de estrés en plantas como posibles herramientas para la detección fácil, rápida y barata de un estrés por sequía es fundamental para garantizar el acceso de todos a su detección y control, asegurando una detección temprana que permita la intervención inmediata, mucho antes de que los síntomas sean visibles (Munné-Bosch & Villadangos, 2023). Uno de estos marcadores de estrés es el test de tetrazolio (**Anexo I**), el cual es un método conocido para medir la viabilidad de las semillas (Patil & Dadlani, 2009), y que puede ser usado como un indicador de estrés al discriminar entre tejidos vivos y muertos, como propuso inicialmente Larcher et al. (1969). Esta prueba, que se basa en la capacidad de los tejidos vivos de reducir la sal incolora 2,3,5-trifeniltetrazolio en el compuesto rojo formazan permite una rápida detección del estrés en las hojas, y a través de la cuantificación del color mediante el espacio CIELAB y el ángulo Hue. Esta prueba refleja rápidamente el estado fisiológico de la planta y predice la vida de la hoja. Como hemos visto en el **capítulo 3**, este test de tetrazolio permite distinguir entre plantas estresadas de no estresadas por sequía, siendo por lo tanto un método útil y sencillo para el monitoreo del estrés.

En vista de los resultados presentados en esta tesis, *S. tectorum* dispone de mecanismos fisiológicos y morfológicos que le permiten tolerar sequías extremas y prolongadas, siendo también una especie resiliente al estrés. Además, la reproducción clonal permite alargar la supervivencia del genet una vez la roseta parental monocárpica florece y muere, permitiendo el rápido crecimiento y extensión de cada nuevo ramet que, incluso, aprovecha las estructuras senescentes de la roseta parental. Todas estas estrategias protegen a la especie en el marco climático actual, incluyendo periodos estivales caracterizados por sequías prolongadas, elevadas temperaturas y baja humedad, y podrían ser suficientes de cara a un futuro marcado por el cambio climático. En efecto, la población

natural más meridional de este estudio, la situada en Les Guilleries (**capítulos 2 y 3**), muestra cómo esta especie nativa de ecosistemas de alta montaña como los Alpes o los Pirineos, puede adaptarse a latitudes y altitudes más bajas, estando expuestas a sequías más severas y veranos más calurosos sin daños irreversibles para la planta. Además, se trata de una población natural establecida que cuenta con eventos de reproducción sexual frecuentes. De hecho, existen otras poblaciones densas descritas en la zona, como en el macizo del Montseny. Por todo ello, las sequías extremas no presentan amenazas para la supervivencia de esta especie.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

- i. La especie *Sempervivum tectorum* puede tolerar el estrés por sequía durante 10 semanas sin sufrir síntomas de fotoinhibición y evitando el estrés foto-oxidativo.
- ii. *S. tectorum* dispone de un mecanismo fisiológico por el cual no solo el ABA, sino también la forma de jasmonatos JA-Ile, puede inducir la fotoprotección modulando el contenido y la composición de vitamina E en hojas, concretamente acumulándose la forma activa α -tocoferol por unidad de clorofila.
- iii. La acumulación simultánea de ABA y de JA-Ile junto a una disminución de las citoquininas activas permite la aclimatación de *S. tectorum* a una sequía extrema durante el verano en su hábitat natural caracterizada por una detención en el crecimiento.
- iv. *S. tectorum* detiene la nueva producción clonal ante situaciones de estrés muy severo, como una sequía estival extrema o ante un estrés severo prolongado en condiciones controladas, donde se da un compromiso entre crecimiento y supervivencia e inclinándose la balanza de forma muy clara en pro de la supervivencia al estrés.
- v. *S. tectorum* está provista de una estrategia de tipo quiescente en hojas que mantiene niveles oxidativos extremadamente bajos durante periodos prolongados de estrés, debido en parte a la función antioxidante de la vitamina E.
- vi. Ante un aumento en el número de nuevas rosetas clonales colgantes, las rosetas parentales aumentan los niveles endógenos de ABA y γ -tocoferol en hojas, promoviendo una mayor capacidad fotoprotectora, además de ajustes en la morfología foliar mediante un aumento en la masa foliar por área, para así poder mantener la supervivencia.

- vii. *S. tectorum* es una planta clonal con la capacidad de realizar ajustes fisiológicos en diferentes niveles organizativos, en las rosetas parentales, en las nuevas rosetas enraizadas y no enraizadas del clon, y también en el órgano clonal, los estolones, promoviendo así la supervivencia de todo el genet a un estrés abiótico severo.
- viii. La senescencia foliar producida gradualmente a lo largo de la roseta desde las hojas externas viejas hacia el interior resulta ser una estrategia de supervivencia al estrés en *S. tectorum*, donde las hojas más jóvenes y la yema apical permanecieron intactas.
- ix. El estrés foto-oxidativo promueve la acumulación de oxilipinas, particularmente en la forma JA-Ile, en los peciolo de hojas de *Olea europaea* severamente estresados por sequía, lo que puede condicionar la zona de abscisión y provocar la caída de las hojas.
- x. El estrés severo por sequía en olivo acentúa la diferenciación fisiológica entre la lámina foliar y el peciolo, especialmente en los contenidos endógenos de hidroperóxidos lipídicos y α -tocoferol, indicando un mayor estrés oxidativo en la lámina foliar.
- xi. El estrés severo por sequía en olivo promueve la formación de gradientes hormonales a lo largo de la hoja desde la parte apical de la lámina foliar hasta la parte más basal del peciolo, donde se encuentra la zona de abscisión. En particular, forma un gradiente creciente de JA-Ile por unidad de clorofila hacia el peciolo, lo cual sugiere una posible señalización por parte de esta hormona en la zona de abscisión.

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

- Abarca, D., Martín, M., & Sabater, B. (2001). Differential leaf stress responses in young and senescent plants. *Physiologia Plantarum*, 113, 409–415.
- Abeles, F. B., & Rubinstein, B. (1964). Regulation of ethylene evolution and leaf abscission by auxin. *Plant Physiology*, 39, 963-969.
- Achard, P., Gong, F., Cheminant, S., Alioua, M., Hedden, P., & Genschik, P. (2008). The cold-inducible CBF1 factor–dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. *The Plant Cell*, 20, 2117-2129.
- Addicott, T. F. (1982). *Abscission*. University of California Press.
- Agustí, J., Merelo, P., Cercós, M., Tadeo, F. R., & Talón, M. (2008). Ethylene-induced differential gene expression during abscission of citrus leaves. *Journal of Experimental Botany*, 59, 2717-2733.
- Agustí, J., Gimeno, J., Merelo, P., Serrano, R., Cercós, M., Conesa, A., Talón, M., & Tadeo, F. R. (2012). Early gene expression events in the laminar abscission zone of abscission-promoted citrus leaves after a cycle of water stress/rehydration: Involvement of CitbHLH1. *Journal of Experimental Botany*, 63, 6079-6091.
- Aldridge, D. C., Galt, S., Giles, D., & Turner, W. B. (1971). Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. *Journal of the Chemical Society C: Organic*, 1623-1627.
- Allen, C. D., Macalady, A. K., Chenchouni, H., Bachelet, D., McDowell, N., Vennetier, M., Kitzberger, T., Rigling, A., Breshears, D. D., Hogg, E. H., Gonzalez, P., Fensham, R., Zhang, Z., Castro, J., Demidova, N., Lim, J.-H., Allard, G., Running, S. W., Semerci, A., & Cobb, N. (2010). A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology & Management*, 259, 660-684.
- Allen, C. D., Breshears, D. D., & McDowell, N. G. (2015). On underestimation of global vulnerability to tree mortality and forest die-off from hotter drought in the Anthropocene. *Ecosphere*, 6, 1-55.
- An, C., & Mou, Z. (2011). Salicylic acid and its function in plant immunity. *Journal of Integrative Plant Biology*, 53, 412-428.

- Angelopoulos, K., Dichio, B., & Xiloyannis, C. (1996). Inhibition of photosynthesis in olive trees (*Olea europaea* L.) during water stress and rewatering. *Journal of Experimental Botany*, 47, 1093-1100.
- Anjum, S. A., Xie, X., Wang, L., Saleem, M. F., Man, C., & Lei, W. (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*, 6, 2026-2032.
- Archaux, F., & Wolters, V. (2006). Impact of summer drought on forest biodiversity: What do we know? *Annals of Forest Science*, 63, 645-652.
- Asada, K. (2000). The water–water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 355, 1419-1431.
- Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, 141, 391-396.
- Ashraf, M., & Harris, P. J. C. (2013). Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica*, 51, 163-190.
- Atkinson, N. J., & Urwin, P. E. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: From genes to the field. *Journal of Experimental Botany*, 63, 3523–3543.
- Avramova, V., Abdelgawad, H., Zhang, Z., Fotschki, B., Casadevall, R., Vergauwen, L., Knapen, D., Taleisnik, E., Guisez, Y., Asard, H., & Beemster, G. T. S. (2015). Drought induces distinct growth response, protection, and recovery mechanisms in the maize leaf growth zone. *Plant Physiology*, 169, 1382-1396.
- Baccari, S., Elloumi, O., Chaari-Rkhis, A., Fenollosa, E., Morales, M., Drira, N., Ben Abdallah, F., Fki, L., & Munné-Bosch, S. (2020). Linking leaf water potential, photosynthesis and chlorophyll loss with mechanisms of photo- and antioxidant protection in juvenile olive trees subjected to severe drought. *Frontiers in Plant Science*, 11, 614144.
- Bacelar, E. A., Santos, D. L., Moutinho-Pereira, J. M., Gonçalves, B. C., Ferreira, H. F., & Correia, C. M. (2006). Immediate responses and adaptative strategies of three olive cultivars under contrasting water availability regimes: Changes on structure and chemical composition of foliage and oxidative damage. *Plant Science*, 170, 596-605.
- Bacelar, E. A., Moutinho-Pereira, J. M., Gonçalves, B. C., Ferreira, H. F., & Correia, C. M. (2007). Changes in growth, gas exchange, xylem hydraulic properties and water use

- efficiency of three olive cultivars under contrasting water availability regimes. *Environmental & Experimental Botany*, 60, 183-192.
- Bandurska, H., Stroiński, A., & Kubiś, J. (2003). The effect of jasmonic acid on the accumulation of ABA, proline and spermidine and its influence on membrane injury under water deficit in two barley genotypes. *Acta Physiologiae Plantarum*, 25, 279-285.
- Bandurska, H., & Cieślak, M. (2013). The interactive effect of water deficit and UV-B radiation on salicylic acid accumulation in barley roots and leaves. *Environmental & Experimental Botany*, 94, 9-18.
- Baquetano, F. J., Valladares, F., & Castillo, F. J. (2008). Phenotypic plasticity blurs ecotypic divergence in the response of *Quercus coccifera* and *Pinus halepensis* to water stress. *European Journal of Forest Research*, 127, 495-506.
- Basu, M. M., González-Carranza, Z. H., Azam-Ali, S., Tang, S., Shahid, A. A., & Roberts, J. A. (2013). The manipulation of auxin in the abscission zone cells of *Arabidopsis* flowers reveals that indoleacetic acid signaling is a prerequisite for organ shedding. *Plant Physiology*, 162, 96-106.
- Batista, U. C. S., Pereira, E. F. T., Hayashi, A. H., Silva, K. R., Purgatto, E., Vieira, E. A., & Gaspar, M. (2024). Unveiling morphophysiological and metabolic adaptive strategies of the CAM epiphytic bromeliad *Acanthostachys pitcairnioides* to drought. *Plant Physiology & Biochemistry*, 216, 109076.
- Batra, N. G., Sharma, V., & Kumari, N. (2014). Drought-induced changes in chlorophyll fluorescence, photosynthetic pigments, and thylakoid membrane proteins of *Vigna radiata*. *Journal of Plant Interactions*, 9, 712-721.
- Bazargani, M. M., Sarhadi, E., Shahnejat-Bushehri, A.-A., Matros, A., Mock, H.-P., Naghavi, M.-R., Hajihoseini, V., Mardi, M., Hajirezaei, M.-R., Moradi, F., Ehdaie, B., & Hosseini-Salekdeh. (2011). A proteomics view on the role of drought-induced senescence and oxidative stress defense in enhanced stem reserves remobilization in wheat. *Journal of Proteomics*, 74, 1959-1973.
- Bechtold, U., Ferguson, J. N., & Mullineaux, P. M. (2018). To defend or to grow: Lessons from *Arabidopsis* C24. *Journal of Experimental Botany*, 69, 2809-2821.
- Beguería, S., Vicente-Serrano, S. M., Reig, F., & Latorre, B. (2014). Standardized precipitation evapotranspiration index (SPEI) revisited: Parameter fitting, evapotranspiration models,

tools, datasets and drought monitoring. *International Journal of Climatology*, 34, 3001-3023.

Bernacchia, G., Salamini, F., & Bartels, D. (1996). Molecular characterization of the rehydration process in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Physiology*, 111, 1043-1050.

Besnard, G., Khadari, B., Navascués, M., Fernández-Mazuecos, M., Bakkali, A. E., Arrigo, N., Baali-Cherif, D., Caraffa, V. B.-B. de, Santoni, S., Vargas, P., & Savolainen, V. (2013). The complex history of the olive tree: From Late Quaternary diversification of Mediterranean lineages to primary domestication in the northern Levant. *Proceedings of the Royal Society. Biological Sciences*, 280, 20122833.

Bhattacharjee, S. (2005). Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Science Association*, 89, 1113-1121.

Bickford, C. P. (2016). Ecophysiology of leaf trichomes. *Functional Plant Biology*, 43, 807-814.

Bienert, G. P., & Chaumont, F. (2014). Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840, 1596-1604.

Blanco-Sánchez, M., Ramos-Muñoz, M., Pías, B., Ramírez-Valiente, J. A., Díaz-Guerra, L., Escudero, A., & Matesanz, S. (2022). Natural selection favours drought escape and an acquisitive resource-use strategy in semi-arid Mediterranean shrubs. *Functional Ecology*, 36, 2289-2302.

Boonnoy, P., Karttunen, M., & Wong-ekkabut, J. (2018). Does α -tocopherol flip-flop help to protect membranes against oxidation? *The Journal of Physical Chemistry B*, 122, 10362–10370.

Borchert, R., Rivera, G., & Hagnauer, W. (2002). Modification of vegetative phenology in a tropical semi-deciduous forest by abnormal drought and rainy. *Biotropica*, 34, 27-39.

Boussadia, O., Ben Mariem, F., Mechri, B., Boussetta, W., Braham, M., & Ben El Hadj, S. (2008). Response to drought of two olive tree cultivars (cv Koroneki and Meski). *Scientia Horticulturae*, 116, 388-393.

Brossa, R., López-Carbonell, M., Jubany-Marí, T., & Alegre, L. (2011). Interplay between abscisic acid and jasmonic acid and its role in water-oxidative stress in wild-type, ABA-deficient, JA-deficient, and ascorbate-deficient *Arabidopsis* plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 30, 322-333.

- Bustan, A., Avni, A., Lavee, S., Zipori, I., Yeselson, Y., Schaffer, A. A., Riov, J., & Dag, A. (2011). Role of carbohydrate reserves in yield production of intensively cultivated oil olive (*Olea europaea* L.) trees. *Tree Physiology*, 31, 519-530.
- Butenko, M. A., Patterson, S. E., Grini, P. E., Stenvik, G.-E., Amundsen, S. S., Mandal, A., & Aalen, R. B. (2003). *INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION* controls floral organ abscission in *Arabidopsis* and identifies a novel family of putative ligands in plants. *The Plant Cell*, 15, 2296-2307.
- Casadesús, A., Bouchikh, R., Pérez-Llorca, M., & Munné-Bosch, S. (2021). Linking jasmonates with vitamin E accumulation in plants: A case study in the Mediterranean shrub *Cistus albidus* L. *Planta*, 253, 36.
- Cela, J., Arrom, L., & Munné-Bosch, S. (2009). Diurnal changes in photosystem II photochemistry, photoprotective compounds and stress-related phytohormones in the CAM plant, *Aptenia cordifolia*. *Plant Science*, 177, 404-410.
- Chan, K. X., Phua, S. Y., Crisp, P., McQuinn, R., & Pogson, B. J. (2016). Learning the languages of the chloroplast: Retrograde signaling and beyond. *Annual Review of Plant Biology*, 67, 25-53.
- Chartzoulakis, K., Patakas, A., & Bosabalidis, A. M. (1999). Changes in water relations, photosynthesis and leaf anatomy induced by intermittent drought in two olive cultivars. *Environmental & Experimental Botany*, 42, 113-120.
- Chaudhary, N., & Khurana, P. (2009). Vitamin E biosynthesis genes in rice: Molecular characterization, expression profiling and comparative phylogenetic analysis. *Plant Science*, 177, 479-491.
- 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, 239-264.
- Chen, J.-S., Lei, N.-F., & Dong, M. (2010). Clonal integration improves the tolerance of *Carex praeclara* to sand burial by compensatory response. *Acta Oecologica*, 36, 23-28.
- Cheng, M.-C., Liao, P.-M., Kuo, W.-W., & Lin, T.-P. (2013). The *Arabidopsis* *ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1* regulates abiotic stress-responsive gene expression by binding to different cis-acting elements in response to different stress signals. *Plant Physiology*, 162, 1566-1582.
- Choi, H., Hong, J., Ha, J., Kang, J., & Kim, S. Y. (2000). ABFs, a Family of ABA-responsive element binding factors. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 1723-1730.

- Chojak-Koźniewska, J., Linkiewicz, A., Sowa, S., Radzioch, M. A., & Kuźniak, E. (2017). Interactive effects of salt stress and *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* infection in cucumber: Involvement of antioxidant enzymes, abscisic acid and salicylic acid. *Environmental & Experimental Botany*, 136, 9-20.
- Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., & Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal*, 90, 856-867.
- Claeys, H., & Inzé, D. (2013). The agony of choice: How plants balance growth and survival under water-limiting conditions. *Plant Physiology*, 162, 1768-1779.
- Connor, D. J. & Fereres, E. (2005). The physiology of adaptation and yield expression in olive. *Horticultural Reviews*, 31, 155-229.
- Considine, M. J., & Considine, J. A. (2016). On the language and physiology of dormancy and quiescence in plants. *Journal of Experimental Botany*, 67, 3189-3203.
- Considine, M. J., & Foyer, C. H. (2014). Redox regulation of plant development. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21, 1305-1326.
- Cotado, A., Müller, M., Morales, M., & Munné-Bosch, S. (2018). Linking jasmonates with pigment accumulation and photoprotection in a high-mountain endemic plant, *Saxifraga longifolia*. *Environmental & Experimental Botany*, 154, 56-65.
- Cotado, A., & Munné-Bosch, S. (2020). Distribution, trade-offs and drought vulnerability of a high-mountain Pyrenean endemic plant species, *Saxifraga longifolia*. *Global Ecology & Conservation*, 22, e00916.
- Cotado, A., Munné-Bosch, S., & Pintó-Marijuan, M. (2020). Strategies for severe drought survival and recovery in a Pyrenean relict species. *Physiologia Plantarum*, 169, 276-290.
- Crausbay, S. D., Ramirez, A. R., Carter, S. L., Cross, M. S., Hall, K. R., Bathke, D. J., Betancourt, J. L., Colt, S., Cravens, A. E., Dalton, M. S., Dunham, J. B., Hay, L. E., Hayes, M. J., McEvoy, J., McNutt, C. A., Moritz, M. A., Nislow, K. H., Raheem, N., & Sanford, T. (2017). Defining ecological drought for the twenty-first century. *Bulletin of the American Meteorological Society*, 98, 2543-2550.
- Croce, R., & van Amerongen, H. (2011). Light-harvesting and structural organization of Photosystem II: From individual complexes to thylakoid membrane. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 104, 142-153.
- Crosatti, C., Rizza, F., Badeck, F. W., Mazzucotelli, E., & Cattivelli, L. (2013). Harden the chloroplast to protect the plant. *Physiologia Plantarum*, 147, 55-63.

- Dahal, K., & Vanlerberghe, G. C. (2017). Alternative oxidase respiration maintains both mitochondrial and chloroplast function during drought. *New Phytologist*, 213, 560-571.
- De Ollas, C., Arbona, V., & Gómez-Cadenas, A. (2015). Jasmonoyl isoleucine accumulation is needed for abscisic acid build-up in roots of *Arabidopsis* under water stress conditions. *Plant, Cell & Environment*, 38, 2157-2170.
- De Ollas, C., Arbona, V., Gómez-Cadenas, A., & Dodd, I. C. (2018). Attenuated accumulation of jasmonates modifies stomatal responses to water deficit. *Journal of Experimental Botany*, 69, 2103-2116.
- De Ollas, C., & Dodd, I. C. (2016). Physiological impacts of ABA–JA interactions under water-limitation. *Plant Molecular Biology*, 91, 641-650.
- De Ollas, C., Hernando, B., Arbona, V., & Gómez-Cadenas, A. (2013). Jasmonic acid transient accumulation is needed for abscisic acid increase in citrus roots under drought stress conditions. *Physiologia Plantarum*, 147, 296-306.
- Dathe, W., Rönsch, H., Preiss, A., Schade, W., Sembdner, G., & Schreiber, K. (1981). Endogenous plant hormones of the broad bean, *Vicia faba* L. (-)-jasmonic acid, a plant growth inhibitor in pericarp. *Planta*, 153, 530-535.
- Davenport, T. L., Morgan, P. W., & Jordan, W. R. (1977). Auxin transport as related to leaf abscission during water stress in cotton. *Plant Physiology*, 59, 554-557.
- Davies, P. J. (2010). *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Springer Dordrecht.
- de Kroon, H. & Van Groenendael, J. (1997). *The Ecology and Evolution of Clonal Plants*. Backhuys Publishers.
- De Domenico, S., Bonsegna, S., Horres, R., Pastor, V., Taurino, M., Poltronieri, P., Imtiaz, M., Kahl, G., Flors, V., Winter, P., & Santino, A. (2012). Transcriptomic analysis of oxylipin biosynthesis genes and chemical profiling reveal an early induction of jasmonates in chickpea roots under drought stress. *Plant Physiology & Biochemistry*, 61, 115–122.
- Demirevska, K., Zasheva, D., Dimitrov, R., Simova-Stoilova, L., Stamenova, M., & Feller, U. (2009). Drought stress effects on Rubisco in wheat: Changes in the Rubisco large subunit. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31, 1129-1138.
- Demmig-Adams, B., & Adams III, W. W. (1996). The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science*, 1, 21-26.

- Demmig-Adams, B., Cohu, C. M., Muller, O., & Adams, W. W. (2012). Modulation of photosynthetic energy conversion efficiency in nature: From seconds to seasons. *Photosynthesis Research*, 113, 75-88.
- Demmig-Adams, B., & Adams, W. (2018). An integrative approach to photoinhibition and photoprotection of photosynthesis. *Environmental & Experimental Botany*, 154, 1-3.
- Demole, E., Lederer, E., & Mercier, D. (1962). Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. *Helvetica Chimica Acta*, 45, 675-685.
- Dichio, B., Margiotta, G., Xiloyannis, C., Bufo, S. A., Sofo, A., & Cataldi, T. R. I. (2009). Changes in water status and osmolyte contents in leaves and roots of olive plants (*Olea europaea* L.) subjected to water deficit. *Trees*, 23, 247-256.
- Ding, P., & Ding, Y. (2020). Stories of salicylic acid: A plant defense hormone. *Trends in Plant Science*, 25, 549-565.
- Dong, B.-C., Alpert, P., Zhang, Q., & Yu, F.-H. (2015). Clonal integration in homogeneous environments increases performance of *Alternanthera philoxeroides*. *Oecologia*, 179, 393-403.
- Douhovnikoff, V., & Dodd, R. S. (2015). Epigenetics: A potential mechanism for clonal plant success. *Plant Ecology*, 216, 227-233.
- Earnshaw, M. J., Carver, K. A., & Lee, J. A. (1985). Changes in leaf water potential and CAM in *Sempervivum montanum* and *Sedum album* in response to water availability in the field. *Oecologia*, 67, 486-492.
- Eggli, U., & Nyffeler, R. (2009). Living under temporarily arid conditions—Succulence as an adaptive strategy. *Bradleya*, 27, 13-36.
- El Kayal, W. E., Keller, G., Debayles, C., Kumar, R., Weier, D., Teulieres, C., & Marque, C. (2006). Regulation of tocopherol biosynthesis through transcriptional control of tocopherol cyclase during cold hardening in *Eucalyptus gunnii*. *Physiologia Plantarum*, 126, 212-223.
- Encinas-Valero, M., Esteban, R., Hereş, A.-M., Becerril, J. M., García-Plazaola, J. I., Artexe, U., Vivas, M., Solla, A., Moreno, G., & Curiel Yuste, J. (2022). Photoprotective compounds as early markers to predict holm oak crown defoliation in declining Mediterranean savannahs. *Tree Physiology*, 42, 208-224.

- Exposito-Rodriguez, M., Laissue, P. P., Yvon-Durocher, G., Smirnoff, N., & Mullineaux, P. M. (2017). Photosynthesis-dependent H₂O₂ transfer from chloroplasts to nuclei provides a high-light signalling mechanism. *Nature Communications*, 8, 49.
- Faeth, S. H., Connor, E. F., & Simberloff, D. (1981). Early leaf abscission: A neglected source of mortality for folivores. *American Naturalist*, 117, 409-415.
- Fahrenholtz, S. R., Doleiden, F. H., Trozzolo, A. M., & Lamola, A. A. (1974). On the quenching of singlet oxygen by α -tocopherol. *Photochemistry & Photobiology*, 20, 505-509.
- Farmer, E. E., & Mueller, M. J. (2013). ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 429-450.
- Feeley, K. J., Bravo-Avila, C., Fadrique, B., Perez, T. M., & Zuleta, D. (2020). Climate-driven changes in the composition of New World plant communities. *Nature Climate Change*, 10, 965-970.
- Feistler, A. M., & Habermann, G. (2012). Assessing the role of vertical leaves within the photosynthetic function of *Styrax camporum* under drought conditions. *Photosynthetica*, 50, 613-622.
- Fernández, A. P., & Strand, Å. (2008). Retrograde signaling and plant stress: Plastid signals initiate cellular stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 509-513.
- Feussner, I., & Wasternack, C. (2002). The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 275-297.
- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., Miersch, O., Wasternack, C., & Solano, R. (2009). (+)-7-*iso*-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology*, 5, 344-350.
- Foyer, C. H. (2018). Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. *Environmental & Experimental Botany*, 154, 134-142.
- Foyer, C. H., & Hanke, G. (2022). ROS production and signalling in chloroplasts: Cornerstones and evolving concepts. *The Plant Journal*, 111, 642-661.
- Fradera-Soler, M., Grace, O. M., Jørgensen, B., & Mravec, J. (2022). Elastic and collapsible: Current understanding of cell walls in succulent plants. *Journal of Experimental Botany*, 73, 2290-2307.
- Fresno, D. H., & Munné-Bosch, S. (2023). Organ-specific responses during acclimation of mycorrhizal and non-mycorrhizal tomato plants to a mild water stress reveal differential local and systemic hormonal and nutritional adjustments. *Planta*, 258, 1-17.

- Fukazawa, J., Ohashi, Y., Takahashi, R., Nakai, K., & Takahashi, Y. (2021). DELLA degradation by gibberellin promotes flowering via GAF1-TPR-dependent repression of floral repressors in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 33, 2258-2272.
- García-León, D., Standardi, G., & Staccione, A. (2021). An integrated approach for the estimation of agricultural drought costs. *Land Use Policy*, 100, 104923.
- García-Plazaola, J. I., Hernández, A., & Becerril, J. M. (2003). Antioxidant and pigment composition during autumnal leaf senescence in woody deciduous species differing in their ecological traits. *Plant Biology*, 5, 557-566.
- García-Plazaola, J. I., Matsubara, S., & Osmond, C. B. (2007). The lutein epoxide cycle in higher plants: Its relationships to other xanthophyll cycles and possible functions. *Functional Plant Biology*, 34, 759-773.
- Garcion, C., Lohmann, A., Lamodièrre, E., Catinot, J., Buchala, A., Doermann, P., & Métraux, J.-P. (2008). Characterization and biological function of the *ISOCHORISMATE SYNTHASE 2* gene of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 147, 1279-1287.
- Gao, S., Gao, J., Zhu, X., Song, Y., Li, Z., Ren, G., Zhou, X., & Kuai, B. (2016). ABF2, ABF3, and ABF4 promote ABA-mediated chlorophyll degradation and leaf senescence by transcriptional activation of chlorophyll catabolic genes and senescence-associated genes in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 9, 1272-1285.
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Stange, A., Marten, I., Bauer, H., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Al-Rasheid, K. A. S., Romeis, T., & Hedrich, R. (2009). Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 21425-21430.
- Gill, S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology & Biochemistry*, 48, 909-930.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 205-227.
- Goldental-Cohen, S., Burstein, C., Biton, I., Ben Sasson, S., Sadeh, A., Many, Y., Doron-Faigenboim, A., Zemach, H., Mugira, Y., Schneider, D., Birger, R., Meir, S., Philosoph-Hadas, S., Irihomovitch, V., Lavee, S., Avidan, B., & Ben-Ari, G. (2017). Ethephon induced oxidative stress in the olive leaf abscission zone enables development of a selective abscission compound. *BMC Plant Biology*, 17, 87.

- Gómez-Mena, C., & Sablowski, R. (2008). *ARABIDOPSIS THALIANA* HOMEODOMAIN GENE1 establishes the basal boundaries of shoot organs and controls stem growth. *The Plant Cell*, 20, 2059-2072.
- González-Guzmán, M., Apostolova, N., Bellés, J. M., Barrero, J. M., Piqueras, P., Ponce, M. R., Micol, J. L., Serrano, R., & Rodríguez, P. L. (2002). The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. *The Plant Cell*, 14, 1833.
- Grebner, W., Stengl, N. E., Oenel, A., Mueller, M. J., & Berger, S. (2013). Lipoxygenase 6-dependent oxylipin synthesis in roots is required for abiotic and biotic stress resistance of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 161, 2159-2170.
- Griffiths, H., Ong, B. L., Avadhani, P. N., & Goh, C. J. (1989). Recycling of respiratory CO₂ during Crassulacean acid metabolism: Alleviation of photoinhibition in *Pyrrosia piloselloides*. *Planta*, 179, 115-122.
- Groot, S. P. C., & Karssen, C. M. (1987). Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: A study with gibberellin-deficient mutants. *Planta*, 171, 525-531.
- Grunewald, W., & Friml, J. (2010). The march of the PINs: Developmental plasticity by dynamic polar targeting in plant cells. *The EMBO Journal*, 29, 2700-2714.
- Guan, C., Ji, J., Zhang, X., Li, X., Jin, C., Guan, W., & Wang, G. (2015). Positive feedback regulation of a *Lycium chinense*-derived VDE gene by drought-induced endogenous ABA, and over-expression of this VDE gene improve drought-induced photo-damage in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology*, 175, 26-36.
- Guerfel, M., Ouni, Y., Boujnah, D., & Zarrouk, M. (2009). Photosynthesis parameters and activities of enzymes of oxidative stress in two young 'Chemlali' and 'Chetoui' olive trees under water deficit. *Photosynthetica*, 47, 340-346.
- Gupta, A., Rico-Medina, A., & Caño-Delgado, A. I. (2020). The physiology of plant responses to drought. *Science*, 368, 266-269.
- Gutiérrez-Soto, M. V., Pacheco, A., & Holbrook, N. M. (2008). Leaf age and the timing of leaf abscission in two tropical dry forest trees. *Trees*, 22, 393-401.
- Gutschick, V. P., & BassiriRad, H. (2003). Extreme events as shaping physiology, ecology, and evolution of plants: Toward a unified definition and evaluation of their consequences. *New Phytologist*, 160, 21-42.

- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141, 312-322.
- Hamberg, M., & Fahlstadius, P. (1990). Allene oxide cyclase: A new enzyme in plant lipid metabolism. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 276, 518-526.
- Harb, A., Krishnan, A., Ambavaram, M. M. R., & Pereira, A. (2010). Molecular and physiological analysis of drought stress in *Arabidopsis* reveals early responses leading to acclimation in plant growth. *Plant Physiology*, 154, 1254-1271.
- Hedden, P. (2020). The current status of research on gibberellin biosynthesis. *Plant & Cell Physiology*, 61, 1832-1849.
- Herrera, A., Fernández, M. D., & Taisma, M. A. (2000). Effects of drought on CAM and water relations in plants of *Peperomia carnevalii*. *Annals of Botany*, 86, 511-517.
- Heitz, T., Smirnova, E., Widemann, E., Aubert, Y., Pinot, F., & Ménard, R. (2016). The rise and fall of jasmonate biological activities. In: Y. Nakamura & Y. Li-Beisson (Eds.), *Lipids in Plant and Algae Development. Subcellular Biochemistry* (pp. 405-426). Springer.
- Helliwell, C. A., Poole, A., Peacock, W. J., & Dennis, E. S. (1999). *Arabidopsis* ent-kaurene oxidase catalyzes three steps of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiology*, 119, 507.
- Heyduk, K., Moreno-Villena, J. J., Gilman, I. S., Christin, P.-A., & Edwards, E. J. (2019). The genetics of convergent evolution: Insights from plant photosynthesis. *Nature Reviews Genetics*, 20, 485-493.
- Higuchi, K., Iwase, J., Tsukiori, Y., Nakura, D., Kobayashi, N., Ohashi, H., Saito, A., & Miwa, E. (2014). Early senescence of the oldest leaves of Fe-deficient barley plants may contribute to phytosiderophore release from the roots. *Physiologia Plantarum*, 151, 313-322.
- Hoch, G., Richter, A., & Körner, C. (2003). Non-structural carbon compounds in temperate forest trees. *Plant, Cell & Environment*, 26, 1067-1081.
- Hodgson, D., McDonald, J. L., & Hosken, D. J. (2015). What do you mean, 'resilient'? *Trends in Ecology & Evolution*, 30, 503-506.
- Hörtensteiner, S., & Feller, U. (2002). Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *Journal of Experimental Botany*, 53, 927-937.
- Hörtensteiner, S., & Kräutler, B. (2011). Chlorophyll breakdown in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1807, 977-988.
- Horvath, D. P., Anderson, J. V., Chao, W. S., & Foley, M. E. (2003). Knowing when to grow: Signals regulating bud dormancy. *Trends in Plant Science*, 8, 534-540.

- Howe, G. A., Major, I. T., & Koo, A. J. (2018). Modularity in jasmonate signaling for multistress resilience. *Annual Review of Plant Biology*, 69, 387-415.
- Hu, C., Mascoli, V., Elias, E., & Croce, R. (2023). The photosynthetic apparatus of the CAM plant *Tillandsia flabellate* and its response to water deficit. *Journal of Plant Physiology*, 282, 153945.
- Hu, R., Zhang, J., Jawdy, S., Sreedasyam, A., Lipzen, A., Wang, M., Ng, V., Daum, C., Keymanesh, K., Liu, D., Lu, H., Ranjan, P., Chen, J.-G., Muchero, W., Tschaplinski, T. J., Tuskan, G. A., Schmutz, J., & Yang, X. (2022). Comparative genomics analysis of drought response between obligate CAM and C3 photosynthesis plants. *Journal of Plant Physiology*, 277, 153791.
- Huber, H., Whigham, D. F., & O'Neill, J. (2004). Timing of disturbance changes the balance between growth and survival of parent and offspring ramets in the clonal forest understory herb *Uvularia perfoliata*. *Evolutionary Ecology*, 18, 521-539.
- Hussain, S. J., Khan, N. A., Anjum, N. A., Masood, A., & Khan, M. I. R. (2021). Mechanistic elucidation of salicylic acid and sulphur-induced defence systems, nitrogen metabolism, photosynthetic, and growth potential of mungbean (*Vigna radiata*) under salt stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40, 1000-1016.
- Hwang, I., Sheen, J., & Müller, B. (2012). Cytokinin signaling networks. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 353-380.
- Ihlenfeldt, H.-D. (1985). Lebensformen und Überlebensstrategien bei Sukkulente. *Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 98, 409-423.
- IPCC (2023). 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 [Core Writing Team, Lee, H., & Romero, J. (Eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, pp. 35-115.
- Ito, H., Saito, H., Fukui, M., Tanaka, A., & Arakawa, K. (2022). Poplar leaf abscission through induced chlorophyll breakdown by Mg-dechelata. *Plant Science*, 324, 111444.
- Jaafry, W. H., Li, D. Z., Fatima, S. A., & Hassan, M. (2016). Role of clonal integration among different environmental conditions (a review). *Natural Science*, 08, 475-486.
- Jackson, M. B., & Osborne, D. J. (1970). Ethylene, the natural regulator of leaf abscission. *Nature*, 225, 1019-1022.
- Jackson, M. B., Ishizawa, K., & Ito, O. (2009). Evolution and mechanisms of plant tolerance to flooding stress. *Annals of Botany*, 103, 137-142.

- Jibrán, R., Hunter, D. A., & Dijkwel, P. P. (2013). Hormonal regulation of leaf senescence through integration of developmental and stress signals. *Plant Molecular Biology*, 82, 547-561.
- Jing, H.-C., Sturre, M. J. G., Hille, J., & Dijkwel, P. P. (2002). *Arabidopsis* onset of leaf death mutants identify a regulatory pathway controlling leaf senescence. *The Plant Journal*, 32, 51-63.
- Jinn, T.-L., Stone, J. M., & Walker, J. C. (2000). HAESA, an *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. *Genes & Development*, 14, 108-117.
- Jónsdóttir, I. S., & Callaghan, T. V. (1989). Localized defoliation stress and the movement of ^{14}C between tillers of *Carex Bigelowii*. *Oikos*, 54, 211-219.
- Jubany-Marí, T., Prinsen, E., Munné-Bosch, S., & Alegre, L. (2010). The timing of methyl jasmonate, hydrogen peroxide and ascorbate accumulation during water deficit and subsequent recovery in the Mediterranean shrub *Cistus albidus* L. *Environmental & Experimental Botany*, 69, 47-55.
- Juvany, M., Müller, M., & Munné-Bosch, S. (2012). Leaves of field-grown mastic trees suffer oxidative stress at the two extremes of their lifespan. *Journal of Integrative Plant Biology*, 54, 584-594.
- Juvany, M., Müller, M., & Munné-Bosch, S. (2013). Photo-oxidative stress in emerging and senescing leaves: A mirror image? *Journal of Experimental Botany*, 64, 3087-3098.
- Kakridis, I.T. (1986). Greek Mythology, Tome II. Athens: Editons Ekdotiki of Athens [in Greek]
- Kale, R., Hebert, A. E., Frankel, L. K., Sallans, L., Bricker, T. M., & Pospíšil, P. (2017). Amino acid oxidation of the D1 and D2 proteins by oxygen radicals during photoinhibition of photosystem II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114, 2988-2993.
- Kazan, K. (2015). Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 20, 219-229.
- Kendrick, M. D., & Chang, C. (2008). Ethylene signaling: New levels of complexity and regulation. *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 479-485.
- Khan, G. A., Vogiatzaki, E., Glauser, G., & Poirier, Y. (2016). Phosphate deficiency induces the jasmonate pathway and enhances resistance to insect herbivory. *Plant Physiology*, 171, 632-644.

- Khan, M. I. R., Fatma, M., Per, T. S., Anjum, N. A., & Khan, N. A. (2015). Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Frontiers in Plant Science*, 6, 462.
- Khanna-Chopra, R. (2012). Leaf senescence and abiotic stresses share reactive oxygen species-mediated chloroplast degradation. *Protoplasma*, 249, 469-481.
- Kim, H. J., Ryu, H., Hong, S. H., Woo, H. R., Lim, P. O., Lee, I. C., Sheen, J., Nam, H. G., & Hwang, I. (2006). Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 814-819.
- Kim, T.-H., Böhmer, M., Hu, H., Nishimura, N., & Schroeder, J. I. (2010). Guard cell signal transduction network: Advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 561-591.
- Kim, J. (2014). Four shades of detachment: Regulation of floral organ abscission. *Plant Signaling & Behavior*, 9, e976154.
- Kim, J., Dotson, B., Rey, C., Lindsey, J., Bleecker, A. B., Binder, B. M., & Patterson, S. E. (2013). New clothes for the jasmonic acid receptor COI1: Delayed abscission, meristem arrest and apical dominance. *PLoS ONE*, 8, e60505.
- Kirilenko, N. A. (2016). Structural peculiarities of vegetative organs of *Sempervivum tectorum* L. (Crassulaceae) and *Salicornia europaea* L. (Chenopodiaceae) – Residents of extreme habitats. *Journal of Education, Health and Sport*, 6, 883-892.
- Klein, J. T., & Kadereit, J. W. (2015). Phylogeny, biogeography, and evolution of edaphic association in the european oreophytes *Sempervivum* and *Jovibarba* (Crassulaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 176, 44-71.
- Klein, J. T., & Kadereit, J. W. (2016). Allopatric hybrids as evidence for past range dynamics in *Sempervivum* (Crassulaceae), a western Eurasian high mountain oreophyte. *Alpine Botany*, 126, 119-133.
- Klimeš, L., Klimešova, J., Hendriks, R., & van Groenendael, J. (1997). Clonal plant architecture: a comparative analysis of form and function. In: H. de Kroon & J. van Groenendael (Eds.), *The ecology and evolution of clonal plants*. (pp. 1–29). Backhuys Publishers.
- Kobayashi, Y., Murata, M., Minami, H., Yamamoto, S., Kagaya, Y., Hobo, T., Yamamoto, A., & Hattori, T. (2005). Absciscic acid-activated SNRK2 protein kinases function in the gene-

regulation pathway of ABA signal transduction by phosphorylating ABA response element-binding factors. *The Plant Journal*, 44, 939-949.

Kocsy, G., Tari, I., Vanková, R., Zechmann, B., Gulyás, Z., Poór, P., & Galiba, G. (2013). Redox control of plant growth and development. *Plant Science*, 211, 77-91.

Koo, A. J. K., Chung, H. S., Kobayashi, Y., & Howe, G. A. (2006). Identification of a peroxisomal acyl-activating enzyme involved in the biosynthesis of jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 33511-33520.

Kooyers, N. J. (2015). The evolution of drought escape and avoidance in natural herbaceous populations. *Plant Science*, 234, 155-162.

Körner, C. (2003). *Alpine plant life: Functional plant ecology of high mountain ecosystems*. Second edition. Springer.

Krieger-Liszkay, A. (2005). Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 56, 337-346.

Kumar, A., Prasad, A., Sedlářová, M., Kale, R., Frankel, L. K., Sallans, L., Bricker, T. M., & Pospíšil, P. (2021). Tocopherol controls D1 amino acid oxidation by oxygen radicals in Photosystem II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118, e2019246118.

Kyparissis, A., Petropoulou, Y., & Manetas, Y. (1995). Summer survival of leaves in a soft-leaved shrub (*Phlomis fruticosa* L., Labiatae) under Mediterranean field conditions: Avoidance of photoinhibitory damage through decreased chlorophyll contents. *Journal of Experimental Botany*, 46, 1825-1831.

Laloi, C., & Havaux, M. (2015). Key players of singlet oxygen-induced cell death in plants. *Frontiers in Plant Science*, 6, 39.

Lambers, H., & Oliveira, R. S. (2019). *Plant physiological ecology*. Third edition. Springer International Publishing.

Langgut, D., Cheddadi, R., Carrión, J. S., Cavanagh, M., Colombaroli, D., Eastwood, W. J., Greenberg, R., Litt, T., Mercuri, A. M., Miebach, A., Roberts, C. N., Woldring, H., & Woodbridge, J. (2019). The origin and spread of olive cultivation in the Mediterranean Basin: The fossil pollen evidence. *The Holocene*, 29, 902-922.

Larcher, W. (1969). Anwendung und zuverlässigkeit der tetrazolium methode zur feststellung von schäden in pflanzlichen gewebe. *Mikroskopie*, 25, 207-218.

- Larcher, W. (1980). Plants under stress. In: W. Larcher (Ed.), *Physiological plant ecology* (pp. 321-324). Springer.
- Larcher, W., & Wagner, J. (1983). Ökologischer Zeigerwert und physiologische Konstitution von *Sempervivum montanum*. *Verhandlungen - Gesellschaft für Ökologie*, 11, 253-264.
- Larcher, W., Holzner, M. M., & Pichler, J. (1989). Temperaturresistenz inneralpiner Trockenrasen. *Flora*, 183, 115-131.
- Larcher, W., Kainmüller, C., & Wagner, J. (2010). Survival types of high mountain plants under extreme temperatures. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 205, 3-18.
- Laughlin, D. C. (2023). *Plant strategies: The demographic consequences of functional traits in changing environments*. Oxford University Press.
- Lawlor, D. W., & Tezara, W. (2009). Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: A critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Annals of Botany*, 103, 561-579.
- Leigh, A., Sevanto, S., Close, J. D., & Nicotra, A. B. (2017). The influence of leaf size and shape on leaf thermal dynamics: Does theory hold up under natural conditions? *Plant, Cell & Environment*, 40, 237-248.
- Leister, D. (2019). Piecing the puzzle together: The central role of reactive oxygen species and redox hubs in chloroplast retrograde signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*, 30, 1206-1219.
- Leonelli, L., Brooks, M. D., & Niyogi, K. K. (2017). Engineering the lutein epoxide cycle into *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114, E7002-E7008.
- Letsas, A. (1949). *Mythology of agriculture*, Tome I. Thessaloniki, re-edition (1989). Athens: Agricultural Bank of Greece [in Greek].
- Leverett, A., Hartzell, S., Winter, K., Garcia, M., Aranda, J., Virgo, A., Smith, A., Focht, P., Rasmussen-Arda, A., Willats, W. G. T., Cowan-Turner, D., & Borland, A. M. (2023). Dissecting succulence: Crassulacean acid metabolism and hydraulic capacitance are independent adaptations in *Clusia* leaves. *Plant, Cell & Environment*, 46, 1472-1488.
- Levitt, J. (1980). *Responses of plants to environmental stress*. Academic Press.
- Li, Z., Ahn, T. K., Avenson, T. J., Ballottari, M., Cruz, J. A., Kramer, D. M., Bassi, R., Fleming, G. R., Keasling, J. D., & Niyogi, K. K. (2009). Lutein accumulation in the absence of zeaxanthin

restores nonphotochemical quenching in the *Arabidopsis thaliana npq1* mutant. *The Plant Cell*, 21, 1798-1812.

Li, Z., Wang, F., Zhao, Q., Liu, J., & Cheng, F. (2018). Involvement of NADPH oxidase isoforms in the production of O₂⁻ manipulated by ABA in the senescing leaves of early-senescence-leaf (*esl*) mutant rice (*Oryza sativa*). *PLoS ONE*, 13, e0190161.

Liao, W., Li, Y., Yang, Y., Wang, G., & Peng, M. (2016). Exposure to various abscission-promoting treatments suggests substantial ERF subfamily transcription factors involvement in the regulation of *Cassava* leaf abscission. *BMC Genomics*, 17, 538.

Lichtenthaler, H. K. (1988). *In vivo* chlorophyll fluorescence as a tool for stress detection in plants. In: H. K. Lichtenthaler (Ed.), *Applications of chlorophyll fluorescence in photosynthesis research, stress physiology, hydrobiology and remote sensing* (pp. 129-142). Springer.

Lichtenthaler, H. K. (1996). Vegetation stress: An introduction to the stress concept in plants. *Journal of Plant Physiology*, 148, 4-14.

Lim, P. O., Kim, H. J., & Nam, H. G. (2007). Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 115-136.

Liu, H. L., Kao, T. H., & Chen, B. H. (2004). Determination of carotenoids in the chinese medical herb Jiao-Gu-Lan (*Gynostemma pentaphyllum* makino) by liquid chromatography. *Chromatographia*, 60, 411-417.

Liu, X., Cheng, L., Li, R., Cai, Y., Wang, X., Fu, X., Dong, X., Qi, M., Jiang, C.-Z., Xu, T., & Li, T. (2022). The HD-Zip transcription factor SIHB15A regulates abscission by modulating jasmonoyl-isoleucine biosynthesis. *Plant Physiology*, 189, 2396.

Liu, Y., Zhang, T., Li, X., & Wang, G. (2007). Protective mechanism of desiccation tolerance in *Reaumuria soongorica*: Leaf abscission and sucrose accumulation in the stem. *Science in China Series C: Life Sciences*, 50, 15-21.

Liu, Y. D., Yin, Z. J., Yu, J. W., Li, J., Wei, H. L., Han, X. L., & Shen, F. F. (2012). Improved salt tolerance and delayed leaf senescence in transgenic cotton expressing the *Agrobacterium IPT* gene. *Biologia Plantarum*, 56, 237-246.

Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J. J., & Solano, R. (2003). *ETHYLENE RESPONSE FACTOR1* integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *The Plant Cell*, 15, 165-178.

- Loumou, A., & Giourga, C. (2003). Olive groves: ``The life and identity of the Mediterranean''. *Agriculture & Human Values*, 20, 87-95.
- Lu, C., Qiu, N., Lu, Q., Wang, B., & Kuang, T. (2003). PSII photochemistry, thermal energy dissipation, and the xanthophyll cycle in *Kalanchoë daigremontiana* exposed to a combination of water stress and high light. *Physiologia Plantarum*, 118, 173-182.
- Ludlow, M. M. (1989). Strategies of response to water stress. In: K. H. Kreeb, H. Richter, & T. M. Hinckley (Eds.), *Structural and functional responses to environmental stresses* (pp. 269-281). SPB Academic Publishers.
- Ma, J., Qiu, D., Pang, Y., Gao, H., Wang, X., & Qin, Y. (2020). Diverse roles of tocopherols in response to abiotic and biotic stresses and strategies for genetic biofortification in plants. *Molecular Breeding*, 40, 1-15.
- Macková, H., Hronková, M., Dobrá, J., Turečková, V., Novák, O., Lubovská, Z., Motyka, V., Haisel, D., Hájek, T., Prášil, I. T., Gaudinová, A., Štorchová, H., Ge, E., Werner, T., Schmülling, T., & Vanková, R. (2013). Enhanced drought and heat stress tolerance of tobacco plants with ectopically enhanced cytokinin oxidase/dehydrogenase gene expression. *Journal of Experimental Botany*, 64, 2805-2815.
- Mahmud, S., Ullah, C., Kortz, A., Bhattacharyya, S., Yu, P., Gershenzon, J., & Vothknecht, U. C. (2022). Constitutive expression of *JASMONATE RESISTANT 1* induces molecular changes that prime the plants to better withstand drought. *Plant, Cell & Environment*, 45, 2906-2922.
- Maitra, S., Hossain, A., Sahu, C., Mishra, U. N., Banerjee, P., Bhadra, P., Praharaj, S., Shankar, T., & Bhattacharya, U. (2021). The role of gibberellin against abiotic stress tolerance in plants. In: S. Fahad, O. Sonmez, S. Saud, D. Wang, C. Wu, M. Adnan, & V. Turan (Eds.), *Plant growth regulators for climate-smart agriculture*. CRC Press.
- Majda, M., & Robert, S. (2018). The role of auxin in cell wall expansion. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 951.
- Makhmudov S. A. (1983). A study on chlorophyll formation in wheat leaves under moisture stress. *Field Crops Abstracts*, 39, 1753.
- Mandaokar, A., Thines, B., Shin, B., Lange, B. M., Choi, G., Koo, Y. J., Yoo, Y. J., Choi, Y. D., Choi, G., & Browse, J. (2006). Transcriptional regulators of stamen development in *Arabidopsis* identified by transcriptional profiling. *The Plant Journal*, 46, 984-1008.

- Mao, C., Lu, S., Lv, B., Zhang, B., Shen, J., He, J., Luo, L., Xi, D., Chen, X., & Ming, F. (2017). A rice NAC transcription factor promotes leaf senescence via ABA biosynthesis. *Plant Physiology*, 174, 1747-1763.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2024a). *Boletín del mercado de aceite de oliva. Campaña 2023/2024*. https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/boletindemercadoaceitedeoliva-octubre2024_tcm30-695994.pdf.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2024b). *Balance del sector del olivar en España. Campaña 2022/2023*. https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/balancesdecampana2022-2023definitivo__tcm30-684024.pdf.
- May, J. D., & Killingbeck, K. T. (1992). Effects of preventing nutrient resorption on plant fitness and foliar nutrient dynamics. *Ecology*, 73, 1868-1878.
- McDowell, N. G. (2011). Mechanisms linking drought, hydraulics, carbon metabolism, and vegetation mortality. *Plant Physiology*, 155, 1051-1059.
- McDowell, N. G., Pockman, W. T., Allen, C. D., Breshears, D. D., Cobb, N., Kolb, T., Plaut, J., Sperry, J., West, A., Williams, D. G., & Yezzer, E. A. (2008). Mechanisms of plant survival and mortality during drought: Why do some plants survive while others succumb to drought? *New Phytologist*, 178, 719-739.
- McDowell, N. G., Sapes, G., Pivovarov, A., Adams, H. D., Allen, C. D., Anderegg, W. R. L., Arend, M., Breshears, D. D., Brodribb, T., Choat, B., Cochard, H., De Cáceres, M., De Kauwe, M. G., Grossiord, C., Hammond, W. M., Hartmann, H., Hoch, G., Kahmen, A., Klein, T., Mackay, D. S., Mantova, M., Martínez-Vilalta, J., Medlyn, B. E., Mencuccini, M., Nardini, A., Oliveira, R. S., Sala, A., Tissue, D. T., Torres-Ruiz, J. M., Trowbridge, A. M., Trugman, A. T., Wiley, E., & Xu, C. (2022). Mechanisms of woody-plant mortality under rising drought, CO₂ and vapour pressure deficit. *Nature Reviews Earth & Environment*, 3, 294-308.
- McIntyre, K. E., Bush, D. R., & Argueso, C. T. (2021). Cytokinin regulation of source-sink relationships in plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science*, 12, 677585.
- McKee, T. B., Doesken, N. J., & Kleist, J. (1993). The relationship of drought frequency and duration of time scales. *Eighth Conference on Applied Climatology, American Meteorological Society*, 17-23 January 1993, Anaheim, CA, pp. 179-186.
- McKim, S. M., Stenvik, G.-E., Butenko, M. A., Kristiansen, W., Cho, S. K., Hepworth, S. R., Aalen, R. B., & Haughn, G. W. (2008). The *BLADE-ON-PETIOLE* genes are essential for abscission zone formation in *Arabidopsis*. *Development*, 135, 1537-1546.

- Meir, S., Sundaresan, S., Riov, J., Agarwal, I., & Philosoph-Hadas, S. (2015). Role of auxin depletion in abscission control. *Stewart Postharvest Review*, 11, 1-15.
- Melis, A. (1999). Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: What modulates the rate of photodamage *in vivo*? *Trends in Plant Science*, 4, 130-135.
- Mencuccini, M., Manzoni, S., & Christoffersen, B. (2019). Modelling water fluxes in plants: From tissues to biosphere. *New Phytologist*, 222, 1207–1222.
- Mencuccini, M., Anderegg, W. R. L., Binks, O., Knipfer, T., Konings, A. G., Novick, K., Poyatos, R., & Martínez-Vilalta, J. (2024). A new empirical framework to quantify the hydraulic effects of soil and atmospheric drivers on plant water status. *Global Change Biology*, 30, e17222.
- Mesa, T., & Munné-Bosch, S. (2023). α -Tocopherol in chloroplasts: Nothing more than an antioxidant? *Current Opinion in Plant Biology*, 74, 102400.
- Mishra, A. K., & Singh, V. P. (2010). A review of drought concepts. *Journal of Hydrology*, 391, 202-216.
- Mittler, R. (2017). ROS are good. *Trends in Plant Science*, 22, 11-19.
- Mittler, R., Zandalinas, S. I., Fichman, Y., & Van Breusegem, F. (2022). Reactive oxygen species signalling in plant stress responses. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23, 663-679.
- Monte, I., Kneeshaw, S., Franco-Zorrilla, J. M., Chini, A., Zamarreño, A. M., García-Mina, J. M., & Solano, R. (2020). An ancient COI1-independent function for reactive electrophilic oxylipins in thermotolerance. *Current Biology*, 30, 962-971.e3.
- Morales, M., Garcia, Q. S., & Munné-Bosch, S. (2015). Ecophysiological response to seasonal variations in water availability in the arborescent, endemic plant *Vellozia gigantea*. *Tree Physiology*, 35, 253-265.
- Morales, M., & Munné-Bosch, S. (2019). Malondialdehyde: Facts and artifacts. *Plant Physiology*, 180, 1246-1250.
- Morales, M., & Munné-Bosch, S. (2024). Hormonal response to recurrent seasonal stress in coastal and mountain scabiouses growing in their natural habitat: Linking ABA and jasmonates with photoprotection. *Physiologia Plantarum*, 176, e14265.
- Müller, L., Theile, K., & Böhm, V. (2010). *In vitro* antioxidant activity of tocopherols and tocotrienols and comparison of vitamin E concentration and lipophilic antioxidant capacity in human plasma. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54, 731-742.

- Müller, M., & Munné-Bosch, S. (2015). Ethylene Response Factors: A key regulatory hub in hormone and stress signaling. *Plant Physiology*, 169, 32-41.
- Müller, M., & Munné-Bosch, S. (2021). Hormonal impact on photosynthesis and photoprotection in plants. *Plant Physiology*, 185, 1500-1522.
- Munemasa, S., Oda, K., Watanabe-Sugimoto, M., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., & Murata, Y. (2007). The *coronatine-insensitive 1* mutation reveals the hormonal signaling interaction between abscisic acid and methyl jasmonate in arabidopsis guard cells. Specific impairment of ion channel activation and second messenger production. *Plant Physiology*, 143, 1398-1407.
- Munné-Bosch, S. (2005). The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 162, 743-748.
- Munné-Bosch, S., & Alegre, L. (2000). Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta*, 210, 925-931.
- Munné-Bosch, S., & Alegre, L. (2002). The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21, 31-57.
- Munné-Bosch, S., & Alegre, L. (2002). Plant aging increases oxidative stress in chloroplasts. *Planta*, 214, 608-615.
- Munné-Bosch, S., & Alegre, L. (2004). Die and let live: Leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Functional Plant Biology*, 31, 203-216.
- Munné-Bosch, S., Jubany-Marí, T., & Alegre, L. (2001). Drought-induced senescence is characterized by a loss of antioxidant defences in chloroplasts. *Plant, Cell & Environment*, 24, 1319-1327.
- Munné-Bosch, S., Falara, V., Pateraki, I., López-Carbonell, M., Cela, J., & Kanellis, A. K. (2009). Physiological and molecular responses of the isoprenoid biosynthetic pathway in a drought-resistant Mediterranean shrub, *Cistus creticus* exposed to water deficit. *Journal of Plant Physiology*, 166, 136-145.
- Munné-Bosch, S., & Peñuelas, J. (2003). Photo- and antioxidative protection, and a role for salicylic acid during drought and recovery in field-grown *Phillyrea angustifolia* plants. *Planta*, 217, 758-766.

- Munné-Bosch, S., & Villadangos, S. (2023). Cheap, cost-effective, and quick stress biomarkers for drought stress detection and monitoring in plants. *Trends in Plant Science*, 28, 527-536.
- Munné-Bosch, S., Weiler, E. W., Alegre, L., Müller, M., Dückting, P., & Falk, J. (2007). α -Tocopherol may influence cellular signaling by modulating jasmonic acid levels in plants. *Planta*, 225, 681-691.
- Muñoz, P., & Munné-Bosch, S. (2019). Vitamin E in plants: Biosynthesis, transport, and function. *Trends in Plant Science*, 24, 1040-1051.
- Muñoz, P., & Munné-Bosch, S. (2020). Oxylipins in plastidial retrograde signaling. *Redox Biology*, 37, 101717.
- Muñoz, P., Tijero, V., Vincent, C., & Munné-Bosch, S. (2024). Absciscic acid triggers vitamin E accumulation by transient transcript activation of *VTE5* and *VTE6* in sweet cherry fruits. *Biochemical Journal*, 481, 279-293.
- Muñoz-Espinoza, V. A., López-Climent, M. F., Casaretto, J. A., & Gómez-Cadenas, A. (2015). Water stress responses of tomato mutants impaired in hormone biosynthesis reveal absciscic acid, jasmonic acid and salicylic acid interactions. *Frontiers in Plant Science*, 6, 997.
- Nakanishi, K., Fujiki, H., Ozaki, K., Yanahara, S., Takeuchi, N., Suzuki, Y., Sugiyama, T., Makino, A., Ookawa, T., & Hirasawa, T. (2024). Decrease of cytokinin flux from roots enhances degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: a mechanism of the accelerated decrease of leaf photosynthesis with senescence under soil moisture stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Soil*, 496, 391–411.
- Navabpour, S., Morris, K., Allen, R., Harrison, E., A-H-Mackerness, S., & Buchanan-Wollaston, V. (2003). Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, 54, 2285-2292.
- Negin, B., & Moshelion, M. (2016). The evolution of the role of ABA in the regulation of water-use efficiency: From biochemical mechanisms to stomatal conductance. *Plant Science*, 251, 82-89.
- Nelson, N., & Yocum, C. F. (2006). Structure and function of photosystems I and II. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 521-565.
- Ng, L. M., Melcher, K., Teh, B. T., & Xu, H. E. (2014). Absciscic acid perception and signaling: Structural mechanisms and applications. *Acta Pharmacologica Sinica*, 35, 567-584.

- Nickelsen, J., & Rengstl, B. (2013). Photosystem II assembly: From cyanobacteria to plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 609-635.
- Niinemets, Ü. (2010). Mild versus severe stress and BVOCs: Thresholds, priming and consequences. *Trends in Plant Science*, 15, 145-153.
- Nir, I., Moshelion, M., & Weiss, D. (2014). The *Arabidopsis GIBBERELLIN METHYL TRANSFERASE 1* suppresses gibberellin activity, reduces whole-plant transpiration and promotes drought tolerance in transgenic tomato. *Plant, Cell & Environment*, 37, 113-123.
- Nishiyama, R., Watanabe, Y., Fujita, Y., Le, D. T., Kojima, M., Werner, T., Vankova, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Kakimoto, T., Sakakibara, H., Schmölling, T., & Tran, L.-S. P. (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*, 23, 2169-2183.
- Nishiyama, Y., Takechi, K., Nanjo, Y., Murata, N., & Hayashi, H. (2006). Acclimation of photosystem II to high temperature in a suspension culture of soybean (*Glycine max.*) cells requires proteins that are associated with the thylakoid membrane. *Photosynthesis Research*, 90, 223-232.
- Nogués, S., & Baker, N. R. (2000). Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plants grown under enhanced UV-B radiation. *Journal of Experimental Botany*, 51, 1309-1317.
- Noodén, L. D. (1988). The phenomena of senescence and aging. In: L. D. Noodén & A. C. Leopold (Eds.), *Senescence and aging in plants* (pp. 1-50). Academic Press.
- Obeso, J. R. (2002). The costs of reproduction in plants. *New Phytologist*, 155, 321-348.
- Oertli, J. J., Lips, S. H., & Agami, M. (1990). The strength of sclerophyllous cells to resist collapse due to negative turgor pressure. *Acta Oecologica*, 11, 281-289.
- Ogawa, D., Nakajima, N., Sano, T., Tamaoki, M., Aono, M., Kubo, A., Kanna, M., Ioki, M., Kamada, H., & Saji, H. (2005). Salicylic acid accumulation under O₃ exposure is regulated by ethylene in tobacco plants. *Plant & Cell Physiology*, 46, 1062-1072.
- Ogburn, R. M., & Edwards, E. J. (2010). Chapter 4 - The ecological water-use strategies of succulent plants. In: J.-C. Kader & M. Delseny (Eds.), *Advances in Botanical Research* (Vol 55, pp. 179-225). Academic Press.

- Oleksyn, J., Modrzyński, J., Tjoelker, M. G., Żytkowiak, R., Reich, P. B., & Karolewski, P. (1998). Growth and physiology of *Picea abies* populations from elevational transects: Common garden evidence for altitudinal ecotypes and cold adaptation. *Functional Ecology*, 12, 573-590.
- Oliver, M. J., Farrant, J. M., Hilhorst, H. W. M., Mundree, S., Williams, B., & Bewley, J. D. (2020). Desiccation tolerance: Avoiding cellular damage during drying and rehydration. *Annual Review of Plant Biology*, 71, 435-460.
- Osmond, C. B., Ziegler, H., Stichler, W., & Trimborn, P. (1975). Carbon isotope discrimination in alpine succulent plants supposed to be capable of crassulacean acid metabolism (CAM). *Oecologia*, 18, 209-217.
- Parnell, J., & Favarger, C. (1993). *Sempervivum* L., *Jovibarba* Opiz. In: T. G. Tutin, N. A. Burges, A. O. Chater, J. R. Edmondson, V. H. Heywood, D. M. Moore, D. H. Valentine, S. M. Walters, & D. A. Webb (Eds.), *Flora europaea* (pp. 425–428). Cambridge University Press.
- Patharkar, O. R., & Walker, J. C. (2015). Floral organ abscission is regulated by a positive feedback loop. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, 2906-2911.
- Patharkar, O. R., & Walker, J. C. (2016). Core mechanisms regulating developmentally timed and environmentally triggered abscission. *Plant Physiology*, 172, 510-520.
- Patharkar, O. R., & Walker, J. C. (2018). Advances in abscission signaling. *Journal of Experimental Botany*, 69, 733-740.
- Patil, V. N., & Dadlani, M. V. (2009). Tetrazolium test for seed viability and vigour. In: M. B. McDonald & F. Y. Kwon (Eds.), *Flower seeds: Biology and technology handbook* (pp. 209-241). Oxfordshire.
- Patterson, S. E. (2001). Cutting loose. Abscission and dehiscence in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 126, 494-500.
- Patterson, S. E., & Bleecker, A. B. (2004). Ethylene-dependent and -independent processes associated with floral organ abscission in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 134, 194-203.
- Pavanetto, N., Carmona, C. P., Laanisto, L., Niinemets, Ü., & Puglielli, G. (2024). Trait dimensions of abiotic stress tolerance in woody plants of the Northern Hemisphere. *Global Ecology & Biogeography*, 33, 272-285.
- Peer, W. A., Cheng, Y., & Murphy, A. S. (2013). Evidence of oxidative attenuation of auxin signalling. *Journal of Experimental Botany*, 64, 2629-2639.

- Peguero-Pina, J. J., Vilagrosa, A., Alonso-Forn, D., Ferrio, J. P., Sancho-Knapik, D., & Gil-Pelegrín, E. (2020). Living in drylands: Functional adaptations of trees and shrubs to cope with high temperatures and water scarcity. *Forests*, 11, 1028.
- Perdomo, J. A., Capó-Bauçà, S., Carmo-Silva, E., & Galmés, J. (2017). Rubisco and Rubisco Activase play an important role in the biochemical limitations of photosynthesis in rice, wheat, and maize under high temperature and water deficit. *Frontiers in Plant Science*, 8, 240508.
- 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, 3143-3156.
- Pfannschmidt, T., Terry, M. J., Aken, O. V., & Quiros, P. M. (2020). Retrograde signals from endosymbiotic organelles: A common control principle in eukaryotic cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, 375, 20190396.
- Pitelka, L. F., & Asmund, J. W. (1985). Physiology and integration of ramets in clonal plants. In: J. Jackson, L. C. Buss, & R.E. Cook (Eds.), *The population biology and evolution of clonal organisms*, (pp. 399-437). Yale University Press.
- Poyatos, R., Aguadé, D., Galiano, L., Mencuccini, M., & Martínez-Vilalta, J. (2013). Drought-induced defoliation and long periods of near-zero gas exchange play a key role in accentuating metabolic decline of Scots pine. *New Phytologist*, 200, 388-401.
- Prochazkova, D., Sairam, R. K., Srivastava, G. C., & Singh, D. V. (2001). Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Science*, 161, 765-771.
- Pospíšil, P., & Yamamoto, Y. (2017). Damage to photosystem II by lipid peroxidation products. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1861, 457-466.
- Praeger, R. L., 1932. *An account of the Sempervivum group*. Royal Horticultural Society.
- Prasch, C. M., & Sonnewald, U. (2013). Simultaneous application of heat, drought, and virus to *Arabidopsis* plants reveals significant shifts in signaling networks. *Plant Physiology*, 162, 1849-1866.

- Primka, E. J., & Smith, W. K. (2019). Synchrony in fall leaf drop: Chlorophyll degradation, color change, and abscission layer formation in three temperate deciduous tree species. *American Journal of Botany*, 106, 377-388.
- Prodhan, M. Y., Munemasa, S., Nahar, M. N.-E.-N., Nakamura, Y., & Murata, Y. (2018). Guard cell salicylic acid signaling is integrated into abscisic acid signaling via the Ca^{2+} /CPK-dependent pathway. *Plant Physiology*, 178, 441-450.
- Quirino, B. F. (2000). Molecular aspects of leaf senescence. *Trends in Plant Science*, 5, 278-282.
- Raghavendra, A. S., Gonugunta, V. K., Christmann, A., & Grill, E. (2010). ABA perception and signalling. *Trends in Plant Science*, 15, 395-401.
- Ramel, F., Birtic, S., Ginies, C., Soubigou-Taconnat, L., Triantaphylidès, C., & Havaux, M. (2012). Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 5535.
- Ranjan, A., Sinha, R., Singla-Pareek, S. L., Pareek, A., & Singh, A. K. (2022). Shaping the root system architecture in plants for adaptation to drought stress. *Physiologia Plantarum*, 174, e13651.
- Rapp, R. A., & Wendel, J. F. (2005). Epigenetics and plant evolution. *New Phytologist*, 168, 81-91.
- Raskin, I. (1992). Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 43, 439-463.
- Reddy, S. H., Singhal, R. K., DaCosta, M. V. J., Kambalimath, S. K., Rajanna, M. P., Muthurajan, R., Sevanthi, A. M., Mohapatra, T., Sarla, N., Chinnusamy, V., S, G. K., Singh, A. K., Singh, N. K., Sharma, R. P., Pathappa, N., & Sheshshayee, S. M. (2020). Leaf mass area determines water use efficiency through its influence on carbon gain in rice mutants. *Physiologia Plantarum*, 169, 194-213.
- Ren, W., García-Palacios, P., Soliveres, S., Prieto, I., Maestre, F. T., & Querejeta, J. I. (2024). Pushing the limits of C3 intrinsic water use efficiency in Mediterranean semiarid steppes: Responses of a drought-avoider perennial grass to climate aridification. *Functional Ecology*, 38, 955-966.
- Ripley, B. S., Abraham, T., Klak, C., & Cramer, M. D. (2013). How succulent leaves of Aizoaceae avoid mesophyll conductance limitations of photosynthesis and survive drought. *Journal of Experimental Botany*, 64, 5485-5496.

- Rise, M., Cojocaru, M., Gottlieb, H. E., & Goldschmidt, E. E. (1989). Accumulation of α -tocopherol in senescing organs as related to chlorophyll degradation. *Plant Physiology*, 89, 1028-1030.
- Rivero, R. M., Kojima, M., Gepstein, A., Sakakibara, H., Mittler, R., Gepstein, S., & Blumwald, E. (2007). Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 19631-19636.
- Rivero, R. M., Mestre, T. C., Mittler, R., Rubio, F., Garcia-Sanchez, F., & Martinez, V. (2014). The combined effect of salinity and heat reveals a specific physiological, biochemical and molecular response in tomato plants. *Plant, Cell & Environment*, 37, 1059-1073.
- Rodriguez-Dominguez, C. M., & Brodribb, T. J. (2020). Declining root water transport drives stomatal closure in olive under moderate water stress. *New Phytologist*, 225, 126-134.
- Rohde, A., & Bhalerao, R. P. (2007). Plant dormancy in the perennial context. *Trends in Plant Science*, 12, 217-223.
- Roiloa, S. R., & Retuerto, R. (2006). Physiological integration ameliorates effects of serpentine soils in the clonal herb *Fragaria vesca*. *Physiologia Plantarum*, 128, 662-676.
- Roiloa, S. R., Retuerto, R., Campoy, J. G., Novoa, A., & Barreiro, R. (2014). Division of labor brings greater benefits to clones of *Carpobrotus edulis* in the non-native range: Evidence for rapid adaptive evolution. *Frontiers in Plant Science*, 7, 349.
- Sakamoto, M., Munemura, I., Tomita, R., & Kobayashi, K. (2008a). Reactive oxygen species in leaf abscission signaling. *Plant Signaling & Behavior*, 3, 1014-1015.
- Sakamoto, M., Munemura, I., Tomita, R., & Kobayashi, K. (2008b). Involvement of hydrogen peroxide in leaf abscission signaling, revealed by analysis with an *in vitro* abscission system in *Capsicum* plants. *The Plant Journal*, 56, 13-27.
- Salazar-Irribé, A., & De-la-Peña, C. (2020). Auxins, the hidden player in chloroplast development. *Plant Cell Reports*, 39, 1595-1608.
- Samaniego, L., Thober, S., Kumar, R., Wanders, N., Rakovec, O., Pan, M., Zink, M., Sheffield, J., Wood, E. F., & Marx, A. (2018). Anthropogenic warming exacerbates European soil moisture droughts. *Nature Climate Change*, 8, 421-426.
- Sammarco, I., Díez Rodríguez, B., Galanti, D., Nunn, A., Becker, C., Bossdorf, O., Münzbergová, Z., & Latzel, V. (2024). DNA methylation in the wild: Epigenetic

- transgenerational inheritance can mediate adaptation in clones of wild strawberry (*Fragaria vesca*). *New Phytologist*, 241, 1621-1635.
- Sánchez-Romera, B., Ruiz-Lozano, J. M., Li, G., Luu, D.-T., Martínez-Ballesta, M. D. C., Carvajal, M., Zamarreño, A. M., García-Mina, J. M., Maurel, C., & Aroca, R. (2014). Enhancement of root hydraulic conductivity by methyl jasmonate and the role of calcium and abscisic acid in this process. *Plant, Cell & Environment*, 37, 995-1008.
- Sadhukhan, A., Prasad, S. S., Mitra, J., Siddiqui, N., Sahoo, L., Kobayashi, Y., & Koyama, H. (2022). How do plants remember drought? *Planta*, 256, 1-15.
- Sandorf, I., & Holländer-Czytko, H. (2002). Jasmonate is involved in the induction of tyrosine aminotransferase and tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 216, 173-179.
- Sato, A., Sato, Y., Fukao, Y., Fujiwara, M., Umezawa, T., Shinozaki, K., Hibi, T., Taniguchi, M., Miyake, H., Goto, D. B., & Uozumi, N. (2009). Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase. *Biochemical Journal*, 424, 439-448.
- Savchenko, T., Kolla, V. A., Wang, C.-Q., Nasafi, Z., Hicks, D. R., Phadungchob, B., Chehab, W. E., Brandizzi, F., Froehlich, J., & Dehesh, K. (2014). Functional convergence of oxylipin and abscisic acid pathways controls stomatal closure in response to drought. *Plant Physiology*, 164, 1151-1160.
- Schardon, K., Hohl, M., Graff, L., Pfannstiel, J., Schulze, W., Stintzi, A., & Schaller, A. (2016). Precursor processing for plant peptide hormone maturation by subtilisin-like serine proteinases. *Science*, 354, 1594-1597.
- Schippers, J. H. M., Schmidt, R., Wagstaff, C., & Jing, H.-C. (2015). Living to die and dying to live: The survival strategy behind leaf senescence. *Plant Physiology*, 169, 914.
- Scott, P. (2000). Resurrection plants and the secrets of eternal leaf. *Annals of Botany*, 85, 159-166.
- Selye, H. (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, 138, 32.
- Seo, J.-S., Joo, J., Kim, M.-J., Kim, Y.-K., Nahm, B. H., Song, S. I., Cheong, J.-J., Lee, J. S., Kim, J.-K., & Choi, Y. D. (2011). OsbHLH148, a basic helix-loop-helix protein, interacts with OsJAZ proteins in a jasmonate signaling pathway leading to drought tolerance in rice. *The Plant Journal*, 65, 907-921.

- Serrano-Notivolí, R., Tejedor, E., Sarricolea, P., Meseguer-Ruiz, O., de Luis, M., Saz, M. Á., Longares, L. A., & Olcina, J. (2023). Unprecedented warmth: A look at Spain's exceptional summer of 2022. *Atmospheric Research*, 293, 106931.
- Servei Meteorològic de Catalunya. (11 de abril de 2024). *Bulletí Climàtic Anual del 2023*. https://static-m.meteo.cat/wordpressweb/wp-content/uploads/2024/04/11112647/BCA_2023.pdf
- Sewelam, N., Kazan, K., Thomas-Hall, S. R., Kidd, B. N., Manners, J. M., & Schenk, P. M. (2013). Ethylene Response Factor 6 is a regulator of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*, 8, e70289.
- Shan, X., Wang, J., Chua, L., Jiang, D., Peng, W., & Xie, D. (2011). The role of *Arabidopsis* Rubisco activase in jasmonate-induced leaf senescence. *Plant Physiology*, 155, 751-764.
- Sharma, M., Gupta, S. K., Majumder, B., Maurya, V. K., Deeba, F., Alam, A., & Pandey, V. (2017). Salicylic acid mediated growth, physiological and proteomic responses in two wheat varieties under drought stress. *Journal of Proteomics*, 163, 28-51.
- Siles, L., Alegre, L., González-Solís, A., Cahoon, E. B., & Munné-Bosch, S. (2018). Transcriptional regulation of vitamin E biosynthesis during germination of dwarf fan palm seeds. *Plant & Cell Physiology*, 59, 2490-2501.
- Skirycz, A., Vandenbroucke, K., Clauw, P., Maleux, K., De Meyer, B., Dhondt, S., Pucci, A., Gonzalez, N., Hoeberichts, F., Tognetti, V. B., Galbiati, M., Tonelli, C., Van Breusegem, F., Vuylsteke, M., & Inzé, D. (2011). Survival and growth of *Arabidopsis* plants given limited water are not equal. *Nature Biotechnology*, 29, 212-214.
- Smith, M. C. (1981). *Sempervivum* (Crassulaceae) in Spain and the Pyrenees. *Lagascalia* 10, 1-23.
- Smith, M. D. (2011). An ecological perspective on extreme climatic events: A synthetic definition and framework to guide future research. *Journal of Ecology*, 99, 656-663.
- Sofo, A. (2011). Drought stress tolerance and photoprotection in two varieties of olive tree. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science*, 61, 711-720.
- Song, S., Qi, T., Huang, H., Ren, Q., Wu, D., Chang, C., Peng, W., Liu, Y., Peng, J., & Xie, D. (2011). The Jasmonate-ZIM domain proteins interact with the R2R3-MYB transcription factors MYB21 and MYB24 to affect jasmonate-regulated stamen development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 23, 1000-1013.

- Song, W.-C., & Brash, A. R. (1991). Purification of an allene oxide synthase and identification of the enzyme as a cytochrome P-450. *Science*, 253, 781-784.
- Sponsel, V. M. (2016). Signal achievements in gibberellin research: The second half-century. *Annual Plant Reviews*, 49, 1-36.
- Stahle, D. W., Fye, F. K., Cook, E. R., & Griffin, R. D. (2007). Tree-ring reconstructed megadroughts over North America since a.d. 1300. *Climatic Change*, 83, 133-149.
- Stamati, K., Hollingsworth, P. M., & Russell, J. (2007). Patterns of clonal diversity in three species of sub-arctic willow (*Salix lanata*, *Salix lapponum* and *Salix herbacea*). *Plant Systematics & Evolution*, 269, 75-88.
- Staswick, P. E., & Tiryaki, I. (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16, 2117-2127.
- Stintzi, A., & Browse, J. (2000). The *Arabidopsis* male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 10625.
- Stotz, H. U., Mueller, S., Zoeller, M., Mueller, M. J., & Berger, S. (2013). TGA transcription factors and jasmonate-independent COI1 signalling regulate specific plant responses to reactive oxylipins. *Journal of Experimental Botany*, 64, 963-975.
- Street, N. R., Skogström, O., Sjödin, A., Tucker, J., Rodríguez-Acosta, M., Nilsson, P., Jansson, S., & Taylor, G. (2006). The genetics and genomics of the drought response in *Populus*. *The Plant Journal*, 48, 321-341.
- Stuefer, J. F. (1998). Two types of division of labour in clonal plants: Benefits, costs and constraints. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution & Systematics*, 1, 47-60.
- Suhita, D., Raghavendra, A. S., Kwak, J. M., & Vavasseur, A. (2004). Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiology*, 134, 1536-1545.
- Sun, T. (2011). The molecular mechanism and evolution of the GA–GID1–DELLA signaling module in plants. *Current Biology*, 21, R338-R345.
- Sun, W., Ma, N., Huang, H., Wei, J., Ma, S., Liu, H., Zhang, S., Zhang, Z., Sui, X., & Li, X. (2021). Photosynthetic contribution and characteristics of cucumber stems and petioles. *BMC Plant Biology*, 21, 454.
- Suzuki, N., Bassil, E., Hamilton, J. S., Inupakutika, M. A., Zandalinas, S. I., Tripathy, D., Luo, Y., Dion, E., Fukui, G., Kumazaki, A., Nakano, R., Rivero, R. M., Verbeck, G. F., Azad, R. K.,

- Blumwald, E., & Mittler, R. (2016). ABA is required for plant acclimation to a combination of salt and heat stress. *PLoS ONE*, 11, e0147625.
- Svolacchia, N., & Sabatini, S. (2023). Cytokinins. *Current Biology*, 33, R10-R13.
- Szarka, A., Tomasskovics, B., & Bánhegyi, G. (2012). The ascorbate-glutathione- α -tocopherol triad in abiotic stress response. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 4458-4483.
- Takahashi, S., Bauwe, H., & Badger, M. (2007). Impairment of the photorespiratory pathway accelerates photoinhibition of photosystem II by suppression of repair but not acceleration of damage processes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 144, 487-494.
- Takahashi, S., & Badger, M. R. (2011). Photoprotection in plants: A new light on photosystem II damage. *Trends in Plant Science*, 16, 53-60.
- Takasaki, H., Maruyama, K., Takahashi, F., Fujita, M., Yoshida, T., Nakashima, K., Myouga, F., Toyooka, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2015). SNAC-As, stress-responsive NAC transcription factors, mediate ABA-inducible leaf senescence. *The Plant Journal*, 84, 1114-1123.
- Taki, N., Sasaki-Sekimoto, Y., Obayashi, T., Kikuta, A., Kobayashi, K., Ainai, T., Yagi, K., Sakurai, N., Suzuki, H., Masuda, T., Takamiya, K., Shibata, D., Kobayashi, Y., & Ohta, H. (2005). 12-oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 139, 1268-1283.
- Taylor, J. E., & Whitelaw, C. A. (2001). Signals in abscission. *New Phytologist*, 151, 323-340.
- Thabet, S. G., Jabbour, A. A., Börner, A., Alkhateeb, M. A., Almaroai, Y. A., El Moneim, D. A., & Alqudah, A. M. (2024). Genetic mining of desirable alleles for transgenerational stress memory through enhancing drought adaptation in wheat. *Environmental & Experimental Botany*, 218, 105578.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S. Y., Howe, G. A., & Browse, J. (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCFCOI1 complex during jasmonate signalling. *Nature*, 448, 661-665.
- Tian, Y., Xu, Y.-P., & Wang, G. (2018). Agricultural drought prediction using climate indices based on Support Vector Regression in Xiangjiang River basin. *Science of the Total Environment*, 622-623, 710-720.
- Thomas, F. M. (2014). Ecology of phreatophytes. In: U. Lüttge, W. Beyschlag, & J. Cushman (Eds), *Progress in botany* (Vol 75, pp. 335-375). Springer.

- Thompson, A. J., Jackson, A. C., Parker, R. A., Morpeth, D. R., Burbidge, A., & Taylor, I. B. (2000). Absciscic acid biosynthesis in tomato: Regulation of zeaxanthin epoxidase and 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase mRNAs by light/dark cycles, water stress and absciscic acid. *Plant Molecular Biology*, 42, 833-845.
- Thompson, A. J., Mulholland, B. J., Jackson, A. C., Mckee, J. M. T., Hilton, H. W., Symonds, R. C., Sonneveld, T., Burbidge, A., Stevenson, P., & Taylor, I. B. (2007). Regulation and manipulation of ABA biosynthesis in roots. *Plant, Cell & Environment*, 30, 67-78.
- Tognetti, R., d'Andria, R., Morelli, G., Calandrelli, D., & Fragnito, F. (2004). Irrigation effects on daily and seasonal variations of trunk sap flow and leaf water relations in olive trees. *Plant & Soil*, 263, 249-264.
- Tognetti, R., d'Andria, R., Lavini, A., & Morelli, G. (2006). The effect of deficit irrigation on crop yield and vegetative development of *Olea europaea* L. (cvs. Frantoio and Leccino). *European Journal of Agronomy*, 25, 356-364.
- Tognetti, V. B., Mühlenbock, P., & Breusegem, F. V. (2012). Stress homeostasis – the redox and auxin perspective. *Plant, Cell & Environment*, 35, 321-333.
- Torres-Ruiz, J. M., Diaz-Espejo, A., Morales-Sillero, A., Martín-Palomo, M. J., Mayr, S., Beikircher, B., & Fernández, J. E. (2013). Shoot hydraulic characteristics, plant water status and stomatal response in olive trees under different soil water conditions. *Plant & Soil*, 373, 77-87.
- Trabelsi, L., Gargouri, K., Ben Hassena, A., Mbadra, C., Ghrab, M., Ncube, B., Van Staden, J., & Gargouri, R. (2019). Impact of drought and salinity on olive water status and physiological performance in an arid climate. *Agricultural Water Management*, 213, 749-759.
- Trabelsi, L., Gargouri, K., Ghrab, M., Mbadra, C., Ben Hassena, A., Ncube, B., Soua, N., Maktouf, S., Khelifi, M., Van Staden, J., & Gargouri, R. (2024). The effect of drought and saline water on the nutritional behaviour of the olive tree (*Olea europaea* L.) in an arid climate. *South African Journal of Botany*, 165, 126-135.
- Triantaphylidès, C., Krischke, M., Hoeberichts, F. A., Ksas, B., Gresser, G., Havaux, M., Van Breusegem, F., & Mueller, M. J. (2008). Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. *Plant Physiology*, 148, 960-968.
- Triantaphylidès, C., & Havaux, M. (2009). Singlet oxygen in plants: Production, detoxification and signaling. *Trends in Plant Science*, 14, 219-228.

- Tyree, M. T., & Sperry, J. S. (1988). Do woody plants operate near the point of catastrophic xylem dysfunction caused by dynamic water stress?: Answers from a model. *Plant Physiology*, 88, 574-580.
- Ueda, J., & Kato, J. (1980). Isolation and identification of a senescence-promoting substance from wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *Plant Physiology*, 66, 246-249.
- Ueda, J., Miyamoto, K., & Hashimoto, M. (1996). Jasmonates promote abscission in bean petiole explants: Its relationship to the metabolism of cell wall polysaccharides and cellulase activity. *Journal of Plant Growth Regulation*, 15, 189-195.
- Um, T. Y., Lee, H. Y., Lee, S., Chang, S. H., Chung, P. J., Oh, K.-B., Kim, J.-K., Jang, G., & Choi, Y. D. (2018). Jasmonate Zim-Domain protein 9 interacts with slender rice 1 to mediate the antagonistic interaction between jasmonic and gibberellic acid signals in rice. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1866.
- Urano, K., Maruyama, K., Ogata, Y., Morishita, Y., Takeda, M., Sakurai, N., Suzuki, H., Saito, K., Shibata, D., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2009). Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in *Arabidopsis* by metabolomics. *The Plant Journal*, 57, 1065-1078.
- Valladares, F., Sanchez-Gomez, D., & Zavala, M. A. (2006). Quantitative estimation of phenotypic plasticity: Bridging the gap between the evolutionary concept and its ecological applications. *Journal of Ecology*, 94, 1103-1116.
- Van Breusegem, F., & Dat, J. F. (2006). Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiology*, 141, 384-390.
- Van Lanen, H. A. J., Wanders, N., Tallaksen, L. M., & Van Loon, A. F. (2013). Hydrological drought across the world: Impact of climate and physical catchment structure. *Hydrology & Earth System Sciences*, 17, 1715-1732.
- Velappan, Y., Signorelli, S., & Considine, M. J. (2017). Cell cycle arrest in plants: What distinguishes quiescence, dormancy and differentiated G1? *Annals of Botany*, 120, 495-509.
- Verma, V., Ravindran, P., & Kumar, P. P. (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biology*, 16, 86.
- Vick, B. A., & Zimmerman, D. C. (1984). Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiology*, 75, 458.

- Vicré, M., Farrant, J. M., & Driouich, A. (2004). Insights into the cellular mechanisms of desiccation tolerance among angiosperm resurrection plant species. *Plant, Cell & Environment*, 27, 1329-1340.
- Volaire, F. (2018). A unified framework of plant adaptive strategies to drought: Crossing scales and disciplines. *Global Change Biology*, 24, 2929-2938.
- Von Willert, D. J., Eller, B. M., Werger, M. J. A., Brinckmann, E., & Ihlenfeldt, H.-D. (1992). *Life strategies of succulents in deserts: With special reference to the Namib desert*. Cambridge University Press.
- Wagner, J., & Larcher, W. (1981). Dependence of CO₂ gas exchange and acid metabolism of the alpine CAM Plant *Sempervivum montanum* on temperature and light. *Oecologia*, 50, 88-93.
- Wakamatsu, A., Mori, I. C., Matsuura, T., Taniwaki, Y., Ishii, R., & Yoshida, R. (2021). Possible roles for phytohormones in controlling the stomatal behavior of *Mesembryanthemum crystallinum* during the salt-induced transition from C3 to crassulacean acid metabolism. *Journal of Plant Physiology*, 262, 153448.
- Wang, J., Xu, T., Wang, Y., Li, G., Abdullah, I., Zhong, Z., Liu, J., Zhu, W., Wang, L., Wang, D., & Yu, F.-H. (2021). A meta-analysis of effects of physiological integration in clonal plants under homogeneous vs. heterogeneous environments. *Functional Ecology*, 35, 578-589.
- Wang, K. L.-C., Li, H., & Ecker, J. R. (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. *The Plant Cell*, 14, S131-S151.
- Wang, Y., Zhao, J., Lu, W., & Deng, D. (2017). Gibberellin in plant height control: Old player, new story. *Plant Cell Reports*, 36, 391-398.
- Wasternack, C. (2015). How jasmonates earned their laurels: Past and present. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34, 761-794.
- Wasternack, C., & Hause, B. (2013). Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in Annals of Botany. *Annals of Botany*, 111, 1021-1058.
- Weber, H., Chételat, A., Reymond, P., & Farmer, E. E. (2004). Selective and powerful stress gene expression in *Arabidopsis* in response to malondialdehyde. *The Plant Journal*, 37, 877-888.
- Weigel, D., & Colot, V. (2012). Epialleles in plant evolution. *Genome Biology*, 13, 249.

- Welles, S. R., & Funk, J. L. (2021). Patterns of intraspecific trait variation along an aridity gradient suggest both drought escape and drought tolerance strategies in an invasive herb. *Annals of Botany*, 127, 461-471.
- Westoby, M. (1998). A leaf-height-seed (LHS) plant ecology strategy scheme. *Plant & Soil*, 199, 213–227.
- Wilhite, D. A. (2000). Chapter 1 Drought as a natural hazard: Concepts and definitions. In: D. A. Wilhite (Ed.), *Drought: A Global Assessment* (Vol. I, pp. 3-18). Routledge.
- Wingler, A., Marès, M., & Pourtau, N. (2004). Spatial patterns and metabolic regulation of photosynthetic parameters during leaf senescence. *New Phytologist*, 161, 781-789.
- Wright, I. J., Groom, P. K., Lamont, B. B., Poot, P., Prior, L. D., Reich, P. B., Schulze, E.-D., Veneklaas, E. J., & Westoby, M. (2004). Short Communication: Leaf trait relationships in Australian plant species. *Functional Plant Biology*, 31, 551-558.
- Wu, Y., Li, X., Zhang, J., Zhao, H., Tan, S., Xu, W., Pan, J., Yang, F., & Pi, E. (2022). ERF subfamily transcription factors and their function in plant responses to abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1042084.
- Xia, X.-J., Zhou, Y.-H., Shi, K., Zhou, J., Foyer, C. H., & Yu, J.-Q. (2015). Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 66, 2839-2856.
- Xiao, Y., Tang, J., Qing, H., Ouyang, Y., Zhao, Y., Zhou, C., & An, S. (2010). Clonal integration enhances flood tolerance of *Spartina alterniflora* daughter ramets. *Aquatic Botany*, 92, 9-13.
- Xie, D.-X., Feys, B. F., James, S., Nieto-Rostro, M., & Turner, J. G. (1998). COI1: An *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science*, 280, 1091-1094.
- Xu, L., Liu, F., Lechner, E., Genschik, P., Crosby, W. L., Ma, H., Peng, W., Huang, D., & Xie, D. (2002). The SCFCOI1 ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 14, 1919-1935.
- Yang, D.-L., Yao, J., Mei, C.-S., Tong, X.-H., Zeng, L.-J., Li, Q., Xiao, L.-T., Sun, T., Li, J., Deng, X.-W., Lee, C. M., Thomashow, M. F., Yang, Y., He, Z., & He, S. Y. (2012). Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, E1192-E1200.

- Yang, J., Zhang, J., Wang, Z., Zhu, Q., & Liu, L. (2002). Absciscic acid and cytokinins in the root exudates and leaves and their relationship to senescence and remobilization of carbon reserves in rice subjected to water stress during grain filling. *Planta*, 215, 645-652.
- Yang, J. C., Zhang, J. H., Wang, Z. Q., Zhu, Q. S., & Liu, L. J. (2003). Involvement of absciscic acid and cytokinins in the senescence and remobilization of carbon reserves in wheat subjected to water stress during grain filling. *Plant, Cell & Environment*, 26, 1621-1631.
- Yang, J., Worley, E., & Udvardi, M. (2015). A NAP-AAO3 regulatory module promotes chlorophyll degradation via ABA biosynthesis in *Arabidopsis* leaves. *The Plant Cell*, 26, 4862-4874.
- Ye, D., Hu, Y., Song, M., Pan, X., Xie, X., Liu, G., Ye, X., & Dong, M. (2014). Clonality-climate relationships along latitudinal gradient across China: adaptation of clonality to environments. *PLoS ONE*, 9, e94009.
- Yoshida, T., Fujita, Y., Maruyama, K., Mogami, J., Todaka, D., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2015). Four *Arabidopsis* AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in absciscic acid signalling in response to osmotic stress. *Plant, Cell & Environment*, 38, 35-49.
- Young, T. E., Meeley, R. B., & Gallie, D. R. (2004). ACC synthase expression regulates leaf performance and drought tolerance in maize. *The Plant Journal*, 40, 813-825.
- Yu, Q., Hua, X., Yao, H., Zhang, Q., He, J., Peng, L., Li, D., Yang, Y., & Li, X. (2021). Absciscic acid receptors are involved in the jasmonate signaling in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior*, 16, 1948243.
- Zaharia, A., Zaharia, D., Cantor, M., & Buta, E. (2010). Research regarding the effects of water retention mechanisms, resistance to drought, heatstroke and high temperatures of the *Sempervivum* rosettes. *Analele Universitatii Din Craiova*, 90, 568-573.
- Zandalinas, S. I., Balfagón, D., Arbona, V., & Gómez-Cadenas, A. (2017). Modulation of antioxidant defense system is associated with combined drought and heat stress tolerance in citrus. *Frontiers in Plant Science*, 8, 953.
- Zandalinas, S. I., Fritsch, F. B., & Mittler, R. (2021). Global warming, climate change, and environmental pollution: Recipe for a multifactorial stress combination disaster. *Trends in Plant Science*, 26, 588-599.
- Zandalinas, S. I., & Mittler, R. (2022). Plant responses to multifactorial stress combination. *New Phytologist*, 234, 1161-1167.

- Zhang, H., & Sonnewald, U. (2017). Differences and commonalities of plant responses to single and combined stresses. *The Plant Journal*, 90, 839–855.
- Zhang, K., & Gan, S.-S. (2012). An abscisic acid-AtNAP transcription factor-SAG113 Protein Phosphatase 2C regulatory chain for controlling dehydration in senescing *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology*, 158, 961-969.
- Zhang, M., Zhao, R., Huang, K., Wei, Z., Guo, B., Huang, S., Li, Z., Jiang, W., Wu, T., & Du, X. (2023). OsWRKY76 positively regulates drought stress via OsbHLH148-mediated jasmonate signaling in rice. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1168723.
- Zhang, S., Dai, J., & Ge, Q. (2020). Responses of autumn phenology to climate change and the correlations of plant hormone regulation. *Scientific Reports*, 10, 9039.
- Zhang, Y., Ma, Y., Guo, Y., Chen, Y., Yang, M., Ruiqing, F., & Sun, Y. (2022). Physiological and iTRAQ-based proteomic analyses for yellowing of postharvest broccoli heads under elevated O₂ controlled atmosphere. *Scientia Horticulturae*, 294, 110769.
- Zhao, G., Shi, P., Wu, J., Xiong, D., Zong, N., & Zhang, X. (2017). Foliar nutrient resorption patterns of four functional plants along a precipitation gradient on the Tibetan Changtang Plateau. *Ecology & Evolution*, 7, 7201-7212.
- Zhao, L., Zhang, W., Song, Q., Xuan, Y., Li, K., Cheng, L., Qiao, H., Wang, G., & Zhou, C. (2020). A WRKY transcription factor, TaWRKY40-D, promotes leaf senescence associated with jasmonic acid and abscisic acid pathways in wheat. *Plant Biology*, 22, 1072-1085.
- Zhao, M., & Running, S. W. (2010). Drought-induced reduction in global terrestrial net primary production from 2000 through 2009. *Science*, 329, 940-943.
- Zhao, Y., Chan, Z., Gao, J., Xing, L., Cao, M., Yu, C., Hu, Y., You, J., Shi, H., Zhu, Y., Gong, Y., Mu, Z., Wang, H., Deng, X., Wang, P., Bressan, R. A., & Zhu, J.-K. (2016). ABA receptor PYL9 promotes drought resistance and leaf senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, 1949-1954.
- Zhu, T., Zou, L., Li, Y., Yao, X., Xu, F., Deng, X., Zhang, D., & Lin, H. (2018). Mitochondrial alternative oxidase-dependent autophagy involved in ethylene-mediated drought tolerance in *Solanum lycopersicum*. *Plant Biotechnology Journal*, 16, 2063-2076.
- Zhu, X., Chen, J., Xie, Z., Gao, J., Ren, G., Gao, S., Zhou, X., & Kuai, B. (2015). Jasmonic acid promotes degreening via MYC2/3/4- and ANAC019/055/072-mediated regulation of major chlorophyll catabolic genes. *The Plant Journal*, 84, 597-610.

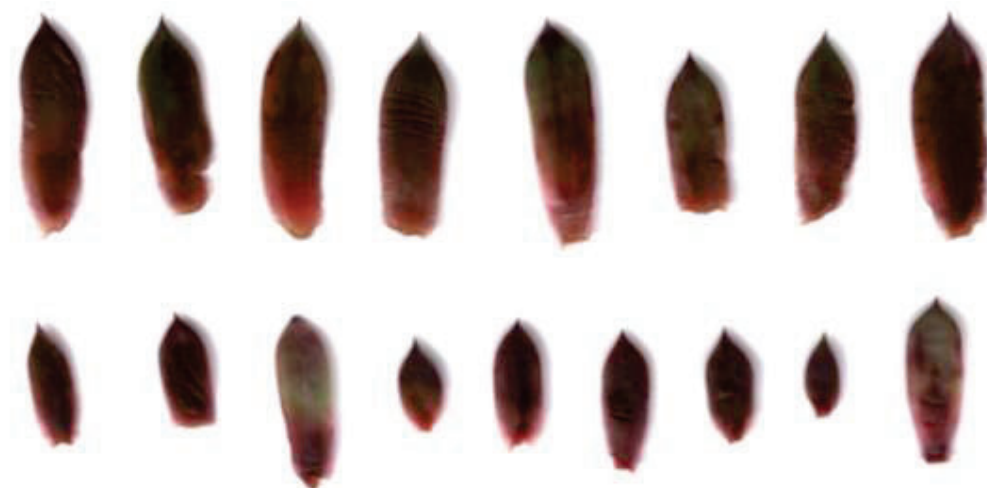
- Zimmermann, P., & Zentgraf, U. (2005). The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 10, 515-534.
- Zwack, P. J., De Clercq, I., Howton, T. C., Hallmark, H. T., Hurny, A., Keshishian, E. A., Parish, A. M., Benkova, E., Mukhtar, M. S., Van Breusegem, F., & Rashotte, A. M. (2016). Cytokinin Response Factor 6 represses cytokinin-associated genes during oxidative stress. *Plant Physiology*, 172, 1249-1258.
- Zwack, P. J., Robinson, B. R., Risley, M. G., & Rashotte, A. M. (2013). Cytokinin Response Factor 6 negatively regulates leaf senescence and is induced in response to cytokinin and numerous abiotic stresses. *Plant & Cell Physiology*, 54, 971-981.

ANEXOS



Anexo I

Test de tetrazolio: revivir un antiguo pero útil marcador de estrés



Annex I. The tetrazolium test: reviving an old but useful stress marker

Sabina Villadangos^{1,2}, Tania Mesa¹, Paula Muñoz¹, Sergi Munné-Bosch^{1,2}

¹Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

²Institute of Research in Biodiversity (IRBio), Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Publicado en **Trends in Plant Science** (2023) 28: 609-610.

RESUMEN

Las condiciones ambientales adversas a menudo comprometen la supervivencia de las plantas. Por ello, el monitoreo del estrés con tecnologías precisas y rentables debe ser una prioridad para anticiparnos a las amenazas ambientales, pero el tiempo de procesamiento y los costes asociados son aún limitaciones importantes. Revisar tecnologías de investigación como los marcadores bioquímicos puede proporcionar datos directos para prever los efectos de los factores estresantes de las plantas. La prueba del tetrazolio está basada en la capacidad de los tejidos vivos de reducir una sal incolora, el cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (TTC), en el compuesto rojo formazan. No solo es útil para los test de viabilidad de semillas, sino también para evaluaciones de daño tisular, como propuso inicialmente Larcher *et al.* (1969).

El test de tetrazolio sobresale como un biomarcador de estrés útil, especialmente cuando se usa junto con otros marcadores, como el contenido hídrico relativo (RWC) y la eficiencia máxima del fotosistema II (PSII) (relación F_v/F_m); predice claramente la muerte, como se ejemplifica aquí en la planta de metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) *Sempervivum tectorum*. Aunque destructivo, este test de viabilidad emerge como el método más rentable para el monitoreo del estrés; ya que requiere poco equipo, refleja rápidamente el estado fisiológico de la planta y, lo que es más importante, prevé la mortalidad de las hojas.

