



**Respuesta metabólica en raíces de portainjertos contrastantes de
Lagenaria siceraria y hojas del injerto *Citrullus lanatus* bajo condiciones de
estrés por sequía**

Raúl Flores Chacón

Tesis para optar al grado de Magíster en Biotecnología

Profesor Guía: Rodrigo Contreras Soto

Profesor Co-Guía: Carlos Maldonado Muñoz

Universidad de O'Higgins

Instituto de Ciencias de la Ingeniería

Instituto de Ciencias Agroalimentarias, Animales y Ambientales

Instituto de Ciencias de la Salud

Región de O'Higgins, Chile

2025

Respuesta metabólica en raíces de portainjertos contrastantes de
Lagenaria siceraria y hojas del injerto *Citrullus lanatus* bajo condiciones de
estrés por sequía

Autores

Raúl Flores Chacón^{1, 2}, Rodrigo Contreras Soto³, Carlos Maldonado Muñoz⁴.

Afiliaciones

¹Laboratorio de Fitopatología Vegetal. Instituto de Ciencias Agroalimentarias, Animales y Ambientales, ICA3, Universidad de O'Higgins. San Fernando, Chile.

²Laboratorio de Mejoramiento Genético Vegetal. ³Instituto de Ciencias Agroalimentarias, Animales y Ambientales, ICA3, Universidad de O'Higgins. San Fernando, Chile.

³Instituto de Ciencias Agroalimentarias, Animales y Ambientales, ICA3, Universidad de O'Higgins. San Fernando, Chile.

⁴Centro de Genómica y Bioinformática, Facultad de Ciencias, Universidad Mayor, Santiago, Chile.

Agradecimientos y financiamiento:

Este proyecto se encuentra financiado por el Proyecto Fondecyt N° 11240273 llamado "Integrative analysis of transcriptomic and metabolomic profiles in *Citrullus lanatus* grafted onto *Lagenaria siceraria* rootstocks in response to drought stress".

Dedicatoria:

Esta tesis va dedicada a distintas personas que me han acompañado durante toda mi carrera académica, las cuales han estado conmigo desde mi época de pregrado hasta esta nueva etapa de magíster; como también a las personas que me han brindado su apoyo en esta nueva etapa de mi vida.

Quiero comenzar agradeciendo a mis padres Raúl Flores Jiménez y María Chacón Pinto por la educación que me dieron, además de su apoyo incondicional en esta nueva etapa. También quiero agradecer a mis hermanos Sebastián Flores Chacón y Estefanía Araneda Chacón, quienes siempre han estado conmigo cuando más los he necesitado. También agradecer a mis abuelos José Chacón y Raquel Pinto, por haberme criado de la mejor manera posible y darme su apoyo siempre.

Agradecer todos los profesores que me han acompañado en este largo camino que termina el día de hoy, como lo son Rodrigo Contreras Soto y Gonzalo Carreño Cáceres, quienes me han acompañado durante mis 8 años de carrera universitaria considerando mi época de estudiante de pregrado y magíster y siempre han estado para apoyarme desde el primer minuto. También quiero agradecer al profesor Carlos Maldonado Muñoz, a quien conocí en esta nueva etapa de estudiante de magister y que desde que comenzamos a trabajar juntos me ha brindado su apoyo tanto en las correcciones de mi escrito, como orientaciones para búsqueda de información.

Otras personas que me han acompañado en este proceso y que también han sido importantes son el profesor Set Pérez Fuentealba, quien fue mi profesor en mi tesis de pregrado, y siguió apoyando en esta nueva etapa, junto con todo el equipo de Fitopatología de la Universidad de O'Higgins; también quiero agradecer a Nicole Cortez Jorquera, quien fue mi profesora en mi tesis de pregrado y fue la persona que me enseñó todos mis conocimientos de biología molecular, estando siempre presente cuando la he necesitado, convirtiéndose en una persona a la que puedo considerar una gran amiga.

Finalmente, quiero agradecer a la profesora Lorena Pizarro y a todos los miembros del equipo de Inmunidad Vegetal, quienes me han dado consejos y apoyo en el desarrollo de mi experimento. También quiero agradecer a todos mis colegas de la comunidad ICA3 de la Universidad de O'Higgins, quienes me recibieron en su grupo y logramos formar una gran amistad a lo largo de estos años. En este ámbito, quiero agradecer de forma especial a Daniela Muñoz, por su gran disposición en enseñarme sobre biología molecular; a Yansai Vergara, quien me ha apoyado en la preparación de material para mis experimentos desde el primer momento. Como mención especial quiero agradecer a Camila Silvi Alarcón, quien desde el momento que llegó a mi vida me ha brindado su apoyo y cariño incondicional, dándome todos los ánimos y energías necesarias para terminar mi etapa universitaria, convirtiéndose en una persona muy importante para mí.

Resumen

La sandía (*Citrullus lanatus*) requiere altos volúmenes de agua para alcanzar un adecuado llenado de frutos, lo que hace crítico el estudio del déficit hídrico en su cultivo. Una estrategia efectiva para enfrentar este problema es el uso de portainjertos tolerantes como *Lagenaria siceraria*, conocidos por sus características morfofisiológicas que favorecen la resistencia al estrés por sequía, además del uso de riego deficitario, para así aplicar la cantidad mínima de riego que necesita el cultivo sin dañar su producción. Este estudio analizó el perfil metabolómico de raíces e injertos en plantas injertadas sobre dos accesiones de *L. siceraria* (Illapel y Philippines) y un homoinjerto de *C. lanatus*, bajo condiciones de riego completo y estrés hídrico. Los resultados revelaron una acumulación diferencial de metabolitos en hojas de *C. lanatus* injertadas sobre Illapel, identificando 16 metabolitos compartidos entre ambos tejidos, asociados principalmente a mecanismos de defensa frente al estrés abiótico. Además, el análisis de enriquecimiento funcional evidenció la activación de rutas metabólicas relacionadas con la osmorregulación, el balance redox y el metabolismo energético, destacando el papel del injerto en la adaptación de la planta al déficit hídrico.

Palabras clave

Citrullus lanatus, sequía, riego deficitario, *Lagenaria siceraria*, metabolitos, producción.

Abstract

Watermelon (*Citrullus lanatus*) requires high volumes of water to achieve adequate fruit set, making the study of water deficit in its cultivation critical. An effective strategy to address this problem is the use of tolerant rootstocks such as *Lagenaria siceraria*, known for their morphophysiological characteristics that favor resistance to drought stress, in addition to the use of deficit irrigation, in order to apply the minimum amount of irrigation required by the crop without damaging its production. This study analyzed the metabolomic profile of roots and scions in plants grafted onto two accessions of *L. siceraria* (Illapel and Philippines) and a *C. lanatus* homograft, under fully irrigated and water stress conditions. The results revealed a differential accumulation of metabolites in leaves of *C. lanatus* grafted onto Illapel, identifying 16 shared metabolites between both genera, mainly associated with defense mechanisms against abiotic stress. Furthermore, functional enrichment analysis showed the activation of metabolic pathways related to osmoregulation, redox balance, and energy metabolism, highlighting the role of grafting in plant adaptation to water deficit.

Key words

Citrullus lanatus, drought, deficit irrigation, *Lagenaria siceraria*, metabolites, production.

Introducción

Citrullus lanatus es una especie frutal de la familia Cucurbitaceae; es el cultivo más importante de esta familia, con 3 millones de hectáreas estimadas en 2022 (FAO, 2022). Los principales productores son China, Turquía e India. En Sudamérica, Brasil lidera con 2 millones de toneladas. En Chile, existen 3.252 hectáreas cultivadas, con una producción promedio de 52.318 toneladas, concentradas entre las regiones del Maule y O'Higgins (ODEPA, 2023). *C. lanatus* se caracteriza por frutos de gran tamaño, con pulpas que varían entre rojo y amarillo, ricos en compuestos como azúcares, aminoácidos, nutrientes y licopenos (Liu *et al.*, 2012). Su consumo entrega beneficios para la salud, aportando aminoácidos esenciales como citrulina, arginina y triptófano (Collins *et al.*, 2007).

El cambio climático, particularmente la sequía, representa un problema creciente para su producción en la zona centro-sur de Chile, donde se proyecta una disminución de 16–17 % en precipitaciones y más de 100 días con temperaturas sobre 30 °C (Araya *et al.*, 2020). Estas condiciones afectan negativamente el rendimiento del cultivo (Aldunce *et al.*, 2017; Morales *et al.*, 2023). Una estrategia para enfrentar el déficit hídrico es el uso de portainjertos tolerantes como *Lagenaria siceraria*, que favorecen el desarrollo de raíces más profundas y una mayor conductancia hidráulica (Suárez *et al.*, 2022; Devi *et al.*, 2020). Asimismo, el riego deficitario (RD), técnica que reduce intencionalmente el suministro de agua, permite mantener la productividad en condiciones limitadas (Ruíz-Sánchez, 2010).

Tanto *C. lanatus* como *L. siceraria* acumulan metabolitos secundarios que otorgan ventajas adaptativas como osmoprotección, eliminación de ROS, fortalecimiento celular y señalización defensiva. El estudio del metaboloma permite analizar estos compuestos y comprender mejor la respuesta de las plantas al estrés, proporcionando una herramienta clave para su caracterización (Ghatak *et al.*, 2018).

Autores como Mashilo *et al.*, 2022 menciona que *C. lanatus* posee distintos metabolitos secundarios como la citrulina, la cual actúa como osmoprotector y antioxidante; carotenoides, que actúan como antioxidantes y protegen a la planta del estrés oxidativo; fenoles, los que eliminan la función de ROS (reactive oxygen species) y fortalecen la estructura celular; glucósidos, que participan en la defensa vegetal y regulación del metabolismo antioxidante celular; o los alcaloides, encargados de regular el estrés de la planta, participan en la señalización y defensa celular. Este conjunto de metabolitos secundarios son claves en la respuesta adaptativa de la planta frente al estrés ambiental, ya que otorgan mecanismos de respuesta a condiciones de estrés tanto biótico (patógenos), como abióticos (sequía, salinidad, temperatura) (Anjum *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018).

Para el caso de *L. siceraria*, otros autores como Mkhize *et al.*, 2023 y Davidovich *et al.*, (2014) indican que las plantas de *L. siceraria* pueden tolerar el estrés por sequía debido a su composición bioquímica única, donde se destacan las cucurbitacinas. Las cucurbitacinas son metabolitos secundarios que otorgan un sabor amargo en las hojas, raíces y frutos de la mayoría de cultivos de cucurbitáceas y son tóxicas cuando se consumen en grandes cantidades. Autores como Maja *et al.*, (2021) indican que las cucurbitacinas se pueden clasificar en distintos grupos (A, B, C, D, E, I, L, Q, R, S y T) y su biosíntesis varía entre los distintos cultivos de cucurbitáceas y los genotipos de la misma especie.

A pesar de ser un cultivo típicamente estival, *C. lanatus* presenta una notable tolerancia a las altas temperaturas. No obstante, su desarrollo óptimo y el adecuado llenado de los frutos requieren un elevado consumo hídrico, lo que convierte al estudio del déficit hídrico en un aspecto crítico. Como se ha evidenciado previamente, una reducción en el suministro de agua puede afectar significativamente la calidad de los frutos. En este contexto, el uso de portainjertos de *L. siceraria* representa una alternativa viable para sostener la producción de *C. lanatus* bajo condiciones de riego restringido. Por ello, resulta fundamental el análisis conjunto de los perfiles transcriptómicos y metabolómicos, tanto en las raíces de los portainjertos de *L. siceraria* como en las hojas del injerto de *C. lanatus*.

Esta aproximación permite profundizar en la comprensión de las respuestas moleculares y fisiológicas de las plantas frente al estrés hídrico, aportando información clave para el desarrollo de estrategias de adaptación en condiciones de limitada disponibilidad de agua.

Hipótesis

Existe una variación en el metaboloma de raíces de portainjertos de *Lagenaria siceraria* y hojas del injerto *Citrullus lanatus* bajo condiciones de estrés hídrico.

Objetivo general

Analizar la respuesta metabolómica en hojas del injerto *Citrullus lanatus* bajo condiciones de estrés por sequía mediante el uso de qRT-PCR.

Objetivos específicos

- Identificar metabolitos diferencialmente expresados en hojas de *Citrullus lanatus* gatillados por el déficit hídrico en dos portainjertos contrastantes de *Lagenaria siceraria* a través de un análisis metabolómico.
- Evaluar a través del tiempo el cambio de nivel transcripcional de genes de tolerancia a estrés hídrico en raíces de *Lagenaria siceraria* y hojas de *Citrullus lanatus* mediante RT-qPCR.

Materiales y métodos

Lugar del ensayo

El experimento se llevó a cabo en las dependencias del Campus Colchagua de la Universidad de O'Higgins, ubicado en Ruta I-90 S/N, Km 3, San Fernando, O'Higgins Los plantines fueron producidos en el Vivero Los Olmos.

Ensayo riego deficitario

El ensayo se llevó a cabo con 20 plantas de *C. lanatus* variedad Santa Amelia injertadas sobre portainjerto Illapel (G23), 20 de *C. lanatus* variedad Santa Amelia injertadas sobre portainjerto Philippines (G21) y 10 plantas de *C. lanatus* variedad Santa Amelia injertada sobre Santa Amelia (homoinjerto) (Figura 1); para el caso de las plantas homoinjertadas, no se logró el prendimiento correcto de las 10 de estas transcurridos un par de días de comenzado el ensayo, dejando así 9 individuos homoinjertados para los análisis. Las plantas fueron sometidas a dos condiciones de riego; déficit hídrico donde hubo 0% de reposición de agua y bien regado donde se regó al 100% de reposición de agua para alcanzar la capacidad de campo. El riego se aplicó en base a la diferencia de peso del balde a capacidad de campo menos la diferencia del peso del balde transcurridas 48 horas desde el riego. El ensayo tuvo una duración total de 4 semanas (13/01/2025-03/02/2025).

Análisis de metaboloma

Para los análisis moleculares se realizaron 4 muestreos durante el ensayo. Para ello, se extrajeron 6 hojas de plantas portainjerto Illapel (G23); 3 en condiciones de control y 3 en condiciones de déficit hídrico, 6 hojas de plantas portainjerto Philippines (G21) ; 3 en condiciones de control y 3 en condiciones de déficit hídrico, y 3 muestras homoinjertadas (72 hojas en total), las hojas al momento de ser cortadas fueron colocadas en tubos Falcon de 50 ml rotulados los cuales fueron congelados en nitrógeno líquido y así realizar las extracciones correspondientes; junto con esto también se recolectaron 3 raíces de plantas portainjerto Illapel (G23), 3 muestras de raíces Philippines (G21) y 3 muestras de raíces homoinjertadas. Las hojas recolectadas en el último muestreo fueron utilizadas para realizar el análisis metabolómico, para el análisis de los metabolitos se contrató un servicio de terceros al "The Metabolomics Innovation Centre" (TMIC), donde se enviaron las muestras liofilizadas para el estudio de 4491 metabolitos de nivel 1 y 2, y otros 3842 metabolitos de nivel 3 o putativos (<https://metabolomicscentre.ca/service/plant-metabolome-assay/>). Una vez obtenidos los metabolitos, estos fueron procesados mediante la plataforma Rstudio y los resultados fueron procesados mediante la plataforma MetaboAnalyst 6.0 (<https://www.metaboanalyst.ca>), desde donde se obtuvo el análisis de enriquecimiento de los metabolitos.

Análisis de RT-qPCR

La extracción de ARN se realizó moliendo las muestras de hojas en un mortero de porcelana estéril autoclavado a 121°C durante 15 minutos; las muestras se molieron cortando un trozo de hoja congelado hasta conseguir un polvo fino con un volumen final de 80 miligramos. Una vez molidas las muestras estas fueron procesadas siguiendo el protocolo descrito en el kit de extracción RNeasy Plant Mini Kit (50) con modificaciones menores descritas en el anexo 1. Una vez extraído el RNA, se midió su concentración y calidad 260/280 con el equipo EPOCH (Modelo Epoch™ 2, Biotek), además de visualizar la integridad del ARN en un gel de agarosa 1,5% p/v el cual fue corrido en condiciones de 80 voltios, corriente 400 y tiempo de 45 minutos. Una vez terminado el gel se evaluó la integridad de las bandas del ARN ribosomal 18S y 28S para así proseguir con la transcripción a cDNA mediante retrotranscriptasa y así evaluar mediante RT-qPCR.

Para el análisis de RT-qPCR se utilizó el equipo AriaMx Real-time PCR System (Agilent); para el monitoreo de fluorescencia se utilizó el kit Takyon™ Rox SYBR® MasterMix dTTP Blue (Eurogente). La mastermix se preparó mezclando los componentes del kit hasta tener un volumen final de 17,5µL, el cual fue mezclado con 2,5µL de cDNA para obtener un volumen final de 20µL. Para el correcto funcionamiento de la enzima se utilizó el perfil térmico descrito en la enzima, el cual se presenta en el anexo 2.

Para el análisis por qPCR se diseñaron diez pares de partidores con el uso de la herramienta AmplifX, estos fueron diseñados sobre genes que participan en distintas rutas metabólicas del cultivo de *C. lanatus*, los cuales fueron detectados mediante el estudio metabolómico descrito anteriormente. De los diez partidores diseñados, ocho fueron creados en base al genoma de *C. lanatus* disponible en la base de datos de cucurbitgenomics-org (Código 97103V1) (https://cucurbitgenomics-org.translate.google/organism/21?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=es&_x_tr_hl=es&_x_tr_pto=t&_x_tr_sch=http), siendo estos los genes PMSR/MSRB7, PTP, TDC1, DI19-5, GGCT2/OXP, ProDH, GAD2, ASP3/AAT2; por otro lado, los dos partidores restantes fueron diseñados en base al genoma de *Arabidopsis thaliana*, siendo estos los genes NCED3/ABF3 y P5CS1, los cuales se presentan en la tabla 1. La calidad de los partidores fue comprobada con la herramienta Blasn, dando como resultado, teniendo un resultado de un porcentaje de cobertura promedio de 80% (Query Cover) y de porcentaje de identidad de 100% (Percent Identity).

Resultados

La Figura 2 muestra la distribución de las muestras de hojas (Figura 2A) y raíces (Figura 2B) en las tres variedades, bajo condiciones de control y de estrés al mismo tiempo. En ambos tejidos se observa una separación entre las muestras bajo condiciones de control y estrés, lo que indica que los perfiles de metabolitos acumulados difieren entre ambas condiciones. Esto sugiere que las condiciones de estrés inducen la acumulación de metabolitos distintos a los presentes en la condición control. Además, las muestras correspondientes a cada variedad de portainjerto también tienden a agruparse entre sí dentro de cada condición (control o estrés), lo que indica que cada variedad posee un perfil metabolómico similar dentro de sus réplicas. Sin embargo, hay algunos outliers, los cuales pudieron haber aparecido debido a otros factores que pudieron estresar a esa planta, como podría ser un factor biótico u otra alteración.

El análisis de varianza (ANOVA) reveló que 129 metabolitos en hojas fueron significativamente diferentemente acumulados entre las tres variedades en condiciones de estrés hídrico. Similarmente, en raíces se detectaron 128 metabolitos diferencialmente acumulados, sin embargo, solo 16 metabolitos fueron compartidos entre los tejidos de hojas y raíces. La Figura 3 muestra un heatmap correspondiente a estos metabolitos significativos, donde se observa que las muestras presentan perfiles metabolómicos similares dentro de cada tejido (hojas y raíces). En hojas, se observa que las muestras de la accesión clasificada como susceptible (G21) y las homoinjertadas (HOMO) comparten un perfil metabolómico más cercano entre sí. Esto sugiere que las plantas HOMO tienen una respuesta metabolómica más parecida a la variedad susceptible bajo estrés hídrico que a las tolerantes. Por otro lado, el análisis de raíces de plantas homoinjertadas muestran un perfil metabolómico distinto al de G21 y G23. Esto es coherente, considerando que tanto G21 como G23 pertenecen a *Lagenaria siceraria*, lo que podría explicar su mayor similitud entre sí en comparación con las plantas de *Citrullus lanatus* (HOMO).

Los resultados del análisis de enriquecimiento asociados a los metabolitos significativamente acumulados en hojas (Figura 4A) indican una activación y modulación de rutas metabólicas relacionadas con la protección frente al estrés hídrico. Entre estas se observan mecanismos de osmorregulación y protección celular (acumulación de aminoácidos como arginina, prolina, alanina, aspartato y glutamato), vías relacionadas con el mantenimiento del balance redox y el metabolismo energético (metabolismo de nicotinato y nicotinamida, el ciclo del citrato y la biosíntesis de pantotenato y coenzima A), y ajustes en el metabolismo

de lípidos y compuestos protectores (metabolismo de propanoato y butanoato, y la biosíntesis de ubiquinona y otros terpenoides-quinona).

Similarmente, en raíces, se identificaron rutas enriquecidas (Figura 4B) asociadas al ajuste osmótico y la protección celular (metabolismo de arginina, prolina, alanina, aspartato y glutamato), así como al mantenimiento de la homeostasis redox y al metabolismo energético (metabolismo de nicotinato y nicotinamida, ciclo del citrato, biosíntesis de pantotenato y CoA), y cambios en vías del metabolismo secundario y antioxidante (metabolismo de histidina, purinas, folato, cisteína, metionina, propanoato y butanoato, así como la biosíntesis de ubiquinona y otros terpenoides-quinona). Estos resultados son consistentes con una respuesta general al estrés hídrico caracterizada por la acumulación de osmolitos compatibles, el fortalecimiento del sistema antioxidante, el reajuste del metabolismo energético y la modulación del metabolismo de aminoácidos.

Los metabolitos diferencialmente acumulados en común entre hojas y raíces (Figura 5) mostraron que las hojas de las plantas injertadas en G23 presentaron una acumulación significativamente menor de 3-hidroxi-L-1-pirrolina-5-carboxilato en comparación con las plantas injertadas en G21 y HOMO, sin embargo, esta acumulación fue mayor en las raíces. Similarmente, desoxiguanosina y ácido 3-deshidroquínico también mostraron niveles más elevados en las hojas de las plantas con el portainjerto G23. Contrariamente, metabolitos como ácido 6-amino-2-oxohexanoico y ácido 2-hidroxipenta-2,4-dienoico mostraron una acumulación mayor en las hojas de las plantas injertadas en G21 y HOMO. Por otro lado, en las raíces, las muestras G23 mostraron niveles significativamente más altos de ácido 3-etilmalato y metionina en comparación con G21 y HOMO. Contrariamente, metabolitos como ácido traumático y dihomometionina fueron más abundantes en las raíces de G21 y HOMO. Notablemente, a pesar de que la acumulación de 3-hidroxi-L-1-pirrolina-5-carboxilato fue marcada en las hojas de G23, esta diferencia no se observó de forma clara en sus raíces, lo que podría indicar una regulación órgano-específica de este metabolito bajo condiciones de estrés.

Los resultados de concentración y calidad de ARN desde hojas de *C. lanatus* se muestran en la tabla 2. el total de 52 muestras analizadas, 46 se encuentran dentro de un rango de 1.8 – 2.1 para la relación 260/280, por otro lado, 2 muestras presentaron un valor menor a 1.8 y los 4 restantes presentaron un valor superior a 2.1. Para el caso de la cantidad de ARN obtenido, de las 52 muestras extraídas, 30 presentaron una concentración superior a 100 ng/μL, 19 presentaron valores entre 20-100 ng/μL y 3 presentaron valores menores a 20 ng/μL.

Discusión

El presente estudio integra un análisis metabolómico en hojas de plantas de *Citrullus lanatus* injertadas sobre dos portainjertos de *Lagenaria siceraria* con tolerancia contrastante al estrés hídrico (G21: susceptible y G23: tolerante), y sobre sí mismo (HOMO: homoinjertadas) como control. Nuestra hipótesis plantea que los portainjertos modifican el perfil metabolómico y transcriptómico de las plantas injertadas, promoviendo respuestas diferenciales de tolerancia al estrés en condiciones de déficit hídrico. En este sentido, los resultados de esta tesis respaldan nuestra hipótesis, ya que se observó una activación diferencial de rutas metabólicas entre tejidos (hojas y raíces) y variedades (G21, G23 y HOMO) consistentes a las estrategias de defensa descritas en la literatura.

El análisis de enriquecimiento de rutas KEGG (sumado a la información de PubChem) reveló una activación significativa de rutas relacionadas con la osmorregulación, la protección celular y el metabolismo energético en ambos tejidos. En este sentido, la presencia de aminoácidos como prolina, alanina, glutamato y aspartato se asoció con la activación de la vía de biosíntesis de aminoácidos, particularmente la prolina, la cual ha sido ampliamente reportada como una de las respuestas más conservadas frente al estrés hídrico (Khan *et al.*, 2025; Hayat *et al.*, 2012; Verbruggen and Hermans, 2008). Notablemente, la acumulación aumentada de 3-hidroxi-L-1-pirrolina-5-carboxilato (un precursor directo de prolina) en raíces de G23 ratifica la hipótesis de que el injerto de *Lagenaria siceraria* ayuda a incrementar la capacidad osmorreguladora de *C. lanatus*, lo cual es consistente con una estrategia fisiológica adaptativa para mantener la turgencia celular (Hayat *et al.*, 2012; Verbruggen and Hermans, 2008).

Similarmente, el enriquecimiento del metabolismo de nicotinato y nicotinamida indica un aumento potencial en la disponibilidad de NAD⁺ y NADP⁺, los cuales son cofactores esenciales para mantener la actividad de las enzimas antioxidantes y el balance redox (Hashida *et al.*, 2010). Además, esta actividad regulatoria se complementa con la acumulación de ácido deshidroquínico en hojas de G23, un compuesto intermediario asociado a la vía de shikimato (metabolismo de compuestos fenólicos con función antioxidante) lo que sugiere una reorientación metabólica hacia la producción de compuestos protectores con propiedades antioxidantes en respuesta a condiciones de estrés hídrico (Vogt 2010).

Esta combinación de protectores oxidativos puede indicar una activación de respuesta antioxidante en hojas de *Citrullus lanatus*, gatillada por el portainjerto G23, la cual sería clave para proteger la maquinaria fotosintética bajo condiciones de sequía. Por otro lado, en raíces del portainjerto G23, la mayor acumulación de

ácido 3-etilmalato y metionina indica una activación del metabolismo de ácidos orgánicos y azufrados. En este sentido, la metionina es precursora de la cisteína y del glutatión, antioxidantes fundamentales en la desintoxicación de especies reactivas de oxígeno (Samicho *et al.*, 2013; Kambona *et al.*, 2023), mientras que el ácido 3-etilmalato sugiere una posible actividad de las rutas asociadas a ácidos orgánicos, potencialmente vinculadas al metabolismo energético requerido para sostener funciones celulares bajo estrés hídrico (Lawlor and Cornic, 2002).

La acumulación diferencial de metabolitos en hojas de plantas injertadas en G21 y HOMO mostraron un aumento de ácido 6-amino-2-oxohexanoico y ácido 2-hidroxipenta-2,4-dienoico, dos compuestos que han sido asociados a respuestas al daño oxidativo y procesos de senescencia, fenómenos comúnmente inducidos por el estrés hídrico y caracterizados por el aumento de especies reactivas de oxígeno (Mittler, 2002). Esto contrasta con el perfil de G23, que evidencia una regulación más orientada hacia la protección y adaptación. Contrariamente, en raíces, el enriquecimiento similar entre G21 y G23 se explica por su origen compartido (*L. siceraria*), aunque G23 se destaca por la acumulación de metabolitos clave de defensa como la metionina y ácidos orgánicos como el ácido 3-etilmalato. Además, el perfil metabolómico de HOMO fue distinto a G21 y G23, reflejando su pertenencia a *C. lanatus* y mostrando una menor activación de rutas de adaptación al estrés. Esto apoya la hipótesis de que la tolerancia al estrés hídrico está siendo conferida principalmente por el portainjerto tolerante.

Un resultado relevante fue que, a pesar de compartir solo 16 metabolitos entre hojas y raíces, los patrones de acumulación sugieren una coordinación entre órganos. Por ejemplo, el aumento de metabolitos osmoprotectores en hojas, como el 3-hidroxi-L-1-pirrolina-5-carboxilato, podría estar regulado por señales generadas en raíz. Esta comunicación entre órganos ha sido documentada previamente en cucurbitáceas y otros cultivos, donde el portainjerto actúa como sensor ambiental y coordinador de respuestas sistémicas (Kyriacou *et al.*, 2020). Además, el enriquecimiento común del metabolismo de butanoato y propanoato en ambos tejidos sugiere además una redistribución activa de carbono mediante la degradación de aminoácidos y ácidos grasos, lo que podría estar ayudando a mantener la biosíntesis de compuestos protectores (Liberatore *et al.*, 2016; Birsoy *et al.*, 2015). Esta adaptación data por el portainjerto tolerante G23 podría implicar un cambio en el metabolismo primario de *C. lanatus*, con el fin de mantener la funcionalidad celular en condiciones de sequía.

En cuanto a las extracciones de ARN, si utilizamos como referencia lo descrito por Bustin *et al.*, 2009, donde se indica que el valor mínimo para la relación 260/280 es de 1,8, y un óptimo de entre 1.8 - 2.1, podemos decir que, del total de 52 muestras analizadas, 46 se encuentran dentro del rango óptimo en la relación 260/280,

mientras que 6 se encuentran fuera de rango. Para el caso de la concentración de ARN, Bustin *et al.*, 2009 menciona que el valor mínimo de RNA total para su uso en pruebas qPCR es de 20 ng/μL, un valor ideal es de 100 y 500 ng/μL y valores menores a 20 ng/μL no cumplen con el valor mínimo para su uso. En base a esto, podemos mencionar que, del total de 52 muestras analizadas, 30 tienen una concentración ideal (100-500 ng/μL), 19 cumplen con el mínimo de concentración (20-100 ng/μL) y 3 no cumplen con el mínimo requerido para su uso en pruebas qPCR.

Conclusiones

- La separación observada en el análisis multivariado entre condiciones de control y estrés, tanto en hojas como en raíces, confirma que el estrés hídrico induce la acumulación de metabolitos específicos, distintos a los presentes en condiciones normales de riego.
- Los 16 metabolitos secundarios identificados en hojas de *C. lanatus* y *L. siceraria* estuvieron asociados principalmente a funciones de protección frente a condiciones de estrés abiótico, sugiriendo un rol relevante en los mecanismos adaptativos de ambas especies.
- El uso del portainjerto Illapel (G23) indujo una acumulación diferencial de metabolitos en las hojas del injerto de *C. lanatus*, en comparación con Filipinas (G21) y el homoinjerto (HOMO), lo que evidencia una interacción portainjerto–injerto que podría favorecer una mayor respuesta adaptativa en escenarios de estrés hídrico.
- El análisis de enriquecimiento funcional evidenció la activación de rutas metabólicas asociadas a la adaptación al estrés hídrico, incluyendo la acumulación de aminoácidos osmoprotectores (prolina, arginina, glutamato), el mantenimiento del balance redox (nicotinamida, CoA) y el reajuste del metabolismo energético y celular. Estos resultados reflejan una respuesta coordinada orientada a preservar la homeostasis bajo condiciones de déficit hídrico.
- En conjunto, los resultados sugieren que el uso de portainjertos de *Lagenaria siceraria*, particularmente la accesión G23, modula positivamente la respuesta metabolómica de *C. lanatus* frente al estrés hídrico, favoreciendo la acumulación de compuestos protectores que podrían contribuir a una mayor eficiencia fisiológica bajo condiciones restrictivas de agua.

Índice de figuras

Figura 1: Disposición de plantas de <i>Citrullus lanatus</i> (hileras de 10 individuos) utilizadas en el experimento.	16
Figura 2: Analisis de componentes principales (PCA) para metabolitos presentes en muestras. (A) PCA hojas <i>Citrullus lanatus</i> en homoinjerto (HOMO) e injertadas en <i>Lagenaria siceraria</i> (G23 o G21) en condiciones control (bien regada: WW) y tratamiento (déficit hídrico: WD). (B) PCA muestras de raíces <i>Citrullus lanatus</i> (HOMO) y <i>Lagenaria siceraria</i> (G23 y G21) en condiciones control (bien regada: WW) y tratamiento (déficit hídrico: WD).	16
Figura 3: Heatmap metabolitos diferencialmente acumulados en G23, G21 y HOMO bajo estrés hídrico. (A) Metabolitos hojas <i>Citrullus lanatus</i> en homoinjerto (HOMO) e injertadas en <i>Lagenaria siceraria</i> (G23 o G31). (B) Metabolitos raíces <i>Citrullus lanatus</i> (HOMO) y <i>Lagenaria siceraria</i> (G23 y G31).	17
Figura 4: Rutas enriquecidas en metabolitos diferencialmente acumulados en G23, G21 y HOMO bajo estrés hídrico. (A) Rutas en hojas <i>Citrullus lanatus</i> en homoinjerto (HOMO) e injertadas en <i>Lagenaria siceraria</i> (G23 o G21). (B) Rutas en raíces <i>Citrullus lanatus</i> (HOMO) y <i>Lagenaria siceraria</i> (G23 y G21).	17
Figura 5: Boxplot metabolitos diferencialmente acumulados en G23, G21 y HOMO bajo estrés hídrico compartidos en hojas y raíces.	18

Índice de tablas

Tabla 1: Partidores qPCR diseñados para detección de genes de <i>Citrullus lanatus</i> expresados en condiciones de riego deficitario.	18
Tabla 2: Cuadro resumen extracciones de ARN de hojas de <i>Citrullus lanatus</i>	19
Tabla 3: Componentes y volúmenes necesarios para preparar Mastermix.	26
Tabla 4: Protocolo de ciclismo de 3 pasos para máxima sensibilidad.	27
Tabla 5: Metabolitos significativos detectados por análisis metabolómico y su correspondiente ruta de Kegg.	27

Figuras y tablas



Figura 1: Disposición de plantas de *Citrullus lanatus* (hileras de 10 individuos) utilizadas en el experimento.

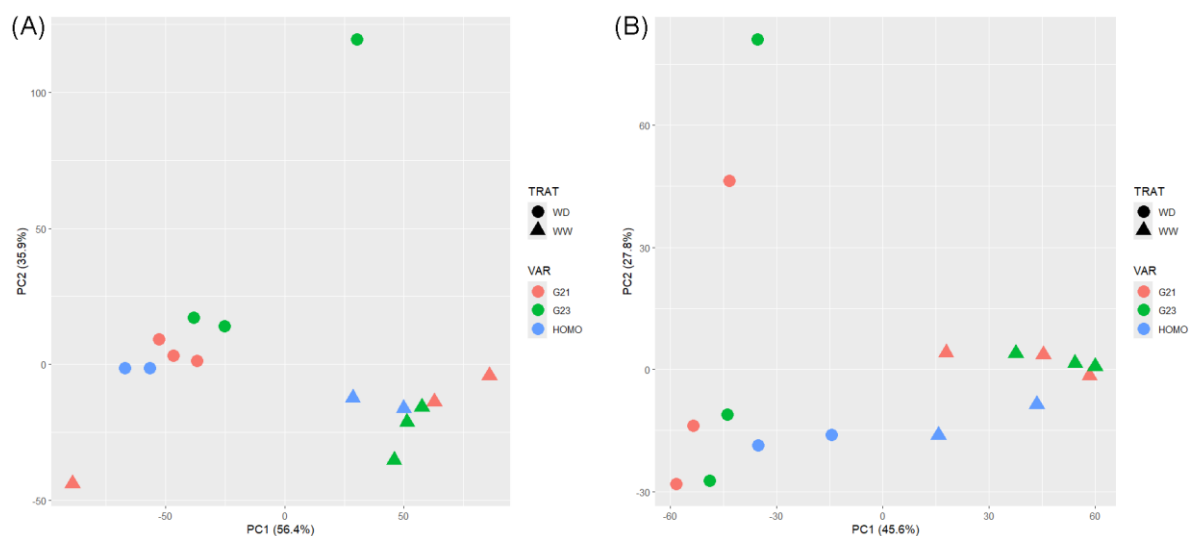


Figura 2: Analisis de componentes principales (PCA) para metabolitos presentes en muestras. (A) PCA hojas *Citrullus lanatus* en homoinjerto (HOMO) e injertadas en *Lagenaria siceraria* (G23 o G21) en condiciones control (bien regada: WW) y tratamiento (déficit hídrico: WD). (B) PCA muestras de raíces *Citrullus lanatus* (HOMO) y *Lagenaria siceraria* (G23 y G21) en condiciones control (bien regada: WW) y tratamiento (déficit hídrico: WD).

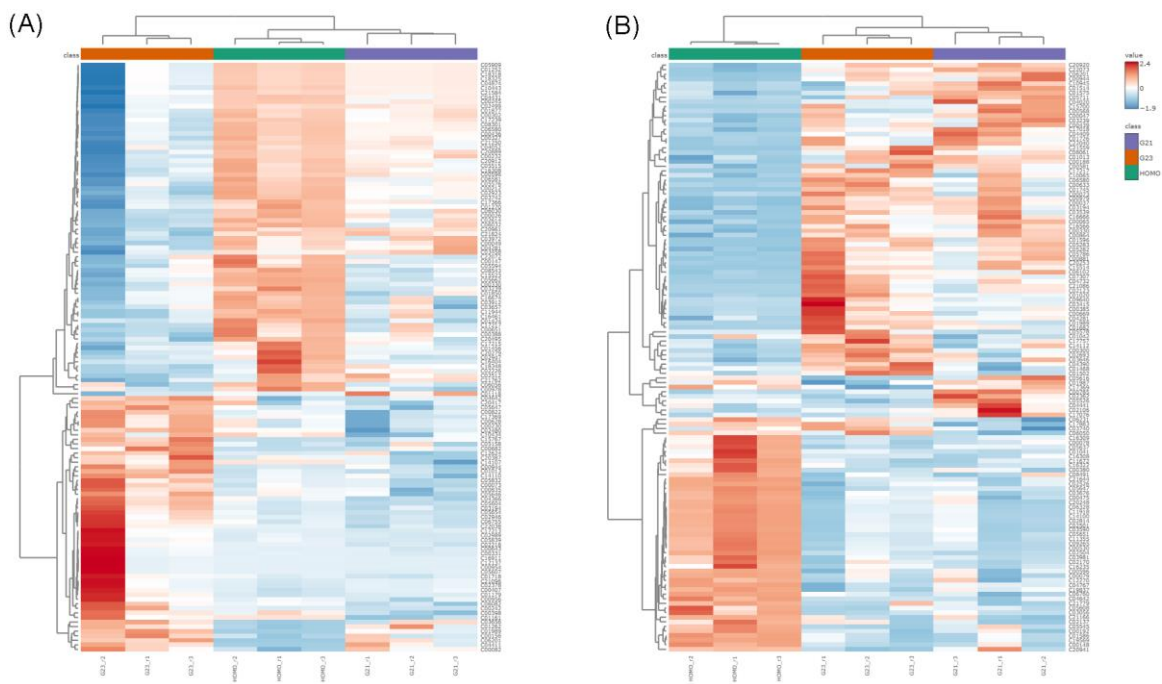


Figura 3: Heatmap metabolitos diferencialmente acumulados en G23, G21 y HOMO bajo estrés hídrico. (A) Metabolitos hojas *Citrullus lanatus* en homoinjerto (HOMO) e inertadas en *Lagenaria siceraria* (G23 o G31). (B) Metabolitos raíces *Citrullus lanatus* (HOMO) y *Lagenaria siceraria* (G23 y G31).

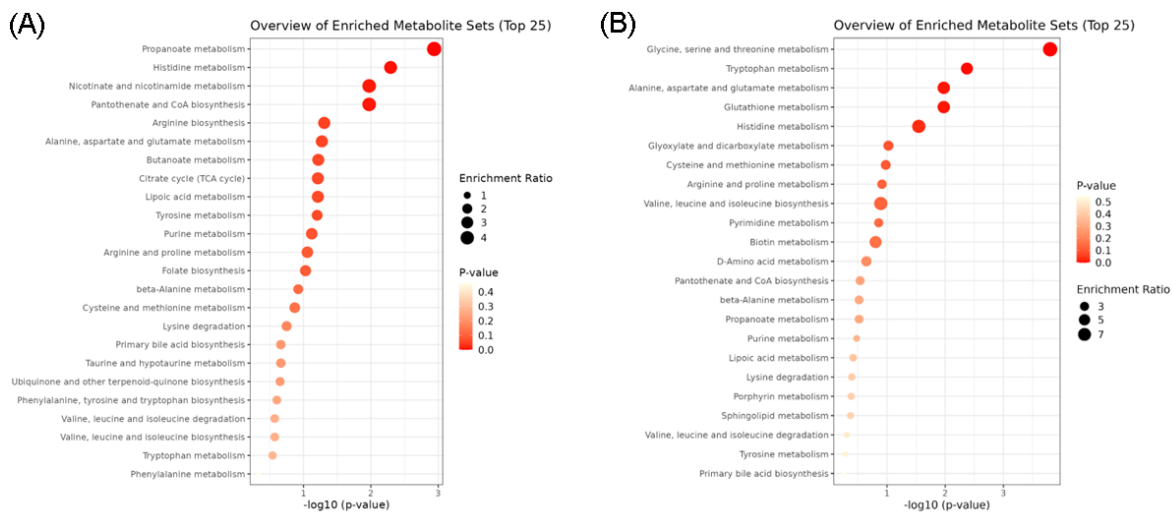


Figura 4: Rutas enriquecidas en metabolitos diferencialmente acumulados en G23, G21 y HOMO bajo estrés hídrico. (A) Rutas en hojas *Citrullus lanatus* en homoinjerto (HOMO) e inertadas en *Lagenaria siceraria* (G23 o G21). (B) Rutas en raíces *Citrullus lanatus* (HOMO) y *Lagenaria siceraria* (G23 y G21).

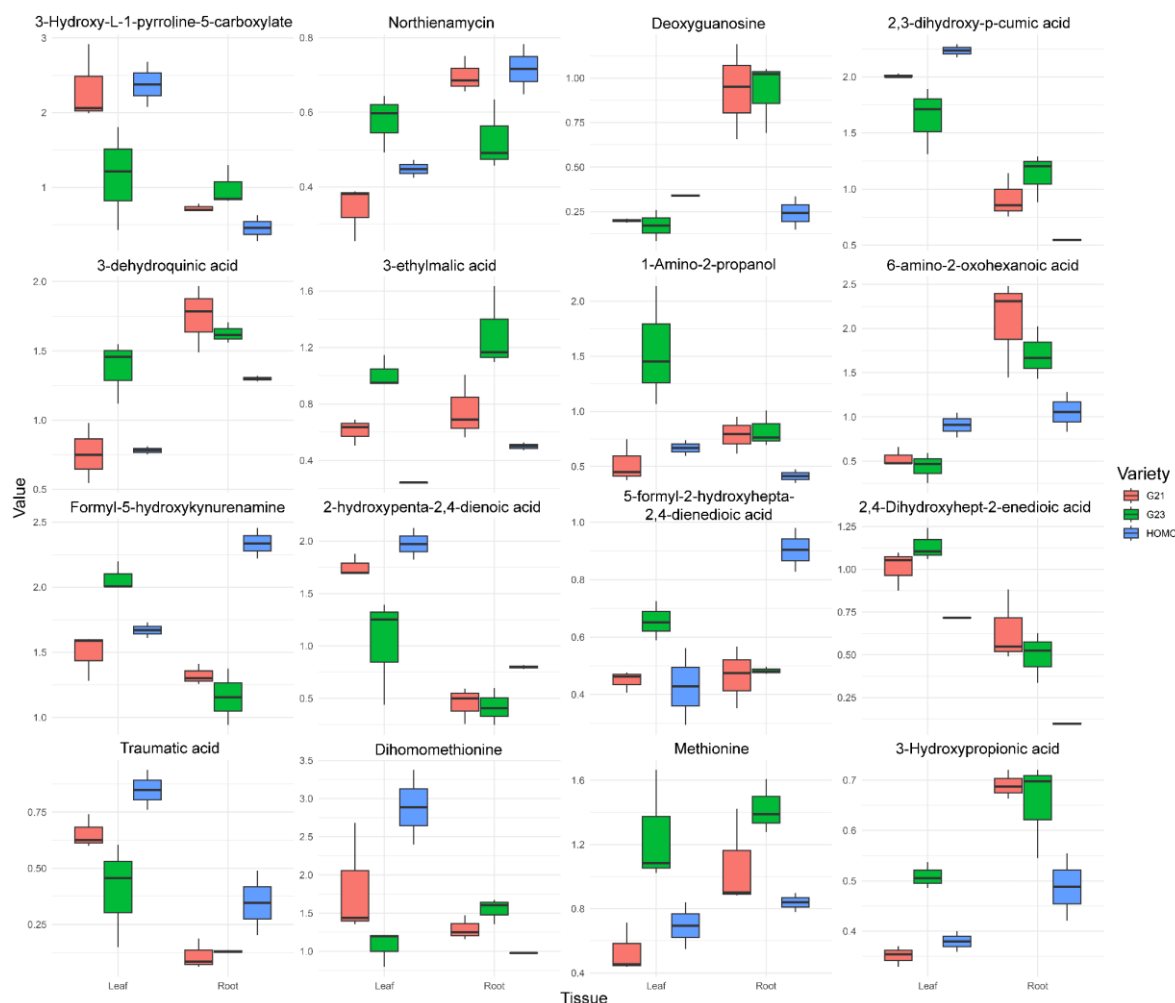


Figura 5: Boxplot metabolitos diferencialmente acumulados en G23, G21 y HOMO bajo estrés hídrico compartidos en hojas y raíces.

Tabla 1: Partidores qPCR diseñados para detección de genes de *Citrullus lanatus* expresados en condiciones de riego deficitario.

Partidor	Secuencia	Gen	PB	TM	ΔG Harpin	ΔG Dimeros	Largo Amplificación (PB)	Calidad Partidores
PMSR/MSRB7	5'-GCTTGACCGCAAAGAGAGCTTGTT-3' 3'-TCCACAGCCTGCACAGTTGTAT-5'	Peptide methionine sulfoxide reductase	24	60.5	-0.74	-6.34	191	94
			22	58.5	-0.29	-7.05		
PTP	5'-TCCATGCCTTCAGGTGAGTCCTAT-3' 3'-CACATTTTCCAGCAAGGCAACCAG-5'	Protein-tyrosine-phosphatase	24	59	-1.79	-5.38	186	100
			24	59.5	-0.6	-3.14		
TDC1	5'-ACGCCTCACAATCTGCTTTCCA-3' 3'-AGCCACCTATGAACACCAGCAA-5'	Tryptophan decarboxylase	22	59.1	-0.3	-3.61	171	100
			22	58.5	-0.33	-3.14		
DI19-5	5'-CGCTCTTGATATTGCCAACCT-3' 3'-ATCACATCCCCTAACGCACAGTTG-5'	Protein dehydration induced 19 homolog 5	22	57.4	-0.03	-3.91	112	96
			24	59.3	-1.84	-3.61		

GGCT2/OXP	5'-ATGGCACTTGAGTACCAACTCAGC-3' 3'-TCCGCACCAACTACCTGTCTG-5'	Gamma glutamylcyclotransferase	24 21	59.3 58.5	-3.27 0.28	-6.47 -3.61	147	92
ProDH	5'-GTGGAGCAATTCTCGCAACCCATA-3' 3'-GCTGCCAATTTCCCTACTCAACAC-5'	Proline dehydrogenase	24 24	59.6 58.6	-1.07 1.99	-5.36 -5.36	137	98
GAD2	5'-GGTCTTGTCTACGCTGGAATTGGT-3' 3'-GTTGGTCCGCTCCAAGGTAATTGA-5'	Glutamate Decarboxylase2	24 24	59 59.3	0.83 -1.8	-5.36 -6.97	100	100
ASP3/AAT2	5'-TGGGGCTAAGGTCAAATGTGGT-3' 3'-TTGTGCCCAAGGCTTATCCTTACC-5'	Aminotranferase	22 24	58.2 59	0.11 -2.6	-3.14 -6.61	193	100
NCED3/ABF3	5'-GAATCGCTCGGCTGTTACTGTTCT-3' 3'-ACGTGGTACGGCAAATCGTCTT-5'	Absciscic acid responsive elements-binding factor 3	24 22	59.4 59.2	-0.03 -1.97	-3.61 -6.3	193	99
P5CS1	5'-CCAGAAGCACGGTCATTCAACCAT-3' 3'-TCCACTTGCGGAAGGAATAGCTCT-5'	Pyrolline-5-carboxylate synthase	24 24	59.8 59.8	-1.54 -1.14	-4.41 -6.34	170	100

Tabla 2: Cuadro resumen extracciones de ARN de hojas de *Citrullus lanatus*.

Muestra	Fecha de Muestreo	260 Raw	280 Raw	320 Raw	260	280	260/280	ng/μL
7HOMO WW 13/01	13/01/2025	145	55	47	130	59	2.169	52.617
19HOMO WW 13/01	13/01/2025	167	71	56	151	66	1.963	70.436
18HOMO WD 13/01	13/01/2025	62	41	62	36	15	2.176	37.126
26HOMO WD 13/01	13/01/2025	125	73	71	95	48	2.193	67.692
20G21 WD 13/01	13/01/2025	97	53	32	72	37	2.027	25.478
13G21 WW 13/01	13/01/2025	378	179	45	308	149	1.964	339.751
11G23 WW 13/01	13/01/2025	237	149	61	198	102	2.093	227.631
27G23 WW 13/01	13/01/2025	276	184	49	221	139	2.098	236,187
14G23 WD 13/01	13/01/2025	69	43	48	45	23	1.971	35.813
15G23 WD 13/01	13/01/2025	247	136	55	193	95	2.023	154.229
47G21 WD 13/01	13/01/2025	52	19	42	21	10	2.168	16.654
19HOMO WW 13/01	13/01/2025	109	51	63	77	38	2.036	61.279
17G23 WD 13/01	13/01/2025	367	203	47	319	157	2.026	255.041
32G23 WW 13/01	13/01/2025	82	51	52	70	35	2.005	55.846
46G21 WW 13/01	13/01/2025	56	31	46	44	23	1.942	35.221
24HOMO WD 13/01	13/01/2025	56	29	44	31	16	1.994	24.738
26HOMO WW 20/01	20/01/2025	479	263	45	404	202	2.000	323.220
6HOMO WD 20/01	20/01/2025	144	93	46	89	43	2.089	71.050
17G23 WD 20/01	20/01/2025	108	75	41	59	30	1.972	46.933
26HOMO WD 20/01	20/01/2025	75	72	68	3	2	1.701	2.124
24HOMO WD 20/01	20/01/2025	361	204	52	290	141	2.048	231.696

11G23 WW 20/01	20/01/2025	332	189	52	264	129	2.049	211.338
15G23 WD 20/01	20/01/2025	1.066	548	41	971	480	2.023	776.816
19HOMO WW 20/01	20/01/2025	1.120	577	46	1.028	508	2.024	822.202
10G21 WW 20/01	20/01/2025	154	118	81	66	33	2.007	52.667
7HOMO WW 20/01	20/01/2025	189	115	41	138	69	1.998	110.175
14G23 WD 20/01	20/01/2025	1.245	638	47	1.123	554	2.027	898.674
13G21 WW 20/01	20/01/2025	179	113	48	120	59	2.046	95.829
47G21 WD 20/01	20/01/2025	311	192	72	223	112	1.998	178.795
39G21 WD 20/01	20/01/2025	203	130	57	134	66	2.013	106.972
18HOMO WD 20/01	20/01/2025	1.196	610	46	1.090	535	2.038	871.976
20G21 WD 20/01	20/01/2025	325	186	48	257	128	2.015	205.784
27G23 WW 20/01	20/01/2025	202	152	111	83	37	2.240	66.321
31G23 WW 20/01	20/01/2025	696	369	47	611	303	2.019	488.865
17G23 WD 27/01	27/01/2025	160	111	60	91	46	1.982	72.516
14G23 WD 27/01	27/01/2025	110	77	42	61	30	1.988	48.422
46G21 WW 27/01	27/01/2025	339	191	41	276	138	2.003	221.058
15G23 WD 27/01	27/01/2025	222	135	46	162	81	1.998	129.440
27G23 WW 27/01	27/01/2025	680	360	50	597	294	2.035	477.952
13G21 WW 27/01	27/01/2025	471	261	51	396	197	2.009	316.708
47G21 WD 27/01	27/01/2025	962	497	42	871	431	2.022	696.824
7HOMO WW 27/01	27/01/2025	76	74	69	3	2	1.465	2.253
17G23 WD 27/01	27/01/2025	523	289	47	449	228	1.968	358.840
19HOMO WW 27/01	27/01/2025	687	365	44	604	301	2.009	483.128
24HOMO WD 27/01	27/01/2025	598	318	41	520	258	2.015	415.936
18HOMO WD 27/01	27/01/2025	1.061	546	54	944	460	2.050	754.859
39G21 WD 27/01	27/01/2025	153	101	48	95	48	1.986	75.856
6HOMO WD 27/01	27/01/2025	171	113	50	111	57	1.955	88.534
15G23 WD 27/01	27/01/2025	188	117	40	138	72	1.929	110.559
11G23 WW 27/01	27/01/2025	528	289	52	450	223	2.016	359.928
20G21 WD 27/01	27/01/2025	258	149	41	202	100	2.019	161.732
20G21 WD 27/01	27/01/2025	425	232	42	361	178	2.025	288.421

Referencias

- Aldunce, P.; Araya, D.; Sapiain, R.; Ramos, I.; Lillo, G.; Urquiza, A.; Garreaus, R. (2017). Local Perception of Drought Impacts in a Changing Climate: The Mega-Drought in Central Chile. *Sustainability*, 9(11), 2053. <https://doi.org/10.3390/su9112053>.
- Anjum, S. A., Ashraf, U., Tanveer, M., Khan, I., Hussain, S., Shahzad, B., Zohaib, A., Abbas, F., Saleem, M. F., Ali, I., & Wang, L. C. (2017). Drought- induced changes in growth, osmolyte accumulation and antioxidant metabolism of three maize hybrids. *Frontiers in Plant Science*, 8, 69. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00069>
- Birsoy, K., Wang, T., Chen, W. W., Freinkman, E., Abu-Remaileh, M., & Sabatini, D. M. (2015). An essential role of the mitochondrial electron transport chain in cell proliferation is to enable aspartate synthesis. *Cell*, 162(3), 540-551.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.
- Collins, J. K., Wu, G., Perkins-Veazie, P., Spears, K., Claypool, P. L., Baker, R. A., & Clevidence, B. A. (2007). Watermelon consumption increases plasma arginine concentrations in adults. *Nutrition*, 23(3), 261–266. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2007.01.005>.
- Davidovich, R.; Shalev, L.; Baranes, N.; Meir, A.; Itkin, M.; Cohen, S.; Zimble, K.; Portnoy, V.; Ebizuka, Y.; Shibuya, M.; Burger, Y.; Katzir, N. (2014). Recombinant yeast as a functional tool for understanding bitterness and cucurbitacin biosynthesis in watermelon (*Citrullus* spp.). *Yeast (Chichester, England)*, 32(1), 103–114. <https://doi.org/10.1002/yea.3049>.
- Devi, P.; Perkins, P.; Miles, C. (2020). Impact of grafting on watermelon fruit maturity and quality. *Horticulturae*. 6, 97.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2022). *FAOSTAT*. <https://www.fao.org/faostat>.
- Hashida, S. N., Itami, T., Takahashi, H., Takahara, K., Nagano, M., Kawai-Yamada, M., ... & Uchimiya, H. (2010). Nicotinate/nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase-mediated regulation of NAD biosynthesis protects guard cells

from reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal movement in Arabidopsis. *Journal of experimental botany*, 61(13), 3813-3825.

Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., & Ahmad, A. (2012). Role of proline under changing environments: a review. *Plant signaling & behavior*, 7(11), 1456-1466.

Kambona, C. M., Koua, P. A., Léon, J., & Ballvora, A. (2023). Stress memory and its regulation in plants experiencing recurrent drought conditions. *Theoretical and Applied Genetics*, 136(2), 26.

Khan, P., Abdelbacki, A. M., Albaqami, M., Jan, R., & Kim, K. M. (2025). Proline promotes drought tolerance in maize. *Biology*, 14(1), 41.

Kyriacou, M. C., Colla, G., & Rouphael, Y. (2020). Grafting as a sustainable means for securing yield stability and quality in vegetable crops. *Agronomy*, 10(12), 1945.

Lawlor, D. W., & Cornic, G. (2002). Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, cell & environment*, 25(2), 275-294.

Liberatore, K. L., Dukowic-Schulze, S., Miller, M. E., Chen, C., & Kianian, S. F. (2016). The role of mitochondria in plant development and stress tolerance. *Free Radical Biology and Medicine*, 100, 238-256.

Liu, C.; Zhang, H.; Dai, Z.; Liu, Y.; Deng, X.; Cheng, F.; Xu, J. (2012). Volatile chemical and carotenoid profiles in watermelons [*Citrullus vulgaris* (Thunb.) Schrad (Cucurbitaceae)] with different flesh colors. *Food Sci. Biotechnol.* 21, 531–541.

Maja, D.; Mavengahama, S.; Mashilo, J. (2021). Cucurbitacin biosynthesis in cucurbit crops, their pharmaceutical value and agricultural application for management of biotic and abiotic stress: A review. *South African Journal of Botany*. 145. <https://10.1016/j.sajb.2021.08.044>.

Mashilo, J.; Odindo, A.; Shimelis, H.; Musenge, P.; Tesfay, S.; Magwaza, L. (2018). Photosynthetic response of bottle gourd [*Lagenaria siceraria* (Molina) Standl.] to drought stress: Relationship between cucurbitacins accumulation and drought tolerance. *Scientia Horticulturae* 231. 133-143.

Mashilo, J.; Odindo, A.; Shimelis, H.; Musenge, P.; Tesfay, S.; Magwaza, L. (2017). Drought tolerance of selected bottle gourd [*Lagenaria siceraria* (Molina) Standl.] landraces assessed by leaf gas exchange and photosynthetic efficiency. *Plant Physiol. Biochem*, 120, 75-87.

Mashilo, J., Shimelis, H., & Ngwepe, R. M. (2022). Genetic resources of bottle gourd (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standl.) and citron watermelon (*Citrullus lanatus* var. *citroides* (L.H. Bailey) Mansf. ex Greb.): Implications for genetic improvement, product development and commercialization [Review article]. *South African Journal of Botany*, 145, 28.

Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9), 405-410.

Mkhize, P.; Shimelis, H.; Mashilo, J. (2023). Cucurbitacins B, E and I Concentrations and Relationship with Drought Tolerance in Bottle Gourd [*Lagenaria siceraria* (Molina) Standl.]. *Plants*. 12.(19), 3492. <https://doi.org/10.3390/plants12193492>.

Morales, C.; Contreras, R.; Riveros, C.; Espinoza, F.; Maldonado, C.; Mashilo, J.; Pinto, C. (2023). Rootstocks Comparison in Grafted Watermelon under Water Deficit: Effects on the Fruit Quality and Yield. *Plants*. 12, 509.

ODEPA – Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. (2023). *Boletín de hortalizas: Junio 2023*. <https://www.odepa.gob.cl/>

Ruíz-Sánchez, M.; Domingo, R.; Castel, J. (2010). Deficit irrigation in fruit trees and vines in Spain. *Spanish J. Agric. Res.* 8, 5-20.

Samicho, Z., Ab Mutalib, S. R., & Abdullah, N. (2013). Amino acid composition of droughtmaster beef at various beef cuts. *Agricultural Sciences*, 4(5B), 61.

Suárez, A.; Grimaldo, O.; Ceceña, C.; Vázquez, J.; Carrazco, L.; Avendaño, L.; AIL, C.; Basilio, U.; Ángulo, A. (2022). Influence of seed and fruit characteristics of *Lagenaria siceraria* on production and quality of grafted watermelon. *Horticulturae*. 8, 242.

Verbruggen, N., & Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: a review. *Amino acids*, 35(4), 753-759.

Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular plant*, 3(1), 2-20.

Wang, Y.; Xu, P.; Wu, X.; Wu, X.; Wang, B.; Huang, Y.; Hu, Y.; Li, J.; Lu, Z.; Li, G. (2018). GourdBase: a genome-centered multi-omics database for the bottle gourd (*Lagenaria siceraria*), an economically important cucurbit crop. *Scientific reports*, 8(1), 3604. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22007-3>.

Anexos

Anexo 1

Protocolo QIAGEN RNAeasy Plant Mini Kit (50) modificado.

Notas:

- El kit RNAeasy Plant Mini Kit ofrece una selección de tampones de lisis. El tampón RLT es el tampón de lisis preferido (**Usado en este estudio**), sin embargo, el tampón RLT puede causar la solidificación de algunas muestras, dependiendo de la cantidad y el tipo de metabolitos secundarios presentes en el tejido. En estos casos se debe usar el tampón RLC.
 - Agregar 10µL de β-mercaptoetanol (β-ME) (**Usado en este estudio**) o 20 µL de ditionitritol (DDT) 2M,* a 1 mL de tampón RLT o tampón RLC antes de usar. Los tampones con DTT o β-ME pueden almacenarse a temperatura ambiente hasta por 1 mes en oscuridad.
 - Agregar 4 volúmenes de etanol (96-100%) al tampón RPE para preparar una solución de trabajo.
 - Tener preparado un recipiente con hielo o mini cooler enfriado previamente.
-
1. Utilizando un mortero autoclavado a 121°C y enfriado previamente en conjunto con nitrógeno líquido triture un volumen entre 80-90 mg de material vegetal y colóquelo en un tubo Eppendorf de 1,5 ml (no incluido).
 2. Añada 450µL de tampón RLT o RLC a un máximo de 90 mg de muestra. Mezcle vigorosamente con un vortex y cúbralo inmediatamente de hielo.
 3. Transfiera el lisado a una columna de centrifugado QIAshredder (lila) colocada en un tubo de recolección de 2 mL. Centrifugue durante 2 minutos a máxima velocidad. Transfiera el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga (no incluido), evitando recolectar el pellet con restos celulares. (Cuantificar volumen). (Colocar en hielo mientras se prepara el paso siguiente).
 4. Añada 0,5 volúmenes de etanol (96-100) (no incluido) al lisado clarificado y mezcle inmediatamente con una pipeta. (NO CENTRIFUGUE). Proceda

inmediatamente al paso 5. (colocar en hielo mientras se prepara el paso siguiente)

5. Transfiera la muestra (usualmente 600µL), junto con el precipitado, a una columna de centrifugado RNAeasy Mini (rosado) en un tubo de recolección de 2 mL (incluido). Centrifugue durante 15 segundos a $\geq 8.000 \times g$ (≥ 10.000 rpm). Deseche el sobrenadante y seque el tubo de colección con papel absorbente. (En caso que no pase todo el líquido volver a centrifugar durante 30 segundos a $10.000 \times g$ o 12.000 rpm). (colocar en hielo mientras se prepara el paso siguiente)
6. Añada 700µL de tampón RW1 a la columna RNAeasy. Centrifugue durante 15 segundos a $\geq 8.000 \times g$ (≥ 10.000 rpm). Deseche el sobrenadante y seque el tubo de colección con papel absorbente. (colocar en hielo mientras se prepara el paso siguiente)
7. Añada 500µL de tampón RPE a la columna RNAeasy. Centrifugue durante 15 segundos a $\geq 8.000 \times g$ (≥ 10.000 rpm). Deseche el sobrenadante y seque el tubo de colección con papel absorbente. (colocar en hielo mientras se prepara el paso siguiente)
8. Añada 500µL de tampón RPE a la columna RNAeasy. Centrifugue durante 2 minutos a $\geq 8.000 \times g$ (≥ 10.000 rpm).

Opcional: (Coloque la columna RNAeasy en un nuevo tubo de recolección de 2mL incluido). Centrifugue a máxima velocidad durante 1 minuto para secar la membrana. (Realizado en este estudio).

9. Coloque la columna RNAeasy en un nuevo tubo de recolección de 1,5mL (incluido). Añada 30-50µL (En este estudio se utilizaron 40µL) de agua libre de RNAsa directamente a la membrana de la columna. Centrifugue durante 1 minuto a $\geq 8.000 \times g$ (≥ 10.000 rpm) para eluir el ARN.
10. Si se espera un rendimiento de ARN superior a 30µg, repita el paso 9 utilizando otros 30-50µg de agua libre de RNAsa. Como alternativa, utilice el eluato del paso 9 (si se requiere una alta concentración de ARN). Reutilice el tubo de recolección del paso anterior (En este estudio se utilizó el eluato del paso 9 y se complementa con 10µL de agua libre de RNAsa para obtener un volumen final de 50µL). Congelar inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenar a -80°C .

Anexo 2

Preparación de Takyon™ Rox SYBR® MasterMix dTTP Blue

1. Descongelar completamente todos los reactivos necesarios y colóquelos en hielo. Mezcle bien todos los reactivos por inversión y agitar en un vortex antes de pipetear.
2. Prepare la mezcla de reacción (véase la Tabla 3). Para corregir las pérdidas por dispensación, prepare un exceso de mezcla de reacción (p. ej., una mezcla de 100 reacciones para 96 reacciones).
3. Añada todos los componentes, excepto el molde. Mezcle bien mediante pipeteo o inversión. Centrifugue.
4. Pipetee 2,5 µL del ADNc/ADN molde para las muestras, 2,5 µL del ADN de control para el control positivo o 2,5 µL de agua/tampón para el control negativo en los tubos/placa de qPCR.
5. Añada 17,5 µL de la mezcla de reacción por pocillo/vial, cierre la placa/vial, mezcle suavemente con un agitador y centrifugue. Asegúrese de que no haya burbujas en los pocillos/viales de reacción. La reacción se puede preparar a temperatura ambiente.
6. La enzima Takyon™ Rox SYBR® MasterMix dTTP azul producirá resultados consistentes y sensibles en condiciones de ciclos RÁPIDOS y REGULARES. Programe el termociclador en tiempo real utilizando los siguientes parámetros recomendados (Tabla 4).

Tabla 3: Componentes y volúmenes necesarios para preparar Mastermix.

Reactivo	Volumen (µL)	Concentración Final
Takyon™ MasterMix	10	1X
Partidor Directo	2	50-300nM ¹
Partidor Reverso	2	50-300nM ¹
Agua	3.5	El volumen es de 20 µL menos todos los demás componentes.
Mix Total/Reacción	17,5µL	

Nota 1: Se recomienda una concentración inicial de partidores de 100 nM. Esta concentración será correcta para muchos ensayos, pero podría requerirse una optimización adicional para obtener los mejores resultados con su conjunto de partidores.

Nota 2: Se añaden 17,5 µL de mezcla de reacción a 2,5 µL de ADN molde/control antes del ciclado, lo que da un volumen de reacción final de 20 µL. Consulte los pasos 4 y 5 volúmenes, incluidos los partidores, se pueden ajustar en función del molde y del volumen de reacción.

Tabla 4: Protocolo de ciclismo de 3 pasos para máxima sensibilidad.

	Temperatura (C°)	Tiempo	
		Rápido	Normal
Corrida de prevención	50°C	2 minutos	2 minutos
Activación Takyon™	95°C	3 minutos	3 minutos
40 ciclos	95°C	3 segundos	10 segundos
Desnaturalización			
Alineamiento	60°C	15 segundos	20 segundos
Extensión	72°C	15 segundos	20-40 segundos

Anexo 3

Tabla 5: Metabolitos significativos detectados por análisis metabolómico y su correspondiente ruta de Kegg.

LEAF		ROOT	
<i>Compound</i>	<i>KEGG</i>	<i>Compound</i>	<i>KEGG</i>
2-Oxoglutaric acid	C00026	Glycine	C00037
Aspartic acid	C00049	Lysine /(3S,5S)-3,5-Diaminohexanoic acid	C00047
Methionine	C00073	Serine	C00065
Tyrosine	C00082	Methionine	C00073
Adenine	C00147	L-Tryptophan	C00078
4-Hydroxybenzoic acid	C00156	D-phenylalanine	C00079
Adenosine	C00212	Proline	C00148
3,4-Dihydroxybenzoic acid	C00230	Threonine	C00188
Succinic Semialdehyde	C00232	Hydroxylamine	C00192
Guanine	C00242	Creatine	C00300
Taurine	C00245	Deoxyguanosine	C00330
Glutamic acid/L-4-Hydroxyglutamate semialdehyde	C00302	Cytosine	C00380
Citrulline	C00327	Xanthine	C00385
Deoxyguanosine	C00330	N-Formimino-L-glutamic acid	C00439
Indolepyruvic acid	C00331	Cytidine	C00475
Histamine	C00388	Hydroquinone	C00530
Tryptamine	C00398	4-Aminobenzoic acid	C00568
Isoleucine	C00407	Guanidinoacetic acid	C00581
N-Carbamoylputrescine	C00436	3 of 2-Hydroxy-2,4-pentadienoic acid	C00596
2-Hydroxy-2,4-pentadienoic acid	C00596	1 of 4-Hydroxybenzaldehyde/3-Hydroxybenzaldehyde	C00633
2,5-Dihydroxybenzoic acid /Protocatechuic acid /3,4-Dihydroxybenzoic acid	C00628	gamma-L-Glutamyl-L-cysteine	C00669
5-Hydroxy-L-tryptophan	C00643	Urocanic acid	C00785
4-Methylene-L-glutamic acid	C00651	Pantothenic acid	C00864
2-Hydroxymuconate semialdehyde	C00682	Deoxycytidine	C00881
Dopaquinone	C00822	3-Dehydroquinic acid	C00944
Sepiapterin	C00835	O-Acetyl-L-serine	C00979
3-Dehydroquinic acid	C00944	1 of 3-Hydroxypropanoic acid	C01013
Indole-3-acetic acid	C00954	6-Hydroxynicotinic acid	C01020

Aminoadipic acid	C00956	Monodehydroascorbic acid	C01041
N-Acetylserotonin	C00978	N-Acetyl-L-aspartic acid	C01042
3-Hydroxypropanoic acid	C01013	4-Cresol/3-Cresol	C01468
O-Succinyl-L-homoserine	C01118	1 of Guaiacol	C01502
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	C01161	Luteolin	C01514
3-(4-Hydroxyphenyl)Pyruvic acid	C01179	Ephedrine	C01575
4-(2-Aminophenyl)-2,4-dioxobutanoic acid	C01252	Hippuric acid	C01586
beta-Alanyl-N(pi)-methyl-L-histidine	C01262	Maleamic acid	C01596
3-Hydroxy-2-methylpyridine-5-carboxylic acid	C01270	Nopaline	C01682
Gallic acid	C01424	D-Lombricine	C01726
Tropic acid	C01456	Pinosylvin	C01745
Kynurenine	C01718	2-Aminophenol	C01987
Rosmarinic acid	C01850	3-Ethylmalic acid	C01989
4-Oxoproline	C01877	(S)-Scoulerine /(S)-Coreximine	C02106
3-Ethylmalic acid	C01989	3-Propylmalic acid	C02123
Dehydroalanine	C02218	Phenylglyoxylic acid	C02137
Citraconic acid	C02226	Methylmalonic acid	C02170
6-Aminohexanoic acid	C02378	2-Oxosuccinamic acid	C02362
Cis,Cis-Muconic acid	C02480	2-Hydroxymuconic acid	C02501
2-Phenylphenol	C02499	2-Isopropylmalic acid	C02504
3-Cyano-L-alanine	C02512	Biphenyl-2,3-diol	C02526
2,3-Dihydroxytoluene	C02923	(Indol-3-yl)acetamide	C02693
4-Acetamidobutanoic acid	C02946	Benzene-1,2,4-triol	C02814
4-Coumaroylshikimic acid	C02947	2,6-Dihydroxypyridine	C03056
Methionine Sulfoxide	C02989	1 of (R)-1-Aminopropan-2-ol	C03194
(R)-1-Aminopropan-2-ol	C03194	6-Amino-2-oxohexanoic acid	C03239
6-Amino-2-oxohexanoic acid	C03239	N2-Succinyl-L-ornithine	C03415
2,3,6-Trihydroxypyridine	C03458	S-Ribosyl-L-homocysteine	C03539
(S)-5-Amino-3-oxohexanoic acid	C03656	4-Hydroxyphenylglyoxylic acid	C03590
1,4-Dihydroxy-2-naphthoic acid	C03657	Bis-gamma-glutamylcystine	C03646
(S)-4-Hydroxymandelonitrile/(R)-4-Hydroxymandelonitrile	C03742	1 of 3-Hydroxy-cis,cis-muconic acid	C03676
1-Pyrroline-5-carboxylic acid	C03912	gamma-Glutamylalanine	C03740
2,3,4,5-Tetrahydrodipicolinic acid	C03972	2-Hydroxyethylenedicarboxylic acid	C03981
5-Carboxy-2-oxohept-3-enedioic acid	C04052	2 of D-Lysopine	C04020
L-1-Pyrroline-3-hydroxy-5-carboxylic acid	C04281	L-1-Pyrroline-3-hydroxy-5-carboxylic acid	C04281
3-(2-Carboxyethenyl)-cis,cis-muconic acid	C04366	N6-Acetyl-LL-2,6-diaminoheptanedioic acid	C04390
(2R,3S)-3-Isopropylmalic acid/3-Propylmalic acid	C04411	2-Amino-3-carboxymuconate semialdehyde	C04409
cis-4-Carboxymethylenebut-2-en-4-olide	C04431	2-(3-Carboxy-3-aminopropyl)-L-histidine	C04441
2-Hydroxy-5-carboxymethylmuconate semialdehyde	C04642	2-Hydroxy-5-carboxymethylmuconate semialdehyde	C04642
7,8-Dihydroneopterin/7,8-Dihydromonapterin	C04874	5-Amino-6-(1-D-ribitylamino)uracil	C04732
trans-beta-D-Glucosyl-2-hydroxycinnamic acid	C05158	O-(1->4)-alpha-L-Dihydrostreptosyl-streptidine 6-phosphate	C04767
5-Ureido-4-imidazole carboxylic acid	C05515	gamma-Glutamylglutamic acid	C05282
3,4-Dihydroxyphenylethyleneglycol	C05576	N2-gamma-Glutamyl-Glutamine	C05283
3-Methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol	C05594	S-Glutathionyl-L-cysteine	C05526
2-Carboxy-2,3-dihydro-5,6-dihydroxyindole	C05604	Ne,Ne dimethyllysine	C05545
Phenyllactic acid	C05607	1 of 5,6-Dihydroxyindole	C05578
5-Hydroxyindolepyruvic acid	C05646	1 of 4-Hydroxycinnamyl aldehyde	C05608
Formyl-5-hydroxykynurenamine	C05647	3-O-Methylgallic acid	C05616
5-(2'-Formylethyl)-4,6-dihydroxypicolinic acid	C05654	4,8-Dihydroxyquinoline	C05637
Homoisocitric acid	C05662	Formyl-5-hydroxykynurenamine	C05647
5-Hydroxyindoleacetyl glycine	C05832	5-Hydroxykynurenine	C05651

cis-beta-D-Glucosyl-2-hydroxycinnamic acid/trans-beta-D-Glucosyl-2-hydroxycinnamic acid	C05839	gamma-Glutamyl-beta-cyanoalanine	C05711
Leucodelphinidin/(2R,3S,4S)-Leucodelphinidin	C05909	(3Z)-Phycocyanobilin	C05786
Methyloxaloacetic acid	C06030	2-Methyl-3-hydroxy-5-formylpyridine-4-carboxylic acid	C06050
D-erythro-3-Methylmalic acid /Citramalic acid	C06032	Adipate semialdehyde	C06102
4-Hydroxy-L-threonine	C06056	1 of 2,4-Dihydroxyhept-2-enedioic acid	C06201
(S)-(+)-Absciscic acid	C06082	1 of Ectoine	C06231
2,4-Dihydroxyhept-2-enedioic acid	C06201	6-Chlorobenzene-1,2,4-triol	C06328
2,3-Dihydroxy-p-cumic acid	C06580	1 of 2,3-Dihydroxy-p-cumic acid	C06580
2-Hydroxy-3-carboxy-6-oxo-7-methylocta-2,4-dienoic acid	C06581	2-Hydroxy-5-methyl-cis,cis-muconic semialdehyde	C06760
Isomer 3 of 2-Hydroxy-3-carboxy-6-oxo-7-methylocta-2,4-dienoic acid	C06581	Deacetylpecoside /Deacetylisoipecoside	C07307
Chloroacetic acid	C06755	2'-Aminobiphenyl-2,3-diol	C08061
D-Cathinone	C08301	1 of Jasmonic acid	C08491
Dopaxanthin	C08543	Fraxetin	C09265
5-O-Caffeoylshikimic acid	C10434	(-)-Salsoline	C09640
Curcumin	C10443	1 of Gentisein	C10065
cis-2-Methyl-5-isopropylhexa-2,5-dienoic acid	C11944	3 of Caffeic aldehyde	C10945
Pelargonidin 3-O-glucoside	C12137	4-Amino-4-deoxychorismic acid	C11355
2-Hydroxy-6-ketononatrienedioic acid	C12624	10-Deoxygeniposidic acid	C11672
2-Hydroxy-4-hydroxymethylbenzalpyruvic acid	C14107	Maltol	C11918
4-Hydroxymethylcatechol	C14110	N-Acetylaspartylglutamic acid	C12270
2,6-Dihydroxynicotinic acid	C15523	1 of 4-Formylsalicylic acid	C14100
4-(L-gamma-Glutamylamino)butanoic acid	C15767	3 of cis-2-Carboxycyclohexyl-acetic acid	C14112
Traumatic acid	C16308	2 of 8'-Hydroxyabsciscic acid	C15514
Pinocembrin chalcone	C16404	gamma-Glutamyl-gamma-aminobutyraldehyde	C15700
Geranic acid	C16461	o-Hydroxylaminobenzoic acid/4-Aminosalicylic acid	C16235
Formylisoglutamine	C16674	Traumatic acid	C16308
Afzelin	C16911	Traumatin	C16309
Homomethionine	C17213	1 of 9-Oxononanoic acid	C16322
3-(3'-Methylthio)propylmalic acid	C17215	Glutathionylaminopropylcadaverine	C16566
Dihomomethionine	C17217	Vanillylamine	C16666
p-Hydroxyphenylacetothiohydroximic acid	C17239	1,4-Dihydroxy-6-naphthoic acid	C17018
(2S,5S)-trans-Carboxymethylproline	C17366	Tridecylic acid	C17076
Northienamycin	C17369	Dihomomethionine	C17217
cis,cis-2,4-Dihydroxy-5-methyl-6-oxo-2,4-hexadienoic acid	C18318	Northienamycin	C17369
Feruloylagmatine	C18325	2-Descarboxy-betanidin	C17757
2,2',3-Trihydroxy-3'-methoxy-5,5'-dicarboxybiphenyl	C18348	2-Methoxy-4-vinylphenol	C17883
(2R,3R)-3-Methylglutamyl-5-semialdehyde-N6-lysine	C20279	3-Succinoylpyridine	C19569
Biotin sulfone	C20387	Indole-3-carboxylic acid	C19837
2,4-Dihydroxy-6-pentylbenzoic acid	C20417	1 of 7-Carboxy-7-carbaguanine	C20248
Pelargonidin 3,7-di-O-beta-D-glucoside	C20495	2 of Aminoacrylic acid	C20253
D-Galactaro-1,5-lactone	C20889	Tabtoxinine-delta-lactam	C20920
Tabtoxin biosynthesis intermediate 2	C20912	L-Anticapsin	C20941
N3-Fumaroyl-L-2,3-diaminopropanoic acid	C20961	(3E)-3-[(1R,5R,6S)-5-Hydroxy-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-2-ylidene]-2-oxopropanoic acid	C21086
Alloisoleucine	C21096	4-Hydroxy-3-methylbenzaldehyde	C21166
2-Methyl-trans-aconitic acid /(Z)-But-1-ene-1,2,4-tricarboxylic acid	C21250	N-[(2S)-2-Amino-2-carboxyethyl]-L-glutamic acid	C21559

7'-O-Dmethylcephaline	C21584	5-Dehydro-L-gluconic acid	C21644
4-Hydroxytryptamine	C21762	1 of Baeocystin	C21779
11,20-Dihydroxysugiol	C21824	S-Methyl-L-Cysteine	C22040
(R)-3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-hydroxypropanoic acid	C22038	2-[(2-Aminoethylcarbamoyl)methyl]-2-hydroxybutanedioic acid	C22073
2-[(L-Alanin-3-ylcarbamoyl)methyl]-2-hydroxybutanedioic acid	C22072		