



Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Caracterización juvenil frente al déficit hídrico de progenies de *Juglans spp.* de aptitudes madereras



Marta Fernández Gosende
22/07/2014

Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y
Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Caracterización juvenil frente al déficit hídrico de
progenies de *Juglans spp.* de
aptitudes madereras**

Marta Fernández Gosende

Firma

Marta Ciordia Ara

Ana María Rodríguez Alonso

Firma

Firma

Resumen

La disponibilidad de agua influye directamente sobre la productividad forestal, de tal manera que ésta se ve reducida ante una disminución en el crecimiento provocada por estrés hídrico. Esto conlleva la necesidad directa de disponer del conocimiento de la ecología y comportamiento de las diferentes especies en distintos ambientes, sobre todo ante las actuales condiciones de cambio climático global.

Se ha realizado un estudio de la respuesta de seis progenies juveniles de *Juglans* spp., entre las que se incluyen *J. nigra*, *J. regia* e híbridos comerciales, pre-seleccionadas, de interés forestal. Se analizaron una serie de parámetros, tanto morfo-fisiológicos como bioquímicos, en condiciones iniciales, de estrés moderado y de rehidratación, encontrándose diferencias entre condiciones sin limitación de agua y de estrés hídrico. Las progenies más afectadas por la sequía han sido las *J. nigra* y en especial, MBNg3, que mostraron una estrategia evitadora del estrés.

Summary

Forestry productivity is directly affected by the availability of water. Hydric stress reduces this productivity due to plant growing inhibition. Therefore, knowledge about the ecology and behaviour of different species in different environments is necessary, especially in the actual conditions of global warming.

It has been made a study about the response of six *Juglans* spp. Progenies of forestry interest, involving *J. nigra*, *J. regia* and commercial hybrids. Different parameters, such as morphological, physiological and biochemical parameters, have been analyzed in different conditions (initial characterization, moderate stress and rehydration), observing differences between progenies placed under no water limitation conditions and progenies placed under hydric stress conditions. The progenies most affected by drought have been *J. nigra* and, specially, MBNg3. These progenies showed a hydric stress-avoidance strategy.

Agradecimientos

Agradezco la financiación recibida del FEDER a través del proyecto de investigación RTA-2011-00046-00-00 y, de la Consejería de Agroganadería y Recursos Autóctonos a través del SERIDA.

A mis tutoras Marta Ciordia Ara y Ana María Rodríguez Alonso, por su dedicación y ayuda.

Igualmente, agradezco las sugerencias indicadas por J. Majada y por la coordinadora e investigador del mencionado proyecto, Dra N. Aletà y A. Vilanova, respectivamente.

A todos los compañeros del Programa de Investigación Forestal del SERIDA, tanto por sus enseñanzas prácticas en el laboratorio, como por el apoyo en el manejo diario de las plantas en el invernadero.

A Viveros Forestal Catalana por el suministro de las plántulas de nogal.

Y, por último, agradecer a mi familia y amigos, especialmente a mi hermano.

Abreviaturas

T0: muestreo de caracterización inicial.

T1: muestreo de estrés moderado.

T2: muestreo de rehidratación.

MBR: Material de base de referencia.

T^a: Temperatura.

HR: Humedad relativa.

P: p-valor.

CC: Capacidad de campo.

CWC: Contenido de agua disponible en el contenedor.

H14: Crecimiento en el año 2014.

H14-H13: Porcentaje de crecimiento del año 2014 respecto al año 2013.

Diam: Diámetro.

ΔH : Incremento en altura.

ΔDiam : Incremento en diámetro.

$\Delta n^{\circ} \text{Hojas}$: Incremento en el número de hojas.

N^oHojas: Número de hojas.

N^oHojas/H14: Distribución de hojas a lo largo del tallo.

Long raquis: Longitud del raquis.

Ψ_h : Potencial hídrico.

Ψ_a : Potencial hídrico al amanecer.

Ψ_m : Potencial hídrico a medio día.

Ψ_{crit} : Potencial hídrico crítico.

Ψ_{letal} : Potencial hídrico letal.

RWC: Contenido relativo de agua en la hoja.

LWC: Contenido hídrico foliar.

A: Eficiencia fotosintética.

E: Transpiración.

gs: Conductancia estomática.

K: Conductividad hídrica.

EUAi: Tasa instantánea de la eficiencia del uso del agua.

Ci: Concentración interna de CO₂.

VPDL: Déficit de presión de vapor entre la hoja y el aire.

Fm: Fluorescencia máxima.

Fv: Fluorescencia variable.

Fv/Fm: Eficiencia máxima aparente del fotosistema II.

PSII: Fotosistema II.

L*, a*, b*: Medidas de color (sistema CIELAB).

C: Coordenada polar (Croma).

H: Coordenada polar (hue).

PRaíz: Porcentajes de peso seco de raíz.

PTallo: Porcentaje de peso seco de tallo.

PRaquis: Porcentaje de peso seco de raquis.

PFoliolos: Porcentaje de peso seco de foliolos.

BT: Biomasa total.

BA: Biomasa aérea.

BA/PRaíz: Relación entre la biomasa aérea y el peso seco de la raíz.

Índice

	Páginas
1. Introducción.....	1-4
1.1. Las especies de <i>Juglans</i> spp. como objeto de estudio.....	1
1.2. Concepto de estrés hídrico.....	1-2
1.3. Estrategias de respuesta de las plantas al estrés hídrico.....	2-3
1.4. Justificación.....	3-4
1.5. Objetivos.....	4
2. Material y métodos.....	5-9
2.1. Material vegetal.....	5
2.2. Diseño experimental.....	5-6
2.3. Variables evaluadas.....	6-8
2.3.1. Crecimiento y morfología.....	6
2.3.2. Disponibilidad hídrica (CWC).....	6
2.3.3. Contenido hídrico foliar (LWC) y contenido hídrico relativo (RWC).....	6-7
2.3.4. Potencial hídrico (Ψ_h).....	7
2.3.5. Medidas de intercambio gaseoso.....	7
2.3.6. Medidas de la fluorescencia de la clorofila.....	7
2.3.7. Colorimetría.....	7-8
2.3.8. Biomasa.....	8
2.3.9. Extracción y cuantificación de prolina libre.....	8
2.3.10. Extracción y cuantificación de pigmentos fotosintéticos.....	8
2.4. Análisis estadístico de los datos.....	9
3. Resultados.....	10-21
3.1. Relaciones hídricas.....	11-13
3.2. Caracterización morfológica.....	14-17
3.3. Caracterización fisiológica.....	17-19
3.4. Caracterización bioquímica.....	20
3.5. Relaciones entre variables.....	21
4. Discusión.....	22-26
5. Conclusiones.....	27
6. Bibliografía.....	28-30

1. Introducción

1.1. Las especies de *Juglans* spp. como objeto de estudio

Las especies incluidas en este trabajo se consideran bajo el nombre genérico de nogales y todas son materiales del género *Juglans* que tienen en común el elevado valor de su madera, reconocida ya desde la Edad Media (Grosser et al., 2000; Aletà et al., 2007; Montero et al., 2003).

El nogal común, o nogal europeo (*Juglans regia* L.) es originario de Asia Central. En la península ibérica, se considera una especie autóctona que se distribuye de norte a sur y prácticamente desde el nivel del mar hasta los 1600 m (Aletà et al., 2007). Esta distribución demuestra un grado de plasticidad fenotípica amplio, aunque no soporta los suelos mal drenados, el pH óptimo de éste se sitúa entre 6,5 y 7,5. No forma masas monoespecíficas forestales.

El nogal negro americano (*J. nigra* L.) es una especie originaria del Este de Norteamérica. Se desarrolla mejor en suelos neutros, profundos y bien drenados. Presenta una marcada dominancia apical y la ramificación es abundante. La madera es particularmente valiosa (Williams, US Forest Service).

El nogal de Arizona, (*Juglans major* (Torrey) Heller) se extiende desde el centro de Texas hasta el suroeste en Nuevo México y Arizona (Carr et al. 1986). Se puede encontrar en masas arbóreas puras o mixtas, o como individuos dispersos. El rango de pH óptimo del suelo para su desarrollo es 6-7. No tolera encharcamientos. Su tasa de crecimiento en condiciones óptimas es rápida.

Los **híbridos interespecíficos** existen en la naturaleza y destacan por su elevado crecimiento, atribuible a lo que se denomina vigor híbrido, y por su exigua producción de fruto. Al igual que los nogales americanos, es exigente en las condiciones de suelo y clima: requieren suelos profundos, bien drenados y con textura equilibrada, y un clima relativamente húmedo, no demasiado frío. Los cruzamientos más frecuentes para su obtención se consiguen entre selecciones de *J. nigra*, *J. major* o *J. hindsii* con *J. regia* (Aletà y Vilanova, 2006).

1.2. Concepto de estrés hídrico

De forma general, cuando una planta está sometida a unas condiciones significativamente diferentes de las óptimas para la vida se dice que está sometida a estrés, si bien las diferentes especies o variedades varían en sus requerimientos óptimos y, por tanto, en su susceptibilidad a un determinado estrés (Hsiao, 1973, Levitt, 1980).

El estudio de las respuestas de las plantas al estrés es un aspecto fundamental de la fisiología ambiental o ecofisiología, la cual se propone conocer cómo las plantas funcionan en sus ambientes naturales y cuáles son los patrones que determinan su

distribución, supervivencia y crecimiento (Ackerly et al., 2002).

Específicamente, el estrés hídrico es uno de los factores que más limitan el éxito de las repoblaciones forestales. La falta de agua provoca la mortalidad de una plantación en regiones templadas (Mummery y Battaglia, 2001), y en zonas secas limita el crecimiento de una plantación forestal y reduce su volumen total (Stape et al, 2004).

Por tanto, se puede considerar clave conocer la capacidad de respuesta de las especies forestales, y el daño generado por diferentes grados de déficit hídrico, a fin de realizar una planificación de las explotaciones madereras lo más rentable posible bajo las condiciones climáticas del lugar de la explotación. La gestión es crítica para la respuesta positiva al crecimiento forestal a un clima más caluroso, y la selección de las mejores especies para las nuevas condiciones climáticas será de vital importancia, puesto que los modelos climáticos globales predicen fluctuaciones y valores más extremos en la temperatura y precipitaciones (Kattenberg et al., 1996; IPCC, 2001) durante las próximas décadas. Concretamente, en la Península Ibérica se espera un incremento en la severidad, duración y frecuencia de las sequías estivales durante el presente siglo (Christensen et al., 2007). Y en el Principado de Asturias se han constatado cambios en las últimas décadas en el clima, el medio natural, costero y marino, como por ejemplo, incrementos medios de temperatura atmosférica de 0,21 °C por década desde los años 60. (Informe CLIMAS, 2009).

1.3. Estrategias de respuesta de las plantas al estrés hídrico

Para resistir la sequía, los árboles han desarrollado diversos mecanismos, cuyo coste puede diferir en términos de productividad (Ludlow, 1989). Las estrategias de resistencia al déficit hídrico en las plantas las agrupó Levitt (1980) en dos: la estrategia *tolerante* a la sequía y la *evitadora*. La tolerancia a la sequía de las plantas depende de muchos factores, entre ellos el desarrollo radical, la capacidad xilemática para el transporte de agua y la regulación estomática. Mientras todas las estrategias de tolerancia conllevan una limitación mayor o menor del crecimiento, solo la estrategia de ahorro de agua conlleva un crecimiento limitado en el caso de la evitación del estrés. Las especies que derrochan agua son, en general, más productivas y han desarrollado mecanismos que les permite una eficaz extracción del agua del sustrato y una elevada conductividad hidráulica. Ello les confiere de una gran competitividad, pero en condiciones de carencia de agua crónica, predominan las especies tolerantes al estrés hídrico (Valladares, 2004).

En el mundo vegetal, las respuestas morfológicas al estrés hídrico incluyen, por ejemplo, disminuciones en el peso seco total, en la emisión de hojas y número de ramas laterales (Osorio et al., 1998). También se han observado reducciones de la superficie foliar, bien modificando el tamaño de las hojas (Braatne et al., 1992) o incrementando la senescencia, lo cual conlleva una reducción de la tasa fotosintética por unidad de área foliar, o incluso una disminución de la fotosíntesis en las hojas restantes (Boyer, 1976). Otra de las estrategias más generalizadas es la inversión del reparto de biomasa (Nagakura et al., 2004), las plantas se adaptan

a la sequía elongando y expansionando el sistema radical constituyendo uno de los mecanismos más efectivos de las plantas de ambientes mesófitos (Begg, 1980).

La disminución de la tasa fotosintética en plantas creciendo bajo condiciones de estrés hídrico (Li et al., 2007) puede atribuirse bien a una disminución de la conductancia estomática y/o a limitaciones no estomáticas (Cornic y Massacci, 1996).

Una de las respuestas inmediatas de las plantas al estrés hídrico consiste en la reducción de las pérdidas de agua por transpiración. La productividad y la evapotranspiración están linealmente correlacionadas (Ehleringer y Mooney, 1983; Baldocchi et al., 1987; Stephenson, 1990).

La mejora del estatus hídrico de la planta y en especial el mantenimiento de la turgencia, que puede lograrse mediante el ajuste osmótico y/o cambios en la elasticidad de la pared celular, es esencial para el mantenimiento de la actividad fisiológica durante largos periodos de sequía. En el ajuste osmótico, la prolina, es uno de los compuestos que juega un papel importante, pues actúa reteniendo el agua y protegiendo a la célula de la desecación (Medrano y Flexas, 2003).

Existen pocas referencias bibliográficas relativas a las respuestas fisiológicas de *Juglans* spp. al estrés hídrico y, la mayoría se refieren a *J. nigra* (Pallardy y Rhoads, 1993, Pallardy et al., 1991) o a materiales de *J. regia* seleccionados principalmente por su aptitud frutícola (Ben Báaziz et al. 2012, Rosati et al. 2006, Sun et al. 2011), o clones híbridos (Cochard, 2002).

1.4. Justificación

Entre las directrices para conseguir resultados óptimos en las nuevas plantaciones forestales de nogal destacan dos: la utilización de un buen material genético y un adecuado manejo del agua.

En lo que respecta a la primera, la mejor garantía es poder disponer de materiales cualificados y/o controlados de acuerdo con la normativa (en 2003 entró en vigor el Real Decreto 289/03 que traspone y adapta a España la Directiva Europea 1999/105/CE sobre comercialización de materiales forestales de reproducción (MFR)). La selección de estas categorías de material permite asegurar tanto el origen como la calidad genética de los materiales con los que se realizan las plantaciones o repoblaciones. No obstante, a pesar de los avances realizados en España en la selección y mejora de *Juglans* spp., los MFR registrados en el Catálogo Nacional de Materiales de Base (CNMB) se corresponden principalmente con clones de *J. nigra* de empresas privadas, clones de híbridos y de *J. regia* del IRTA y Huertos Semilleros de *J. regia*, categoría cualificada, que aún no están en producción.

Y, relacionado con la segunda directriz, el crecimiento del nogal es especialmente sensible al déficit de agua durante su crecimiento vegetativo y los grandes cambios que se están produciendo a nivel ambiental ocasionarán una

respuesta a nivel biótico. Por ello resulta necesario caracterizar su respuesta adaptativa, en situaciones de limitación hídrica, de los recursos genéticos de nogal preseleccionados en distintas ecologías para obtener madera de calidad de nogal, previamente a su establecimiento masivo en el campo.

1.5. Objetivos

El objetivo general de este proyecto es evaluar, en fase juvenil, la respuesta de progenies seleccionadas de semibratías F1 de *Juglans* spp al estrés hídrico moderado en condiciones controladas, que permitan acotar limitaciones geográficas a los distintos materiales y aportar herramientas útiles y aplicables a la caracterización adaptativa de materiales forestales.

Para desarrollar este objetivo general se han abordado los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluación morfológica, fisiológica y bioquímica precoz de progenies juveniles seleccionadas de semibratías F1 de *Juglans* spp. en ambiente controlado.
2. Establecer posibles marcadores morfo-fisiológicos que permitan la detección precoz de materiales de *Juglans* spp. de interés ante situaciones de estrés hídrico moderado
3. Valorar la recuperación fisiológica de las diferentes progenies de nogal tras su rehidratación.
4. Valorar la utilización del espectrofotómetro para mediciones de reflectancia espectral como marcador precoz no destructivo en hojas de nogales en situación de limitación hídrica.

2. Material y métodos

2.1. Material vegetal

Se utilizaron seis progenies de semifratrias F1 de nogal: dos de *J. regia* (MBT 231, MBPo 6), dos de *J. nigra* (MBNg 3, MBNg 10), todas ellas pre-seleccionadas por el IRTA y, dos híbridos franceses comerciales de referencia (Mj209 x Ra, Ng23 x Ra), obtenidas en vivero a partir de progenitores de familia como Material de Base.

Las plántulas, con 3 meses de edad, se enviaron a la finca del SERIDA en Villaviciosa a principios de julio de 2013. Se transplantaron a macetas individuales de 5,5 litros y 30 cm de profundidad, utilizando una mezcla de turba (pH: 6-7), arena de sílice y vermiculita exfoliada de granulometría 3, en proporción 2:1:1 v/v. Se mantuvieron en invernadero durante todo el ensayo, con clima controlado mediante sistemas de refrigeración (apertura cenital, mallas de sombreo, *cooling* y extractores de aire). La Tª y la Humedad Relativa (HR) se registraron diariamente con sondas instaladas en el invernadero. El riego se aportó por goteo, a razón de un gotero de 2 l h⁻¹ por planta.

En la primavera de 2014 se aplicó a todas las plantas una dosis de 3 g/maceta de abono Multigreen NPK 17-8-18 + 1,6 MgO + 1Fe, con nitrógeno de liberación lenta de 4 meses de duración.

2.2. Diseño experimental

Se estableció un diseño en bloques completos con dos factores: el primer factor el tratamiento hídrico con dos niveles, y el segundo factor progenie, con seis niveles, y cuatro bloques aleatorizados en el invernadero, con 15 plantas como pseudorréplicas (2 tratamientos de riego x 6 progenies x 4 bloques x 15 plantas por progenie, lo que hace un total de 720 plantas). Las progenies, especificadas en el apartado 2.1, se aleatorizaron en cada bloque.

Se estimó el peso inicial a capacidad de campo (CC). El agua disponible se cuantificó gravimétricamente. Para ello, 16 contenedores con el mismo sustrato que el ensayo, pero sin planta, se llevaron previamente a CC tras saturación y posterior percolación hasta alcanzar el equilibrio, y se dejaron secar a 60°C hasta alcanzar peso seco constante. Se calculó el contenido de agua del sustrato mediante la diferencia de peso de los contenedores a CC y con el sustrato seco.

Se implantaron dos niveles hídricos: i) un nivel de riego deficitario moderado (tratamiento estrés), que se estableció en torno al 50% de la CC en el que, una vez alcanzado, se mantuvieron durante dos semanas y, ii) posteriormente, a fin de valorar la capacidad de recuperación de las plantas sometidas a limitación hídrica, se rehidrataron hasta alcanzar progresivamente el 75-80% de la CC (tratamiento

rehidratación), manteniéndose en estas condiciones durante una semana. Las plantas control se mantuvieron en torno al 75-80% de la CC durante el experimento.

Se realizaron tres muestreos: i) el primero (T0), la semana del 19 al 24 de mayo de 2014 en condiciones control; ii) el segundo (T1), la semana del 16 de junio de 2014 en condiciones de estrés hídrico moderado y de control; iii) y el tercer muestreo (T2) se realizó entre el 30 de junio y el 1 de julio en las plantas control, así como en las rehidratadas. Durante los muestreos, la Tª media en el interior del invernadero fue de 16,51°C ± 1,10; 20,42°C ± 0,84; y 18,82 ± 0,96; y la HR del 75,21% ± 4,60; 74,4% ± 2,86 y 79,29% ± 3,94, respectivamente para T0, T1 y T2.

2.3. Variables evaluadas

Para la cuantificación de los parámetros evaluados se seleccionó una submuestra de 12 plantas por familia y tratamiento.

2.3.1. Crecimiento y morfología

Para determinar el crecimiento de las plantas se midió la altura correspondiente al año 2013, el incremento en altura durante el periodo de estrés moderado (T1-T0), así como la altura total al finalizar el ensayo. Se consideró la distancia desde el cuello de la raíz hasta la base de la yema apical. El diámetro del tallo se midió con un calibre digital a 5 cm del cuello de la raíz.

Se cuantificó el número de hojas en los muestreos T0 y T1, el tipo de ramificación, densa o dispersa a lo largo del tallo. Se determinó la rectitud del fuste en el tiempo T0. La longitud del raquis se cuantificó en el muestreo T1, considerándola desde el punto de inserción en el tallo hasta la base del foliolo terminal. Además, se valoró el grado de epinastia que mostraban las diferentes progenies.

2.3.2. Disponibilidad hídrica (CWC)

La cantidad de agua a aportar se determinó mediante el método gravimétrico), pesando los tiestos de la submuestra una vez iniciada la brotación, con una frecuencia inicial de 3 días/semana, aumentando a partir de mayo a cinco veces/semana para mantener el nivel de saturación adecuado del sustrato. Cada contenedor se cubrió con plástico retráctil para evitar pérdidas de agua por evaporación.

2.3.3. Contenido hídrico foliar (LWC) y contenido hídrico relativo (RWC)

La determinación del LWC y RWC se realizó en los muestreos T0 y T1. Para ello, se cortó, en cada individuo de la submuestra, uno de los dos folíolos

inmediatamente inferiores al terminal. Cuantificado el peso fresco (PF), se rehidrataron para obtener su peso hidratado (PH). Finalmente, se secaron en una estufa de circulación forzada de aire (Selecta Digitronic, Barcelona, España) a 65° durante 24 horas para obtener el peso seco (PS).

2.3.4. Potencial hídrico (Ψ_h)

Para la medición del potencial hídrico (Ψ_h) de las plantas se utilizó una cámara de presión de Scholander siguiendo la metodología descrita por Scholander et al. (1965) y Turner (1988). La medida de presión obtenida por la cámara de presión se corresponde con el potencial hídrico. Se realizaron medidas tanto al amanecer (Ψ_a), como al mediodía (Ψ_m), en los tres muestreos diferentes.

2.3.5. Medidas de intercambio gaseoso

Las medidas de la eficiencia fotosintética (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), tasa de transpiración (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), g_s (conductancia, $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y C_i (concentración de CO_2 interna) se realizaron con un analizador portátil de gases por infrarrojos IRGA (LICOR 6400 XT)

La eficiencia instantánea del uso de agua (EU_{Ai}) se calculó como el cociente entre la eficiencia fotosintética (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y la transpiración (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). La conductividad hidráulica (K) se obtuvo mediante el cociente de la transpiración (E) y la diferencia de los potenciales hídricos (Ψ_a y Ψ_m).

2.3.6. Medidas de fluorescencia de la clorofila

Para la determinación de la fluorescencia se utilizó un fluorímetro modulado portátil (Hansatech FMS 2), basado en la detección de la emisión de la fluorescencia de la clorofila. La fluorescencia máxima (F_m), la fluorescencia variable (F_v) y la eficiencia máxima aparente del fotosistema II (F_v/F_m), mediante adaptación previa a condiciones de oscuridad durante 30 minutos, seguida de un pulso lumínico saturante.

Tanto las medidas de intercambio gaseoso, como las medidas de fluorescencia y los potenciales hídricos se realizaron en las tres fechas de muestreo y se midieron en los folíolos terminales o en el inmediatamente inferior en el caso de ausencia o imposibilidad del uso de los mismos, previa aclimatación de una hora de las plantas bajo lámparas de alta presión de vapor sodio, que suministraban una irradiancia a nivel del dosel foliar de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

2.3.7. Colorimetría

La reflectancia de los folíolos se determinó en el muestreo T1 utilizando un espectrofotómetro portátil (Konica Minolta CM-2300d). Se cuantificó sobre dos hojas por

planta en un máximo de 40 plantas por progenie y tratamiento, apoyadas sobre un fondo blanco. Se obtuvieron los espacios de color L^* , a^* , b^* (sistema CIELAB), y las coordenadas polares C^* (Croma) y h (hue). Se recogió la reflectancia espectral para las longitudes de onda comprendidas entre los 360 y 740 nm.

2.3.8. Biomasa

Al finalizar el ensayo se tomó una submuestra de 12 plantas por progenie y tratamiento para la obtención del reparto de biomasa. Se procedió a la separación individual de folíolos, raquis, tallo y raíz; cada una de las fracciones se introdujo, en un sobre de papel, en una estufa de aire forzado a 102°C durante 24 horas para su completo secado y así obtener el peso seco de cada fracción (g).

Para cada planta se calculó el porcentaje de peso seco de los folíolos, raquis, tallo y raíz mediante el cociente de cada parte y la biomasa total, calculada como la suma de todos los pesos secos.

Además, se calculó la biomasa aérea (BA) como la suma de todos los pesos secos excluyendo el de la raíz, y la relación entre la BA y el peso seco de la raíz (BA/Praíz).

2.3.9. Extracción y cuantificación de prolina libre

La extracción y cuantificación de prolina libre se realizó empleando una modificación del método descrito por Bates et al. (1973), en una solución de ácido acético glacial con ninhidrina, utilizando para ello una recta patrón de prolina. La extracción (tanto de prolinas como de los pigmentos fotosintéticos del apartado 2.3.10.) se realizó en folíolos inmediatamente inferiores a los terminales, recogidos en 10 individuos por progenie, tratamiento y bloque, durante el muestreo T0 y T1.

2.3.10. Extracción y cuantificación de pigmentos fotosintéticos

Para la extracción y cuantificación de clorofilas y carotenoides se ha utilizado una modificación del protocolo descrito por Sims & Gamon (2002), en una solución de acetona/tampón tris (80:20, v:v, pH: 7,8). Para la extracción y cuantificación de antocianinas se ha utilizado la modificación del mismo protocolo, pero en una solución de metanol/HCl/H₂O (90:1:1, v: v: v).

Las muestras de los apartados 2.3.9 y 2.3.10 recogidas en T1 se mantienen en congelación, dada la imposibilidad de procesarlas a tiempo de entregar este trabajo.

2.4. Análisis estadístico de los datos

El análisis estadístico de todos los datos obtenidos para cada parámetro se realizó mediante la aplicación estadística SPSS vs 12,0 (2003).

Dado que las plantas presentaban diferentes alturas al inicio del ensayo, se incluyó como covariable su altura para valorar el efecto que pudiera tener sobre los factores. En los análisis de ANCOVA multivariantes se pudo observar que la covariable altura no tenía interacción con los factores en estudio, por lo que se suprimió la misma de los análisis estadísticos posteriores.

Se realizó una transformación trigonométrica (arcsen) en los valores expresados en porcentajes, si bien, en las figuras se reflejan los valores reales. Además, se realizaron análisis de medidas no paramétricas (Chi-cuadrado) para las variables cualitativas (rectitud, distribución de hojas a lo largo del tallo y epinastia).

Las diferencias e interacciones entre progenies y tratamientos hídricos se determinaron mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA). La comparación de medias se realizó utilizando el Test *a posteriori* de Scheffé ($P < 0,05$). Las relaciones bivariadas se analizaron utilizando los coeficientes de correlación de Pearson.

Finalmente, para la obtención de las figuras se utilizó el paquete de gráficos científicos y análisis de datos SIGMAPLOT[®] vs 10.0 (2007).

3. Resultados

Las distintas progenies muestran diferentes comportamientos, tanto entre tratamientos como entre las mismas progenies, para determinados parámetros de crecimiento, morfología, consumos de agua, potenciales hídricos, y variables de intercambio gaseoso y fluorescencia en los tres muestreos del ensayo (T0, T1 y T2).

En el **muestreo T0**, considerado de caracterización general, el análisis de varianza (ANOVA de un factor) realizado para la variable consumo de agua (mL consumidos progenie⁻¹) mostró diferencias significativas entre progenies ($P < 0,001$)

Se han encontrado diferencias significativas para las siguientes variables morfológicas y de crecimiento: altura, el porcentaje de incremento de altura en el año 2014 respecto al año 2013, el número de hojas y la distribución de las hojas en el tallo ($P < 0,05$).

Respecto a los potenciales hídricos, el análisis mostró diferencias significativas entre progenies solo para Ψ_m ($F=4,961$; $P=0,001$). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas entre progenies para RWC (%), pero sí para el LWC (%) ($F=2,768$; $P=0,021$).

En los parámetros de intercambio gaseoso se observaron diferencias significativas entre progenies en la tasa de transpiración ($F=4,182$; $P=0,002$) y en la conductividad hidráulica ($F=4,344$; $P=0,001$).

En cuanto a la fluorescencia, en el muestreo T0 no existen diferencias significativas entre progenies para la eficiencia máxima aparente del fotosistema II (F_v/F_m) ($F=1,121$; $P=0,355$).

De la misma manera, tampoco se observaron diferencias significativas entre progenies en los contenidos de prolina ($F=1,483$; $P=0,247$), en clorofila a ($F=1,831$; $P=0,160$), en clorofila b ($F=1,467$; $P=0,252$), en carotenoides ($F=1,657$; $P=0,199$) o en antocianinas ($F=1,257$; $P=0,327$).

En el **muestreo T1**, en estrés moderado, analizando el muestreo T1 con un ANOVA de dos vías, hubo diferencias significativas para la variable consumo de agua entre progenies y tratamientos ($P < 0,005$).

El tratamiento estrés moderado afectó significativamente al vigor de las plantas, considerado como el incremento del diámetro del tallo ($F=15,486$; $P=0,002$), pero no afectó al incremento en altura durante el periodo de estrés moderado ($F=0,712$; $P=0,4$). Cabe señalar que la variable longitud de los raquis mostró diferencias entre progenies ($F=22,813$; $P=0,001$), así como el incremento en el número de hojas entre tratamientos ($F=18,317$; $P=0,001$).

Se observaron además diferencias significativas entre progenies ($F=17,439$; $P < 0,001$ y $F=18,541$; $P < 0,001$) y entre tratamientos ($F=166,610$; $P < 0,001$ y $F=53,318$; $P < 0,001$), para las dos variables Ψ_a y Ψ_m .

En cuanto a la biomasa, existen diferencias significativas entre tratamientos para el parámetro PTallos ($F=4,153$; $P=0,043$). Entre las distintas progenies se observaron

diferencias significativas en el PRaíz ($F=3,970$; $P=0,002$), en el PRAquis ($F=13,740$; $P=0,001$) y en el PFoliolos ($F=3,557$; $P=0,005$).

Se observaron diferencias significativas entre tratamientos en la biomasa total (BT) ($F=12,450$; $P=0,001$) y en la biomasa aérea (BA) ($F=9,165$; $P=0,003$) pero no se observaron diferencias en la relación BA/PRaíz ($F=0,000$; $p=0,996$). Entre las progenies sí se observan diferencias significativas para la biomasa total ($F=9,644$; $P=0,001$) y para la biomasa aérea ($F=5,913$; $P=0,001$), además de para la relación BA/PRaíz ($F=3,230$; $P=0,009$).

Contrariamente, no se observaron diferencias entre tratamientos para el LWC(%) ($F=0,52$; $P=0,821$) ni entre progenies ($F=1,387$; $P=0,234$). Del mismo modo, no se aprecian diferencias significativas para el RWC (%) ni entre tratamientos ($F=0,084$; $P=0,773$) ni entre progenies ($F=0,807$; $P=0,537$).

No existen diferencias significativas entre tratamientos para ningún parámetro de intercambio gaseoso ($P>0,005$). De la misma manera, tampoco se observaron diferencias significativas para los parámetros entre las progenies ($P>0,005$).

Para la fluorescencia se observaron diferencias entre tratamientos ($F=17,481$; $P=0,001$), pero no entre progenies ($F=0,098$; $P=0,992$).

Por último, para la variable colorimetría se observaron diferencias significativas entre tratamientos en b^* ($F=12,107$; $P=0,001$) y las coordenadas polares C ($F=10,971$; $P=0,002$) y h ($F=21,332$; $P=0,000$), y entre progenies solamente en L^* y en h ($P<0,005$).

En el **muestreo T2** de rehidratación se repite el patrón señalado para el periodo de estrés moderado (T1) en el consumo de agua, existiendo diferencias significativas entre tratamientos y entre progenies ($P<0,005$).

No se observaron diferencias significativas entre tratamientos para Ψ_a y Ψ_m ($F=2,940$; $P=0,089$ y $F=2,692$; $P=0,103$, respectivamente). Sin embargo, se han encontrado diferencias significativas entre progenies para Ψ_m ($F=4,025$; $P=0,002$).

Por último, tampoco se observaron diferencias significativas entre tratamientos ni entre progenies para los parámetros de intercambio gaseoso ($P>0,005$), ni tampoco para la fluorescencia (F_v/F_m) ($P>0,005$).

3.1. Relaciones hídricas

En la figura 1 se representan los consumos de agua (ml planta^{-1}) totales para cada una de las progenies, como la suma de los consumidos en cada uno de los tres periodos que se establecieron en el ensayo.

A fin de verificar la correcta instalación y manejo del riego con los materiales en estudio en el invernadero, en el muestreo T0 se presentan los consumos de las plantas control, así como los correspondientes a las que posteriormente se sometieron a estrés hídrico moderado, viéndose que no hay diferencia entre tratamientos ($P>0,005$). Las progenies que más agua consumieron durante la totalidad del ensayo

fueron los híbridos Ng23xRa, (8535 mL en control y 6647 mL en estrés) y Mj209xRa (8665 mL en control y de 6767 mL en estrés) y, la progenie que menos agua necesitó durante el ensayo fue MBPo6 (4558 mL en control y 4075 ml en estrés) (fig 1).

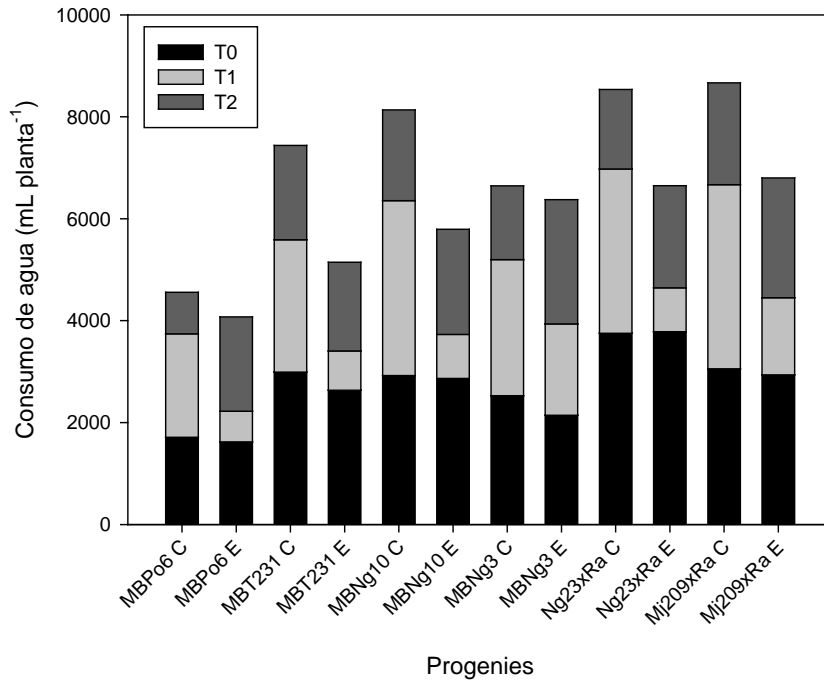


Figura 1. Consumos de agua total (mL planta⁻¹) para cada progenie en estudio y tratamiento hídrico, mostrando los relativos a cada periodo de muestreo (T0: caracterización inicial, T1: estrés moderado, T2: rehidratación).

En la figura 2 se muestran los valores de potenciales hídricos correspondientes al muestreo de estrés moderado T1. Se puede observar que las progenies del tratamiento estrés muestran valores más negativos, tanto para Ψ_a (fig. 2 A) como en Ψ_m (fig. 2 B) siendo además notable que los valores de Ψ_m son más negativos que en Ψ_a , considerando los dos tratamientos.

El rango de variación de Ψ_a y Ψ_m en las progenies control se sitúa entre -0,36 y -0,51MPa, y -0,94 y -1,29MPa, respectivamente, mientras que en las progenies estresadas varía entre -0,56 y -1,79MPa, y -1,05 y -2,03 MPa, respectivamente.

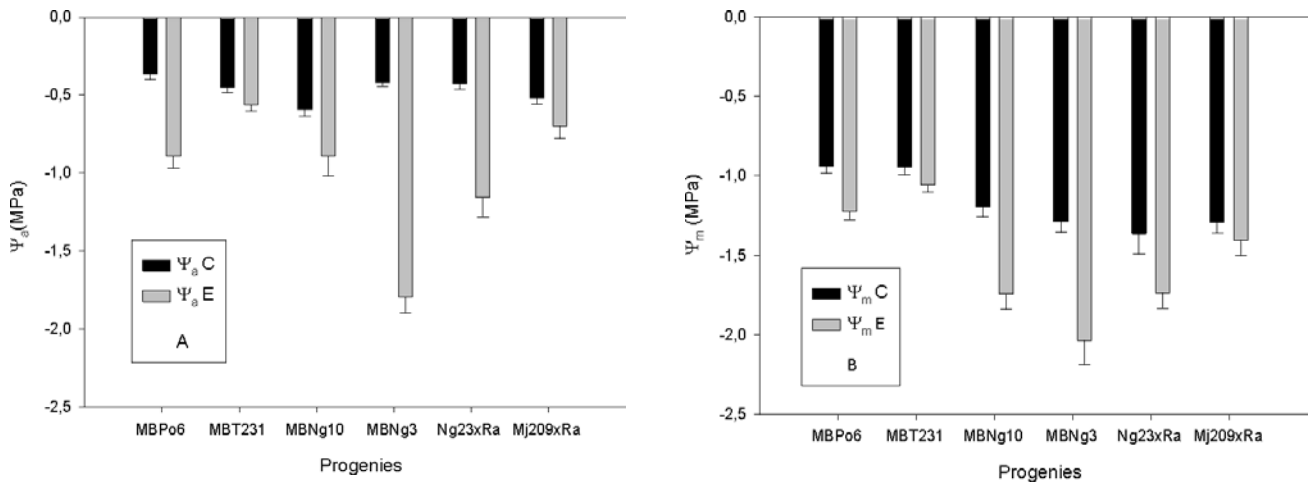


Figura 2. Potencial hídrico medido al amanecer (Ψ_a) (A) y al mediodía (Ψ_m) (B) para las progenies en el muestreo T1 (estrés moderado).

Atendiendo al efecto del tratamiento en el Ψ_m y en el Ψ_a para cada progenie, en estrés, la progenie MBNg3 es la única que no recupera de manera significativa ($F=1,794$, $P=0,195$) los niveles del Ψ_a , manteniéndolo muy próximo al del Ψ_m . En el caso del tratamiento control, todas las progenies mostraron diferencias significativas ($P < 0,001$) entre Ψ_m y Ψ_a .

En el muestreo de rehidratación (T2) (fig. 3) se observa significativamente la recuperación de ambos potenciales en las progenies rehidratadas, ya que sus potenciales son similares a los de las progenies control en todas las progenies, tanto en tratamiento control como en tratamiento estrés. Esta recuperación sucede en todas las progenies, incluso en la MBNg3 en el tratamiento estrés que en el muestreo T1 no recuperaba ($F=5,934$; $P=0,023$). Se puede apreciar que los valores de Ψ_m son más negativos que los valores de Ψ_a , teniendo valores medios en las plantas control de -0,2 y -0,26MPa y -0,83 y -1,02MPa, y en las plantas estresadas de -0,17 y -0,24MPa y -0,58 y -1,14MPa, respectivamente.

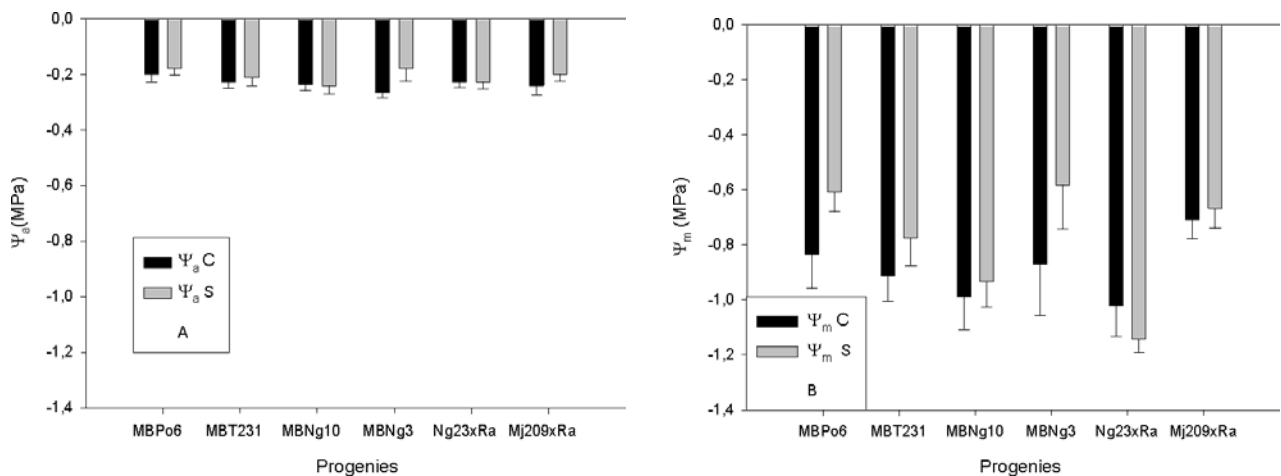


Figura 3. Potencial hídrico medido al amanecer (Ψ_a) (A) y al mediodía (Ψ_m) (B) para las progenies en el muestreo T2 (rehidratación).

3.2. Caracterización morfológica

Respecto al crecimiento en altura (H14) en el muestreo de caracterización T0 las progenies que significativamente ($P < 0,005$) crecieron más durante el periodo de riego al 80%CC fueron la MBT-231 (60,65%) y la MBPo6 (50,02%) y la que presentó valores más bajos fue la MBNg3 (10,45%).

Considerando el porcentaje de crecimiento de este periodo (H14) respecto a H13, las progenies que significativamente crecieron más fueron la MBPo6 y la MBT231, en contraposición a las progenies Ng23xRa, MBNg10 y MBNg3. Por el contrario, en el número de hojas destaca significativamente la progenie MBNg3 con el mayor número de hojas (12 hojas), teniendo los valores más bajos las progenies MBPo6 (7 hojas) y MBT231 (6 hojas).

En lo que respecta a la distribución de las hojas a lo largo del tallo, las progenies se diferencian significativamente, ($\chi^2 < 0,001$). Las progenies de *J. nigra* (MBNg10 y MBNg3) muestran las hojas concentradas en el ápice, en contraposición a los materiales de *J. regia*, en los que las hojas están distribuidas por el tallo. Entre las progenies de los materiales híbridos se encontraron individuos con los dos modelos de arquitectura.

La prueba de Chi-cuadrado de Pearson realizada para la rectitud del tallo, valorado el grado de rectitud del mismo (1: rectitud baja, 4: rectitud media, 7: recto), pone de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre progenies ($\chi^2 < 0,001$) para esta variable. Las progenies MBNg10 y MBNg3 presentan el mayor número de individuos con tallo totalmente recto (21,7% y 16,7%, respectivamente), frente a los híbridos Mj 209xRa y Ng23xRa, únicas progenies en las que se recuentan individuos con tallos con grado de rectitud muy bajo.

En el muestreo T1 de estrés moderado se observaron diferencias significativas entre tratamientos para el diámetro en las progenies MBNg10 ($F=8,636$; $P=0,008$), MBNg3 ($F=9,364$; $P=0,006$) y Ng23xRa ($F=9,415$; $P=0,006$). Estas progenies acusaron una disminución en el incremento del diámetro del tallo (fig. 4). La progenie MbNg3 mostró valores incluso inferiores a los medidos en las plantas control (-0,0883 cm).

Además, esta progenie (MBNg3) mostró significativamente un menor nº de hojas en estrés frente al control ($F=22,208$; $P \leq 0,001$) (fig. 5).

Además, existen diferencias significativas en la longitud del raquis en las progenies MBNg10 ($F=6,240$; $P=0,020$) y MBNg3 ($F=5,530$; $P=0,028$), mostrando valores inferiores las progenies en estrés que las control.

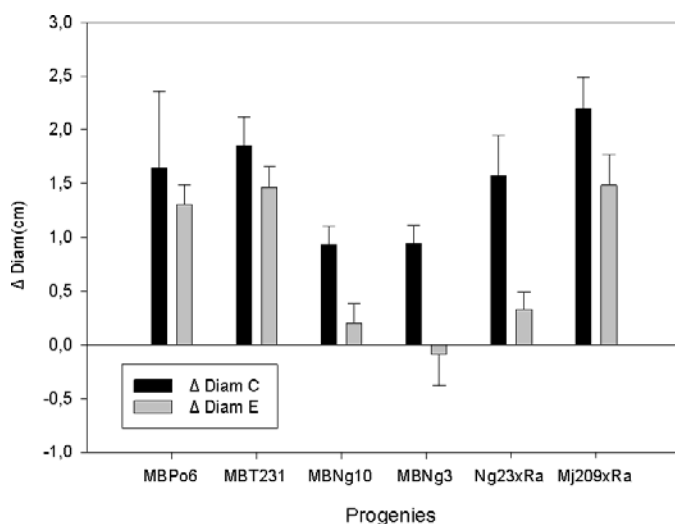


Figura 4. Incremento en diámetro en tratamientos control (C) y estrés (E) en las diferentes progenies en el muestreo de estrés moderado (T1).

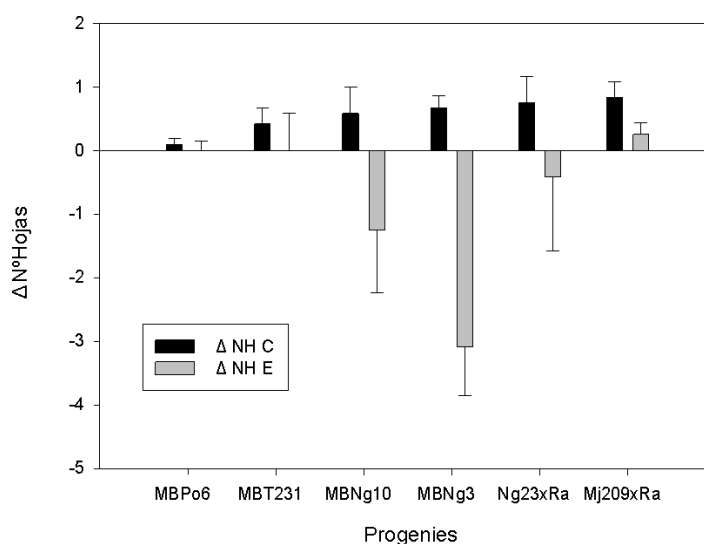


Figura 5. Incremento en número de hojas en tratamientos control (C) y estrés (E) en las diferentes progenies en el muestreo de estrés moderado (T1).

La figura 6 representa el fraccionamiento de biomasa total, distribuida en valores de porcentajes de peso de la raíz (PRaíz), del tallo principal (PTallo), de los raquis (PRAquis) y de los folíolos (PFolíolos), calculados respecto a la biomasa final de las plantas.

A pesar de haberse detectado un efecto del tratamiento en el PTallo, no hay diferencias significativas en esta variable entre progenies, probablemente debido a la heterogeneidad de la muestra.

La única progenie que ha mostrado significativamente una disminución en el PRAquis en condiciones de estrés ha sido MBNg3 ($F=4,533$; $P=0,045$).

En control, la progenie con valor más alto para PRaíz es Ng23xRa (70,09%), y la progenie con el menor valor es MBT231 (61,80%). Respecto al Praquis, la progenie con un mayor porcentaje es la MBT231 (4,73%) y la progenie con el menor valor es

MBNg3 (2,74%). Por último, la progenie que destaca por el mayor valor para PFoliolos es MBT231 (16,95%), en oposición a Ng23xRa (10,61%).

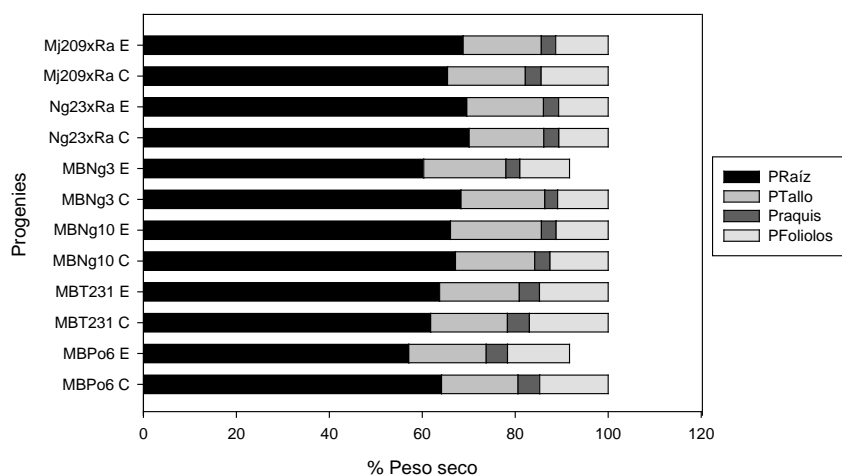


Figura 6. Distribución de la biomasa total fraccionada de la planta según tratamiento y progenie en el muestreo T1. Porcentaje de peso de la raíz (PRaíz), porcentaje de peso seco del tallo (PTallo), porcentaje de peso seco de los raquis (Praquis) y porcentaje de peso seco de los foliolos (PFoliolos). C: tratamiento control; E: tratamiento estrés.

En la figura 7 se muestran los valores de BT (A) y BA (B) para las diferentes progenies. La única progenie en la que se observaron diferencias fue la MBNg3, tanto para la BT ($F=24,046$; $P\leq 0,001$) como para la BA ($F=13,844$; $P\leq 0,001$), que disminuyen significativamente.

Las progenies con mayor porcentaje de biomasa total en control son MBNg3 (84,01%) y MBNg10 (81,14%), y las progenies con menor porcentaje son MBPo6 (43,26%) y la MBT231 (60,83%). Respecto a la biomasa aérea, las progenies con mayor porcentaje son igualmente las MBNg3 (26,59%) y MBNg10 (26,24%) y las progenies con menor porcentaje son la MBPo6 (14,65%) y la Ng23xRa (22,91%). Igualmente, estas progenies (MBNg10 y MBNg3) tienen un mayor porcentaje de peso de raíz (PRaíz).

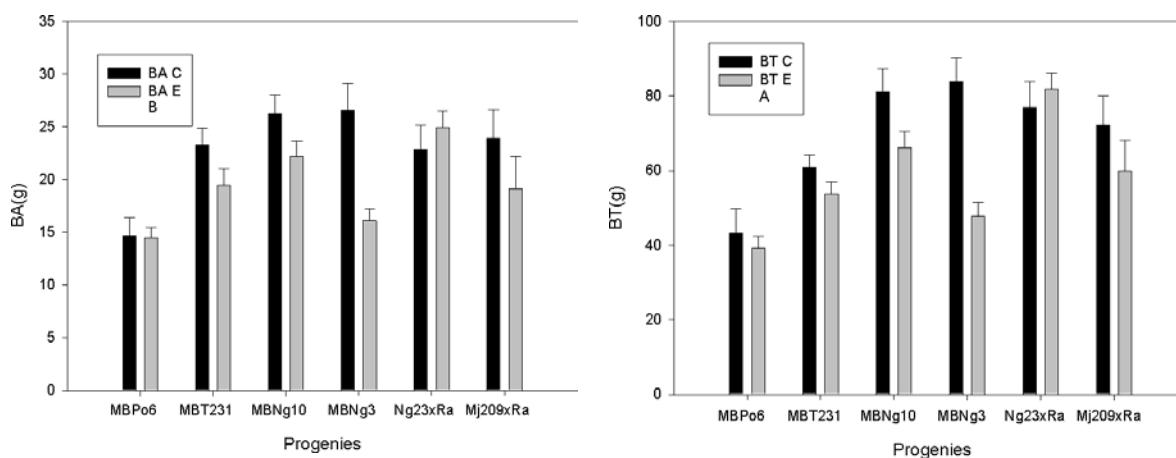


Figura 7 . Peso seco (g) de biomasa total (BT) (A) y biomasa aérea (BA) (B) en las distintas progenies. C:tratamiento control; E: tratamiento estrés.

La prueba de Chi-cuadrado de Pearson realizada para la variable epinastia de los foliolos (0: ausencia de epinastia, 1: epinastia intermedia (45°), 2: epinastia completa (90°), pone de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre progenies ($\chi^2 < 0,001$) para esta variable. En control solamente se observaron individuos con grado de epinastia 0. En estrés, la única familia que no presentó individuos con ningún síntoma de epinastia fue MBT231, mientras que las progenies MBNg10, MBNg3 y el híbrido Ng23xRa presentaron individuos con el mayor grado de epinastia (25% y 45%, y 30%, respectivamente).

3.3. Caracterización fisiológica

La respuesta de las progenies al factor estrés hídrico para RWC ha sido muy heterogénea, sin existir un patrón común. Así, hay familias que aumentan el RWC (MBNg10, MBNg3 y Mj209xRa) aunque sin encontrarse diferencias significativas, mientras que la MBPo6 es la única que disminuye significativamente el valor de esta variable ($F=5,881$; $P=0,024$).

En control, destacó la progenie es la MBNg3 (74,05%) con los valores más altos en LWC, y la MBPo6 (92,26%) en RWC. La progenie con valores más bajos de LWC fue la progenie Mj209xRa (66,75%) y en el caso de RWC fue la progenie MBNg3 (80,02%) (fig. 8).

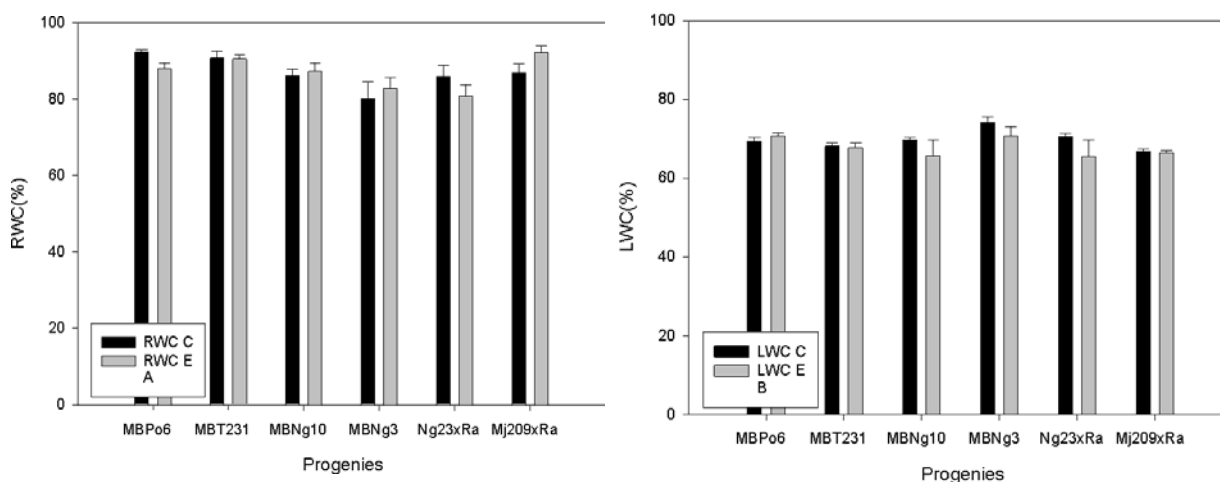


Figura 8. Contenido hídrico en las hojas para el muestreo de estrés moderado T1 (RWC% (A) y LWC% (B)). C: tratamiento control. E: tratamiento estrés.

En relación con los parámetros de fotosíntesis, en el muestreo de caracterización inicial (T0), las progenies con mayores tasas de transpiración significativamente fueron las Mj209xRa y MBPo6, siendo la MBNg10 la progenie con menor tasa de transpiración. En cuanto a la conductividad hidráulica, las progenies con mayores niveles fueron la MBPo6 y la MBT231, y las progenies con menores niveles fueron las MBNg3, Ng23xRa y la MBNg10.

En la figura 9 se observan los diferentes valores de la eficiencia fotosintética en los dos muestreos del ensayo. Se puede apreciar cómo en los sucesivos muestreos va

umentando la tasa de fotosíntesis, desde valores en torno a 20 a 28 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ del muestreo T1 (A) a valores de 60 y 70 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en el muestreo T2 (B).

A pesar de que las diferencias no son significativas entre tratamientos en el muestreo T1 en la figura se puede observar que las plantas estresadas de las progenies MBNg10, MBNg3 y Ng23xRa tienen una menor eficiencia fotosintética que las plantas control (20,43, 19,89 y 20,62 A, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ frente a 26,62, 28,35 y 27,75 A, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Además, se observa que en el muestreo T2 esas progenies recuperan su eficiencia fotosintética, encontrándose al mismo nivel que las plantas control o incluso superándolas, como en el caso de las progenies MBNg10 o Ng23xRa (63,99 y 65,48 A, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente).

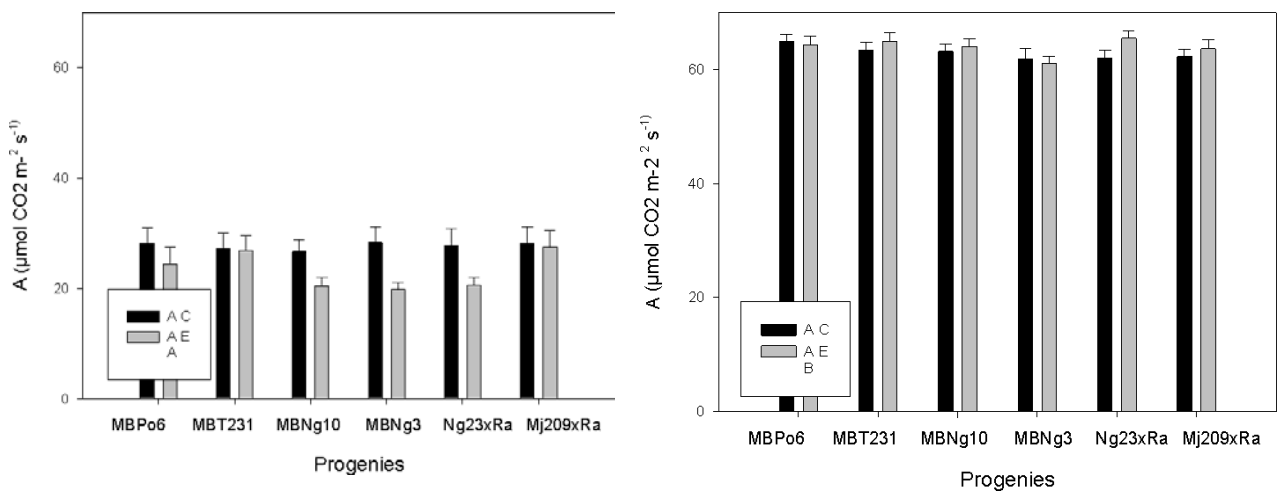


Figura 9. Valores de eficiencia fotosintética (A) para los tiempos de muestreo T1 (A) y T2 (B). C: tratamiento control. E: tratamiento estrés.

Respecto a la medida de la fluorescencia, en el muestreo de estrés moderado (T1) la única progenie que presenta diferencias significativas entre tratamientos es la Ng23xRa ($F=4,757$; $P=0,044$), en la que disminuye el valor F_v/F_m en estrés.

En la figura 10 se representan los valores de colorimetría para las distintas progenies en el muestreo de estrés moderado (T1), tanto en tratamiento control (negro) como en tratamiento estrés (rojo).

La progenie Ng23xRa es la única que presentó diferencias significativas entre tratamientos para b^* ($F=16,222$; $P=0,010$), C ($F=12,129$; $P=0,018$) y h ($F=14,102$; $P=0,013$). Los parámetros b^* y C aumentan en estrés, al contrario que h, que disminuye.

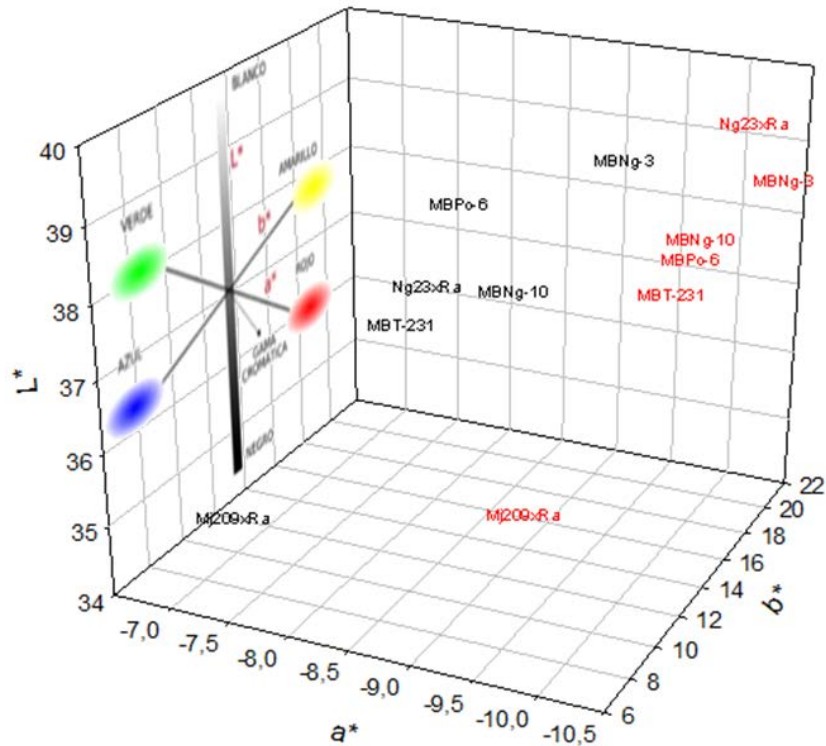


Figura 10. Diagrama tridimensional para los espacios de color L^* a^* b^* en las diferentes progenies. En negro, las progenies control, y en rojo, las progenies estrés.

A modo de ejemplo, en la figura 11 se recoge la reflectancia espectral para las longitudes de onda comprendidas entre los 360 y 740 nm, en control y estrés, para la progenie Ng23xRa. Los espectros relativos al control y al estrés moderado se separan para las longitudes de onda comprendidas entre 360 y 500 nm y entre las longitudes de onda 620-690 nm incluidas en el color. Igualmente, el máximo porcentaje de reflectancia se produce a 550 nm, longitud de onda a la que también se separan los espectros entre tratamientos para todas las progenies con excepción de MBP₆ y MBNg₃.

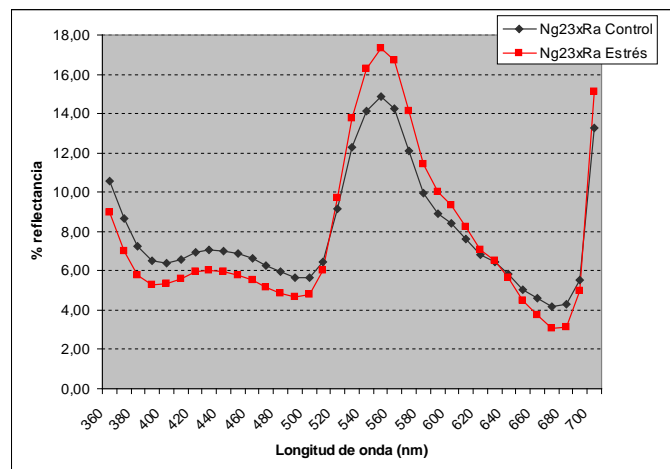


Figura 11. Reflectancia espectral para las longitudes de onda comprendidas entre los 360 y 740 nm, en control y estrés, para la progenie Ng23xRa. En negro se representa el control y en rojo el estrés.

3.4. Caracterización bioquímica

En la figura 12 se muestran los diferentes contenidos en prolina, clorofila a, clorofila b, carotenoides y antocianina que presentan las progenies.

La progenie con un contenido en prolina más alto es la Ng23xRa (0,024 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF) y la progenie con un contenido más bajo es la Mj209xRa (0,020 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF) (fig. 12 A).

Respecto al contenido en clorofilas, la progenie con más contenido en clorofila a y en clorofila b es la MBNg3, con 1,14 $\mu\text{mol g}^{-1}$ PS y 0,55 $\mu\text{mol g}^{-1}$ PS respectivamente. La progenie con menor contenido en clorofila a y b es la MBPo6, con 0,84 $\mu\text{mol g}^{-1}$ PS y 0,38 $\mu\text{mol g}^{-1}$ PS (fig. 12 B).

En relación con los carotenoides, las progenies con mayor contenido son las MBNg3 y Mj209xRa con 100,47 y 100,31 $\mu\text{mol g}^{-1}$ PS, y la progenie con menor contenido es la MBPo6, con 75,41 $\mu\text{mol g}^{-1}$ PS (fig. 12 C).

Por último, las progenies con mayor contenido en antocianinas son las MBNg10 y MBNg3, con 3,96 y 3,95 $\mu\text{mol g}^{-1}$ PS respectivamente, y la progenie con menor contenido es la MBPo6, con 2,47 $\mu\text{mol g}^{-1}$ PS (fig. 12 D).

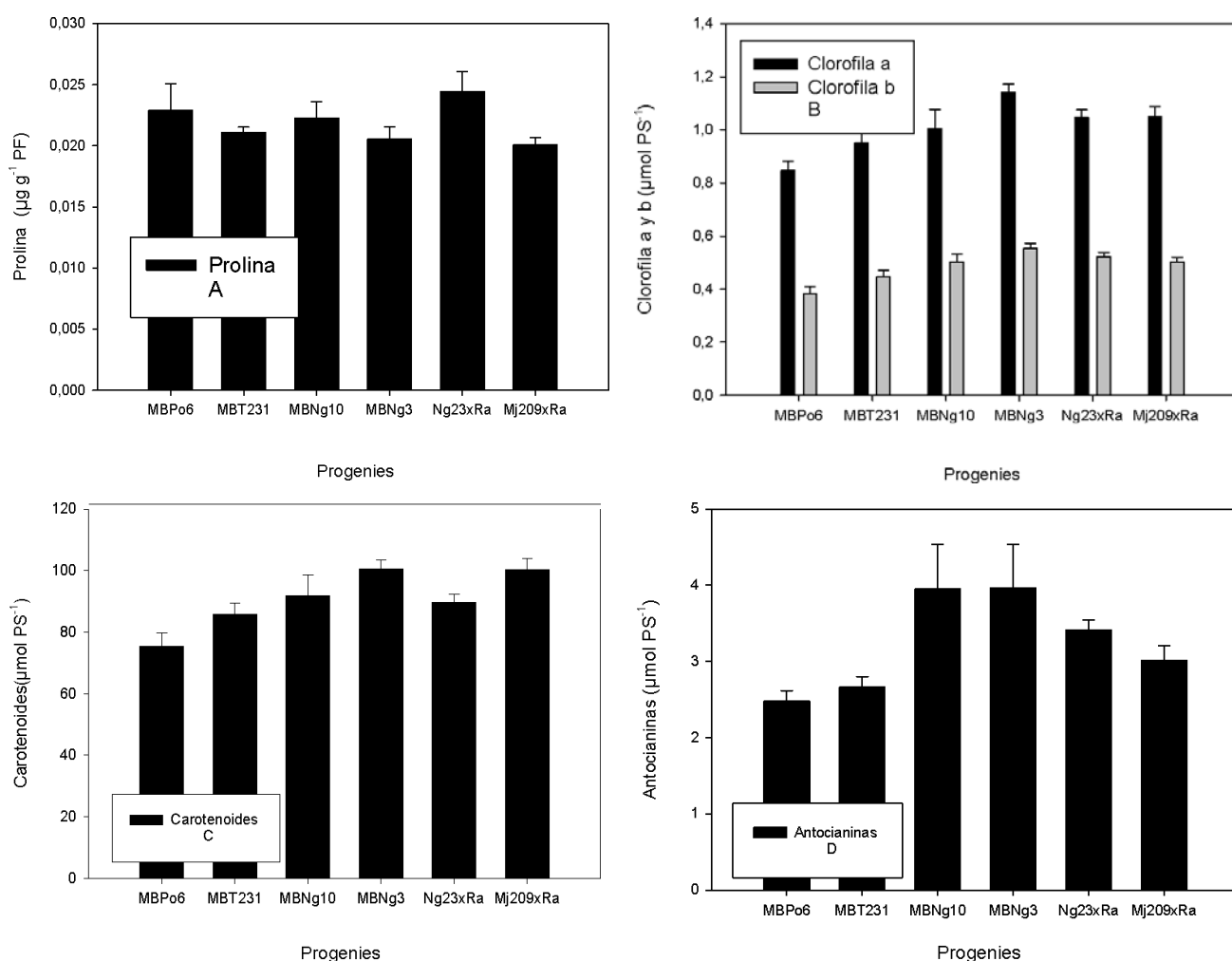


Figura 12. Contenidos en prolina (A), clorofila a (B), clorofila b (B), carotenoides (C) y antocianinas (D) en las diferentes progenies en el muestreo correspondiente al muestreo de caracterización inicial (T0).

3.5. Relaciones entre variables

Algunos parámetros objeto de estudio en el muestreo de estrés moderado T1 tienen correlación significativa entre sí. Esta correlación se muestra en la tabla 1.

Los parámetros de intercambio gaseoso se correlacionan entre sí, pero no se relacionan significativamente con ningún parámetro de crecimiento. El parámetro de fluorescencia se relaciona significativamente con parámetros de fotosíntesis y con parámetros de crecimiento (incremento en el número de hojas).

Por otra parte, los parámetros hídricos (potenciales hídricos, Ψ_a y Ψ_m) se relacionan con parámetros de intercambio gaseoso como la eficiencia fotosintética (fig.13), con parámetros de crecimiento como la longitud de raquis media, y con diferentes parámetros de biomasa. El contenido hídrico relativo de la hoja (RWC%) tiene una correlación significativa con parámetros de biomasa, así como también la longitud de raquis media.

Finalmente, los potenciales hídricos al amanecer y al mediodía en estrés (Ψ_a E y Ψ_m E) tiene una correlación significativa con el contenido hídrico del suelo (CWC%) en estrés.

Tabla 1. Correlaciones entre parámetros estudiados en el muestreo de estrés moderado (T1). E: tratamiento estrés.

		A	E	Ψ_m	Ψ_a	Fv/Fm	K	EUAI	RWC (%)	Long raquis	Ψ_a E	Ψ_m E
E	Cor. Pearson	,708**		-,270*								
	P	0		,024								
K	Cor. Pearson	,563**	,908**			-,363**						
	P	,000	,000			,009						
EUAI	Cor. Pearson					,453**	-,306**					
	P					,001	,010					
Long raquis m.	Cor. Pearson			-,310**	-,268*							
	P			,009	,024							
Ψ_m	Cor. Pearson	-,380**										
	P	,001										
ΔN° Hojas	Cor. Pearson					,368**	,261*					
	P					,007	,029					
%Praíz	Cor. Pearson			-,243*					-,273*	-,276*		
	P			,041					,023	,020		
%Praquis	Cor. Pearson			,348**					,371**			
	P			,003					,002			
%Pfoliolos	Cor. Pearson			,303*					,252*			
	P			,010					,037			
BT	Cor. Pearson			-,411**						,482**		
	P			,000						,000		
BA	Cor. Pearson			-,322**						,469**		
	P			,006						,000		
BA/Praíz	Cor. Pearson								,250*			
	P								,038			
SWC (%) E	Cor. Pearson										,322**	,249*
	P										,006	,036

4. Discusión

Se ha evaluado la caracterización de seis progenies de *Juglans* spp. juveniles F1 de medio-hermanos en condiciones controladas y de estrés hídrico, con posterior rehidratación, con diferentes parámetros morfológicos, fisiológicos y bioquímicos.

En la fase de muestreo inicial, manteniendo el sustrato de la maceta en torno al 75-80% de saturación media (CWC) para todas las progenies, los MFR de nogal presentaron diferencias significativas en altura (H14), en el número (NºHojas) y la distribución de las hojas a lo largo del tallo (NºHojas/H14), en la rectitud de éste, en el contenido hídrico foliar (LWC), en los potenciales hídricos foliares al mediodía (Ψ_m), en la transpiración (E) y en la conductividad hidráulica (K), así como en los consumos hídricos.

La altura cuantificada en los materiales de *J. nigra* (MBNg10, MBNg3 y el híbrido Ng23xRa), inferior a la esperada, podría explicarse atendiendo a la saturación del sustrato en la maceta. Probablemente, un 80%-85% de la CC al inicio del desborre (datos no presentados) haya sido un valor alto para esta especie que haya condicionado su posterior crecimiento (MbNg10: 11,15%, MbNg3: 10,45%, incrementos en altura respecto a la de 2013). El alto vigor atribuido a los nogales híbridos, tampoco se corresponde con los resultados obtenidos en este trabajo (Mj209xRa: 36%, Ng23xRa: 15%). En contraposición, el fuerte crecimiento de los *J. regia* (MBPo6: 50,02%, MBP231: 60,75%) estaría apoyado por las conclusiones obtenidas en campo por Vilanova et al. (2010), que señalan que los MFR de *J. regia* tienen una potencialidad elevada en condiciones de riego y gestión adecuadas, con temperaturas primaverales altas.

Se ha puesto de manifiesto la variabilidad interespecífica referente al consumo de agua. Las progenies que significativamente más agua han demandado han sido los híbridos, y en contraposición, MBPo6. Este resultado es de interés práctico a la hora de gestionar el riego, al menos en las condiciones de estudio y, refuerza los resultados de potencialidad de este material preseleccionado que, con menores consumos de agua ha mostrado tener una tasa de crecimiento interesante.

Si bien los árboles con crecimientos monocíclicos centran la medida anual en la primavera-inicio del verano, en todas las *Juglans* spp, del ensayo se observó una parada en el crecimiento ya a mediados de mayo. Las altas temperaturas máximas medias registradas en el invernadero para los meses de abril y mayo (32,90°C y 31,70°C) pueden haber adelantado el proceso de lignificación, que en los híbridos se inicia pronto, a mediados de verano (Aletà et al., 2007), produciendo en una primera fase en éstos y las demás progenies, una determinación en la yema apical.

Considerando la rectitud del fuste, los híbridos MFR franceses de referencia comercializados con categoría identificada, Ng23xRa y Mj209xRa, mostraron una baja rectitud en el tallo, cuando es precisamente este carácter ésta una de las variables a tener en cuenta desde un punto de vista de selección forestal. Este resultado puede deberse a las condiciones de germinación y crecimiento de las plántulas en las

primeras semanas de vida, con densidades altas de planta por unidad de superficie, hecho que se constató al recibir las plantas en 2013.

En la fase de muestreo T1, manteniendo el sustrato de la maceta en torno al 75-80% de saturación media (CWC) en control y en torno al 50% en estrés, las progenies adoptaron diferentes mecanismos para controlar su consumo de agua durante el estrés moderado y, por tanto, tolerar la sequía. Por un lado se observaron disminuciones en el crecimiento y biomasa, además de una disminución en los potenciales y consumos hídricos, así como en la fluorescencia y en las medidas del color.

En condiciones de estrés moderado se observó una disminución significativa del diámetro en las progenies *J. nigra* (MBNg10, MBNg3 y el híbrido Ng23xRa). Además, se observó una disminución en el número de hojas en la progenie MBNg3 y una disminución en la longitud del raquis en las progenies MBNg10 y MBNg3. De todas estas observaciones se deduce que el estrés hídrico afecta de manera significativa al crecimiento de las progenies *J. nigra*.

La epinastia observada en las progenies *J. nigra* (MBNg3, MBNg10 y Ng23xRa) representa una respuesta al estrés hídrico relacionada con un mecanismo adaptativo de evitación a la sequía, que permite a las progenies regular la pérdida de agua con una mayor eficiencia y además, prevenir el calentamiento foliar. También puede considerarse como una estrategia complementaria a la regulación de la transpiración (Ruiz-Sánchez et al., 2000). Belloni y Mapelli (2001) ya observaron esta respuesta en *J. regia*. Además, se produjo una abscisión parcial de los folíolos en MBNg3, como evitadora del estrés hídrico. Esta respuesta la describieron Pallardy y Rhoads (1993) en plántulas de *J. nigra* en condiciones de estrés hídrico, y también se ha observado en otras especies, como en albaricoque (Ruiz-Sánchez et al., 2000).

La disminución significativa en el porcentaje de peso del raquis que manifestó la progenie *J. nigra* MBNg3, así como la disminución en biomasa total y biomasa aérea, sugiere de nuevo la sensibilidad de esta progenie a la limitación hídrica, ya que el crecimiento es uno de los parámetros que más se ven afectados por el déficit hídrico. La reducción en la biomasa total (BT), como una de las primeras respuestas de las plantas ante un déficit de agua en el sustrato, se ha descrito también en progenies silvestres de castaño (Pliura y Eriksson, 2002), así como en otras especies como *Ulmus laevis* Pall. (Black-Samuelssons y Andersson., 2003), *Eucalyptus cloenziana* F. Muell. y *E. argophloia* Blakely (Ngugi et al., 2003) e híbridos del género *Populus* (Rhodenbaugh y Pallardy, 1993). Sin embargo, no ha habido una inversión hacia las raíces en las plantas sujetas a limitación hídrica, contrariamente a lo señalado en *J. nigra* por Pallardy y Rhoads (1993). Estos autores indicaron que *Juglans nigra* mostró crecimientos vigorosos de raíz tras la germinación, lo cual se relaciona con su buena capacidad para evitar el estrés hídrico, siendo la relación BA/PRAíz menos favorable que el descrito para *Quercus stellata* (Pallardy y Rhoads, 1993).

Un bajo potencial hídrico y los cambios en el turgor y en el contenido de agua derivados del mismo implican respuestas que permiten a las plantas adaptarse a la sequía y continuar su crecimiento y desarrollo. En este estudio, MBNg3 alcanzó

valores de Ψ_a inferiores a -1,80 MPa, sin diferencias significativas con su Ψ_m (-2,04 MPa) indicando que se encontraba en una situación de potencial crítico (Ψ_{crit}), dado que éste es el potencial del suelo al cual se igualan el potencial de la planta al amanecer y al mediodía (Sun et al., 1995). Ψ_{crit} también se han descrito en situaciones de estrés hídrico en progenies de castaño (Ciordia, et al. 2012). Sin embargo, tras la rehidratación los valores del Ψ_m de la progenie MBNg3 se recuperaron, por lo que no podemos considerar los valores indicados de Ψ como Ψ_{letal} , que sería aquel por debajo del cual la planta no recupera (Sun et al., 2011).

Se ha encontrado una correlación significativa entre la tasa fotosintética con Ψ_m , aumentando la eficiencia fotosintética a medida que los valores del potencial hídrico adquiere valores menos negativos, tal y como se ha descrito en la bibliografía (Grossnickle y Arnott, 1992; Stoneman et al., 1994). Los materiales de *J. nigra* y el híbrido Ng23 x Ra fueron en los que más disminuyó la eficiencia fotosintética (A) al disminuir la disponibilidad de agua.

La adaptación al estrés hídrico también puede llevar a la disminución en la eficacia de otros procesos como la fotosíntesis y otros parámetros de intercambio gaseoso. En condiciones de limitación hídrica, se reduce generalmente la eficiencia de la carboxilación, lo que refleja aumentos de la resistencia del mesófilo inducidas por el estrés. Así mismo, se produce un aumento de la fotorrespiración, y una consecuente disminución en la tasa de fotosíntesis, como consecuencia del cierre estomático para evitar la pérdida de agua a través de la transpiración (Medrano y Flexas, 2003). Sin embargo, y en contraposición a lo anteriormente citado, las progenies de estudio no presentaron disminuciones significativas en la eficiencia fotosintética (A) en el periodo de estrés moderado, aunque se ha observado una tendencia a la disminución de esta variable en los materiales *J. nigra* (MBNg10, MBNg3 y el híbrido NG23xRa). De nuevo, se puede ver que los materiales *J. nigra* son los menos tolerantes al estrés hídrico.

Además, los valores de concentración interna de CO_2 (C_i) obtenidos para *Juglans* spp. fueron próximos a cero, lo que podría deberse a un cierre heterogéneo de los estomas. El cierre estomático, en condiciones de estrés hídrico, no es constante a lo largo de la hoja. En ocasiones, distintas secciones de una misma hoja presentan grados de cierre estomático diversos y por tanto, tasas de fotosíntesis y fotorrespiración distintas (Medrano y Flexas, 2003). Esta situación induce errores en los cálculos de la concentración subestomática de CO_2 al utilizar métodos de intercambio gaseoso convencionales, que pueden generar valores erráticos, observados en este estudio, que también podrían deberse a algún tipo de microfuga, no observable "a priori", en las almohadillas de cierre o mangueras del equipo (Fernández y Gyenge, 2010).

Las diferentes especies tienen diferentes vías para adaptarse a la sequía. El nogal cierra sus estomas ante valores altos de déficit de presión de vapor entre la hoja y el aire (VPDL) o bajos de potencial hídrico foliar, lo que hace prevenir que el potencial hídrico xilemático del tallo baje de -1,4 MPa, situación en la que se pueden empezar a apreciar cavitaciones en el xilema. Los valores de Ψ obtenidos en este trabajo para *Juglans* spp. se mueven en el umbral descrito en la bibliografía para nogales de fruto

(Buchner et al., 2008) y se consideran como un mecanismo de respuesta evitadora al estrés hídrico (Lucier y Hinckley, 1982).

Por otra parte, la disposición de los estomas, insertados en cavidades o pliegues de hojas, representa una estrategia evitadora del estrés para reducir las pérdidas de agua, ya que se consigue de esta manera reducir el gradiente de agua entre el aire y la hoja, reduciendo la transpiración. Puesto que el gradiente de CO₂ se ve menos modificado que el gradiente de agua, se reduce la transpiración más que la fotosíntesis, de manera que aumenta la eficiencia en el uso del agua (Medrano y Flexas, 2003). Esta situación se aprecia en especies adaptadas a climas mediterráneos, por lo que podría ser atribuible a *J. nigra* como estrategia desarrollada en condiciones de sequía, y especialmente a la progenie MBNg3.

En relación con los parámetros de fluorescencia, cualquier efecto de estrés, como la sequía, se puede reflejar en una disminución de la relación Fv/Fm (Öquist, 1983), tendencia que se verifica en las progenies sometidas a estrés hídrico, aunque la única que presentó diferencias significativas entre tratamientos fue el híbrido Ng23xRa. Esta disminución de la eficiencia fotoquímica, puede deberse a dos procesos diferentes: i) procesos de regulación de la actividad del PSII, que tendría un papel protector ante el exceso de luminosidad, ii) un daño sobre centros de reacción del PSII (Medrano y Flexas, 2003). Al no haberse definido una tendencia al aumento de la concentración intercelular de CO₂ (C_i) en las progenies en condiciones de estrés hídrico, simultáneamente con una reducción media de la capacidad fotosintética (A) y de la transpiración (E), no podemos inferir un daño en los centros de reacción del PSII.

El espectrofotómetro es un instrumento que se utiliza para evaluar las bases cuantitativas del color en las hojas (Kwolek, 1982). El color de las plantas puede utilizarse para identificar niveles de estrés por su adaptación a cambios ambientales (Sibghatallah et al., 2013). En los nogales en estudio, se observó un efecto del tratamiento de estrés hídrico moderado en los espacios de color a*, b*, C* (Chroma), así como en la coordenada polar h (hue), con valores en estrés más negativos (más próximos al color verde) en a*, más positivos en b* (más próximos al color amarillo), en C* (más saturación) y en h (menores matices). La progenie híbrida Ng23xRa presentó significativamente cambios en el color en el sentido explicado para los parámetros b*, C* y h.

Además, la medida de las reflectancias espectrales facilita un método rápido y no destructivo para la estimación de los pigmentos fotosintéticos (Sims y Gamons, 2002). El contenido de agua del material vegetal influye en la reflectancia, de forma directa afectando la signatura espectral mediante las bandas de absorción que le son propias. La librería de espectros recogida en los materiales de nogal han evidenciado diferencias en el porcentaje de reflectancia de los pigmentos foliares en función del tratamiento hídrico. No obstante, y dado que en este trabajo, no ha sido posible concluir la determinación del contenido de los pigmentos mediante su extracción y cuantificación en el laboratorio en condiciones de estrés (T1), no se ha podido realizar la correspondencia estadística e integrándolos con los espectros de reflectancia y el contenido hídrico de las plantas.

La concentración de los diferentes pigmentos (clorofila a, clorofila b, carotenoides y antocianinas) no varió significativamente entre las progenies de estudio en el muestreo de caracterización inicial, si bien de forma general se observó una mayor concentración de los pigmentos fotosintéticos en la progenie *J. nigra* MBNg3.

Estos resultados preliminares constituyen una interesante línea futura de investigación, no solo para caracterizar el contenido en pigmentos fotosintéticos en materiales vegetales de interés mediante el empleo de un método no destructivo, sino también para obtener índices de reflectancia indicadores del estrés (hídrico, nutritivo...) basados en variaciones del contenido en fitopigmentos.

Diversos estudios demuestran que existe una relación directa entre el grado de estrés hídrico y el contenido en prolina de las especies con limitaciones hídricas (Yadollahi et al., 2010, Dichio et al., 2003), ya que la prolina actúa como osmolito en el ajuste osmótico mediante la acumulación de la misma en hojas y raíces para evitar la deshidratación. La valoración en los contenidos de prolina en el muestreo de caracterización inicial no mostró diferencias significativas entre las distintas progenies. Las concentraciones obtenidas son similares a las descritas por Yadollahi et al. para *Juglans regia* cv Serr, pero inferiores a las descritas en otras especies como *Pinus pinaster* Aiton (Baizán, S. 2011, Proyecto Fin de Carrera).

Tanto el análisis de prolinas como el de pigmentos fotosintéticos se realizó en el muestreo de caracterización inicial como una puesta a punto de la metodología en la que se optimizó la metodología de extracción y cuantificación de pigmentos fotosintéticos.

Por último, en el muestreo de rehidratación (T2) se observaron aumentos significativos de los potenciales hídricos, tanto al amanecer como al mediodía, así como de la recuperación de los potenciales de la progenie *J. nigra* MBNg3. Además, se observa también una recuperación en la eficiencia fotosintética de las progenies *J. nigra* (MBNg10, MBNg3 y el híbrido Ng23xRa), y también de forma general en los valores de la eficiencia máxima aparente del fotosistema II (Fv/Fm). Con esto se manifiesta la evidente capacidad de recuperación de los materiales frente a una rehidratación, en especial de las progenies *J. nigra*.

5. Conclusiones

1. La aptitud de los MFR (Materiales Forestales de Reproducción) de las progenies juveniles de semi-hermanos de *Juglans regia* es elevada en condiciones de cultivo controladas, y gestionadas con riego.
2. El mantenimiento del CWC (Contenido de agua en el contenedor) en torno al 50% durante tres semanas no ha sido suficiente para expresar significativamente respuestas adaptativas en las progenies de nogal, con excepción de los materiales Ng23xRa, MBNg10 y, específicamente MbNg3.
3. Si bien las progenies de *J. nigra* y las del híbrido Ng23xRa han desarrollado mecanismos de evitación del estrés hídrico dirigidos a reducir crecimientos y/o minimizar la superficie responsable de la transpiración, debido a una mayor sensibilidad foliar al estrés hídrico frente a la inversión de partición de biomasa, las variables de intercambio gaseoso A, E, g_s , así como K, no han permitido valorar sus mecanismos de respuesta fisiológicos.
4. La estimación de la eficiencia máxima aparente del fotosistema II, calculada mediante la relación F_v/F_m , ha resultado ser un marcador precoz de estrés hídrico.
5. Las medidas de Ψ hídrico foliar han resultado ser indicadores adecuados del estado hídrico de las plantas y pueden ser útiles para controlar el estrés hídrico.
- 6 La rehidratación de los materiales de *Juglans* spp., sometidos previamente a una limitación hídrica, reestablece los Ψ_a en Ng23xRa, y mejora el nivel hídrico de las demás progenies.
7. Los resultados preliminares basados en las reflectancias espectrales obtenidas con el espectrofotómetro portátil puede tener aplicaciones ecológicas, bien para estimar el contenido en pigmentos fotosintéticos, como en la detección de variaciones en su contenido ante situaciones de estrés hídrico. No obstante, es necesario realizar más estudios en esta línea de investigación.

6. Bibliografía

- Ackerly, D., C. Knight, S. Weiss, K. Barton y K. Starmer., 2002. *Oecologia* 130: 449 – 457.
- Aletà, N.; Ninot, A.; Voltas, J., 2007. *Investigación Agraria: Sistemas Agroforestales* 12(1): 29-50.
- Baldocchi D. D., Hicks B. B. y Camara P., 1987. *Atmospheric Environment* 21: 91-101.
- Bates L., Waldren R.P, Teare I.D., 1973. *Plant and Soil*, 39: 205-207.
- Belloni, V. y Mapelli, S., 2001.. *Acta Hort.*, 544: 327-333.
- Begg, J.E., 1980. Wiley Interscience, New York. 33–42.
- Ben Baaziz, K.; Rabot, A.; Henry, C., 2012. *Plant and Cell Physiology*. 53 (6): 1068.
- Black-Samuelssons, S. y Andersson, S., 2003. *American Journal of Botany*. 90: 1107-1112.
- Boyer, J.S., 1976. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. 273 : 501- 512.
- Braatne, J. H., T.M. Hinckley y R.F. Stettler. 1992. *Tree Physiol*. 11:325–339.
- Buchner, R.P., Fulton, A.E., Gilles, C.K., Lampinen, B.D, Shackel, K.A., Metcalf, S.G., Little, C.C., Prichard, T.L., y Schwankl, J.L., 2008. *Acta hort*. 792: 141-146.
- Carr, Merle E.; Mason, Charles T., Jr.; Bagby, Marvin O., 1986. *Forest Ecology and Management*.16: 155-167.
- Christensen, J.H., B. Hewitson, A. Busuioc, A. Chen, X. Gao, I. Held, R. Jones, R.K. Kolli, W.-T. Kwon, R. Laprise, V. Magaña Rueda, L. Mearns, C.G. Menéndez, J. Räisänen, A. Rinke, A. Sarr and P. Whetton, 2007. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Ciordia, M.; Feito, I.; Pereira-Lorenzo, S.; Fernández, A.; Majada, J., 2012. *Environmental and Experimental Botany*. 78: 56- 63.
- Cochard, H., 2001. *Springer-Verlag*. 215: 466–471.
- Cornic G. y Massacci A., 1996. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Dichio, B.; Xiloyannis, C.; Angelopoulos, K; Nuzzo, V.; Bufo, S.A.; Celano, G., 2003. 257: 381-389.
- Ehleringer, J.R. y Mooney, H.A., 1983. *Encyclopedia of Plant Physiology (New Series)* 12: 205-231. Springer-Verlag, New York.
- Evidencias y efectos potenciales del cambio climático en Asturias. Conclusiones primer informe climas 2009. Consejería de Medio Ambiente, Ordenación del Territorio e Infraestructuras. Gobierno del Principado de Asturias.*
- Fernández, M.E. y Gyenge, J.E., 2010. Ediciones INTA. Buenos Aires, Argentina.

978-987-1623-76-1.

Grosser, J.W., P. Ollitrault y O. Olivares-Fuster., 2000. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 36:434–449.

Grossnickle, S. C.; Arnott, J. T. 1992. *Forest Ecology and Management* 49:177-193.

Hsiao T.C. 1973. *Plant Physiology.* 24:519–570.

Kattenberg, A., F. Giorgi, H. Grassl, G. A. Meehl, J. F. B. Mitchell, R. J. Stouffer, T. Tokioka, A. J. Weaver, and T. M.L. Wigley., 1996. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 285-357.

Kwolek, W.F., 1982. *Journal of Arboriculture* 8 (6).

Levitt, J., 1980. 1: 129 - 186. Academic Press, NY.

Li, P.; Bohnert, H. J. y Grene, R., 2007. *Trends in Plant Science*, London, 12(3): 87-89.

Lucier, A.A.y Hinckley, T.M. 1982. *Forest Ecology and Management.* 4: 127-142.

Ludlow, M.M., 1989. SPB Academic Press, 269–281. The Netherlands.

Medrano, H. y Flexas, J., 2003. Editorial Thompson. España. p.253-286.

Montero A., Estrada N.; Paiz Y., 2003. *Ecología de Ecosistemas Amazónicos.* Puerto Maldonado, Perú.

Mummery, D. y Battaglia, M., 2001. *Forest Ecology & Management.* 140: 51 – 63.

Nagakura, J.; Shigenaga, H.; Akama, A.; Takahashi, M., 2004. *Tree Physiol.* 24: 1203–1208.

Ngugi M, Doley D, Hunt A, Dart P, Ryan P., 2003. *Tree Physiol.* 23: 335-343.

Öquist, G., 1983. *Plant, Cell & Environment* 6, 281–300.

Osório J., Osório M.L., Chaves M.M., Pereira J.S., 1998. *Tree Physiology*18: 363–373.

Pallardy, S.G. y Rhoads, J.L., 1993. *Can. J. For. Res.* 23: 1766-1774.

Pallardy, S.G.; Pereira, J.S.; Parker, W.C., 1991. Boca Raton, U.S.A.: CRC Press: 27-76.

Pliura, A. y Eriksson, G. 2002. *Silvae Genetica* 51:152-160.

Rhodenbaug, E. J. y Pallardy, S.G., 1993. *Tree physiology.* 13: 213–226.

Rosati, A., Metcalf, S.; Buchner, R.; Fulton, A.; Lampinem, B., 2006. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology.* 81(3): 415–420.

Ruiz-Sánchez, M.C.; Domingob, R.; Torrecillasa, A.; Pérez-Pastor., A., 2000. Departamento Riego y Salinidad Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CSIC), Murcia Spain. Departamento Producción Agraria, Universidad Politécnica de Cartagena, Murcia, Spain. *Plant Science.* 156: 245 – 251.

Scholander, P.F.; Hammel, H.T.; Bradstreet, E.D. y Hemmingsen, E.A.; 1965. *Science* 148: 339-346.

Shibghatallah, M.A.B., Khotimah, S.N.; Suhandono, S.; Viridi, S., Kesuma, T., 2013. *AIP Conference Proceedings* 1554 (1), 210-213.

Sims D. A.y Gamon J. A., 2002. Department of Biology and Microbiology, California State University LA, USA. *Remote Sensing of Environment* 81: 37–354.

Stape, J.L.; Binkley, D.; Michael G. R., 2004. *Forest Ecology and Management*. 193: 17–31.

Stephenson, N.L. 1990. *Nature*. 135:649-670.

Stoneman, G.L., N.C. Turner and B. Dell. 1994. *Tree Physiol.* 14:633–646

Sun, S.J.; Meng, P.; Zhang, J.S.; Wan, X., 2011. Institute of New Forest Technology, Chinese Academy of Forestry, Beijing, China. *Tree Physiology*. 31: 1378–1389.

Tercer Informe de Evaluación de Cambio climático (IPCC), 2001.

Turner, N.C.; 1988. *Irrigation Sci.* 9: 289-308

Valladares, F., 2004. *Ecology, Conservation and Sustainable Management of Mediterranean type ecosystems of the World*. Millpress, Rotterdam. 1-4.

Vilanova, A.; Zas, R.; Sierra, R.; Merlo, E.; Ocaña, L.; Iglesias, S.; Díaz, R.; Aletà, N.; Prada, E.; Celestino, C.; Ruiz Galea, M.M.; de la mata, R.; Lari, F.; Pérez, F., 2010. Reunión de coordinación del Grupo de Trabajo de Genética Forestal de la Sociedad Española de Ciencias Forestales. Maceda.

Williams, R.D., *Juglans nigra* L. US. Forest Service. [fecha de consulta: 20 Junio 2014]. Disponible en:
http://www.na.fs.fed.us/pubs/silvics_manual/volume_2/juglans/nigra.htm

Yadollahi, A., Kholdebarin, B., Lotfi, N., Vahdati, K., Amiri, R., Hassani, D., 2010. *Proc. VIth Intl. Walnut Symposium . Acta Hort.* 861.