

UNIVERSIDAD DE OVIEDO
ESCUELA POLITÉCNICA DE MIERES

GRADO EN INGENIERÍA FORESTAL Y DEL MEDIO NATURAL

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE ORGANISMOS Y SISTEMAS

ÁREA DE PRODUCCIÓN VEGETAL

TRABAJO FIN DE GRADO
Trabajo de Investigación Aplicada

**“ENDURECIMIENTO EN PLANTAS JUVENILES DE *Pinus pinaster* Aiton.
PARA INCREMENTAR LA TOLERANCIA AL FRÍO”**

Autor: Silvia Baizán González

Director: Ricardo J. Ordás Fernández

Codirector: Celia Martínez Alonso

Mieres, julio 2012

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Majada Guijo por darme la oportunidad de hacer este trabajo en la Fundación CETEMAS y en las instalaciones del SERIDA.

A mi Director el Dr. Ricardo Ordás por confiar en mí para realizar este trabajo bajo su dirección.

A mi Co-directora, la Dr. Celia Martínez por sus correcciones y consejos.

A la Dr. Isabel Feito Díaz por tu tiempo, tus explicaciones, orientaciones y correcciones que hicieron posible que terminara, una vez más, este trabajo a tiempo.

A la Dr. Regina Chambel y al CIFOR-INIA por su colaboración con el método de liberación de electrolitos.

Al Dr. Andrés Dieste por su colaboración con el método de CBD.

A mi compañera Paula Vallejo por su ayuda incondicional desde el primer día.

A todos mis compañeros SERIDA/CETEMAS y todas aquellas personas que de alguna forma hayan ayudado en la realización de este trabajo.

A Juan Miguel por su infinita paciencia y su cariño. Cómo se puede tener tanta suerte.

Y sobre todo a mi hermana Elisa por su inestimable ayuda todo este tiempo. Que haya podido hacer este trabajo te lo debo a ti.

A todos, GRACIAS

ABREVIATURAS

AT	Agua total
AC	Agua congelable
CC	Capacidad de campo
ANC	Agua no congelable
I_d	Índice de daños
TL₅₀	Temperatura letal media
CBD	Calorimetría de Barrido Diferencial
Ψ_h	Potencial hídrico al amanecer
CHF	Contenido hídrico foliar
ATD	Análisis Térmico Diferencial
Ψ_π	Potencial osmótico
Ψ_{π100}	Potencial osmótico a plena turgencia
ABA	Ácido abscísico
TDR	Reflectómetro de Dominio de Tiempo (<i>Time Domain Reflectometry</i>)
PF	Peso fresco
PS	Peso seco
ELISA	Ensayo por inmuno absorción ligado a enzimas (<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
C_imuestra	Conductividad inicial de la muestra
C_icontrol	Conductividad inicial del control
C_fmuestra	Conductividad final de la muestra
C_fcontrol	Conductividad final del control
CER	Conductividad eléctrica relativa
CR	Conductividad relativa
CFM	Control de Flujo Másico
SER	Sistema de Enfriamiento por Refrigerador
P_c	Temperatura del pico de congelación
P_d	Temperatura del pico de descongelación
T_{ic}	Temperatura inicial de congelación
T_{id}	Temperatura inicial de descongelación
T_{fc}	Temperatura final de congelación
T_{fd}	Temperatura final de descongelación
ΔH_c	Entalpía de congelación
ΔH_d	Entalpía de descongelación
Rango_c	Diferencia de temperatura entre la inicial y la final de congelación
Rango_d	Diferencia de temperatura entre la inicial y la final de descongelación
ΔH_{agua}	Entalpía de fusión del agua
NE	Plantas no endurecidas
E	Plantas endurecidas
GAS	Síndrome General de Adaptación (<i>General Adaptation Syndrome</i>)
BTE	Baja Temperatura Exotérmica

ÍNDICE

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	5
1. ANTECEDENTES	6
2. JUSTIFICACIÓN	6
3. RESISTENCIA AL FRÍO	7
4. MÉTODOS PARA DETERMINAR LA RESISTENCIA AL FRÍO	9
4.1. Liberación de electrolitos	10
4.2. Temperatura letal media de congelación (TL ₅₀)	11
4.3. Calorimetría de Barrido Diferencial (CBD)	11
5. CO-ESTRÉS	12
6. ENDURECIMIENTO	14
7. OBJETIVOS	15
CAPÍTULO II. MATERIAL Y MÉTODOS	16
1. MATERIAL VEGETAL UTILIZADO	17
2. DISEÑO EXPERIMENTAL	18
2.1. Endurecimiento mediante estrés hídrico	18
2.2. Determinación de la tolerancia a frío	20
2.2.1 Acondicionamiento	20
2.2.2. Evaluación de la tolerancia a frío mediante el método de liberación de electrolitos	21
2.2.3. Evaluación de resistencia a frío mediante Calorimetría de Barrido Diferencial (CBD)	25
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	29
CAPÍTULO III. RESULTADOS	30
1. ESTRÉS HÍDRICO	31
2. TOLERANCIA AL FRÍO	33
2.1. Índice de daño (I _d)	33
2.2. Temperatura letal media de congelación (TL ₅₀)	36
2.3. Relación entre estimadores de tolerancia a frío y las variables indicadoras del estatus hídrico de las plantas	37
2.4. Calorimetría de Barrido Diferencial (CBD)	38
2.5. Distribución de agua en las acículas	43
2.6. Relación entre los indicadores de tolerancia a frío y las variables térmicas obtenidas por CBD	44
2.7. Relación entre los tipos de agua estimados mediante CBD y las variables indicadoras del estatus hídrico	45
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN	47
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	60
CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA	62

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES

Con motivo del Proyecto Singular Estratégico: Restauración y Gestión Forestal (ADAPTA/EVALUA) (MICIT PSE310000-2009-4), en el que ha participado el Centro Tecnológico Forestal y de la Madera (CETEMAS) y el Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), se puso en marcha un proyecto para evaluar, en condiciones controladas, cambios fisiológicos en clones de *Pinus pinaster Aiton.* para la selección precoz de materiales forestales en respuesta al co-estrés sequía/frío. Como primera fase del proyecto se desarrolló un ensayo para evaluar, en fase juvenil, la respuesta de dicho material frente al estrés hídrico. Los resultados obtenidos se describen en el Proyecto Fin de Carrera “Mecanismos de respuesta de plantas juveniles de *P.pinaster* de procedencia Oria al estrés hídrico”, realizado por Silvia Baizán González en la Universidad de Oviedo y dirigido por Juan P. Majada Guijo, director científico del CETEMAS e Isabel Feito Díaz, investigadora del Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA).

A continuación se desarrolló un segundo ensayo para evaluar la tolerancia al frío de estos materiales previamente endurecidos mediante estrés hídrico, cuyos resultados se presentan en este Trabajo Fin de Grado.

2. JUSTIFICACIÓN

La sequía y las heladas son dos de los factores ambientales más importantes que afectan al crecimiento, la productividad y la distribución de las plantas (Boyer, 1982). A pesar de que se ha demostrado que ambos están fuertemente correlacionados (Levitt, 1980; Larcher, 1995), pocos estudios se han desarrollado en la respuesta de las plantas al co-estrés (Maldonado *et al.* 1997; da Silva *et al.* 2008; Turchetti, 2011; Charra-Vaskou *et al.* 2012).

En zonas áridas el estrés hídrico es el factor principal que limita el crecimiento y la supervivencia de las plantaciones, mientras que en zonas húmedas y frías las bajas temperaturas son el factor limitante (Corcuera *et al.* 2011). El clima Mediterráneo, se caracteriza por tener una pluviosidad bastante escasa (500 mm) y concentrada en las estaciones intermedias (primavera y otoño), con temperaturas muy calurosas en verano y relativamente suaves en invierno, con un período más o menos largo de heladas en esta estación, por lo que en estas zonas ambos tipos de estrés coexisten, y por tanto, es de gran interés estudiar respuestas comunes entre la resistencia y/o tolerancia a la sequía y al frío.

El desarrollo de test o protocolos de evaluación específicos para especies mediterráneas parece relevante para analizar y determinar cuándo una partida de plantas está endurecida y tiene mayor resistencia a condiciones de estrés post-trasplante (Vilagrosa *et al.* 2006). La selección en vivero de variedades menos sensibles al frío es el método indirecto más eficaz de evitar daños por heladas en las plantaciones en campo (Barranco *et al.* 2005).

3. RESISTENCIA AL FRÍO

La resistencia al frío, definida como la capacidad de las plantas para soportar temperaturas bajo cero sin sufrir daños importantes, es un criterio a tener en cuenta para la evaluación del potencial de cultivo y propagación de una especie, o para el trabajo de selección (Linden, 2002). Conocer el grado de resistencia al frío en las plantas es de vital importancia en estudios previos a la implantación de una especie en una zona determinada.

Los síntomas característicos de daños por heladas son quemaduras en la punta de brotes y hojas, clorosis, defoliación, grietas en la corteza y daños en frutos (Martínez *et al.* 2007). Las heladas hacen que se formen cristales de hielo, primero en los vasos conductores y luego se va extendiendo al resto de las plantas. El hielo pasa a los espacios intercelulares ocasionando diferencias de presión osmótica

entre el interior y el exterior de la célula, por lo que tiene lugar una salida de agua del interior de la célula que provoca una concentración de compuestos celulares hasta alcanzar niveles tóxicos, precipitación de proteínas, alteraciones de la permeabilidad de la membrana, reducción del volumen celular y cambios en el pH (Turchetti, 2011). La membrana plasmática de la célula ha sido considerada como la zona más afectada por la congelación en las plantas. Los daños producidos, son principalmente el resultado de la deshidratación severa celular asociada a este factor, que también se vincula con el déficit hídrico a nivel celular y es por lo que las plantas pueden exhibir respuestas comunes a estas dos tensiones ambientales (Hao *et al.* 2009).

En las plantas, el principal mecanismo de resistencia a la congelación es la disminución del punto de congelación de la solución acuosa del tejido. Wolfe *et al.* (2002) atribuyen esta disminución a 3 efectos: la acumulación de solutos, la existencia de macromoléculas, membranas y otras estructuras hidrófilas y a los efectos de la viscosidad. Aparte de la disminución del punto de congelación se ha observado, en especies muy resistentes, que el agua intracelular que se llega a congelar forma cristales estables (Hirsh *et al.* 1985; Vertucci y Stushnoff, 1992). En estos casos, la resistencia, probablemente, depende de dicha estabilidad, ya que dado un sistema de vitrificado estable, el tejido teóricamente podría sobrevivir cualquier tensión a baja temperatura.

La aclimatación al frío es un proceso complejo relacionado con cambios fisiológicos y bioquímicos, incluidas las modificaciones en la composición de lípidos de membrana, aumentos en azúcares solubles, aminoácidos y ácidos orgánicos, síntesis y acumulación de antioxidantes y proteínas protectoras, los cambios en los niveles hormonales y alteraciones en la expresión génica (Hao *et al.* 2009).

4. MÉTODOS PARA DETERMINAR LA RESISTENCIA AL FRÍO

Debido a la importancia que la resistencia al frío tiene para la supervivencia de las plantas, ha habido un interés considerable en el desarrollo de métodos para determinar el nivel de la planta a dicho factor. La mayoría de estos métodos se basan en ensayos controlados de congelación seguidos por la evaluación de lesiones. Sin embargo, durante muchos años los investigadores también han buscado indicadores indirectos para predecir el nivel de resistencia sin congelar. El contenido de materia seca, contenido y composición de azúcares, a menudo se correlaciona con la resistencia al frío del tejido vegetal. Hay también numerosas investigaciones que muestran una relación entre la calidad o cantidad de los aminoácidos ácidos, proteínas y los lípidos y el nivel de resistencia al frío (Lindén, 2002).

En la literatura se han descrito numerosas metodologías orientadas a establecer el grado de endurecimiento de las plántulas (Glerum *et al.* 1985; Burr *et al.* 1990; Hawkins *et al.* 1996; Royo *et al.* 2003), aunque se han desarrollado principalmente para especies de climas boreales o templado-húmedos. Las técnicas más utilizadas en laboratorio para discriminar entre genotipos sensibles o tolerantes a las heladas han sido: la medición de la resistencia eléctrica, observación visual, liberación de compuestos fenólicos, capacidad de recuperación y liberación de electrolitos. Tales métodos no han sido siempre eficaces, e incluso cuando lo han sido tienden a ser costosos y/o laboriosos (Barranco *et al.* 2005). Existen otros indicadores como la relación entre peso seco y peso fresco en combinación con análisis de azúcares solubles, que se han relacionado muy estrechamente con la resistencia a la helada en especies boreales. No obstante, estas técnicas no han sido evaluadas en especies mediterráneas ni aplicadas al control de calidad de planta (Vilagrosa *et al.* 2006).

Otro método menos utilizado ha sido el estudio de los procesos exotérmicos en los tejidos, mediante análisis térmico, para determinar límites geográficos de plantas, formación de hielo y congelación de los tejidos de las plantas (Swiderski *et al.* 2006).

En la tolerancia a la deshidratación de los tejidos, sea cual sea la causa por la que se produzca, es fundamental el mantenimiento de la estructura del tejido y evitar la oxidación debida al acumulo de radicales libres. Mantener la integridad del tejido se debe, entre otros aspectos, a la capacidad para minimizar el daño en la membrana celular, por tanto, la salida o liberación de electrolitos del interior celular es menor y éste es, en último término, el hecho en que se basa la cuantificación de electrolitos utilizada para valorar la tolerancia al frío (Burr *et al.* 1990; Lindén, 2000).

4.1. Liberación de electrolitos

El método de liberación de electrolitos se basa en el principio de que el daño a las membranas celulares provoca la salida de iones de la célula. El registro de la cantidad de solutos liberados permite hacer una estimación de los daños en el tejido. Para llevar a cabo dicho registro se mide la conductividad eléctrica del agua donde se colocan las muestras de tejido después de un ciclo de congelación/descongelación y después de un choque térmico.

Desde que este método fuera aplicado por primera vez por Dexter *et al.* (1930), son muchas las mejoras técnicas que se han ido realizando. Flint *et al.* (1967) propusieron la transformación de los valores de conductividad relativa a una escala donde las muestras no congeladas tuvieran un valor de cero y las muestras después del choque térmico un valor de 100 y expresarla en porcentaje. La liberación de electrolitos así expresada se denominó “Índice de daño” (I_d). Colombo *et al.* (1884) aplicaron este método propuesto por Flint *et al.* (1967) en coníferas. Whitlow *et al.* (1992) sugirieron una modificación adicional del protocolo que tiene en cuenta el área de la superficie de la muestra, a través de la cual se produce la difusión y el gradiente electroquímico entre la solución celular y la solución donde se

sumergen las muestras. Deans *et al.* (1995) propusieron que las muestras fueran expuestas a períodos más largos de incubación y de choque térmico para acercarse más a los valores asintóticos.

El test de liberación de electrolitos puede ser útil para medir el daño inducido por congelación, ya que está basado en alteraciones en las membranas celulares. Además, la prueba es bastante simple y rápida, los datos de rendimientos son cuantitativos y requiere sólo pequeñas cantidades de planta. Sin embargo, los cambios en la permeabilidad de la membrana con el cambio de estado fisiológico y el complejo tratamiento del ajuste de los datos limitan la validez de la técnica.

4.2. Temperatura letal media de congelación (TL₅₀)

El indicador más común de resistencia al frío es la temperatura letal media (TL₅₀), es decir, la temperatura a la cual se produce el 50 % de los daños en el tejido. La elección del método para hallar este indicador depende en parte de la naturaleza de los datos. En su estudio, Lindén (2002) concluyó que, los modelos logit y probit, así como el método de Spearman-Kärber se ajustan mejor a datos de respuestas binarias, como las observaciones visuales, donde se registran los daños como tejido vivo o muerto. La interpolación lineal y las funciones no lineales se ajustan mejor a datos como la conductividad relativa o I_d . Las curvas que describen la respuesta de las plantas a la congelación siguen un modelo sigmoideo, y en consecuencia, la regresión no lineal se utiliza a menudo para estimar el TL₅₀, que se corresponde con el punto de inflexión de la curva. Las funciones más recomendadas para el ajuste de las curvas son la función logística, la de Richards y la de Gompertz.

4.3. Calorimetría de Barrido Diferencial (CBD)

La CBD es una técnica de análisis térmico que registra la diferencia en el flujo de calor que tiene lugar entre la muestra y un material inerte de referencia en función de la temperatura y el tiempo, cuando ambos están sometidos a un programa controlado de temperaturas (Höhne *et al.* 2003). Permite determinar la temperatura a

la cual se producen algunos procesos experimentados por diversos materiales, como transiciones de fase (cristalización, fusión y evaporación) y reacciones químicas (hidrólisis y oxidación), así como el flujo de calor asociado, bien sea éste exotérmico o endotérmico.

Es una técnica similar al Análisis Térmico Diferencial (ATD) y suministra una información semejante. La diferencia entre ambos estriba en que la CBD en lugar de medir una diferencia de temperaturas entre la muestra y una referencia (sustancia que no sufre ninguna transición o transformación en el intervalo de temperaturas en el que se mida), mide la energía que es necesaria suministrar a la muestra para mantenerla a idéntica temperatura que la referencia. En general, la CBD puede trabajar en un intervalo de temperaturas que va desde la temperatura del nitrógeno líquido (-80°C) hasta unos 600°C. Consta de un horno calorimétrico, un sistema de gas de purga y un procesador para el control del instrumento y la adquisición de datos. Aunque los principios básicos en los que se basa esta técnica son muy sencillos, existen muchas variables que deben tenerse siempre muy presentes y que, muchas veces, son difíciles de controlar. Las más importantes son las de tipo instrumental (velocidad de calentamiento/enfriamiento) y la muestra (tamaño, tratamiento previo).

Con esta técnica se puede medir el calor liberado por las diferentes fracciones de agua dentro del tejido cuando ésta se somete a un ciclo de congelación/descongelación y determinar, por tanto, el punto de congelación que ocasiona la muerte de las células permitiendo la medición rápida de la resistencia al frío en los tejidos (Swiderski *et al.* 2006; Repo *et al.* 2008).

5. CO-ESTRÉS

Cuando una planta se somete a diferentes niveles de estrés hídrico antes del período de heladas se observa que la pérdida de agua disminuye los daños producidos por las bajas temperaturas, o lo que es lo mismo, aumenta la tolerancia

de las plantas a las heladas (Maldonado *et al.* 1997; Da Silva *et al.* 2008). Algunas de las respuestas al estrés hídrico han sido también encontradas en plantas bajo estrés por frío cuando se han estudiado estos dos factores por separado. En un estudio realizado por Maldonado *et al.* (1997) se observó que el contenido de ABA endógeno, los niveles de azúcares y otros solutos como la prolina, se incrementaron en respuesta al estrés hídrico y estos dos últimos se correlacionaron con una mayor tolerancia tanto a heladas como a sequía. Atribuyeron este hecho a que el frío y el estrés hídrico están involucrados en la desecación de la célula. Cuando las plantas son expuestas a heladas, la formación de hielo extracelular provoca el movimiento de agua del citoplasma hacia los espacios extracelulares, lo que deshidrata a la célula. Cuanto más concentrada sea la solución celular, menor será el potencial hídrico del interior de la célula y la deshidratación provocada por las bajas temperaturas de la helada (Da Silva *et al.* 2008).

La observación de las plantas sometidas a estrés llevó a concluir que además de los efectos específicos de cada agente estresante, se producen respuestas generales iguales o muy parecidas. A partir de esta observación se definió el “*Síndrome General de Adaptación*” o “*GAS*” (del inglés *General Adaptation Syndrome*). La asunción del GAS trajo consigo la idea del “co-estrés” (Prasad, 1997), a partir de la cual la resistencia a un determinado tipo de estrés podría aportar co-resistencia a otros agentes estresantes. Este mecanismo inherente de resistencia al estrés múltiple sería muy ventajoso ya que las plantas en la naturaleza se enfrentan normalmente a varios factores estresantes.

El impacto de los estreses simultáneos y la posible respuesta de la planta es algo difícil de predecir pues puede ocurrir tanto que la planta que ha soportado un estrés leve se haga más sensible a otro como que el pre-acondicionamiento a un factor estresante incremente la tolerancia a ese u otro agente. Este hecho fue el que tomamos como base para realizar este trabajo.

6. ENDURECIMIENTO

El endurecimiento de las plantas es un proceso que ocurre espontáneamente en la naturaleza, permitiendo, que las plantas se aclimaten para sobrevivir o crecer bajo situaciones de estrés. Un ejemplo de endurecimiento es el aumento de la resistencia a las heladas que experimentan muchas especies leñosas del mundo templado y boreal al acercarse la época fría del año, en respuesta a la disminución de la temperatura y el fotoperiodo. Otro ejemplo de endurecimiento que afecta a multitud de plantas perennes es el aumento de la tolerancia al estrés hídrico durante los períodos secos. Este tipo de comportamiento es muy frecuente en especies leñosas mediterráneas (Vilagrosa *et al.* 2006).

Levitt (1980) señaló que es posible que una planta aumente su resistencia a un estrés determinado sometiéndola a dosis subletales de ese mismo estrés, en muchos casos, la resistencia adquirida a un factor de estrés también confiere mayor resistencia a otros factores de estrés, por ejemplo, el endurecimiento por déficit hídrico también puede mejorar la resistencia a las heladas (Kozlowski y Pallardy, 2002).

La resistencia a las bajas temperaturas se incrementa con la edad del árbol y con la actividad de los tejidos, siendo los árboles jóvenes más sensibles a las heladas, llegando a producir daños que pueden derivar en la muerte de las plantas. Además de la edad, también influye en el nivel de daño, la duración y la temperatura mínima alcanzada (Lindén, 2002; Barranco *et al.* 2005).

Levitt (1980) postuló que el endurecimiento es un rasgo genéticamente controlado que es impulsado por tres factores medioambientales clave: temperatura, fotoperiodo y estrés hídrico. También Fiorino y Mancuso (2000) demostraron que ciertos genes específicos se activan como consecuencia de los cambios en estos factores. Estos cambios inducen un mecanismo metabólico de endurecimiento, que se traduce en un aumento de la resistencia a las heladas en otoño y una disminución en primavera.

El endurecimiento en vivero es un proceso en el que se promueven los mecanismos de resistencia a un factor de estrés de una planta al someterla a dosis subletales de dicho estrés. Uno de los principales tipos de endurecimiento aplicado a especies mediterráneas es el endurecimiento mediante estrés hídrico para aumentar la resistencia a la sequía (Vilagrosa *et al.* 2006). Debido a la relación existente entre la tolerancia al frío y a la sequía, esta práctica realizada en la fase de vivero puede ayudar a incrementar la tolerancia a ambos factores a la vez de tal forma que favorezcan tanto los trasplantes de primavera, que se verán sometidos al estrés hídrico del verano, como los de otoño, que pueden verse sometidos a heladas.

El endurecimiento mediante estrés hídrico contribuye a mejorar la calidad de las plantas, previo a su establecimiento en campo, y supone una herramienta de manejo importante en vivero (Prieto *et al.* 2004).

7. OBJETIVOS

Con este trabajo se persiguen dos objetivos principales que son:

- ❖ Valorar la eficacia del endurecimiento mediante estrés hídrico en planta clonal juvenil de *P. pinaster*.
- ❖ Determinar la eficiencia de los procedimientos de valoración de la tolerancia a frío más rápidos y no destructivos.

CAPÍTULO II. MATERIALY MÉTODOS

Para llevar a cabo los objetivos planteados en este trabajo se ha realizado un ensayo que incluyó dos etapas, en la primera se sometieron las plantas a un endurecimiento mediante estrés hídrico y en la segunda se determinó el efecto de ese tratamiento sobre la tolerancia al frío.

1. MATERIAL VEGETAL UTILIZADO

Como material vegetal se utilizaron 5 clones procedentes de 3 familias de *Pinus pinaster* Aiton. de procedencia Oria, Almería (F1P3, F1P5, F2P2, F2P5 y F5P1), obtenidos mediante técnicas de esquejado siguiendo la metodología de Majada *et al.* 2011 (Figuras II.1 y II.2). Dicha procedencia fue seleccionada en base a las características climáticas de su lugar de origen y las familias fueron elegidas al azar entre las 25 plantas madre que componen esta procedencia en el banco clonal CLONAPIN, situado en los invernaderos de la Sección Forestal del SERIDA (Villaviciosa, Asturias).



Tras 9 meses de cultivo en invernadero, 12 mini-estaquillas enraizadas de cada familia fueron trasplantadas a contenedores de 2 L con una mezcla de turba y perlita (80:20 v/v). Todas las plantas se fertilizaron con 1 gL⁻¹ de abono de liberación

lenta (N-P-K-Mg 16:7:15:2) y se colocaron en una cámara de cultivo situada en la Finca Experimental “La Mata”, en Grado (Asturias). Se programó una temperatura media de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con una humedad relativa del $70 \pm 5\%$ y un fotoperiodo de 16 horas suministrado por lámparas fluorescentes (OSRAM L36W/77), proporcionando una intensidad de $52 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ al nivel del dosel foliar. Durante los 3 meses de aclimatación a estas condiciones de cultivo, las plantas fueron regadas una vez a la semana con una solución de nutrientes (COMPO HORTRILON[®], Barcelona-España) ajustando el pH a 6,0. Durante la fase de endurecimiento se aplicó esta misma fertirrigación cada 15 días.

2. DISEÑO EXPERIMENTAL

2.1. Endurecimiento mediante estrés hídrico

La fase de endurecimiento se realizó con 6 de las 12 plantas y se aplicó un tratamiento de estrés hídrico que se fijó al 20% de la capacidad de campo (CC). Las plantas con este tratamiento las denominamos “endurecidas” (E). Las 6 plantas restantes se mantuvieron con alta disponibilidad hídrica (95% de la CC) y las denominamos “no endurecidas” (NE).

Cuando se alcanzó el 20% de la CC se hizo un muestreo al amanecer (6:00 h) y otro al mediodía (13:00 h) en el que se recogieron acículas para determinar las siguientes variables: potencial hídrico (Ψ_h), contenido hídrico foliar (CHF), potencial osmótico real (Ψ_{π}) y a plena turgencia ($\Psi_{\pi 100}$), contenido en prolina y ácido abscísico (ABA).

El contenido hídrico en el sustrato se midió de forma continua durante todo el ensayo gravimétricamente y, además, la humedad de cada contenedor fue controlada por medio de sondas TDR (*Time Domain Reflectometry Probe*, Trime[®]IT IMKO, Alemania) tres veces por semana (Topp *et al.* 1980 y 1985). Se repuso agua tanto en las plantas NE como en las E, manteniendo la disponibilidad hídrica en los

porcentajes programados para las primeras y disminuyéndolo por igual en las segundas. En este último caso se tomó como referencia la planta que mostró mayor consumo.

Variables evaluadas:

Potencial hídrico (Ψ_h)

Para determinar el Ψ_h se utilizó una cámara de presión de Scholander (PMS Instrument Co., Corvallis, OR, USA) siguiendo la metodología descrita por Scholander *et al.* (1965) y Turner (1988).

Contenido hídrico foliar (CHF)

El CHF fue calculado como: $CHF = \frac{PF-PS}{PF} \cdot 100$, donde PF es el peso fresco y PS es el peso seco después de secar las acículas a 65°C hasta peso constante.

Potencial osmótico (Ψ_π)

El potencial osmótico real (Ψ_π) fue determinado en acículas recién cortadas y el potencial osmótico a plena turgencia ($\Psi_{\pi 100}$) en acículas rehidratadas con 2 mL de agua destilada durante 24 h a 4°C. Para ambas mediciones, tras congelar y descongelar los tejidos, se utilizó un psicrómetro Psypro™ (Wescor Inc., USA) al que se le acoplaron 6 cámaras (Thermocouple C-52 Sample Chamber, USA) y en las que se introdujeron, tras ser calibradas, aproximadamente 0,030 g de acícula troceada. Tras 60 minutos de estabilización se obtuvo el potencial osmótico (MPa).

Prolina libre

La extracción y cuantificación se realizó utilizando el método descrito por Bates *et al.* (1973). Se utilizaron muestras de entre 80 y 200 mg de material foliar

fresco que se homogenizaron en 1,5 mL de ácido sulfosalicílico al 3%. A 500 μ L del extracto se le agregaron 2 mL de ácido acético glacial y 2 mL de solución reactiva (1,25 g de ninhidrina en 30 mL de ácido acético glacial y 20 mL de ácido ortofosfórico 6M), se agitó y se incubó a 100°C durante 1 h. Se paró la reacción con un baño de hielo y el complejo coloreado obtenido se extrajo con 2 mL de tolueno. La cuantificación se realizó sobre 1 mL de fase orgánica y se midió su absorbancia a 520 nm, en un espectrofotómetro (Biotek[®] Synergy HT, USA). Estas medidas se interpolaron en una curva de calibración usando prolina comercial como estándar.

Ácido Abscísico (ABA)

Para la extracción de ABA se utilizó el método de Dobrev y Kamínek (2002). Muestras de 100 mg de materia seca se homogenizaron en 5 mL de solvente de extracción (metanol, agua y ácido fórmico 75/20/5, v/v/v). El extracto se pre-purificó pasándolo en primer lugar por una columna de fase reversa y luego por una columna de intercambio catiónico. En ambos casos las muestras se eluyeron con metanol. El eluyente recogido se llevó a sequedad, se redisolvió en 400 μ L de metanol y se purificó mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, Varian Pro Estrella, USA). Las fracciones recogidas se llevaron a sequedad para su posterior cuantificación mediante enzima inmunoensayo (ELISA) con anticuerpos monoclonales (Phytodetek[®] ABA Test Kit, USA) en un espectrofotómetro (Biotek[®] Synergy HT, USA).

2.2. Determinación de la tolerancia a frío

2.2.1 Acondicionamiento

Tras el endurecimiento de los materiales mediante la reducción del aporte hídrico, se realizó un acondicionamiento de las plantas mediante una reducción gradual de la temperatura y de las horas de luz. Para ello, la temperatura del

ambiente se redujo de 25°C a 15°C y las horas de luz de 16 a 12 h, gradualmente, a lo largo de una semana de cultivo.

2.2.2. Evaluación de la tolerancia a frío mediante el método de liberación de electrolitos

Para cuantificar la tolerancia de las plantas al frío (heladas) se estimó la pérdida de integridad de las membranas celulares causada por un daño, en este caso congelación, simulando para ello una situación de helada sobre las acículas del material vegetal previamente acondicionado. Para ello se empleó el método de liberación de electrolitos (Glerum, 1985; Burr *et al.* 1990; Lindén, 2002).

Se tomaron muestras de acículas sanas de la última cohorte totalmente desarrollada, posteriormente se cortaron en segmentos de 3 cm y, tras lavarlas y secarlas para quitar las impurezas y electrolitos liberados al cortar, se introdujeron en tubos de vidrio con 2 mL de agua destilada (Figuras II.3 y II.4).



Figuras II.3 y II.4. Preparación de las muestras para el método de liberación de electrolitos.

Las muestras de acículas se sometieron a temperaturas de -4°C, -8°C, -12°C, -16°C, -20°C y -24°C. Las muestras usadas como control se mantuvieron a temperatura de 4°C. En todos los casos se aplicó un ritmo constante de bajada de la

temperatura de 5°C por hora y un periodo de exposición a la temperatura mínimo de 1 h.

El ensayo se realizó en cámaras climáticas (Dycometal Serie CCK/CM, Barcelona, España) localizadas en el departamento de Sistemas y Recursos Forestales (Genética y Ecofisiología Forestal) del CIFOR-INIA, Madrid (Figuras II.5 y II.6).



Figura II. 5 y II.6. Cámaras climáticas en las que se llevó a cabo el ciclo del frío y la rotura celular total.

Pasado el ciclo de frío, las muestras se dejaron descongelar a 4°C en oscuridad entre 2 y 3 h, se diluyeron añadiéndoles 18 mL de agua destilada y se incubaron 20 h a 20°C en oscuridad. Con el objeto de medir la liberación de electrolitos que se produce en las roturas celulares durante la congelación, tras la incubación se midió la conductividad eléctrica ($C_{i_{muestra}}$) de cada tubo, incluyendo las muestras de control ($C_{i_{control}}$), (Figuras II.7 y II.8).



Figuras II.7 y II.8. Medición de la conductividad eléctrica de las muestras.

Tras medir los valores de conductividad, las muestras se sometieron a 90°C durante 2 h, para producir la destrucción total de los tejidos, utilizando para ello las mismas cámaras climáticas. Tras esta fase se volvieron a incubar 20 h a 20°C en oscuridad, midiendo posteriormente la conductividad de cada muestra ($C_{f_{muestra}}$) y de los controles ($C_{f_{control}}$).

Variables evaluadas:

Índice de daño (I_d)

Se utilizó este índice para expresar el resultado de las lesiones producidas en los tejidos mediante el método de liberación de electrolitos en todos los clones y tratamientos estudiados. Su valor, expresado en porcentaje, es inversamente proporcional a la resistencia al frío del tejido estudiado.

El I_d se calculó para cada temperatura de congelación mediante las ecuaciones propuestas por Colombo *et al.* (1984) para coníferas:

$$CR_{\text{control}} = C_{i_{\text{control}}} / C_{f_{\text{control}}} \times 100$$

$$CR_{\text{muestra}} = C_{i_{\text{muestra}}} / C_{f_{\text{muestra}}} \times 100$$

$$I_d = CR_{\text{muestra}} - CR_{\text{control}} / 1 - RC_{\text{control}} / 100$$

Donde,

CR_{control} : conductividad relativa de las muestras usadas como control, que es el contenido de electrolitos liberados por las muestras sin congelar

$C_{i_{\text{control}}}$: conductividad eléctrica de los controles

$C_{f_{\text{control}}}$: conductividad eléctrica de los controles después de la rotura total de los tejidos

C_{muestra} : conductividad relativa de las muestras expuestas a cada temperatura de congelación

$C_{i_{\text{muestra}}}$: conductividad eléctrica de las muestras sometidas a cada temperatura de congelación

$C_{f_{\text{muestra}}}$: conductividad eléctrica de las muestras sometidas a cada temperatura de congelación después de la rotura total de los tejidos

I_d : índice de daño

Temperatura letal media de congelación (TL_{50})

La relación entre el I_d y la temperatura se ajustó a un modelo de curva sigmoide, (Fiorino y Mancuso, 2000; Barranco *et al.* 2005; Corcuera *et al.* 2011) cuya ecuación es:

$$y = a / (1 + \exp(-(x - x_0)/b))$$

Donde,

$$Y = I_d$$

a = asíntota de la curva

b = pendiente en el punto de inflexión X_0

X_0 = temperatura en el punto de inflexión

X = temperatura de tratamiento

El punto de inflexión de la curva sigmoide (parámetro X_0) predice el valor de TL_{50} , que se utiliza como indicador de la resistencia al frío, y se corresponde con la temperatura de congelación a la cual ocurre el 50% de iones liberados y a un daño letal irreversible.

2.2.3. Evaluación de resistencia a frío mediante Calorimetría de Barrido Diferencial (CBD)

El Calorímetro de Barrido Diferencial (*Q20 TA Instrument Tzero, USA*) (Figura II.9) se usa para determinar la energía asociada al cambio de transición de fase de la materia, en este caso congelación/descongelación de las muestras de material vegetal. El fundamento de esta técnica se basa en la medida de la diferencia de flujo de calor de un crisol vacío, llamado de referencia, y un crisol con la muestra objeto de estudio. El valor de la entalpia de congelación/descongelación es proporcional a la cantidad de agua congelable del tejido, que es en último término la responsable del daño celular.



Figura II.9. Calorímetro de barrido diferencial (CBD) con control de flujo másico (CFM) y sistema de enfriamiento por refrigerador (SER).

Preparación de muestras:

Se utilizó una muestra troceada de acícula de cada clon y tratamiento de entre 15-20 mg de peso fresco (PF). Las muestras se introdujeron en unas cápsulas de aluminio (*Tzero Pans*) previamente taradas. Una vez introducidas, las cápsulas se sellaron herméticamente con sus tapas (*Tzero Hermetic Lid*) utilizando una prensa manual (*Tzero Press*) para evitar la evaporación (Figura II.10). Las muestras se introdujeron en la cámara de medición del CBD (*Q20 TA Instrument Tzero, USA*) junto con una cápsula de referencia vacía.



Figura II.10. Kit de prensa Tzero (prensa, cápsulas y tapas de aluminio).

Condiciones de operación empleadas para el estudio del proceso de congelación y descongelación de las muestras (Hawkins *et al.* 1996):

- 1. Estabilización o equilibrado de las muestras a 5°C de T inicial
- 2. Rampa de congelación: desde 5°C hasta -25°C con una disminución de 1°C por minuto
- 3. Isotherma durante 10 minutos a -25°C
- 4. Rampa de descongelación: desde -25°C hasta 5°C con un aumento de 1°C por minuto

La duración total del análisis por muestra fue de 75 minutos.

Una vez procesada cada muestra, se hicieron unas pequeñas perforaciones en la cápsula y se metió en una estufa de circulación forzada de aire (Selecta Digitronic, Barcelona, España) a 65°C durante 48 h. Pasado ese tiempo se llevó a temperatura ambiente en un desecador, durante 1 h aproximadamente, para obtener el peso seco (PS) y determinar el contenido de agua total de la muestra.

Variables evaluadas:

Durante los procesos de congelación y descongelación se recogieron los datos de flujo de calor en función del tiempo y la temperatura, a partir de los cuales se obtuvieron las siguientes variables (Figura II.11):

- Temperatura de los picos de transición de congelación y descongelación: P_c y P_d
- Entalpía de congelación y descongelación: ΔH_c y ΔH_d
- Temperatura del inicio de la congelación y la descongelación: T_{ic} y T_{id}
- Temperatura del final de la congelación y descongelación: T_{fc} y T_{fd}

También se calculó la diferencia entre la temperatura inicial y la temperatura final de congelación y descongelación para obtener el rango ($Rango_c$ y $Rango_d$) de ambos procesos.

Sample: CF1P3P1_1
 Size: 23.2000 mg
 Method: Rampa_1
 Comment: Ensayo co-estrés frío-sequía

DSC

File: C:\...Ensayos PSE Forestal\CF1P3P1_1.JPW
 Operator: Silvia
 Run Date: 18-Aug-2010 08:31
 Instrument: DSC Q20 V24.4 Build 116

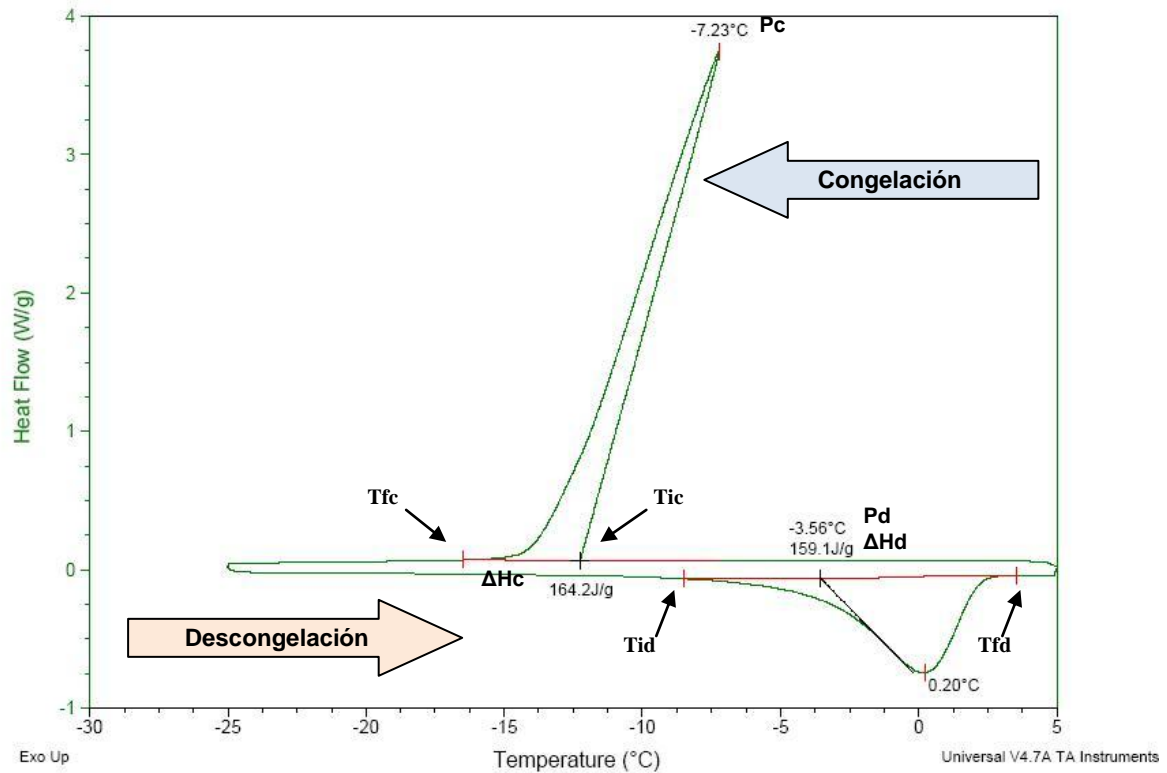


Figura II.11. Curva de congelación/descongelación obtenida con mediante CBD de una de las muestras del ensayo donde P_c y P_d es la temperatura de los picos de transición de congelación y descongelación, T_{ic} y T_{id} es la temperaturas inicial de congelación y descongelación, T_{fc} y T_{fd} es la temperatura final de congelación y descongelación y ΔH_c y ΔH_d es la entalpía de congelación y descongelación.

A partir del valor de ΔH_d se calculó el contenido de agua total, agua congelable y no congelable presente en las acículas mediante las siguientes ecuaciones (Repo *et al.* 2008):

$$AT = PF - PS / PS$$

$$AC = \Delta H_d * PF / \Delta H_{\text{agua}} * PS$$

$$ANC = AT - AC$$

Donde,

AT: agua total ($\text{g H}_2\text{O g}^{-1}\text{PS}$)

PF: peso fresco (g)

PS: peso seco (g)

AC: agua congelable ($\text{g H}_2\text{O g}^{-1}\text{PS}$)

ΔH_d : entalpía de descongelación (fusión) de la muestra (Jg^{-1})

ΔH_{agua} : entalpía de fusión del agua (334 Jg^{-1})

ANC: agua no congelable ($\text{g H}_2\text{O g}^{-1}\text{PS}$)

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

El análisis estadístico de los datos obtenidos para cada parámetro se realizó mediante la aplicación estadística SPSS Inc.® Win™ vs. 15.0. La homogeneidad de varianzas se comprobó *a priori* mediante el test de Levene. Las diferencias e interacciones entre clones y tratamientos fueron determinadas mediante un análisis de varianza de dos factores (ANOVA). Las comparaciones *Post-hoc* de las medias fueron hechas mediante el test de Tukey ($P < 0,05$).

Para determinar la relación entre variables, se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson entre parámetros hídricos y bioquímicos también con la aplicación estadística SPSS Inc.® Win™ vs. 15.0.

CAPÍTULO III.RESULTADOS

1. ESTRÉS HÍDRICO

En las Tablas III.1 y III.2 se recogen los indicadores del estado fisiológico en el que se encontraban las plantas en el momento en que se tomaron las muestras para analizar la tolerancia al frío.

Como consecuencia del déficit de agua en el sustrato, todas las plantas sometidas a endurecimiento mediante estrés hídrico disminuyeron su potencial hídrico (Ψ_h). Se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$), inducidas por el tratamiento, en los clones F1P3, F2P2 y F2P5, al amanecer (6:00 h), y en todos, al mediodía (13:00 h), momento en el que se alcanzaron valores más negativos.

El contenido hídrico foliar (CHF) disminuyó en las plantas con restricción hídrica, en valores similares en ambos momentos del día, y se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre tratamientos, al amanecer y al mediodía, en todos los clones exceptuando los de la familia 2, en la que sólo fue significativo el clon F2P2 al mediodía.

Tanto el potencial osmótico real (Ψ_π) como el potencial osmótico a plena turgencia ($\Psi_{\pi 100}$) se hicieron más negativos con la carencia de agua. Se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre tratamientos para los clones F2P2, F2P5 y F5P1 en Ψ_π al amanecer y para F1P3, F2P5 y F5P1 al mediodía. Los valores del $\Psi_{\pi 100}$ se diferenciaron significativamente ($P < 0,05$) entre tratamientos para todos los clones excepto F1P5 al amanecer y F1P3 al mediodía.

El contenido en prolina aumentó en las plantas E en 3 de los clones ensayados, al amanecer, y en todos los clones al mediodía, aunque sólo se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en F2P2 al amanecer y en F1P5 al mediodía.

El contenido en ácido abscísico (ABA) no mostró diferencias significativas entre tratamientos para la mayoría de los clones en ambos muestreos y en aquellos en que hubo diferencias, clones F2P5 y F5P1, al amanecer, y F1P3, al mediodía, su contenido se redujo con el tratamiento de endurecimiento, contrariamente a lo esperado tras un estrés hídrico.

Tabla III.1. Valores medios (\pm error estándar) del potencial hídrico (Ψ_h), contenido hídrico foliar (CHF), potencial osmótico (Ψ_π), potencial osmótico a plena turgencia ($\Psi_{\pi 100}$), contenido en prolina y en ácido abscísico (ABA) al amanecer (6:00 h). Letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos, plantas no endurecidas (NE) y plantas endurecidas (E). Test de Tukey $P < 0,05$.

Clon	Tratamiento	Ψ_h (MPa)	CHF (%)	Ψ_π (MPa)	$\Psi_{\pi 100}$ (MPa)	Prolina ($\mu\text{g/gPF}$)	ABA (nmol/gPS)
F1P3	NE	-0,60 \pm 0,03 a	77,14 \pm 0,78 a	-2,01 \pm 0,20 a	-1,52 \pm 0,03 a	32,84 \pm 12,39 a	8,67 \pm 1,10 a
	E	-0,83 \pm 0,02 b	73,15 \pm 0,80 b	-2,13 \pm 0,06 a	-2,05 \pm 0,02 b	53,01 \pm 13,51 a	17,91 \pm 4,60 a
F1P5	NE	-0,62 \pm 0,07 a	79,07 \pm 0,74 a	-1,87 \pm 0,13 a	-1,73 \pm 0,09 a	17,12 \pm 6,30 a	10,36 \pm 0,61 a
	E	-1,02 \pm 0,15 a	72,50 \pm 0,61 b	-2,08 \pm 0,03 a	-1,94 \pm 0,02 a	13,89 \pm 3,21 a	46,65 \pm 26,77 a
F2P2	NE	-0,60 \pm 0,03 a	78,72 \pm 0,36 a	-1,69 \pm 0,01 a	-1,84 \pm 0,03 a	9,35 \pm 3,53 a	25,77 \pm 2,32 a
	E	-1,07 \pm 0,04 b	73,40 \pm 1,90 a	-2,12 \pm 0,04 b	-2,26 \pm 0,02 b	51,60 \pm 4,28 b	40,99 \pm 17,30 a
F2P5	NE	-0,62 \pm 0,09 a	76,46 \pm 0,85 a	-1,68 \pm 0,07 a	-1,63 \pm 0,06 a	36,54 \pm 9,09 a	19,87 \pm 2,45 a
	E	-1,23 \pm 0,15 b	66,50 \pm 4,20 a	-2,90 \pm 0,37 b	-2,09 \pm 0,15 b	75,77 \pm 17,45 a	5,48 \pm 0,58 b
F5P1	NE	-0,83 \pm 0,04 a	80,16 \pm 1,15 a	-1,56 \pm 0,02 a	-1,34 \pm 0,04 a	27,76 \pm 5,01 a	12,98 \pm 1,73 a
	E	-1,22 \pm 0,19 a	72,35 \pm 0,58 b	-2,83 \pm 0,45 b	-1,97 \pm 0,04 b	20,37 \pm 5,84 a	7,42 \pm 1,05 b

Tabla III.2. Valores medios (\pm error estándar) del potencial hídrico (Ψ_h), contenido hídrico foliar (CHF), potencial osmótico (Ψ_π), potencial osmótico a plena turgencia ($\Psi_{\pi 100}$), contenido en prolina y en ácido abscísico (ABA) al mediodía (13:00 h). Letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos, plantas no endurecidas (NE) y plantas endurecidas (E) Test de Tukey $P < 0,05$.

Clon	Tratamiento	Ψ_h (MPa)	CHF (%)	Ψ_π (MPa)	$\Psi_{\pi 100}$ (MPa)	Prolina ($\mu\text{g/gPF}$)	ABA (nmol/gPS)
F1P3	NE	-0,58 \pm 0,07 a	76,86 \pm 0,77 a	-1,42 \pm 0,03 a	-2,86 \pm 0,53 a	29,96 \pm 9,11 a	16,39 \pm 2,69 a
	E	-0,88 \pm 0,07 b	71,86 \pm 0,82 b	-1,99 \pm 0,04 b	-2,18 \pm 0,11 a	36,50 \pm 4,59 a	9,61 \pm 1,05 b
F1P5	NE	-0,68 \pm 0,04 a	80,34 \pm 0,96 a	-3,48 \pm 0,51 a	-1,36 \pm 0,05 a	34,44 \pm 0,79 a	12,56 \pm 0,79 a
	E	-1,15 \pm 0,08 b	71,55 \pm 1,48 b	-1,94 \pm 0,57 a	-1,88 \pm 0,11 b	101,95 \pm 10,10 b	11,89 \pm 0,76 a
F2P2	NE	-0,50 \pm 0,13 a	79,55 \pm 0,60 a	-2,62 \pm 0,55 a	-1,53 \pm 0,03 a	5,96 \pm 5,05 a	28,81 \pm 10,81 a
	E	-1,22 \pm 0,13 b	73,04 \pm 1,64 b	-2,68 \pm 0,27 a	-2,05 \pm 0,12 b	33,79 \pm 11,09 a	27,93 \pm 6,18 a
F2P5	NE	-0,57 \pm 0,03 a	83,41 \pm 7,15 a	-1,60 \pm 0,04 a	-1,60 \pm 0,03 a	30,12 \pm 5,99 a	34,22 \pm 7,28 a
	E	-1,32 \pm 0,16 b	66,79 \pm 3,73 a	-2,19 \pm 0,12 b	-1,97 \pm 0,08 b	76,04 \pm 26,14 a	21,89 \pm 2,31 a
F5P1	NE	-0,58 \pm 0,07 a	81,42 \pm 1,47 a	-1,30 \pm 0,05 a	-1,46 \pm 0,06 a	21,26 \pm 3,49 a	8,11 \pm 0,82 a
	E	-1,23 \pm 0,14 b	74,92 \pm 1,79 b	-1,95 \pm 0,06 b	-1,76 \pm 0,06 b	41,51 \pm 13,75 a	6,89 \pm 0,78 a

2. TOLERANCIA AL FRÍO

2.1. Índice de daño (I_d)

Los valores de I_d difirieron significativamente, tanto entre tratamientos como entre clones, para temperaturas inferiores a -12°C , salvo para la diferencia entre clones sometidos a -20°C . No obstante, se observa interacción significativa Clon*Tratamiento para todas las temperaturas, con la excepción de -8°C (Tabla III.3).

Tabla III.3. Valores medios (\pm error estándar) y análisis de varianza del Índice de daño (I_d) en plantas no endurecidas (NE) y endurecidas (E) en todas las temperaturas ensayadas. Niveles de significación: no significativo (ns), (*) $P < 0,05$ y (**) $P < 0,001$.

	Tratamiento	I_d (%)					
		-4°C	-8°C	-12°C	-16°C	-20°C	-24°C
Total	NE	0,84 \pm 0,19	32,06 \pm 7,14	75,42 \pm 1,97	79,28 \pm 1,74	78,27 \pm 1,92	78,98 \pm 1,86
	E	1,14 \pm 0,29	24,68 \pm 4,95	55,50 \pm 1,75	59,03 \pm 1,86	58,26 \pm 1,78	57,91 \pm 1,58
Clon		ns	ns	**	*	ns	**
Tratamiento		ns	ns	**	**	**	**
Clon*Tratamiento		*	ns	**	**	**	**

Los valores de I_d se incrementan a medida que la temperatura desciende, siendo este incremento superior en las plantas NE. A -4°C no se apreció daño en los tejidos en ningún tratamiento, pero a medida que fue disminuyendo la temperatura, se observó que en todas las temperaturas las NE sufrieron un 20% más de daño que las plantas E. El máximo daño observado para estas plantas fue un 79% frente a un 59% para las plantas E. El I_d se incrementó de forma exponencial con la bajada de temperatura en ambos tratamientos, hasta -12°C , temperatura a la cual se estabilizó permaneciendo más o menos constante posteriormente (Figura III.1).

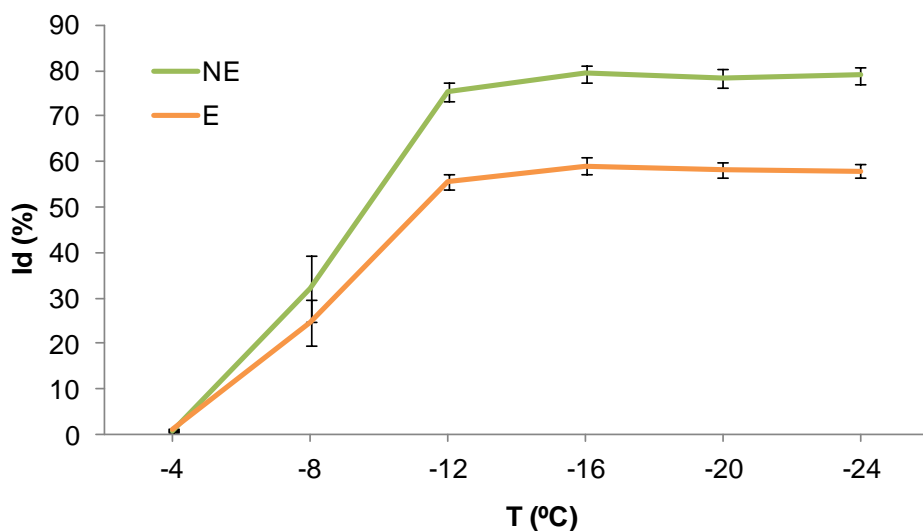


Figura III.1. Valores medios (\pm error estándar) del Índice de daño (I_d) medido a diferentes temperaturas de congelación en plantas no endurecidas (NE) y endurecidas (E).

En la Figura III.2 se muestra la respuesta del I_d a la disminución progresiva de la temperatura a la que los tejidos fueron sometidos en los 5 clones estudiados y para los 2 tratamientos aplicados. En todos los casos se ajusta a una curva sigmoide. A partir de -12°C se observaron diferencias significativas en este índice para todos los clones excepto F2P5. Los valores de I_d oscilaron entre 0,16 % y 90% en plantas NE y en el rango de 0,32% a 68% en plantas E.

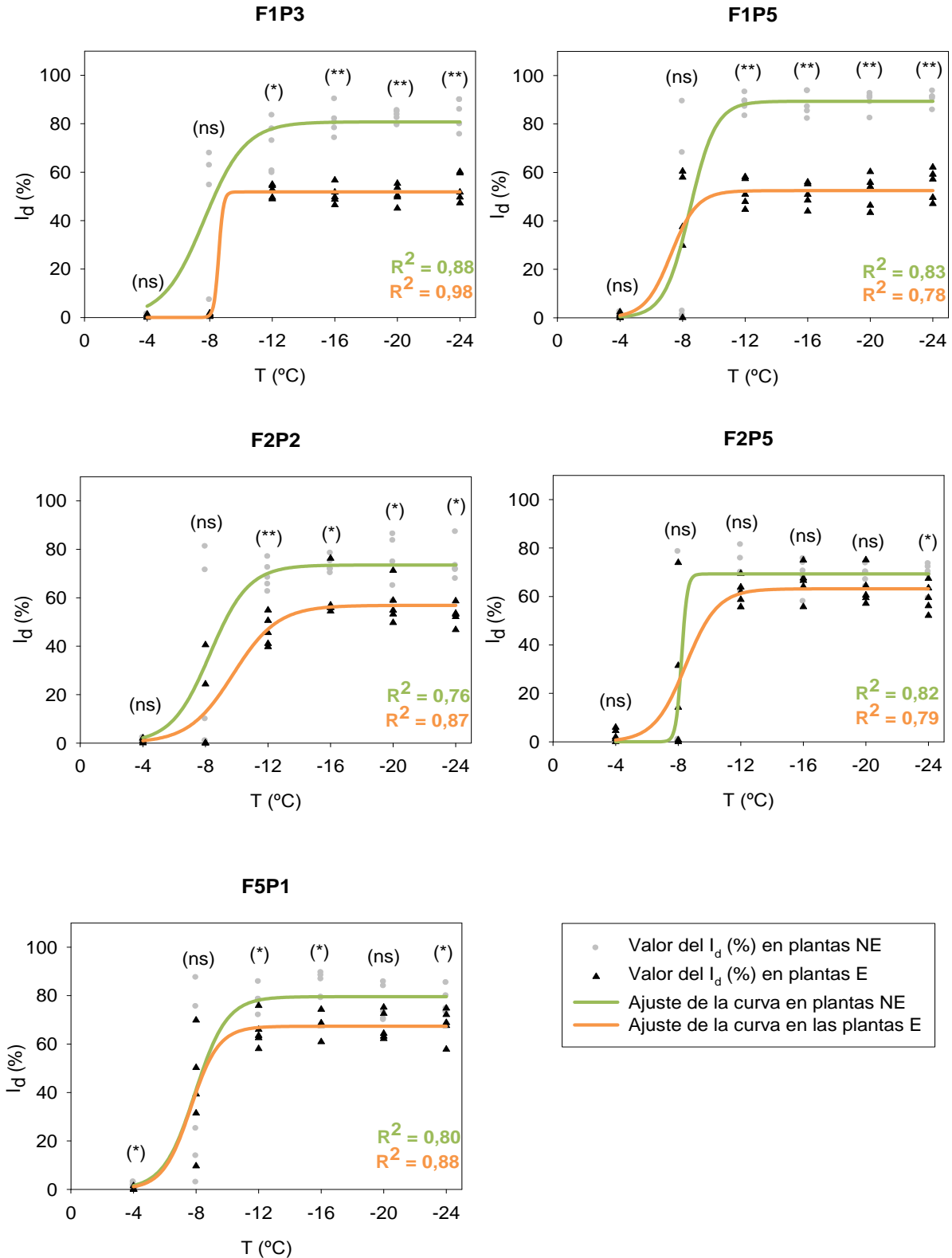


Figura III.2. Curvas del Índice de daño (I_d) frente a las temperaturas de congelación en plantas no endurecidas (NE) y endurecidas (E) en los 5 clones del ensayo. Los asteriscos representan las diferencias entre tratamientos. Niveles de significación: no significativo (ns), (*) $P < 0,05$ y (**) $P < 0,001$.

2.2. Temperatura Letal Media (TL₅₀)

En la Tabla III.4 se recogen los valores de X_0 del modelo de ajuste elegido, sigmoide de 3 parámetros, como estimación del valor de TL₅₀ para los 5 clones y los dos tratamientos. También se muestran, como alternativa al método descrito para el cálculo del TL₅₀, los valores de las abscisas (T) que corresponderían al valor de la ordenada (I_d) 50% aplicando las ecuaciones obtenidas según el modelo sigmoide para los distintos clones y tratamientos. Por último, se indica en porcentaje la diferencia entre los dos valores de T calculados.

Según el modelo sigmoide, en los clones evaluados, el valor de TL₅₀ estimado en base a X_0 más bajo se obtuvo en plantas endurecidas del clon F2P2, -9.77 °C. Las plantas endurecidas de los clones F1P3, F2P2 y F2P5 redujeron el valor de TL₅₀ en -0,83, -1,48°C, -0,26°C respecto a las NE, respectivamente, mientras que, en el resto de clones, el valor de TL₅₀ de las plantas E fue superior al de las no NE (Tabla III.4). Utilizando las fórmulas correspondientes a estas curvas para calcular el valor de la abscisa cuando la ordenada (I_d) toma el valor del 50%, todos los clones mostraron una reducción de TL₅₀ con el tratamiento de endurecimiento y en todos los casos, la variación observada en la medida del parámetro según los dos métodos es superior en las plantas E.

Tabla III.4. Coeficientes de la ecuación sigmoidea de 3 parámetros utilizada para el ajuste de los datos de I_d (%) obtenidos tras la congelación para los 5 clones y los dos tratamientos. X_0 es el punto de inflexión de la curva (estima el valor de TL_{50}), X es la temperatura obtenida cuando a Y se le asigna un I_d del 50% y el % variación es la diferencia porcentual entre X y X_0 .

Clon	Tratamiento	a	b	X_0 (°C)	Y (%)	X (%)	% variación
F1P3	NE	80,77	-1,31	-7,66	50	-8,29	8,31
	E	51,85	-0,13	-8,49	50	-8,91	4,91
F1P5	NE	89,38	-0,82	-8,47	50	-8,67	2,32
	E	52,49	-0,83	-7,26	50	-9,76	34,31
F2P2	NE	73,54	-1,23	-8,29	50	-9,22	11,19
	E	56,87	-1,43	-9,77	50	-12,6	28,96
F2P5	NE	69,3	-0,18	-8,22	50	-8,39	2,08
	E	63,16	-1,02	-8,48	50	-9,84	16,03
F5P1	NE	79,57	-1,02	-7,94	50	-8,47	6,72
	E	67,34	-0,89	-7,66	50	-8,6	12,3

2.3. Relación entre estimadores de tolerancia a frío y las variables indicadoras del estatus hídrico de las plantas

Se eligió la temperatura de -12°C , como valor de I_d crítico por ser el punto en el que se empiezan a manifestar diferencias significativas ($P < 0,001$) entre tratamientos. Este valor se correlacionó de manera significativa ($P < 0,05$) con el CHF y con el $\Psi_{\pi 100}$. Ninguno de los indicadores de tolerancia al frío mostraron relación con el contenido en ABA (Tabla III.5).

TL_{50} (X) solo lo hace de forma significativa con $\Psi_{\pi 100}$ y TL_{50} (X_0) no se correlaciona de forma significativa con ningún parámetro, mostrando además los valores del coeficiente de Pearson más bajos, salvo para el contenido en prolina.

Tabla III.5. Coeficientes de correlación de Pearson entre el Índice de daño a -12°C (I_d (-12°C)), la temperatura letal media (TL_{50} (X_0)) y temperatura letal media estimada (TL_{50} (X)) con el potencial hídrico (Ψ_h), contenido hídrico foliar (CHF), potencial osmótico (Ψ_{π}), potencial osmótico a plena turgencia ($\Psi_{\pi 100}$), contenido en prolina y ácido abscísico (ABA). Niveles de significación: (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$.

	Ψ_h	CHF	Ψ_{π}	$\Psi_{\pi 100}$	Prolina	ABA
I_d (-12°C)	0,56	0,65(*)	0,36	0,75(*)	-0,38	-0,63
TL_{50} (X_0)	-0,04	0,03	-0,04	0,37	-0,48	-0,10
TL_{50} (X)	0,41	0,37	0,19	0,67(*)	-0,31	-0,61

2.4. Calorimetría de Barrido Diferencial (CBD)

En la Figura III.3 se representan las curvas de congelación/descongelación, obtenidas mediante CBD, de una de las muestras de plantas NE (A) y de una muestra de plantas E mediante estrés hídrico (B). De forma general se observó que las plantas NE presentaron un único pico de congelación o pico exotérmico, mientras que las plantas E presentaron un pico exotérmico principal y varios picos o núcleos de congelación secundarios. Tanto las plantas NE como las E presentaron un único pico de descongelación o pico endotérmico.

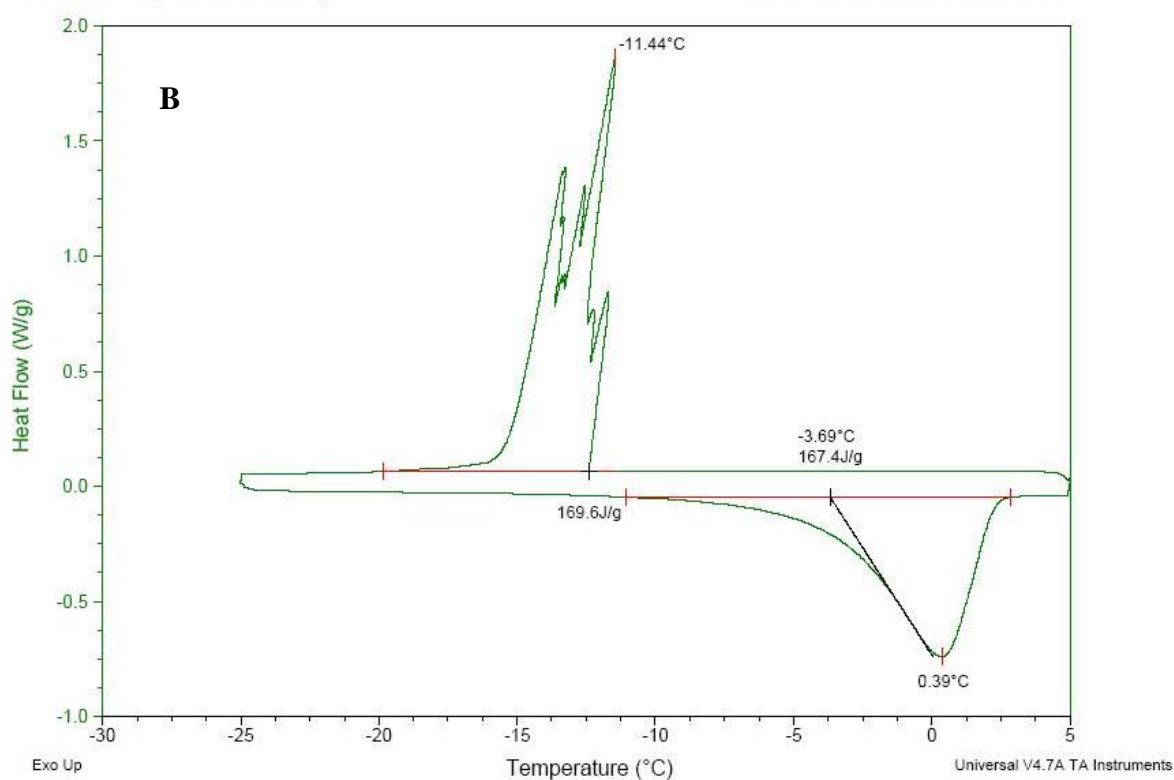
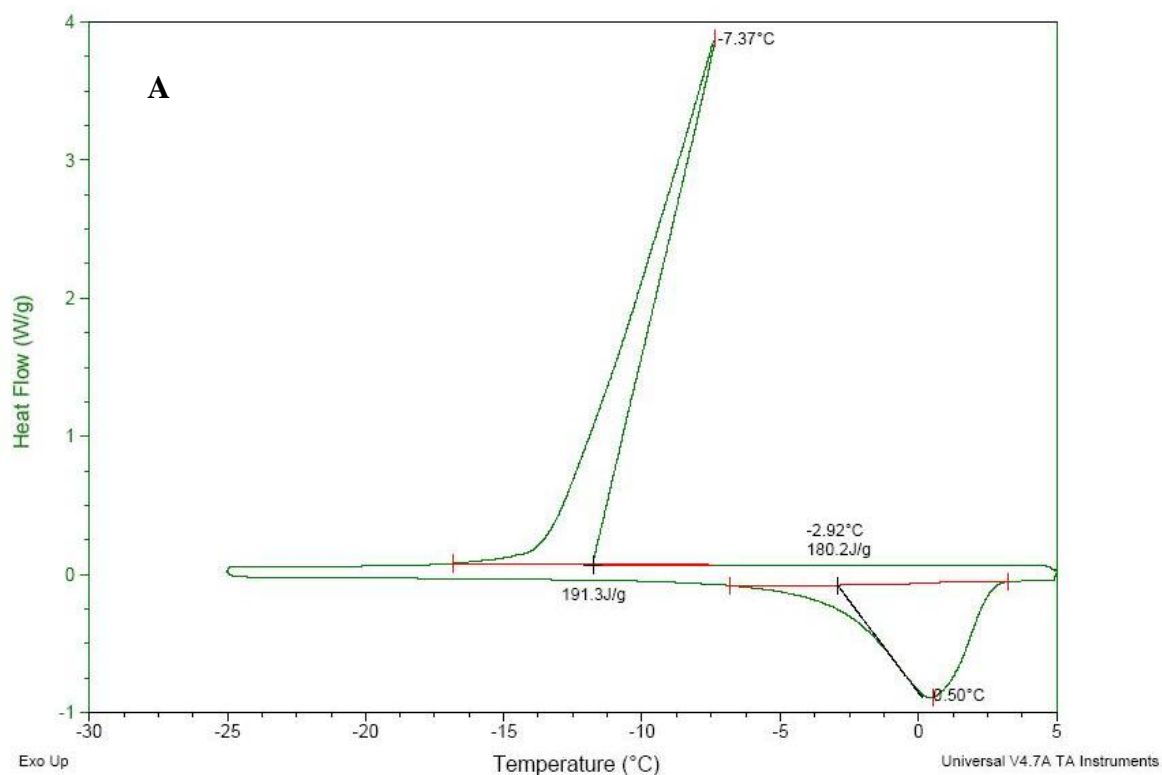


Figura III.3. Curvas de flujo calorífico *versus* temperatura obtenidas mediante CBD de una muestra de acículas de planta no endurecida (A) y endurecida mediante estrés hídrico (B).

Proceso de Congelación

El análisis de las curvas de congelación mostró diferencias significativas ($P < 0,05$) en la entalpía del pico de congelación (ΔH_c) entre clones, tratamiento y su interacción. En el pico de transición (P_c) sólo se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) por tratamiento y se observó que las plantas E congelaron a temperaturas más frías que las NE (Tabla III.6). El resto de variables no mostraron diferencias significativas, sin embargo, los valores de T_{ic} y T_{fc} también fueron siempre inferiores en plantas E y la diferencia entre ambas temperaturas ($Rango_c$) es mayor, indicando que además de congelar a menor temperatura, el proceso fue más largo.

Tabla III.6. Valores medios (\pm error estándar) y análisis de varianza del pico de transición (P_c), entalpía (ΔH_c), temperatura de inicio de la transición (T_{ic}), temperatura final de la transición (T_{fc}) y diferencia entre temperatura inicial y final ($Rango_c$) en el proceso de congelación en plantas no endurecidas (NE) y endurecidas (E). Niveles de significación: no significativo (ns), (*) $P < 0,05$ y (**) $P < 0,001$.

	Tratamiento	Congelación				
		P_c (°C)	ΔH_c (J/g)	T_{ic} (°C)	T_{fc} (°C)	$Rango_c$ (°C)
Total	NE	-7,61 \pm 0,13	173,98 \pm 2,55	-9,93 \pm 1,06	-16,97 \pm 0,17	7,04 \pm 1,03
	E	-8,54 \pm 0,25	156,88 \pm 2,80	-11,05 \pm 0,35	-17,45 \pm 1,32	8,57 \pm 0,93
Clon		ns	**	ns	ns	ns
Tratamiento		*	**	ns	ns	ns
Clon*Tratamiento		ns	*	ns	ns	ns

A nivel de clon, la T_{ic} en las plantas NE osciló entre -7°C y -12,42°C, mientras que en las plantas E lo hizo entre -10,42°C y -11,83°C. La temperatura del P_c registró temperaturas de -7,13°C a -8,06°C en plantas NE y de -7,75°C a -9,17°C en plantas E. El fin de la transición en las plantas NE se registró entre los -16,40°C y los -17,37°C, y en las E en -11,98°C a -19,12°C (Tabla III.7).

Tabla III.7. Valores medios (\pm error estándar) y análisis de varianza del pico de transición (P_c), entalpía (ΔH_c), temperatura de inicio de la transición (T_{ic}), temperatura final de la transición (T_{fc}) y diferencia entre temperatura inicial y final ($Rango_c$) en el proceso de congelación. Letras distintas muestran diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, plantas no endurecidas (NE) y plantas endurecidas (E). Test de Tukey $P < 0,05$.

Clon	Tratamiento	Congelación				
		P_c ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_c (J/g)	T_{ic} ($^{\circ}\text{C}$)	T_{fc} ($^{\circ}\text{C}$)	$Rango_c$ ($^{\circ}\text{C}$)
F1P3	NE	-7,13 \pm 0,31 a	169,00 \pm 3,55 a	-7,37 \pm 3,92 a	-16,40 \pm 0,25 a	9,03 \pm 3,90 a
	E	-7,75 \pm 0,60 a	159,07 \pm 4,02 a	-10,42 \pm 1,37 a	-18,70 \pm 0,52 b	8,28 \pm 1,76 a
F1P5	NE	-7,38 \pm 0,14 a	173,06 \pm 3,17 a	-7,00 \pm 4,33 a	-17,18 \pm 0,44 a	10,18 \pm 3,99 a
	E	-8,81 \pm 0,77 a	169,73 \pm 3,51 a	-10,82 \pm 0,57 a	-18,57 \pm 0,34 b	7,75 \pm 0,57 a
F2P2	NE	-8,06 \pm 0,39 a	168,43 \pm 6,48 a	-11,33 \pm 0,45 a	-17,37 \pm 0,44 a	6,03 \pm 0,14 a
	E	-9,17 \pm 0,37 a	161,67 \pm 4,86 a	-11,83 \pm 0,37 a	-11,98 \pm 6,50 a	10,98 \pm 4,32 a
F2P5	NE	-7,97 \pm 0,10 a	166,17 \pm 3,37 a	-12,42 \pm 0,11 a	-16,78 \pm 0,34 a	4,37 \pm 0,40 a
	E	-7,99 \pm 0,45 a	135,62 \pm 2,25 b	-10,75 \pm 0,82 a	-18,90 \pm 0,44 b	8,15 \pm 1,15 b
F5P1	NE	-7,50 \pm 0,22 a	190,34 \pm 4,65 a	-10,89 \pm 0,36 a	-17,13 \pm 0,37 a	6,24 \pm 0,46 a
	E	-8,97 \pm 0,40 b	158,32 \pm 6,39 b	-11,43 \pm 0,54 a	-19,12 \pm 0,35 b	7,68 \pm 0,37 b

Proceso de Descongelación

El análisis de varianza en el proceso de descongelación (Tabla III.8) fue significativo ($P < 0,05$) por tratamiento para todas las variables. Por clon fueron significativas ($P < 0,05$) la entalpía del pico de descongelación (ΔH_d) y el la temperatura de finalización de dicha transición (T_{fd}). Solo hubo interacción Clon*Tratamiento significativa en la ΔH_d .

Tabla III.8. Valores medios (\pm error estándar) y análisis de varianza del pico de transición (P_d), entalpía (ΔH_d), temperatura de inicio de la transición (T_{id}), temperatura final de la transición (T_{fd}) y diferencia entre temperatura inicial y final ($Rango_d$) en el proceso de congelación en plantas no endurecidas (NE) y endurecidas (E). Niveles de significación: no significativo (ns), (*) $P < 0,05$ y (**) $P < 0,001$.

	Tratamiento	Descongelación				
		P_c (°C)	ΔH_c (J/g)	T_{ic} (°C)	T_{fc} (°C)	$Rango_c$ (°C)
Total	NE	-3,26 \pm 0,04	169,85 \pm 2,67	-7,60 \pm 0,17	3,25 \pm 0,07	10,85 \pm 0,19
	E	-3,99 \pm 0,10	158,28 \pm 2,85	-10,96 \pm 0,23	2,79 \pm 0,12	13,75 \pm 0,25
Clon		ns	**	ns	*	ns
Tratamiento		**	*	**	*	**
Clon*Tratamiento		ns	*	ns	ns	ns

En las plantas NE el inicio de la descongelación (T_{id}) comenzó entre -8,2°C y -6,88°C, en las E entre -9,93°C y -11,67°C. La temperatura del P_d registró temperaturas de -3,05°C a -3,37°C y de -3,66°C a -4,32°C en plantas NE y E, respectivamente. El fin de la transición (T_{fd}) en las plantas NE se registró entre los 2,88°C y los 3,59°C y en las E de 2,50°C a 3,10°C (Tabla III.9).

Tabla III.9. Valores medios (\pm error estándar) y análisis de varianza del pico de transición (P_d), entalpía (ΔH_d), temperatura de inicio de la transición (T_{id}), temperatura final de la transición (T_{fd}) y diferencia entre temperatura inicial y final ($Rango_d$) en el proceso de descongelación. Letras distintas muestran diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, plantas no endurecidas (NE) y plantas endurecidas (E). Test de Tukey $P < 0,05$.

Clon	Tratamiento	Descongelación				
		P_d (°C)	ΔH_d (J/g)	T_{id} (°C)	T_{fd} (°C)	$Rango_d$ (°C)
F1P3	NE	-3,37 \pm 0,09 a	161,43 \pm 3,71 a	-7,43 \pm 0,40 a	3,27 \pm 0,16 a	10,70 \pm 0,53 a
	E	-3,93 \pm 0,10 b	158,37 \pm 3,46 a	-9,93 \pm 0,46 b	2,83 \pm 0,23 a	12,77 \pm 0,62 b
F1P5	NE	-3,05 \pm 0,06 a	171,68 \pm 3,25 a	-6,88 \pm 0,26 a	3,36 \pm 0,11 a	10,24 \pm 0,29 a
	E	-3,66 \pm 0,07 b	171,68 \pm 3,15 a	-11,03 \pm 0,52 b	3,10 \pm 0,14 a	14,13 \pm 0,57 b
F2P2	NE	-3,36 \pm 0,05 a	166,10 \pm 6,10 a	-8,20 \pm 0,38 a	3,13 \pm 0,11 a	11,33 \pm 0,36 a
	E	-4,10 \pm 0,17 b	162,20 \pm 6,11 a	-10,80 \pm 0,22 b	2,52 \pm 0,22 b	13,32 \pm 0,32 b
F2P5	NE	-3,34 \pm 0,11 a	161,52 \pm 3,68 a	-7,42 \pm 0,37 a	2,88 \pm 0,09 a	10,30 \pm 0,30 a
	E	-3,96 \pm 0,34 a	139,10 \pm 2,34 b	-11,67 \pm 0,36 b	2,50 \pm 0,21 a	14,17 \pm 0,24 b
F5P1	NE	-3,15 \pm 0,08 a	186,10 \pm 5,47 a	-7,90 \pm 0,30 a	3,59 \pm 0,16 a	11,49 \pm 0,37 a
	E	-4,32 \pm 0,31 b	160,03 \pm 7,61 b	-11,37 \pm 0,77 b	2,98 \pm 0,40 a	14,35 \pm 0,75 b

2.5. Distribución de agua en las acículas

Con los valores de entalpía de descongelación obtenidos a partir de las curvas CBD se calculó el contenido de agua congelable (AC).

El AC presentó diferencias significativas ($P < 0,05$) por clon y tratamiento, mientras que el ANC y el AT sólo presentaron diferencias significativas por tratamiento. Ninguna de las 3 variables fue significativa en la interacción Clon*Tratamiento (Tabla III.10).

El efecto del endurecimiento mediante restricción hídrica provocó una disminución media de $0,46 \text{ g agua g}^{-1}\text{PS}$ en el AC y $0,23 \text{ g agua g}^{-1}\text{PS}$ en el ANC respecto a las plantas bien hidratadas.

Tabla III.10. Valores medios (\pm error estándar) del agua congelable (AC), del agua no congelable (ANC) y del agua total (AT) en plantas no endurecidas (NE) y endurecidas (E) en todas las temperaturas ensayadas. Niveles de significación: no significativo (ns), (*) $P < 0,05$ y (**) $P < 0,001$.

	Tratamiento	AC (g H ₂ O/g PS)	ANC(g H ₂ O/g PS)	AT(g H ₂ O/g PS)
Total	NE	2,04 \pm 0,09	0,95 \pm 0,05	2,99 \pm 0,13
	E	1,58 \pm 0,07	0,72 \pm 0,04	2,31 \pm 0,10
Clon		**	ns	*
Tratamiento		**	*	**
Clon*Tratamiento		ns	ns	ns

En la Figura III.4 se representan las distintas fracciones de agua analizadas por clon y tratamiento, aunque los valores de las diferentes formas de encontrarse el agua fueron siempre superiores en las plantas NE, las diferencias fueron significativas ($P < 0,05$) en AC para los clones F2P5 y F5P1. Ningún clon fue significativo para el ANC. En el AT mostraron diferencias significativas F1P3, F2P5 y F5P1. Se observó también que, la cantidad de AC fue mayor que la de ANC para todos los clones y en los dos tratamientos evaluados.

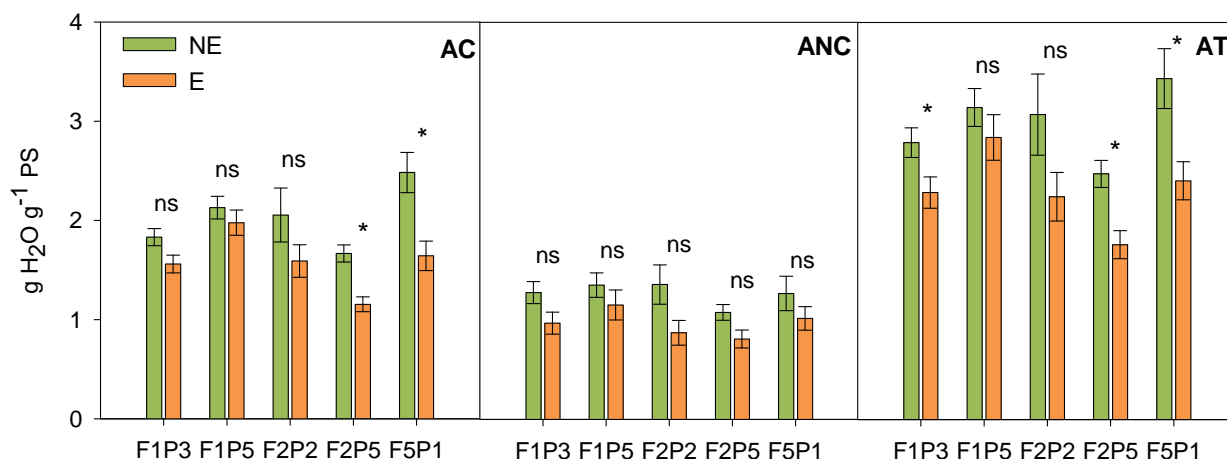


Figura III.4. Valores medios (\pm error estándar) del agua congelable (AC), agua no congelable (ANC) y agua total (AT) de acículas de plantas no endurecidas (NE) y endurecidas (E). Niveles de significación: no significativo (ns), (*) $P < 0,05$ y (**) $P < 0,001$.

2.6. Relación entre los indicadores de tolerancia a frío y las variables térmicas obtenidas por CBD

De las variables obtenidas en el proceso de congelación, únicamente P_c se correlacionó de manera significativa ($P < 0,05$) con I_d (-12°C). En descongelación, por el contrario, todas las variables se correlacionaron con este indicador. Respecto al otro indicador de tolerancia, TL_{50} , independientemente de cómo se calcule, solo se observó una correlación significativa con T_{fc} . Para el resto de variables, tanto de congelación como de descongelación, los coeficientes de Pearson fueron siempre superiores para la TL_{50} (X), aunque como ya hemos dicho, de forma no significativa (Tabla III.11).

Tabla III.11. Coeficientes de correlación de Pearson entre el Índice de daño (I_d), temperatura letal media ($TL_{50}(X_0)$) y temperatura letal media estimada ($TL_{50}(X)$) con las variables obtenidas en las curvas CBD de congelación y descongelación: temperatura de los picos de transición de congelación y descongelación (P_c y P_d), entalpía de congelación y descongelación (ΔH_c y ΔH_d), temperatura inicial de congelación y descongelación (T_{ic} y T_{id}), temperatura final de congelación y descongelación (T_{fc} y T_{fd}) y rango de congelación y descongelación ($Rango_c$ y $Rango_d$). Niveles de significación: (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$.

	Congelación					Descongelación				
	P_c	ΔH_c	T_{ic}	T_{fc}	$Rango_c$	P_d	ΔH_d	T_{id}	T_{fd}	$Rango_d$
$I_d (-12^\circ\text{C})$	0,67(*)	0,46	0,52	0,20	-0,22	0,76(*)	0,39	0,77(*)	0,72(*)	-0,72(*)
$TL_{50}(X_0)$	0,06	0,22	-0,02	-0,82(**)	-0,54	0,13	0,27	-0,04	0,49	0,15
$TL_{50}(X)$	0,59	0,30	0,23	-0,73(*)	-0,60	0,46	0,23	0,48	0,61	-0,42

2.7. Relación entre los tipos de agua estimados mediante CBD y las variables indicadoras del estatus hídrico

Los 3 tipos de agua se correlacionaron de manera significativa ($P < 0,05$) con el Ψ_{π} , el $\Psi_{\pi 100}$ y con el contenido en prolina ($P < 0,01$). Además el ANC se correlacionó con el Ψ_h ($P < 0,05$). Sin embargo, al igual que ocurría con los indicadores de tolerancia a frío no parece existir una correlación de estas variables con el contenido de ABA (Tabla III.11)

Tabla III.12. Coeficientes de correlación de Pearson entre el agua congelable (AC), el agua no congelable (ANC) y el agua total (AT) con el potencial hídrico (Ψ_h), contenido hídrico foliar (CHF), potencial osmótico (Ψ_{π}), potencial osmótico a plena turgencia ($\Psi_{\pi 100}$), contenido en prolina y ácido abscísico (ABA). Niveles de significación: (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$.

	Ψ_h	Ψ_{π}	$\Psi_{\pi 100}$	Prolina	ABA
AC	0,52	0,74(*)	0,70(*)	-0,77(**)	0,11
ANC	0,76(*)	0,68(*)	0,73(*)	-0,81(**)	-0,08
AT	0,61	0,75(*)	0,73(*)	-0,80(**)	0,06

En la Figura III.5 se destacan las relaciones existentes entre el AC, el ANC y el AT con el CHF. Esta relación resultó significativa ($P < 0,01$) en los 3 casos y con una alto grado de correlación.

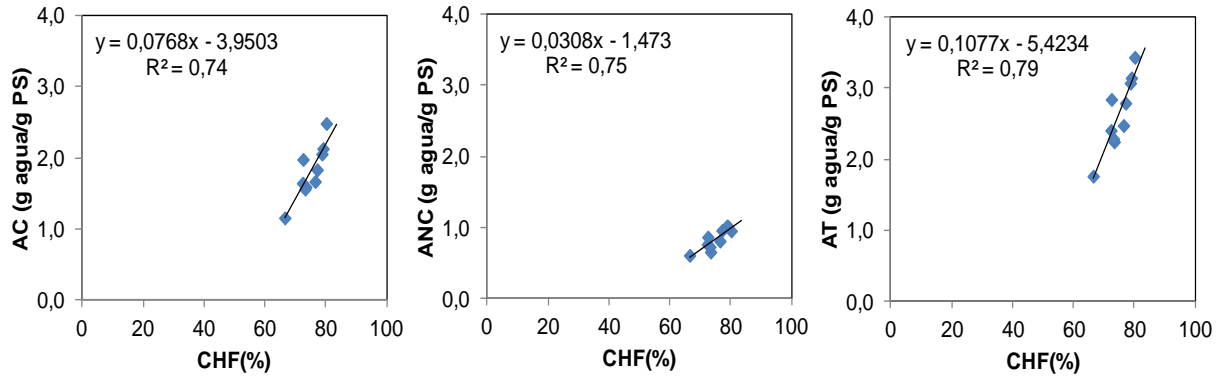


Figura III.5. Relación lineal entre el agua congelable (AC), el agua no congelable (ANC) y el agua total (AT) con el contenido hídrico foliar (CHF).

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN

El endurecimiento a través de riego deficitario mostró un claro efecto sobre la tolerancia al frío pues se puede apreciar que paralelamente a la disminución en el Ψ_h , CHF, Ψ_{π} y $\Psi_{\pi 100}$ (Tablas III.1 y III.2) observada en las plantas sometidas a estrés hídrico, se apreció un menor porcentaje de daño a nivel celular dado por el valor del I_d (Tabla III.3 y Figura III.1). Este hecho demuestra claramente el efecto y la importancia que tiene el estado hídrico de las plantas frente a una helada (Maldonado *et al.* 1997 y da Silva *et al.* 2008). Por tanto, en base a los resultados obtenidos en este estudio y, como se ha observado en otros trabajos como los realizados por Turchetti (2011) en olivo, podemos decir que el tratamiento aplicado incide en la respuesta de los tejidos a las bajas temperaturas, y que la tolerancia al frío no es entonces una condición estática, sino que se ve afectada por los factores ya mencionados, potencial hídrico, contenido hídrico de los tejidos y ajuste osmótico.

Sin embargo, la respuesta no siempre es homogénea en todos los materiales genéticos. Así como nos encontramos que no todos los clones respondieron por igual al estrés hídrico al que fueron sometidos, aun cuando la disponibilidad de agua se trató de uniformizar, su respuesta a la congelación tampoco fue homogénea. En el ensayo de estrés hídrico se observó que el clon que mostraba una mayor adaptación a la sequía era el F2P2 (Baizán, 2011). En este caso, los valores del I_d a la temperatura crítica de -12°C (Figura III.2) mostraron que, en las plantas NE este clon era también el que menor porcentaje de daño mostraba y, por tanto, el que mayor tolerancia al frío tuvo. En las plantas E se observó que F2P2 seguía siendo el clon más tolerante al frío y además, el único que no superó el 50% de daños en sus tejidos. La mayor sensibilidad a las bajas temperaturas en planta NE la presentó F1P5, sin embargo, pasa a ser de los más tolerantes tras el estrés hídrico (Figura III.2) lo cual estaría relacionado con su capacidad de acumular osmolitos protectores como la prolina, ya que se observó que en el muestreo del mediodía el contenido de este aminoácido se triplicó (Tabla III.2). El clon más sensible al frío tras el tratamiento de endurecimiento fue F5P1 lo cual podría deberse a que el tratamiento de endurecimiento para este clon podría haber sido menos eficiente, pues al ser un material con crecimiento muy limitado y, por tanto, con un bajo consumo de agua, se comportó en el tratamiento de estrés hídrico de forma muy similar al control sin

estrés, no llegando a modificar el crecimiento, ni la acumulación de prolina, etc. (Baizán, 2011).

Las plantas que son resistentes o tolerantes a un factor de estrés, lo suelen ser para el resto de los estreses abióticos, e incluso bióticos, pues uno de los aspectos fundamentales de la tolerancia a nivel tisular se centra en mantener el agua útil para los tejidos. El estrés medioambiental se puede presentar de muchas formas, no obstante, su efecto suele converger en un déficit hídrico (Bohnert *et al.* 1995).

Una vez obtenidos los datos del I_d a distintas temperaturas de congelación se utilizaron diferentes ajustes de regresión no lineal como el modelo sigmoideo, el logístico y el de Gompertz (Burr *et al.* 1990; Lim *et al.* 1998; Lindén, 2000; Mancuso, 2002; Fiorino y Mancuso, 2000; Barranco *et al.* 2005; Turchetti, 2011) para valorar el efecto de la bajada de temperatura en la liberación de electrolitos y con ello estimar la tolerancia al frío. Estos modelos dan lugar a diferentes ecuaciones cuyos parámetros definen datos de interés tales como el TL_{50} dado por el punto de inflexión (X_0).

Lindén (2002) concluyó que, teniendo en cuenta estudios anteriores y los resultados de su propio estudio, la función de Gompertz era la más adecuada para el ajuste de las curvas del I_d calculado con el método de liberación de electrolitos. Sin embargo, en este estudio, utilizando este modelo sólo dos clones, F2P2 y F1P3, mostraron valores más bajos de TL_{50} en planta E (datos no mostrados) y, por el contrario, siguiendo el modelo sigmoideo, utilizado por otros autores para esta especie (Climent *et al.* 2009), se obtuvieron mejores resultados (Tabla III.4).

La elección del modelo de ajuste no es algo que esté muy establecido y así en trabajos previos como los de Lim *et al.* (1998), donde se comparaban las funciones de Gompertz y Richard se concluye que aunque se consigue mejor ajuste con la primera, ambas se correlacionan igual con TL_{50} visual. En este trabajo, al realizar los ajustes mediante el modelo seleccionado, se observó que el valor

obtenido para TL_{50} no se adecuaba a lo esperado, ya que a pesar de que los valores de I_d disminuían en plantas E frente a NE para todos los clones, los valores de TL_{50} no lo hacían, o lo hacían en muy baja proporción.

Por definición, TL_{50} es aquel valor de la abscisa que se corresponde con el punto de inflexión de la curva, pero en curvas como las aquí obtenidas y las de otros estudios como los realizados por Climent *et al.* (2009), en donde las curvas para esta misma especie, *Pinus pinaster* y otras coníferas como *Pinus nigra* y *Pinus sylvestris*, tampoco llegaron al valor de I_d del 100%, el punto de inflexión no se corresponde con un I_d del 50%. Por ésta razón, y apoyándonos en los estudios de Arora *et al.* (1992), Grossnickle, (1992); Boorse *et al.* (1998) y Climent *et al.* (2009), se decidió realizar otro cálculo en el que se despejó de la ecuación de la curva la temperatura correspondiente a un I_d del 50%. Utilizando éste método todos los clones mostraron en las plantas E un TL_{50} más bajo que en NE.

En todos estos análisis, aunque los valores de este indicador variaron de un modelo a otro, se confirmó la mayor tolerancia al frío de F2P2 E, que ya fue observada en los resultados del I_d , sin embargo, se puso de manifiesto que este protocolo no es adecuado para la valoración del TL_{50} en este tipo de estudios. En estos resultados parecen influir los cambios fisiológicos que muestran las plantas endurecidas ante la disminución del contenido hídrico (Turchetti, 2011). En estudios realizados en olivo se observaron valores de TL_{50} más bajos que las plantas sometidas a un estrés leve (entre -1 MPa y -1,5 MPa). Sin embargo, para un mayor estrés (-2,5 MPa), sí que observó una disminución del TL_{50} con el tratamiento, lo que sugiere que el nivel de estrés aplicado en nuestro caso podría no haber sido el suficiente.

En tejidos de plantas leñosas, la liberación de electrolitos puede variar sustancialmente de acuerdo con las especies evaluadas (Bengtsson, 2007) y el estado fisiológico de la planta influye de manera notable en los resultados. En consecuencia, Sutinen *et al.* (1992), proponen estimar el nivel crítico de liberación de electrolitos como la media aritmética entre el porcentaje de I_d máximo y mínimo. De

esta manera la temperatura de letalidad basada en el punto medio de liberación de electrolitos predice la resistencia a estrés en coníferas como *Pinus resinosa* y *Pinus nigra*. Sin embargo, en el presente estudio, los resultados obtenidos fueron similares a los que se obtienen con el modelo sigmoideo (datos no mostrados), ya que no corrige el problema asociado al máximo. En el trabajo realizado en guayaba por Hao *et al.* (2009) con este método (Sutinen *et al.* 1992), se observó que las plantas no aclimatadas y aclimatadas a frío no mostraron diferencias significativas en la tolerancia a la congelación a pesar de observar que el I_d exhibía valores significativamente menores en aclimatadas en la mayoría de temperaturas ensayadas. En nuestro caso habría ocurrido lo mismo de tal forma que en muchas ocasiones parece que TL_{50} , por sí solo, no puede ser un indicador fiable para distinguir pequeñas diferencias en la tolerancia a la congelación de los tejidos, cuando las plantas se han modificado fisiológicamente.

En este sentido von Fircks (1994) sugirió que el índice de resistencia más válido sería el punto en el que está situado el umbral de daño irreversible de congelación, debido a que observó la recuperación de las plantas en temperaturas por debajo del punto de inflexión, por lo que este índice no deja de ser un umbral dudoso.

En la imprecisión del TL_{50} podrían intervenir también causas de tipo metodológico, intrínsecas al tipo de muestra. Así, Lindén (2002) observó que el ajuste de las curvas del I_d en plantas leñosas aclimatadas resulta difícil por la escasa cantidad de electrolitos liberados a partir de las muestras. Este hecho también fue puesto de manifiesto en otros trabajos (Sutinen *et al.* 1992; Anisko y Lindstrom, 1995; Deans *et al.* 1995; Repo *et al.* 1996). En alguno de ellos (Deans *et al.* 1995) se sugiere que los cambios en la técnica de ensayo, tales como un período más largo de incubación y de choque térmico, podrían mejorar la liberación de electrolitos y la calidad de los datos. Por su parte Lindén (2002) indicó que en su estudio habría sido beneficioso aumentar el número de temperaturas de ensayo en la parte crítica de la curva. Todos los cambios metodológicos, tales como una exposición más larga a cada temperatura, un proceso de descongelación controlado a una velocidad

constante o el incremento del número de temperaturas ensayadas pueden alterar la forma de las curvas y, la mejora en el ajuste de la misma, repercutir en los resultados obtenidos. No obstante, aunque prácticamente todo lo anteriormente expuesto es aplicable a nuestro caso y podría redundar en un beneficio, no siempre es factible pues implicaría una puesta a punto metodológica por cada tipo de muestra, lo cual, además de ser muy laborioso, implicaría la introducción de otras variables que complicarían la interpretación de las diferencias encontradas entre materiales y tratamientos.

Sin olvidar toda la problemática descrita en torno a este índice, pero teniendo en cuenta que sea cual sea la metodología empleada para su cálculo el rango de temperaturas que obtenemos es muy similar, lo que más puede sorprender de nuestros resultados son los valores en que nos movemos. Para nuestros materiales la tolerancia al frío según este indicador, osciló entre $-8,60^{\circ}\text{C}$ y $-12,60^{\circ}\text{C}$ en plantas E (Tabla III.4).

Se han publicado pocos trabajos sobre la tolerancia al frío de *P. pinaster* pero en algunos de ellos (Climent *et al.* 2009), trabajando con la procedencia Montes de Guadarrama, se describen valores para este índice que alcanzan los -19°C . Corcuera *et al.* (2011) comparando cuatro procedencias de esta especie encontró valores de TL_{50} en acículas que diferían según la temperatura media mínima del mes más frío, siendo la procedencia Oria la que presentaba menor tolerancia, con un valor de TL_{50} de -24°C .

A pesar de que el material evaluado en este estudio, de procedencia Oria, parece ser el más sensible, nuestros valores de TL_{50} se alejan mucho de los obtenidos por estos autores. Estas diferencias observadas se deben a que los ensayos de este estudio se realizaron en cámara de cultivo con condiciones controladas de humedad y temperatura, que difieren mucho de las que se dan en condiciones naturales. Sin embargo, estos resultados permiten concluir que, aun cuando se trate de efectuar un endurecimiento forzado de la planta a través de la

restricción hídrica, las condiciones ambientales en que crece el material son fundamentales para que lleguen a ser más o menos tolerante.

La adscripción de un valor LT_{50} a una especie, procedencia o clon puede ser difícil debido a que es un valor que depende tanto del tipo de material vegetal (tejidos foliares, radicales, etc.), como del método de endurecimiento aplicado, así como de factores más fisiológicos como pueda ser la edad de la planta (Fontanazza y Preziosi, 1969) o el estatus hídrico. Esto último, en la que se basa nuestra hipótesis de trabajo, es lo que condiciona que se observase correlación entre factores como el valor de I_d a -12°C y variables relacionadas con éste estado de hidratación, como el CHF, el ajuste osmótico, o el $\Psi_{\pi 100}$ (Tabla III.5). En ese estatus hídrico no sólo es importante la cantidad de agua que tengan en los tejidos si no el cómo la tengan. Así, las plantas con menor contenido de agua y mayor capacidad de ajuste osmótico serían menos susceptibles de sufrir daños por bajas temperaturas.

La relación directa entre el estrés hídrico, de la planta durante un período determinado, y el aumento de la tolerancia al frío (Maldonado *et al.* 1997; da Silva *et al.* 2008; Turchetti, 2011) posiblemente sea un hecho natural. El déficit de agua cumple una función de remplazo del efecto del estrés por frío sobre el endurecimiento de los tejidos que normalmente se logra en zonas con una disminución progresiva de las temperaturas mínimas absolutas (Gómez del Campo *et al.* 2010).

Maldonado *et al.* (1997) sugirieron que, la acumulación en las células de compuestos como la sacarosa y la prolina durante el estrés hídrico, pudieron causar la disminución del TL_{50} al encontrar buenas correlaciones inversas entre estas variables. En este estudio la relación con el Ψ_{π} parece indicarlo, pero no se encontró una correlación significativa con el contenido en prolina. Este hecho puede ser debido a que, éste no sea el osmolito acumulado o quizá por no ser el único, ya que su participación no parece descartable, puesto que el clon más tolerante fue también el que mostró un acúmulo significativo de este compuesto.

En cuanto al control hormonal, el ABA no mostró ninguna correlación con las variables de tolerancia al frío (Tabla III.5). Este hecho podría venir dado por el carácter de marcador rápido y transitorio del estrés que parece tener esta fitohormona y que hizo que su contenido en los tejidos se incrementase cuando se realizó un estrés a corto plazo, pero no cuando este se alargó en el tiempo (Baizán, 2011). Estos resultados coinciden con lo observado por Maldonado *et al.* (1997) en avena, donde tras 48 h de exposición a estrés severo el ABA dejó de acumularse. Por tanto, si el ABA está relacionado con el endurecimiento conseguido en este ensayo, su papel es a corto plazo y no parece actuar directamente en la tolerancia al frío de estos materiales endurecidos.

El endurecimiento conseguido en estos materiales se basa fundamentalmente en la reducción del agua de los tejidos, pero no solo del total, si no de la forma en que ésta se encuentre. Aunque no se haya encontrado el osmolito responsable, el papel de la prolina no fue descartable y los aminoácidos, tanto la prolina o glicina betaína, como los carbohidratos, como la sacarosa, parecen ser importantes para explicar la mayor tolerancia a frío bajo estrés hídrico, ya que actúan como crioprotectores (Thomas y James, 1993; Xing y Rajashekar, 2000).

En base a la importancia relativa del agua y la forma en que se encuentra, en relación con la tolerancia al frío, y ya que el indicador de uso más extendido, TL₅₀, no fue adecuado en todos los casos, se valoró directamente la cantidad de agua y la forma en que ésta se encuentra en los tejidos. Una de las estrategias más utilizadas para este fin es la técnica de CBD que estima el AC en base a la energía calorífica de congelación o descongelación, y por diferencia con el AT se estima el ANC.

Las curvas obtenidas mediante esta técnica mostraron diferencias sustanciales en función del tratamiento aplicado a las plantas. El ciclo de descongelación registró un sólo pico endotérmico principal, tanto en plantas NE como en E, sin embargo, el ciclo de congelación presentó una estructura más compleja en las plantas E en las que, además del pico principal se registraron varios picos exotérmicos secundarios. La formación de varios picos exotérmicos parece

estar relacionada con la existencia de varios núcleos de cristalización (Swiderski *et al.* 2006), lo cual podría indicar que en las plantas E el agua estuvo más compartimentalizada y se cristalizó en lugares diferentes dentro de los tejidos.

La aparición de varios ciclos exotérmicos fue puesto de manifiesto por otros autores, (Swiderski *et al.* 2006) y se propuso, para poder dar unos resultados precisos de la temperatura del pico de congelación, realizar varios ciclos de congelación/descongelación, para eliminar la formación de estos picos. A partir del segundo ciclo se rompen los tejidos y se utiliza la diferencia entre los máximos de los dos primeros ciclos como indicador de tolerancia a frío para relacionarlo con el test de electrolitos. Otros estudios (Márquez *et al.* 2007) atribuyen la presencia de estos picos secundarios a la velocidad con que se conduce el proceso de congelación/descongelación.

En los materiales evaluados solo se realizó un ciclo de congelación/descongelación, observando que el valor de P_c más bajo correspondió al clon F2P2 en el tratamiento de endurecimiento (Tabla III.7). Estos resultados concuerdan con la mayor tolerancia atribuida a este clon a través del método de liberación de electrolitos (Tabla III.4). Por otro lado, los valores de I_d a -12°C se correlacionaron con esta variable (Tabla III.11) de forma significativa ($P < 0,05$), pero no lo hicieron los dos tipos de cálculo de TL_{50} . Sin embargo, Burr *et al.* (1990) encontraron que se correlaciona con la baja temperatura exotérmica (BTE) obtenida en análisis térmico diferencial (ATD).

En la comparación realizada por Burr *et al.* (1990) entre el método de liberación de electrolitos y el análisis térmico diferencial (ATD) propusieron como más adecuado el primero. Sin embargo, afirma que el ATD tiene como ventajas la velocidad con que se obtienen los resultados, la objetividad de la prueba y que es una técnica no destructiva. También sugiere desventajas pues considera que da una estimación excesivamente conservadora, proporcionando sólo una evaluación general de la resistencia al frío debido a la gran variabilidad de los datos y la dificultad de calibrar con precisión el método.

En nuestra opinión el método CBD presenta otras ventajas como es la aportación de más información en torno a la muestra, ya que a través de las variables obtenidas en las curvas de CBD se puede calcular la cantidad de agua en el tejido y la forma en que ésta se encuentra. Además, el perfil de la curva indica de forma cualitativa, la compartimentación de la misma, y, a partir de la entalpía de congelación/descongelación se puede estimar la cantidad de AC (Repo *et al.* 2008).

En base a las correlaciones entre la variable I_d a -12°C y las obtenidas de las curvas CBD los resultados indican que fueron las variables de descongelación las que mejor representaron el estatus de tolerancia al frío, debido a que fueron las variables que se correlacionaron de forma significativa. Por otro lado, otro dato que apoya esta elección fue que todas las variables obtenidas en la curva de descongelación separaron los materiales por tratamientos (Tabla III.8) mientras que las de congelación solo lo hicieron para la ΔH_c y el P_c (Tabla III.6). Entre clones solo aparecieron diferencias significativas para la ΔH_c (Tabla III.6) y, sin embargo, en descongelación, también se separó por el valor de T_{fc} (Tabla III.8). El análisis clon a clon mostró que, de todas las variables analizadas en la curva de congelación, la que mejor separó los tratamientos fue también T_{fc} (Tabla III.7), aunque curiosamente el clon para el que no mostró diferencias significativas fue el F2P2. Dentro de los parámetros obtenidos de la curva de descongelación fueron los valores de T_{id} y el $Rango_d$ los que separaron los tratamientos para todos los clones (Tabla III.9) si bien, en este caso, todas las variables mostraron diferencias entre tratamientos para varios de ellos, en base a lo cual se seleccionó la ΔH_d para calcular la cantidad de AC, tal y como también proponen otros autores (Li *et al.* 2005; Kolzac *et al.* 2007; Repo *et al.* 2008).

Los datos de AC, obtenidos a partir de la entalpía, diferenciaron tanto los tratamientos como los clones, al igual que ocurrió con el AT (Tabla III.10), sin embargo el ANC se diferenció solo entre tratamientos lo cual es lógico ya que se trata de un agua estructural que debería de ser muy poco variable por lo que solo con un tratamiento de estrés prolongado como el nuestro se consigue modificarla. Analizados clon a clon estas diferencias en AC solo fueron significativas para el

tratamiento en dos de ellos (Figura III.4) pero sus valores se correlacionan de forma significativa con todos los parámetros osmóticos valorados en estos tejidos (Tabla III.12). Respecto al ANC, curiosamente, esta correlación fue significativa tanto con los parámetros hídricos como osmóticos. Resulta sorprendente, que a pesar de ser tan poco variable se correlacionó significativamente con los parámetros osmóticos, e incluso con el contenido en prolina y parece indicar que esta fracción del agua está también condicionada por la presencia de osmóticos.

Destacamos la relación obtenida entre los distintos tipos de agua y el CHF (Figura III.5) para poner de manifiesto la eficacia de este sistema de medida indirecta del agua a partir de la entalpía ya que aunque los muestreos se realizaron con un mes de intervalo, lo que justifica que la correlación entre AT y CHF sea 0,79, se mantiene una correlación aceptable y una distribución lógica del AC y ANC. Durante este periodo de tiempo las plantas se mantuvieron reponiendo el agua consumida de forma que se mantenía el nivel de estrés adquirido y estos datos así lo corroboran.

da Silva *et al.* (2008) observó que los daños producidos por heladas están directamente relacionados con la disponibilidad hídrica en el suelo, de manera que un menor contenido hídrico del suelo afecta al contenido hídrico de los tejidos y aumenta la concentración de solutos a nivel celular, afectando directamente al punto de congelación. Los resultados de este trabajo corroboran esta observación pues se confirmó que el tratamiento de estrés hídrico aplicado sólo al sustrato, que modificó de forma significativa los parámetros hídricos y osmóticos de las acículas también modificó las variables obtenidas en la curva de congelación/descongelación y concretamente el valor de P_c adquiriendo esta variable el valor más bajo en el clon F2P2 sometido a endurecimiento (Tabla III.7).

Los valores del P_c obtenidos para los diferentes clones y tratamientos son muy similares a los valores de LT_{50} obtenidos a partir de los termogramas del método de cuantificación de electrolitos. No obstante creemos que presenta una serie de ventajas con respecto a los dos LT_{50} como es el hecho de ajustarse más a lo

esperado, valores más negativos en la planta endurecida; mostrar el menor valor en el clon que se supone más tolerante, F2P2 endurecido, y una correlación significativa con el I_d a -12°C , seleccionado previamente como temperatura más representativa en el método de cuantificación de electrolitos. El procedimiento para la obtención de este parámetro también tiene a su favor una mayor simplicidad en la medida, menor procesado de la muestra y por tanto una mayor rapidez para la obtención de los datos. El hándicap mayor que encontramos en nuestro caso es la ausencia de separación por tratamientos a nivel de clon individual la cual podría deberse a una imprecisión de la toma del mismo que quizá se subsanase repitiendo el ciclo de congelación/descongelación tal y como recomiendan Swiderski *et al.* (2006). Esta alternativa incrementaría ligeramente el tiempo necesario para la obtención de cada dato por lo que pensamos que ya que el valor de P_d nos separa 4 de los 5 clones y se obtiene con el primer ciclo podría ser la variable más idónea, aunque quizá menos intuitiva, pues sus valores discrepan mucho de los del TL_{50} que acostumbramos a usar.

Los resultados obtenidos por Swiderski *et al.* (2006) utilizando el método calorimétrico (CDB) y el de conductividad (liberación de electrolitos) ya mostraron una buena correlación entre ambos. Pero además obtuvo que el primero de ellos, el CDB, cuando se repitieron varios ciclos de congelación descongelación dio una información relevante sobre la dinámica de la estructura de daño en dichos tejidos, proporcionando más información acerca de la resistencia de la planta a las bajas temperaturas.

Por otra parte Márquez *et al.* (2007) mostraron que con distintas rampas de temperatura se modificaron las curvas de CBD pudiendo hacer desaparecer los picos secundarios al modificar la velocidad de enfriamiento. Este hecho que se suele utilizar tan solo como puesta a punto de la metodología, y que en este trabajo se utilizó en este sentido (datos no mostrados), podría suministrar, sin embargo, una información añadida de la forma de encontrarse el agua en el tejido y por ello pensamos que esta técnica podría permitir obtener unas características más completas de las plantas estudiadas y la posibilidad de caracterizar, dentro de una

misma especie, las más tolerantes. No obstante, también somos conscientes que dicha información requiere de un estudio más exhaustivo de toda la información suministrada por este equipo.

Pero además el conocimiento sobre el papel del agua y, sobre todo, de los tipos de agua que hay en los tejidos, en la tolerancia al frío no está aún lo suficientemente esclarecido. La hipótesis más tradicional relacionaba el contenido hídrico con la mayor o menor tendencia a la formación de cristales de agua que dañarían las estructuras celulares.. Actualmente se propone que la formación de cristales tiene lugar en el apoplasto fundamentalmente y que, por tanto, se trata más de un efecto de deshidratación de la célula más que de rotura. Esta última teoría pensamos afecta más a la validez de los datos obtenidos mediante la técnica de medida de electrolitos que a los de la técnica CBD.

Desvelar el papel del agua y las distintas formas en que se encuentra resulta de sumo interés pues se sabe que en la naturaleza existe un sistema de integración múltiple que es el que le permite a la planta adaptarse a un entorno cambiante que cada día es más acusado (Ensminger *et al.* 2000). Posiblemente la selección hizo que las respuestas directas de las plantas a cada factor fueran reemplazadas por rutas de percepción/transducción de señales que permitieran soportar el estrés de forma más barata y eficiente, incrementando la eficacia biológica de las especies (Leshem *et al.* 1998).

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

1. Se puede incrementar la tolerancia al frío, en planta clonal juvenil de *P. pinaster*, mediante un tratamiento de estrés hídrico que condicione el estatus hídrico de los tejidos.
2. Se presume un papel importante del ajuste osmótico como crioprotector dada la correlación encontrada entre los indicadores osmóticos y la tolerancia al frío de estos materiales. La prolina parece jugar un papel en el endurecimiento, aunque quizá no sea el osmolito más importante.
3. Existe variabilidad en la respuesta al endurecimiento debida al genotipo siendo el clon F2P2 el que muestra mayor tolerancia y mejor respuesta.
4. La variable TL_{50} no es un buen indicador de tolerancia al frío cuando las plantas han sido alteradas fisiológicamente para incrementar la resistencia a bajas temperaturas.
5. La CBD es una técnica rápida, no destructiva y fiable que sirve para determinar el estado hídrico de los tejidos vegetales, por lo que su utilización en ensayos de tolerancia al frío parece apropiada y recomendable.

CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA

ANISKO T., LINDSTROM O.M. (1995). *Applying the Richards function in freezing tolerance determination with electrolyte and phenolic leakage techniques*. *Physiologia Plantarum* 95: 281-287.

ARORA R., WISNIEWSKI M., SCORZA R. (1992). *Cold acclimation in genetically related (sibling) deciduous and evergreen peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. 1. Seasonal changes in cold hardiness and polypeptides of bark and xylem tissues*. *Plant Physiology* 99: 1562-1568.

BAIZÁN S. (2011). *Mecanismos de respuesta de plantas juveniles de *Pinus pinaster* Ait. de procedencia Oria al estrés hídrico*. Proyecto de Fin de Carrera. Escuela Politécnica de Mieres. 50 págs.

BARRANCO D., RUIZ N., (2005). *Frost Tolerance of Eight Olive Cultivars*. *HortScience* 40(3): 558-560.

BATES L., WALDREN R. P., TEARE I.D. (1973). *Rapid determination of free proline for water stress studies*. *Plant Soil* 39: 205-207.

BENGTSSON S. (2007). *Frost hardiness of some New Zealand shrubs*. Master project in the Horticultural Science programme; 2007-1. Swedish University of Agricultural Sciences (Sveriges Lantbruksuniversitet, SLU). Faculty of Landscape planning, Horticulture and Agricultural Science Department of Horticulture. 74 págs.

BOHNERT H.J, NELSON D.E, JENSEN R.G. (1995). *Adaptations to Environmental Stresses*. *The Plant Cell* 7 (7):1099–1111.

BOORSE G.C., BOSMA T.L., MEYER A.C., EWERS F.W., DAVIS S.D. (1998). *Comparative methods of estimating freezing temperatures and freezing injury in leaves of chaparral shrubs*. *International Journal of Plant Science* 159: 513-521.

BOYER J.S. (1982). *Plant productivity and environment*. *Science* 218: 443-448.

BURR K.E., TINUS R.W., WALLNER S.J., KING R.M. (1990). *Comparison of three cold hardiness tests conifer seedlings*. *Tree Physiology* 6: 351-369.

CHARRA-VASKOU K., CHARRIER G., WORTEMANN., BEIKIRCHER B., COCHARD H., THIERRY AMEGLIO., STEFAN M. (2012). *Drought and frost resistance of trees: a comparison of four species at different sites and altitudes*. Annals of Forest Science 69: 325 – 333.

CLIMENT J., COSTA E SILVA F., CHAMBEL M.R., PARDOS M., ALMEIDA M.H. (2009). *Freezing injury in primary and secondary needles of Mediterranean pine species of contrasting ecological niches*. Annals of Forest Science. 66 (4): 407-415.

COLOMBO S.J., WEBB, D.P., GLERUM C. (1984). *Frost hardiness testing: An operational manual for use with Extended Greenhouse Culture*. Ontario Ministry of Natural Resources. Forest Research Report 110: 14 págs.

CORCUERA L., GIL-PELEGRIN E., NOTIVO E. (2011). *Intraspecific Variation in Pinus pinaster PSII Photochemical Efficiency in Response to Winter Stress and Freezing Temperatures*. PLoS ONE 6 (12): e28772. Doi:10.1371/journal.pone.0028772.

DA SILVA E.P., ROCCA G., FERNANDES J.L., DALMAGO G.A., PASINATO A. (2008). *Fatores abióticos envolvidos na tolerância de trigo à geadas*. Departamento Hidráulica. Gobierno de San Juan. 2007. Relevamiento Agrícola en la Provincia de San Juan. Ciclo 2006-2007.

DEANS J.D., BILLINGTON H.L., HARVEY F. (1995). *Assessment of frost damage to leafless stem tissues of Quercus petraea: A reappraisal of the method of relative conductivity*. Forestry 68: 25-34.

DEXTER S.T., TOTTINGHAM W.E., GRABER L.F. (1930). *Preliminary results in measuring the hardiness of plants*. Plant Physiology 5: 215-223.

DOBREV P.I., KAMÍNEK M. (2002). *Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid their purification using mixed-mode solid-phase extraction*. Journal of Chromatography A 950: 21-29.

ENSMINGER I., XYLÄNDER M., HAGEN C., BRAUNE W. (2000). *Strategies providing success in a variable habitat: II. Ecophysiology of photosynthesis of Cladophora glomerata*. Plant, Cell and Environment. 23:1129-1136.

FIORINO P., MANCUSO S. (2000). *Differential thermal analysis, supercooling and cell viability in organs of Olea europea at subzero temperatures*. Advances in Horticultural Science 14: 23-27.

FIRCKS H.A. VON (1994). *Frost resistance in Salix*. D. Ph. Tesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Ecology and Environmental Research 67: 1-78.

FLINT H.L., BOYCE B.R., BEATTIE D.J. (1967). *Index of injury – a useful expression of freezing injury to plant tissues as determined by electrolytic method*. Canadian Journal of Plant Science. 47: 229–230.

FONTANAZZA G., PREZIOSI P. (1969). *L'Olivo e le basse temperatura. Osservazioni su 37 cultivar da olio e 20 cultivar da mensa*. L'Italia Agrícola, 78:737-745.

GLERUM C. (1985). *Frost hardiness of coniferous seedlings: principles and applications*. En Evaluating Seedling Quality: principles, procedures, and predictive abilities of major tests. Ed. M.L. Duryea. Forest Research Laboratory, Oregon State University, Corvallis, 107-123.

GÓMEZ DEL CAMPO M., MORALES-SILLERO A., VITA SERMAN F., ROUSSEAU M. C., SEARLES P.S. (2010). *El olivar en los valles áridos del Noroeste de Argentina (provincias de Catamarca, La Rioja y San Juan)*. Olivae 114.

KOLZAC T., KRZYSZTOFORSKI K., PALKA K. (2006). *The effect of post-mortem ageing and heating on water retention in bovine muscles*. Meat Science. 75: 655-660

KOZLOWSKI T.T., PALLARDY S.G. (2002). *Acclimation and Adaptive Responses of Woody Plants to Environmental Stresses*. The Botanical Review 68 (2): 270-334.

- HAO W., ARORA R., YADAV A.K., JOSHEE N. (2009). *Freezing Tolerance and Cold Acclimation in Guava (Psidium guajava L.)* HortScience 44 (5): 1258-1266.
- HAWKINS B.J., HENRY G., WHITTINGTON Y. (1996). *Frost hardiness of Thuja plicata and Pseudotsuga menziesii seedlings when nutrient supply varies with season*. Canadian Journal of Forest Research. 26: 1509-1513.
- HIRSH A.G., WILLIAMS R.J., MERYMAN H.T. (1985). *A Novel Method of Natural Cryoprotection*. Plant Physiology (79): 41-56.
- HÖHNE G.W.H., HEMMINGER W.F., FLAMMERSHEIM H.J. (2003). *Differential Scanning Calorimetry*. Ed. Springer-Verlag. Germany. 298 págs..
- LARCHER W. (1995). *Physiological plant ecology*. Ed.3. Berlin: Springer – Verlag.
- LEVITT J. (1980). *Responses of plants to environmental stresses*. Vol. 1. Chilling, freezing and high temperature stresses. New York: Academic Press.
- LESHEM Y.Y., KUIPER P.J.C., LURIE S., PERL-TREVES. R. (1998). *Do Selye's Mammalian "GAS" Concept and "Co-stress" Response Exist in Plants*. En: Csermely P. Stress of life from molecules to man. Ed. New York Academy of Sciences. Nueva York. EEUU. 199-208.
- LI W., XUE F., CHENG R. (2005). *States of water in partially swollen poly (vinyl alcohol) hydrogels*. Polymer 46: 12026-12031.
- LINDÉN L. (2002). *Measuring Cold Hardiness in Woody Plants*. University of Helsinki, Department of Applied Biology, Publication nº 10. 57 págs..
- LIM C.C., ARORA R., TOWNSEND E.C. (1989). *Comparing Gompertz and Richards functions to Estimate Freezing Injury in Rhododendron Using Electrolyte Leakage*. Journal of the American Society for Horticultural Science 123: 246-252.
- MAJADA J., MARTÍNEZ-ALONSO C., FEITO I., KIDELMAN A., ARANDA I., ALÍA R. (2011). *Mini-cuttings: an effective technique for the propagation of Pinus pinaster Aiton*. New Forests 41: 399-412.

MALDONADO C.A., ZUÑIGA G.E., CORCUERA L.J., ALBERDI M. (1997). *Effect of water stress on frost resistance of oat leaves*. Environmental and Experimental Botany 38: 99-107.

MANCUSO S. (2000). *Electrical resistance changes during exposure to low temperature measure chilling and freezing tolerance in olive (Olea europaea L.) plants*. Plant, Cell and Environment 23: 291-299.

MÁRQUEZ A.J., MAZA G.B., HERERA M.P.A., OJEDA M.U. (2007). *Calorimetria diferencial de barrido. Influencia de la composición del aceite de oliva virgen en su perfil térmico*. Grasas y Aceites 58 (2): 122-129.

MARTÍNEZ L., IBACACHE A., ROJAS L. (2007). *Las Heladas en la Agricultura*. Boletín INIA N° 165. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Intihuasi, La Serena Chile. 68 págs.

PRASAD M.N.V. 1997. *Plant Ecophysiology*. John Willey. Nueva York, EE. UU. 542 págs.

PRIETO J.A., CORNEJO E.H., DOMÍNGUEZ P.A., NÁVAR J.J., MARMOLEJO J.G. JÍMENEZ J. (2004). *Estrés hídrico en Pinus engelmannii Carr., producido en vivero*. Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales 13 (3): 443-451

REPO T., MONOMEN K., ALVILA L. PAKKANEN T.T., HÄNNINEN (2008). *Cold acclimation of pedunculate oak (Quercus robur L.) at its northernmost distribution range*. Environmental and Experimental Botany (2008) 63, 59-70.

ROYO A., FERNANDEZ M., GIL L., PARDOS, J.A. (2003). *Assessing the Hardiness of Aleppo Pine, Maritime Pine, and Holm Oak Seedlings by Electrolyte Leakage and Water Potential Methods*. Tree Planters' Notes. 50(1):1-6.

SCHOLANDER P.F., HAMMEL H.T., BRANDSTREET E.D. (1965). HEMMINGSEN E.A. *Sap pressure in vascular plants*. Science 148: 339-346.

- SUTINEN M.L., PALTA J.P., REICH P.B. (1992). *Seasonal differences in freezing stress resistance of needles of Pinus nigra and Pinus resinosa: evaluation of the electrolyte leakage method*. *Tree Physiology* 11: 241-254.
- THOMAS H., JAMES A.R. (1993). *Freezing Tolerance and Solute Changes in Contrasting Genotypes of Lolium perenne L. Acclimated to Cold and Drought*. *Annals of Botany* 72: 249-254.
- TOPP G.C., DAVIS J.L., ANNAN A.P.(1980). *Electromagnetic determination of soil water content: Measurements in coaxial transmission lines*. *Water Resource Research* 16:574–582.
- TOPP G.C., DAVIS J.L.(1985). *Measurement of soil water content using time-domain reflectometry (TDR): A field evaluation*. *Soil Science Society of America Journal* 49:19–24.
- TURCHETTI J.P. (2011). *Efecto del Estrés Hídrico y Salino sobre la Tolerancia al Frío en Plantas Jóvenes de Olivo (Olea europea L.) cv. Arbequina y Barnea*. Tesis de Grado. Universidad Nacional de San Juan. Argentina. 50 págs.
- TURNER N.C. (1988). *Measurements of plant water status by the pressure chamber technique*. *Irrigation Science* 9: 289-308.
- SWIDERSKI A., WOJTAL A., MURAS P., MIKULKO A., WROBEL S., KOLOCZEK H. (2006). *DSC studies of rhododendron hybrids frost resistance*. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 83 (3): 631-636.
- VERTUCCI C.W., STUSHNOFF C. (1992). *The state of water in acclimating vegetative buds from Malus and Amelanchier and its relationship to winter hardiness*. *Physiologia Plantarum* 86:503-511.
- VILAGROSA A., VILLAR-SALVADOR P., PUÉRTOLAS J. (2006). *El endurecimiento en vivero de especies forestales mediterráneas*. En: Cortina J., Peñuelas J.L., Savé R., Vilagrosa. Ed. *Calidad de planta forestal para la restauración en ambientes*

mediterráneos. Estado actual de conocimientos. Serie Forestal. Organismo Autónomo de Parques Nacionales. Ministerio de Medio Ambiente. 119-140.

WITLOW T.H., BASSUK N.L., RANNEY T.G., REICHERT D.L.(1992). *An improved method for using electrolyte leakage to asses membrane competence in plant tissues*. Plant Physiology 98: 198-205.

WILNER J. (1961). *Relationship between certain methods and procedures of testing for winter injury of outdoor exposed shoots and roots of apple trees*. Canadian Journal of Plant Science 41: 309-315.

WOLFE J., BRYANT G., KOSTER K.L. (2002). *Whats is “unfreezable water”, how unfreezable water is it and how much is there?* CryoLetters 23:157-166.

XING W., RAJASHEKAR C.B. (2001). *Glycine betaine involvement in freezing tolerance and water stress in Arabidopsis thaliana*. Environmental and Experimental Botany 46: 21-28.