

Universidad de Huelva

Departamento de Ciencias Agroforestales



Caracterización a edad temprana de clones del género *Eucalyptus* por su resistencia a estreses abióticos para uso en plantaciones comerciales

**Memoria para optar al grado de doctor
presentada por:**

André Carignato

Fecha de lectura: 3 de diciembre de 2020

Bajo la dirección de los doctores:

Manuel Fernández Martínez

Francisco Javier Vázquez Piqué

Huelva, 2020





Universidad de Huelva

Departamento de Ciencias Agroforestales

Programa de Doctorado

Ciencia y Tecnología Industrial y Ambiental

Tesis Doctoral

CARACTERIZACIÓN A EDAD TEMPRANA DE CLONES DEL
GÉNERO *Eucalyptus* POR SU RESISTENCIA A ESTRESSES
ABIÓTICOS PARA USO EN PLANTACIONES COMERCIALES

*“CHARACTERIZATION OF *Eucalyptus* CLONES AT AN EARLY
AGE FOR THEIR RESISTANCE TO ABIOTIC STRESSES FOR
USE IN COMMERCIAL PLANTATIONS”*

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

André Carignato

Bajo la dirección de los Doctores:

Manuel Fernández Martínez

Francisco Javier Vázquez Piqué

Huelva, 2020

A todas las personas que siempre me han apoyado.
Gracias por creer en mí.

A mis padres, Adriane y José Valdemar,
A mis abuelos, Rosinha y Álvaro,
A mis padrinos, Sandro e Camila, y
A mi novia, Sarah Reichwein,
por regalarme tanto cariño y buenos momentos.

“Todo el mundo trata de realizar algo grande, sin darse cuenta de que la vida se compone de cosas pequeñas”

Frank Clark

“Aunque nadie ha podido regresar atrás y hacer un nuevo comienzo, cualquiera puede recomenzar ahora y hacer un nuevo final”

Jonathan García-Allen

Echando la vista atrás, fueron cuatro años llenos de trabajo e ilusión, pero también han sido cuatro años de mi vida que culminan no solo con la obtención de un grado académico sino también con un crecimiento personal, en un país y una ciudad ajenos a mi origen, pero que a día de hoy es como si pertenecieran a mis raíces. Siempre me sentiré afortunado de haber desarrollado esta etapa en Huelva, España. Una de las cosas que he aprendido a medida que iba realizando la Tesis Doctoral, es que el resultado no es sólo debido al esfuerzo del doctorando, sino que se necesita la ayuda de muchas personas, tanto en lo profesional como en lo personal.

Con especial cariño quiero citar a mis Directores de Tesis, **Manuel** y **Javi**, sin las que este trabajo no hubiese sido posible. Gracias por haberme guiado durante todo el camino, por vuestra dedicación y paciencia, por todas esas horas de trabajo y por haberme aportado tanto, no sólo en lo profesional sino también en lo personal. Sois un ejemplo de trabajo bien hecho. No podría haber contado con mejores Directores de Tesis.

A mis compañeros de despacho, Patricia Alesso y David Romero, por la contribución en algunas mensuraciones de los experimentos, convivio y amistad.

No puedo dejar de recordar de los profesionales que estuvieron presentes como tutores de prácticas durante todo mi grado de Ingeniería Forestal en Brasil en la UNESP, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Edson Seizo Mori, Carlos Frederico Wilcken y Cristiano Bueno de Moraes.

Fuera del ámbito profesional deseo expresar mi agradecimiento a toda mi familia, en especial a mis padres, **Adriane** y **José Valdemar**, por haberme educado con los mejores valores, y haberme hecho la persona que soy hoy. A mis abuelos maternos, Rosinha y Álvaro, que vienen contribuyendo en mi educación desde mi infancia y quienes he considerado siempre parte fundamental de mi vida. A mis padrinos, Camila y Sandro, aunque a distancia, por todo el apoyo moral a quedarme en este proyecto profesional y por los buenos momentos que pasé junto a ellos.

A todos los amigos extranjeros del programa “Erasmus” que conocí durante estos cuatro años en Huelva, que me hicieron crecer culturalmente y mejorar mi nivel de idiomas, permitiéndome decir que tengo una familia en toda Europa,

incluso por todo el mundo. A todos los amigos onubenses, que son personas muy acogedoras, abiertas, siempre dispuestos a ayudar, sin importar si eres extranjero o nativo, y en especial a mi familia del fútbol, **Juventus Onubense**, en que pude practicar deporte todos los fines de semana y dónde me sentí muy valorado por el trato tanto fuera como dentro de campo. A mi gran amigo alemán Manuel, compañero de piso y consejero, que siempre me motivó a obtener el grado de doctor.

En este momento no puedo dejar de pensar en mi novia Sarah, porque ella ha soportado lo mejor y lo peor de estos años y siempre ha estado ahí dándome todo su apoyo, comprensión y complicidad por ello.

Por último, debo agradecer la financiación que he recibido durante estos cuatro años mediante una beca predoctoral del Programa *Ciência sem Fronteiras*, con apoyo del CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil, la ayuda y el soporte financiero de la Universidad de Huelva, por el uso de instalaciones y equipos, de la empresa ENCE, energía y celulosa S.A., a través de un contrato de investigación sobre clones de eucaliptos, y del Plan Nacional de Investigación I+D+i a través de los proyectos de referencia CTQ2013-46804-C2-1R y CTQ2017-85251-C2-2-R que, a su vez, contaron con financiación FEDER.

Gracias a todos



ÍNDICE

ÍNDICE

i. ABREVIATURAS

ii. RESUMEN 1

iii. ABSTRACT 3

1. INTRODUCCIÓN 5

1.1 El eucalipto en el sector productivo forestal 7

1.2 Mejora genética forestal: el caso del eucalipto 12

1.3 Las heladas y sequías como factores ambientales estresantes 17

2. OBJETIVOS GENERALES 21

3. CAPÍTULO 1: Anatomía foliar y del xilema 25

3.1 Resumen 27

3.2 Introducción y objetivos específicos 28

3.3 Parámetros foliares 32

3.3.1 Material y métodos 32

3.3.1.1 Material vegetal y condiciones de cultivo 32

3.3.1.2 Tamaño y densidad de estomas en la superficie foliar 33

3.3.1.3 Estructura transversal de la hoja 36

3.3.1.4 Área foliar específica (SLA) 38

3.3.1.5 Análisis de datos 38

3.3.2 Resultados 39

3.3.2.1 Características estomáticas 39

3.3.2.2 Sección transversal de la hoja 44

3.3.2.3 Área foliar específica (SLA) 45

3.3.3 Discusión 46

3.4 Parámetros xilemáticos 52

3.4.1 Material y métodos 52

3.4.1.1 Preparación de las muestras 52

3.4.1.2 Mediciones 52

3.4.1.3 Análisis de datos 54

3.4.2 Resultados 54

3.4.3 Discusión	60
3.5 Conclusiones	64
4. CAPÍTULO 2: Relaciones hídricas y consumo de agua	67
4.1 Resumen	69
4.2 Introducción y objetivos específicos	70
4.3 Material y métodos	73
4.3.1 Material vegetal y condiciones de cultivo	73
4.3.2 Transpiración cuticular (E_c)	74
4.3.3 Transpiración diaria, por intervalos horarios y total	76
4.3.4 Transpiración y crecimiento diametral en condiciones variables de humedad	80
4.3.5 Distribución de biomasa en las plantas	82
4.3.6 Vulnerabilidad a la cavitación	83
4.3.7 Curvas presión-volumen	85
4.3.8 Análisis de datos	87
4.4 Resultados	88
4.4.1 Transpiración cuticular y parámetros asociados	88
4.4.2 Transpiración diaria y en intervalos del día	95
4.4.3 Crecimiento y consumo hídrico en condiciones variables de humedad	101
4.4.4 Distribución de biomasa	108
4.4.5 Vulnerabilidad a la cavitación	113
4.4.6 Parámetros derivados de curvas presión-volumen	114
4.5 Discusión	117
4.5.1 Transpiración cuticular y parámetros derivados	117
4.5.2 Transpiración diaria y en intervalos del día	120
4.5.3 Crecimiento y consumo hídrico en condiciones variables de humedad	122
4.5.4 Distribución de biomasa	125
4.5.5 Vulnerabilidad a la cavitación	126
4.5.6 Curvas presión-volumen	127
4.6 Conclusiones	131

5. CAPÍTULO 3: Tolerancia al frío de nueve clones de <i>Eucalyptus</i> spp.: evolución estacional durante la estación fría y efecto de la fertilización	135
5.1 Resumen	137
5.2 Introducción y objetivos específicos	138
5.3 Material y métodos	140
5.3.1 Primer año. Material vegetal y diseño experimental	140
5.3.2 Segundo año. Material vegetal y diseño experimental	142
5.3.3 Evaluación de la tolerancia al frío	145
5.3.4 Análisis de datos	148
5.4 Resultados	148
5.4.1 Primer año. Nueve clones bajo dos tratamientos de radiación solar durante el otoño-invierno de 2016-2017	148
5.4.2 Segundo año. Ocho clones sometidos a un único tipo de fertilización (N_1K_1) durante el otoño-invierno de 2017-2018	154
5.4.3 Segundo año. Tres clones sometidos a distintos tipos de fertilización durante el otoño-invierno de 2017-18	157
5.4.4 Segundo año. Estado nutricional de las plantas y relación con tolerancia al frío	161
5.5 Discusión	164
5.6 Conclusiones	168
6. DISCUSIÓN GENERAL	169
7. CONCLUSIONES	177
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	181
9. ANEXO	213
9.1 Sobre el autor	215

A	Fotosíntesis neta
Ab	Sección transversal de la base del tallo
ABA	Ácido abscísico
AC	Área conductora en la sección transversal del xilema
$A_{est/hoja}$	Proporción de área foliar ocupada por los estomas abiertos
AF	Área foliar
AO	Ancho de la apertura de la epidermis sobre el ostiolo
AO/LO	Ratio entre el ancho y el largo de la apertura de la epidermis
AO/AS	Ratio entre el ancho de la apertura de la epidermis y el de las células oclusivas
AS	Ancho de las células oclusivas
AS/LS	Ratio entre ancho y largo de las células oclusivas
A_v	Área de la sección transversal de cada vaso
C	Conductancia hidráulica del xilema
C_{max}	Conductancia hidráulica específica foliar
C_{max}	Conductancia hidráulica máxima
C_{smax}	Conductancia hidráulica específica xilemática
CHR	Contenido hídrico relativo
CHR_c	Contenido hídrico relativo en el momento del cierre estomático
CHR_a	Contenido hídrico relativo del apoplasto
CHR_0	Contenido hídrico relativo en el punto de pérdida de la turgencia
d	Densidad de estomas
d_R	Densidad de radios leñosos
d_v	Densidad de vasos xilemáticos
D	Diámetro en la base del tronco/tallo principal
DPV	Déficit en la presión de vapor del aire
D_t	Diámetro del tallo al cuello de la raíz
D_{tmax}	Diámetro del tallo máximo diario
D_{tmin}	Diámetro del tallo mínimo diario
$D_{tmax} - D_{tmin}$	Oscilación diaria de la dilatación o contracción del tronco
D_v	Diámetro de los vasos xilemáticos, tomado en dos direcciones perpendiculares en la sección transversal
D_{v-m}	Diámetro medio de los vasos xilemáticos
D_{v-max}	Diámetro mayor de los vasos xilemáticos
D_{v-min}	Diámetro menor de los vasos xilemáticos
D_{v-max}/D_{v-min}	Ratio entre el diámetro mayor y el menor de los vasos xilemáticos
E	Tasa de transpiración medida en el IRGA
E_c	Tasa de transpiración cuticular
E_e	Tasa de transpiración estomática
E_{pasto}	Tasa de transpiración de un pasto de tamaño estándar

E_t	Tasa de transpiración total al inicio
ET_o	Evapotranspiración de referencia
EUA	Eficiencia en el uso del agua
EIUA	Eficiencia intrínseca del uso del agua
H	Altura de la planta
HF_T	Número de horas de frío totales acumuladas
$HF_{-7^\circ C}$	Número de horas de frío menores de 7 °C
$HF_{-8^\circ C}$	Número de horas de frío menores de 8 °C
hm	Humedad relativa media
gs	Conductancia estomática
$H'a$	Media de las humedades relativas máximas diarias
$h'a$	Media de las humedades relativas mínimas diarias
H_c	Contenido de humedad en el momento del cierre estomático
Id_{max}	Incremento diario de los diámetros máximos diarios del tallo
Id_{min}	Incremento diario de los diámetros mínimos diarios del tallo
IRGA	Infra Red Gas Analysers (analizador de gases portátil)
K	Potasio
LO	Longitud de la apertura de la epidermis sobre el ostiolo
LO/LS	Ratio entre el largo de la apertura de la epidermis y de las células oclusivas
LS	Longitud de las células oclusivas
LT ₁₀	Temperatura que causa el 10 % de daños en hojas (Temperatura Letal 10)
LT ₅₀	Temperatura que causa el 50 % de daños en hojas (Temperatura Letal 50)
L_v	Longitud de los elementos de vaso xilemático
N	Nitrógeno
N_{hj}	Número de hojas
P	Fósforo
PF	Peso fresco
PCH	Pérdida de conductancia hidráulica en el xilema
PCH ₅₀	Pérdida de conductancia hidráulica del 50%
PCH ₈₀	Pérdida de conductancia hidráulica del 80%
P_f	Peso final del conjunto planta-contenedor
P_i	Peso inicial del conjunto planta-contenedor
PS	Peso seco
PS_{hj}	Peso seco de hojas
PS_{rz}	Peso seco de raíces
PS_{tl}	Peso seco de tallos

R	Radiación solar acumulada diaria
PAR	Radiación fotosintéticamente activa
SF	Superficie foliar transpirante
SLA	Área foliar específica
SS	Azúcares solubles
T	Transpiración total diaria
T/E_{pasto}	Ratio entre la transpiración total diaria de los eucaliptos y la de un pasto de tamaño estándar
Ta	Temperatura máxima absoluta
T'a	Media de las temperaturas máximas diarias
ta	Temperatura mínima absoluta
t'a	Media de las temperaturas mínimas diarias
t_c	Tiempo transcurrido hasta el cierre de los estomas
T_{LA}	Tasa de transpiración diaria en base a la superficie foliar
tm	Temperatura media
VD	Daño visual en hojas
w	contenido de humedad del sustrato
Ψ	Potencial hídrico (medido al amanecer)
ε	Módulo de elasticidad de la pared celular
Ψ_P	Componente de presión de Ψ
Ψ_s	Componente osmótico de Ψ
Ψ_{s100}	Potencial osmótico a plena turgencia
Ψ_{s0}	Potencial osmótico en el punto de pérdida de la turgencia
Ψ_{ws}	Potencial hídrico del sustrato

“Me lo contaron y lo olvidé. Lo ví y lo entendí.
Lo hice y lo aprendí”

Confucio

“Utiliza en la vida los talentos que poseas: el
bosque estaría muy silencioso si sólo
cantasen los pájaros que cantan mejor”

Henry Van Dike

Resumen

Eucalyptus es el género arbóreo más utilizado en el mundo en plantaciones comerciales, cubriendo más de 20.1 millones de hectáreas, con tasas de crecimiento que habitualmente superan los 35 m³/(ha.año) en muchas localidades. Puede cultivarse en una gran variedad de climas, convirtiéndose en una fuente importante de productos madereros y no madereros como leña, carbón, pasta celulósica y papel, aserrío y aceites esenciales. El estrés hídrico y el estrés térmico son dos de los principales limitantes del crecimiento y la supervivencia de las plantaciones de *Eucalyptus*. Por tanto, en un programa de mejora genética, la selección de genotipos que mejoren la resistencia a ambos estreses ayudaría a mejorar la productividad y a ampliar las plantaciones. Las características de los estomas, la transpiración estomática y cuticular, las propiedades anatómicas del xilema, los mecanismos de tolerancia a bajas temperaturas, entre otros, son caracteres a tener en cuenta en la selección, así como la capacidad de cada clon de modificarlos en función de las condiciones de crecimiento. Para ello, utilizando plantas de vivero de 1-2 años de edad, de nueve clones de *Eucalyptus* de alta productividad, cinco de *E. globulus* y cuatro de híbridos de diversas especies, procedentes de un programa de selección y mejora genética, se han estudiado dichos caracteres en distintas épocas del año.

En el capítulo 1 se evaluaron parámetros foliares como el tamaño (largo y ancho) y densidad de los estomas, el área foliar específica y la estructura transversal de la hoja. Asimismo, se evaluaron también parámetros xilemáticos como la densidad, el diámetro y el área transversal de los vasos xilemáticos en raíces y tallos, la longitud de los elementos de vaso y la densidad de radios leñosos. La densidad estomática, el tamaño de los estomas y la *SLA* variaron en función de la época del año y se diferenciaron entre clones. Todos los parámetros xilemáticos evaluados se diferenciaron entre clones.

En el capítulo 2 se evaluaron diversos parámetros relacionados con la resistencia a estrés hídrico y el consumo de agua, como la transpiración total de la planta y la cuticular, el ajuste osmótico, la conductancia hidráulica y la vulnerabilidad a la cavitación del xilema, entre otros, así como la capacidad de cada clon de modificarlos en función de las condiciones de crecimiento. Los

resultados revelaron diferencias significativas entre fechas de medición y entre clones en todos los parámetros medidos.

Relacionando los parámetros medidos en los distintos ensayos de los dos capítulos anteriores, de transpiración cuticular, vulnerabilidad a la cavitación y parámetros derivados de curvas $p-V$, transpiración diaria en vivero y características estomáticas, se pudo apreciar, en general, aunque con ligeros matices, un comportamiento similar de los clones de *E. globulus* entre sí. Ello contrastó con las diferencias mostradas por los demás clones de híbridos, entre sí y con los de *E. globulus*, pero solo en algunos de los parámetros, ya que dichas diferencias variaron de un parámetro a otro.

Por último, en el capítulo 3 se muestra la evolución temporal de la tolerancia al frío durante la estación fría, así como el efecto de la fertilización otoñal con diferentes dosis de N y K sobre dicha tolerancia. Los resultados señalaron una escasa variación estacional en la temperatura que causa el 50 % de daños en hojas (LT_{50}), en general menor de 2 °C, entre -5.0 y -7.0 °C, lo que dificultó la diferenciación entre clones por el rango tan estrecho de temperatura en que se movieron, aunque resultó significativa. Esto indica, además, que estos eucaliptos ensayados no poseen un alto grado de endurecimiento estimulado por la temperatura. El efecto de la dosis aplicada de N resultó significativo, así como la interacción de N y K, aunque no el efecto principal K, por lo que, para establecer la dosis correcta de fertilización, se debería tener en cuenta la relación N/K. Las concentraciones de N y de azúcares solubles en dichas hojas no se correlacionaron significativamente con la tolerancia al frío (LT_{50}), al menos para el rango de concentraciones obtenido en este estudio, en el que las plantas no mostraron síntomas de deficiencia en nutrientes.

Todos los resultados obtenidos, junto a las experiencias previas con esta especie, permiten ir definiendo los caracteres morfo-fisiológicos de cada clon potencialmente aplicables a la selección de genotipos resistentes a sequía o a heladas, por lo que el éxito de las plantaciones, sobre todo en zonas desfavorables, podría verse incrementado. Asimismo, se pone de manifiesto que la estrategia de resistencia o de ahorro de agua varía de un clon a otro, en función de la combinación de caracteres puestos en juego en cada caso.

Abstract

Eucalyptus is the most widely used hardwood genus in commercial plantations worldwide, covering more than 20.1 million hectares. Its growth rates usually exceed $35 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$ in many locations. These plantations can be grown under a great variety of climates, becoming an important source of woody and non-woody products such as fuelwood, charcoal, cellulose pulp and paper, sawn timber and essential oils. However, as the water and cold stress are two major constraining factors of *Eucalyptus* plantation growth and survival, the selection of genotypes that improve resistance to these stresses would help to improve productivity and to expand plantations. Stomata features, stomatal and cuticular transpiration, xylem anatomical properties, cold tolerance mechanisms, among others, are characteristics to be taken into account in a genetic improvement programme, as well as the clone's ability to modify them according to growing conditions. To this end, using nursery plants of 1–2 years-old of nine high-productivity *Eucalyptus* clones, including five *E. globulus* and four hybrids from different species, from a plant selection and breeding programme, these characteristics were studied along different seasons of the year.

In Chapter 1 foliar parameters were evaluated such as stomata size (length and width) and density, specific leaf area, and leaf structure. Xylem parameters in roots and stems were also evaluated, such as the density, diameter and cross-sectional area of the xylem vessels, length of the vessel elements and the density of woody rays. Stomata density, stomata size and *SLA* varied according to the seasons of the year and differed among clones. All xylem parameters evaluated differed among clones.

In Chapter 2 various parameters relating to drought resistance and water use were evaluated, such as the total transpiration rate of the plant and cuticular transpiration, osmotic adjustment, xylem hydraulic conductance and vulnerability to cavitation, among others, as well as the clone's ability to modify them according to growing conditions. The results revealed significant differences among measurement dates and among clones in all parameters evaluated.

Relating the parameters measured in the different tests of the two previous chapters, cuticular transpiration, vulnerability to cavitation and parameters derived from *p-V* curves, daily transpiration in nursery plants and stomatal

characteristics, it was observed, in general, although with slight differences, a similar behaviour of the *E. globulus* clones with each other. This contrasted with regard to the differences shown by the other clones of hybrids, with each other and with those of *E. globulus*, but only in some of the parameters, since these differences varied from one parameter to another.

Finally, Chapter 3 shows the seasonal evolution of the cold tolerance during the cold season, as well as the effect of autumn fertilization using different doses of N and K on this tolerance. The results indicated a scarce seasonal variation in lethal temperature 50 (LT₅₀), in general less than 2 °C, in a range from -5.0 °C to -7.0 °C, which made the differentiation between clones difficult because of the narrow temperature range in which they moved, although it was significant. This also indicates that these tested eucalypts do not have a high degree of hardening stimulated by temperature. The effect of the applied dose of N was significant, as well as the interaction of N and K, although not the main effect of K, therefore, to set the correct dosage of fertilization, it must be taken into consideration the ratio N/K. The leaf N and soluble sugars concentrations did not correlate significantly with cold tolerance (LT₅₀), at least for the concentration range obtained in this study, in which the plants showed no symptoms of nutrient deficiency.

All the results obtained, together with previous experiences with this species, allow us to define the morpho-physiological characteristics of each clone that are potentially applicable to the selection of genotypes resistant to drought or frost. So, the success of the plantations, especially in unfavourable areas, could be further increased. However, it also shows that the drought resistance or water saving strategy varies from one clone to another, according to the combination of characteristics brought into play in each case.



1. INTRODUCCIÓN

1.1. El eucalipto en el sector productivo forestal

Eucalyptus es un género muy diverso dentro de las angiospermas. Originario de Tasmania (Australia), domina la flora arbórea del continente australiano con más de 800 especies y 92 millones de hectáreas de bosques nativos y plantaciones cultivadas (ABARES, 2016). Se cultiva ampliamente en todo el mundo pero, hasta el momento, solo unas 30 especies tienen interés para la industria forestal (Tabla 1.1). Su área de distribución natural se restringe al hemisferio sur, con la única excepción del *Eucalyptus deglupta*, que se extiende hasta la latitud 11° N en Mindanao (Filipinas) (Fonseca et al., 2010). Los géneros *Eucalyptus* y *Pinus* destacan por incluir a las especies forestales más utilizadas en plantaciones con fines industriales en todo el mundo, por su gran amplitud ecológica y capacidad de adaptación, lo que representa el 98 % de la producción económica de los bosques (FAO, 2016). El área de las plantaciones de *Eucalyptus* cultivadas en todo el mundo en 2009 fue aproximadamente 20.1 millones de hectáreas, con Brasil poseyendo el 21 % del total, seguido de India (19 %), China (13 %), Australia, Uruguay, Chile, Portugal y España (Iglesias-Trabado y Wilstermann, 2009). En Brasil, es el género forestal más empleado en plantaciones comerciales, en base a sus características de rápido crecimiento y buena adaptación a las condiciones edafoclimáticas (Almeida et al., 2007). A escala mundial, la productividad anual de madera en pie en plantaciones de corta rotación puede alcanzar desde 20 m³/(ha.año) en áreas con un déficit hídrico moderado (6–8 meses consecutivos con un déficit anual acumulado de 600 mm) hasta más de 70 m³/(ha.año) en áreas con más de 1200 mm de precipitación anual, distribuidas uniformemente en el año y fertilidad edáfica. (Stape et al., 2010; Henry, 2011; Lima et al., 2013; Pulito et al., 2015).

Tabla 1.1. Características básicas ecológicas, de crecimiento y uso de las 30 especies más utilizadas en plantaciones de *Eucalyptus*, incluyendo tanto plantaciones procedentes de semilla como clonales. Categorías de tolerancia a helada entre las especies de *Eucalyptus* (T °C): Baja: hasta -3 °C; Moderada: de -4 °C hasta -9 °C; Alta: de -9 °C hasta -14 °C. Categorías de tolerancia a sequía entre las especies de *Eucalyptus* (Potencial hídrico foliar (Ψ) MPa): Baja: > -1.5 MPa; Moderada: -1.5 hasta -3.5 MPa; Alta: < -3.5 MPa. Temperatura (T): intervalo entre la media anual de las mínimas del mes más frío y de las máximas del mes más cálido. Precipitación (P): rango de la media anual. Para el rango de productividad, tolerancia a helada y tolerancia a sequía, se incluyen los clones seleccionados de cada especie.

Especie	Uso principal	Densidad madera (g/cm ³)	P (mm) T (°C)	Rango de productividad (m ³ /(ha.año))	Tolerancia a helada	Tolerancia a sequía	Referencias complementares
<i>E. benthamii</i>	celulosa	0.55 - 0.65	P: 730 – 1.010 T: 1 – 30	10-66	Alta	Baja	(Boland et al., 2006; Benin et al., 2014; Flores et al. 2016)
<i>E. botryoides</i>	Construcción y biomasa	0.70 - 0.75	P: 625 – 1.000 T: 2 – 28	15-35	Baja	Baja	(Passioura y Ash, 1993; Boland et al., 2006; Flores et al., 2016)
<i>E. brassiana</i>	leña y carbón	0.60 - 0.70	P: 1.000 – 2.500 T: 16 – 32	20-25	Baja	Alta	(Boland et al., 2006; Flores et al., 2016)
<i>E. camaldulensis</i>	construcción y carbón	0.70 - 0.75	P: 250 - 625 T: 11 – 35	10-30	Baja	Alta	(Boland et al., 2006; Ishiguri et al., 2013; Flores et al., 2016)
<i>E. citriodora</i>	construcción y esencias	0.75 - 0.85	P: 625 – 1.000 T: 5 – 35	10-21	Baja	Alta	(Boland et al., 2006; Dickinson et al., 2013; Flores et al., 2016)
<i>E. cloeziana</i>	construcción y carbón	0.70 - 0.80	P: 1.000 – 1.600 T: 8 – 29	15-34	Moderada	Moderada	(Boland et al., 2006; Alcorn et al., 2013; Flores et al., 2016)
<i>E. deanei</i>	construcción	0.50 - 0.65	P: 750 – 1.500 T: 0 – 30	20-40	Baja	Alta	(Boland et al., 2006; Flores et al., 2016)
<i>E. deglupta</i>	muebles y miel	0.45 - 0.60	P: 2.500 – 5.000 T: 16 – 33	14-50	Baja	Baja	(Eldridge et al., 1993; Boland et al., 2006; Flores et al., 2016)

<i>E. dunnii</i>	celulosa y construcción	0.60 - 0.70	P: 800 - 1.500 T: 8 – 29	28-42	Alta	Baja	(Boland et al., 2006; Moraes et al., 2014; Flores et al., 2016)
<i>E. exserta</i>	construcción y leña	0.70 - 0.75	P: 400 - 1.800 T: 2 – 36	10-15	Moderada	Alta	(Boland et al., 2006; Flores et al., 2016)
<i>E. globulus</i>	celulosa, esencias y biomasa	0.55 - 0.65	P: 600 - 1.400 T: 0 – 23	10-40	Moderada	Moderada	(Boland et al., 2006; Navarrete-Campos et al., 2013; Flores et al., 2016)
<i>E. grandis</i>	celulosa y serrería	0.45 - 0.55	P: 1.000 - 1.700 T: 5 – 35	17-70	Baja	Baja	(Boland et al., 2006; Almeida et al., 2007; Flores et al., 2016)
<i>E. maculata</i>	Construcción y biomasa	0.75 - 0.85	P: 625 - 1.250 T: 2 – 35	21-35	Moderada	Moderada	(Boland et al., 2006; Martins et al., 2013; Flores et al., 2016)
<i>E. melliodora</i>	construcción y miel	0.55 - 0.70	P: 450 - 1.400 T: -2 – 32	2-6	Alta	Alta	(Boland et al., 2006; Héroult et al., 2013; Flores et al., 2016)
<i>E. microcorys</i>	construcción y muebles	0.55 - 0.70	P: 900 - 1.500 T: 5 – 32	8-30	Moderada	Moderada	(Boland et al., 2006; Martins et al., 2013; Flores et al., 2016)
<i>E. nitens</i>	celulosa, muebles y biomasa	0.45 - 0.55	P: 950 - 2.100 T: -2 – 24	20-40	Alta	Alta	(Boland et al., 2006; Carrillo et al., 2017; Flores et al., 2016)
<i>E. paniculata</i>	construcción y carbón	0.80 - 1.10	P: 825 - 1.500 T: 2 – 29	9-18	Baja	Moderada	(Mattei y Longhi, 2001; Boland et al., 2006; Flores et al., 2016)
<i>E. pellita</i>	construcción y carbón	0.65 a 0.75	P: 900 - 2.400 T: 12 – 33	10-20	Moderada	Moderada	(Boland et al., 2006; Hung et al., 2015; Flores et al., 2016)
<i>E. phaeotricha</i>	construcción y muebles	0.50 - 0.60	P: 1.000 - 2.000 T: 3 – 33	20-30	Moderada	Moderada	(Ferreira et al., 1992; Boland et al., 2006; Flores et al., 2016)
<i>E. pilulares</i>	construcción y carbón	0.60 - 0.70	P: 1.000 - 1.500 T: 5 – 32	10-20	Baja	Moderada	(Boland et al., 2006; Alcorn et al., 2013; Flores et al., 2016)

<i>E. propinqua</i>	construcción	0.75 - 0.85	P: 875 - 1.400 T: 4 – 33	10-15	Baja	Alta	(Boland et al., 2006; Longui et al., 2014; Flores et al., 2016)
<i>E. punctata</i>	construcción	0.55 - 0.70	P: 625 - 1.250 T: 4 – 32	10-20	Baja	Alta	(Bortoletto Júnior, 2003; Boland et al., 2006; Flores et al., 2016)
<i>E. resinifera</i>	construcción	0.70 - 0.85	P: 1.300 - 1.500 T: 4 – 32	5-20	Baja	Moderada	(Boland et al., 2006; Sato et al., 2007; Flores et al., 2016)
<i>E. robusta</i>	construcción	0.60 - 0.75	P: 1.000 - 1.500 T: 3 – 32	14-35	Baja	Alta	(Boland et al., 2006; Razafimahatratra et al., 2016; Flores et al., 2016)
<i>E. saligna</i>	celulosa y construcción	0.50 - 0.65	P: 800 - 1.200 T: 3 – 30	15-35	Moderada	Baja	(Boland et al., 2006; Moraes et al., 2014; Flores et al., 2016)
<i>E. tereticornis</i>	celulosa, construcción y carbón	0.70 - 0.80	P: 500 - 1.500 T: 2 – 32	15-25	Moderada	Alta	(Boland et al., 2006; Aspinwall et al., 2016; Flores et al., 2016)
<i>E. torelliana</i>	construcción, carbón y miel	0.70 - 0.75	P: 1.000 - 1.500 T: 10 – 29	10-20	Baja	Moderada	(Boland et al., 2006; Dukku, 2011; Flores et al., 2016)
<i>E. umbra</i>	construcción	0.55 - 0.65	P: 700 - 1.400 T: 4 – 34	5-15	Moderada	Alta	(Boland et al., 2006; Lima et al., 2011; Flores et al., 2016)
<i>E. urophylla</i>	construcción, celulosa y miel	0.50 - 0.60	P: 1.000 - 1.500 T: 8 – 29	20-83	Baja	Moderada	(Boland et al., 2006; Wu et al., 2013; Flores et al., 2016)
<i>E. viminalis</i>	celulosa	0.45 - 0.55	P: 625 - 1.400 T: 1 – 21	15-20	Alta	Baja	Boland et al., 2006; McKiernan et al., 2014; Flores et al., 2016)

De todos los posibles usos de interés comercial que pueden derivarse de los eucaliptos, reflejados en la Tabla 1.1., destacan actualmente el uso energético y la producción de celulosa para pasta de papel. En 2016, las energías renovables repercutieron el 18.2 % del total de la energía global producida y, dentro de las renovables, el uso tradicional de la biomasa correspondió al 7.8 % de ese 18.2 % (IEA, 2017; REN21, 2018). Los aumentos constantes del precio del petróleo, la incertidumbre política de los principales países exportadores y el aumento de las emisiones de los gases causantes del efecto invernadero ha colocado a la biomasa, incluida la madera, en el foco de atención como una importante fuente de energía. Las empresas forestales alrededor del mundo, desde los trópicos hasta los climas templados, utilizan cada vez más las plantaciones de *Eucalyptus* como la principal fuente de materia prima de productos madereros y no madereros como leña, carbón, pulpa y papel, aserrío y aceites esenciales. El incremento de las plantaciones realizadas con fines energéticos, derivado del aumento de la demanda, supondrá, además, una nueva oportunidad para paliar el abandono paulatino de superficies agrícolas y forestales, apoyando de este modo la economía rural y evitando el despoblamiento de estas zonas, por aportar gran cantidad de biomasa de forma rentable y con un coste de cultivo bajo (Searle et al., 2014). Estos cultivos contribuyen, además, a reducir el déficit energético y el uso de energías no renovables, así como a conservar mejor las áreas forestales naturales, no cultivadas (Simioni et al., 2018). Las especies de eucalipto que vienen siendo más utilizadas para este fin son *E. urophylla*, *E. cloeziana*, *E. pellita*, *E. tereticornis*, *E. camaldulensis*, *E. brassiana*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. saligna*, *E. grandis*, *E. pilularis*, *E. urograndis* (híbrido), *E. citriodora*, *E. maculata*, *E. torelliana*, *E. botryoides*, *E. globulus* y *E. nitens* (Knapic et al., 2014).

Por otro lado, aparte del importante uso energético que se está dando a la biomasa de eucaliptos actualmente, también hay una demanda creciente de madera para la producción de celulosa, donde cada vez es mayor el uso de madera de frondosas, de fibra corta. Por ello, el género *Eucalyptus* se posiciona también como una de las principales fuentes mundiales de esta materia prima, por su crecimiento rápido y su alto contenido en fibras (Hart y Santos, 2015). Además, como la producción de celulosa en la etapa de cocción separa la lignina de la celulosa, luego se reutiliza la primera como combustible, obteniendo la

llamada “biomasa de proceso” con la que se puede generar energía. Ambas ventajas, productividad forestal y rendimiento industrial de la madera, hacen que el eucalipto sea un árbol altamente indicado para la fabricación de celulosa y la generación de energía. En cuanto a la producción de celulosa, a pesar de la gran diversidad de especies de eucaliptos, solamente un grupo limitado viene siendo utilizado para este fin, destacando, de entre las que aparecen en la tabla 1.1., *E. saligna*, *E. grandis*, *E. urophylla*, *E. viminalis*, *E. dunnii*, *E. nitens*, *E. tereticornis*, *E. benthamii* y *E. globulus* (Neiva et al., 2015), siendo, dentro de esta última especie, la subespecie *globulus* la que destaca por su alto rendimiento en fibra (>56 %) (Miranda y Pereira, 2002). Sin embargo, el empleo de estas especies en plantaciones, tanto para cultivos energéticos como para celulosa, encuentra limitaciones de expansión debidas a factores edáficos, climáticos y de sanidad vegetal (Machado et al., 1988; Gomide, 2010).

1.2. Mejora genética forestal: el caso del eucalipto

El objetivo de un plan de mejora genética con eucaliptos orientados a plantaciones comerciales debe tener una alta rentabilidad económica, presentar buena variabilidad y, al menos, un moderado control genético. Hasta la actualidad, los principales caracteres tenidos en cuenta en la selección y mejora han sido los referentes al crecimiento y productividad (Plomion y Adam-Blondon, 2015); a las propiedades químicas de la madera (Poke et al., 2004); a las propiedades físicas de la madera (ángulo de fibras, espesor de pared) (Hong et al., 2014); a la resistencia a plagas y enfermedades (Milgate et al., 2005); a la tolerancia a estreses abióticos (heladas, sequías, salinidad) (Tibbits et al, 1991); y a otros aspectos como capacidad fotosintética y caracteres fisiológicos (Teskey et al., 2015), uso en biorremediación (McIvor et al., 2014), producción de compuestos farmacéuticos (Hu et al., 2016) o arquitectura del árbol (ramas, nudos, interceptación de luz) (Díaz-Varela et al., 2015). A pesar de todas las características mostradas, la mayoría de los programas de mejora forestal llevados a cabo en eucalipto están orientados al aumento de la productividad y de la calidad de la madera, característica que difiere dependiendo del objetivo y del producto final. Por ejemplo, para la generación de energía, la madera debe

contener alto contenido de lignina y poseer alta densidad básica; para celulosa y papel, los contenidos y tipos de ligninas son características marcadas en el proceso de la selección (Greaves et al., 1997); en el caso de madera para aserrar, las propiedades físicas, anatómicas e incluso químicas están involucradas en el control de las tensiones de crecimiento, que devalúan el uso de la madera en construcción o fabricación de muebles (Raymond, 2002).

El plan de mejora genética de especies como los eucaliptos se basa en la selección recurrente, lo que implica la repetición de varias etapas. Se comienza con la selección de los mejores individuos (genotipos) a partir de la evaluación fenotípica de las características de interés en una amplia base genética (masas naturales o plantaciones de brinzales). Seguidamente se procede a la evaluación local de los individuos seleccionados, constituyendo la primera generación de mejora (F_0) con aquellos que no sean rechazados tras esta primera evaluación. Esta generación de individuos seleccionados participará como progenitores de la siguiente generación de mejora (F_1), así como productores de propágulos (semillas, esquejes, etc.) para plantaciones comerciales. Así, sucesivamente, se irán generando las próximas generaciones de mejora (Plomion y Adam-Blondon, 2015).

Los programas de selección y mejora llevados a cabo por instituciones públicas y privadas consistieron, inicialmente, en la evaluación de especies y procedencias prometedoras y, posteriormente, en la formación de huertos semilleros a partir de la selección masal de individuos superiores en familias de medios hermanos. A partir de la década de los 80, la técnica de clonación del eucalipto, desarrollada de forma pionera en Brasil, permitió la perpetuación y multiplicación de genotipos sobresalientes. Ello posibilitó el impulso del sector forestal con la formación de plantaciones clonales homogéneas, resistentes a enfermedades y de alta productividad (Berger et al., 2002; Leslie et al., 2019). Así, por ejemplo, la implantación de esta técnica ayudó al control de enfermedades, como en el caso del chancro (*Cryphonectria cubensis*), que tuvo gran incidencia en la década de los 70 debido a la heterogeneidad de las plantaciones procedentes de semillas. Además de todo ello, se cree que se obtuvo una ganancia, en incremento volumétrico, del orden del 100 % en relación a las plantaciones realizadas con brinzales (Gonçalves et al., 2001; Alfenas et al., 2009; Wu et al., 2013; Griffin, 2014). A pesar de los desafíos, los programas

de mejora genética del eucalipto han sido eficientes en la generación de plantaciones mejoradas. Aunque los progresos son significativos, todavía hay espacio para avances en la mejora de la calidad de la madera para todos los segmentos industriales que la utilizan como fuente de materia prima (Harfouche et al., 2014; Gonçalves et al., 2017).

Asimismo, cuando estamos tratando con especies arbóreas longevas, el acortamiento de estos programas de mejora, a partir de mediciones en plantas de corta edad y su extrapolación a edades mayores (selección temprana o precoz), es de vital importancia (Wu et al., 2013). Dicha selección temprana ha sido utilizada, por ejemplo, mediante mediciones de crecimiento en diámetro y altura a los tres años tras la plantación (Massaro et al., 2010; Beltrame et al., 2012), o mediante parámetros fisiológicos indicadores del crecimiento, la resistencia a la sequía, al frío, a heladas o a plagas en plantas más jóvenes bajo condiciones controladas (Chaves et al., 2004; Luo et al., 2014).

Paralelamente a estos avances, la síntesis de híbridos interespecíficos en el género *Eucalyptus* ha asumido destacada importancia dentro de los programas de mejora genética de este género. La posibilidad de asociación de características diferenciadas en especies importantes, así como la manifestación de heterosis comprobada en los cruces entre especies, ha llevado a los mejoradores de *Eucalyptus* a buscar en la hibridación un medio más rápido de promover la mejora de características deseables siguiendo, asimismo, un proceso de selección y evaluación antes de la selección final, multiplicación y explotación comercial (Nunes et al., 2002). Se ha comprobado que es posible la complementariedad de características de crecimiento, de calidad de la madera (celulosa, densidad, propiedades energéticas y mecánicas), de resistencia a factores bióticos (plagas y enfermedades) y abióticos (estrés hídrico, de fertilidad o de temperatura) (Potts y Dungey, 2004).

En este sentido, las especies como *E. camaldulensis*, *E. tereticornis*, *E. brassiana*, *E. resinifera*, *E. pellita* y *E. paniculata*, todas con alta densidad de madera (densidad básica > 550 kg/m³), se utilizan cada vez más en la producción de híbridos interespecíficos con especies de mayor crecimiento (Tabla 1.2). El cruce de estas especies con clones comerciales de otro híbrido, *E. x urograndis*, ha generado materiales de alta productividad forestal y calidad de la madera superior, sobre todo con mayor densidad (entre 18 % y 45 %) y menor contenido

de lignina (Tabla 1.2) (Paludzyszyn Filho et al, 2006; Silva et al., 2018). Una estrategia similar ha sido adoptada con éxito en la integración de genes de *E. globulus* y *E. nitens* para mejorar la calidad de la madera para la fabricación de celulosa (en promedio de 18%) (Carrillo et al., 2017). También está siendo utilizada, por ejemplo, para transferir tolerancia a helada a *E. globulus*, el cruzamiento con varias especies tolerantes como *E. viminalis*, *E. gunnii* y *E. nitens* (Assis et al., 1993; Pardos, 2007; Navarrete-Campos et al., 2013).

Los principales híbridos utilizados en las plantaciones industriales son *E. grandis* × *urophylla* por su alta productividad (Tabla 1.2), pudiendo llegar hasta los 100 m³/(ha.año) en algunas zonas de Brasil (Hart y Santos, 2015); *E. grandis* × *camaldulensis* y las variedades que incluyen al menos una de las siguientes dos especies, *E. globulus* y *E. tereticornis*. (Gonçalves et al., 2013). Dichos híbridos son plantados en una escala relativamente grande en Brasil y el Congo, aunque también existen plantaciones importantes en China, Indonesia y Sudáfrica. El despliegue de clones seleccionados de *E. urophylla* × *grandis* en Brasil y el Congo ha sido un gran éxito en el combate al chancro y en la susceptibilidad a otras enfermedades de *E. grandis* como la roya del eucalipto (*Puccinia psidii*), o la causada por el hongo *Cylindrocladium candelabrum* (Bouvet y Vigneron, 1996; Santos et al., 2013). Por otro lado, resulta de interés probar otras especies como *E. globulus* y *E. dunnii*, por ejemplo, con objeto de obtener un aumento de la densidad de la madera, siendo posible alcanzar, en el caso de *E. urophylla* × *E. dunnii*, un rango de densidad de 0.65 – 0.75 g cm⁻³ (Beltrame et al., 2012), y en el caso del *E. globulus* × *E. nitens* un aumento en la productividad en celulosa (68.4 % de contenido de holocelulosa) junto a la reducción de lignina (contenido de 25.7 %) y extractivos (contenido de 2.0 %), mejorando el aprovechamiento del bosque en un sentido más amplio (Palacios, 2018).

Tabla 1.2. Características básicas ecológicas, de crecimiento y uso de los 4 híbridos más utilizadas en plantaciones de *Eucalyptus*. Categorías de tolerancia a helada entre las especies de *Eucalyptus* (T °C): Baja: hasta -3 °C; Moderada: de -4 °C hasta -9 °C; Alta: de -9 °C hasta -14 °C. Categorías de tolerancia a sequía entre las especies de *Eucalyptus* (Potencial hídrico foliar (Ψ) MPa): Baja: > -1.5 MPa; Moderada: -1.5 hasta -3.5 MPa; Alta: < -3.5 MPa. Temperatura (T) y Precipitación (P): rangos de la media anual.

Híbrido	Usos principales	Densidad madera (g/cm ³)	Contenido de Lignina (%)	P (mm) T (°C)	Rango de productividad (m ³ /(ha.año))	Tolerancia a helada	Tolerancia a sequía	Referencias complementares
<i>E. camaldulensis</i> x <i>grandis</i>	celulosa, leña, biomasa, carbón	0.47 - 0.49	29-31	P: 1.000 – 1.800 T: 24 – 26	25-35	Baja	Alta	(Pereira et al., 2000; Fonseca et al., 2010; Pima et al., 2016)
<i>E. urophylla</i> x <i>globulus</i>	celulosa	0.51 - 0.54	23-25	P: 1.000 – 2.500 T: 13 – 20	35-45	Moderada	Moderada	(Pereira et al., 2000; Fonseca et al., 2010; Carrillo et al., 2017)
<i>E. urophylla</i> x <i>grandis</i>	celulosa, carbón, leña, panel, serrería, madera tratada	0.48 - 0.52	26-29	P: 1.500 – 2.500 T: 20 – 24	35-60	Baja	Moderada	(Pereira et al., 2000; Fonseca et al., 2010; Hart y Santos, 2015)
<i>E. urophylla</i> x <i>tereticornis</i>	leña, celulosa, carbón	0.53 - 0.64	28-35	P: 250 - 625 T: 24 – 26	25-35	Baja	Alta	(Pereira et al., 2000; Fonseca et al., 2010; Gonçalves et al., 2013)

El clima mediterráneo presente en la provincia de Huelva, lugar donde se desarrolla esta tesis doctoral, se caracteriza por presentar inviernos templados y lluviosos y veranos secos y calurosos, con período de sequía estival. Esto hace que varíe considerablemente la demanda evaporativa entre estaciones del año, especialmente agudizadas durante el verano, por lo que las plantas deben adaptarse a ello, siendo muy interesante en este caso la evaluación de la respuesta al estrés hídrico. En ese contexto, ENCE, energía y celulosa S.A., desarrolla desde 1982 un programa de mejora genética, especialmente centrado en *Eucalyptus globulus*, en dos zonas de mejora, Suroeste y Norte de España, basados en caracteres de crecimiento, calidad de fibra, resistencia a la sequía o al frío, etc., dando lugar a la consecución de clones propios de esta especie. Asimismo, en los últimos años se ha incrementado la demanda de biomasa destinada a uso energético, por lo que se están tomando en consideración tanto clones de *E. globulus* ya seleccionados por su adaptación al clima y suelo de ambas zonas, como clones de otras especies y de híbridos con gran potencial de adaptación. Por estas razones, con especial referencia a Huelva, es crucial implementar programas de mejora en resistencia a estrés hídrico y térmico en los taxones utilizados de este género, con el fin de mejorar las producciones en lugares limitantes, ampliar las plantaciones y ayudar a mitigar el impacto futuro del clima sobre ellos.

1.3. Las heladas y sequías como factores ambientales estresantes

Los factores climáticos que condicionan más la adaptación y el crecimiento de los árboles son las precipitaciones, la radiación solar y el viento, que afectan a su estado hídrico alterando su metabolismo y causando pérdidas en la productividad, así como la temperatura (tanto las altas, como las bajas) siendo, habitualmente, las temperaturas mínimas las más letales, pudiendo matar parte o la totalidad de la planta con una sola ocurrencia (Fernández et al., 2006; Stape et al., 2008). Los escenarios de cambio climático desarrollados prevén eventos climáticos extremos, como la disminución de las precipitaciones, mayor ocurrencia de heladas y un incremento en la recurrencia de episodios de sequía extrema (IPCC, 2014). Cualquiera de esos cambios generará una serie de

alteraciones para la vegetación que son actualmente difíciles de prever con precisión pero que obligan a tomar medidas adaptativas a las futuras variaciones ambientales (Warren et al., 2005).

Cuando las plantas son expuestas a temperaturas bajas, algunas de ellas desarrollan diferentes grados de tolerancia al frío, controlado por relaciones fisiológicas complejas (Leslie et al., 2014), mediante un proceso al que denominamos *endurecimiento*, que puede originar ajuste osmótico del interior celular (Taiz et al., 2017) entre otros efectos. Si hay episodios de heladas, el período del año en que ocurren también tiene influencia. En este sentido las heladas esporádicas son normalmente más dañinas porque, aunque las temperaturas raramente sean muy bajas, afectan a las plantas con bajo o ningún grado de endurecimiento (King y Ball, 1998). Las heladas pueden causar daños que dependen de la intensidad, duración y velocidad de la disminución de la temperatura, llegando hasta una temperatura crítica a la cual los diferentes órganos vegetales son definitivamente dañados. Tan solo una helada severa ($T_{\min} < -6.6\text{ }^{\circ}\text{C}$) puede causar daños irreversibles a especies como *E. dunnii*, *E. benthamii*, *E. grandis* y *E. saligna*, desde la caída de las hojas, muerte de la zona apical o hasta la muerte de los individuos por el frío intenso (Pitz Floriani et al., 2013). Por ello, la resistencia al frío es un factor ambiental determinante en la adaptación y éxito de las especies de *Eucalyptus* en las plantaciones forestales (Moraes et al., 2014). El género *Eucalyptus* tiene gran variación interespecífica en cuanto a la capacidad de adaptación al frío. Existen especies que no soportan temperaturas por debajo de $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ (p. ej. *E. deglupta*) y otras que resisten valores inferiores a $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$, como *E. rubida*, *E. niphophila*, *E. vernicosa* y *E. largiflorens* (FAO, 1981; Ritter, 2014). Entre los eucaliptos utilizados en plantaciones comerciales, las especies reconocidas como más resistentes a las heladas son *E. viminalis*, *E. benthamii*, *E. nitens* y *E. dunnii*. Sin embargo, con excepción de *E. benthamii* y *E. dunnii*, son de baja productividad cuando se comparan con especies tropicales como *E. grandis*, *E. saligna* o el híbrido *E. urophylla* x *E. grandis*.

Por otra parte, el déficit hídrico y la sequía limitan la productividad vegetal en nuestro planeta más que cualquier otro factor ambiental y, generalmente, la tasa de crecimiento de una comunidad vegetal o un cultivo son proporcionales a la disponibilidad de agua (Navarrete-Campos et al., 2013), lo que incluye también

al eucalipto (Stape et al., 2010). La selección de estirpes de *Eucalyptus* spp. resistentes al déficit hídrico es de gran interés, principalmente en regiones localizadas en áreas que presentan régimen pluviométrico anual irregular y escaso, asociado a altas temperaturas y elevada evapotranspiración, ocasionada por la demanda evaporativa del aire y los altos niveles de radiación, como es el caso del ambiente mediterráneo. La evapotranspiración puede llegar a exceder el 90 % de la precipitación en plantaciones de *Eucalyptus* spp. (Almeida et al., 2016). Cuando el déficit hídrico presenta una evolución suficientemente lenta para permitir cambios en los procesos de desarrollo (*endurecimiento*) las especies de eucalipto pueden presentar diferentes grados de resistencia al déficit de agua en el suelo (Tatagiba et al., 2007). De entre las especies más resistentes a la sequía destacan *E. camaldulensis*, *E. torelliana*, *E. tereticornis* y *E. brassiana* (Lemcoff et al., 1994). Por comentar algunos ejemplos, *E. camaldulensis*, aunque presenta baja capacidad de ajuste osmótico, posee un sistema radicular profundo y ramificado, posibilitando absorber agua de capas más profundas del suelo, siendo atribuida a esta última característica su mayor resistencia a la sequía (Reis et al., 1991). *E. globulus*, por su parte, aunque clasificado como un clon de resistencia baja a la sequía, presenta determinados genotipos con potencial para tolerar ambientes con baja disponibilidad hídrica (Costa e Silva et al., 2008). Asimismo, varios híbridos vienen siendo utilizados en ambientes sujetos a déficit hídrico, tales como el *E. camaldulensis* x *E. grandis* y *E. x urograndis* (Silva et al., 2014; Silva et al., 2016).

La eficiencia en el uso del agua (EUA) relaciona la tasa fotosintética o el crecimiento de las plantas con el consumo de agua y se ha demostrado que es un parámetro fisiológico útil para evaluar la adaptación a la sequía de las plantas (Navarrete-Campos et al., 2013; Li, 2000; Jiménez et al., 2007), y para diferenciar el comportamiento de diferentes taxones (Silva et al., 2016). Sin embargo, EUA no siempre es un rasgo constante de un taxón dado: varía según una combinación específica de condiciones del sitio, el clima y la edad de los árboles (Almeida et al., 2007). Mientras que las características fisiológicas pueden variar dentro de un intervalo muy corto, no ocurre igual con las características morfológicas. Las segundas mantienen la misma estructura mientras el órgano es funcional a pesar de los posibles cambios ambientales. De ahí la importancia de desarrollar órganos con una estructura apropiada para resistir las condiciones

ambientales futuras y de estudiar el efecto de algunas características anatómicas de las hojas en la pérdida de agua debido a la transpiración de la planta, tanto con estomas completamente abiertos, como con estomas totalmente cerrados. Por ejemplo, las estructuras anatómicas de las hojas, como el parénquima en empalizada y la densidad estomática, y la morfología de la hoja, como el grosor y el peso específico de la hoja, regulan las funciones fisiológicas (p. ej., la fotosíntesis y la transpiración), que varían en función de los diferentes cultivos o clones (Bhusal et al., 2018). Asimismo, durante condiciones de sequía, la conductancia estomática (g_s) se ve directamente afectada, y el consiguiente cierre de los estomas es una forma de reducir la pérdida de agua debido a la transpiración de la hoja y a la susceptibilidad de los vasos xilemáticos a la cavitación (p. ej., embolia o disfunción), que resulta en una reducción en la conductancia hidráulica (Bhusal et al., 2019; McDowell et al., 2011). Por lo tanto, dado que la resistencia a la sequía es un mecanismo de control múltiple, es la conjunción de varios factores, no solo uno, lo que representa el verdadero grado del consumo de agua y de la resistencia a la sequía de cada taxón (Pita et al., 2005; Fernández et al., 2010).



2. OBJETIVOS GENERALES

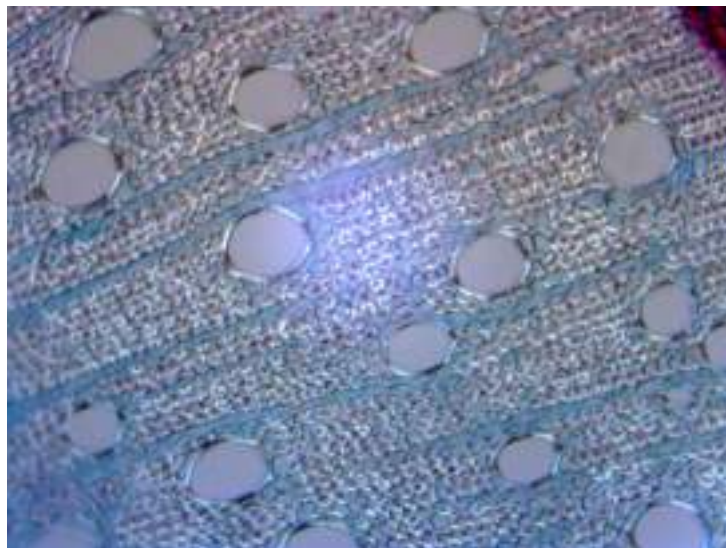
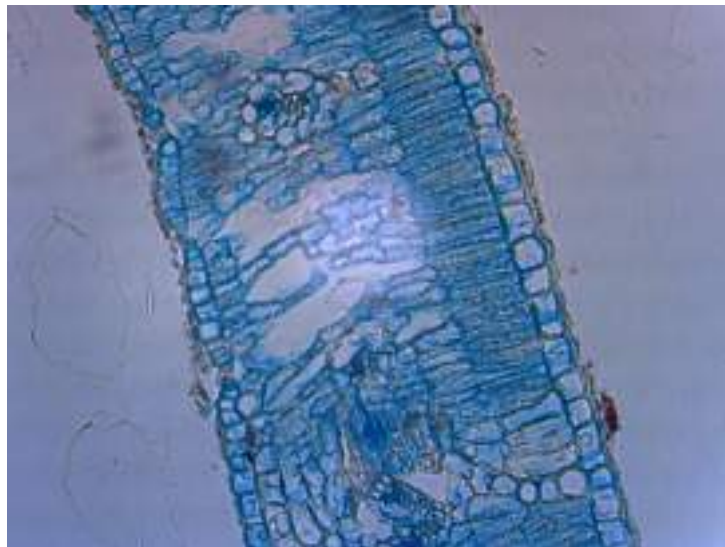
El presente estudio se desarrolla en la provincia de Huelva, de clima mediterráneo, y está centrado en la evaluación de nueve clones, monoespecíficos e híbridos de *Eucalyptus* spp. del programa de mejora genética de la empresa ENCE, energía y celulosa S.A. En el trabajo se analizan aspectos relacionados con las relaciones hídricas y la tolerancia a temperaturas bajo cero, todo ello a edad temprana, y evaluando su comportamiento en distintas épocas del año. La hipótesis de partida es que debe haber diferencias entre clones en dichos aspectos, los cuales varían dependiendo de las condiciones de crecimiento y que son detectables a edad temprana.

Por estas razones, fueron abordados los siguientes objetivos generales:

- 1- Analizar características anatómicas relacionadas con el uso del agua tales como el tamaño y distribución de los estomas en hojas y de los vasos xilemáticos en tallos jóvenes, la estructura transversal de la hoja y el área foliar específica (SLA).
- 2- Cuantificar el consumo de agua (transpiración), tanto en condiciones de laboratorio como de campo, y relacionarla con las variables ambientales y anatómicas.
- 3- Analizar parámetros fisiológicos relacionados con el uso del agua y la resistencia al estrés hídrico tales como el contenido hídrico relativo, la vulnerabilidad del xilema a la cavitación, la distribución del agua entre apoplasto y simplasto y la descomposición del potencial hídrico celular en sus componentes osmótico y de turgencia.
- 4- Evaluar la tolerancia al frío durante la fase de endurecimiento de la época fría y relacionarla con la temperatura ambiente y con parámetros de nutrición mineral (N y K).

3. Capítulo 1

ANATOMÍA FOLIAR Y DEL XILEMA



3.1 RESUMEN

Las relaciones hídricas en las plantas y la producción de biomasa están fuertemente influenciadas por el funcionamiento estomático, por la estructura de la hoja y por las propiedades anatómicas del xilema. Resulta importante, por tanto, conocer dichas características en los taxones utilizados en plantaciones comerciales de *Eucalyptus ssp.* Para ello, utilizando plantas de vivero, se evaluaron parámetros foliares como el tamaño (largo, LS , y ancho, AS) y densidad (d) de los estomas, el área foliar específica (SLA) y la estructura transversal de la hoja, todos ellos medidos en distintas épocas del año. Asimismo, se evaluaron también parámetros xilemáticos como la densidad (d_V), el diámetro (D_V) y el área transversal (A_V) de los vasos xilemáticos, la densidad de radios leñosos (d_R) y la longitud de los elementos de vaso (L_V). Se utilizaron cinco clones comerciales de *E. globulus* y cuatro clones de híbridos interespecíficos. La densidad estomática, el tamaño de los estomas y la SLA variaron en función de la época del año y se diferenciaron entre clones. Todos los parámetros xilemáticos evaluados se diferenciaron entre clones. Los rangos de valores encontrados en los clones fueron: $d = 204 - 434 \text{ mm}^{-2}$; $LS = 18.5 - 24.0 \text{ }\mu\text{m}$; $AS = 14.2 - 18.2 \text{ }\mu\text{m}$; $AS/LS = 0.75 - 0.78 \text{ }\mu\text{m}$; $SLA = 9.0 \text{ a } 13.4 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$; $d_V = 17.3 - 67.4 \text{ mm}^{-2}$; $D_V = 34.2 - 99.7 \text{ }\mu\text{m}$; $A_V = 940 - 8846 \text{ }\mu\text{m}^2$; $d_R = 6.8 - 7.8 \text{ mm}^{-1}$ y $L_V = 91.6 - 244.9 \text{ }\mu\text{m}$. Se aprecia que hay variabilidad genética en los clones estudiados y que, además, los individuos modifican sus parámetros morfo-fisiológicos durante el año para acomodarse a las condiciones ambientales, a pesar de tener en todo momento agua disponible en el sustrato.

3.2. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

La morfología foliar (p. ej., área foliar específica, *SLA*), las características estomáticas (p. ej., el tamaño y la densidad (d) de estomas y la apertura estomática) están fuertemente relacionadas con la actividad fisiológica y el control de la transpiración, relacionadas a su vez con el crecimiento y la supervivencia. En respuesta a la disponibilidad de recursos, las plantas pueden manifestar ajustes en dichas características, conocidos como respuestas plásticas, facilitando la aclimatación de éstas a las condiciones ambientales. Además, la capacidad de aclimatación a un factor ambiental, como por ejemplo la intensidad lumínica, es variable entre especies, poblaciones de una misma especie y entre clones, lo cual refleja aspectos genéticos actuando conjuntamente con los factores ambientales (Schlichting, 1986; Valladares et al., 2002; Mejía de Tafur et al., 2014). Sin embargo, las relaciones entre el tamaño de los estomas, d y la conductancia del estoma (g_s) deben ser tratadas con precaución, porque la velocidad de variación de g_s no está necesariamente relacionada con d o el tamaño de los estomas en diferentes especies, o individuos dentro de una especie (Haworth et al., 2018a).

Los estomas son pequeñas aberturas, localizados principalmente en la superficie de las hojas, que regulan la pérdida de agua (transpiración) y la absorción de CO_2 durante la fotosíntesis. Por lo tanto, las relaciones hídricas y la acumulación de biomasa en la planta están influenciadas por el movimiento de apertura y cierre de los estomas (Bussis et al., 2006; Anderegg et al., 2018) que a su vez son producidos por flujos de iones de potasio (K^+) dentro o fuera de las células guarda (Shimazaki et al., 2007). Dichos mecanismos podrían incluir la desactivación/activación fisiológica del transporte de iones en las células oclusivas, o un control genético de la expresión de los canales de transporte de iones (Gerardin et al., 2018). Cuando un área de la hoja se encuentra en condiciones de alto déficit de presión de vapor hoja-aire (DPV), los estomas generalmente se cierran para evitar la desecación, mientras que un bajo DPV hoja-aire conduce a tasas más altas de g_s ya que el peligro de pérdida excesiva de agua disminuye (Dai et al., 1992; Mott y Peak, 2013). La regulación de la apertura estomática es multigénica, lo que resulta en un mecanismo de control múltiple (el estado hídrico, iluminancia, DPV, actividad fotosintética,

concentración de CO₂, etc.) (Medrano, et al., 2007). Sin embargo, cómo las simultáneas señales estomáticas interactúan e influyen en el comportamiento estomático es relativamente inexplorado (Haworth et al., 2018b). La estanqueidad tras el cierre estomático también constituye un componente importante del control estomático, particularmente durante una sequía cuando es necesario restringir la pérdida de agua por transpiración (García-Mata y Lamattina, 2001). Cuando son expuestos a la sequía, los estomas pueden volverse cada vez más sensibles a la concentración de CO₂ y a la del ácido abscísico en las hojas (ABA), en comparación con la radiación fotosintéticamente activa (PAR), el DPV hoja-aire y el potencial hídrico foliar (Haworth et al., 2018b). Se espera que las especies de plantas con un control estomático más efectivo tengan más éxito en soportar situaciones de déficit hídrico. Sin embargo, no todas las especies de plantas, o individuos dentro de una especie, poseen control estomático igualmente efectivo, tanto en el establecimiento del número de estomas como en la regulación de la apertura estomática (Haworth et al., 2011). Sin embargo, el comportamiento estomático no es universal, ya que algunas especies alteran el número de estomas en las hojas recién desarrolladas en respuesta a la concentración de CO₂, en lugar de utilizar la regulación fisiológica de la apertura estomática (Haworth et al., 2015). Los mecanismos de control estomático empleados por una especie vegetal influyen, entre otros factores, en el riesgo de embolia del xilema al reducir la probabilidad de cavitación a través del cierre estomático durante episodios de alta demanda de transpiración (Jones et al., 2002; Meinzer et al., 2009).

En los limbos foliares de hojas planas, los estomas pueden estar en ambas superficies (hojas anfiestomáticas), o solamente en una de las superficies, por lo general la inferior (hojas hipoestomáticas) (Camargo y Marengo, 2011). En hojas anfiestomáticas, como el caso del *Eucalyptus ssp.*, la frecuencia estomática suele ser mayor en la superficie inferior de la hoja (abaxial), que en la superficie adaxial (Tari 2003).

El tamaño de los estomas y la densidad parecen ser variables anatómicas muy sensibles al cambio en las condiciones ambientales, en especial las condiciones de estrés hídrico, posiblemente relacionadas con la resistencia estomática a la transpiración (Lammertsma et al., 2011). Hetherington y

Woodward (2003) reportaron que, con frecuencia, la densidad estomática se relaciona negativamente con el tamaño de los estomas. La densidad estomática (d) puede variar debido a factores ambientales, tales como la luz, la humedad relativa del aire, la disponibilidad de agua, la concentración atmosférica de CO_2 y el estado de madurez de la planta (Givnish 1988; Woodward y Kelly 1995). Se ha constatado que puede haber un mecanismo de señalización a partir de hojas maduras hacia aquellas en desarrollo, optimizando la densidad y el tamaño estomático frente los cambios de las condiciones ambientales (Lammertsma et al., 2011).

El área foliar específica (SLA), por su parte, es una característica que indica cómo se distribuye la biomasa foliar, buscando un equilibrio entre la ganancia de carbono y la pérdida de agua, puesto que a igualdad de masa, una lámina foliar más amplia y delgada favorece la fotosíntesis pero también la pérdida de agua por transpiración. Es una importante propiedad de adaptación de las plantas a las condiciones ambientales y su plasticidad se ve a menudo como una forma de optimizar su eficiencia en la absorción de luz y la eficiencia en el uso del agua (Poorter y Rozendaal, 2008). SLA está altamente relacionada con las condiciones hídricas del ambiente y los niveles de radiación durante el desarrollo de las hojas (mayor cuanto más humedad y menor radiación). Las variaciones estacionales o interanuales en SLA son habituales en muchas especies, incluido el género *Eucalyptus*, resultado de las variaciones de la luz o de la demanda y disponibilidad de agua (Nouvellon et al., 2010). El menor espesor de la lámina foliar se debe a que el parénquima en empalizada tiene células más pequeñas y/o menor número de capas de células (Canny y Huang, 2006). En especies de *Eucalyptus* de ambientes más xerófilos es común la presencia de tejido en empalizada en ambas caras de la hoja (Smith et al., 1998). Del mismo modo, el déficit hídrico puede causar desorganización y colapso de células y tejidos y alteración en el grosor del mesófilo y de la epidermis en esta especie (Souza et al., 1999). Un mayor grosor de la epidermis y de la cutícula de ésta implica un mejor control de la pérdida de agua bajo condiciones de humedad limitada, lo que mejora la adaptación a condiciones de sequía y salinidad (Bahaji et al., 2002; Ali et al., 2009).

En cuanto al xilema, este género vegetal presenta algunas características particulares como vasos simples distribuidos en porosidad difusa, escasos y, por lo general, en disposición diagonal, con placa de perforación simple y punteaduras intervasculares areoladas y alternas. Los elementos imperforados que acompañan los vasos son traqueidas vasicéntricas y fibras de contorno angular y/o circular, diferenciadas en dos tipos, unas con punteaduras simples y otras con punteaduras areoladas (fibrotraqueidas). Presenta parénquima axial paratraqueal vasicéntrico y/o apotraqueal difuso, y parénquima radial en radios generalmente uniseriados, pero pueden aparecer biseriados, triseriados y excepcionalmente tetraseriados, cuya variación puede estar causada por efectos genéticos y ambientales (Villegas y Rivera, 2002; Pirralho et al., 2014). Aunque hay características inherentes al género, la variación entre especies aconseja el estudio particular de especies y genotipos, ya que influye en la respuesta a las distintas condiciones de disponibilidad de agua y en la transpiración (Navarrete-Campos et al., 2013).

Los objetivos particulares de este capítulo, trabajando con plantas de vivero de los clones de *Eucalyptus* correspondientes a un programa de mejora genética, son: **(i)** Comparar la *SLA* y el tamaño y densidad de estomas en hojas completamente desarrolladas pero de estado juvenil; **(ii)** Evaluar la estacionalidad de los parámetros foliares analizados; **(iii)** Caracterizar las propiedades anatómicas del xilema de tallos y raíces.

3.3. PARÁMETROS FOLIARES

3.3.1. MATERIAL Y MÉTODOS

3.3.1.1. Material vegetal y condiciones de cultivo

El material vegetal utilizado consistió en plantas de una savia de cinco clones de *E. globulus* (códigos de referencia: C14, 225, 227, 358, 437) y cuatro clones de híbridos (*E. x urograndis*, 12€; *E. urograndis x globulus*, HE; *E. dunnii-grandis x globulus*, HG; *E. saligna x maidenii*, HI), obtenidas a partir del enraizamiento de estaquillas en vivero comercial, en envases de 150 cm³ de capacidad, procedentes del programa de selección y mejora vegetal de la empresa ENCE, energía y celulosa S.A. El primero de ellos, C14, es un clon perteneciente a la primera generación de mejora (F₀), de alta productividad y plasticidad, ampliamente utilizado por esta empresa en plantaciones comerciales, incluso en zonas con estación seca estival. Los demás son clones de generaciones de mejora posteriores.

Durante tres años consecutivos, en diciembre, se trasplantaban a contenedores de 10 L donde se mantenían un período vegetativo completo. Se usaron 4 plantas por clon cada vez. El sustrato consistió en una mezcla de turba, fibra de coco y perlita (2:2:1 en volumen), bien regado según necesidad y fertilizados con Ferticote 16-7-8 + 2 MgO + Micros (Burés profesional S.A., España) a la dosis de 1.5 kg m⁻³. Las plantas estaban situadas al aire libre, totalmente expuestas a la luz solar, en una parcela experimental de la Universidad de Huelva (37° 12' 03" N, 6° 54' 53" W, 5 m snm). En la tabla 3.1 se presentan los valores de las variables climáticas relevantes en la zona durante todo el estudio.

Tabla 3.1. Resumen de los valores de temperatura, humedad relativa y radiación en el vivero de los 90 días anteriores a cada fecha de medición, considerando que las mediciones de febrero, mayo y noviembre fueron realizadas a principios de cada mes, y las mediciones de julio fueron realizadas a finales de dicho mes.

Variables	Fechas de medición de parámetros foliares									
	Feb. 2015	Mayo 2015	Julio 2015	Nov. 2015	Feb. 2016	Mayo 2016	Julio 2016	Nov. 2016	Feb. 2017	Mayo 2017
T'a (°C)	16.3	19.9	30.0	24.9	19.8	19.3	28.6	27.3	17.9	20.9
t'a (°C)	3.3	6.9	15.1	14.0	8.5	7.5	14.4	13.8	5.7	8.0
H'a (%)	102.1	100.1	89.6	95.8	95.2	93.6	86.7	86.9	89.8	91.6
h'a (%)	59.0	52.3	33.1	51.0	52.7	45.9	37.0	42.8	50.5	46.3
R (MJ/(m ² d))	9.3	16.2	26.3	16.0	9.1	16.8	26.2	17.1	9.5	16.2

- *T'a / H'a*: media de las temperaturas / humedades relativas máximas diarias del período de 90 días.
- *t'a / h'a*: media de las temperaturas / humedades relativas mínimas diarias del período de 90 días.
- *R*: radiación solar acumulada diaria en el período de 90 días.

3.3.1.2. Tamaño y densidad de los estomas en la superficie foliar

En cuatro épocas del año (hojas de primavera, verano, otoño e invierno), en 10 fechas durante 2.5 años seguidos, se tomaron 2–4 hojas por clon. Las hojas eran juveniles pero completamente desarrolladas, y se tomaron del 3^o–5^o verticilo del tallo principal. De dichas hojas, se extrajeron huellas o impresiones (impresión foliar) hechas con laca base de uñas teñida de color rosa o naranja con el objetivo de distinguir los estomas. Las impresiones se obtuvieron de la cara abaxial de las hojas, en tres zonas (basal, central y apical) (Figura 3.1), una vez comprobado que en el lado adaxial no había estomas o eran extremadamente escasos. La imagen grabada en la película de laca de uñas se montó sobre un portaobjetos que permitía su visualización al microscopio óptico (Figura 3.2). Una cámara de vídeo, acoplada a un software capturador de imágenes (Leica LAS EZ, Leica Microsystems), montada sobre el microscopio nos permitió tomar imágenes de las preparaciones hechas. Fue necesaria la captura de fotos con aumento 100x para la densidad (*d*; número de estomas por mm²), y 400x para las dimensiones de ancho y largo, tanto de células oclusivas (AS, LS, respectivamente) como de la apertura de la epidermis sobre el ostiolo

(AO, LO) (Figura 3.1). En la Figura 3.3 se muestra un ejemplo de las imágenes capturadas.

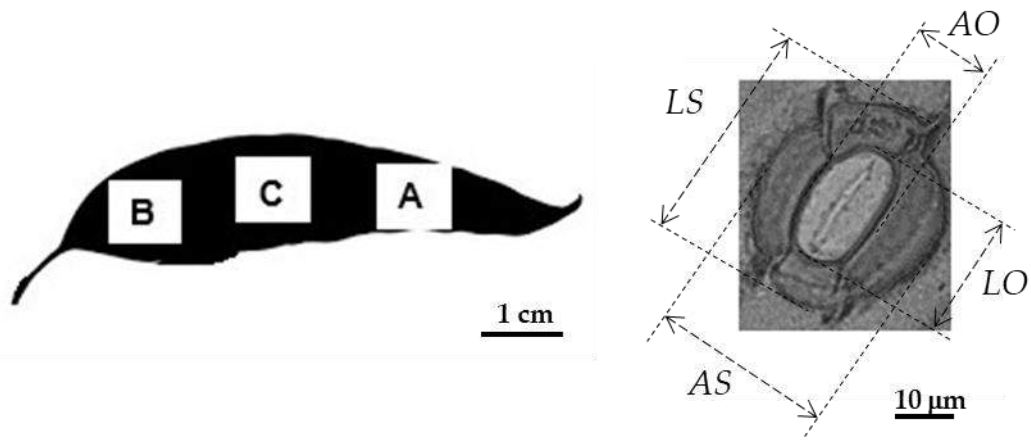


Figura 3.1. (Izda.) Zonas de la hoja (B; C; A) de las cuales se tomaron las impresiones para observar los estomas, y (Dcha.) el ancho y largo de las células oclusivas (AS, LS) y de la apertura de la epidermis sobre el ostiolo (AO, LO).



Figura 3.2. Muestras montadas sobre un portaobjetos.

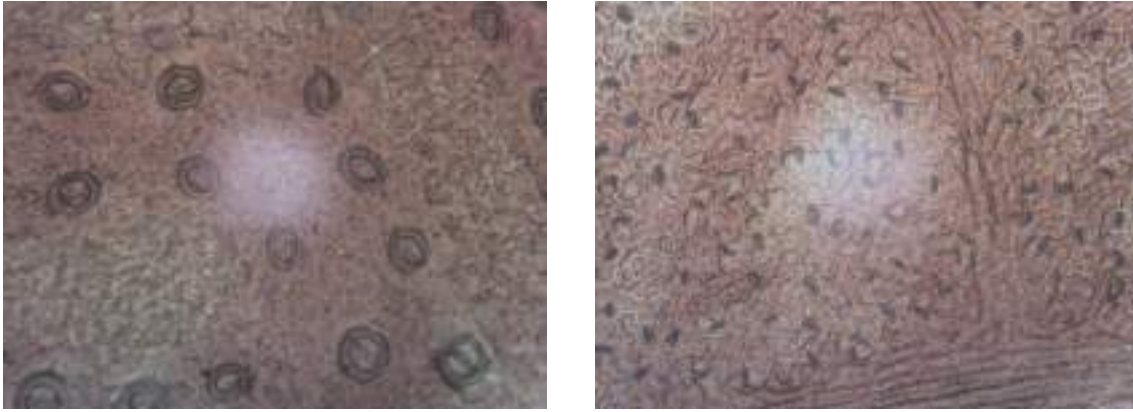


Figura 3.3. (Izda.) Estomas en aumento de 400x para la medición de las dimensiones, largo y ancho; (Dcha.) Estomas vistos en aumento de 100x para medición de la densidad.

De cada zona de la hoja se tomaron dos fotos aleatoriamente. Sobre cada foto, para determinar la densidad, se contabilizaron el número de estomas presentes en cuadrículas tomadas al azar de tamaño $250 \times 250 \mu\text{m}$ (0.0625 mm^2). Se midieron 30 cuadrículas por hoja (10 cuadrículas por zona). Para las dimensiones de los estomas (AS , LS , AO , LO), fueron medidos 93 estomas de cada hoja (31 estomas por zona), escogidos aleatoriamente. También se calculó el máximo potencial de apertura estomática que deja la epidermis sobre los ostiolos, a partir de la ecuación, $d \times (\pi \times AO \times LO)/4$. Como este último parámetro no tiene unidades, ya que es mm^2 de apertura estomática por cada mm^2 de superficie foliar, se expresó como un porcentaje (%).

3.3.1.3. Estructura transversal de la hoja

Se seleccionaron 3 hojas, de tres plantas distintas, del vástago principal de cada clon. Se tomaron secciones cuadradas de 2 x 2 cm de la parte media de cada hoja y se conservaron en solución hidroalcohólica al 50 %. Todas las muestras se tomaron para una fecha concreta, julio de 2015. Dichas muestras fueron tratadas por el método de infiltración o inclusión en parafina, que consiste en una perfusión de la parafina en los tejidos para crear un medio homogéneo. Este mismo método se utilizó para las muestras de xilema (apdo. 3.4.1.1), con la particularidad de que los tiempos de inclusión, hidratación y deshidratación fueron más largos para las de xilema. La técnica comienza con la deshidratación de los materiales en alcoholes etílicos de graduación creciente. La inclusión en parafina se hizo según el método de Johansen (1940), utilizando como medio de inclusión Paraplast Plus y reemplazando el xilol por Bioclear. Se realizaron cortes de 12 μm con micrótopo rotativo de Minot (MicroTec®, CUT 4060, Alemania) (Figura 3.4). Seguidamente, se procedió con las técnicas de tinción, con la utilización de Azul de metileno y Safranina (Figura 3.5). Después de la tinción, las preparaciones se montaron en portaobjetos con medio de montaje Eukitt®. A partir de las preparaciones histológicas realizadas, se obtuvieron imágenes digitales con 200 aumentos (200x) en un microscopio (Leica, modelo DMLS), con adaptación para una cámara de vídeo (Leica, modelo ICC A), conectado a una tarjeta de captura de imágenes (Leica, MC170 HD) para su posterior análisis (Figura 3.6). Asimismo, se capturó una imagen con una escala de longitud conocida (Figura 3.7) para tomarla como referencia en las mediciones.

En los cortes de las láminas foliares se evaluó: el grosor de dicha lámina foliar, el de ambas epidermis (adaxial y abaxial) y el del parénquima en empalizada. Se realizaron ocho observaciones por hoja (planta). Las mediciones en las imágenes digitales se realizaron mediante el analizador de imágenes (Leica LAS EZ ver 3.4.0).

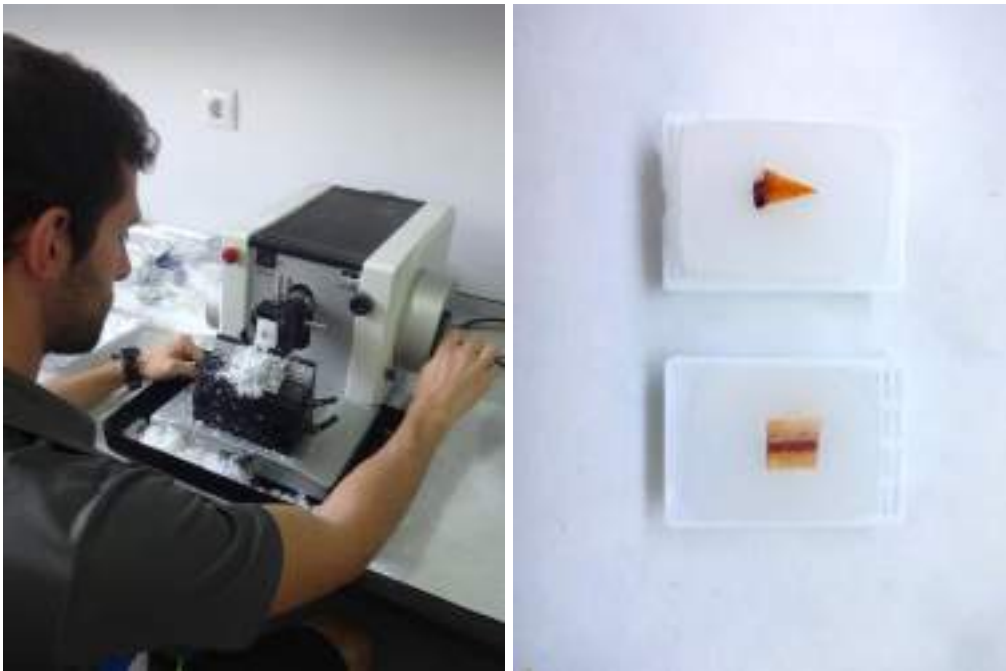


Figura 3.4. (Izda.) Proceso de obtención de cortes histológicos con micrótopo rotativo; (Dcha.) Muestras de xilema fijadas en parafina sobre bio-cassettes.



Figura 3.5. (Izda.) Cestilla con varias muestras para su tinción en una cubeta; (Dcha.) Portaobjetos presentando cortes transversal y longitudinal de muestras de xilema.

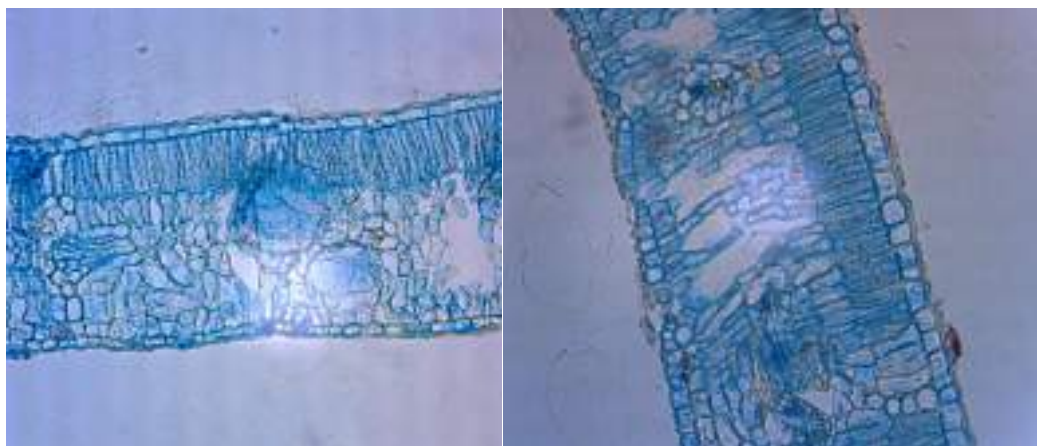


Figura 3.6. Cortes transversales de lámina de hoja de *Eucalyptus* spp.

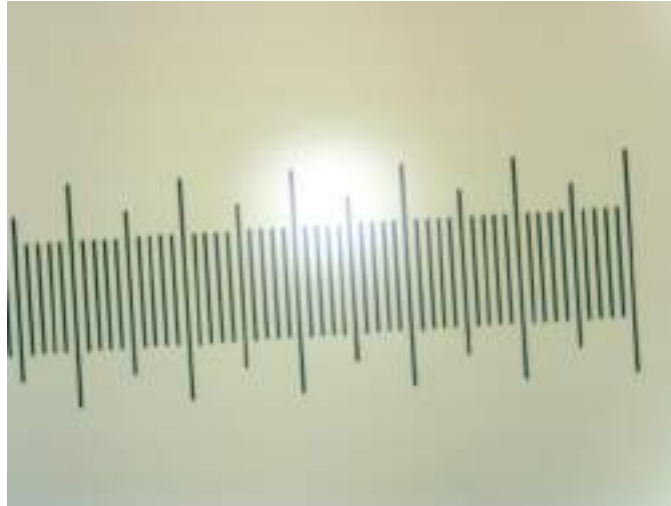


Figura 3.7. Escala graduada para referencia en las mediciones. La distancia entre dos rayas equivale a 10 μm .

3.3.1.4. Área foliar específica (SLA)

El área foliar específica se obtuvo a través del muestreo destructivo de hojas juveniles, completamente desarrolladas, crecidas en las cuatro épocas del año (otoño, invierno, primavera y verano) correspondientes al 3^o–4^o verticilo superior de los tallos. Se tomaron tres hojas por clon, de tres plantas diferentes, en cada fecha de medición, con un total de 10 fechas de muestreo durante 2.5 años.

Las hojas fueron escaneadas para determinar el área foliar (AF) con la ayuda del software ImageJ. Asimismo, seguidamente, se llevaron a estufa hasta peso constante a 70 °C durante 72 horas para determinar su peso seco (PS). Con estos últimos datos se pudo calcular el área foliar específica ($SLA = AF/PS$, $\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$).

3.3.1.5. Análisis de datos

Para la densidad de los estomas en la superficie foliar, el análisis de los datos se realizó siguiendo un Modelo Mixto Generalizado con distribución Poisson y función de enlace logarítmica. En un primer análisis de la densidad estomática, se ha apreciado una sobredispersión de los datos. Para corregirlo, se ha añadido al modelo un parámetro de dispersión. Para el tamaño de los estomas y para la estructura transversal de la hoja, el análisis de los datos se

realizó siguiendo un Modelo Lineal Mixto con distribución Gaussiana y función de enlace identidad. Para la densidad y el tamaño de los estomas, se consideraron los efectos fijos Clon, Fecha e interacción Clon x Fecha y como aleatorio la planta anidada dentro del clon. Para la estructura transversal de la hoja, se consideró el efecto fijo Clon y, como efecto aleatorio, la planta anidada dentro del clon. Las diferencias significativas entre los grupos de los distintos factores fueron analizadas mediante el test de *Scheffé*. Para *SLA*, el análisis de los datos se realizó siguiendo un Modelo Lineal General de dos factores (clon, fecha), que se consideraron fijos, y las diferencias entre los grupos de los distintos factores fueron analizadas mediante el test T3 de Dunnett. Se utilizó el paquete estadístico SAS ® 9.2. Las diferencias se consideraron significativas para un nivel de significación $p \leq 0.05$.

3.3.2. RESULTADOS

3.3.2.1. Características estomáticas

Comparando los estomas en hojas crecidas y recolectadas en las cuatro épocas del año antes mencionadas, se detectaron diferencias significativas para la densidad estomática entre los distintos clones ($p < 0.001$) y entre fechas ($p < 0.001$) (Tabla 3.2). Asimismo, la interacción entre los dos factores resultó significativa ($p < 0.001$), indicando un patrón de evolución temporal distinto entre clones (Figura 3.8).

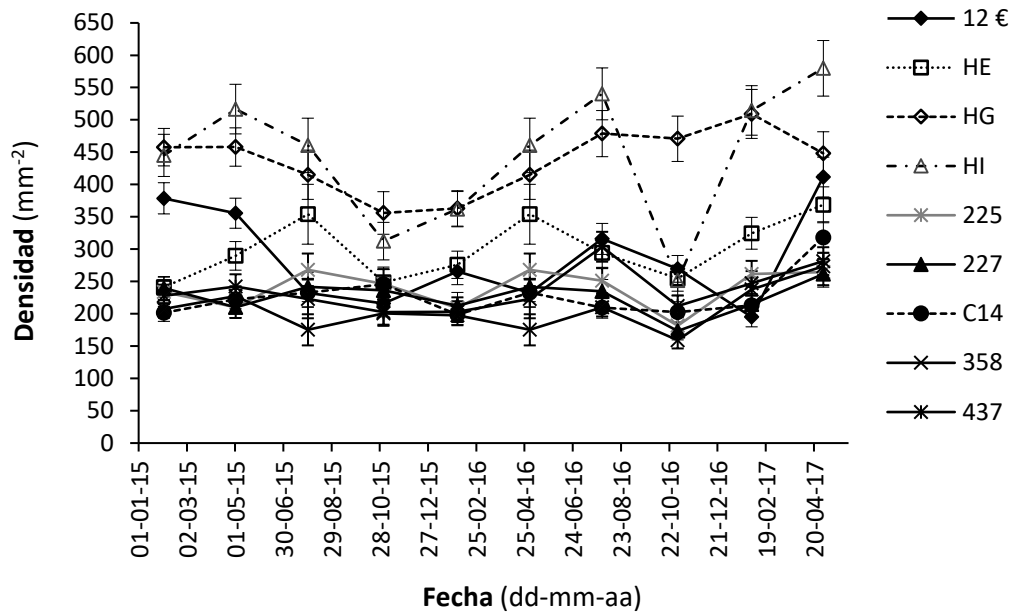


Figura 3.8. Valores medios (\pm ET) de la densidad (d) de estomas en las diez fechas de medición de los nueve clones de eucalipto estudiados.

Respecto al tamaño de los estomas, largo (LS) y ancho (AS), se detectaron diferencias significativas, tanto para LS como para AS , entre los distintos clones ($p < 0.001$) y fechas ($p < 0.001$) (Tabla 3.2), así como para la interacción Clon x Fecha, $p < 0.001$ para LS y $p = 0.014$ para AS (Figuras 3.8 y 3.9).

Tabla 3.2. Valores medios (\pm ET) de la densidad (*d*), ancho (*AS*) y largo (*LS*) de las células oclusivas, así como la relación entre el ancho y el largo, de los estomas de los distintos genotipos de eucalipto ensayados y fechas de medición. *p* = nivel de significación. Para cada factor principal (*clon*, *fecha*) letras distintas en cada columna indican diferencias significativas.

Clon	<i>d</i> (nº mm ⁻²)	<i>LS</i> (µm)	<i>AS</i> (µm)	<i>AS/LS</i>
Total	285.5 ± 7.6	21.88 ± 0.29	16.62 ± 0.25	0.763 ± 0.004
Clon				
12€	278.8 ± 7.1 b	18.51 ± 0.28 a	14.18 ± 0.24 a	0.768 ± 0.004 ab
HE	297.3 ± 8.5 b	23.94 ± 0.27 d	17.95 ± 0.24 d	0.751 ± 0.004 a
HG	434.5 ± 10.8 c	21.28 ± 0.30 b	15.93 ± 0.26 b	0.751 ± 0.005 a
HI	431.4 ± 11.2 c	19.10 ± 0.29 a	14.32 ± 0.25 a	0.752 ± 0.004 a
225	237.6 ± 6.2 a	21.56 ± 0.28 bc	16.52 ± 0.25 bc	0.770 ± 0.004 ab
227	225.4 ± 6.0 a	23.02 ± 0.29 cd	17.53 ± 0.25 cd	0.765 ± 0.004 ab
C14	225.6 ± 5.8 a	24.03 ± 0.28 d	18.22 ± 0.24 d	0.760 ± 0.004 ab
358	204.0 ± 5.9 a	22.24 ± 0.30 bc	16.93 ± 0.26 bcd	0.765 ± 0.005 ab
437	234.7 ± 6.9 a	23.22 ± 0.30 cd	18.04 ± 0.27 d	0.781 ± 0.005 b
<i>p</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Fecha				
Feb_15	278.1 ± 6.4 bcd	21.58 ± 0.27 bcd	15.87 ± 0.23 bcd	0.740 ± 0.004 a
Mayo_15	287.0 ± 6.9 cd	22.76 ± 0.27 de	17.61 ± 0.23 ef	0.780 ± 0.004 d
Julio_15	275.9 ± 10.0 abcd	20.73 ± 0.40 bc	15.97 ± 0.35 bcde	0.776 ± 0.006 bcd
Nov_15	247.3 ± 7.8 abc	18.41 ± 0.35 a	13.77 ± 0.31 a	0.751 ± 0.005 abc
Feb_16	247.0 ± 6.5 ab	22.75 ± 0.29 cde	17.24 ± 0.26 def	0.761 ± 0.004 abcd
Mayo_16	275.9 ± 10.0 abcd	24.23 ± 0.29 e	18.67 ± 0.25 f	0.773 ± 0.004 bcd
Julio_16	298.8 ± 7.5 de	26.12 ± 0.29 f	20.20 ± 0.25 g	0.777 ± 0.004 cd
Nov_16	229.3 ± 6.1 a	20.27 ± 0.29 ab	15.19 ± 0.26 abc	0.753 ± 0.004 abc
Feb_17	283.0 ± 7.1 bcd	20.20 ± 0.27 ab	15.07 ± 0.25 ab	0.750 ± 0.004 ab
Mayo_17	343.6 ± 8.7 e	21.75 ± 0.29 bcd	16.65 ± 0.25 cde	0.770 ± 0.004 bcd
<i>p</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

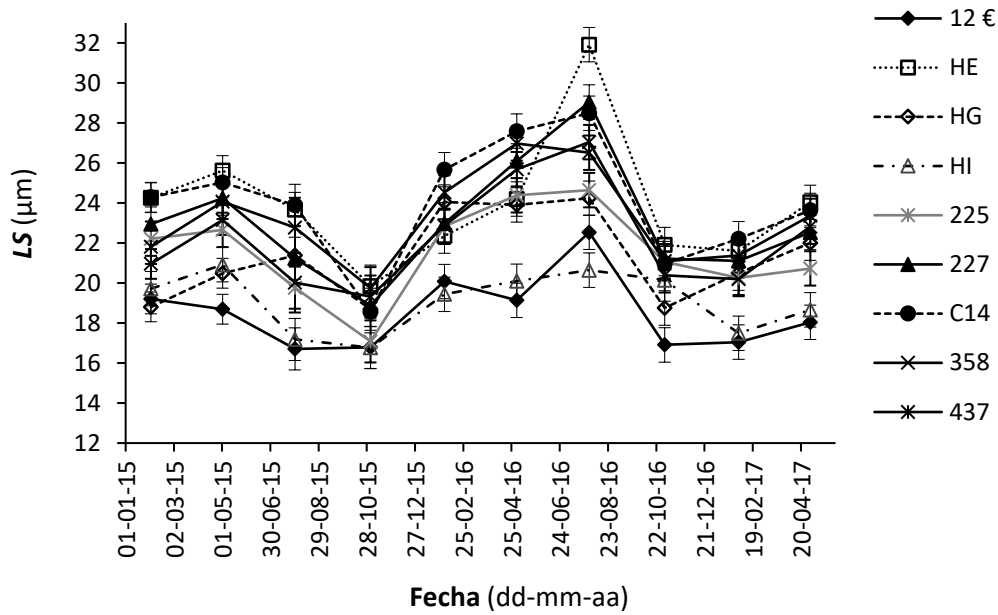


Figura 3.9. Longitud de las células oclusivas de los estomas (LS) de los nueve clones de eucalipto estudiados en las diez fechas de medición (media \pm ET).

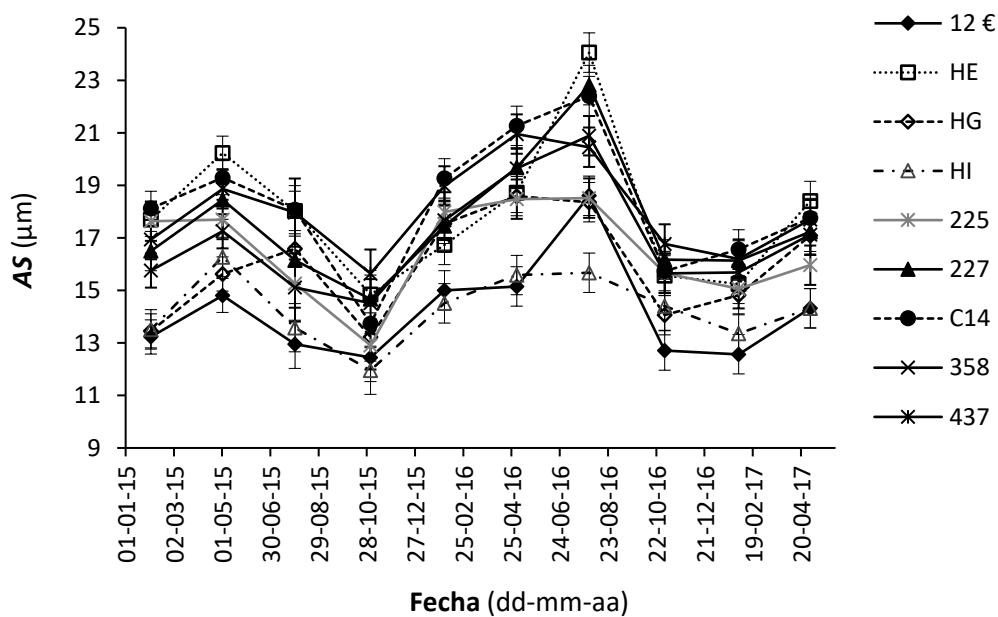


Figura 3.10. Ancho de las células oclusivas de los estomas (AS) de los nueve clones de eucalipto estudiados en las diez fechas de medición (media \pm ET).

Asimismo, para la relación AS/LS se detectaron diferencias significativas entre los distintos clones ($p < 0.001$) y entre fechas de medición ($p < 0.001$) (Tabla 3.2), así como para la interacción Clon x Fecha ($p < 0.001$) (Figura 3.11).

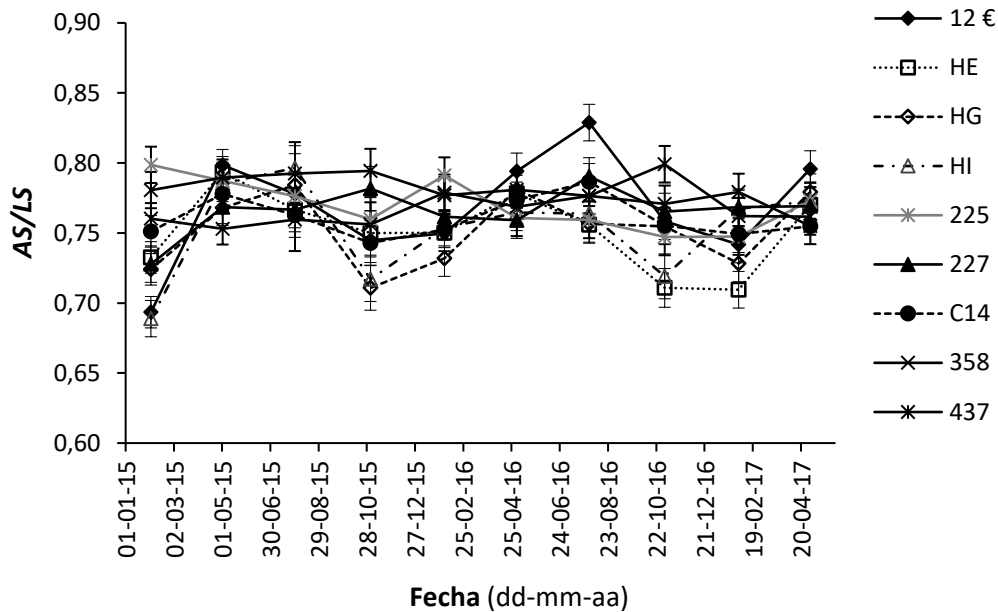


Figura 3.11. Relación entre el ancho y el largo de las células oclusivas de los estomas (AS/LS) de los nueve clones de eucalipto estudiados en las diez fechas de medición (media \pm ET).

Las correlaciones de los ocho parámetros evaluados, ancho y largo de células oclusivas (AS, LS) y de la apertura de la epidermis (AO y LO), ratio entre ancho y largo de la apertura de la epidermis (AO/LO), ratio entre ancho y largo de las células oclusivas (AS/LS), ratio entre el ancho de las oclusivas y de la apertura de la epidermis (AS/AO) y ratio entre el largo de las oclusivas y de la apertura de la epidermis (LS/LO), se presentan en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Coeficientes de correlación (r) entre los ocho parámetros evaluados en los estomas para el conjunto de todos los clones. $N = 14043$ para todos ellos. El nivel de significación (p) resultó menor de 0.01 en todos los casos.

	LS	AS	LO	AO	AS/LS	AO/LO	AO/AS	LO/LS
LS	1							
AS	0.746	1						
LO	0.795	0.621	1					
AO	0.596	0.767	0.683	1				
AS/LS	-0.193	0.492	-0.114	0.343	1			
AO/LO	-0.162	0.246	-0.293	0.472	0.580	1		
AO/AS	-0.129	-0.219	0.162	0.435	-0.167	0.388	1	
LO/LS	-0.140	-0.060	0.471	0.245	0.097	-0.256	0.458	1

LO ($14.36 \pm 0.21 \mu\text{m}$, en un rango de 4.85 a $28.68 \mu\text{m}$) se correlacionó significativamente con LS, y AO ($10.06 \pm 0.16 \mu\text{m}$, en un rango de 3.41 a 21.98

μm) se correlacionó significativamente con AS (Tabla 3.3). No se han presentado con más detalle los resultados obtenidos para AO y LO debido a las altas y significativas correlaciones de estos dos parámetros con AS y LS, respectivamente, así como su similar evolución temporal y diferenciación entre clones.

Los restantes parámetros no presentaron altas correlaciones entre sí ni con los demás parámetros, a pesar de la significación obtenida (Tabla 3.3). Los valores obtenidos fueron: $AO/LO = 0.708 \pm 0.005$ (rango de 0.302 a 1.450); $AO/AS = 0.598 \pm 0.005$ (rango de 0.213 a 1.007); y $LO/LS = 0.648 \pm 0.005$ (rango de 0.246 a 0.960). No obstante se evaluó el máximo potencial de apertura estomática por unidad de superficie foliar, calculado mediante el producto de la densidad estomática (mm^{-2}) por el área máxima de apertura considerada como una elipse (μm^2) (es decir, $d [\pi AO LO]/4$). Este parámetro, que no tiene unidades, reveló que todos los clones de *E. globulus* más el híbrido 12€ se situaron en el rango más bajo, de 2.3 % (12€) a 3.2 % (C14), mientras que los otros tres híbridos se situaron en un rango de 3.7 % (HI) a 4.4 % (HG).

3.3.2.2. Sección transversal de la hoja

No se detectaron diferencias significativas entre clones en los cuatro parámetros analizados para la fecha de medición llevada a cabo: grosor de la lámina foliar ($p = 0.111$), con valor medio de $267.56 \pm 27.4 \mu\text{m}$; grosor de la epidermis adaxial ($p = 0.160$), con valor medio de $20.6 \pm 2.1 \mu\text{m}$; grosor de la epidermis abaxial ($p = 0.370$), con valor medio de $17.1 \pm 1.6 \mu\text{m}$ y grosor del parénquima en empalizada ($p = 0.500$), con valor medio de $76.7 \pm 7.5 \mu\text{m}$. En el análisis de datos realizado se observó que el mayor porcentaje de la varianza total correspondió a la muestra (planta) para todos los parámetros, lo que llevó a que el efecto clon no resultase significativo, incluso para el grosor de la lámina foliar.

3.3.2.3. Área foliar específica (SLA)

Se detectaron diferencias significativas entre los distintos clones, fechas de medición (Tabla 3.4) y para la interacción Clon x Fecha ($p < 0.001$) (Figura 3.12). Estos valores son los obtenidos en plantas crecidas al aire libre, sin malla de sombreado. En plantas crecidas bajo la malla de sombreado del 50 % se midió solamente en una fecha (noviembre de 2016) y el valor medio por clon (en μm) fue: 19.17 ± 0.82 para 12€; 18.99 ± 0.82 para HE; 17.40 ± 0.82 para HG; 17.53 ± 0.76 para HI; 12.79 ± 0.76 para 225; 14.44 ± 0.71 para 227; 11.70 ± 0.66 para C14; 13.07 ± 0.66 para 358; y 12.17 ± 0.66 para 437.

Tabla 3.4. Valores medios (\pm ET) del área foliar específica (SLA) de las hojas de los distintos genotipos de eucalipto ensayados y fechas de medición. p = nivel de significación. Para cada factor (clon, fecha) letras distintas en cada columna indican diferencias significativas.

	SLA ($\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$)		SLA ($\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$)
Total	10.36 ± 0.15		
	Clon		Fecha
12€	13.36 ± 0.63 c	Feb_2015	11.53 ± 0.29 c
HE	9.91 ± 0.30 ab	Mayo_2015	10.08 ± 0.33 bc
HG	12.17 ± 0.45 c	Julio_2015	9.85 ± 0.70 abc
HI	11.02 ± 0.35 bc	Nov_2015	14.41 ± 0.62 d
225	9.17 ± 0.34 a	Feb_2016	10.61 ± 0.36 bc
227	9.67 ± 0.36 ab	Mayo_2016	8.12 ± 0.22 a
C14	9.02 ± 0.33 a	Julio_2016	9.18 ± 0.31 ab
358	9.29 ± 0.32 a	Nov_2016	10.73 ± 0.38 bc
437	9.11 ± 0.35 a	Feb_2017	11.81 ± 0.43 cd
		Mayo_2017	8.26 ± 0.31 a
<i>p</i>	<0.001		<0.001

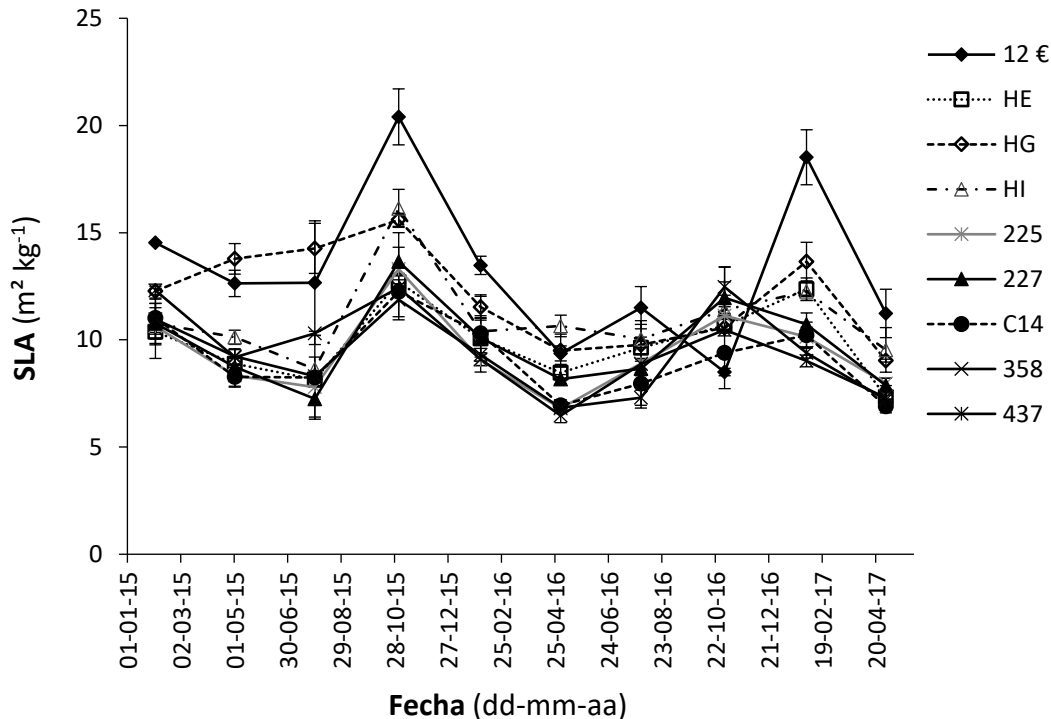


Figura 3.12. Área foliar específica (SLA) de los nueve clones de eucalipto estudiados en las diez fechas de medición (media \pm ET).

3.3.3 DISCUSIÓN

En los clones de eucalipto del presente estudio, la presencia de estomas se concentró en la superficie abaxial de la hoja. Para todos los clones estudiados se encontró una cantidad muy baja de estomas en la superficie adaxial, 2–3 estomas por milímetro cuadrado. Esto es debido a que se han utilizado hojas completamente desarrolladas pero de plantas en estado juvenil, de corta edad. Estas especies suelen presentar dimorfismo foliar marcado entre estado juvenil y maduro, muy marcado para los clones de *E. globulus*, que también se hace patente en la disposición de los estomas en el limbo foliar. Para hojas del estado de madurez, las diferencias morfológicas entre haz y envés se minimizan, especialmente para *E. globulus*, *E. maidenii* y *E. saligna*, pudiendo encontrar estomas en ambas caras del limbo. No obstante, aunque puede haber presencia de estomas en ambas superficies en hojas adultas, Tuffi Santos et al. (2006), al estudiar la densidad de estomas también en hojas juveniles de *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla*, *E. saligna*, *E. pellita* y *E. resinífera*, constataron que, para

el conjunto de especies, en la superficie adaxial (10–80 estomas mm^{-2}) había 10 veces menos estomas que en la superficie abaxial (600 estomas mm^{-2}), con diferencias entre clones.

En las plantas de este estudio, los valores medios de densidad estomática de la cara abaxial se situaron entre 204 y 434 estomas por mm^2 , dentro del rango de valores medios de hojas esclerófilas (100–500 mm^{-2} , Larcher [2006]), de especies que habitan en la selva tropical (Camargo y Marengo, 2011) o en zonas templadas como *Pinus taeda*, *Taxodium distichum* o *Ilex cassine* (Lammertsma et al., 2011), pero inferior a los 750–1050 mm^{-2} contabilizados en especies subtropicales como *Toona ciliata* (Carins Murphy et al., 2014) o los más de 1000 que alcanzan algunos robles y arces de zonas templadas húmedas (Lammertsma et al., 2011). Las hojas que crecieron fundamentalmente en primavera, concretamente desde el final del invierno hasta principios de verano (mediciones de mayo y julio), tendieron a presentar una mayor densidad de estomas, lo que facilita la vía de salida del agua (y asimilación de CO_2) en la época en que hay disponibilidad hídrica en el suelo y la demanda atmosférica no es excesiva (Héroult et al., 2013; Bhusal et al., 2018; Haworth et al., 2018a). Sin embargo, en las desarrolladas durante el centro y final del verano (principalmente desde finales de julio hasta finales de septiembre), que corresponden a las medidas tomadas a principios de noviembre, cuando suele haber limitación de agua y mayor demanda atmosférica, la densidad estomática disminuyó, lo que posibilita que las plantas ahorren agua y resistan mejor los eventos de sequía. Todo ello hace suponer que, aparte de la disponibilidad de agua y nutrientes del suelo, las plantas respondieron a otros estímulos ambientales (fotoperíodo, radiación solar, temperatura del aire, humedad relativa, etc., Dai et al., 1992; Eksteen et al., 2013; Haworth et al., 2015). Estos últimos controlaron en todo momento la densidad estomática de las nuevas hojas en desarrollo, y que debe haber un mecanismo interno de captación del estímulo y transmisión de la señal (Dai et al., 1992).

Los clones con mayor densidad estomática de los aquí estudiados, considerando todas las fechas, fueron los híbridos HI y HG, presentando una media en torno a 430 estomas por mm^2 , mientras que la densidad estomática

para los clones 358, C14, 437, 227 y 225, todos ellos de *E. globulus*, fue la mitad que para los anteriores. La menor densidad estomática de *E. globulus* en los clones estudiados, podría ser un carácter relacionado con la adaptación a la sequía, aunque habrá que tener en cuenta otros caracteres en su conjunto (Gharun et al. 2015). Para *Azadirachta indica* A. Juss y *Populus* sp., por ejemplo, d se correlacionó positivamente con la fotosíntesis neta y la producción de biomasa para *A. indica* (Araus et al., 1986) o con g_s para *Populus* sp. (Pearce et al., 2006). Por otro lado, los clones de *E. globulus* y el clon HE tendieron a mantener la densidad estomática a lo largo del año ($\Delta d < 150 \text{ mm}^{-2}$), mientras que los otros tres clones variaron la densidad entre fechas de 160 mm^{-2} (HG) a 300 mm^{-2} (HI). Por tanto, curiosamente, estos últimos clones mostraron mayor plasticidad que los clones de *E. globulus* en cuanto a este parámetro.

En general, los valores de longitud y ancho de las células oclusivas se mostraron menores en las hojas crecidas entre mediados-finales de verano y principios del otoño (medición de noviembre), y mayores en las hojas que crecieron en primavera, lo que indica un cierto grado de aclimatación del aparato estomático al cambio en las condiciones ambientales, que origina estomas menores en épocas más cálidas y secas. Eso puede ser explicado porque durante los meses de primavera-invierno, cuando la temperatura, radiación y fotoperiodo son menores y la humedad relativa mayor (Tabla 3.1), el desarrollo de las hojas podría estar favoreciendo la formación de estomas de mayor tamaño, y viceversa en el caso del verano y los primeros meses del otoño, con el objetivo de regular el intercambio gaseoso y la eficiencia de uso del agua. El mismo fenómeno fue encontrado para plantas de *Sequoia sempervirens* en diferentes plantaciones de Chile (Toral et al., 2010). En la comparación entre clones, en general mayor para los que contienen genes de *E. globulus*, cabe destacar las diferencias significativas de C14 y HE ($LS = 24 \mu\text{m}$, $AS = 18 \mu\text{m}$) respecto de 12€, HI y HG ($LS = 18.5\text{--}21.3 \mu\text{m}$, $AS = 14.2\text{--}15.9 \mu\text{m}$). Estos valores se encuentran en un rango levemente superior a los encontrados para otras tres especies de *Eucalyptus* (*E. delegatensis*, *E. pauciflora* y *E. radiata*), que mostraron un rango de $9.8\text{--}12.0 \mu\text{m}$ para LO y de $10.0\text{--}14.0 \mu\text{m}$ para AS (Gharun et al. 2015).

Por otro lado, considerando la combinación del tamaño y d en nuestro estudio (es decir, $d \times (\pi \times AO \times LO)/4$), los clones con el mayor potencial de apertura estomática por unidad de superficie foliar, HG, HE y HI, podrían tener un mayor potencial de transpiración con estomas completamente abiertos, mientras que al mismo tiempo presentan un riesgo de pérdida excesiva de agua en situaciones de escasez de agua cuando el control estomático no sea óptimo. Se ha reportado que d y la longitud de las células oclusivas están relacionadas con g_s y la fotosíntesis neta, así como con otras características fisiológicas de la planta (Mott y Peak, 2013; Xu y Zhou, 2008; Drake et al., 2013; Xiong et al., 2018). Sin embargo, en otros estudios recientes, no se han detectado correlaciones significativas entre d , el tamaño y la rapidez de la respuesta estomática (Haworth et al., 2015; Elliott-Kingston et al., 2016). Por lo tanto, se puede asumir que las modificaciones y ajustes estacionales del tamaño y la densidad estomática encontrados en este estudio pueden afectar la fisiología de las plantas, al menos hasta cierto punto. Estas modificaciones seguramente permiten que cada clon se autoajuste para mantener su mejor nivel de eficiencia fotosintética, respondiendo a los estímulos ambientales. Sin embargo, los resultados de este estudio no demostraron que d y el tamaño de los estomas, por sí solos, fueran criterios de selección de clones relevantes para el ahorro de agua, ya que en el caso de plantas bien regadas (p. ej., $\Psi \geq -1.0$ MPa), las tasas máximas de transpiración fueron similares entre clones (Figura 4.25). Por lo tanto, cuando se supone que todos los poros están completamente abiertos, aparte del potencial máximo de apertura estomática por unidad de superficie foliar determinado por d y el tamaño de los estomas, se deben tener en cuenta otros factores, tales como la conductancia del mesófilo, la resistencia de la capa límite, etc. Además, la pérdida de agua, que depende de la apertura estomática y de otros factores ambientales, puede variar considerablemente incluso para las plantas con un buen estado hídrico, y este mecanismo de control múltiple parece tener un mayor efecto en la cantidad total de agua transpirada todos los días que d y el tamaño estomático.

Estudios de diferentes especies arbóreas, tales como en álamos ribereños crecidos en ambiente semiárido (Pearce, 2006); en especies de selva tropical como *Eschweilera bracteosa* y *Ferdinandusa elliptica* (Camargo y Marengo,

2011); en diversas especies de frondosas de clima subtropical como *Quercus fabri* y *Acer davidii* (Kröber y Bruelheide, 2014); como también en *Eucalyptus globulus*, comparando poblaciones de lugares con alta y baja precipitación (Franks et al., 2009), reportaron una tendencia a reducción del tamaño de los estomas al aumentar la densidad. Sin embargo, en nuestro estudio, a pesar de presentar una correlación negativa significativa entre d y tamaño de los estomas en los nueve clones en su conjunto ($p = 0.017$), la correlación fue muy débil ($r = -0.252$) y no fue significativo para cada clon por separado ($p > 0.10$).

Los menores valores de la ratio AS/LS obtenidos en los clones HE, HG y HI indica una forma menos redondeada de los estomas respecto a los demás clones estudiados, pero sin variar esta forma en el tiempo. Tanto la longitud (LS), como el ancho (AS) de las células oclusivas presentaron una alta correlación positiva, respectivamente, con la longitud (LO) y con el ancho (AO) de la apertura dejada por la epidermis, lo que indica que en el estándar global el tamaño de un tipo de células influye en el tamaño de la estructura estomática asociada.

Para los cuatro parámetros analizados de la sección transversal de las láminas foliares (grosor de la lámina foliar, de la epidermis adaxial, de la epidermis abaxial y del parénquima en empalizada), aunque han sido obtenidas diferencias significativas entre especies de *Eucalyptus* (Guarnaschelli et al., 2009), en los clones de las distintas especies de nuestro estudio no fueron detectadas diferencias. Esto pudo ser debido al menor número de muestras o a que corresponden solamente a una fecha de medición. Sería de esperar que, al menos uno de los parámetros, el grosor de la lámina foliar, sí presentase diferencias entre clones para algunas fechas, tal y como ocurrió para el área foliar específica (SLA).

En cuanto a SLA , Sefton et al. (2002) estudiando plántulas de tres especies de *Eucalyptus* (*E. occidentalis*, *E. camaldulensis* y *E. grandis*), observaron que en las primeras etapas del desarrollo los valores de SLA eran mayores y con mayor variación entre las especies, pero a medida que maduraban las hojas y crecían las plantas esos valores convergieron, en un rango de $16.1 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$ (*E. occidentalis*) hasta $25.4 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$ (*E. grandis*). Los valores encontrados en los clones de nuestro estudio, con plantas entre 1 y 2 años de edad, estuvieron en

un rango de $9.0 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$ (C14) a $13.4 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$ (12€) para plantas crecidas al aire libre, y en un rango de $11.7 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$ (C14) a $19.2 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$ (12€) para plantas crecidas bajo la malla de sombreado del 50 %. Por tanto, por debajo del rango medido por Sefton et al. (2002), especialmente las crecidas al aire libre, en un ambiente de alta radiación y humedad relativa más baja. La variación en *SLA* encontrada entre los dos ambientes lumínicos (total exposición y bajo malla de sombreado del 50 %) indica que las plantas son capaces de captar estímulos ambientales, tales como la radiación luminosa, y modificar la estructura de las hojas durante su desarrollo, pero con distinto grado de plasticidad entre clones. En nuestro estudio, los menores valores encontrados para los clones de *E. globulus* y el clon HE, diferenciados principalmente de 12€ y HG que tienen genes de *E. grandis*, así como de HI, indicaría hojas más gruesas para los *E. globulus*, propio de su mayor adaptación a climas secos, comparado con *E. grandis* típico de climas más húmedos. El clon HE, por su parte, emparentado con *E. globulus* y *E. grandis*, parece que para este parámetro ha dominado la herencia del primero. En la evolución estacional de los clones estudiados, hubo una reducción progresiva en *SLA* desde las hojas formadas en otoño-invierno, medición de febrero ($10.6\text{--}11.8 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$), hasta las formadas en época primaveral, mediciones de mayo y julio ($8.1\text{--}10.1 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$), resultado de la variación de las condiciones climáticas de humedad relativa, radiación y temperatura (Tabla 3.1), teniendo en cuenta que las plantas estuvieron bien regadas, lo que demuestra una vez más su sensibilidad y capacidad de reacción a las variables meteorológicas.

3.4. PARÁMETROS XILEMÁTICOS

3.4.1. MATERIAL Y MÉTODOS

3.4.1.1. Preparación de las muestras

Se tomaron muestras de tres estructuras de las plantas (raíz, tallo principal y ramillos de menos de 1 año de edad) (Figura 3.13). Se seleccionaron muestras de 3 plantas de cada clon para los tallos principales y los ramillos, y de una planta para la raíz. Los tallos principales tenían 3–4 cm de diámetro, mientras que el de las ramas finas y raíces muestreadas era de 0.4–1.0 cm. Todas las muestras se tomaron para una fecha concreta, julio de 2015. Se tomaron secciones en forma de cuña de 2 cm de largo en las muestras de tallos, y discos de ≤ 1 cm de diámetro para las muestras de ramas y de raíz, todas ellas de la parte media de los entrenudos. Se conservaron en solución hidroalcohólica al 50 %, a temperatura ambiente, hasta el momento del procesado. El protocolo de la preparación de las muestras histológicas, de toma de imágenes y procesamiento de éstas fue el mismo que el descrito en el apartado 3.3.1.3 *Estructura transversal de la hoja*

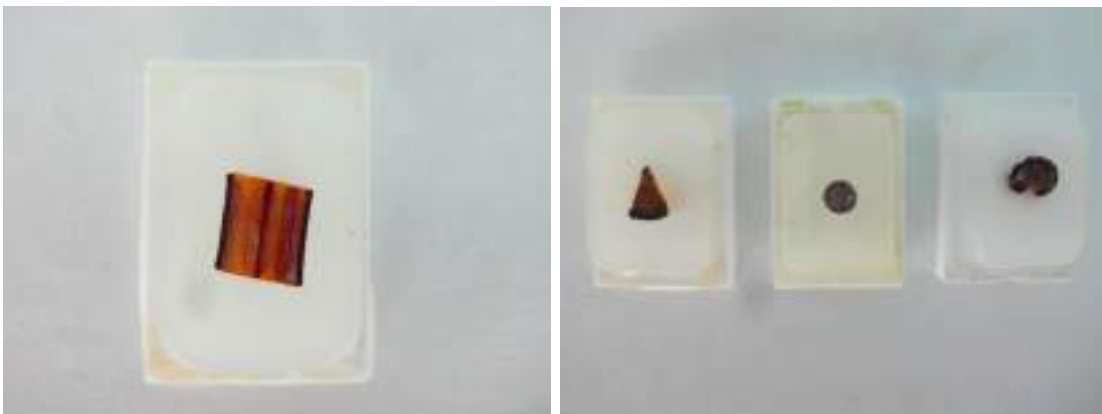


Figura 3.13. (Izda.) Muestra de corte longitudinal de tallo principal de eucalipto en biocasette con parafina; (Dcha.) Muestras de cortes transvesales de tallo, rama y raíz, respectivamente.

3.4.1.2. Mediciones

Sobre las imágenes digitales tomadas de los cortes transversales se midió la densidad de vasos xilemáticos (d_v , $n^\circ \text{ mm}^{-2}$), la densidad de radios leñosos

(d_R , $n^\circ \text{ mm}^{-1}$) y el diámetro de los vasos tomados en dos direcciones perpendiculares en la sección transversal (D_V , μm), procurando ajustarlas al diámetro mayor y menor de cada vaso. Para los dos primeros parámetros, las fotografías fueron tomadas con 40 aumentos (40x), mientras que para el último se necesitaron 200x (Figura 3.14). Para la evaluación de la densidad de vasos, se contabilizó el número de vasos presentes en cuadrículas tomadas al azar de tamaño $250 \times 250 \mu\text{m}$ (0.0625 mm^2). Se midieron 10 cuadrículas por muestra. Para la evaluación del diámetro de los vasos individuales se midieron 31 vasos por muestra, aleatoriamente seleccionados de entre toda la muestra. El diámetro medio de cada vaso se calculó a partir de la media entre el diámetro mayor y menor de ese vaso. Para la evaluación de la frecuencia media de radios, se tomó una línea-plantilla de $300 \mu\text{m}$, que se colocaba perpendicularmente a la dirección de los radios, y se hicieron 10 conteos por muestra, aleatoriamente distribuidos por toda ella. Asimismo, a partir de los valores del diámetro mayor y menor de cada vaso, se calculó el área de la sección transversal de cada uno (A_V , μm^2).

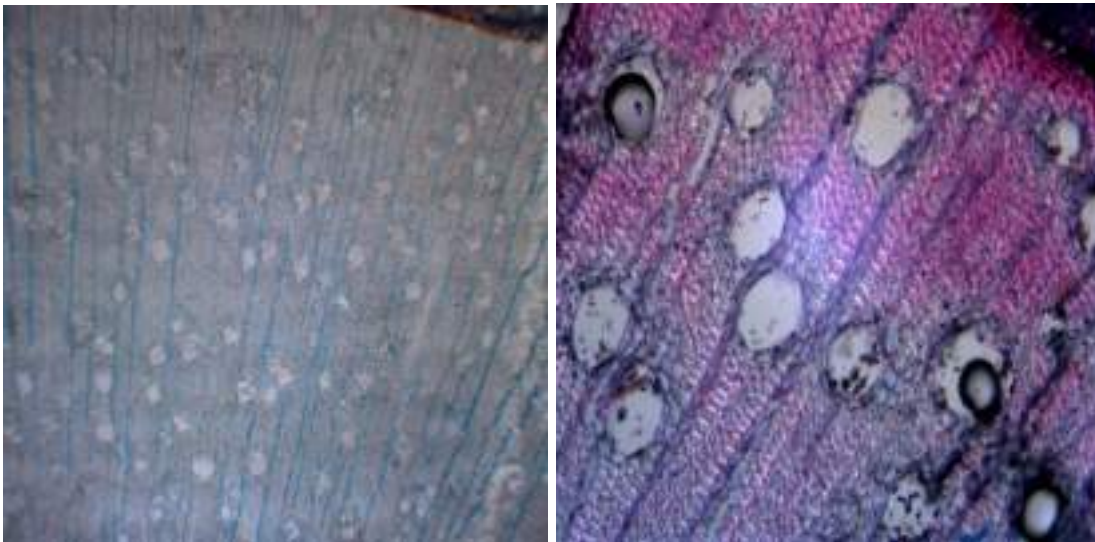


Figura 3.14. (Izda.) Corte transvesal del tallo principal de un eucalipto con aumento 40x; (Dcha.) Corte transvesal de rama fina de eucalipto con aumento 200x. En ambos se observan los vasos xilemáticos y los radios leñosos.

Sobre las imágenes digitales tomadas de los cortes longitudinales se midieron los valores de la longitud de los elementos de vaso (L_V). Las fotografías fueron tomadas a 40x (Figura 3.15). Fueron medidos 31 elementos de vaso por muestra, seleccionados aleatoriamente entre toda la muestra.



Figura 3.15. Corte longitudinal de raíz de eucalipto con aumento 40x. Las flechas indican los extremos de elementos de vaso.

3.4.1.3. Análisis de datos

Para el tamaño y distribución de los vasos xilemáticos, el análisis de los datos se realizó siguiendo un Modelo Mixto Generalizado, con distribución Poisson y función de enlace logarítmica. Se consideró el efecto fijo Clon y, como efecto aleatorio, la planta anidada dentro del clon. Las diferencias significativas entre los grupos de los distintos factores fueron analizadas mediante el test de Bonferroni. Se utilizó el paquete estadístico SAS ® 9.2. Las diferencias se consideraron significativas para un nivel de significación $p \leq 0.05$.

3.4.2. RESULTADOS

Para las plantas muestreadas, de 2 años de edad, se obtuvieron diferencias significativas entre clones ($p < 0.001$) para la densidad de vasos xilemáticos, tanto en raíz, como en ramillos y tallo principal (Tabla 3.5), así como también resultaron significativas las diferencias entre plantas de un mismo clon ($p < 0.001$).

En el caso de la densidad de radios leñosos, todos uniseriados, se detectaron diferencias significativas entre clones para los tres órganos, ramillos y tallo principal ($p < 0.001$) y raíz ($p = 0.001$), pero resultaron tan pequeñas en

valor absoluto para ese último órgano que el test de Bonferroni no las diferenció en grupos homogéneos separados (Tabla 3.6). También se obtuvieron diferencias significativas entre plantas dentro de un mismo clon ($p < 0.001$).

Tabla 3.5. Valores medios (\pm ET) de la densidad de vasos xilemáticos (d_v) de las tres partes de la planta (raíz, ramillos y tallo principal) de los distintos genotipos de eucalipto ensayados. p = nivel de significación. Para el factor principal clon, letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (test de Bonferroni).

Densidad de vasos xilemáticos ($n^\circ \text{ mm}^2$)			
Clon	Raíz	Ramillos	Tallo
Total	30.56 \pm 1.34	51.14 \pm 2.40	26.22 \pm 1.10
	Clon		
12€	22.60 \pm 1.77 ab	45.26 \pm 2.55 ab	21.30 \pm 1.17 a
HE	21.50 \pm 1.73 ab	53.55 \pm 2.20 bc	27.45 \pm 1.01 bc
HG	27.20 \pm 2.20 abc	67.42 \pm 2.20 d	28.77 \pm 1.01 c
HI	17.30 \pm 1.46 a	40.26 \pm 2.55 a	27.30 \pm 1.17 bc
225	39.60 \pm 2.86 c	45.06 \pm 2.55 ab	23.13 \pm 1.17 ab
227	35.60 \pm 2.59 c	34.60 \pm 2.55 a	24.43 \pm 1.17 abc
C14	41.0 \pm 3.67 c	64.17 \pm 2.20 d	27.67 \pm 1.01 c
358	33.20 \pm 6.18 abc	51.12 \pm 2.20 bc	28.32 \pm 1.01 c
437	37.10 \pm 3.82 bc	58.83 \pm 2.55 cd	27.66 \pm 1.17 bc
<i>p</i>	<0.001	<0.001	<0.001

Tabla 3.6. Valores medios (\pm ET) de la densidad de radios (d_R) de las tres partes de la planta (raíz, ramillos y tallo principal) de los distintos genotipos de eucalipto ensayados. p = nivel de significación. Para el factor principal clon, letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (test de Bonferroni).

Densidad de radios leñosos ($n^\circ \text{ mm}^{-1}$)			
Clon	Raíz	Ramillos	Tallo
Total	7.08 \pm 0.04	7.25 \pm 0.10	7.15 \pm 0.08
	Clon		
12€	7.00 \pm 0.00 a	7.80 \pm 0.09 c	7.25 \pm 0.07 abc
HE	6.80 \pm 0.13 a	6.97 \pm 0.09 a	6.92 \pm 0.07 a
HG	7.20 \pm 0.13 a	7.60 \pm 0.09 bc	7.35 \pm 0.07 c
HI	6.90 \pm 0.18 a	7.30 \pm 0.11 ab	7.03 \pm 0.08 abc
225	7.50 \pm 0.16 a	7.23 \pm 0.11 ab	7.16 \pm 0.08 abc
227	7.00 \pm 0.00 a	6.96 \pm 0.11 a	7.20 \pm 0.08 abc
C14	7.00 \pm 0.00 a	7.07 \pm 0.09 a	7.17 \pm 0.07 abc
358	7.00 \pm 0.00 a	7.35 \pm 0.09 ab	7.32 \pm 0.07 bc
437	7.30 \pm 0.50 a	6.93 \pm 0.11 a	6.96 \pm 0.08 ab
<i>p</i>	0.001	<0.001	<0.001

Considerando ahora los diámetros de los vasos xilemáticos, mayor, menor y medio, medidos en sección transversal, se detectaron diferencias entre clones para los tres órganos ($p < 0.001$) (Tabla 3.7, 3.8 y 3.9), así como entre plantas de un mismo clon ($p < 0.001$).

Tabla 3.7. Valores medios (\pm ET) del diámetro mayor de los vasos xilemáticos (D_{V-max}) de las tres partes de la planta (raíz, ramillos y tallo principal) de los distintos genotipos de eucalipto ensayados. p = nivel de significación. Para el factor principal clon, letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (test de Bonferroni).

Diámetro mayor de los vasos (μm)			
Clon	Raíz	Ramillos	Tallo
Total	81.44 \pm 35.37	51.87 \pm 1.14	76.19 \pm 1.50
Clon			
12€	121.23 \pm 4.15 cd	65.76 \pm 1.06 e	99.82 \pm 1.60 f
HE	133.58 \pm 3.81 d	59.24 \pm 1.06 d	84.88 \pm 1.39 e
HG	98.04 \pm 3.56 b	45.38 \pm 1.06 b	72.94 \pm 1.38 bc
HI	103.98 \pm 4.73 bc	63.51 \pm 1.23 de	83.43 \pm 1.60 de
225	60.46 \pm 2.08 a	56.57 \pm 1.23 cd	67.86 \pm 1.60 ab
227	55.46 \pm 2.08 a	51.56 \pm 1.23 c	77.22 \pm 1.60 cd
C14	53.76 \pm 2.08 a	42.60 \pm 1.06 ab	69.04 \pm 1.38 b
358	52.46 \pm 2.08 a	39.94 \pm 1.06 a	69.28 \pm 1.39 b
437	53.96 \pm 2.08 a	42.24 \pm 1.23 ab	61.18 \pm 1.60 a
p	<0.001	<0.001	<0.001

Tabla 3.8. Valores medios (\pm ET) del diámetro menor de los vasos xilemáticos (D_{V-min}) de las tres partes de la planta (raíz, ramillos y tallo principal) de los distintos genotipos de eucalipto ensayados. p = nivel de significación. Para el factor principal clon, letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (test de Bonferroni).

Diámetro menor de los vasos (μm)			
Clon	Raíz	Ramillos	Tallo
Total	50.72 \pm 1.50	36.90 \pm 0.87	53.57 \pm 1.11
Clon			
12€	80.51 \pm 3.30 d	44.41 \pm 0.81 d	63.73 \pm 1.17 d
HE	83.59 \pm 2.71 d	43.12 \pm 0.82 d	60.95 \pm 1.01 cd
HG	66.40 \pm 2.43 c	33.37 \pm 0.82 b	49.67 \pm 1.02 b
HI	63.16 \pm 3.94 c	42.77 \pm 0.94 d	58.83 \pm 1.17 cd
225	37.81 \pm 1.51 b	41.04 \pm 0.94 cd	50.68 \pm 1.17 b
227	32.81 \pm 1.51 ab	37.94 \pm 0.94 c	56.84 \pm 1.17 c
C14	31.11 \pm 1.51 ab	31.0 \pm 0.81 ab	47.95 \pm 1.01 ab
358	29.81 \pm 1.51 a	28.45 \pm 0.81 a	49.69 \pm 1.02 b
437	31.31 \pm 1.51 ab	30.63 \pm 0.94 ab	43.79 \pm 1.17 a
p	<0.001	<0.001	<0.001

Tabla 3.9. Valores medios (\pm ET) del diámetro medio de los vasos xilemáticos (D_{V-m}) de las tres partes de la planta (raíz, ramillos y tallo principal) de los distintos genotipos de eucalipto ensayados. p = nivel de significación. Para el factor principal clon, letras distintas en cada columna indican diferencias significativas.

Clon	Diámetro medio de los vasos (μm)		
	Raíz	Ramillos	Tallo
Total	66.05 \pm 1.77	44.39 \pm 0.96	64.88 \pm 1.25
	Clon		
12€	99.71 \pm 3.63 cd	55.09 \pm 0.90 e	81.78 \pm 1.33 e
HE	107.65 \pm 3.17 d	51.18 \pm 0.90 de	72.92 \pm 1.15 d
HG	83.10 \pm 2.99 b	39.38 \pm 0.90 b	61.31 \pm 1.15 b
HI	81.96 \pm 4.18 bc	53.14 \pm 1.04 de	71.14 \pm 1.33 cd
225	48.97 \pm 1.62 a	48.81 \pm 1.04 cd	59.27 \pm 1.33 b
227	44.04 \pm 1.64 a	44.46 \pm 1.04 c	67.03 \pm 1.33 c
C14	44.14 \pm 2.70 a	36.80 \pm 0.90 ab	58.50 \pm 1.15 b
358	41.18 \pm 1.68 a	34.20 \pm 0.90 a	59.48 \pm 1.15 b
437	42.63 \pm 1.77 a	36.44 \pm 1.04 ab	52.49 \pm 1.33 a
<i>p</i>	<0.001	<0.001	<0.001

El área transversal (A_V) y la ratio entre el diámetro mayor y el diámetro menor de los vasos xilemáticos también diferenciaron significativamente entre clones para los tres órganos ($p < 0.001$) (Figura 3.16 y Tabla 3.10), así como entre plantas dentro de un mismo clon ($p < 0.001$). Los valores medios (\pm ET) de A_V para la raíz, ramillos y tallo principal fueron, respectivamente (en μm^2), 3881.4 \pm 207.4, 1639.7 \pm 71.8 y 3407.0 \pm 125.3.

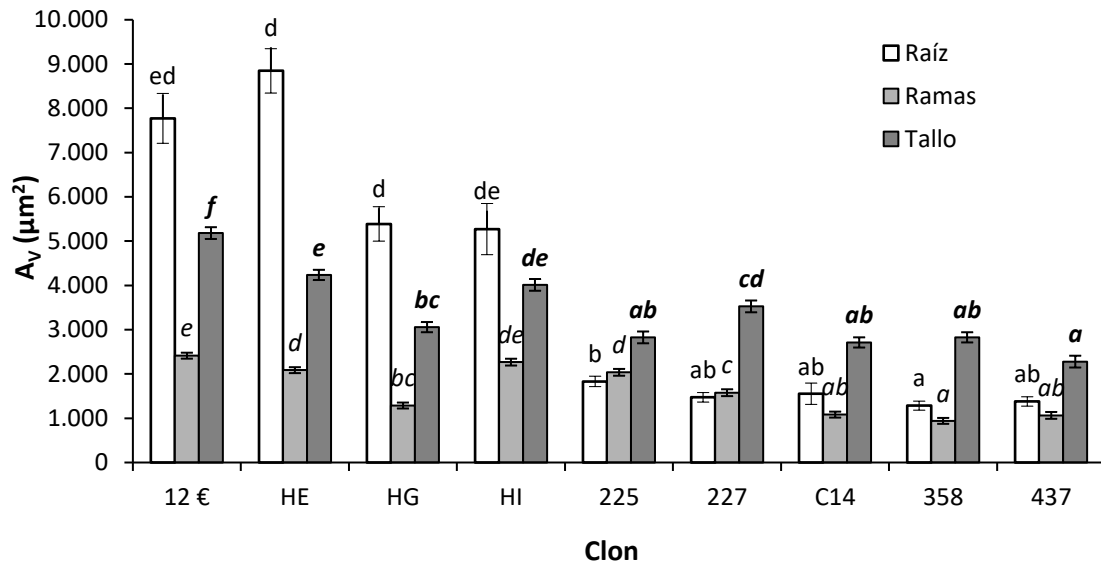


Figura 3.16. Valores medios (\pm ET) del área de los vasos xilemáticos (A_v) de las tres partes de la planta (raíz, ramillos y tallo principal) de los distintos genotipos de eucalipto ensayados. Para el factor principal clon, letras distintas en cada serie indican diferencias significativas entre clones ($p < 0.001$), test de Bonferroni.

En cuanto a la proporción de área conductora en la sección transversal del xilema (AC), para los tres órganos analizados, los clones se puedan agrupar en dos grupos. Para la raíz, los valores más bajos correspondieron a los clones de *E. globulus* y al HI, en un rango de 5.1 % (437) a 9.1 % (HI), mientras que en el grupo de valores altos encontramos a los otros tres clones, de 14.7 % (HG) a 19.0 % (HE). Para los ramillos, en el grupo de los valores más bajos se encuentran los clones de *E. globulus* (del 4.8 % para el 358 al 6.9 % para C14), mientras que los otros cuatro clones se situaron en un rango de 8.7 % (HG) a 11.2 % (HE). Para el tallo, similarmente, los clones de *E. globulus* se situaron en el rango inferior, en este caso acompañado del híbrido HG (de 6.3 % para 437 a 8.8 % para HG), mientras que los otros tres clones se situaron entre 11.0 % (HI) y 11.6 % (HE).

Tabla 3.10. Valores medios (\pm ET) de la ratio entre el diámetro mayor y el menor de los vasos xilemáticos (Dv_{max}/Dv_{min}) de las tres partes de la planta (raíz, ramillos y tallo principal) de los distintos genotipos de eucalipto ensayados. p = nivel de significación. Para el factor principal clon, letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (test de Bonferroni).

Ratio entre el diámetro mayor y el menor de los vasos			
Clon	Raíz	Ramillos	Tallo
Total	1.681 \pm 0.018	1.422 \pm 0.019	1.436 \pm 0.018
	Clon		
12€	1.528 \pm 0.034 ab	1.500 \pm 0.018 bc	1.577 \pm 0.020 d
HE	1.618 \pm 0.037 abc	1.381 \pm 0.018 a	1.401 \pm 0.017 ab
HG	1.493 \pm 0.037 a	1.371 \pm 0.018 a	1.492 \pm 0.017 c
HI	1.716 \pm 0.055 bc	1.512 \pm 0.021 c	1.441 \pm 0.020 bc
225	1.631 \pm 0.045 abc	1.422 \pm 0.021 abc	1.342 \pm 0.020 a
227	1.742 \pm 0.057 bc	1.393 \pm 0.021 a	1.391 \pm 0.020 ab
C14	1.789 \pm 0.062 c	1.403 \pm 0.018 a	1.454 \pm 0.017 bc
358	1.831 \pm 0.068 c	1.421 \pm 0.018 ab	1.408 \pm 0.017 ab
437	1.784 \pm 0.062 c	1.396 \pm 0.021 a	1.416 \pm 0.020 abc
p	<0.001	<0.001	<0.001

En cuanto a la longitud de los elementos de vaso, medidos en sección longitudinal, se detectaron diferencias significativas entre clones para las ramas y el tallo principal ($p < 0.001$), pero no para la raíz ($p = 0.134$) (Tabla 3.11), mientras que sí se diferenciaron entre plantas de un mismo clon ($p < 0.001$) para las ramas y tallo.

Tabla 3.11. Valores medios (\pm ET) de la longitud de los elementos de vaso (L_v) de las tres partes de la planta (raíz, ramillos y tallo principal) de los distintos genotipos de eucalipto ensayados. p = nivel de significación. Para el factor principal clon, letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (test de Bonferroni).

<i>Longitud de los elementos de vaso (μm)</i>			
Clon	Raíz	Ramillos	Tallo
Total	207.51 \pm 4.88	145.35 \pm 8.74	139.38 \pm 5.39
		Clon	
12€	182.96 \pm 9.20 a	126.42 \pm 7.56 ab	149.99 \pm 5.31 cd
HE	211.09 \pm 11.92 a	182.41 \pm 8.76 d	160.54 \pm 4.59 d
HG	211.59 \pm 13.23 a	135.82 \pm 10.17 abc	144.32 \pm 4.59 bcd
HI	204.57 \pm 11.32 a	151.08 \pm 8.76 bcd	164.16 \pm 5.31 d
225	210.69 \pm 12.19 a	164.58 \pm 8.30 cd	121.41 \pm 6.50 b
227	199.43 \pm 7.04 a	153.74 \pm 8.76 bcd	142.60 \pm 6.50 bcd
C14	186.09 \pm 16.60 a	109.05 \pm 7.55 a	91.60 \pm 4.59 a
358	216.28 \pm 17.01 a	148.46 \pm 10.0 abcd	136.04 \pm 4.59 bc
437	244.85 \pm 24.60 a	136.57 \pm 8.76 abc	143.77 \pm 6.50 bcd
<i>p</i>	0.134	<0.001	<0.001

3.4.3 DISCUSIÓN

Se observó una gran variabilidad entre clones en la densidad de vasos xilemáticos en los tres órganos, en un rango de 17.3 vasos/mm² (HI) a 41.0 vasos/mm² (C14) para las raíces; de 34.6 vasos/mm² (227) a 67.4 vasos/mm² (HG) para los ramillos y de 21.3 vasos/mm² (12€) a 28.7 vasos/mm² (HG) para el tallo. Estos valores pueden considerarse altos, pero dentro de los rangos obtenidos por otros autores, como Leal et al. (2003) para *E. globulus* (23.6 vasos/mm²) y Veenin et al. (2005), 15 vasos/mm² (rango 11–20) en clones de *E. camaldulensis* de 5 años de edad. Por lo que, la mayor frecuencia en nuestro estudio puede estar relacionada con la edad de la planta y el diámetro del tallo o raíz, cuanto más joven, mayor densidad de vasos.

Con relación a la densidad de radios leñosos, los valores que se han encontrado están en un rango inferior a los encontrados para *Eucalyptus camaldulensis* en el estudio de Moglia et al. (2008). Al igual que para la densidad de los vasos, esta diferencia se debe posiblemente a que las muestras tomadas

por Moglia et al. (2008) eran de plantas más adultas, de 5 años de edad, pero en este caso a mayor edad mayor densidad de radios leñosos, o bien a que se trata de especies diferentes. En la raíz, no hubo diferencias significativas entre clones para este parámetro. En el caso de las ramas y el tallo, dichas diferencias fueron mínimas, y no se observó una distinción entre el grupo de los clones de *E. globulus* y el grupo de los híbridos.

En cuanto a los diámetros de los vasos, los valores obtenidos (promedios de 66 μm para la raíz, 44 μm para los ramillos y 65 μm para el tallo principal) se encuentran en un rango levemente inferior a los encontrados para *Eucalyptus* spp. por otros autores (Veenin et al., 2005; Moglia et al., 2008; Longui et al., 2014 y Zanuncio et al., 2017), aunque dentro del rango encontrado por Pirralho et al. (2014). Esta pequeña diferencia en tamaño de la sección transversal de los vasos xilemáticos de nuestro estudio se debe, posiblemente, a que proceden de muestras tomadas en plantas de corta edad, mientras que la de los autores citados eran de plantas más adultas, entre 2 a 5 años de edad, incluso de 45 años en el caso del estudio de Longui et al. (2014). Martín et al. (2013) relata que los mayores vasos, tanto en diámetro como en longitud, se hallan en las ramas más largas o en los órganos de mayor tamaño, por lo que, a mayor edad, las longitudes y los diámetros medios tienden a aumentar, aunque pueden estabilizarse a partir de los 5 años dependiendo de cada especie.

En general, los clones de *E. globulus* presentaron menores diámetros que los otros clones, especialmente que estos tres, 12€, HE y HI. El diámetro de los vasos xilemáticos en *E. globulus* suele estar dentro del rango inferior cuando se compara con otras especies de eucaliptos (Pirralho et al., 2014). A este menor diámetro en los clones de *E. globulus*, especialmente agudizado en la raíz, se le puede atribuir a una estrategia de resistencia a sequía (Rodríguez-Calcerrada et al., 2017), pues cuanto menor es el diámetro mayor defensa presenta ante la vulnerabilidad a la cavitación (Venturas et al., 2014). El menor diámetro le resta capacidad de conducción de agua, pero es, en parte, contrarrestada por una mayor densidad de vasos, pero solo en parte porque el porcentaje de área transversal conductora del xilema siempre estuvo en el rango más bajo de todos los clones estudiados. No obstante, en la resistencia a la vulnerabilidad a la

cavitación pueden influir también otros factores como las punteaduras, los engrosamientos interiores de los vasos y las placas perforadas, entre otros. Estos últimos factores o caracteres de los vasos xilemáticos generalmente son parecidos dentro de una misma especie, al menos eso ocurrió en nuestro estudio donde los clones presentaron rasgos muy similares. Las características encontradas en todos los clones del presente estudio son placa de perforación simple, formando un ángulo respecto a eje longitudinal del vaso próximo a 45°, punteaduras areoladas y alternas y engrosamientos en las paredes ausentes, similar a lo descrito por Monteoliva et al. (2015) y Moglia et al. (2008). Como consecuencia del menor diámetro de los vasos, el área transversal de estos también fue menor para los clones de *E. globulus*, con valores dentro del rango obtenido por Pirralho et al. (2014), siendo éste, asimismo, un parámetro influenciado por la edad (Leal et al., 2003). Los valores se situaron en un rango de 1285 μm^2 (358) a 8846 μm^2 (HE) para las raíces; de 940 μm^2 (358) a 2413 μm^2 (12€) para las ramas y de 2279 μm^2 (437) a 5182 μm^2 (12€) para el tallo principal.

En cuanto a la ratio entre el diámetro mayor y el diámetro menor de los vasos xilemáticos, los valores se encuentran dentro de los rangos usuales medidos (Leal et al., 2003). En la raíz, el menor valor obtenido por el clon HG indica una forma más redondeada, mientras que un valor alto, como el encontrado en los clones de *E. globulus* C14, 358 y 437, indica una forma más elíptica. En el caso de las ramas y el tallo, por el contrario, los clones de *E. globulus* y el híbrido HE tienden a estar en el grupo de valores más bajos, vasos más redondeados, aunque sin grandes diferencias en valor absoluto respecto a los otros. Cabe señalar el comportamiento análogo del clon HE y los de *E. globulus* respecto a la forma de los vasos (ratio entre diámetro mayor y menor) y la densidad de estos en la parte aérea, ya observado también en los caracteres foliares, mientras que la densidad de vasos en la raíz y el diámetro de estos es más parecido a *Ex urograndis*, su otro progenitor. Por tanto, presenta caracteres de uno y otro progenitor pero sin atenuarlos o presentar valores intermedios entre ambos.

La variación de la longitud de los elementos de vaso entre plantas de un mismo clon, encontrada en las ramas y en el tallo en nuestro estudio, también fue relatada por Moglia et al. (2008), en ese caso en tallos de *E. camaldulensis*. En cuanto a las diferencias entre clones para las ramas y el tallo, no se notó una separación entre el grupo de los *E. globulus* y los híbridos, pero cabe destacar las diferencias significativas entre el clon C14, con los valores más bajos de longitud del elemento de vaso, y los clones HE y HI. En este caso, el clon HE se aleja de haber heredado caracteres de *E. globulus*, pero tampoco se acerca a *E. x urograndis*. Un valor corto del elemento de vaso puede ayudar también a la resistencia a la vulnerabilidad del xilema a la cavitación (Venturas et al., 2014), aunque puede que reste capacidad de conducción de agua. Pirralho et al. (2014) encontraron, sin embargo, que *E. globulus* tenía vasos más largos que *E. tereticornis*, pero esta última especie no se ha tratado en nuestro estudio, de ahí que no podamos hacer una comparación. Por ejemplo, tres de los cuatro híbridos estudiados contienen genes del *E. grandis*, y los valores de longitud de los elementos de vaso encontrados en la bibliografía para esta especie (Sseremba et al., 2016) son también más altos que los medidos por Pirralho et al. (2014) para *E. globulus*, además de constatar que dicha longitud aumenta con la edad de la planta (de 338 hasta 548 μm), fenómeno contrario al que ocurre con la densidad de los vasos pero similar al del diámetro. En general, en plantaciones destinadas a la producción de celulosa, una mayor longitud de vaso provoca un menor rendimiento de pulpa, ya que los vasos más largos y más grandes producen altos volúmenes de fibras en la pulpa, lo que disminuye la calidad (Sseremba et al., 2016).

Por último, considerando los valores medios globales de los parámetros evaluados en los tres órganos (raíz, ramillos y tallo principal) podemos resumir que: para la densidad de vasos xilemáticos el mayor valor encontrado fue para los ramillos, mientras que para la raíz y para el tallo los valores fueron similares; para la densidad de radios leñosos, el valor para los tres órganos fue análogo; para el diámetro medio como para el área de los vasos, el menor valor encontrado fue para los ramillos, mientras que para la raíz y para el tallo los valores fueron semejantes; y para la ratio entre el diámetro mayor y el menor de los vasos como para la longitud de los elementos de vaso, los mayores valores

encontrados fueron en las raíces, mientras que para los ramillos y el tallo principal los valores fueron prácticamente los mismos.

3.5 CONCLUSIONES

Respecto a los parámetros foliares, la presencia de estomas se concentró en la superficie abaxial de la hoja para todos los clones estudiados. La densidad estomática varió en función de la época del año, mayor en las hojas desarrolladas durante el final del invierno hasta principios de verano y menor en las de centro y final del verano, pudiendo significar estrategias de control de la pérdida de agua a través de los estomas.. Cada clon ajustó sus propios valores de d y tamaño para aclimatar sus estomas a las condiciones de crecimiento. La cantidad máxima de agua transpirada con estomas completamente abiertos podrían depender de otros factores internos y externos. Por lo tanto, los criterios de tamaño y d por separados no son suficientes para diferenciar entre clones, al menos para este estudio. Los clones híbridos HI y HG presentaron mayor densidad estomática, mientras que considerando el conjunto de clones de *E. globulus*, ésta fue la mitad que para los dos anteriores. Los clones monoespecíficos de *E. globulus* y el híbrido HE presentaron menor variación temporal de la densidad que los demás híbridos estudiados. El tamaño de los estomas, medido por la longitud (LS) y ancho (AS) de las células oclusivas, se mostraron menores en las hojas crecidas en verano.

No se detectaron diferencias significativas en los cuatro parámetros analizados de la sección transversal de las láminas foliares (grosor de la lámina foliar, de la epidermis adaxial, de la epidermis abaxial y del parénquima empalizada). En lo que se refiere al SLA , valores más altos en época húmeda y bajos en la más seca indican sensibilidad y capacidad de reacción a las variables meteorológicas por parte de los clones de *Eucalyptus* estudiados. Los valores más altos de los clones 12€ y HG indican hojas más delgadas y propias de climas con más humedad ambiente que los otros clones.

Respecto a los parámetros xilemáticos, la densidad de los vasos fue muy variable entre los clones estudiados, y se situó en un rango de 17.3 vasos/mm² a 67.4 vasos/mm². En cuanto a los diámetros de los vasos, se encuentran en un rango levemente inferior a los encontrados para *Eucalyptus* spp (entre 44 µm y 66 µm) lo que se debe, posiblemente, a que proceden de muestras tomadas en plantas de corta edad, y, dentro de ese, los clones de *E. globulus* presentaron menores diámetros que los otros clones, pudiéndose atribuir a una estrategia de resistencia a sequía. Como consecuencia del menor diámetro de los vasos, el área transversal de estos también fue menor para los clones de *E. globulus*. Con referencia a la longitud de los elementos de vaso y a la densidad de radios leñosos, no se notó una separación entre el grupo de los *E. globulus* y los híbridos, pero cabe destacar, para el primer parámetro, las diferencias significativas entre el clon C14, con los valores más bajos de longitud del elemento de vaso, y los clones HE y HI.

Los valores medios globales en los tres órganos (raíz, ramillos y tallo principal) se comportaron de forma distinta para cada parámetro. Destacan los mayores valores en los ramillos para la densidad de los vasos, y los mayores valores en las raíces tanto para la ratio entre el diámetro mayor y el menor de los vasos, como para la longitud de los elementos de vaso.

4. Capítulo 2

RELACIONES HÍDRICAS Y CONSUMO DE AGUA



4.1 - RESUMEN

El estrés hídrico es uno de los principales limitantes del crecimiento en las plantaciones de *Eucalyptus*. En un programa de mejora genética, la selección de genotipos que mejoren la resistencia a este estrés ayudaría a mejorar la productividad y a ampliar las plantaciones. Para ello, utilizando plantas de vivero, se evaluaron diversos parámetros relacionados con la transpiración total y cuticular, los parámetros relacionados con la resistencia a estrés hídrico y al consumo de agua, tales como la conductancia hidráulica y la vulnerabilidad a la cavitación del xilema, entre otros, así como la capacidad de cada clon de modificarlos en función de las condiciones de crecimiento. Se utilizaron cinco clones comerciales de *E. globulus* y cuatro clones de híbridos interespecíficos. Como ejemplo, podemos destacar los rangos de valores obtenidos para el contenido hídrico relativo en el momento del cierre estomático ($CHR_c = 60.9$ a 95.2 %), para la transpiración cuticular ($E_c = 0.07$ a 0.59 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), para la tasa de transpiración diaria en base a la superficie foliar ($T_{LA} = 0.09$ a 8.01 $\text{L m}^{-2} \text{día}^{-1}$), para la conductancia hidráulica específica xilemática ($C_{smax} = 25.16$ a 249.03 $\text{kg s}^{-1} \text{m}^{-2} \text{MPa}^{-1}$) o para el potencial osmótico a plena turgencia ($\Psi_{s100} = -1.85$ a -1.19 Mpa). Las diferencias significativas entre clones y entre fechas de medición indican que hay tanto variabilidad genética como plasticidad en los parámetros medidos, que les permite acomodarse a las condiciones ambientales cambiantes durante el año, y que pueden ser incorporados a los programas de selección y mejora genética.

4.2 - INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

El agua es un patrimonio natural estratégico, un elemento vital para la conservación de los ecosistemas, por lo que la sostenibilidad del desarrollo humano y del aprovechamiento de los ecosistemas pasa por ir más allá de la mera dimensión económica (Wolkmer y Pimmel, 2013). Los bosques desempeñan un importante papel en el ciclo del agua y la regulación de su consumo está influenciada por factores climáticos, edáficos y fisiológicos, como son la demanda evaporativa del aire, la cantidad de agua en el suelo y la conductividad del dosel (controlada por la conductividad estomática y el área foliar). El crecimiento y la producción de biomasa en cualquier comunidad vegetal, natural o cultivada, está fuertemente determinada por la cantidad de agua disponible para las plantas (Onaindia et al., 2013), debido a que el déficit hídrico es uno de los principales agentes estresantes que restringen el crecimiento (Taiz et al., 2017). En zonas con algún período de sequía a lo largo del año, como las que se encuentran bajo clima Mediterráneo, cuando la evolución del déficit hídrico es suficientemente lenta en las plantas, éstas pueden presentar diferentes estrategias de resistencia a través de modificaciones morfológicas, fisiológicas y del ciclo de vida, que podemos llamar de regulación y aclimatación, dependiendo de la intensidad y de la duración de la sequía. Por ello, la elección de especies con capacidad de aclimatación a la variación de los recursos, en especial cuando éstos son limitados, es un criterio fundamental desde el enfoque de la sostenibilidad (Navarrete-Campos et al., 2013), aplicada tanto a masas naturales como a cultivos o plantaciones comerciales, donde se incluyen los eucaliptos.

El primer paso a la hora de estudiar la capacidad de resistencia a estrés hídrico pasa por evaluar las pérdidas de agua a través de la parte aérea de la planta. Dichas pérdidas se conocen como transpiración, la cual no debe superar a la cantidad de agua absorbida por las raíces, para poder mantener el estado de hidratación adecuado y por ende el crecimiento. La transpiración de las plantas puede ser considerada como un proceso físico de difusión (movimiento aleatorio neto de moléculas de agua desde el interior de la planta a la atmósfera) proporcional a la diferencia de presión de vapor de agua entre las superficies transpirantes y la atmósfera, así como a la propia superficie transpirante. Si a la transpiración añadimos la evaporación directa del suelo y de otras superficies, la

pérdida de agua del ecosistema por este concepto se denomina evapotranspiración. Es la demanda evaporativa del aire la que provoca la principal pérdida de agua por evapotranspiración. Variables como la radiación solar, humedad relativa del aire, velocidad del viento y temperatura afectan a la evapotranspiración, por su efecto sobre la evaporación y la difusión, al afectar a la apertura estomática y la resistencia de la capa límite de las superficies transpirantes (Will et al., 2013).

El clima mediterráneo, presente en la provincia de Huelva, caracterizado por inviernos templados y lluviosos y veranos secos y calurosos, varía considerablemente la demanda evaporativa entre estaciones del año, por lo que las plantas deben adaptarse a ello, siendo importante conocer la transpiración de las plantas durante un ciclo anual completo (Oteros et al., 2013). La medida directa de la evapotranspiración forestal es dificultosa, ya que exige la instalación de equipos especiales y costosos y mediciones continuadas en el tiempo, lo que limita su utilización práctica. Por ese motivo, se han desarrollado métodos que, en la mayoría de los casos, incluyen medidas físicas y permiten estimar la transpiración total de la planta a partir de un muestreo adecuado en unas pocas hojas o en intervalos de tiempo determinados, utilizando generalmente equipos de medición de intercambio gaseoso (Nouri et al., 2013). Los parámetros de intercambio gaseoso (fotosíntesis, conductancia estomática y transpiración) y su efecto sobre la eficiencia instantánea del uso de agua se han identificado como herramientas potenciales para seleccionar genotipos con mejor comportamiento frente al uso del agua y su respuesta al estrés hídrico (Davis et al., 1987; Silva et al., 2016). En plantas de vivero, puede añadirse otra técnica de medición que consiste en pesar el conjunto planta-contenedor para evaluar la transpiración (Incrocci et al., 2014; Medrano et al., 2015), e incluso la evapotranspiración si lo contrastas con el consumo de agua de contenedores sin planta o con plantas control (Salazar-Moreno, 2014), siendo todo ello muy útil para la comparación de especies y variedades.

Otros parámetros relacionados con la resistencia a estrés hídrico y al consumo de agua son la conductividad hidráulica (k_s) y la vulnerabilidad a la cavitación del xilema que, en angiospermas, están principalmente determinadas por las características anatómicas de los vasos por donde circula la savia. Se supone que el conjunto de caracteres anatómicos en *Eucalyptus* estaría

relacionado con algunos de sus requerimientos ecológicos y podría ser un indicador del consumo de agua y de la resistencia diferencial al estrés en sus respectivas zonas de cultivo. En términos generales, una mayor k_s originada por vasos de mayor diámetro aumenta el aporte de agua desde las raíces hasta las hojas para permitir la apertura estomática y fijación de carbono, a costa de disminuir su resistencia al estrés (Barotto et al., 2017; Barotto et al., 2018). Sin embargo, un apreciable número de angiospermas, entre ellas los eucaliptos, presentan traqueidas rodeando los vasos, las cuales muestran capacidad conductiva y resistencia a la formación de embolismos, ayudadas asimismo por la capacitancia generada por la hidratación del parénquima axial difuso (Pfausch et al., 2015; Barotto et al., 2016).

El análisis de la relación del consumo de agua y los parámetros hídricos con el tamaño de la planta y la distribución de biomasa implica, generalmente, mediciones y muestreos destructivos. Para evitar esta destrucción de forma generalizada, es posible estimar la biomasa mediante ecuaciones alométricas a partir de variables predictivas de fácil medición, como el diámetro al cuello de la raíz (D_t) y la altura de la planta (H) o algunas variables derivadas de estas (D_t^2 o D_t^2H). Para ello, es necesario determinar estas relaciones para cada especie, en las diferentes condiciones de crecimiento y, a ser posible, en cada ciclo de producción (González-García et al., 2013; Sigala Rodríguez et al., 2016).

Cabe, por tanto, resaltar la especial importancia que en *Eucalyptus*, ampliamente utilizado en plantaciones comerciales, tienen estos estudios a nivel específico y clonal, con vistas al conocimiento de los requerimientos hídricos de cada clon y a la selección de genotipos tolerantes a los periodos de escasez de agua (Navarrete-Campos et al., 2013). Por todo ello, los objetivos de este capítulo son: **(i)** comparar la tasa de transpiración de distintos clones, con estomas abiertos y cerrados, en condiciones de laboratorio; **(ii)** medir el consumo de agua de las plantas y relacionarlo con el tamaño de estas y las variables ambientales en diferentes periodos del año, en condiciones de vivero, a fin de evaluar las necesidades de agua; y **(iii)** caracterizar las diferencias entre clones en cuanto a conductividad hidráulica del xilema y vulnerabilidad a la cavitación, así como la capacidad de aclimatación y mantenimiento el estado hídrico.

4.3 – MATERIAL Y MÉTODOS

4.3.1 - Material vegetal y condiciones de cultivo

El material vegetal utilizado consistió en plantas de una savia de cinco clones de *E. globulus* (códigos de referencia: C14, 225, 358, 437, 227) y cuatro clones de híbridos (*E. x urograndis*, 12€; *E. urograndis x globulus*, HE; *E. dunnii-grandis x globulus*, HG; *E. saligna x maidenii*, HI;), obtenidas a partir del enraizamiento de estaquillas en vivero comercial, en envases de 150 cm³ de capacidad, procedentes del programa de selección y mejora vegetal de la empresa ENCE, energía y celulosa S.A. El clon C14 es un clon perteneciente a la primera generación de mejora (F₀) y ha sido ampliamente utilizado en plantaciones comerciales. Es un clon altamente productivo y muy plástico. Se adapta bien a distintos ambientes y, bajo clima mediterráneo, soporta períodos de sequía estival. Los demás clones corresponden a generaciones de mejora posteriores.

Durante tres años consecutivos, en diciembre, se trasplantaban a contenedores de 10 L donde se mantenían, al menos, un período vegetativo completo. Se usaron 4 plantas por clon cada año. El sustrato consistió en una mezcla de turba, fibra de coco y perlita (2:2:1 en volumen), bien regados hasta capacidad de campo y fertilizados con Ferticote 16-7-8 + 2 MgO + Micros (Burés profesional S.A., España) a la dosis de 1.5 kg m⁻³. Las plantas estaban situadas al aire libre, totalmente expuestas a la luz solar, en una parcela experimental de la Universidad de Huelva (37° 12' 03" N, 6° 54' 53" W, 5 m snm). En la tabla 4.1 se presentan los valores de temperatura en la zona de estudio durante el tiempo que duró el ensayo.

Tabla 4.1. Resumen de los valores de temperaturas mensuales en el vivero situado en la zona de estudio.

		Ene.	Feb.	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Ago.	Sep.	Oct.	Nov.	Dic.
2015	T'a (°C)	16.4	16.3	20.8	22.4	28.2	28.9	32.8	30.3	26.5	23.4	22.1	19.9
	t'a (°C)	2.6	4.5	6.1	10.0	12.3	14.7	18.2	17.4	13.6	14.4	9.0	8.4
2016	T'a (°C)	17.5	17.7	19.1	21.0	24.0	29.3	32.5	33.0	29.6	25.1	19.2	18.1
	t'a (°C)	8.0	6.8	5.8	9.9	11.7	14.3	17.3	17.5	15.0	12.7	7.4	7.1
2017	T'a (°C)	16.4	17.5	20.8	24.1	25.7	30.6	30.6	32.1	29.0	27.6	21.1	16.7
	t'a (°C)	2.6	7.3	7.4	9.2	12.3	15.4	16.2	16.8	13.8	13.1	7.5	4.3

- T'a: media mensual de las temperaturas máximas diarias.

- t'a: media mensual de las temperaturas mínimas diarias.

4.3.2 - Transpiración cuticular (E_c)

Siguiendo metodología estándar presente en la bibliografía (Carevic et al., 2010), en cuatro épocas del año (hojas de primavera, verano, otoño e invierno), en 10 fechas durante 2.5 años seguidos, se tomaron 3 hojas por clon, en estado juvenil pero completamente desarrolladas, tomadas del 3^o–5^o verticilo del tallo principal. Una vez recolectadas e hidratadas hasta saturación (en oscuridad, a 4 °C durante 16 h), se tomaron pesos sucesivos (peso fresco) en intervalos de tiempo reducidos (cada 5 minutos durante la primera hora, cada 10 minutos las 2 horas siguientes y cada 20 minutos posteriormente, hasta la comprobación en el gráfico generado que la caída de peso era constante en el tiempo) (Figura 4.1). Las hojas se exponían a la luz, con la cara abaxial hacia abajo y sobre una rejilla, para permitir la libre circulación del aire por ambas caras, en ambiente climatizado a (20–23) °C y (45–60) % de humedad relativa.

Con los datos tomados (peso fresco con precisión ± 0.1 mg, y tiempo en minutos) se pudo representar gráficamente la pérdida de agua o transpiración de la hoja en el tiempo (Figura 4.2). En una primera fase, la transpiración ocurre a través de los estomas (transpiración estomática, E_s) y de la epidermis foliar (transpiración cuticular, E_c), pero tras el cierre de los estomas, solo queda E_c . Posteriormente, terminado el pesaje, las hojas fueron escaneadas para determinar el área foliar (AF) con la ayuda del software ImageJ. Asimismo,

seguidamente, las hojas se llevaron a estufa hasta peso constante a 70 °C para determinar su peso seco (PS). Con estos dos datos, se pudo referir la transpiración cuticular tanto a peso seco (E_{c-dw}) como a área foliar (E_{c-la}).

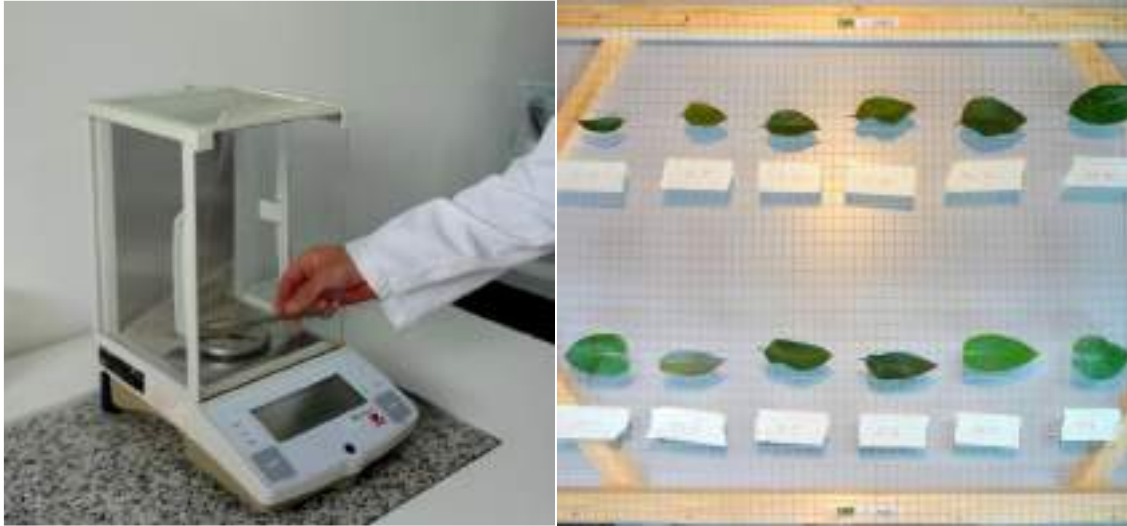


Figura 4.1. (Izda.) Balanza de precisión utilizada en el pesaje de las hojas de eucalipto para la determinación de la tasa de transpiración cuticular (E_c). (Dcha.) Hojas expuestas en una rejilla elevada sobre la mesa del laboratorio durante las mediciones.

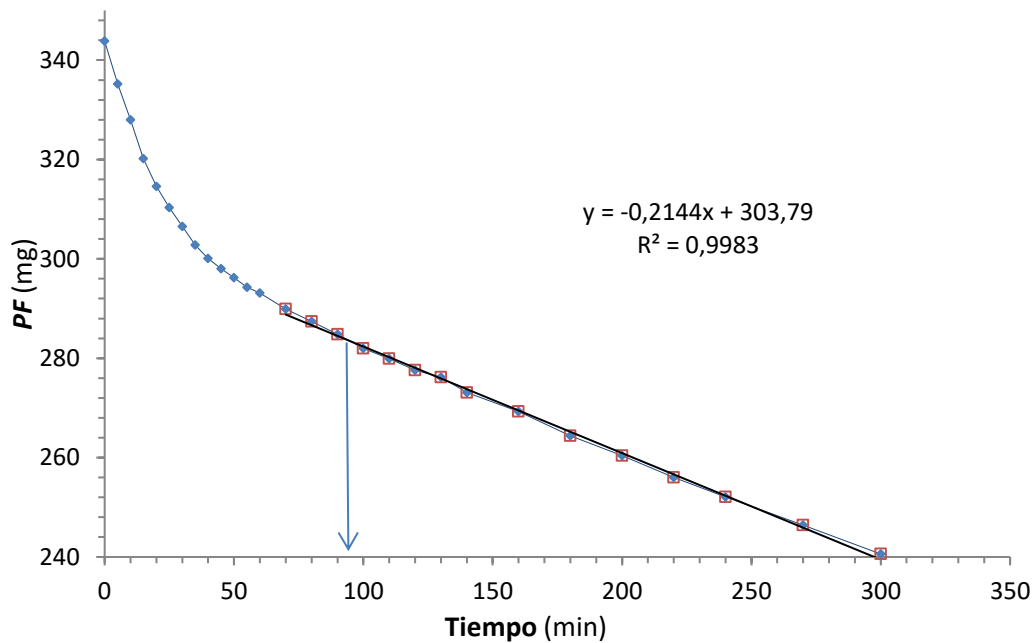


Figura 4.2. Ejemplo de representación gráfica de las mediciones tomadas para determinar la transpiración cuticular (E_c) y de algunos parámetros derivados de ellas. La flecha indicia el tiempo transcurrido hasta el cierre estomático (t_c); la pendiente de la recta de regresión ($y = a x + b$) es considerada la tasa de transpiración cuticular (E_c). PF: peso fresco.

Con las mediciones tomadas y la representación gráfica realizada se pudieron estimar varios parámetros, tales como: tasa de transpiración total al inicio ($E_t = E_e + E_c$) y tasa de transpiración cuticular (E_c), referidas tanto al peso seco como a área foliar; tiempo transcurrido hasta el cierre de los estomas (t_c); contenido hídrico relativo y contenido de humedad en el momento del cierre estomático (CHR_c y H_c , respectivamente).

4.3.3 - Transpiración diaria, por intervalos horarios y total

Para la estimación de la evolución de la transpiración a lo largo del día se contó con plantas crecidas en macetas de 10 L de capacidad. Se procedió a pesajes en intervalos de 3 h, desde las 08:30 hasta las 20:30 h y, tras el último pesaje del día se realizó un último pesaje a las 08:30 h del día siguiente (completando un día entero). Se procedió así porque se comprobó previamente que la pérdida de peso (y por tanto la transpiración) desde las 20:30 h del atardecer y durante toda la noche era muy pequeña, comparada con los demás intervalos horarios. De esta forma se podía cuantificar la transpiración de los clones de eucalipto a lo largo del día y de la noche. Esta evaluación se llevó a cabo en dos períodos diferentes de la época de mayor demanda evaporativa, el principio y el centro del verano (junio y julio de 2016, respectivamente). Se partía de plantas con sustrato saturado de humedad y se midió en días sucesivos pero sin regar en ningún momento hasta el final del experimento, por lo que se pudo evaluar, asimismo, el agua consumida por transpiración para distintos niveles de humedad en el sustrato. Para evitar la transpiración directa desde el sustrato y el sobrecalentamiento por la radiación solar, los contenedores se envolvieron en bolsas de plástico blanco (Fig. 4.3). Se determinó la cantidad de humedad inicial en el sustrato y se prosiguió hasta la observación visual del grado máximo de estrés soportado por las plantas sin perder sus hojas, teniendo la precaución de no causar su muerte. Esto es, observación de marchitamiento foliar e inicio de clorosis en hojas basales. En el primer ciclo de estrés (junio), las plantas fueron pesadas durante 6 días consecutivos; en el segundo ciclo (julio) fueron pesadas durante 4 días, pues en el 4º día algunas de las plantas empezaron a perder hojas y, por tanto, a cesar su actividad fisiológica.

Paralelamente, se realizaron mediciones de potencial hídrico de base (Ψ), en hojas extraídas justo al amanecer, con una cámara de presión (Model 1000, PMS Instruments, Corvallis, USA) (Figura 4.4). Asimismo, se registraron datos de las variables meteorológicas en intervalos de 30 minutos (viento, radiación solar, temperatura y humedad relativa del aire). A partir de estos datos, se calcularon otros parámetros adicionales, tales como el déficit en la presión de vapor del aire (DPV), la evapotranspiración de referencia (ET_0), calculada por la ecuación de Penman-Monteith, el potencial hídrico del sustrato (Ψ_{ws}) y el contenido de humedad del sustrato (w).



Figura 4.3 Plantas de eucalipto en envases de 10 L dispuestas al aire libre en un día soleado, sometidas a pesajes sucesivos para estimar la evolución diaria de la transpiración.



Figura 4.4. Medición del potencial hídrico xilemático (Ψ) con cámara de presión.

En cuanto a la transpiración total diaria (T), se utilizaron 36 plantas (4 plantas por clon), crecidas tanto en contenedores de 10 L como de 100 L de capacidad, en función del tiempo de permanencia de las plantas en el contenedor, para disponer de plantas de varios tamaños. Se midieron en distintas fechas durante 2.5 años seguidos, por lo que se fueron replanteando 5 ensayos distintos, todos ellos con el mismo número de plantas por clon (1º, septiembre-diciembre de 2014 (10 L); 2º, septiembre-2014 a mayo-2105 (100 L); 3º, febrero-octubre-2015 (10 L); 4º, octubre-2015 a julio-2016; y 5º, septiembre-2016 a mayo-2017 (10L)). Los dos primeros se solaparon en el tiempo ya que era necesario dejar pasar un intervalo de tiempo desde el momento de la plantación hasta la primera medición, para que las plantas desarrollasen sus raíces y alcanzasen el tamaño necesario para la medición. El método utilizado consistió en el pesaje directo en balanza de precisión (± 5 g para contenedores de 10 L, y ± 50 g para los de 100 L) del conjunto planta-contenedor, el cual solía ser de unos 5 y 50 kg de media, respectivamente. En cada ensayo se añadían 4 contenedores sin plantas de eucalipto pero con plantas de gramínea, que se cortaban a 12 cm de altura en las fechas de medición, con el fin de comparar las tasas de transpiración de los eucaliptos con la de un pasto de tamaño estándar (E_{pasto}).

El consumo diario de agua por parte de las plantas se evaluó mediante la diferencia de peso de los contenedores en mediciones tomadas en dos días consecutivos, eligiendo siempre días despejados, sin nubes. Las plantas eran regadas hasta superar la capacidad de campo y se colocaba en la parte superior del contenedor un plástico blanco que cubría toda la superficie de este, evitando así la pérdida de agua por evaporación directa desde la superficie del sustrato. Seguidamente se dejaba drenar completamente toda el agua gravimétrica durante 2–4 h, momento en el que se realizaba la primera pesada (peso inicial del conjunto planta-contenedor, P_i), tomada entre las 10 y las 11 h de la mañana, para evitar la acumulación de rocío en la parte aérea. Transcurridas 24 h desde el peso inicial se volvían a pesar, determinando el peso final (P_f). La diferencia entre P_f y P_i nos proporcionaba el agua transpirada por la planta en un día completo (Figuras 4.5 y 4.6).



Figura 4.5. (arriba) Detalle de un ensayo con plantas de eucalipto en contenedores de 10 L, en estado avanzado, en la fase final de dicho ensayo. (abajo) Detalle de dos ensayos, al fondo plantas crecidas en contenedores de 100 L listas para comenzar las mediciones, delante un nuevo ensayo recién trasplantado en contenedores de 10L.



Figura 4.6. Aspecto de las plantas de eucalipto en los momentos de las mediciones, a la izquierda en contenedor de 100 L, a la derecha en contenedor de 10 L.

Para relacionar el agua transpirada con el tamaño de las plantas, especialmente con la superficie foliar transpirante (SF), midiendo en distintas fechas a lo largo de cada ensayo y sin necesidad de destruir las plantas, en cada una de las fechas se midió la altura (H) y el diámetro en la base del tronco principal (D), se contó el número de hojas (N_{hj}) y se estimó el área foliar específica (SLA), siguiendo la metodología de Andivia et al. (2013). Con estos datos (D , H , N_{hj}) y el peso seco de las hojas de las plantas cosechadas al final de cada ensayo y de otras plantas adicionales cosechadas a lo largo de los ensayos, se establecieron ecuaciones de regresión (ecuaciones alométricas) con las que poder estimar la superficie total transpirante de cada planta, sin necesidad de cosechar las plantas en las fechas intermedias. Al final de cada ensayo se medía D , H y N_{hj} , y se determinaba el peso seco de las hojas (PS_{hj}) y su SLA , con los que se pudo determinar la superficie foliar total de cada planta ($SF = SLA \cdot PS_{hj}$) en ese momento. A partir de los datos medidos del consumo de agua diario de las plantas en los contenedores se calcularon las tasas de transpiración diaria en base a la superficie foliar (T_{LA} , $L\ m^{-2}\ día^{-1}$).

En cada fecha de medición se registró, en intervalos de 10 minutos, la velocidad del viento con un anemómetro (PCE-WL 1), la radiación solar con un dosímetro de radiación solar (MacSolar, SLM018c-2), la temperatura y la humedad relativa del aire con sensores conectados a un registrador HOBO® Pro v2., para analizar su efecto sobre la transpiración de las plantas.

4.3.4 - Transpiración y crecimiento diametral en condiciones variables de humedad

En dos fechas, julio de 2016 y julio de 2017, se colocaron dendrómetros electrónicos de desplazamiento lineal (de 4 μm de precisión) en siete plantas de eucalipto cada vez, crecidas en contenedores de 100 L, una planta por clon (C14, 225, 358, HI, HE, HG, 12€), en la base del tallo principal. Asimismo, se colocaron sondas de humedad (ECHO® EC-20), en el centro de los contenedores y enterradas en posición vertical desde 10 hasta 30 cm de profundidad. Los dendrómetros tomaban datos cada 30 minutos que se almacenaban en

registradores HOBO®. También se determinó, diariamente, la humedad del sustrato a tres profundidades (0–20 cm, 20–40 cm y 40–60 cm), con un equipo TDR (TRIME FM-3). El inicio del ensayo partía de plantas regadas hasta capacidad de campo y se pesaban a intervalos de 24 horas para cuantificar el agua transpirada en un día, del mismo modo que lo descrito en el apartado 4.3.3. Cuando las plantas manifestaban síntomas de estrés hídrico se regaban hasta capacidad de campo, para proseguir con las mediciones, permitiéndonos cuantificar la transpiración para cada nivel de humedad del sustrato. En el segundo ensayo, el de 2017, tras el pesaje del día siguiente, se reponía agua pero solamente la mitad de la transpirada, con el fin de inducir un proceso de déficit hídrico lento y controlado, que duró casi un 1 mes (Figura 4.7).



Figura 4.7. (izda.) Detalle de las plantas crecidas en contenedores de 100 L. para cuantificación del consumo de agua y el crecimiento a distintos niveles de disponibilidad hídrica; (centro) Dendrómetro electrónico de desplazamiento lineal y registrador acoplado; (dcha.) Contenedor con hierba gramínea recortada a 12 cm de altura tomada como referencia para comparación con la transpiración de las plantas.

Con los datos registrados se determinó el valor máximo y mínimo diario del diámetro del tallo (Dt_{max} y Dt_{min} , respectivamente) para cada planta. Con estos valores se pudo estimar: el incremento diario ($Id_{max} = Dt_{maxn} - Dt_{maxn-1}$, o bien, $Id_{min} = Dt_{minn} - Dt_{minn-1}$), siendo n una fecha concreta y $n-1$ el día anterior a esa fecha; el crecimiento acumulado, como suma de todos los incrementos diarios consecutivos; y la oscilación diaria de la dilatación o contracción del tronco

($Dt_{maxn} - Dt_{minn}$). Los datos climáticos usados para la realización del estudio se tomaron con los mismos equipos descritos en el apartado 4.3.3 de cuantificación de la transpiración total diaria (T , L día⁻¹) y la transpiración diaria en base a superficie foliar (T_{LA} , mmol m⁻² s⁻¹).

Paralelamente, se hicieron mediciones con un analizador de gases portátil, (IRGA, Infra Red Gas Analysers, ADC®), entre las 10:00 y las 11:00 horas local, para estimar parámetros fotosintéticos tales como: transpiración (E , mmol m⁻² s⁻¹), conductancia estomática (g_s , mol m⁻² s⁻¹) y fotosíntesis neta (A , μmol m⁻² s⁻¹), como también de potencial hídrico foliar al amanecer (Ψ) y el área foliar específica (SLA), para cada clon y día evaluado. También se calculó la evapotranspiración de referencia (ET_o) a través de la ecuación de Penman-Monteith, el potencial hídrico del sustrato (Ψ_{ws}) y el contenido de humedad del sustrato (w), así como la ratio entre T y E_{pasto} .

4.3.5 - Distribución de biomasa en las plantas

Al final de cada ensayo o ciclo de producción descrito en los apartados 4.3.3 y 4.3.4, se determinó la distribución de biomasa en cada uno de los órganos de la planta, a partir de un muestreo destructivo, separando las raíces, los tallos principales, las ramas y las hojas. Una vez separadas las partes, se llevaron a la estufa de secado a 75 °C hasta peso constante. Los parámetros medidos fueron: diámetro del tallo en la base (D) y altura (H), que estuvieron en un rango de 3.1–52.3 mm y 39–284 cm, respectivamente; número de hojas (N_{hj}); peso seco de tallos (PS_{tl}), raíces (PS_{rz}) y hojas (PS_{hj}); y SLA (Figura 4.8). Con estos datos se pudo determinar la superficie foliar total de cada planta ($SF = SLA \cdot PS_{hj}$), así como construir relaciones alométricas para cada clon que relacionan D y/o H con la biomasa seca de la planta.



Figura 4.8. (arriba-izda.) Planta de eucalipto extraída del contenedor; (arriba-dcha.) Planta de eucalipto tras la eliminación del sustrato de las raíces. (abajo) Separación de la planta en los distintos órganos, para la estimación de la distribución de biomasa. Todas estas fotos corresponden a plantas crecidas en contenedores de 100 L.

4.3.6 - Vulnerabilidad a la cavitación

La conductancia hidráulica (C , $\text{kg s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$ de H_2O) y el porcentaje de pérdida de conductancia hidráulica (PCH, %) se determinaron según la metodología descrita por Sperry et al. (1988) (Figura 4.9). En 18 plantas (2 por clon) crecidas en envases de 10 L en el mismo vivero de la Universidad de Huelva ($37^\circ 12' 03'' \text{ N}$, $06^\circ 55' 06'' \text{ W}$, 5 m snm), de 18 meses de edad, se

extrajeron ramillos desarrollados de 1.5–3.0 mm de diámetro sin corteza (Figura 4.9), con al menos 4–5 hojas totalmente expandidas por encima de la sección de corte. Seguidamente se cortaron segmentos de entrenudos de 2–4 cm de longitud, bajo agua para evitar el ingreso de aire al xilema, y se colocaban en el dispositivo de medición. La altura de agua utilizada (desde la mesa hasta el nivel del vaso Mariotte colocado más arriba) fue de 88 cm, y la presión ejercida para revertir los embolismos de 1.2 bares, aplicada durante 15 minutos, nos proporcionó la conductancia máxima (C_{max} , $\text{kg s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$ de H_2O). La conductancia hidráulica específica xilemática (C_{smax} , $\text{kg s}^{-1} \text{m}^{-2} \text{MPa}^{-1}$ de H_2O) se expresó como la razón de C_{max} entre la sección transversal del segmento de ramillo descortezado, y la conductancia hidráulica específica foliar (C_{lmax} , $\text{kg s}^{-1} \text{m}^{-2} \text{MPa}^{-1}$) entre el área foliar presente por encima del segmento cortado. Se partió de plantas bien hidratadas para el primer muestreo, midiéndose a varios niveles de estrés hídrico a lo largo de dos semanas hasta alcanzar niveles de Ψ de entre -2.0 y -3.0 MPa, según clon.

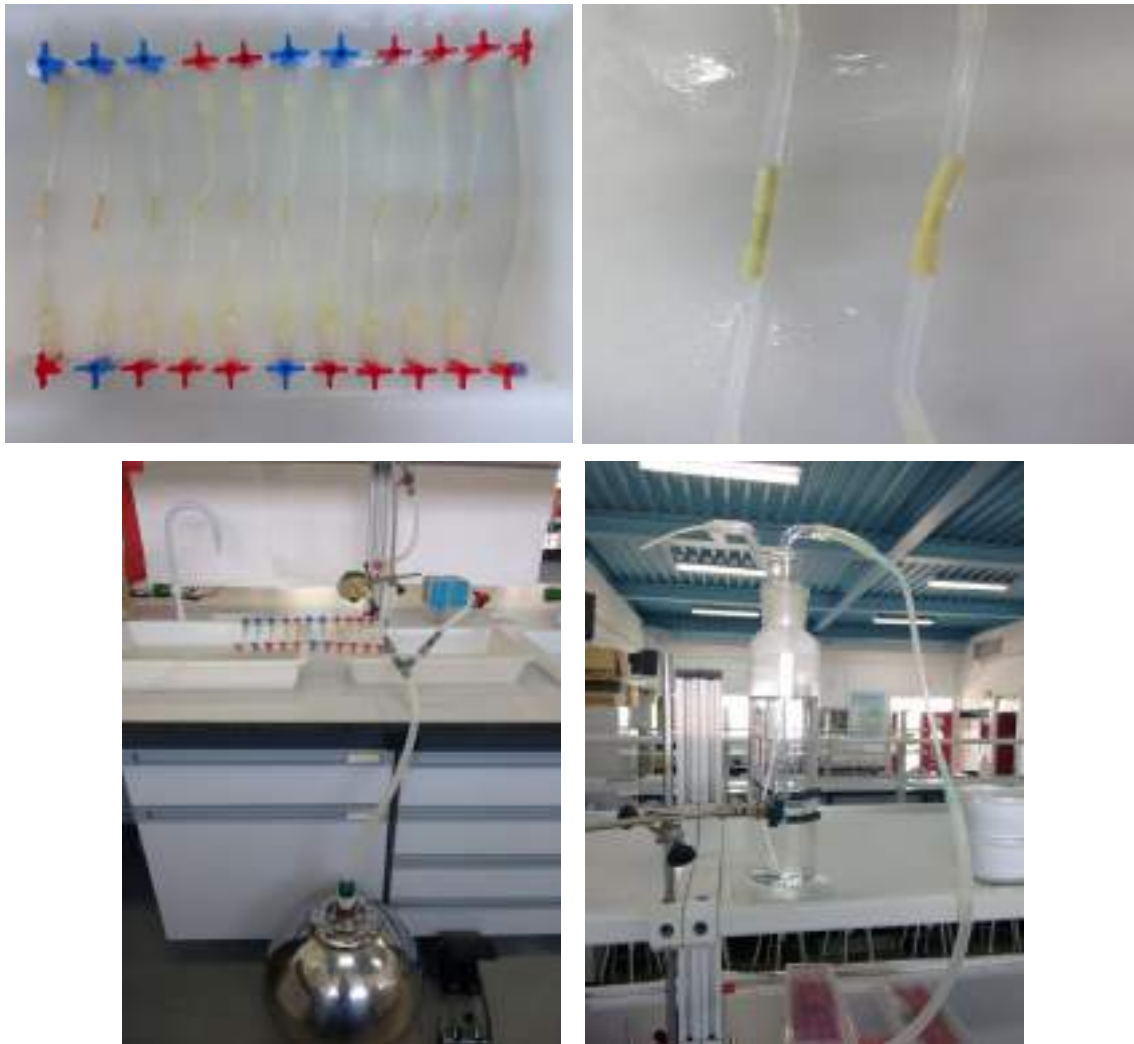


Figura 4.9. (arriba-izda.) Detalle de la disposición de los segmentos de los ramillos en tubos para la determinación de la conductividad hidráulica. En el dispositivo se podían acoplar hasta 10 segmentos. (arriba-dcha.) Detalle de dos de los segmentos de ramillos descortezados acoplados al sistema. (abajo-izda.) Reservorio de agua destilada y desgasificada donde se aplicó presión de 1.2 bares durante 15 minutos a través de una bomba de pie para la eliminación de los embolismos. (abajo-dcha) Vaso Mariotte colocado en la parte superior para asegurar una presión constante durante las mediciones.

4.3.7 - Curvas presión-volumen

Se determinaron los parámetros hídricos derivados de la construcción de isotermas *presión-volumen* en dos fechas distintas, mediados de septiembre (plantas no estresadas) y finales de octubre de 2017, tras sufrir dos ciclos de estrés hídrico moderado (de -2.0 a -2.3 MPa). Se procuró que las hojas utilizadas

tuvieran características similares en cuanto a madurez y tamaño que las usadas para medición de caracteres estomáticos y de morfología foliar, así como procedentes del mismo tipo de ramillos que los utilizados en la determinación de la vulnerabilidad a la cavitación. Se utilizaron las mismas plantas en las dos fechas, 18 plantas (2 por clon). Las hojas, una vez extraídas de las plantas, fueron hidratadas durante 24 horas en oscuridad hasta su saturación. Las curvas se crearon a partir del método de transpiración libre (Corcuera, 2003) (Figura 4.10). La estimación de los parámetros se realizó utilizando la metodología de Tyree y Richter (1981), la cual relaciona el inverso del potencial hídrico ($1/\Psi$) con el respectivo contenido hídrico relativo (CHR) de la muestra (Figura 4.11). Con ello, se pudo determinar el valor de los componentes osmótico (Ψ_s) y de presión (Ψ_p) del potencial hídrico (Ψ) a cualquier nivel de hidratación celular, el potencial osmótico a plena turgencia (Ψ_{s100}) y en el punto de pérdida de la turgencia (Ψ_{s0}), el módulo de elasticidad de la pared celular (ϵ), el contenido hídrico relativo en el punto de pérdida de la turgencia (CHR_0) y contenido hídrico relativo del apoplasto (CHR_a).

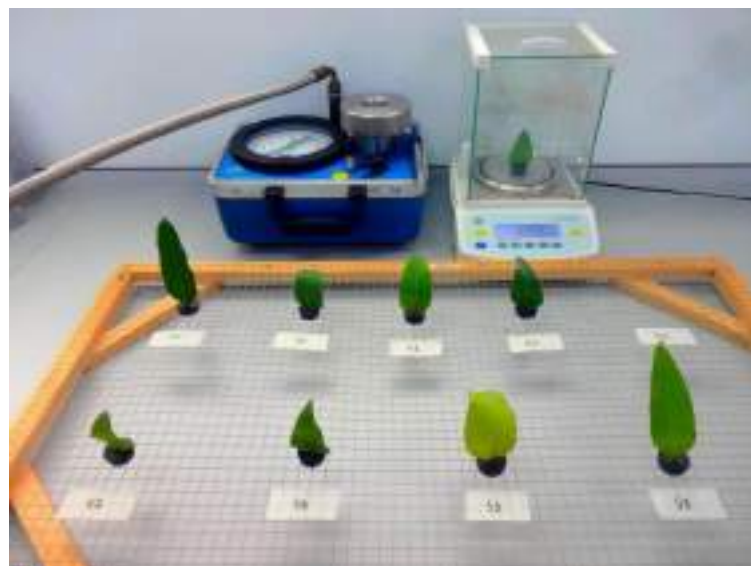


Figura 4.10. Hojas de los nueve clones de eucalipto dispuestas en rejilla plana para las mediciones sucesivas del peso fresco y potencial hídrico xilemático (Ψ) en cámara de presión tipo Scholander, para la posterior determinación de las curvas presión-volumen.

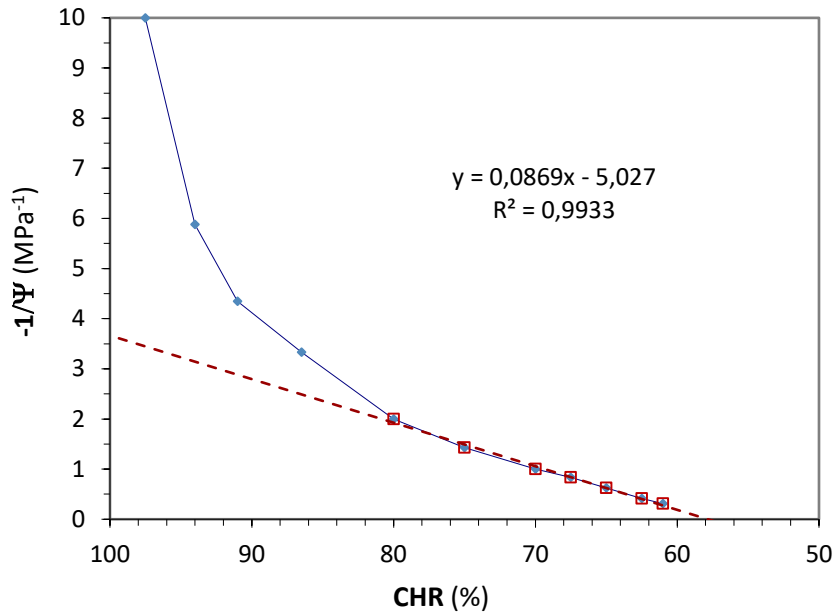


Figura 4.11. Ejemplo de representación gráfica de las mediciones tomadas para determinar el valor de los componentes osmótico (Ψ_s) y de presión (Ψ_p) del potencial hídrico (Ψ) a distintos niveles de hidratación. La línea punteada indica el inverso del potencial osmótico, de donde se puede deducir el valor a saturación ($1/\Psi_{s100}$), el punto de pérdida de la turgencia ($\Psi_p = 0$) y el contenido hídrico relativo del apoplasto (CHR_a). $1/\Psi$: inverso del potencial hídrico; CHR : contenido hídrico relativo.

4.3.8 - Análisis de datos

Para la transpiración cuticular y los parámetros asociados, la distribución de biomasa, la vulnerabilidad a la cavitación y las curvas presión-volumen, el análisis de los datos se realizó siguiendo un Modelo Lineal General de uno (Clon) o dos factores (Clon, Fecha), dependiendo de la variable analizada, que se consideraron fijos. Las diferencias entre los grupos de los distintos factores fueron analizadas mediante el test T3 de Dunnett. Para la transpiración diaria (total diaria y por intervalos horarios), el análisis de los datos se realizó siguiendo un Modelo Lineal Mixto. Para la primera, se consideraron los efectos fijos Clon, Fecha e interacción Clon x Fecha, y como efecto aleatorio la planta anidada dentro del clon. Debido a la posible presencia de correlación temporal en el mismo clon para las observaciones del mismo día, se han experimentado distintas estructuras de la matriz de varianzas-covarianzas para estas observaciones. Finalmente se consideró la matriz no-estructurada de cinco

bandas. Para la segunda, se consideraron todos los efectos fijos (clon, intervalo del día, presencia de estrés hídrico, e interacciones) debido a la posible presencia de correlación temporal en la misma planta, también se han experimentado distintas estructuras de la matriz de varianzas-covarianzas para estas observaciones y se consideró la matriz potencial. Los componentes de la varianza se han estimado por máxima verosimilitud restringida o residual. Para analizar la mejor estructura de modelo en ambos casos se han comparado los valores del criterio de información de Akaike (AIC) (Akaike, 1974) de modo que aquellas con menores valores indican un mejor ajuste. Se utilizó el paquete estadístico SAS ® 9.2. Las diferencias se consideraron significativas para un nivel de significación $p \leq 0.05$.

En el caso de los ensayos encaminados a estudiar la relación de la transpiración diaria y el crecimiento diametral, considerando los dos ensayos conjuntamente, se analizó mediante regresión el efecto de las variables ambientales (potencial hídrico del sustrato, velocidad del viento, temperatura del aire, humedad relativa, radiación solar y evapotranspiración de referencia) y del potencial hídrico de las plantas sobre la transpiración, medida ésta tanto como el valor acumulado diario (T_{LA}) como el instantáneo en un momento del día (E). Asimismo, se evaluó la correlación existente entre distintos parámetros entre sí ($[Dt_{maxn} - Dt_{minn}]$, Id_{max} , T_{LA} , E, T/E_{pasto} , etc).

4.4. RESULTADOS

4.4.1 - Transpiración cuticular y parámetros asociados

Comparando las hojas crecidas y recolectadas en las cuatro épocas del año antes mencionadas, para el contenido hídrico relativo en el momento del cierre estomático (CHR_c) y para el tiempo transcurrido hasta el cierre de los estomas (t_c) se detectaron diferencias significativas entre los distintos clones ($p < 0.001$) y entre fechas ($p < 0.001$) (Tabla 4.2). Asimismo, la interacción entre los dos factores resultó significativa, $p < 0.001$ para el primero y $p = 0.001$ para el

segundo parámetro, indicando un patrón de evolución temporal distinto entre clones (Figuras 4.12 y 4.13).

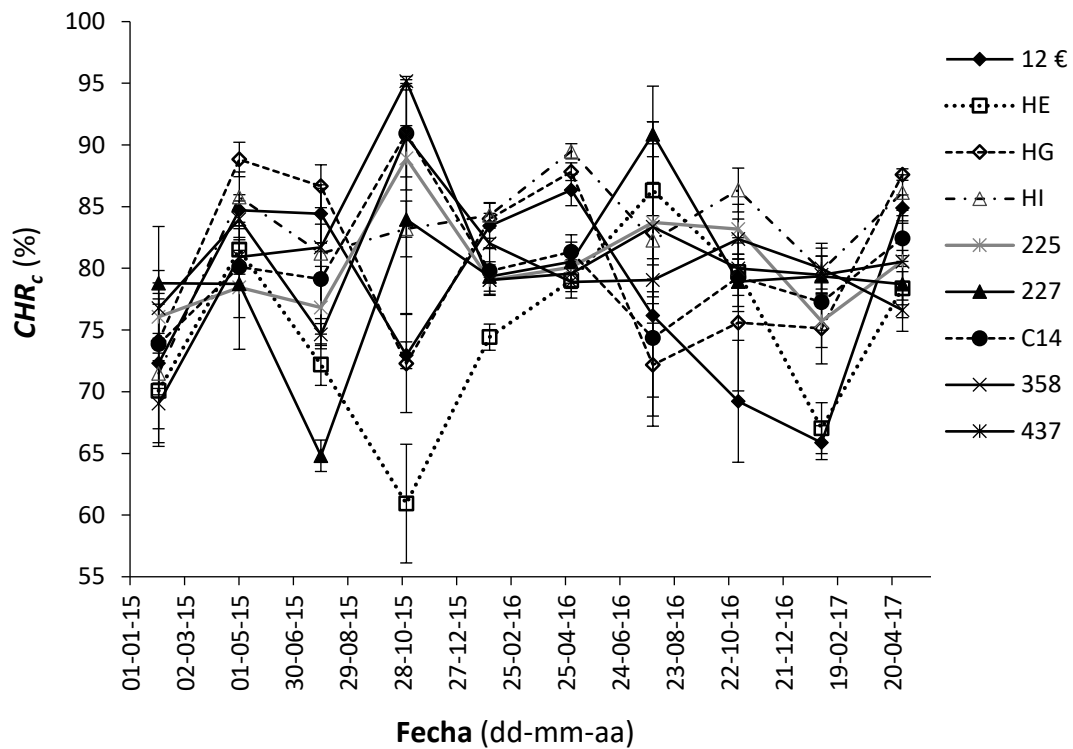


Figura 4.12. Contenido hídrico relativo en el momento del cierre estomático (CHR_c) de los nueve clones de eucalipto estudiados en las diez fechas de medición (media \pm ET).

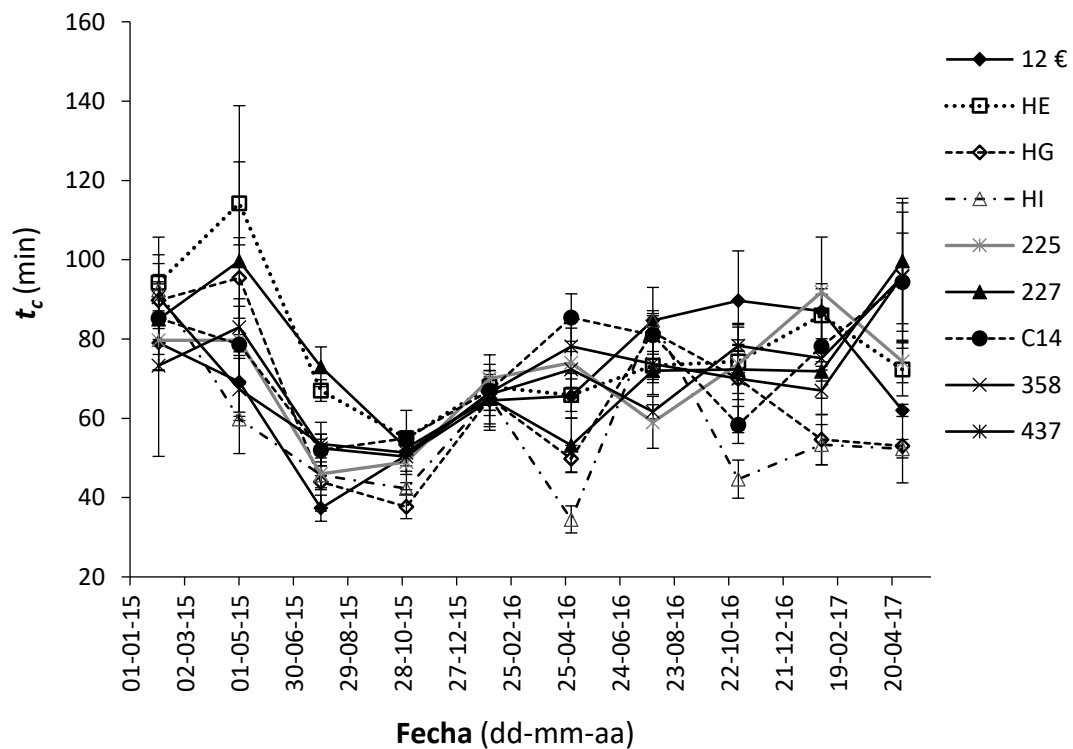


Figura 4.13. Tiempo transcurrido hasta el cierre de los estomas (t_c) de los nueve clones de eucalipto estudiados en las diez fechas de medición (media \pm ET).

Respecto al contenido de humedad al cierre de los estomas (H_c), no se detectaron diferencias significativas entre los distintos clones ($p = 0.536$), pero sí entre fechas ($p < 0.001$) (Tabla 4.2), así como para la interacción Clon x Fecha ($p < 0.001$) (Figura 4.14).

Tabla 4.2. Valores medios (\pm ET) del contenido hídrico relativo (CHR_c), el tiempo transcurrido (t_c), y el contenido de humedad (H_c) en el momento del cierre de los estomas de las hojas de los distintos genotipos de eucalipto ensayados y fechas de medición. p = nivel de significación. Para cada factor (clon, fecha) letras distintas en cada columna indican diferencias significativas.

	CHR_c (%)	t_c (min)	H_c (%)
Total	79.59 \pm 0.42	70.88 \pm 1.22	61.02 \pm 0.29
	Clon		
12€	78.23 \pm 1.32 ab	70.20 \pm 3.00 b	61.76 \pm 1.00 a
HE	74.77 \pm 1.38 a	80.59 \pm 3.70 b	59.86 \pm 0.89 a
HG	80.85 \pm 1.34 ab	64.54 \pm 3.80 ab	61.69 \pm 0.78 a
HI	83.41 \pm 1.04 b	55.47 \pm 3.22 a	61.38 \pm 0.76 a
225	79.69 \pm 1.09 ab	73.35 \pm 3.64 b	60.98 \pm 1.03 a
227	79.43 \pm 1.18 ab	73.94 \pm 4.66 ab	61.37 \pm 0.94 a
C14	79.26 \pm 1.03 ab	76.54 \pm 3.58 b	61.11 \pm 0.76 a
358	80.40 \pm 1.10 ab	72.26 \pm 2.76 b	60.46 \pm 0.76 a
437	80.54 \pm 1.15 ab	72.31 \pm 3.52 b	60.57 \pm 0.87 a
p	<0.001	<0.001	0.536
	Fecha		
Feb_15	73.15 \pm 1.17 a	86.29 \pm 3.32 c	58.68 \pm 0.58 ab
Mayo_15	82.87 \pm 0.76 c	81.30 \pm 4.33 bc	60.38 \pm 0.61 bc
Julio_15	79.16 \pm 1.68 abc	50.01 \pm 2.73 a	59.37 \pm 1.49 abcd
Nov_15	81.38 \pm 2.51 abc	48.96 \pm 1.53 a	67.71 \pm 1.09 f
Feb_16	80.81 \pm 0.76 c	66.33 \pm 1.55 b	62.40 \pm 0.56 cd
Mayo_16	82.63 \pm 0.65 c	64.13 \pm 2.72 b	56.54 \pm 0.45 a
Julio_16	80.54 \pm 2.01 abc	74.73 \pm 2.45 bc	60.84 \pm 0.85 bce
Nov_16	79.40 \pm 1.23 bc	70.15 \pm 3.40 bc	64.57 \pm 0.90 def
Feb_17	75.52 \pm 0.94 ab	73.89 \pm 3.03 bc	64.53 \pm 0.46 df
Mayo_17	81.77 \pm 0.86 c	77.74 \pm 4.76 bc	57.27 \pm 0.73 ab
p	<0.001	<0.001	<0.001

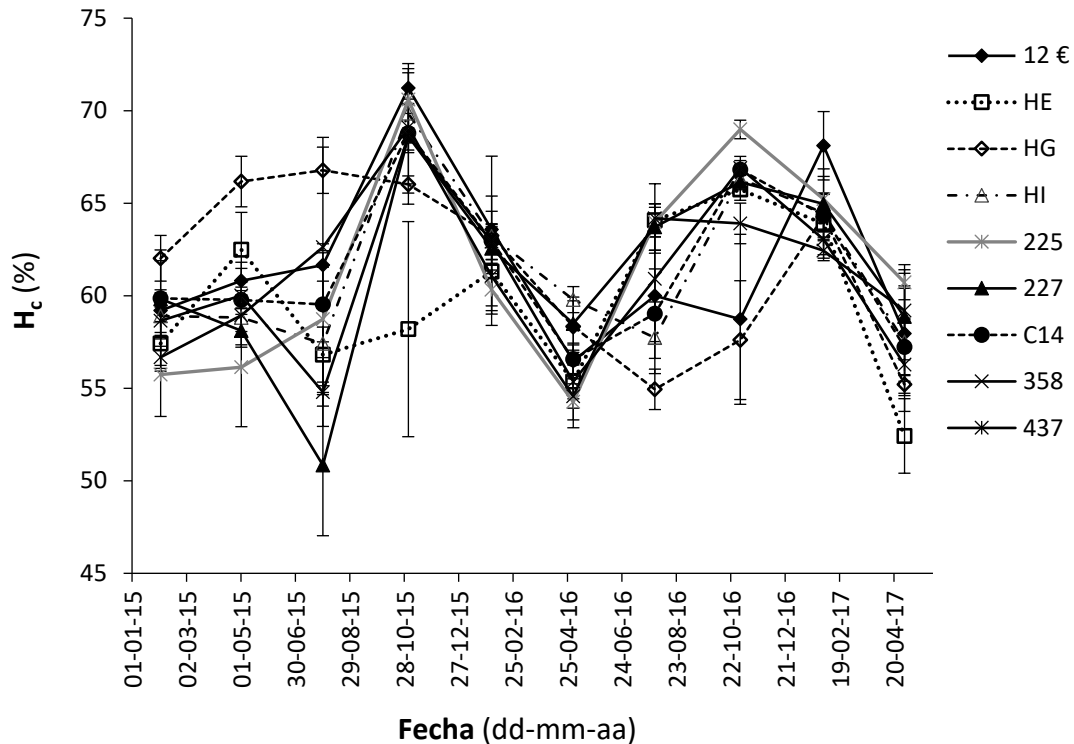


Figura 4.14. Contenido de humedad al cierre de los estomas (H_c) de los nueve clones de eucalypto estudiados en las diez fechas de medición (media \pm ET).

En cuanto a la tasa de transpiración cuticular (E_c), se detectaron diferencias significativas entre los distintos clones y fechas de medición tanto en base al peso seco como o al área foliar ($p < 0.001$) (Tabla 4.3). Mientras que para la tasa de transpiración total al inicio (E_t), se detectaron diferencias significativas entre las distintas fechas de medición ($p < 0.001$) y entre clones cuando se calculó en base al peso seco foliar ($p < 0.001$), pero resultaron tan pequeñas en valor absoluto para ese último parámetro que el test T3-Dunnnett no las diferenció en grupos homogéneos separados. Sin embargo, cuando se calculó en base al área foliar, no se detectaron diferencias significativas entre clones ($p = 0.055$) (Tabla 4.3). Asimismo, para la interacción Clon x Fecha, se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0.001$) (Figuras 4.15 a 4.18).

Tabla 4.3. Valores medios (\pm ET) de la tasa de transpiración total al inicio (E_t) y de la tasa de transpiración cuticular (E_c) de las hojas de los distintos genotipos de eucalipto ensayados y fechas de medición. p = nivel de significación. Para cada factor (clon, fecha) letras distintas en cada columna indican diferencias significativas.

	E_t (mmol kg ⁻¹ s ⁻¹)	E_c (mmol kg ⁻¹ s ⁻¹)	E_t (mmol m ⁻² s ⁻¹)	E_c (mmol m ⁻² s ⁻¹)
Total	8.11 \pm 0.27	1.69 \pm 0.06	0.775 \pm 0.022	0.166 \pm 0.007
Clon				
12€	9.86 \pm 1.08 a	1.71 \pm 0.17 abc	0.681 \pm 0.049 a	0.123 \pm 0.011 a
HE	8.26 \pm 0.88 a	2.60 \pm 0.22 c	0.817 \pm 0.070 a	0.267 \pm 0.022 b
HG	9.41 \pm 1.11 a	1.97 \pm 0.22 bc	0.767 \pm 0.074 a	0.164 \pm 0.018 a
HI	8.54 \pm 0.77 a	1.32 \pm 0.11 ab	0.733 \pm 0.058 a	0.116 \pm 0.011 a
225	8.30 \pm 0.71 a	1.46 \pm 0.18 ab	0.921 \pm 0.079 a	0.161 \pm 0.022 a
227	7.67 \pm 0.53 a	1.78 \pm 0.23 abc	0.799 \pm 0.060 a	0.182 \pm 0.027 ab
C14	7.20 \pm 0.67 a	1.62 \pm 0.17 ab	0.784 \pm 0.065 a	0.179 \pm 0.017 ab
358	6.50 \pm 0.42 a	1.18 \pm 0.08 a	0.724 \pm 0.047 a	0.130 \pm 0.010 a
437	6.89 \pm 0.59 a	1.56 \pm 0.21 ab	0.777 \pm 0.074 a	0.178 \pm 0.031 ab
p	<0.001	<0.001	0.055	<0.001
Fecha				
Feb_15	7.55 \pm 0.39 bc	1.91 \pm 0.14 c	0.628 \pm 0.033 ab	0.162 \pm 0.013 abc
Mayo_15	4.53 \pm 0.40 a	1.12 \pm 0.07 ab	0.477 \pm 0.045 a	0.115 \pm 0.009 a
Julio_15	11.86 \pm 0.87 d	1.83 \pm 0.26 abc	1.236 \pm 0.075 d	0.223 \pm 0.044 abc
Nov_15	12.85 \pm 2.13 bcd	3.07 \pm 0.34 d	0.879 \pm 0.133 abcd	0.235 \pm 0.034 abc
Feb_16	7.75 \pm 0.31 bc	1.68 \pm 0.15 bc	0.745 \pm 0.034 b	0.163 \pm 0.015 abc
Mayo_16	5.84 \pm 0.32 a	1.06 \pm 0.08 a	0.729 \pm 0.035 b	0.136 \pm 0.011 abc
Julio_16	6.70 \pm 1.04 abc	1.56 \pm 0.32 abcd	0.751 \pm 0.126 abcd	0.184 \pm 0.046 abc
Nov_16	9.43 \pm 0.61 cd	2.34 \pm 0.16 c	0.810 \pm 0.042 bc	0.218 \pm 0.021 c
Feb_17	11.15 \pm 0.60 d	2.10 \pm 0.17 c	0.948 \pm 0.043 cd	0.179 \pm 0.015 bc
Mayo_17	6.16 \pm 0.49 ab	0.94 \pm 0.08 a	0.759 \pm 0.057 bc	0.118 \pm 0.011 ab
p	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

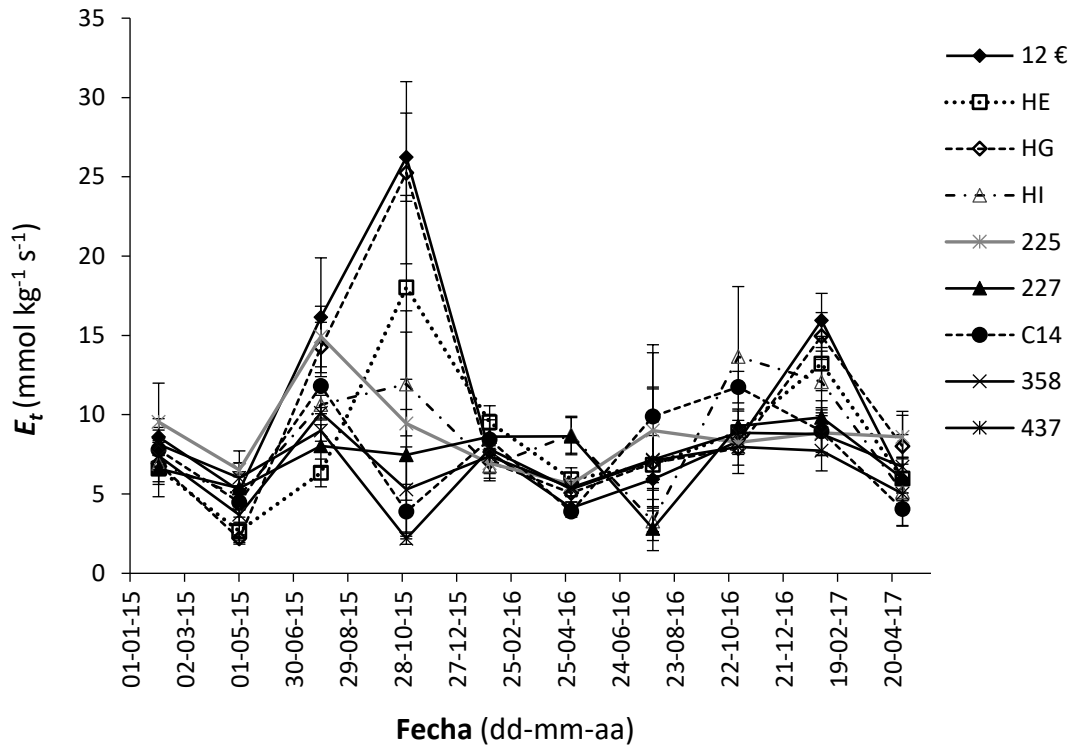


Figura 4.15. Tasa de transpiración total al inicio (E_t) en base al peso seco de los nueve clones de eucalipto estudiados en las diez fechas de medición (media \pm ET).

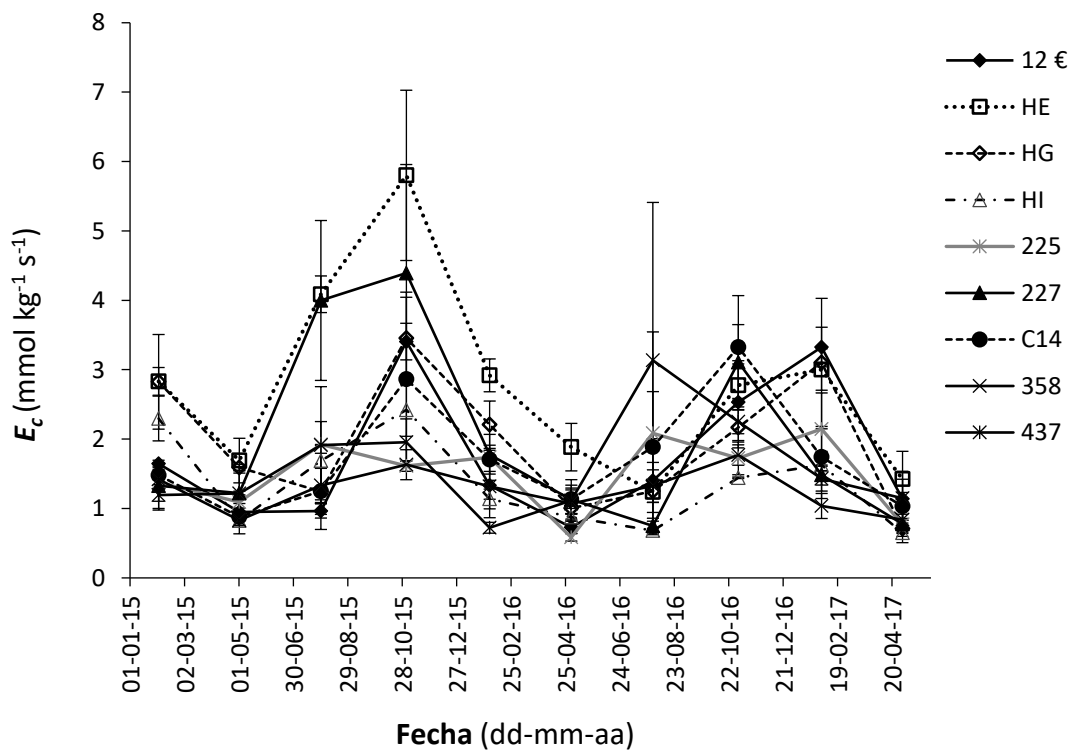


Figura 4.16. Tasa de transpiración cuticular (E_c) en base al peso seco de los nueve clones de eucalipto estudiados en las diez fechas de medición (media \pm ET).

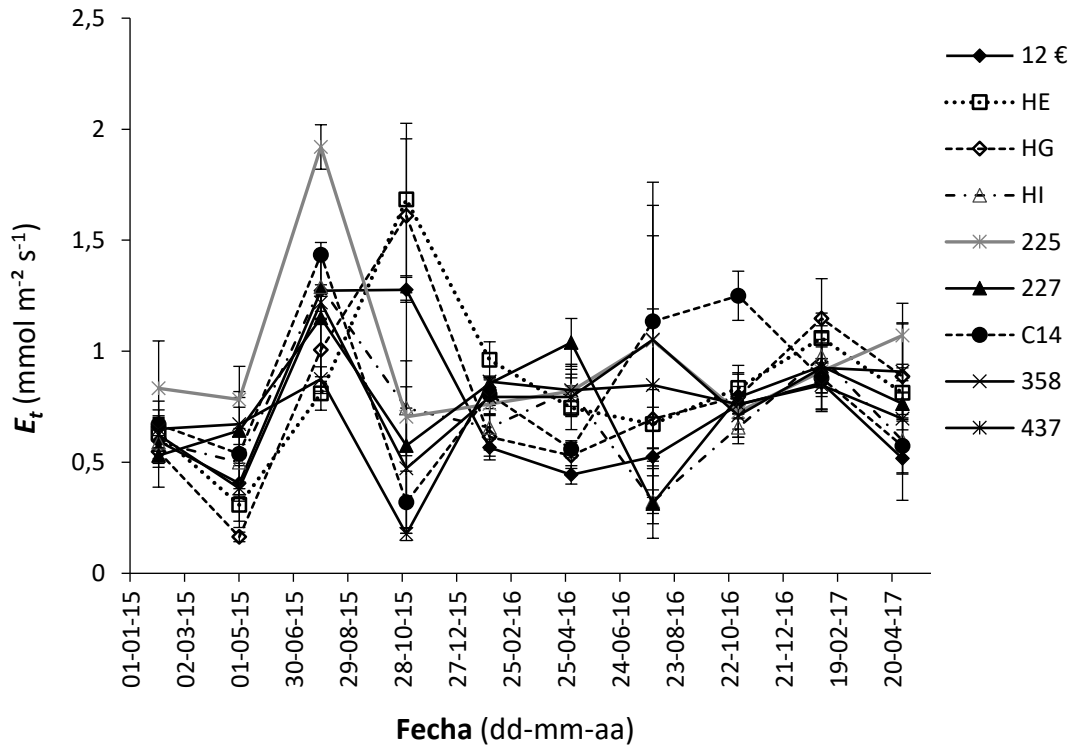


Figura 4.17. Tasa de transpiración total al inicio (E_t) en base al área foliar de los nueve clones de eucalipto estudiados en las diez fechas de medición (media \pm ET).

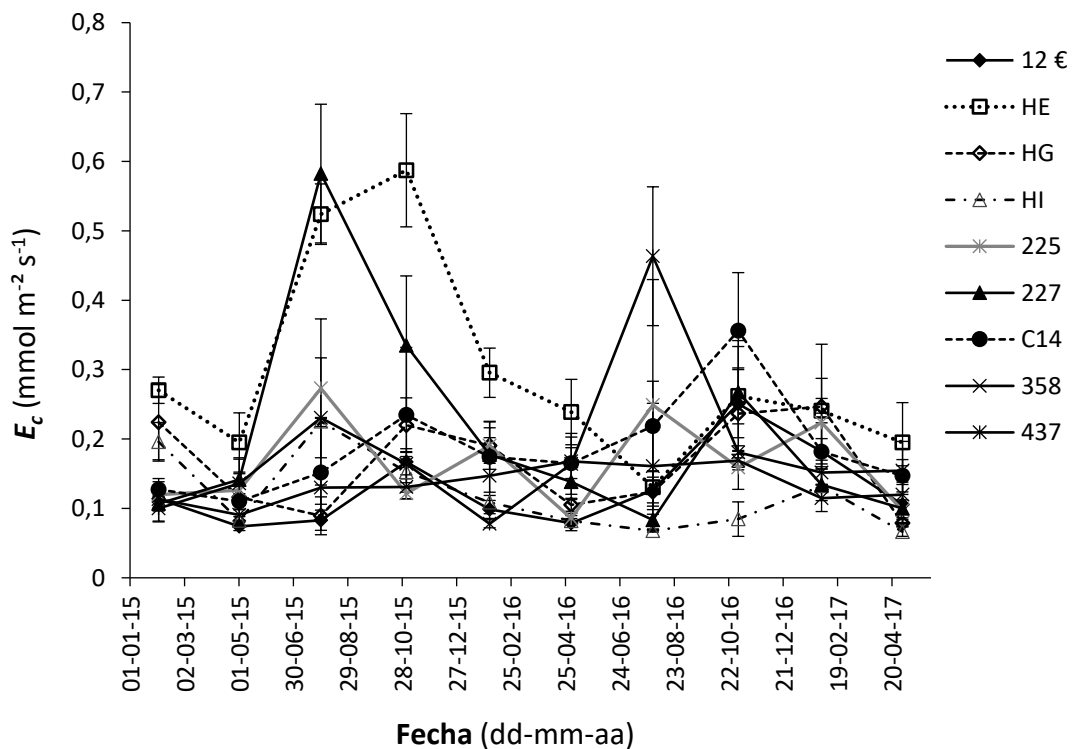


Figura 4.18. Tasa de transpiración cuticular (E_c) en base al área foliar de los nueve clones de eucalipto estudiados en las diez fechas de medición (media \pm ET).

4.4.2 - Transpiración diaria y en intervalos del día

Comparando la transpiración total diaria de las plantas, expresada en base a la superficie foliar transpirante (T_{LA}), entre los nueve clones de *Eucalyptus* y en distintas fechas durante 2.5 años seguidos, se detectaron diferencias significativas entre los distintos clones, fechas de medición (Tabla 4.4) y para la interacción Clon x Fecha ($p < 0.001$) (Figura 4.19).

Como la transpiración diaria también depende del tamaño de la planta, a su vez relacionado con la superficie foliar transpirante, se evaluó la posible relación existente entre la transpiración diaria total y el diámetro o la sección transversal del tallo (Figura 4.20 y 4.21). También se analizó la influencia de la altura de la planta (H), pero su inclusión en el modelo junto con D no lo mejoraba significativamente y por sí sola no resultó una buena predictora, por tanto fue descartada.

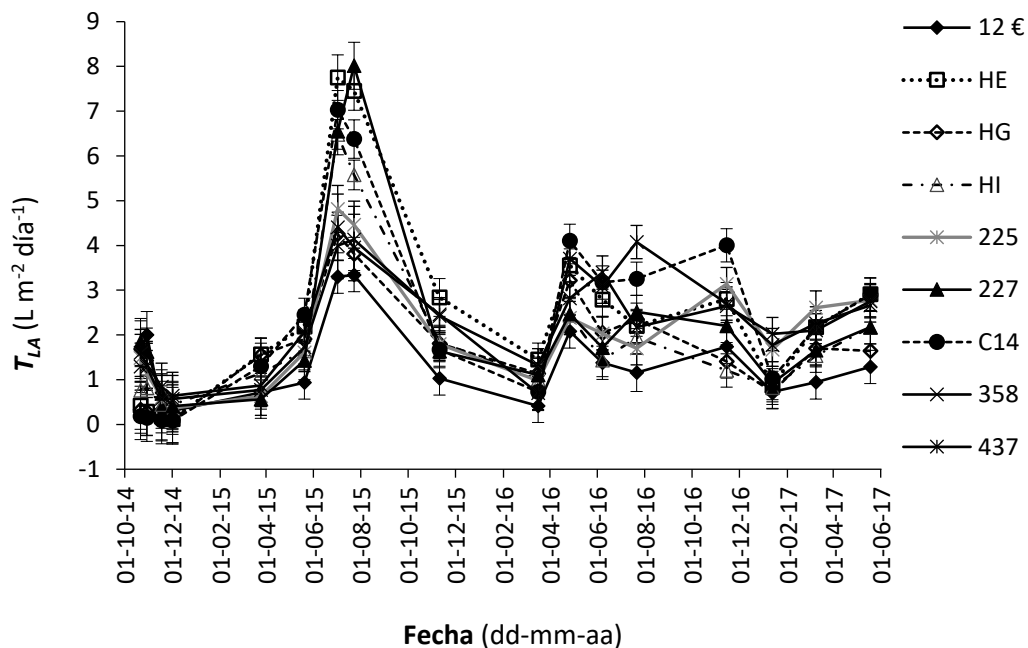


Figura 4.19. Tasa de transpiración diaria en base a la superficie foliar (T_{LA}) de los nueve clones de eucalipto estudiados en las diecisiete fechas de medición (media \pm ET).

Tabla 4.4. Valores medios (\pm ET) de la tasa de transpiración diaria en base a la superficie foliar (T_{LA}) de los distintos genotipos ensayados y fechas de medición. p = nivel de significación. Para cada factor (clon, fecha) letras distintas en cada columna indican diferencias significativas.

Clon	T_{LA} (L m ⁻² día ⁻¹)	Fecha	T_{LA} (L m ⁻² día ⁻¹)
Total	2.04 \pm 0.15		
12 €	1.37 \pm 0.14 a	21/10/2014	1.07 \pm 0.18 abc
		29/10/2014	0.99 \pm 0.18 abc
HE	2.44 \pm 0.14 c	17/11/2014	0.44 \pm 0.18 ab
		01/12/2014	0.34 \pm 0.18 a
HG	1.67 \pm 0.14 ab	25/03/2015	1.01 \pm 0.14 ab
		20/05/2015	1.77 \pm 0.13 cd
HI	1.87 \pm 0.14 abc	02/07/2015	5.40 \pm 0.18 g
		23/07/2015	5.23 \pm 0.17 g
225	2.01 \pm 0.15 abc	10/11/2015	1.95 \pm 0.13 de
		16/03/2016	0.98 \pm 0.13 ab
227	2.21 \pm 0.15 bc	26/04/2016	2.97 \pm 0.12 f
		07/06/2016	2.34 \pm 0.12 de
C14	2.40 \pm 0.14 c	21/07/2016	2.37 \pm 0.13 de
		14/11/2016	2.43 \pm 0.12 ef
358	2.12 \pm 0.15 bc	12/01/2017	1.17 \pm 0.12 bc
		09/03/2017	1.91 \pm 0.12 de
437	2.30 \pm 0.16 bc	18/05/2017	2.36 \pm 0.12 def
p	<0.001	p	<0.001

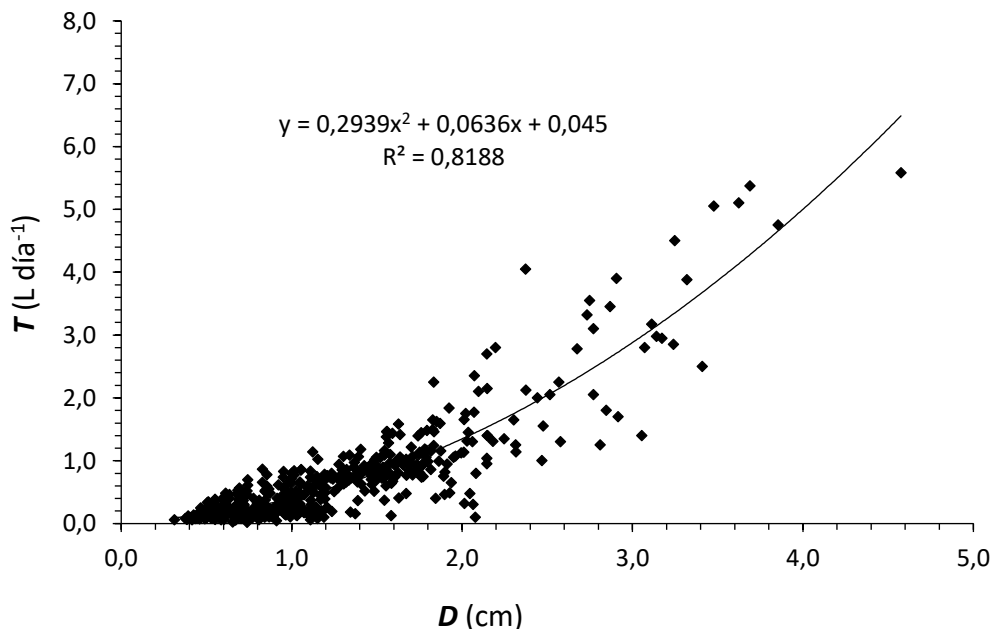


Figura 4.20. Relación entre el diámetro en la base del tallo (D) y la transpiración diaria (T) para el conjunto de clones de *Eucalyptus* estudiados, crecidos en macetas de 10 L y 100 L y medidos en distintas fechas del año.

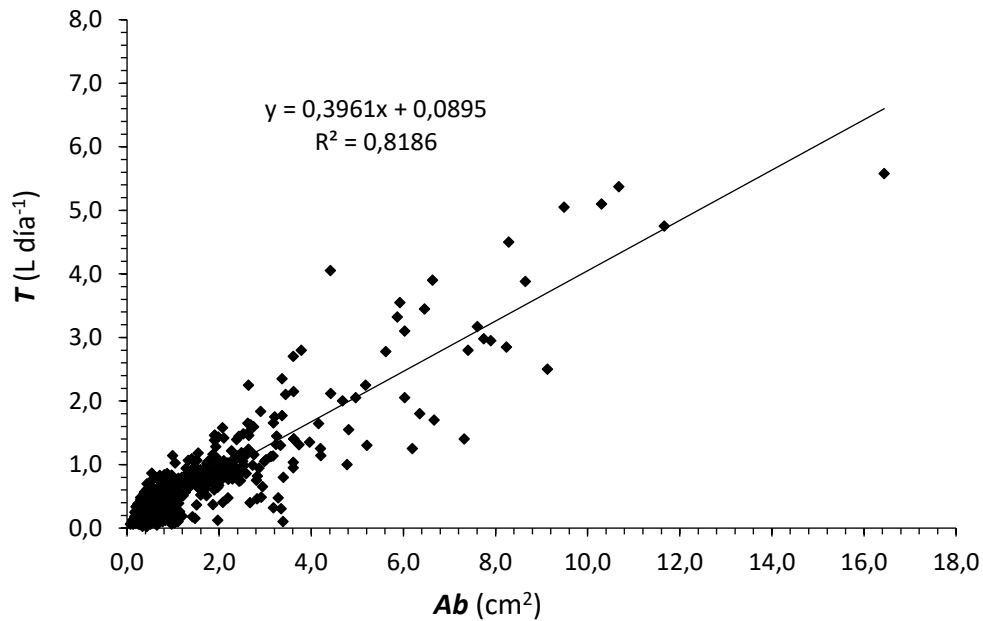


Figura 4.21. Relación entre la sección de la base del tallo (Ab) y la transpiración diaria (T) para el conjunto de clones de *Eucalyptus* estudiados, crecidos en macetas de 10 L y 100 L y medidos en distintas fechas del año.

En el caso de la transpiración en distintos intervalos horarios dentro del día, antes de comparar los intervalos entre sí y entre los nueve clones de *Eucalyptus*, se hizo un análisis previo del potencial hídrico en el sustrato. Se tomó como criterio que el valor estimado de potencial hídrico del sustrato fuese igual (sin estrés hídrico) o distinto (con estrés hídrico) de 0 al 95% de probabilidad. De esta forma se agruparon las fechas de medición en dos grupos, con estrés hídrico y sin estrés hídrico. Se detectaron diferencias significativas entre intervalos del día (Figura 4.22) para la variable estrés (Figura 4.23) y para la interacción Intervalo x Estrés ($p < 0.001$) (Figura 4.24), pero no entre clones ($p = 0.903$), ni tampoco para las interacciones Clon x Estrés ($p = 0.348$) y Clon x Intervalos ($p = 0.238$).

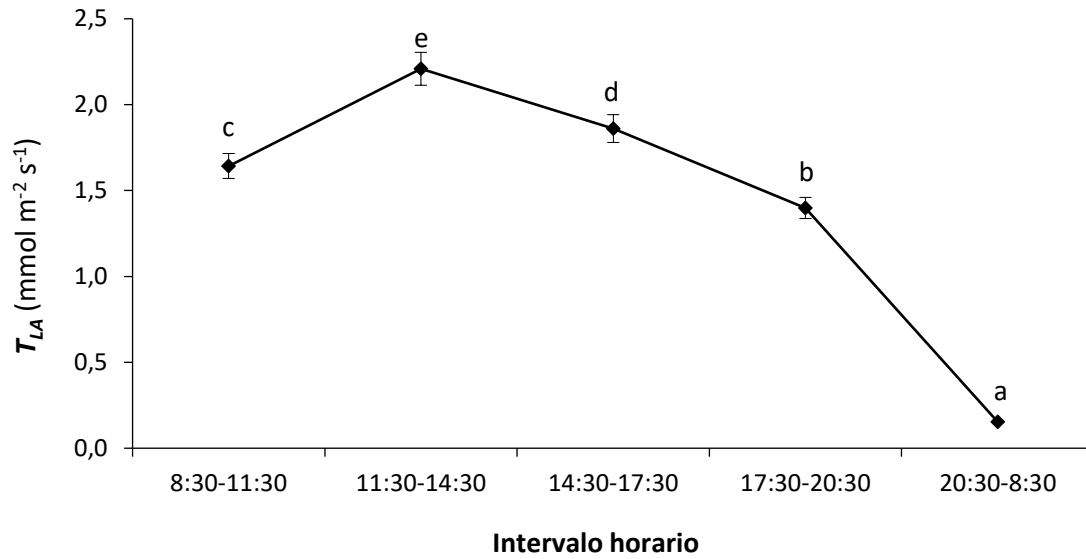


Figura 4.22. Tasa de transpiración para cada intervalo horario (media \pm ET), considerando el conjunto de clones, tratamientos de riego (con estrés y sin estrés hídrico) y ambos periodos evaluados, junio y julio. Letras distintas en cada intervalo indican diferencias significativas ($p < 0.001$). Las horas son horas locales (UTC+2).

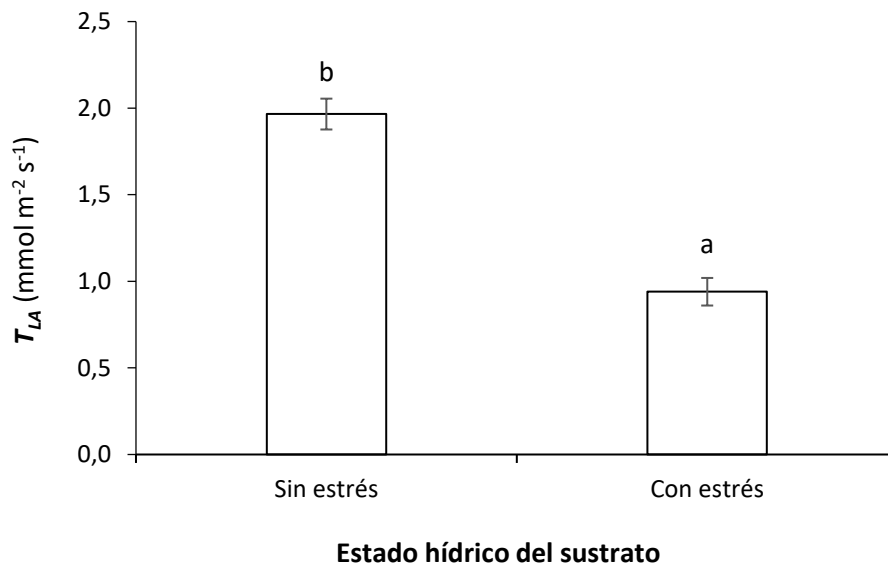


Figura 4.23. Tasa de transpiración para cada tratamiento de disponibilidad de agua (media \pm ET), considerando el conjunto de clones, intervalo horario y ambos periodos evaluados, junio y julio (media \pm ET). Letras distintas en cada intervalo indican diferencias significativas ($p < 0.001$).

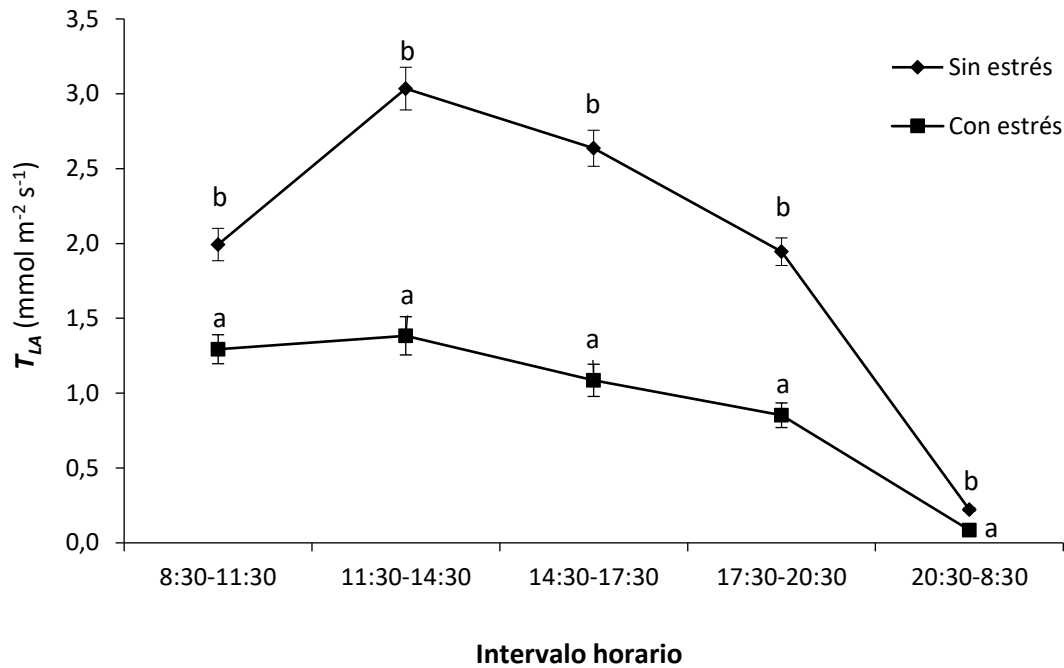


Figura 4.24. Tasa de transpiración para cada intervalo horario y tratamiento de disponibilidad de agua (media \pm ET), considerando el conjunto de clones y ambos periodos evaluados, junio y julio. Letras distintas en cada intervalo horario indican diferencias significativas: intervalo 8:30-11:30 ($p = 0.007$), para los demás intervalos: $p < 0.001$. Las horas son horas locales (UTC+2).

Las siguientes figuras muestran la relación entre el potencial hídrico al amanecer y la tasa de transpiración diaria (Figura 4.25); la tasa de transpiración medida en el IRGA (E, Figura 4.26) y la eficiencia intrínseca del uso del agua (EIUA, Figura 4.27).

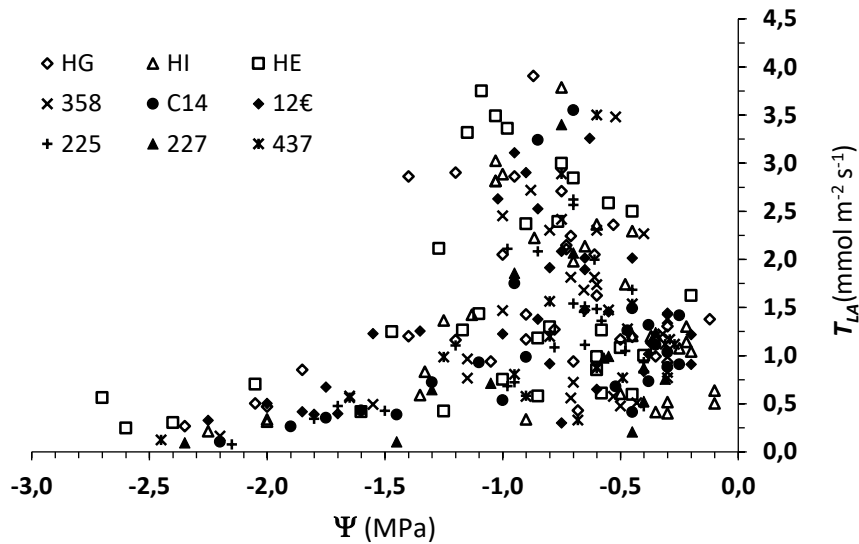


Figura 4.25. Relación entre la tasa de transpiración diaria durante un período de 24 horas, y el potencial hídrico al amanecer del día inicial de cada fecha de medición, para los nueve clones estudiados, considerando el conjunto de intervalos horarios y ambos periodos evaluados, junio y julio (media \pm ET).

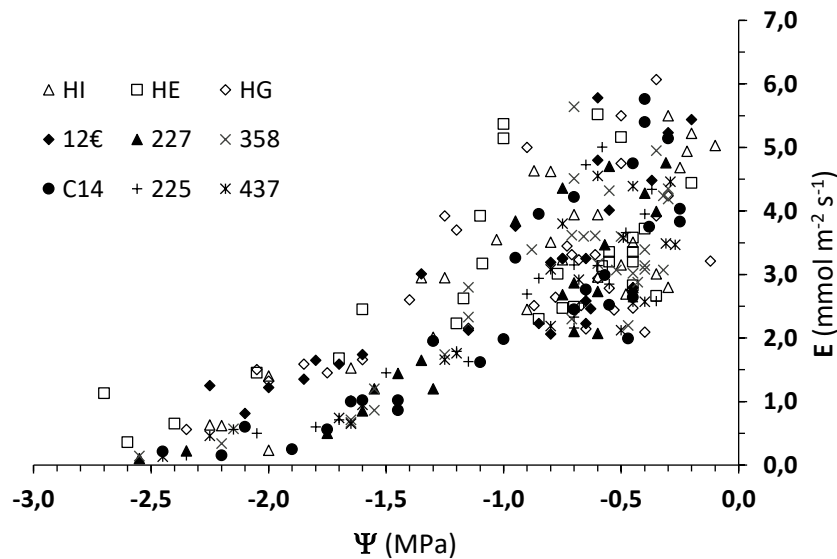


Figura 4.26. Relación entre la tasa de transpiración medida en el IRGA (E), medida 2 h después del amanecer, y el potencial hídrico al amanecer, para los nueve clones estudiados, considerando el conjunto de intervalos horarios y ambos periodos evaluados, junio y julio (media \pm ET). E se correlacionó significativamente con la conductancia estomática, g_s ($E = 9.036 g_s + 5.547$, $r = 0.963$, $p < 0.001$) y con la fotosíntesis neta, A ($A = 0.038 E^4 - 0.661 E^3 + 3.446 E^2 - 2.525 E + 0.619$, $r = 0.962$, $p < 0.001$). E ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of H_2O), g_s ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of H_2O), A ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of CO_2).

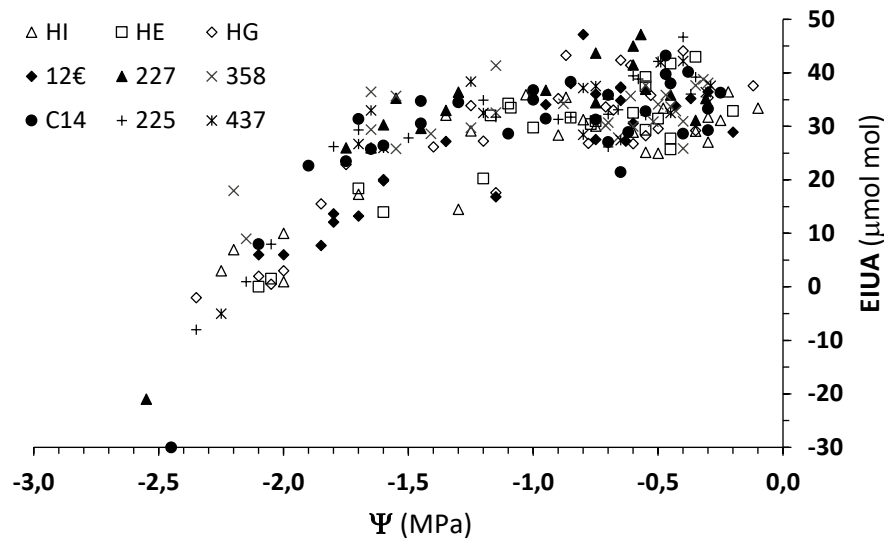


Figura 4.27. Relación entre la eficiencia intrínseca del uso del agua ($EIUA = A/g_s$) medida 2 h después del amanecer y el potencial hídrico al amanecer, para los nueve clones estudiados, considerando el conjunto de intervalos horarios y ambos periodos evaluados, junio y julio (media \pm ET). A ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of CO_2), g_s ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of H_2O).

4.4.3 - Crecimiento y consumo hídrico en condiciones variables de humedad

Los datos proporcionados por los dendrómetros muestran la variación de diámetro del tronco que se caracteriza por su expansión y contracción diaria, influenciado por cada ciclo de riego-estrés. En la época del año en que se llevaron a cabo las mediciones (mes de julio), la expansión del diámetro del tallo se iniciaba por la tarde, generalmente entre las 17:30 h y las 18:40 h (hora local), cuando las plantas estaban bien regadas ($\Psi \geq -1.0$ MPa), pero retrasándose hasta las 20:30–21:40 h en los días en que estaban algo estresadas ($\Psi < -1.2$ MPa), tanto más cuanto más estresadas. Este incremento diametral, originado por la rehidratación de los tejidos, se alargaba hasta justo antes de amanecer, alcanzando en ese momento el valor máximo diario del tallo (entre las 6:00 y las 7:00 h). La salida de sol en esta época se producía en torno a las 7:20 h (hora local) y la puesta de sol a las 21:50 h. No obstante, la luz crepuscular se percibía desde las 6:50, antes de la salida de sol, y hasta las 22:20 h, después de la

puesta. Posteriormente, una vez amanecido, generalmente entre las 7:50 h y las 8:40 h, el tronco comenzaba a contraerse, progresivamente hasta alcanzar su valor mínimo diario sobre las 14:00–16:00 h, pero detectándose el cambio de tendencia originado por el inicio del cierre estomático a las 12:00–13:30 h (algún día retrasándose hasta las 15:30 h). En ese momento, permanecía con el valor mínimo hasta que volvía a iniciarse la rehidratación, por la tarde, y se iniciaba un nuevo ciclo (Figura 4.28). No se encontró una tendencia general que diferenciara entre clones respecto a los momentos del día en que se iniciaba la expansión o contracción del tallo.

En los días en que no se sometieron las plantas a restricción hídrica, el valor máximo del tronco de cada día fue generalmente superior al del día anterior, lo que indica crecimiento. Por el contrario, durante los días en que se sometieron las plantas a restricción hídrica, el máximo diámetro del tronco de cada día alcanzó generalmente un valor inferior al máximo del día anterior, dando como resultado contracciones diarias, proporcionales al grado de estrés hídrico sufrido por cada planta. Las series de crecimiento mostraron que todos los clones siguieron generalmente la misma tendencia y estuvieron fuertemente sincronizados a pesar de las diferencias en el valor absoluto de su crecimiento (Figuras 4.29 y 4.30). Al regar las plantas tras un ciclo de estrés hídrico, estas recuperaban la hidratación en menos de un día. Cabe resaltar, la rapidez de respuesta en la rehidratación, así como el amplio intervalo de variación diamétrica (altibajos en el proceso hidratación-deshidratación) que presentaron los clones 12€, HE y HI en algunas fechas. Los valores del clon C14 del año 2017 han sido eliminados porque fue atacado por un hongo patógeno.

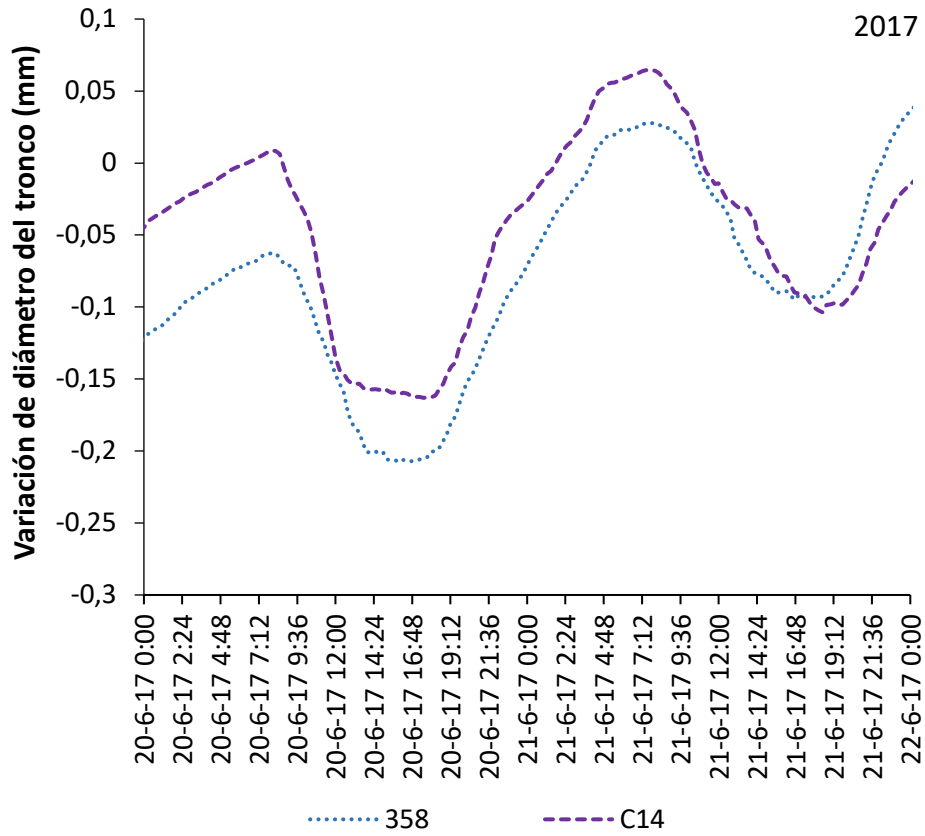


Figura 4.28. Variaciones del diámetro del tronco caracterizadas por su expansión y contracción diaria en dos días consecutivos, de los clones 358 y C14, medidos en la época estival del año.

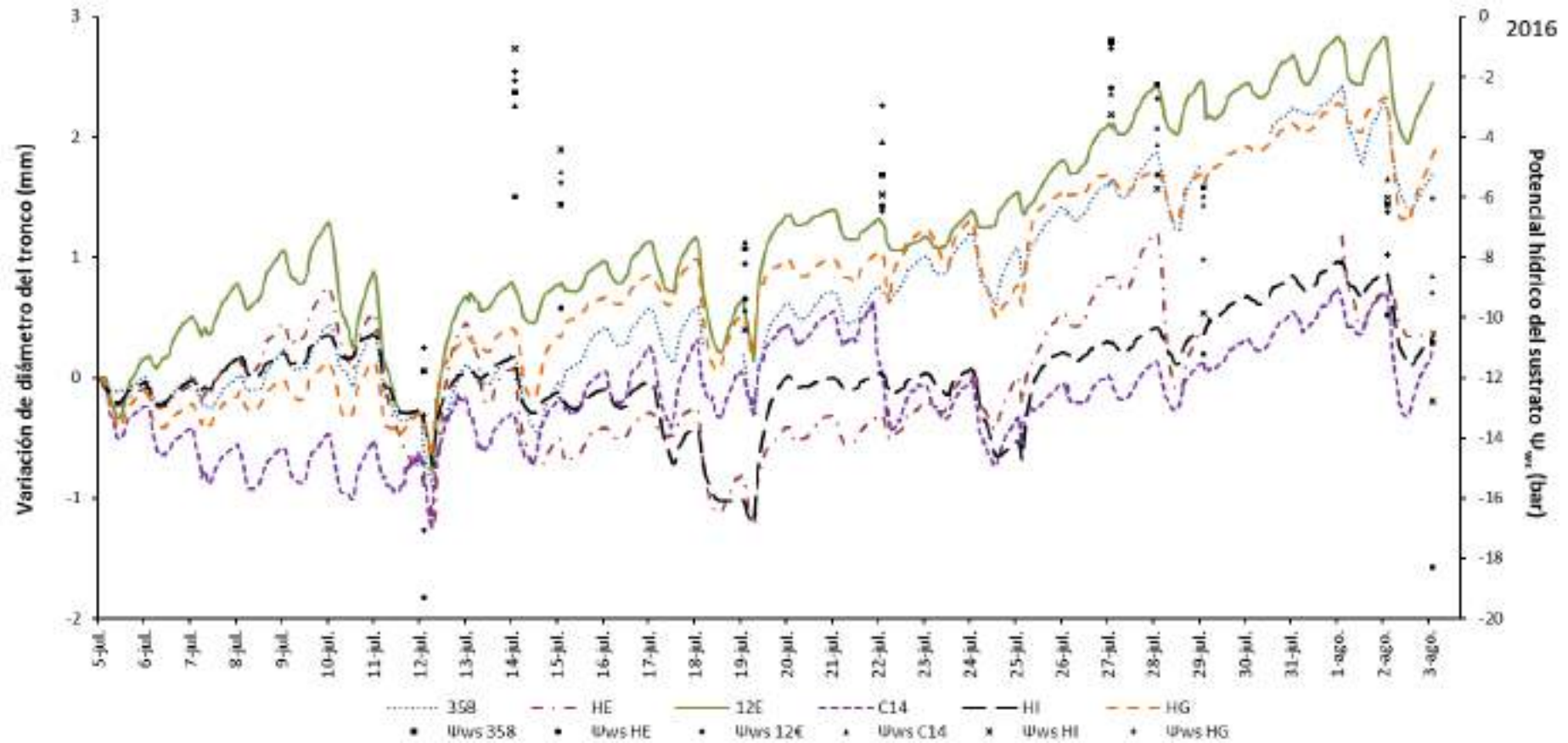


Figura 4.29. Variaciones del diámetro del tronco de los nueve clones medidos en la época estival del año de 2016 y sometidos a ciclos de riego y estrés hídrico. Los riegos se aplicaron los días 12, 19, 25 y 28 de julio y el 2 de agosto. Los puntos indican el potencial hídrico del sustrato en algunos días, cuando se apreciaban ciertos síntomas de estrés hídrico o antes de regar.

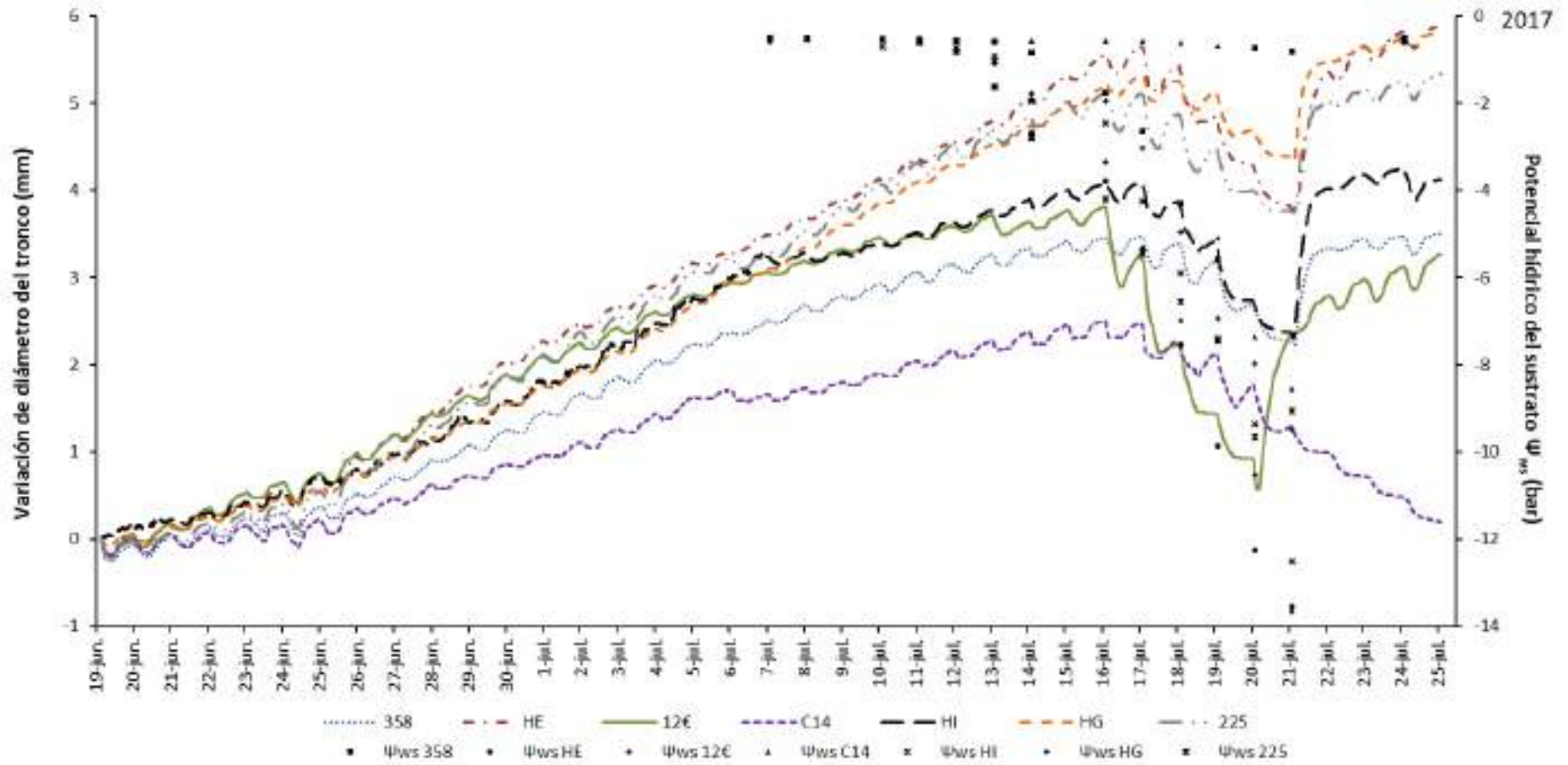


Figura 4.230. Variaciones del diámetro del tronco de los nueve clones medidos en la época estival del año de 2017 y sometidos a ciclos de riego y estrés hídrico. Los puntos indican el potencial hídrico del sustrato en los días en que se determinó.

Las variables ambientales tomadas en consideración ejercieron un efecto muy variable entre los diferentes parámetros medidos en las plantas, unas veces muy significativo y otras no. Considerando el conjunto de clones (con un tamaño tal que promediaron 0.93 m^2 de área foliar por planta), el potencial hídrico de las plantas (Ψ), medido a primera hora de la mañana, se vio afectado por el del sustrato (Ψ_{ws}) ($\Psi = -0.139 \Psi_{ws}^2 + 0.669 \Psi_{ws} - 0.624$, $R^2 = 0.475$, $p < 0.001$), medidos ambos en MPa. Considerando la transpiración diaria de las plantas (T_{LA} , $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), se vio afectada casi en un 60% por el potencial hídrico del sustrato ($T_{LA} = 2.143 e^{1.389\Psi_{ws}}$, $R^2 = 0.596$, $p < 0.001$), pero no por el potencial hídrico de la planta, medido al amanecer (Figura 4.31). Según se aprecia en esta figura, para $\Psi_{ws} < -0.8 \text{ MPa}$ se obtuvieron siempre valores de T_{LA} inferiores a unos $1.3 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, igual que sucedió para $\Psi \leq -1.2 \text{ MPa}$ ($\leq -1.4 \text{ MPa}$ para HE y HG). Asimismo, para $\Psi > -1.2 \text{ MPa}$ ($> -1.4 \text{ MPa}$ para HE y HG) T_{LA} no se relacionó con Ψ . Cabe señalar que, para estas plantas, ese valor de T_{LA} próximo a $1.3 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ coincidió con el punto en el que T (L día^{-1}) igualaba a la transpiración de referencia del pasto ($T/E_{\text{pasto}} = 1$), a través de la relación: $T_{LA} = 1.282 (T/E_{\text{pasto}})^{0.824}$, $r = 0.941$, $p < 0.001$. T/E_{pasto} varió entre 0.20 y 3.30. En cuanto a la transpiración instantánea medida con el IRGA a media mañana (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), al contrario que T_{LA} , se relacionó mejor con Ψ ($E = 5.195 e^{0.564\Psi}$, $R^2 = 0.395$, $p < 0.001$) que con Ψ_{ws} ($R^2 = 0.181$).

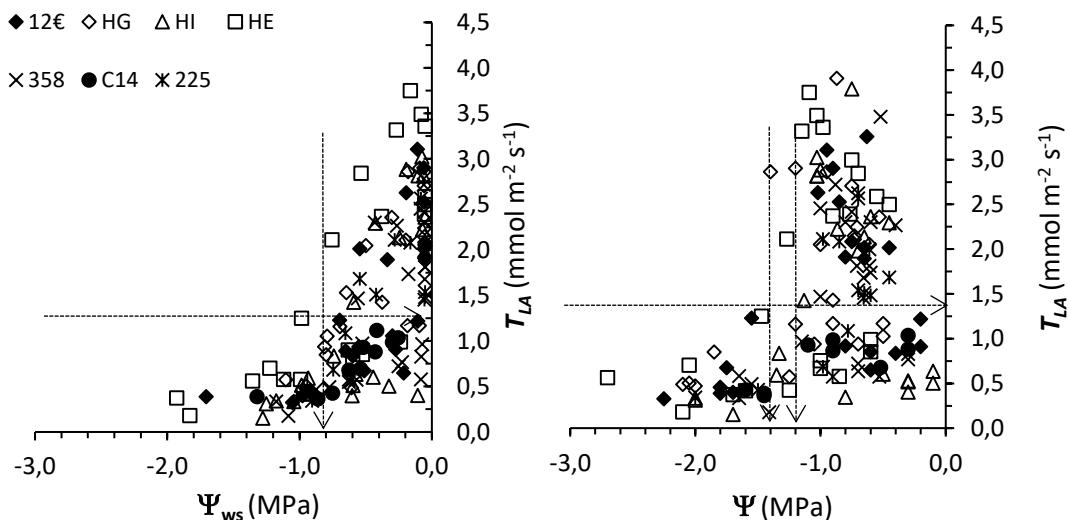


Figura 4.31. (Izda.) Relación entre la transpiración diaria (T_{LA}) y el potencial hídrico del sustrato (Ψ_{ws}) y (Dcha.) entre T_{LA} y el potencial hídrico de las plantas (Ψ), para los siete clones de eucalipto en los ensayos realizados.

En lo que se refiere al incremento del diámetro entre dos días consecutivos (Id_{max}), no se vio significativamente afectado por Ψ o Ψ_{ws} ($R^2 \leq 0.231$), ni se correlacionó con la transpiración ($r = 0.374$). Sin embargo, se pudo observar que para poder obtener incrementos positivos (esto es, $Id_{max} \geq 0.0$ mm), se debía cumplir que $\Psi \geq -1.4$ MPa, o $\Psi_{ws} \geq -1.1$ MPa. Por el contrario, la correlación de Id_{max} con la amplitud diaria de la oscilación del diámetro ($Dt_{maxn} - Dt_{minn}$) resultó negativa y significativa ($Id_{max} = -0.245 \ln[Dt_{maxn} - Dt_{minn}] - 0.336$, $r = -0.695$, $p < 0.001$). El valor límite de la oscilación diaria para a partir del cual siempre se obtuvieron incrementos diametrales negativos estuvo en torno a 0.6 mm. Oscilaciones menores de 0.6 mm resultaron en incrementos negativos o positivos, en función del efecto conjunto de todas las variables puestas en juego. Del mismo modo, la oscilación diaria del diámetro ($Dt_{maxn} - Dt_{minn}$) se relacionó significativa y negativamente tanto con Ψ ($[Dt_{maxn} - Dt_{minn}] = 0.161\Psi^2 + 0.023\Psi + 0.237$, $R^2 = 0.402$, $p < 0.001$) como con Ψ_{ws} ($[Dt_{maxn} - Dt_{minn}] = 0.035\Psi_{ws}^2 - 0.524\Psi_{ws} + 0.185$), $R^2 = 0.489$, $p < 0.001$) (Figura 4.32). Asimismo, este último parámetro se correlacionó negativa y significativamente con la transpiración diaria ($T_{LA} = 0.610[Dt_{maxn} - Dt_{minn}]^{-0.568}$, $r = -0.600$, $p < 0.001$), resultando que para valores de la oscilación diaria por encima de 0.6 mm T_{LA} resultó siempre menor de $2.0 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

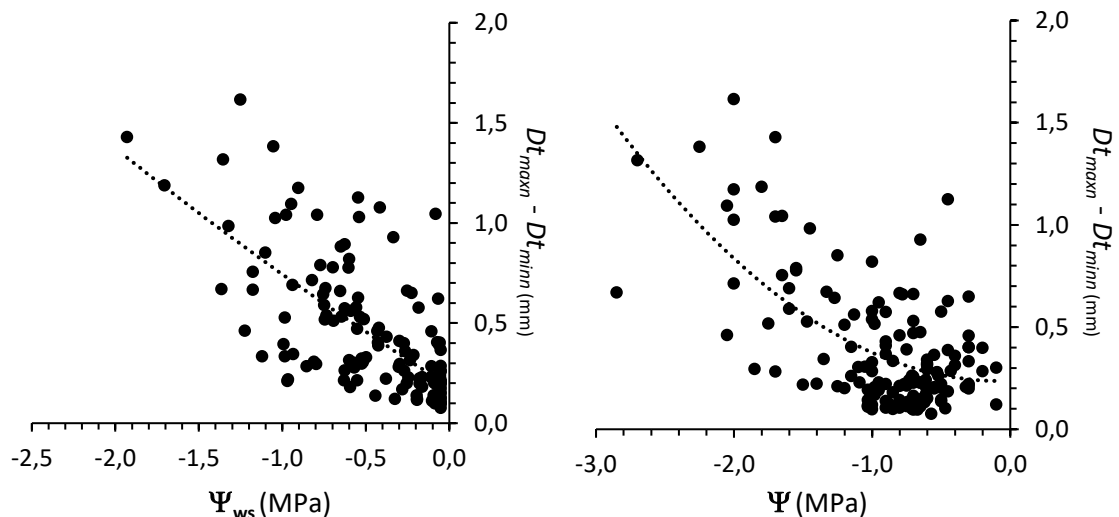


Figura 4.32. Relación entre la oscilación diaria del diámetro ($Dt_{maxn} - Dt_{minn}$) y el potencial hídrico del sustrato (Ψ_{ws}) (Izda.) y el potencial hídrico de las plantas (Ψ) (Dcha.), para el conjunto de clones y los dos años de medición.

Respecto al efecto sobre la transpiración, o sobre las variaciones diarias del diámetro del tallo principal, de las otras variables ambientales medidas (velocidad del viento, temperatura del aire, humedad relativa, radiación solar o la propia evapotranspiración de referencia), el análisis de regresión no mostró relación significativa en este estudio.

4.4.4 - Distribución de biomasa

Para poder determinar las tasas de transpiración de las plantas en base a la superficie foliar transpirante (T_{LA}) es necesario conocer el valor de este parámetro. Como éste solo se midió con precisión en la medición correspondiente a la fecha final (tras la cosecha de las plantas), para las demás fechas se hizo necesario estimar sus valores en base a otros parámetros de las plantas, por ejemplo el diámetro en la base del tronco principal (D). Por ello, se obtuvieron ecuaciones alométricas que relacionaba D con otras partes de las plantas como peso seco de los componentes del árbol (hojas, tallos y raíz) y la superficie foliar. Dichas ecuaciones se determinaron para cada clon por separado, aunque sin diferencias significativas entre la mayoría de ellos, de ahí que se muestren solamente la relación obtenida para el conjunto de clones (Figuras 4.33 a 4.36), aunque a efectos de cálculo se utilizó para cada clon la suya propia. Los valores medios ($\pm ET$) del peso seco de los clones en las diferentes fechas de cada cosecha, así como la significación de sus diferencias, se muestran en las Tablas 4.4a y 4.4b. En cuanto a la distribución de la biomasa en los diferentes órganos, se obtuvieron diferencias significativas entre clones para algunos de los ensayos. Considerando la relación de peso foliar a peso de parte aérea [$PS_{hj} / (PS_{hj} + PS_{tl})$] los valores medios por clon en las cuatro cosechas se movieron en un rango de 0.36 a 0.50, siendo significativas para los ensayos cosechados en jun-2015 (100L), jun-2016 (10L) y mayo-2017 (10L), ($0.002 \leq p \leq 0.012$), pero no en el de jun-2016 (100L) ($p = 0.508$). Aunque con leves diferencias entre cada ensayo, la tendencia general fue que el clon 12€ presentó valores en el rango más bajo de este parámetro y los clones C14 y HE en el rango más alto. Considerando ahora la relación parte aérea a raíz

$[(PS_{hj}+PS_{tl}) / PS_{rz}]$, los valores obtenidos se movieron en el rango 1.4–4.0, resultando significativos para los ensayos cosechados en junio-2016 (10L) y mayo-2017 (10L) ($p = 0.010$ y 0.001 , respectivamente), pero no los otros dos ($0.259 \leq p \leq 0.298$). Asimismo, para este parámetro, la tendencia obtenida en los cuatro ensayos cosechados fue que el clon 12€ siempre estuvo en el grupo que presentó las ratios más bajas, mientras que el clon C14 estuvo en el de las más altas.

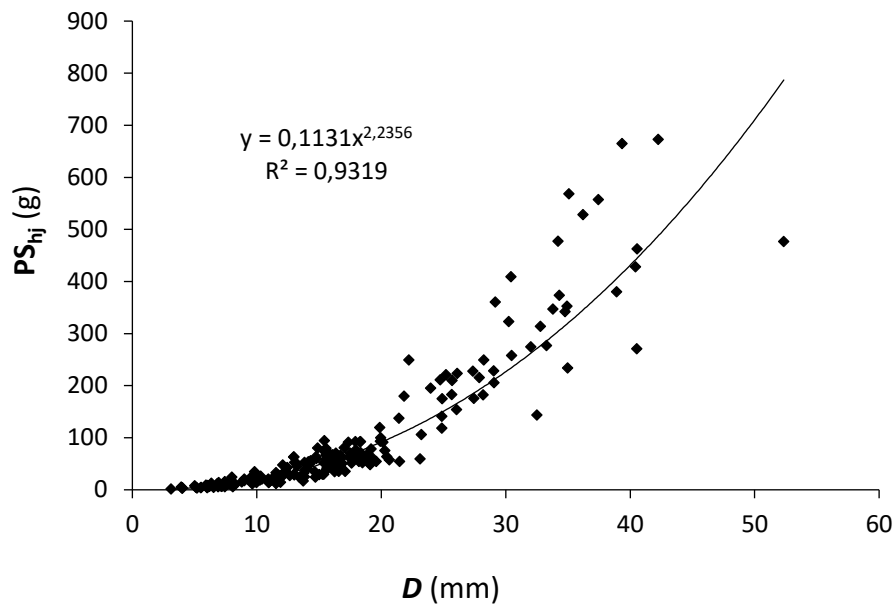


Figura 4.33. Relación entre el diámetro en la base del tronco principal (D) y el peso seco de hojas (PS_{hj}) para el conjunto de clones de *Eucalyptus* estudiados y crecidos en macetas de 10 L y 100 L.

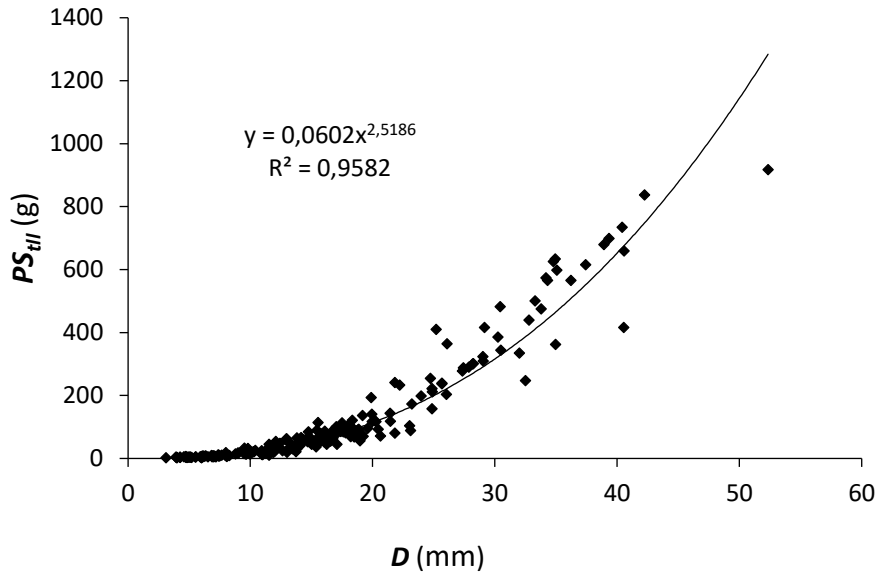


Figura 4.34. Relación entre el diámetro en la base del tronco principal (D) y el peso seco de tallos (PS_{III}) para el conjunto de clones de *Eucalyptus* estudiados y crecidos en macetas de 10 L y 100 L.

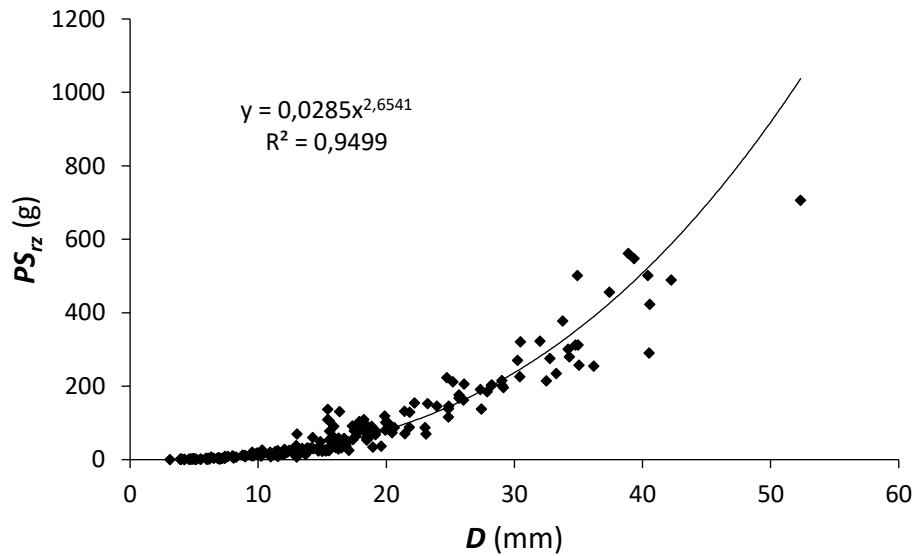


Figura 4.35. Relación entre el diámetro en la base del tronco principal (D) y el peso seco de raíces (PS_{Iz}) para el conjunto de clones de *Eucalyptus* estudiados y crecidos en macetas de 10 L y 100 L.

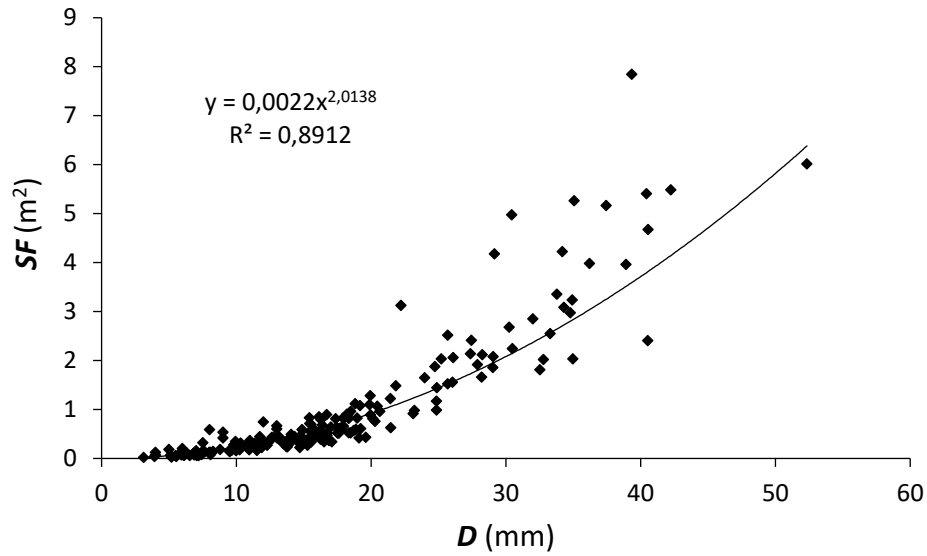


Figura 4.36. Relación entre el diámetro en la base del tronco principal (D) y la superficie foliar total de la planta (SF) para el conjunto de clones de *Eucalyptus* estudiados y crecidos en macetas de 10 L y 100 L.

Tabla 4.4a. Peso seco de hojas (PS_{hj}), tallos (PS_{tl}) y raíces (PS_{rz}) para el conjunto total de clones de eucalipto en los casos en que no se obtuvieron diferencias significativas entre clones. Se muestra el volumen del contenedor en el que habían sido cultivadas, 10 o 100 L. p : nivel de significación.

	Junio-2015 (100 L)		Junio-2016 (10 L)			Junio-2016 (100 L)		
	PS_{hj} (g)	PS_{tl} (g)	PS_{hj} (g)	PS_{tl} (g)	PS_{rz} (g)	PS_{hj} (g)	PS_{tl} (g)	PS_{rz} (g)
Total	220 ± 20	339 ± 37	65 ± 3	83 ± 4	78 ± 5	458 ± 42	542 ± 48	346 ± 40
p	0.423	0.249	0.064	0.143	0.095	0.272	0.697	0.888

Tabla 4.4b. Peso seco de hojas (PS_{hj}), tallos (PS_{tl}) y raíces (PS_{rz}) de los distintos genotipos de eucalipto en los casos en que se obtuvieron diferencias significativas entre clones. Se muestra el volumen del contenedor en el que habían sido cultivadas, 10 o 100 L. p : nivel de significación.

Clon	Junio-2015 (100 L)	Mayo-2017 (10 L)		
	PS_{rz} (g)	PS_{hj} (g)	PS_{tl} (g)	PS_{rz} (g)
Total	229.6 ± 25.9	47.6 ± 2.6	57.4 ± 3.1	29.8 ± 1.5
12€	474.3 ± 142.5 ab	35.1 ± 4.0 a	45.0 ± 3.3 ab	27.8 ± 2.3 ab
225	175.5 ± 48.1 ab	46.4 ± 4.6 ab	48.7 ± 6.2 ab	25.2 ± 3.0 ab
227	315.5 ± 3.1 b	62.9 ± 7.0 b	83.7 ± 11.2 c	38.0 ± 6.0 b
358	186.2 ± 32.2 ab	66.7 ± 5.6 b	73.7 ± 5.0 bc	38.7 ± 3.8 b
437	258.0 ± 122.2 ab	46.3 ± 2.5 ab	60.7 ± 5.2 abc	33.6 ± 2.3 ab
C14	154.9 ± 45.6 ab	60.7 ± 3.2 b	70.9 ± 5.3 bc	33.2 ± 2.2 ab
HE	208.0 ± 33.4 ab	47.3 ± 7.7 ab	47.4 ± 7.6 ab	27.7 ± 4.5 ab
HG	116.1 ± 25.2 a	31.6 ± 2.8 a	50.6 ± 2.4 ab	25.5 ± 0.2 ab
HI	262.8 ± 81.1 ab	31.5 ± 5.7 a	35.9 ± 6.2 a	18.8 ± 4.0 a
p	0.039	<0.001	<0.001	0.007

4.4.5 - Vulnerabilidad a la cavitación

Los segmentos de entrenudos de ramas finas revelaron diferencias significativas entre clones para la conductancia hidráulica máxima, para la conductancia hidráulica específica xilemática, así como también para la conductancia hidráulica específica foliar ($p < 0.001$) (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Valores medios (\pm ET) de la conductancia hidráulica máxima (C_{max}), la conductancia hidráulica específica xilemática (C_{smax}), y la conductancia hidráulica específica foliar (C_{lmax}) del xilema de los segmentos de entrenudos de los distintos genotipos de eucalipto ensayados. p = nivel de significación. Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas entre clones.

	C_{max} ($\text{kg s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$)	C_{smax} ($\text{kg s}^{-1} \text{m}^{-2} \text{MPa}^{-1}$)	C_{lmax} ($\text{kg s}^{-1} \text{m}^{-2} \text{MPa}^{-1}$)
Total	$3.0 \cdot 10^{-4} \pm 2.4 \cdot 10^{-5}$	96.21 ± 5.33	$0.9 \cdot 10^{-2} \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$
Clon			
12€	$4.8 \cdot 10^{-4} \pm 9.3 \cdot 10^{-5}$ ab	154.44 ± 19.37 d	$1.2 \cdot 10^{-2} \pm 2.0 \cdot 10^{-3}$ abc
HE	$3.5 \cdot 10^{-4} \pm 3.4 \cdot 10^{-5}$ b	110.89 ± 14.56 bcd	$0.9 \cdot 10^{-2} \pm 1.2 \cdot 10^{-3}$ abc
HG	$4.3 \cdot 10^{-4} \pm 8.7 \cdot 10^{-5}$ ab	126.07 ± 5.06 cd	$1.1 \cdot 10^{-2} \pm 1.2 \cdot 10^{-3}$ bc
HI	$5.6 \cdot 10^{-4} \pm 12.0 \cdot 10^{-5}$ ab	143.80 ± 18.76 d	$1.2 \cdot 10^{-2} \pm 1.7 \cdot 10^{-3}$ c
225	$1.2 \cdot 10^{-4} \pm 1.6 \cdot 10^{-5}$ a	55.97 ± 6.01 a	$0.5 \cdot 10^{-2} \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ a
227	$1.9 \cdot 10^{-4} \pm 1.1 \cdot 10^{-5}$ ab	62.69 ± 5.69 ab	$0.5 \cdot 10^{-2} \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ ab
C14	$2.5 \cdot 10^{-4} \pm 2.7 \cdot 10^{-5}$ ab	82.54 ± 10.37 abc	$0.6 \cdot 10^{-2} \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ ab
358	$2.3 \cdot 10^{-4} \pm 2.4 \cdot 10^{-5}$ ab	77.53 ± 9.72 abc	$0.7 \cdot 10^{-2} \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ abc
437	$2.1 \cdot 10^{-4} \pm 1.7 \cdot 10^{-5}$ ab	84.15 ± 8.54 abc	$0.8 \cdot 10^{-2} \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ abc
p	<0.001	<0.001	<0.001

Considerando el comportamiento de los nueve clones, medidos en varios niveles de estrés hídrico a lo largo de dos semanas, desde óptimo estado hídrico hasta alcanzar niveles de Ψ de entre -2.0 y -3.0 MPa, los valores de potencial hídrico para el cual se obtuvo una pérdida de conductancia hidráulica del 50% (PCH₅₀) o del 80% (PCH₈₀) se muestran la Tabla 4.6.

Tabla 4.6. Valores medios de potencial hídrico (MPa) para el cual se obtuvo una pérdida de conductancia hidráulica del 50% (PCH_{50}) y del 80% (PCH_{80}) para los distintos clones.

Clon	PCH_{50} (MPa)	PCH_{80} (MPa)
12€	-0.96	-1.33
HE	-0.77	-1.31
HG	-0.93	-1.26
HI	-1.36	-2.61
227	-0.59	-0.80
225	-0.54	-0.86
C14	-0.64	-0.94
358	-0.48	-0.71
437	-0.31	-0.77

4.4.6 - Parámetros derivados de curvas presión-volumen

Las hojas recolectadas en las dos fechas antes mencionadas, tras someterlas a ciclos moderados de estrés hídrico, mostraron diferencias significativas entre clones en los parámetros hídricos derivados de las curvas presión-volumen ($p \leq 0.004$). Entre fechas, se detectaron diferencias significativas para Ψ_{s100} y Ψ_{s0} , pero no para ε , CHR_0 ni CHR_a (Tabla 4.7). Asimismo, la interacción entre los dos factores (Clon x Fecha) resultó significativa para Ψ_{s100} ($p = 0.006$), ε ($p = 0.044$) y CHR_a ($p = 0.025$) (Figuras 4.37, 4.38 y 4.39), pero no para Ψ_{s0} ($p = 0.258$) ni para CHR_0 ($p = 0.811$).

Tabla 4.7. Valores medios (\pm ET) del potencial osmótico a plena turgencia (Ψ_{s100}), el potencial osmótico en el punto de pérdida de la turgencia (Ψ_{s0}), el módulo de elasticidad de la pared celular (ϵ), el contenido hídrico relativo en el punto de pérdida de la turgencia (CHR_0) y el contenido hídrico relativo en el apoplasto (CHR_a) de los distintos genotipos de eucalipto ensayados y fechas de medición. p = nivel de significación. Para cada factor (clon, fecha) letras distintas en cada columna indican diferencias significativas.

	Ψ_{s100} (MPa)	Ψ_{s0} (MPa)	ϵ (MPa)	CHR_0 (%)	CHR_a (%)
Total	-1.40 \pm 0.02	-1.80 \pm 0.03	7.0 \pm 0.4	85.0 \pm 0.1	31.4 \pm 1.5
Clon					
12€	-1.53 \pm 0.03 ab	-1.96 \pm 0.07 ab	7.8 \pm 0.8 abc	87.3 \pm 1.3 abc	39.0 \pm 1.9 ab
HE	-1.36 \pm 0.08 bc	-1.71 \pm 0.08 c	7.9 \pm 1.2 bc	86.7 \pm 2.8 abc	31.1 \pm 4.3 ab
HG	-1.69 \pm 0.07 a	-1.99 \pm 0.07 a	12.4 \pm 1.4 d	88.9 \pm 0.8 c	22.2 \pm 2.7 a
HI	-1.37 \pm 0.09 bc	-1.65 \pm 0.11 c	8.5 \pm 1.1 c	87.9 \pm 0.9 bc	28.1 \pm 5.1 ab
225	-1.31 \pm 0.05 c	-1.72 \pm 0.06 bc	5.8 \pm 0.5 abc	84.9 \pm 0.7 abc	33.4 \pm 3.3 ab
227	-1.39 \pm 0.03 bc	-1.83 \pm 0.05 abc	5.8 \pm 0.6 abc	81.1 \pm 1.4 a	24.9 \pm 3.6 ab
C14	-1.25 \pm 0.05 c	-1.82 \pm 0.05 abc	4.3 \pm 0.5 a	82.3 \pm 1.2 ab	41.0 \pm 5.0 b
358	-1.38 \pm 0.04 bc	-1.79 \pm 0.07 abc	6.4 \pm 0.5 abc	83.1 \pm 1.3 abc	27.0 \pm 4.6 ab
437	-1.30 \pm 0.05 c	-1.81 \pm 0.08 abc	4.8 \pm 0.3 ab	82.8 \pm 1.4 abc	37.0 \pm 5.1 ab
<i>p</i>	<0.001	0.003	<0.001	<0.001	0.004
Fecha					
sep_17	-1.33 \pm 0.03 b	-1.69 \pm 0.03 b	7.1 \pm 0.5 a	85.4 \pm 0.7 a	29.5 \pm 1.9 a
oct_17	-1.49 \pm 0.04 a	-1.97 \pm 0.03 a	6.9 \pm 0.7 a	84.4 \pm 0.7 a	34.4 \pm 2.5 a
<i>p</i>	<0.001	<0.001	0.689	0.217	0.063

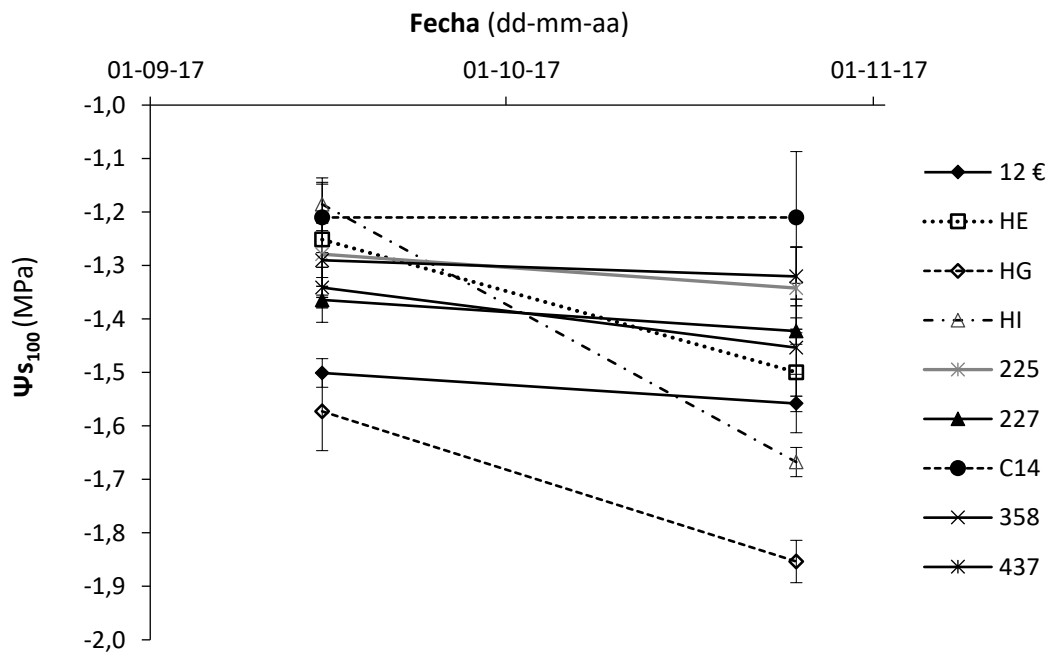


Figura 4.37. Valores medios (\pm ET) del potencial osmótico a plena turgencia (Ψ_{s100}), en las dos fechas de medición de los nueve clones de eucalipto estudiados.

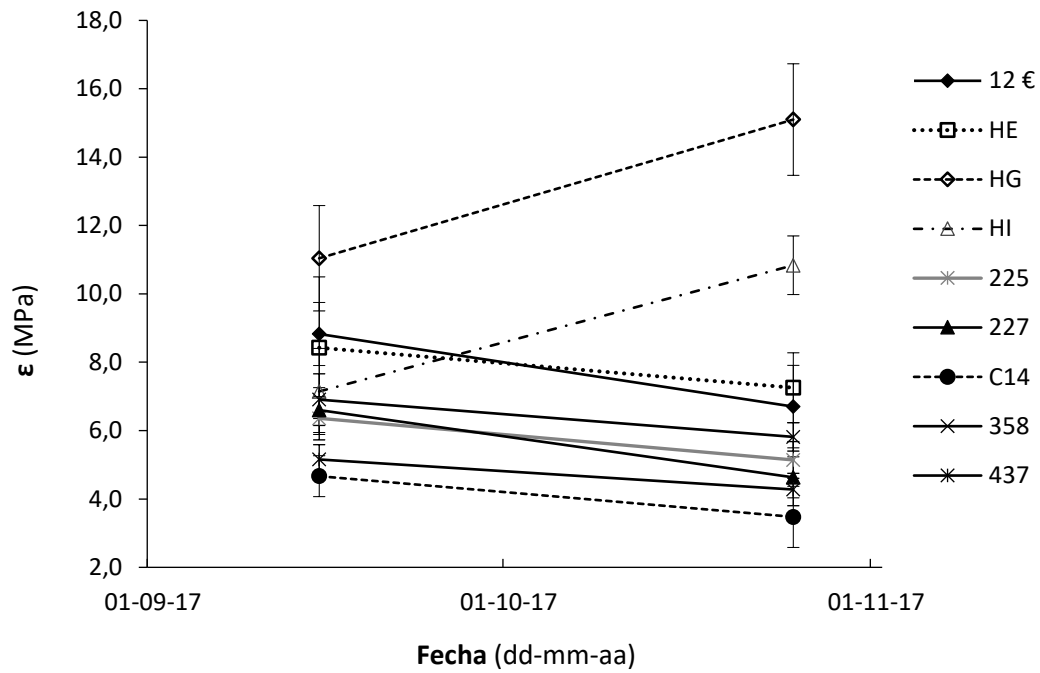


Figura 4.38. Valores medios (\pm ET) del módulo de elasticidad de la pared celular (ϵ), en las dos fechas de medición de los nueve clones de eucalipto estudiados.

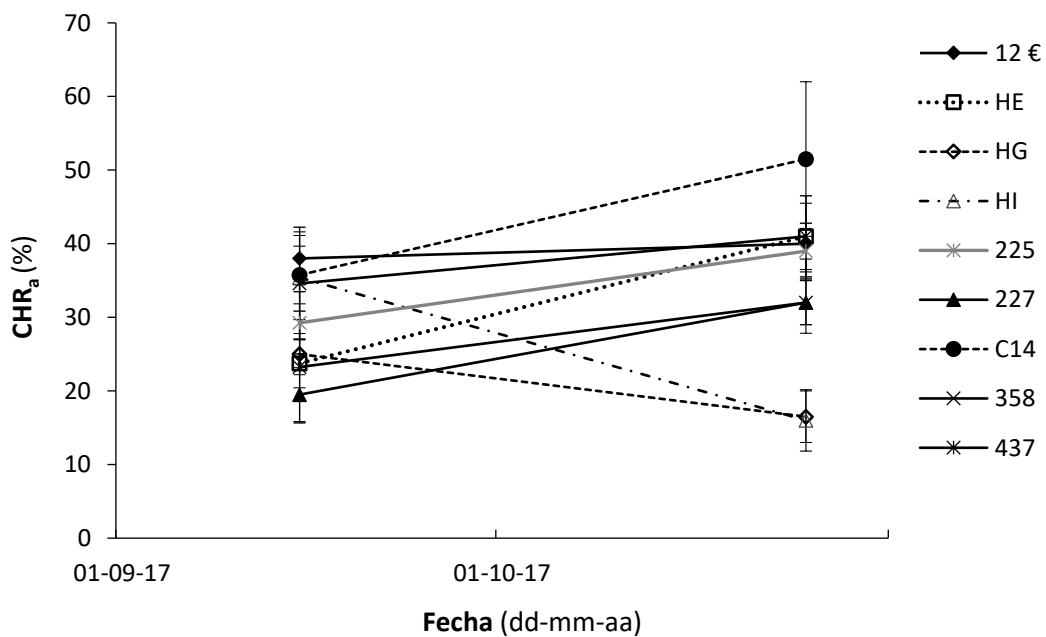


Figura 4.39. Valores medios (\pm ET) del contenido hídrico relativo en el apoplasto, (CHR_a), en las dos fechas de medición de los nueve clones de eucalipto estudiados.

4.5 - DISCUSIÓN

4.5.1 - Transpiración cuticular y parámetros derivados

El contenido hídrico relativo (CHR_c) y el contenido de humedad (H_c) en el punto de cierre de estomas son importantes indicadores del estado hídrico de las hojas en condiciones de sequía. Estos parámetros están estrechamente relacionados con la turgencia celular y, por lo tanto, reflejan con precisión el equilibrio entre el contenido de agua interno, el suministro de agua a la hoja y la tasa de transpiración, así como la tolerancia de la hoja a la deshidratación (Gaulton et al., 2013; Correia et al., 2014; Hernandez et al., 2016).

Los valores medios encontrados del contenido hídrico relativo (CHR_c) en los nueve clones estudiados se encuentran dentro del rango obtenido por Carevic et al. (2010), estudiando plantas de encina (*Quercus ilex* L. spp. *ballota*), especie de ambiente mediterráneo y hojas esclerófilas, que obtuvieron una variación estacional de CHR_c entre 62.0 % (marzo) y 91.2 % (junio), y Mendes et al. (2013), estudiando cinco genotipos de *E. x urograndis*, que obtuvieron una variación de CHR_c entre 78.9 % y 90.1 % bajo dos regímenes de irrigación, siendo menores significativamente en determinados genotipos en el régimen con suspensión de agua. Respuesta similar obtuvieron Merchant et al. (2007), que observaron que el déficit hídrico disminuyó CHR_c en seis especies de eucalipto, pero de forma diferenciada entre ellas. En nuestro estudio, la evolución estacional osciló entre un mínimo de 73.2 % (hojas desarrolladas en otoño e invierno) y 82.9 % (desarrolladas en primavera), no diferenciándose significativamente este último de las desarrolladas en verano. Los clones que más se apartaron de esta tónica general, y que presentaron grandes oscilaciones estacionales a lo largo del estudio, fueron HE, 227 y 12€. Andivia et al. (2012), estudiando la tolerancia a la sequía de dos procedencias españolas de encina observaron variaciones estacionales en este parámetro, indicando una estrategia de conservación del agua durante el verano (con valores máximos cerca de 90 %) y "gastadora de agua" durante la estación húmeda. Todo ello indica que los nueve clones de *Eucalyptus* analizados en este estudio, con ligeras diferencias entre ellos, utilizaron adaptaciones fisiológicas para reducir la pérdida de agua en las épocas de mayor demanda, ya que reaccionan cerrando

los estomas a mayor nivel de hidratación (CHR_c) en las épocas más desfavorables hídricamente, aspecto útil para la supervivencia en climas con estación seca, como el mediterráneo. Siguiendo con esta línea de argumentación, para el conjunto de fechas de medición, el clon HE se comportó como el menos precavido o conservador del agua, ya que permitía una mayor deshidratación antes de cerrar estomas, mientras que en el lado contrario estaría el clon HI.

Por otro lado, el contenido de humedad (H_c) presentó un valor medio de 61.0 %, sin diferencias significativas entre clones en valor absoluto, aunque sí entre fechas. La evolución estacional se diferenció de CHR_c , la cual osciló entre un mínimo de 56.5 % (hojas de primavera) y 67.7 % (hojas de verano-principio de otoño), con valores altos observados también en las hojas desarrolladas durante el otoño-invierno. En el caso del tiempo transcurrido hasta el cierre de los estomas (t_c), a medida que se va deshidratando la hoja, puede variar con la edad de la hoja, con el tamaño del estoma y su localización, con la especie y entre individuos de una misma especie, en función de su estado vegetativo, así como con las condiciones ambientales en que se realiza la medición (Kozlowski, 2012). Entre los clones del presente estudio, destacó con tiempo de cierre de estomas más corto el clon HI (56 min), que se diferenció significativamente de otros seis clones, cuyos tiempos de cierre variaron entre 70 min (12€) hasta 80 min (HE). En la evolución estacional se movieron en un rango de 49 minutos (medición de noviembre-2015) hasta 86 minutos (febrero-2015). En el año de 2015, las hojas formadas en los períodos más secos cerraron sus estomas en la mitad de tiempo que las formadas en períodos más fríos y húmedos, hecho que no ocurrió en el año siguiente. Esto evidencia, una vez más, estrategias de plasticidad para la aclimatación a climas como el mediterráneo, donde deben aclimatarse a las condiciones ambientales del momento para prevenir pérdidas excesivas de agua en meses más secos.

La cutícula forma una eficaz barrera protectora en las plantas ante la pérdida no controlada de agua a través de la epidermis foliar. Durante un período de estrés hídrico, cuando los estomas están cerrados, la supervivencia de las plantas depende en gran medida de la cantidad de agua que se pierde a través

de dicha cutícula. Los valores obtenidos de transpiración cuticular (E_c) en todo el estudio promediaron $1.69 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$, o bien $0.17 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, según se exprese en base a peso o a área foliar. Estos valores son superiores a los encontrados por Carevic et al. (2010) para encinas adultas crecidas en campo ($0.06 - 0.19 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$), pero inferiores a los valores encontrados por Fernández et al. (2015) para siete especies (*Dichrostachys cinérea*, *Populus x euroamericana* "I-214", *Eucalyptus camaldulensis*, *Casuarina cunninghamiana*, *Paulownia fortunei*, *Salix purpurea* y *Leucaena diversifolia*) crecidas, no al aire libre sino bajo malla de sombreo en vivero, que obtuvieron valores de $0.83 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para *E. camaldulensis* hasta $3.98 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para *S. purpurea*. Eamus et al. (2008), analizando hojas de *Eucalyptus haemastoma* (Sm.) a diferentes temperaturas, especie de clima semiárido en el verano con inviernos de noches frías, obtuvo valores de E_c entre $0.04 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ midiendo a temperatura baja ($18 \text{ }^\circ\text{C}$) y $0.5 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a temperatura elevada ($38 \text{ }^\circ\text{C}$), valores que se encuadran dentro de los obtenidos en nuestro estudio. Atendiendo a la variación estacional obtenida, la tendencia general es que las hojas crecidas durante la primavera (mediciones de mayo) son las que mostraban menor transpiración cuticular.

Los valores de E_c fueron semejantes estadísticamente para todos los clones, con excepción de las diferencias mostradas por el clon que presentó el valor más alto (HE), que se diferenció significativamente de otros cinco clones. Esto sugiere que el clon HE tiene una estrategia menos eficiente de ahorro de agua en relación a los otros clones citados, cuando consideramos la permeabilidad de la epidermis foliar (Andivia et al., 2012).

Por otro lado, el test estadístico no diferenció entre clones para la tasa de transpiración total al inicio (E_t) en las condiciones de medición de este estudio, dentro de laboratorio, con baja radiación luminosa y sin viento. El valor medio de E_t fue $0.78 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, con valor mínimo ($0.5 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en la medición de primavera de 2015 y máximo en el verano del mismo año ($1.2 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Este rango de valores es habitual para este género, teniendo en cuenta las condiciones de medición (Vellini et al., 2008; Eksteen et al., 2013; Mendes et al., 2013; Silva P et al., 2015, 2016).

4.5.2 - Transpiración diaria y en intervalos del día

La transpiración media diaria por planta varió en función del tamaño de ésta y de la época del año, en un rango de 0.05 L día^{-1} hasta 5.58 L día^{-1} , con plantas de tamaño entre 0.31 cm y 4.57 cm de diámetro en la base del tallo (0.07 cm^2 – 16.43 cm^2 de sección transversal de tallo), es decir, un promedio de 0.49 L día^{-1} por cada cm^2 de sección de tallo, para el conjunto de clones y de épocas del año medidas y con buena disponibilidad de agua en el sustrato. Resulta lógico que a mayor tamaño de planta corresponda un mayor consumo por la mayor superficie foliar transpirante (Otto et al., 2014). No obstante, debemos ser cautos con estos datos y no extrapolarlos a transpiraciones en plantaciones o masas naturales (Gyenge et al., 2008; Anderegg et al., 2017), puesto que las condiciones ambientales y la competencia entre árboles son distintas.

Los valores de transpiración diaria (T_{LA}) se diferenciaron significativamente entre clones, destacando con valores más altos HE y C14 ($2.4 \text{ L m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ de promedio), en contraposición a los más bajos de 12€ y HG (1.4 y $1.7 \text{ L m}^{-2} \text{ día}^{-1}$, respectivamente). Eso sugiere que los clones HE y C14, cuando hay suficiente agua disponible en el suelo, tienen una estrategia de mayor consumo de agua por unidad de superficie foliar (Matos et al., 2016). Zeppel y Eamus (2008), analizando hojas de *Eucalyptus crebra*, especie de clima semiárido en el verano con inviernos de noches frías, obtuvo valores de T_{LA} entre 0.7 y $1.1 \text{ L m}^{-2} \text{ día}^{-1}$, valores que se encuadran en el rango más bajo de los obtenidos en nuestra medición (0.1 – $8.0 \text{ L m}^{-2} \text{ día}^{-1}$, en función del clon y la fecha de medición). Esto puede ser debido a la disponibilidad hídrica, dado que en nuestro estudio se partía de plantas con sustrato saturado de humedad y siempre se midió en días no nublados, mientras que en el estudio citado, la transpiración fue cuantificada durante y después de episodios de sequía.

La transpiración diaria fue bastante variable de unos meses a otros, evidenciando que las plantas responden a los estímulos del ambiente, como la radiación, temperatura, humedad relativa y velocidad del viento (Hernandez et al., 2016; Anderegg et al., 2017). Las dos fechas en que la transpiración fue más elevada coincidieron con el verano y las de transpiración más reducida al final del otoño y el invierno, en coincidencia con resultados obtenidos por otros

autores (Eksteen et al., 2013; Fernández et al., 2015). En las dos fechas de medición del mes de julio de 2015 (verano), cuando se obtuvieron las máximas tasas de transpiración diaria, fue cuando observó las mayores diferencias entre clones. Para estas dos fechas, los clones HE, C14 y 227 presentaron mayores tasas de transpiración diaria que 12€, HG, 225, 358 y 437. En las demás fechas de medición, las diferencias de transpiración entre clones resultaron menores.

Por otra parte, considerando la evolución de la transpiración a lo largo del día, en intervalos horarios, en los dos periodos evaluados del principio y el centro del verano (junio y julio de 2016, respectivamente), la falta de diferencias entre clones obtenida en este estudio no es algo tan extraño (Hatton et al., 1998). Esto puede ser debido a la alta homogeneidad en las condiciones de crecimiento de todas las plantas, añadido al elevado efecto que causaron las condiciones de humedad del sustrato y las condiciones ambientales de cada intervalo horario, que absorbían la mayor parte de la variación. La tasa de transpiración varió entre $0.15 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ del intervalo predominantemente nocturno (20:30–08:30, hora local) y $2.21 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ del intervalo 11:30–14:30, debido posiblemente a la combinación de elevada radiación luminosa y temperatura con un potencial hídrico foliar aún alto en este último intervalo. Los intervalos anterior y posterior a este último, de tasa transpiratoria máxima, mostraron tasas un poco menores, por la variación de las variables ambientales: menor radiación solar y temperatura en el anterior, y descenso del potencial hídrico foliar junto a temperatura probablemente algo excesiva en el segundo. Este rango de valores es habitual para este género y en las condiciones medidas (Gharum et al., 2013; Albaugh et al., 2013; Doody et al., 2015; Christina et al., 2017). En numerosas ocasiones, la apertura nocturna de estomas puede llegar a alcanzar hasta el 33 % del máximo diurno, dando lugar a tasas transpiratorias importante (15–20 % de las diurnas) (Daley y Philips, 2006), pero éste no fue el caso de este estudio.

Con respecto al efecto del grado de estrés hídrico aplicado a las plantas (con y sin estrés hídrico), en todos los tramos horarios se obtuvo una obvia reducción en la tasa de transpiración bajo condiciones de estrés moderado, concordando con otros estudios con *Eucalyptus* sp. (Navarrete-Campos et al., 2013; Correia et al., 2014; Hernandez et al., 2016). En el caso de las plantas bien regadas (p. ej., $\Psi \geq -1.0 \text{ MPa}$), las tasas máximas de transpiración fueron

similares entre clones (Fig. 4.25 y 4.26). Los clones HE, HG y 12€ mantuvieron altas tasas de transpiración cuando Ψ se redujo de -1.0 a -2.0 MPa. Mientras tanto, los otros clones estudiados comenzaron a reducir su transpiración cuando Ψ alcanzó -1.0 MPa, lo que indica un comportamiento de ahorro de agua más acentuado en estos últimos (Fig. 4.26 y 4.31). Además, en este rango de Ψ (-1.0 a -2.0 MPa), la tasa fotosintética (A) se redujo en mayor medida que la tasa de transpiración (E) y que gs para los clones HE, HG y 12€, por lo que EUA y EIUA se vieron disminuidas en estos tres clones en mayor medida que para los clones de *E. globulus* (Fig. 4.27). Esto último también señala el peor comportamiento de los primeros tres clones (HE, HG, 12€) bajo condiciones de estrés hídrico moderado.

4.5.3 - Crecimiento y consumo hídrico en condiciones variables de humedad

Los clones de eucalipto presentaron el típico comportamiento de expansión y contracción del tronco, con valores máximos a comienzos de la mañana y mínimos al atardecer, tal y como se ha encontrado en estudios previos realizados con este género vegetal (Downes et al., 1999; Zweifel et al., 2014) y con otras especies arbóreas (Martín et al., 2014; Oberhuber et al., 2014). Cuando se incrementó la limitación de agua, con un consecuente aumento en el déficit hídrico, los troncos sufrieron deshidratación y experimentaron contracciones diarias (Xiao et al., 2014), lo que reduce las tasas de transpiración y fotosíntesis (Carevic et al., 2014), además de inhibir la actividad cambial (Oberhuber et al., 2014). Durante la reposición del agua, tras un ciclo de estrés moderado, se produjo un incremento significativo y rápido de diámetro del tronco, fruto de la rehidratación, seguida de la división y crecimiento celular (Downes et al., 1999; Kutschera y Niklas, 2013; Carevic et al., 2014).

En lo que se refiere al comportamiento de los clones en cada ciclo de riego-estrés, este fue distinto al compararlos entre los dos años medidos. En 2016, algunas tendencia destacables fueron que el clon 12€ fue el que más creció en el conjunto del experimento, pero debido casi exclusivamente a la ganancia de

los primeros 5 días, y mostró grandes contracciones del diámetro cuando avanzaba el estrés hídrico moderado aplicado pero recuperándose rápidamente tras el riego; el clon HE presentó también grandes altibajos en los ciclos, indicando una alta actividad transpiratoria en estos dos clones mientras disponen de agua, pero arriesgando demasiado al no reducir dicha actividad con anterioridad, lo que podría llevarles a agotar las reservas de agua del sustrato. El clon C14 presentó un comportamiento extraño los primeros días porque decreció cuando había humedad disponible, pero eso pudo ser debido a una cuestión mecánica del ajuste del dendrómetro al tallo, pues después siguió un patrón más acorde a los demás clones. En 2017, se pudo observar que todos los clones siguieron generalmente la misma tendencia. Al contrario que en el año anterior, el clon 12€ fue el que menos creció en el conjunto del experimento y el que más contracción del diámetro mostró tras el fuerte estrés hídrico sufrido, pero, eso sí, igual que en el año anterior, recuperándose bien tras el riego.

El potencial hídrico al amanecer de las plantas fue más bajo que el del sustrato, por término medio 0.5 MPa, pero en un rango de 0.1 a 0.9 MPa. El potencial hídrico del sustrato explicó casi la mitad de la variación del potencial hídrico de la planta, siendo la demás variación explicada por otras variables ambientales como temperatura, la radiación solar o la humedad relativa, así como el propio error de medición. En la misma dirección que en nuestro estudio, el estudio de Silva et al. (2017) detectó una disminución significativa del potencial hídrico de la planta en 35 genotipos de eucalipto, siendo la magnitud de esta caída variable entre genotipos, y la dispersión tanto mayor cuanto mayor fue el estrés hídrico. En lo que se refiere a la transpiración diaria (T_{LA}), solamente el potencial hídrico del sustrato (Ψ_{ws}) explicó casi el 60 % de la variación, debido a que T_{LA} es una cuantificación acumulada a lo largo del todo el día, durante el cual el Ψ_{ws} no varía excesivamente, pero sí lo hace el de la planta (Christina et al., 2017). En nuestro estudio, el potencial hídrico de la planta (Ψ) medido solamente al amanecer, no fue tan buen predictor de T_{LA} como el del sustrato, ya que se necesitarían más mediciones a lo largo del día para poder hacer una integración del comportamiento diario, como mínimo midiendo también a mediodía (Zhang et al., 2015). No obstante, de la representación gráfica de T_{LA} y Ψ , puede deducirse un umbral mínimo de Ψ limitante para T_{LA} , independientemente de los

valores de las demás variables ambientales, que se sitúa entre -1.2 y -1.4 MPa, pudiendo diferenciar entre clones. En este sentido, los únicos clones que mantuvieron altas tasas de transpiración diaria entre -1.2 y -1.4 MPa fueron HE y HG, mientras que los demás clones estudiados las redujeron antes de alcanzar el umbral de -1.2 MPa.

Al contrario que T_{LA} , la transpiración instantánea medida con el IRGA (E) se relacionó mejor con Ψ que con Ψ_{ws} , lo que se puede explicar porque el potencial hídrico de la planta se midió esa misma mañana y, a la hora de medición de E, las variables ambientales (temperatura, radiación, humedad relativa) aún presentaban valores favorables, al tiempo que las plantas mantenían un buen estado hídrico (Navarrete-Campos et al., 2013). Cabe añadir que, en nuestro estudio, en el momento del día en que se midió E suele coincidir con el momento en que las plantas presentan mayor transpiración, como se ha visto en el apartado 4.4.2.

Aunque está documentado que las variables ambientales explican una considerable proporción de la variación de la transpiración en eucaliptos (Pfausch et al., 2010; Gharun et al., 2013), en nuestro estudio, la ausencia de relación entre las variables ambientales medidas y la transpiración puede ser explicada debido a que se midió siempre en días del centro del verano y despejados de nubes, por lo que estas variables presentaron un rango de variación muy pequeño, que contrastan con el rango de variación alto inducido al potencial hídrico del sustrato.

En cuanto a las variaciones en el diámetro del tallo obtenida en este estudio, la correlación negativa y significativa entre el incremento diario (Id_{max}) y la amplitud diaria de la oscilación del diámetro ($Dt_{maxn} - Dt_{minn}$) indica que a mayor oscilación diaria menor incremento diametral, al menos cuando el grado de estrés hídrico no es severo. Martín et al. (2014) también registraron mayores incrementos diarios en el diámetro del tronco en *Quercus ilex ssp. ballota* cuando la amplitud diaria de la oscilación del diámetro se estabilizó, tras altas variaciones, debido a las precipitaciones recibidas. La relación existente entre la oscilación diaria del diámetro del tronco y el crecimiento diametral (Id_{max}) y la transpiración diaria (T_{LA}), con un umbral de 0.6 mm a partir del cual se paralizaba

Id_{max} y se minimizaba T_{LA} , indicaría el límite de estrés hídrico moderado para el cual la planta aún es capaz de rehidratarse durante la noche pero no es capaz de compensar, durante el día, todo el agua que va perdiendo por transpiración, por lo que debe cerrar estomas en algún momento del día para reducirla. Esta correlación concuerda con los estudios realizados por De Schepper et al. (2012) y King et al. (2013), cuando la disminución de la oscilación diaria del diámetro fue proporcional a la menor pérdida de agua por transpiración.

4.5.4 - Distribución de biomasa

Los altos grados de relación del diámetro del tallo principal con la biomasa (pesos secos de hojas, raíz y tallo) así como con la superficie foliar nos permitieron estimar estos últimos parámetros a partir de la medición del diámetro, medición no destructiva y fácil de realizar. Dicha capacidad de predicción de estos parámetros a partir del diámetro ha sido indicada para *Eucalyptus* por otros autores (Montagua et al., 2005; Alcorn et al., 2013; Mandal et al., 2013; Fernández et al., 2018). Las diferencias entre clones en el peso seco de las distintas partes del individuo no resultaron significativas para, prácticamente, tres de las cosechas realizadas, solo diferenciándose en la cosecha de mayo-2017, para la cual los clones 227 y 358 presentaron los mayores tamaños, mientras que el clon HI los más bajos. No obstante, este patrón no se repitió en las demás cosechas por lo que debe ser más atribuible a las 4 plantas/clon empleadas en cada experimento que al comportamiento general del clon. Esto ocurrió, probablemente, debido a la corta edad de las plantas probadas (4–10 meses, dependiendo del ensayo), como observaron Mughini et al. (2013) en plantas de 8 meses de edad de clones híbridos de *Euclayptus*. Asimismo, la proporción en peso de hojas respecto a peso de la parte aérea (36–50 %), también está dentro de lo habitual para plantas de estos tamaños, alejado del 5–15 % que presentan árboles de gran tamaño de plantaciones comerciales (Hernández et al., 2009; Bouvet et al., 2013).

4.5.5 - Vulnerabilidad a la cavitación

Referente a la conductancia hidráulica del xilema de ramillos finos, para la conductancia hidráulica máxima (C_{max}) y la conductancia hidráulica específica foliar (C_{lmax}), en términos generales, los clones monoespecíficos de *E. globulus* mostraron valores más bajos que los clones de híbridos estudiados. Sin embargo, tan solo se diferenciaron significativamente los clones de valores más extremos ($HE > 225$ para C_{max} ; HI y $HG > 225$ para C_{lmax}) siendo algo esperable en eucaliptos (Hernandez et al., 2016), en especial la falta de significación cuando se analizan clones de la misma especie (Pita et al., 2003). En el caso de la conductancia hidráulica específica xilemática (C_{smax}) ocurrió algo similar, no se diferenciaron los clones de *E. globulus* entre sí y las diferencias más destacables fueron valores más altos en 12€, HI y HG que en 225, 227. El rango de valores de C_{smax} de nuestro estudio está dentro del obtenido para otras especies leñosas, como por ejemplo *Quercus ilex* ssp. *ballota* (Carevic et al., 2014), y para eucaliptos (Barotto et al., 2016). Este último estudio citado también encontró diferencias significativas entre genotipos, situando a *E. globulus* en el rango más bajo de conductancia xilemática. Asimismo, como se comentó anteriormente en el capítulo 1 en cuanto a la anatomía del xilema, esta menor conductancia de *E. globulus* se corresponde con vasos de menor diámetro y, posiblemente, mayor resistencia al flujo de agua (Lens et al., 2011), lo que pudiera comprometer el flujo de savia, el crecimiento y la rehidratación tras un período de sequía, pero una garantía de supervivencia durante ésta (Rodríguez-Calcerrada et al., 2017).

En cuanto a la vulnerabilidad a la cavitación del xilema, las diferencias en PCH_{50} obtenidas entre clones (1.05 MPa entre el mayor y el menor, pero solo 0.33 MPa para clones de *E. globulus* entre sí), así como en PCH_{80} , son interesantes, aunque cabe mencionarse que estos resultados deben ser tomados con precaución debido a que el tamaño muestral fue pequeño. Sin embargo, sugieren que existe variabilidad en la vulnerabilidad a la cavitación del xilema de ramas entre los clones analizados, que debe explorarse más profundamente. Un antecedente de curvas de cavitación comparó un clon de *E. grandis*, que mostró un PCH_{50} de -1.31 MPa, con híbridos de *E. grandis* y *E.*

camaldulensis, encontrando una diferencia máxima de 0.46 MPa entre clones (Vander Willigen y Pammenter, 1998). Adicionalmente, estudiando cuatro clones de *E. globulus* se han encontrado un grado de diferenciación en PCH₅₀ de 0.18 MPa entre los mismos (Pita et al., 2003).

En el caso de *E. globulus*, su vulnerabilidad a la cavitación lo ubica entre las especies más vulnerables de las aquí estudiadas, sufriendo pérdidas importantes de conductividad cuando aún el estado hídrico es alto (Pita et al., 2005). Estos autores han sugerido que esta especie posee alta productividad a expensas de estar siempre al borde del embolismo catastrófico, lo que seguramente resulta muy arriesgado si las condiciones de estrés hídrico aumentan. Sin embargo, a la misma vez, esta especie podría reducir la transpiración y el consumo de agua, conservando durante más tiempo el agua del suelo, lo que puede prolongar el crecimiento en condiciones limitantes de agua, lo que explica por qué *E. globulus* es una especie muy productiva bajo clima mediterráneo con períodos de sequía estival (Pita et al., 2003). Más recientemente, Barotto et al. (2016), investigando árboles adultos de 15–25 m de altura, midieron valores de PCH₅₀ de -2.4 MPa para *E. globulus*, -3.8 MPa para *E. viminalis* y -4.2 MPa para *E. camaldulensis*, reafirmando la menor resistencia a la cavitación de la primera especie (es decir, mayor vulnerabilidad), aunque no por ello le tiene que restar resistencia a sequía ya que actúa diversos factores y la estrategia de cada genotipo es distinta (Gharun et al., 2015; Hernandez et al., 2016; Rodríguez-Calcerrada et al., 2017).

4.5.6 - Curvas presión-volumen

Del análisis de los parámetros derivados de las curvas presión-volumen, el rango de valores coincide, con ligeras variaciones, con los obtenidos por otros autores para eucaliptos (Pita y Pardos, 2001; Battie-Laclau et al., 2013; Poot y Veneklaas, 2013). El módulo de elasticidad de la pared celular presentó gran variabilidad entre clones, destacando con valores más altos HG y HI, en contraposición a los valores bajos de C14 y 437, que indican pared más rígida de los primeros y elástica de los segundos (Pita y Pardos, 2001; Bulfe y Fernández, 2014). En lo que se refiere a los otros cuatro parámetros (Ψ_{s100} , Ψ_{s0} ,

CHR₀ y CHR_a), a pesar de que el análisis estadístico apuntó diferencias significativas, solo diferenciaron los clones con valores más extremos. Podemos destacar los valores más bajos de 12€ y HG para Ψ_{s100} y Ψ_{s0} , lo que les permite mantener la turgencia a potenciales hídricos más negativos; valores más altos de HG respecto de 227 y C14 para CHR₀, lo que indica que los segundos son capaces de mantener la turgencia a mayor grado de deshidratación que el primero.

En el tiempo que duró el experimento, para el conjunto de clones, se ha observado ajuste osmótico en respuesta al estrés hídrico inducido, pero solo significativo para los clones HE, HG y HI. Esto indica que dichos clones han sido más eficientes, sensibles o rápidos que los demás en realizar ajuste osmótico, ya que *E. globulus* también es capaz de llevarlo a cabo (Pita y Pardos, 2001; Callister et al., 2008).

Como consideración final, relacionando los parámetros medidos en los distintos ensayos de transpiración cuticular, vulnerabilidad a la cavitación, curvas $p-V$, transpiración diaria en vivero y características estomáticas, se pudo apreciar, en general, un comportamiento similar entre clones de *E. globulus* en contraposición a las diferencias con los demás clones de híbridos en algunos de los parámetros, pero dichas diferencias variaron de un parámetro a otro. Si tomamos como referencia el clon C14, muy utilizado en plantaciones comerciales, de alta plasticidad ambiental y resistente a la sequía estival propia de clima mediterráneo, el comportamiento de cada clon se muestra en la Figura 4.37. Dentro de la similitud de respuesta de los 5 clones de *E. globulus*, en el conjunto de parámetros medidos, la tendencia general fue que el clon 437 es el que más se acercó al comportamiento del C14, mientras que el 225 es el que más se alejó, empeorando éste último en parámetros relacionados con la conductancia hidráulica, el rango de potencial osmótico entre saturación y pérdida de la turgencia y el diámetro y longitud de los vasos xilemáticos de las ramas finas. Ateniéndonos a las propiedades del C14, la buena respuesta a situaciones de estrés hídrico, aparentemente, pudiera estar ligada a la combinación de algunas características morfo-fisiológicas como:

- Alta densidad de vasos en raíces pero de diámetro pequeño.
- Vasos delgados y elementos de vaso cortos en ramas finas.
- Área foliar específica baja.

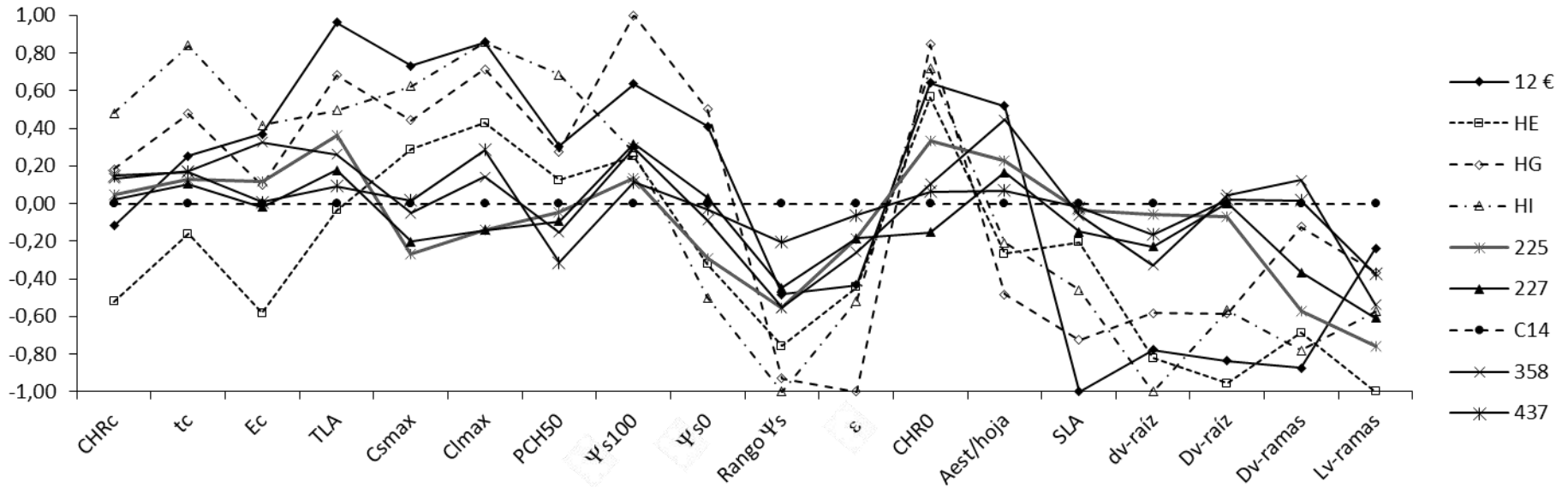
- Elasticidad en paredes celulares (menor ϵ).
- Alto rango de variación del componente osmótico del potencial hídrico desde saturación hasta pérdida de la turgencia ($\Psi_{s100} - \Psi_{s0}$).
- Buen acoplamiento entre el control estomático y el estado hídrico, que permite una mayor deshidratación antes de perder la turgencia celular (menor CHR_0) pero cerrando estomas cuando llega este momento (CHR_c y CHR_0 muy próximos).

Sin embargo, no parece estar ligada a los valores absolutos del componente osmótico celular (Ψ_{s100} , Ψ_{s0}), al tamaño de los estomas (LS , AS), a la conductancia hidráulica específica del xilema (C_{smax} , C_{lmax}) o a la transpiración diaria (T_{LA}) siendo, esta última de las más altas medidas cuando se mide en situación de buena disponibilidad de agua. Altas tasas de transpiración pueden favorecer el crecimiento en épocas de buena disponibilidad de agua, pero deben estar acompañadas de medidas de seguridad durante épocas de escasez. Esto parece estar compensado en los clones de *E. globulus*, especialmente en C14, pero los clones de híbridos aquí considerados no presentan las mismas estrategias en todos los parámetros considerados.

Los clones híbridos estudiados, se distanciaron del comportamiento general mostrado por C14 en algunos parámetros, de forma distinta para cada híbrido. El clon HE fue el más distanciado en el global de parámetros medidos pareciendo, a priori, menos precavido en la conservación del agua ante períodos de estrés hídrico que C14. Todos ellos mostraron un sistema hidráulico más potente que C14, lo que favorece el crecimiento en épocas de disponibilidad de agua. Sin embargo, en los caracteres ligados a la resistencia al estrés hídrico, podemos señalar, como diferencias más destacadas:

- Peor control estomático ($CHR_c < CHR_0$; para 12€, HE, HG), cutícula más permeable (HE) y mayor proporción de área foliar ocupada por estomas (HG, HE, HI).
- Menor densidad de vasos xilemáticos y de mayor diámetro en raíces (12€, HE, HG, HI) y en ramas finas (12€, HE, HI).
- Bajo rango de variación del componente osmótico (HE, HG, HI) y paredes celulares más rígidas (HG, HI, 12€, HE).
- Alta *SLA* (12€, HG, HI).

Fig 4.37. Comparación de las características principales de cada clon con el clon de referencia C14. Se muestran solamente un resumen de los parámetros más destacados y que presentaron diferencias significativas entre clones, medidos en los distintos ensayos. Para cada parámetro (PA) calculado a partir de los valores medios, se muestra la proporción de desviación entre el clon *i* y el clon C14 respecto del rango de variación global del conjunto de clones $[(PA_i - PA_{C14}) / (PA_{max} - PA_{min})]$. Valores > 0 estarían relacionados con una mayor resistencia a sequía y viceversa. La variación y la significación de las diferencias ya se mostraron en tablas y figuras anteriores. Contenido hídrico relativo (CHR_c) y tiempo transcurrido (t_c) en el momento del cierre de los estomas; tasa de transpiración cuticular (E_c); transpiración diaria en base a área foliar (T_{LA}); conductancia hidráulica específica xilemática máxima (C_{smax}) y foliar máxima (C_{lmax}); potencial hídrico para el cual se obtuvo una pérdida de conductancia hidráulica del 50% (PCH_{50}); potencial osmótico a plena turgencia (Ψ_{s100}), potencial osmótico en el punto de pérdida de la turgencia (Ψ_{s0}) y rango de $\Psi_s = \Psi_{s100} - \Psi_{s0}$; módulo de elasticidad de la pared celular (ϵ); contenido hídrico relativo en el punto de pérdida de la turgencia (CHR_0); proporción de área foliar ocupada por los estomas abiertos ($A_{est/hoja} = (d \pi AO LO)/4$), siendo *d* la densidad estomática y AO y LO el ancho y largo de la apertura de la epidermis en el poro estomático; área foliar específica (SLA); densidad de vasos xilemáticos (d_v); diámetro de los vasos xilemáticos (D_v); longitud de los elementos de vaso (L_v).



4.6 - CONCLUSIONES

Del seguimiento estacional durante 2.5 años, de parámetros relacionados con la transpiración y el estado hídrico, llevado a cabo a los distintos clones de *Eucalyptus*, podemos concluir que:

- Los nueve clones de *Eucalyptus* tendieron a mantener altos contenidos hídricos relativos (CHR_c) y a acortar el tiempo (t_c) en el momento del cierre estomático en los períodos más secos, con el fin de mantener constante el contenido de humedad (H_c). Cabe añadir que en el año de 2015, las hojas formadas en los períodos más secos cerraron sus estomas en la mitad de tiempo que las formadas en períodos más fríos y húmedos, hecho que no ocurrió en el año siguiente, evidenciando que dichos clones utilizaron estrategias de plasticidad para la aclimatación a las condiciones ambientales del momento, para prevenir pérdidas excesivas de agua en meses más secos.
- Atendiendo a la variación estacional obtenida, la tendencia general es que las hojas crecidas durante la primavera (mediciones de mayo) son las que mostraban menor transpiración cuticular.
- Los valores de transpiración diaria (T_{LA}) fueron más altos en los clones HE y C14, que sugiere que cuando hay suficiente agua disponible en el suelo, tienen una estrategia de mayor consumo de agua por unidad de superficie foliar. T_{LA} fue bastante variable de unos meses a otros, siendo más elevada en las fechas que coincidieron con el verano y más reducida al final del otoño y el invierno, evidenciando que las plantas responden a los estímulos del ambiente, como la radiación, temperatura, humedad relativa y velocidad del viento.
- Considerando la evolución de la transpiración a lo largo del día, en intervalos horarios, la mayor tasa de transpiración se obtuvo en el intervalo 11:30–14:30 (hora local), debido posiblemente a la combinación de elevada radiación luminosa y temperatura con un alto potencial hídrico foliar. El valor mínimo se obtuvo en el período predominantemente nocturno (20:30–8:30), un 7 % de la del período máximo a pesar de contar con 2.5 h de luz solar y 1 h de luz crepuscular.

- Respecto al crecimiento en diámetro en condiciones variables de humedad, los clones se comportaron de forma distinta en cada ciclo de riego-estrés entre los dos años medidos. Destacamos la gran variación en la expansión-contracción del diámetro del tronco en los clones 12€, HE y HI, en los ciclos humedad-estrés hídrico.
- El potencial hídrico del sustrato explicó casi el 60 % de la variación de la transpiración diaria (T_{LA}), reduciéndose ésta cuando el estrés hídrico aumentaba. Los únicos clones que mantuvieron altas tasas de transpiración diaria cuando el potencial hídrico foliar bajó entre -1.2 y -1.4 MPa fueron HE y HG, mientras que los demás clones estudiados las redujeron antes de alcanzar el umbral de -1.2 MPa.
- Con relación a la conductancia hidráulica xilemática, en términos generales, los clones monoespecíficos de *E. globulus* mostraron valores más bajos de C_{max} y C_{lmax} que los clones de híbridos estudiados. Los resultados sugieren que existe variabilidad en la vulnerabilidad a la cavitación del xilema de ramas entre los clones analizados, que debe explorarse más profundamente en futuros estudios utilizando un mayor tamaño muestral.
- Del análisis de los parámetros derivados de las curvas presión-volumen, se ha observado ajuste osmótico en respuesta al estrés hídrico inducido, pero solo significativamente para los clones HE, HG y HI, indicando que dichos clones han sido más eficientes, sensibles o rápidos que los *E. globulus* y que el híbrido 12€ en realizar ajuste osmótico, aunque no está clara si ésta constituye una estrategia predominante en *Eucalyptus* como adaptación al estrés hídrico.
- El clon HE, con alta capacidad transpiratoria a través de los estomas, es el que más agua pierde a través de la epidermis (transpiración cuticular), por lo que se verá comprometido ante un evento de sequía prolongado. Además, presentó un mal control estomático al permitir deshidratarse en mayor proporción antes del cierre estomático, con lo que correría el riesgo de no poder recuperarse si la sequía se prolonga más de lo habitual.
- El clon HI, por el contrario, a pesar de también disponer de un alto potencial de transpiración a través de los estomas, es el más conservador

del agua interior ya que cierra estomas más pronto y a menor grado de deshidratación.

- Los valores más altos de SLA de los clones 12€ y HG indican hojas más delgadas y propias de ambientes con mayor humedad o menor radiación luminosa que los otros clones, contrastando con los valores bajos de *E. globulus* y HE.
- Teniendo en cuenta solamente los parámetros morfo-fisiológicos aquí medidos y los genotipos considerados, el clon de conocida resistencia a la sequía, C14, se caracterizó por mostrar valores bajos de *SLA*, ϵ , E_c , $D_{V-raíz}$, $D_{V-ramas}$, pero altos de d , d_v , tamaño de estomas y CHR_c . Dichas características fueron compartidas por los demás clones de *E. globulus*, pero los clones de híbridos, en menor o mayor medida, se distanciaron del C14 en uno o varios de estos caracteres.

5. Capítulo 3

TOLERANCIA AL FRÍO DE NUEVE CLONES DE *Eucalyptus* ssp.: EVOLUCIÓN ESTACIONAL DURANTE LA ESTACIÓN FRÍA Y EFECTO DE LA FERTILIZACIÓN



5.1 - RESUMEN

Los eucaliptos son ampliamente utilizados en plantaciones comerciales, pero las temperaturas bajo cero limitan su distribución geográfica y reducen la productividad de los cultivos. Por lo tanto, es importante conocer el grado de tolerancia al frío de los taxones utilizados en estas plantaciones, así como su evolución durante la época fría (otoño-invierno) y el efecto que puedan ejercer ciertas prácticas de cultivo en vivero sobre dicha tolerancia. Para ello, utilizando plantas juveniles en la fase final del cultivo en vivero y durante dos períodos de cultivo, se evaluó, en un primer año, el efecto del cultivo al aire libre o bajo malla de sombreado y, en un segundo año, el efecto de la fertilización mineral variando las dosis de N y K, sobre la tolerancia al frío, midiendo ésta en hojas. Se utilizaron cinco clones comerciales de *E. globulus* y cuatro clones de híbridos interespecíficos, correspondientes al programa de mejora de la empresa ENCE, *energía* y *celulosa*. Aunque se obtuvieron diferencias significativas entre clones y entre fechas a lo largo del otoño-invierno para la tolerancia al frío, medida ésta como la temperatura que causa el 50 % de daños en hojas (LT₅₀), estas resultaron tan pequeñas en valor absoluto (en general una diferencia menor de 2 °C, entre -5.0 y -7.0 °C) que resultó difícil diferenciar entre clones. La escasa variación estacional en LT₅₀ obtenida indica que estos eucaliptos ensayados no poseen un alto grado de endurecimiento estimulado por la temperatura. El efecto de la dosis aplicada de N resultó significativo, diferenciando entre las dos dosis más altas empleadas entre sí (126 y 252 mg/L de N) o entre las dos dosis menores (0 y 5 mg/L de N), así como la interacción N x K, aunque no el efecto principal K, por lo que, para establecer la dosis correcta de fertilización, se debería tener en cuenta la relación N/K. Las concentraciones de N y azúcares solubles (SS) en hojas no se correlacionaron significativamente con la tolerancia al frío (LT₅₀), al menos para el rango de concentraciones obtenido en este estudio.

5.2 - INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

La tolerancia al frío es un aspecto importante para el estudio comparativo de taxones vegetales (especies, clones, etc.) potencialmente utilizables en plantaciones comerciales, cuando no se tiene certeza de los más apropiados al clima de una determinada zona. Es un carácter de vital importancia a la hora de poder ampliar los límites de las plantaciones con eucaliptos, especialmente cuando se ensayan clones híbridos de especies propias de clima subtropical.

La tolerancia al frío puede ser expresada como la temperatura más baja a la cual una planta puede ser expuesta sin ser dañada. Los mecanismos de protección para evitar la formación de hielo en los tejidos definen la capacidad de tolerancia y de supervivencia de una planta bajo clima frío (Taiz et al., 2017). Dicha tolerancia al frío puede tener un componente genético (Gusta y Wisniewski, 2013), importante para el desarrollo de programas de mejora y esencial para la asignación de genotipos a diferentes sitios de plantación (Harfouche et al., 2014). Como ejemplos de umbrales de tolerancia al frío en especies de eucaliptos utilizadas en plantaciones comerciales podemos citar los -10 °C soportados por clones de *Eucalyptus* de ciertas especies (Moraes et al., 2014), -7 a -9 °C por *E. globulus* ssp. *globulus* y *E. globulus* ssp. *maidenii* (Moraga et al., 2006), -5 °C por *E. dunnii* (Paludzyszyn Filho y Santos, 2005) y -4 °C como límite recomendado para *E. grandis* (Golfari et al., 1978). Asimismo, la tolerancia al frío tiene un componente ambiental o de aclimatación, al poder ser incrementada por estímulos ambientales que preceden a las primeras heladas (Paludzyszyn Filho y Santos, 2005). En este sentido, se ha demostrado que la exposición a temperaturas bajas incrementa significativamente la tolerancia a heladas de algunas especies de *Eucalyptus* (Harwood, 1980). Como consecuencia de dicha exposición puede tener lugar un aumento gradual de la concentración en el citosol de varios carbohidratos, de aminoácidos como la prolina y la betaina, de poliaminas como la putrecina, de solutos minerales como iones derivados de N, P y K (Bogeat-Triboulot y Levy, 1998), de Ca (Miura y Furumoto, 2013), de hormonas como el ácido abscísico (ABA) (Guo et al., 2014), o de lípidos y proteínas de respuesta al frío (Thomas et al., 2013; Ramalho et al., 2014, Lin et al., 2014), así como un incremento en la elasticidad y adaptabilidad

de las membranas celulares a las fluctuaciones de las temperaturas (Takahashi et al., 2013). Todos estos cambios están mediados por distintas redes de señalización intracelular relacionadas entre sí, que comienzan con la bajada de la temperatura ambiente (Wang et al., 2013), influyendo tanto la variación de la temperatura como el período de exposición (Han et al., 2013; Janmohammadi et al., 2015). No obstante, otros factores, como el fotoperíodo, el estado hídrico o el nutricional, también pueden influir (Fernández et al., 2008a; Andivia et al., 2014; Vitasse et al., 2014).

El proceso de daños por heladas comienza primero en el apoplasto ya que, al descender la temperatura por debajo de 0 °C, comienzan a formarse pequeños cristales de hielo, sin afectar todavía al simplasto, por su mayor concentración de solutos. Consecuencia de esto, como el hielo tiene afinidad por el agua, parte del agua del simplasto sale hacia el apoplasto, permaneciendo dentro de la célula las sustancias disueltas, por no poder atravesar el plasmalema. Esto último aumenta la concentración de solutos en el simplasto, bajando aún más el punto de congelación e incrementándose el grado de tolerancia al frío. Si el tejido no fuese suficientemente tolerante al frío, los cristales de hielo del apoplasto aumentarían demasiado y se deshidratarían severamente las células, o se formarían cristales en el interior celular. Cualquiera de estas dos opciones llevaría a una desnaturalización de las proteínas y a la ruptura del plasmalema, liberándose el contenido citoplasmático en el apoplasto con la consiguiente muerte celular (Charrier et al., 2015).

A la hora de cuantificar la tolerancia al frío, está muy extendido el uso de la temperatura que causa un determinado nivel de daño, por ejemplo la Temperatura Letal 50 (LT₅₀), definida como la temperatura mínima donde el 50 % de las plantas, o de las hojas o células de una planta son dañadas, siendo un parámetro fácilmente comparable a la hora de cuantificar daños (Navarrete-Campos et al., 2013) y útil para analizar la evolución en el tiempo o las diferencias entre taxones (Moraga et al., 2006; Coopman et al., 2010). También se suele utilizar LT₁₀ (10 % de daño). Aunque existen diversas metodologías para la medición y cálculo final, como la evaluación visual de los daños en planta completa o en hojas, la medición de la conductividad eléctrica por el incremento de electrolitos liberados al dañarse las células y la medición de la fluorescencia

de la clorofila (Moraga et al., 2006; Lingye et al., 2015), la evaluación visual de daños siempre es aconsejable realizarla por su fiabilidad (Cunningham y Read, 2006). Para una caracterización a gran escala de la tolerancia al frío, por su rapidez y sencillez, se puede utilizar el test de frío de hoja suelta ya que, al usar hojas arrancadas de las plantas, permite manejar de una sola vez gran cantidad de muestras. Asimismo, este tipo de test puede realizarse tanto a plantas de vivero como a plantas instaladas en parcelas de campo, tanto en hojas juveniles como en hojas adultas y en cualquier época del año, pudiendo realizar varios test a la misma planta y, además, ha dado buen resultado para eucaliptos (Fernández et al., 2007).

En el presente estudio se han utilizado plantas de vivero de 1–2 años de edad de los nueve clones de *Eucalyptus*, monoespecíficos e híbridos, utilizados en capítulos anteriores. Durante la época fría (mediados de otoño e invierno) de dos períodos de cultivo, se plantearon como principales objetivos determinar, para estos clones: (i) la evolución en el tiempo de la tolerancia al frío durante el período de otoño-invierno considerado, (ii) las posibles diferencias entre los taxones estudiados, (iii) el efecto de la fertilización otoñal con diferentes dosis de N y K sobre la tolerancia al frío.

5.3 – MATERIAL Y MÉTODOS

5.3.1 - Primer año. Material vegetal y diseño experimental

El material vegetal utilizado consistió en plantas de vivero (50–80 cm de altura) de nueve clones de *Eucalyptus*: cinco de *E. globulus ssp. globulus* (códigos de referencia: C14, 225, 227, 358, 437) y cuatro clones de híbridos (*E. x urograndis*, 12€; *E. urograndis x globulus*, HE; *E. dunnii-grandis x globulus*, HG; *E. saligna x maidenii*, HI), procedentes del programa de selección y mejora vegetal de la empresa ENCE, energía y celulosa S.A. Dichas plantas procedían de estaquillas enraizadas, cultivadas en envase forestal de 150 cm³ de capacidad durante el primer año en el vivero de ENCE (Huelva, España) y trasplantadas a envases de 10 L durante un segundo año, ubicadas en el vivero de la Universidad de Huelva (37° 12' 03" N, 06° 55' 06" W, 25 m snm). El sustrato

utilizado consistió en una mezcla de fibra de coco:turba rubia (70:30 %, v/v). Las plantas se mantuvieron bien regadas y recibieron una fertilización estándar (126 mg/L de N, 71.23 mg/L de P, 89.93 mg/L de K). Un grupo de plantas (4 plantas/clon) estaban situadas al aire libre, totalmente expuestas a la luz solar sin malla de sombreado, mientras que el otro grupo (2 plantas/clon) bajo una malla que reducía la radiación solar un 50 % pero que permitía circulación del aire lateral y verticalmente. Todas las plantas (6 plantas/clon) fueron seleccionadas aleatoriamente.

Entre la 2ª semana de diciembre de 2016 y las mismas semanas de enero, febrero y marzo de 2017 (que denominaremos días 1, 28, 58 y 85, respectivamente), se llevaron a cabo los test de frío a distintas temperaturas, entre -3 °C y -7.3 °C, seleccionadas en función de ensayos previos realizados en enero de 2016. Como se espera que las temperaturas por debajo de 10 °C sean efectivas para inducir la aclimatación al frío para especies adaptadas a climas cálidos, generalmente las menores de 7 u 8 °C (Fernández et al., 2003), mediante un registrador de temperatura del aire colocado junto a las plantas se pudo evaluar el número de horas de frío ≤ 7 °C ($HF_{-7^{\circ}C}$) acumuladas por las plantas en el vivero (Tabla 5.1). El número de horas de frío, de los 15 y 30 días anteriores a cada fecha, para las dos temperaturas antes mencionadas (≤ 7 °C y ≤ 8 °C) se correlacionaron significativamente: $HF_{-8^{\circ}C} = 0.973 HF_{-7^{\circ}C} + 43.032$, $r = 0.989$, $n = 8$, $p = 0.01$.

Tabla 5.1. Resumen de los valores de temperatura y humedad relativa en el vivero de los 30 días anteriores a cada fecha de medición, así como las horas de frío de los 15 y 30 días anteriores a cada fecha de medición.

Variables	Fechas de medición (semana)			
	2ª dic.	2ª ene.	2ª feb.	2ª mar.
Ta	26.4	23.6	22.3	24.9
T'a	21.0	20.4	19.1	20.3
tm	14.5	12.7	11.5	14.0
t'a	8.1	5.0	3.8	7.7
ta	2.7	1.2	-0.9	0.9
H'a	99.5	99.6	97.9	99.8
hm	80.1	76.0	74.1	78.9
h'a	60.8	52.4	50.3	58.1
HF_{-7°C} (15)	5	136	81	10
HF_{-7°C} (30)	53	201	240	20
HF_T	53	249	462	482

- Ta: temperatura máxima absoluta.
- T'a / H'a: media de las temperaturas / humedades relativas máximas diarias.
- tm / hm: temperatura / humedad relativa media del periodo considerado.
- t'a / h'a: media de las temperaturas / humedades relativas mínimas diarias.
- ta: temperatura mínima absoluta.
- HF_{-7°C} (15): número de horas de frío ≤ 7 °C acumuladas en el vivero durante los 15 días anteriores a cada fecha de medición.
- HF_{-7°C} (30): número de horas de frío ≤ 7 °C acumuladas en el vivero durante los 30 días anteriores a cada fecha de medición.
- HF_T: número de horas de frío totales acumuladas hasta cada fecha de medición desde 30 días anteriores a la primera.

Estos ensayos sirvieron para, además de comparar los distintos clones y la evolución estacional, establecer las temperaturas óptimas de ensayo en cada fecha para futuras ocasiones y estimar el efecto de la malla de sombreado sobre la tolerancia al frío.

5.3.2 - Segundo año. Material vegetal y diseño experimental

El material vegetal utilizado consistió en plantas de vivero de una savia (20–40 cm de altura) de ocho clones de *Eucalyptus* de los citados anteriormente, cuyos códigos son C14, 227, 358, 437, 12€, HE, HG y HI. Dichas plantas (60 por taxón) procedían de estaquillas enraizadas, cultivadas en envase forestal de 150

cm³, con el mismo sustrato y tipo de fertilización que las del año anterior. No se utilizó el clon 225 por no disponer de planta ya que había sido retirado de la producción comercial por parte de la empresa ese mismo año.

A principio de octubre de 2017 las plantas fueron ubicadas en el vivero de la Universidad de Huelva, bajo la misma malla de sombreo que el año anterior. Se mantuvieron en esas condiciones hasta la finalización del experimento, final de marzo de 2018, bien regadas y sometidas a distintos tratamientos de fertilización. Se llevaron a cabo mediciones en cuatro fechas (3^a semana de diciembre y 4^a semana de enero, febrero y marzo, que denominaremos como días 1, 35, 66 y 93, respectivamente). A continuación se muestra el resumen con los datos de temperatura y humedad relativa en el vivero de los treinta días anteriores a cada una de las fechas de medición (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Resumen de los datos de temperatura y humedad relativa en el vivero de los 30 días anteriores a cada fecha de medición, así como las horas de frío de los 15 y 30 días anteriores a cada fecha de medición.

Variables	Fechas de medición (semana)			
	3 ^a dic.	4 ^a ene.	4 ^a feb.	4 ^a mar.
Ta	27.4	25.2	25.6	25.6
T'a	21.3	19.1	19.4	19.9
tm	14.0	13.1	12.4	14.5
t'a	6.6	7.1	5.5	9.2
ta	1.8	2.3	1.1	1.5
H'a	92.7	96.2	89.6	95.2
hm	67.9	76.4	65.8	76.1
h'a	43.1	56.7	41.9	57.0
HF _{-7°C} (15)	125	100	86	6
HF _{-7°C} (30)	162	126	160	39
HF _T	162	344	504	538

- Ta: temperatura máxima absoluta.
- T'a / H'a: media de las temperaturas / humedades relativas máximas diarias.
- tm / hm: temperatura / humedad relativa media del período considerado.
- t'a / h'a: media de las temperaturas / humedades relativas mínimas diarias.
- ta: temperatura mínima absoluta.
- HF_{-7°C} (15): número de horas de frío ≤ 7 °C acumuladas en el vivero durante los 15 días anteriores a cada fecha de medición.
- HF_{-7°C} (30): número de horas de frío ≤ 7 °C acumuladas en el vivero durante los 30 días anteriores a cada fecha de medición.
- HF_T: número de horas de frío totales acumuladas hasta cada fecha de medición desde 30 días anteriores a la primera.

El número de horas de frío, de los 15 y 30 días anteriores a cada fecha, para las dos temperaturas consideradas ($\leq 7\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $\leq 8\text{ }^{\circ}\text{C}$) se correlacionaron significativamente, $\text{HF}_{-8^{\circ}\text{C}} = 1.136 \text{ HF}_{-7^{\circ}\text{C}} + 14.556$, $r = 0.963$, $n = 8$, $p = 0.01$.

Los clones 227, 358, 437, HE y HG fueron fertilizados únicamente con el tratamiento de referencia, similar al del año anterior y al que denominaremos N_1K_1 (Tabla 5.3), a 5 plantas/clon. Para estos clones solo se analizó la evolución en el tiempo y la comparación entre clones para este tratamiento. Sin embargo, los otros tres clones, C14, 12€ y HI, se sometieron, además, a un ensayo de fertilización mineral. Estos tres clones se escogieron en función del grado de tolerancia al frío manifestado el año anterior, mayor para HI, menor para 12€ e intermedio para C14. Para ello, se tomaron aleatoriamente 40 plantas/clon y se distribuyeron en bandejas. A estos tres clones se aplicaron ocho tratamientos de fertilización (Tabla 5.3), a razón de 5 plantas por clon y tratamiento, desde el inicio del ensayo (1^a semana de octubre) hasta el final (4^a semana de marzo). Los tratamientos se diferenciaban en las dosis de N y K aplicadas y consistieron en un diseño factorial completo con dos factores (N y K), con cuatro niveles para N (N_0 , $N_{1/25}$, N_1 y N_2) y dos niveles para K (K_1 , $K_{1/50}$) y dejando las dosis de los demás macro- y micronutrientes constantes. La cantidad aplicada de P fue de 71.23 mg/L, como en los ensayos del año anterior.

El fertilizante se aplicó semanalmente mediante fertirriego, procurando mantener el sustrato humedecido hasta capacidad de campo constantemente. En cada fertirriego, se regaba hasta que drenase por el fondo del envase para evitar la concentración de los nutrientes en el sustrato. Entre dos fertilizaciones consecutivas, si era necesario, se regaba con agua destilada para mantener la humedad, pero procurando que no drenase por el fondo para evitar el lavado del sustrato. Como el período del ensayo coincidió con la época fría, no fue necesario reponer mucha agua.

Tabla 5.3. Tratamientos de fertilización mineral aplicados a las plantas en vivero durante el período de otoño-invierno.

Código de los tratamientos	Solución fertilizante (mg/L)	
	N	K
$N_1 K_1$	126.00	89.93
$N_0 K_1$	0.00	89.93
$N_{1/25} K_1$	5.04	89.93
$N_2 K_1$	252.00	89.93
$N_1 K_{1/50}$	126.00	1.79
$N_0 K_{1/50}$	0.00	1.79
$N_{1/25} K_{1/50}$	5.04	1.79
$N_2 K_{1/50}$	252.00	1.79

5.3.3 - Evaluación de la tolerancia al frío

Para evaluar la tolerancia al frío se utilizó un ensayo de hoja suelta, tal y como fue descrito para *Eucalyptus globulus* (Fernández et al., 2007). Este método permite la obtención de datos sin sacrificar la planta completa, por lo que nos permitió llevar a cabo varios test con diferentes temperaturas usando hojas de la misma planta. Las hojas seleccionadas, una vez arrancadas, se introducían en tubos de ensayo (2.2 cm de diámetro y 15 cm de longitud) que se colocaban en un congelador al que se ha acoplado un programador de temperatura (West ® 4400; ISE Inc., Cleveland, OH) y dos ventiladores internos que distribuyen el aire en el interior de forma uniforme (Figura 5.1). Cada test comenzó a 12 °C y la temperatura iba descendiendo a razón de 3 °C/hora hasta la mínima temperatura evaluada. La temperatura mínima se mantenía durante 3 horas y posteriormente ascendía hasta 12 °C, a una tasa de 4–5 °C/hora. Un ciclo completo solía durar entre 14 y 16 horas. Una vez terminado el ciclo de temperatura, los tubos de ensayo se sacaban del congelador, se les añadía agua destilada ($\leq 2 \text{ cm}^3$) hasta cubrir el pequeño peciolo, para evitar su deshidratación y se cubrían con tapón translúcido no hermético.



Figura 5.1. Detalle de la disposición de las hojas dentro del arcón congelador con regulador de temperatura y temporizador acoplado, ventiladores interiores y termómetros registradores.

Seguidamente, las muestras se introducían en una cámara de cultivo (25 °C día/17 °C noche; fotoperiodo de 12 h; $\geq 70\%$ de humedad relativa y $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de flujo de fotones fotosintéticos) con el fin de inducir la aparición visual de los daños (Bowers, 1994). El daño a las hojas se evaluó visualmente (VD) transcurridas 24, 48 y 72 horas después de la finalización del tratamiento de frío. El sistema para medir el daño por frío fue similar al utilizado por Leslie et al. (2014), mediante la estimación del porcentaje de superficie foliar que manifestaba un daño visualmente apreciable, causado por la lisis celular. La estimación del daño variaba de 0 % (ningún daño visible) hasta 100 % (hoja completamente dañada). Los valores intermedios de daño se evaluaban mediante la asignación de un valor dentro de intervalos de 10 % (< 10 %, 10-19 %, 20-29 %, ..., 90-99 %), con la ayuda de una plantilla de papel milimetrado. Cabe añadir que más del 85 % de las hojas testadas mostraron los valores más extremos, 0 o 100 %, y menos del 15 % valores intermedios, lo que facilitaba mucho la evaluación y disminuía el error de estimación. Dicho daño se reconocía por un particular oscurecimiento y cambio de color de la hoja después del ensayo (Figura 5.2). Los datos que se mostrarán son los correspondientes a las 48 h, puesto que no se diferenciaron con los mostrados 72 h, y resultaron más fiables que los medidos a las 24 h, ya que un pequeño porcentaje de hojas necesitaron más de 24 h para mostrar visualmente todos los daños sufridos.

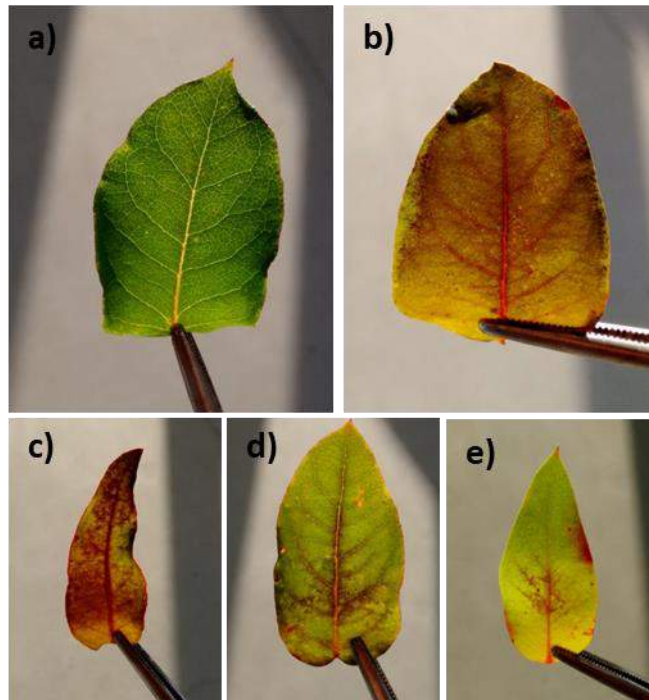


Figura 5.2. Diferentes niveles de daño tras el ensayo de hoja suelta para la tolerancia al frío: a) Daño no visible, 0 %; b) Daño total, 100 %; c) d) e) Daños parciales, niveles 85 %, 25 % y 5 %, respectivamente.

Para cada ensayo de frío se utilizaron 3–4 hojas por clon, tratamiento y temperatura ensayada. Hojas completamente desarrolladas del 3^{er}, 4^o o 5^o verticilo por debajo del meristemo principal del tallo, escogidas aleatoriamente de entre las plantas disponibles por clon y tratamiento. En cada fecha se ensayaron 4–5 temperaturas mínimas, -3.0 a -7.3 °C el primer año y -4.0 a -8.0 °C el segundo, dependiendo de la fecha. Tras los ensayos, se representó gráficamente la relación entre temperatura mínima y daño obtenido con lo que se pudo determinar la temperatura que causaba un 10 % (LT₁₀) o un 50 % (LT₅₀) de daños a las hojas, a partir del ajuste a una ecuación de regresión del tipo Gompertz: $VD = a * \exp(-b * \exp(-k * T))$ (Cunningham y Read, 2006), donde: VD representa el nivel de daño visual de cada hoja, asignándole el valor medio del rango en el que se incluye (%); a representa el valor asintótico, T es la temperatura (°C); b y k son constantes relacionadas con la forma de la curva al inicio y el punto de inflexión.

En las mismas fechas de cada test de frío, se tomaron 2 hojas por clon y tratamiento con el fin de analizar los contenidos en azúcares solubles (SS), nitrógeno (N) y potasio (K), así como determinar la relación de estos parámetros

con la tolerancia al frío obtenida. Estas muestras de hojas fueron inmediatamente secadas en estufa (70 °C), almacenadas en seco y, posteriormente, molidas y tamizadas a 0.8 mm. La determinación de los azúcares solubles (SS) se realizó mediante una extracción hidroalcohólica seguida de una colorimetría con antrona (Spiro, 1966) usando un espectrofotómetro (UV-1601, Shimadzu R, Tokio, Japón), la determinación de N se llevó a cabo mediante el método Kjeldahl y el potasio por fotometría de llama.

5.3.4 - Análisis de datos

El análisis de los datos se realizó siguiendo un Modelo Lineal General. Para la tolerancia al frío de las plantas se llevó a cabo un ANOVA de tres (clon, fecha, temperatura mínima), cuatro (clon, fecha, temperatura mínima, nivel de radiación solar) o cinco factores (clon, fecha, temperatura mínima, N, K), dependiendo de cada uno de los experimentos. A los datos se les aplicó la transformación angular $\arccos(VD/100)^{0.5}$, para asegurar la homocedasticidad. Todos los factores se consideraron fijos. Como criterio general y cuando no se especifique nada, las diferencias significativas entre los grupos de los distintos factores fueron analizadas mediante el test de *Scheffé*, aunque en algún caso, indicado oportunamente en los resultados, también se utilizó el de Bonferroni. Se utilizó el paquete estadístico SAS ® 9.2. Las diferencias se consideraron significativas para un nivel de significación $p \leq 0.05$.

5.4 - RESULTADOS

5.4.1 - Primer año. Nueve clones bajo dos tratamientos de radiación solar durante el otoño-invierno de 2016-2017

Comparando el nivel de daño en hojas maduras entre diciembre de 2016 y marzo de 2017, se detectaron diferencias significativas entre fechas ($p < 0.001$) (Figura 5.3) y entre temperaturas mínimas ensayadas ($p < 0.001$) (Figura 5.4), así como entre el nivel de radiación recibido ($p < 0.001$), con valores medios de 52.15 ± 0.02 % para el tratamiento sin malla y 43.01 ± 0.02 % para el tratamiento

con malla del 50 % de sombreado. También se obtuvieron diferencias significativas entre clones ($p = 0.001$), siendo el valor medio para el conjunto de clones de 47.60 ± 0.04 %. Aunque el test de Sheffé no discriminó entre clones ($p \geq 0.103$), el test de Bonferroni diferenció significativamente al clon HI, que presentó el valor más bajo de daño (35.07 ± 0.04), de HE (55.67 ± 0.04 ; $p = 0.009$), 12€ (54.75 ± 0.04 ; $p = 0.019$) y 225 (53.80 ± 0.04 ; $p = 0.039$).

Asimismo, resultaron significativas algunas interacciones entre factores principales, como Fecha x Temperatura ($p < 0.001$) (Figura 5.5), Fecha x Radiación ($p < 0.001$) (Figura 5.6), Clon x Fecha x Temperatura ($p = 0.003$) (Figura 5.7), y Fecha x Temperatura x Radiación ($p < 0.001$) (Figura 5.8), indicando un patrón de evolución temporal y grado de endurecimiento distintos entre clones y entre tratamientos de exposición solar.

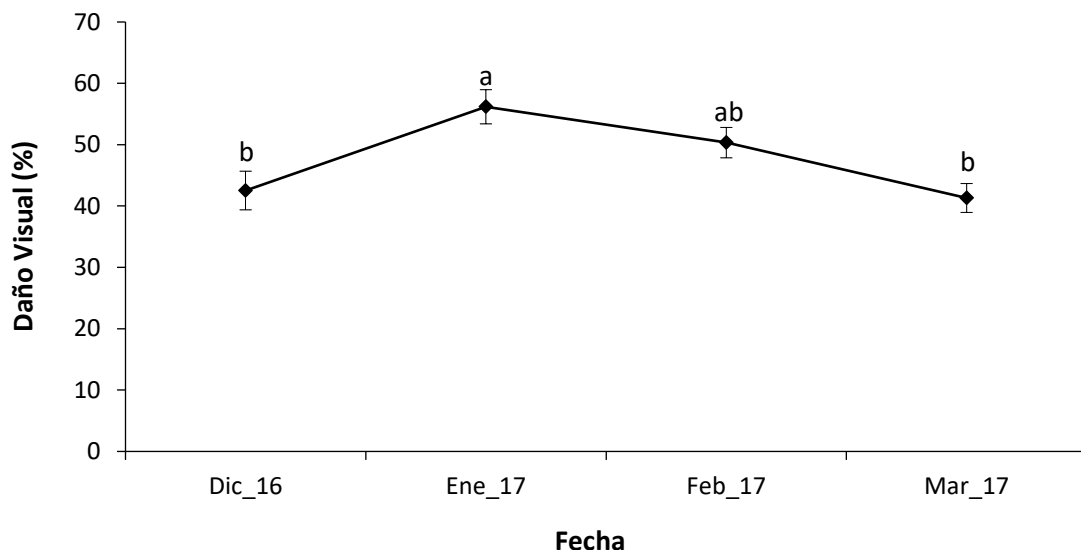


Figura 5.3. Daño visual en hojas (VD) tras el ensayo de tolerancia al frío para cada fecha de medición, considerando el conjunto de clones, temperaturas mínimas y grado de exposición solar (media \pm ET), 0 %: daño no visible; 100 %: totalmente dañada. Letras distintas en cada fecha indican diferencias significativas: entre diciembre_2016 y enero_2017 ($p = 0.016$), entre enero_2017 y marzo_2017 ($p = 0.001$).

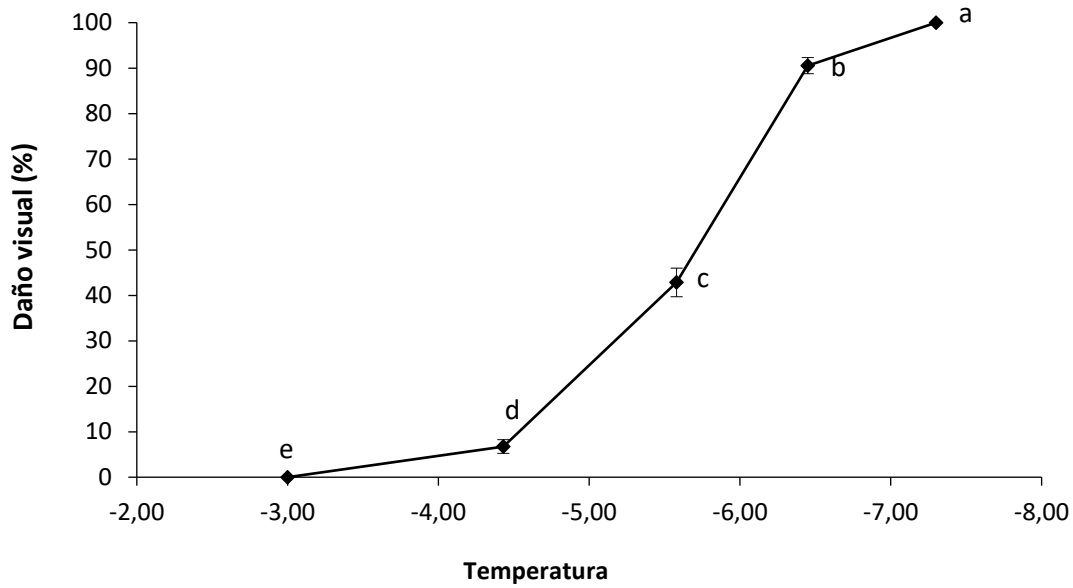


Figura 5.4. Daño visual en hojas (VD) tras el ensayo de tolerancia al frío, para cada temperatura mínima ensayada, considerando el conjunto de clones, fechas de medición y grado de exposición solar (media \pm ET), 0 %: daño no visible; 100 %: hoja totalmente dañada. Letras distintas en cada temperatura indican diferencias significativas ($p < 0.001$).

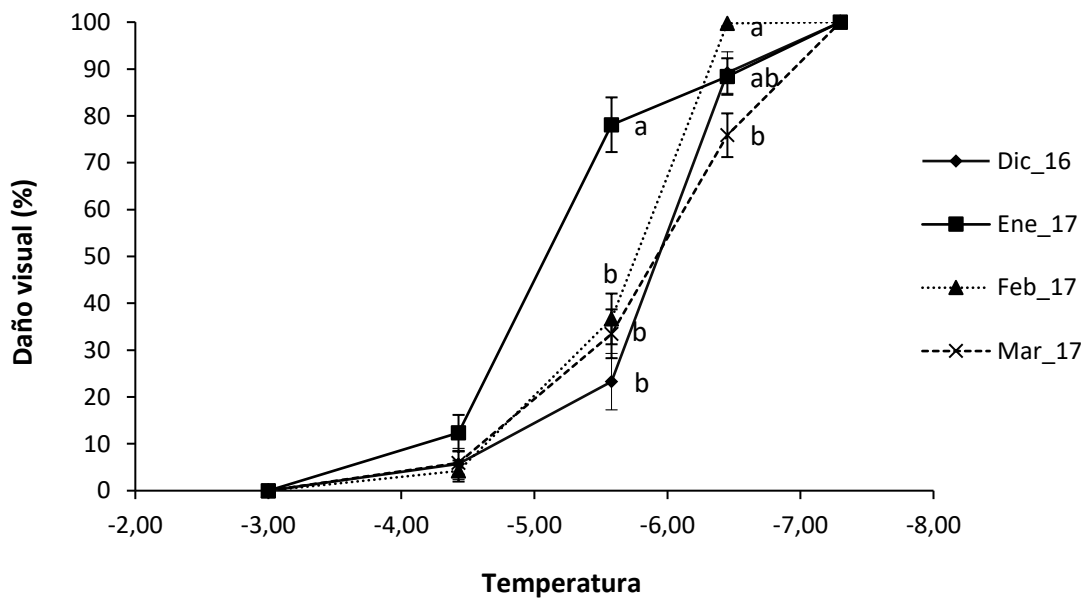


Figura 5.5. Daño visual en hojas (VD) tras el ensayo de tolerancia al frío, para cada temperatura mínima ensayada y fecha de medición, considerando el conjunto de clones y grado de exposición solar (media \pm ET), 0 %: daño no visible; 100 %: hoja totalmente dañada. Para cada temperatura, letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.001$) entre fechas.

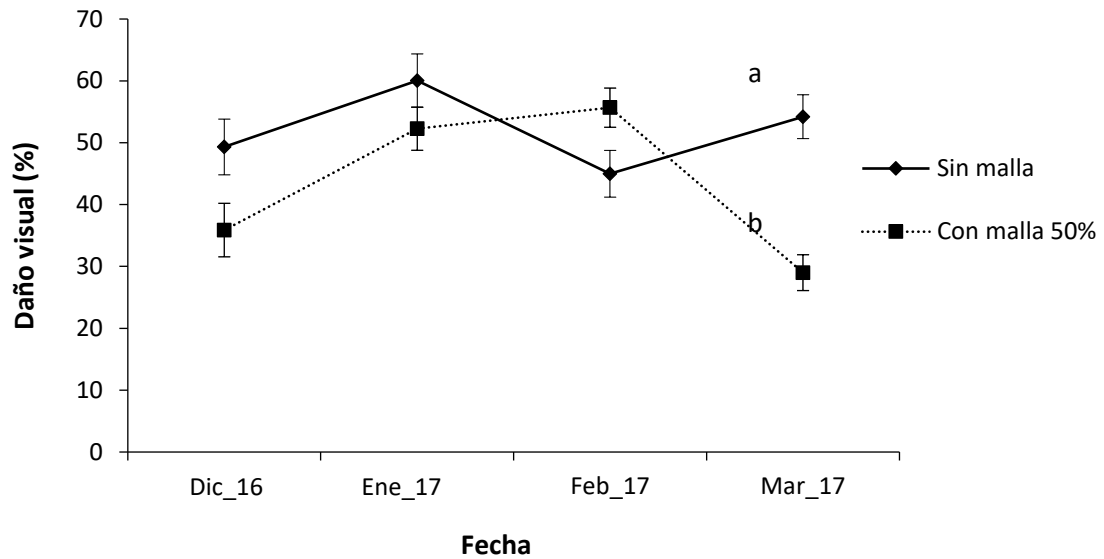


Figura 5.6. Daño visual en hojas (VD) tras el ensayo de tolerancia al frío, para cada fecha de medición y grado de exposición solar, considerando el conjunto de clones y temperaturas mínimas (media \pm ET), 0 %: daño no visible; 100 %: hoja totalmente dañada. Letras distintas en cada grado de exposición solar indican diferencias significativas ($p < 0.001$) para esa fecha de medición.

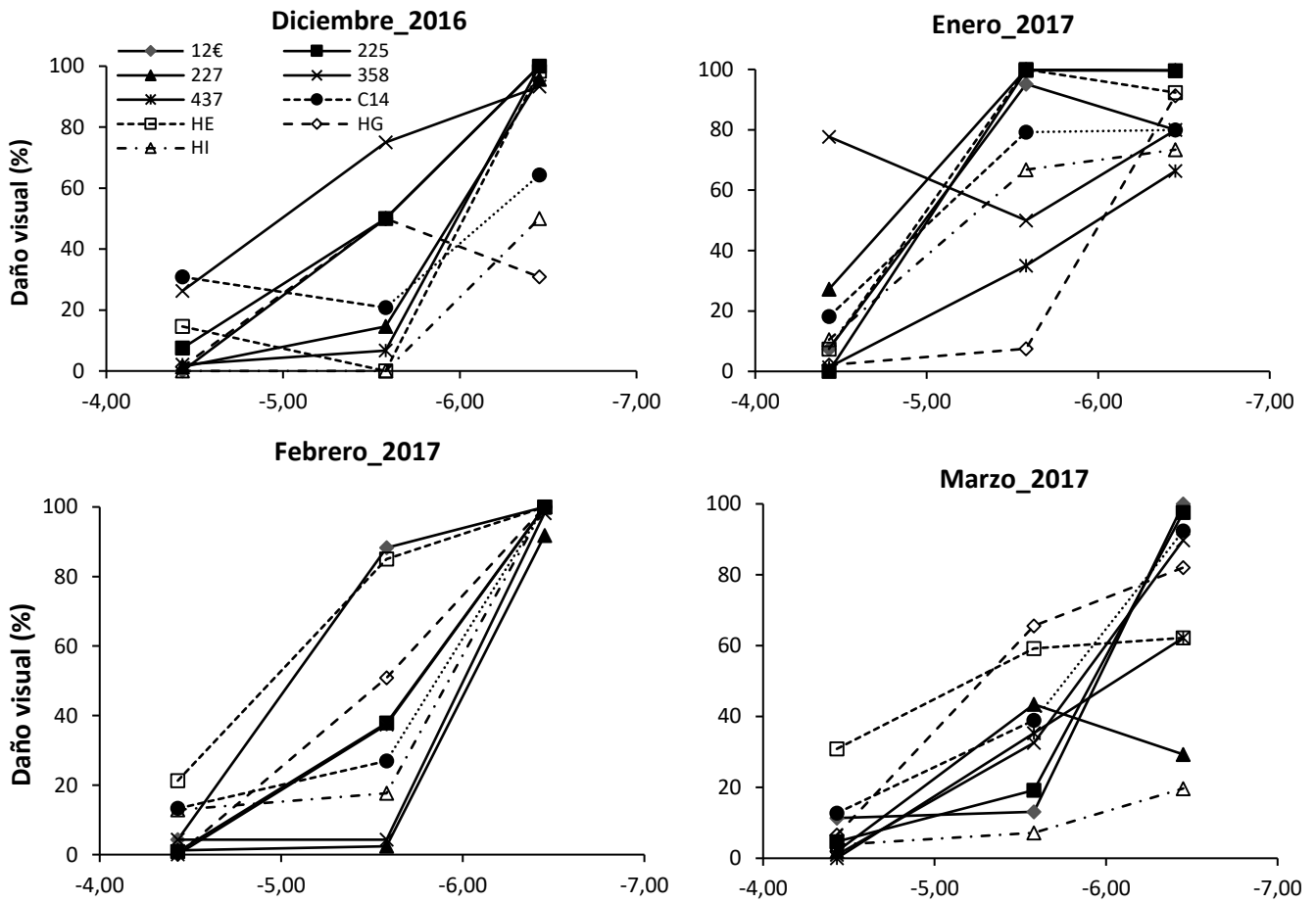


Figura 5.7. Daño visual en hojas (VD) tras el ensayo de tolerancia al frío, para cada fecha, temperatura mínima ensayada y clon, considerando el conjunto de exposiciones solares (media \pm ET), 0 %: daño no visible; 100 %: hoja totalmente dañada. No se han representado las temperaturas -3 °C y -7.3 °C porque no diferenciaron entre clones, siendo VD de 0 % y muy próximo a 100 %, respectivamente, para todos los clones.

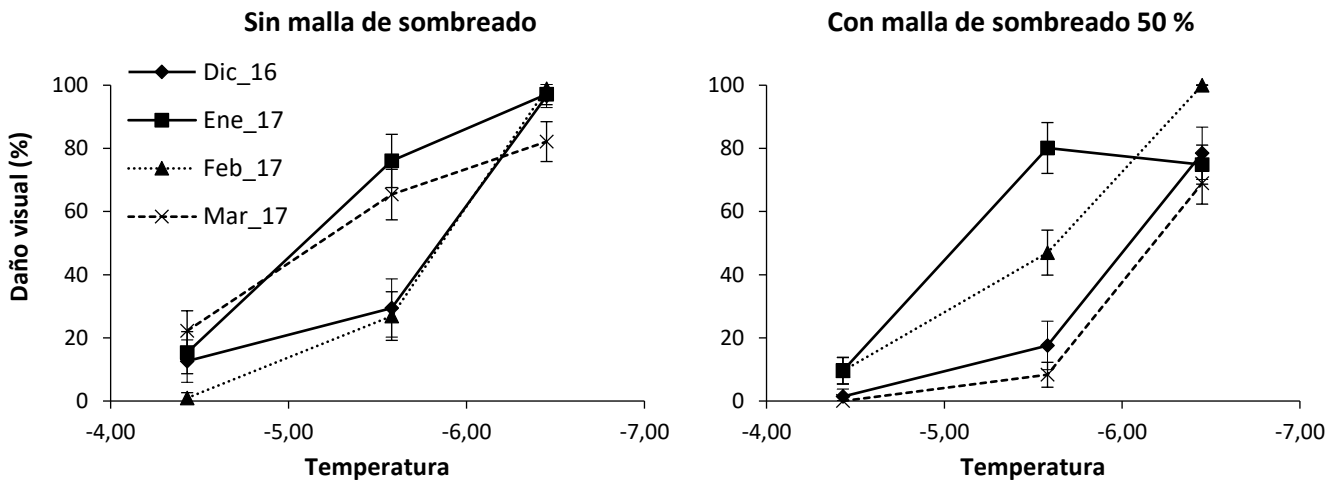


Figura 5.8. Daño visual en hojas (VD) tras el ensayo de tolerancia al frío, para cada temperatura mínima ensayada, grado de exposición solar y fecha, considerando el conjunto de clones (media \pm ET), 0 %: daño no visible; 100 %: hoja totalmente dañada. No se han representado las temperaturas -3 °C y -7.3 °C porque no diferenciaron entre clones, siendo VD de 0 % y muy próximo a 100 %, respectivamente, para todos los clones.

Considerando el comportamiento de estos nueve clones tratados únicamente con la solución nutritiva de referencia (N_1K_1), los valores de LT_{50} y LT_{10} se muestran la Figura 5.9.

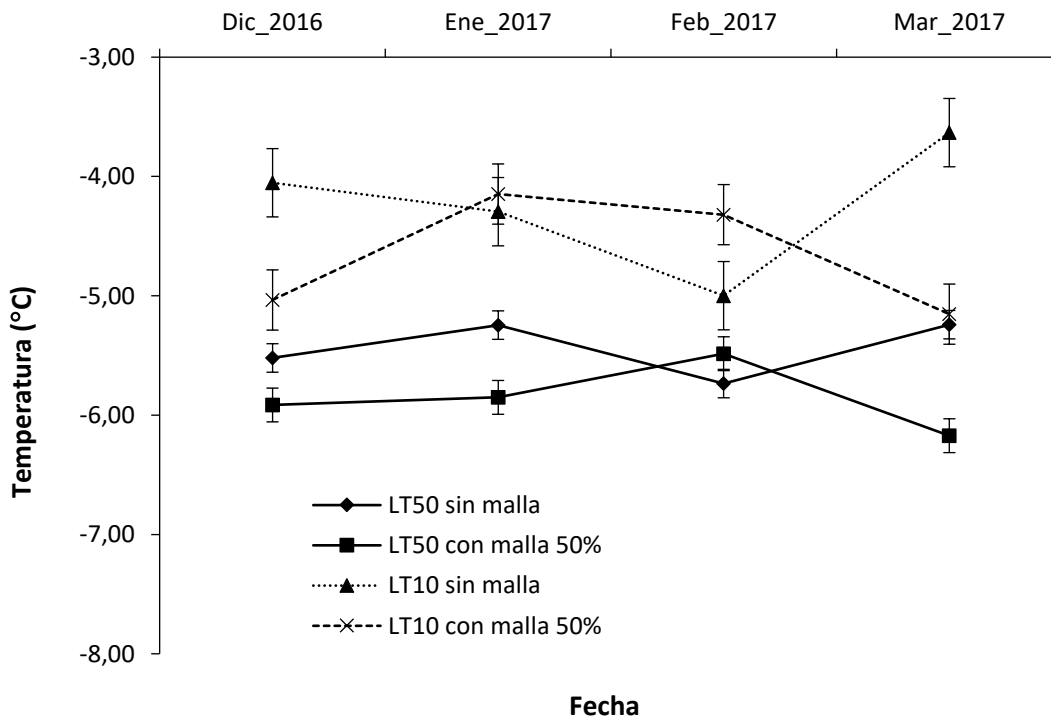


Figura 5.9. Evolución estacional de la resistencia al frío (LT_{50} y LT_{10} , °C) del tratamiento estándar N_1K_1 , para el conjunto de clones, en las fechas de medición del ensayo de 2016/17.

5.4.2 - Segundo año. Ocho clones sometidos a un único tipo de fertilización (N_1K_1) durante el otoño-invierno de 2017-2018

Comparando el nivel de daño en hojas recolectadas entre diciembre de 2017 y enero, febrero y marzo de 2018, se detectaron diferencias entre los distintos clones ($p < 0.001$, Figura 5.10), entre fechas ($p = 0.001$, Figura 5.11) y entre temperaturas ($p < 0.001$, Figura 5.12). Asimismo, para las distintas interacciones entre los tres factores, solamente la interacción Clon x Fecha resultó significativa ($p < 0.001$, Figura 5.13), indicando un patrón de evolución temporal distinto entre clones. Para $-8\text{ }^\circ\text{C}$, el daño fue de 100 % para todas las plantas, y a $-4\text{ }^\circ\text{C}$ del 0 %, por lo que estas temperaturas no se incluyeron en el análisis.

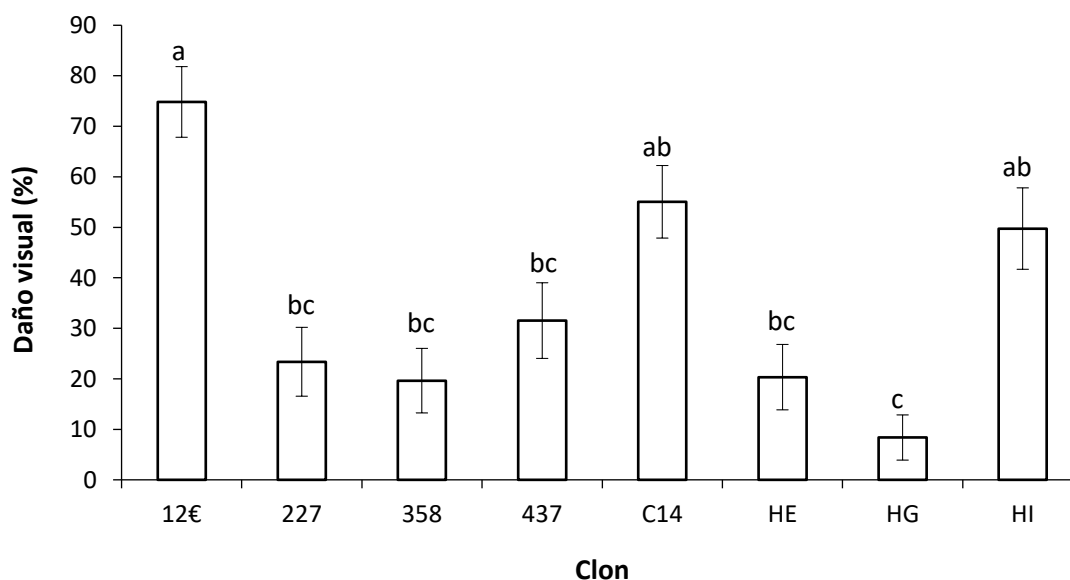


Figura 5.10. Daño visual en hojas (VD) tras el ensayo de tolerancia al frío para cada clon, considerando el conjunto de fechas y temperaturas mínimas (media \pm ET), 0 %: daño no visible; 100 %: hojas totalmente dañada. Letras distintas en cada clon indican diferencias significativas ($p < 0.001$).

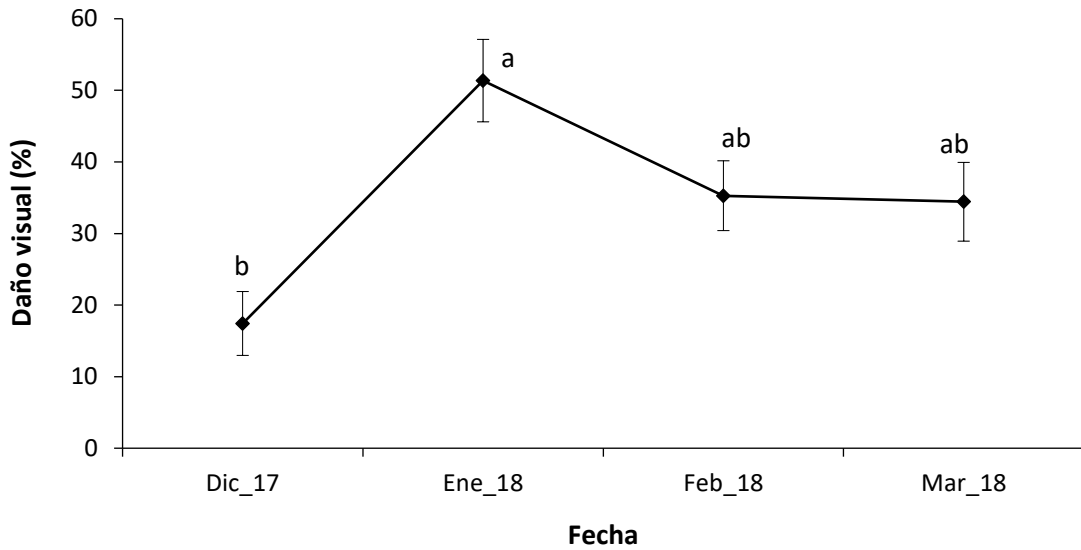


Figura 5.11. Daño visual en hojas (VD) tras el ensayo de tolerancia al frío para cada fecha de medición, considerando el conjunto de clones y temperaturas mínimas (media \pm ET), 0 %: daño no visible; 100 %: hoja totalmente dañada. Letras distintas en cada fecha indican diferencias significativas ($p = 0.001$).

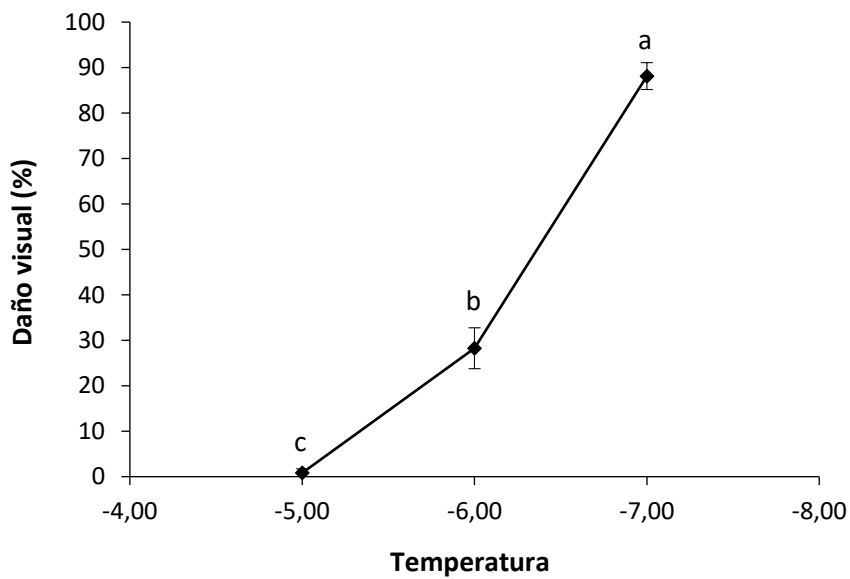


Figura 5.12. Daño visual en hojas (VD) tras el ensayo de tolerancia al frío para cada temperatura mínima ensayada, considerando el conjunto de clones y fechas de medición (media \pm ET), 0 %: daño no visible; 100 %: hoja totalmente dañada. Letras distintas en cada temperatura indican diferencias significativas: entre -5 °C y -6 °C ($p = 0.05$), y $p < 0.001$ para las demás.

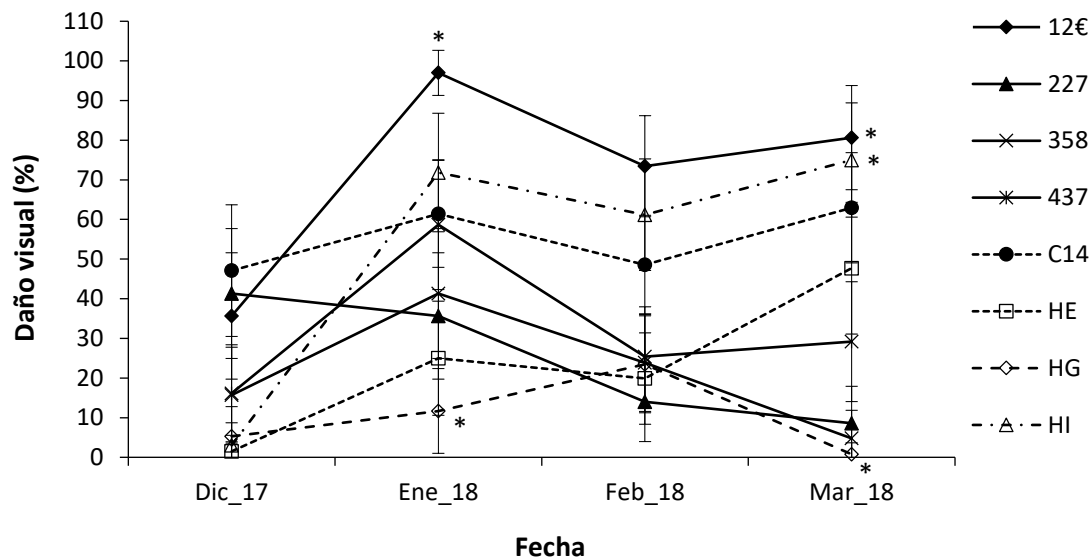


Figura 5.13. Daño visual en hojas (VD) tras el ensayo de tolerancia al frío para cada fecha de medición y clon, considerando el conjunto de temperaturas mínimas ensayadas (media \pm ET), 0 %: daño no visible; 100 %: hoja totalmente dañada.

Considerando el comportamiento de los ocho clones tratados con esta única solución nutritiva de referencia (N_1K_1), los valores de LT_{50} y LT_{10} obtenidos se muestran la Tabla 5.4.

Tabla 5.4. Valores de LT_{50} y LT_{10} ($^{\circ}C$) del tratamiento estándar N_1K_1 para los distintos clones y fechas de medición en el ensayo de 2017/18.

Clon	Días desde el primer test			
	Dic_2017	Ene_2018	Feb_2018	Mar_2018
	LT_{50} ($^{\circ}C$)			
HE	-7.46	-6.87	-6.60	-6.36
437	-6.89	-6.12	-6.66	-6.65
227	-5.51	-6.66	-6.33	-7.07
358	-7.39	-6.62	-6.59	-7.48
HG	-7.47	-7.20	-6.49	-8.00
C14	-6.49	-5.95	-5.64	-5.30
12€	-6.57	-4.69	-5.14	-5.07
HI	-7.39	-5.93	-5.39	-5.13
	LT_{10} ($^{\circ}C$)			
HE	-6.62	-6.47	-5.91	-4.86
437	-6.37	-5.52	-5.39	-5.13
227	-4.91	-5.67	-6.01	-6.41
358	-4.83	-5.67	-5.86	-5.06
HG	-5.16	-6.40	-5.89	-6.84
C14	-4.83	-3.79	-4.70	-4.76
12€	-5.16	-3.29	-4.30	-4.91
HI	-6.54	-3.49	-4.79	-4.73

5.4.3 - Segundo año. Tres clones sometidos a distintos tipos de fertilización durante el otoño-invierno de 2017-18

Se detectaron diferencias significativas entre los distintos clones ($p < 0.001$, Figura 5.14), fechas ($p < 0.001$, Figura 5.15), temperaturas mínimas ensayadas ($p < 0.001$, Figura 5.16) y niveles de N ($p < 0.001$, Figura 5.17), pero no entre niveles de K ($p = 0.623$). Asimismo, para las distintas interacciones entre los cinco factores, las interacciones Clon x Fecha ($p = 0.009$), Fecha x Temperatura ($p < 0.001$, Figura 5.18), Clon x N ($p = 0.026$, Figura 5.19) y N x K ($p < 0.001$, Figura 5.20) resultaron significativas, indicando un patrón de evolución temporal y grados de endurecimiento distintos entre clones y entre los distintos niveles de N y K. Para $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$, el daño fue de 100 % para todas las plantas, y a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ del 0 %, por lo que no se incluyeron en el análisis.

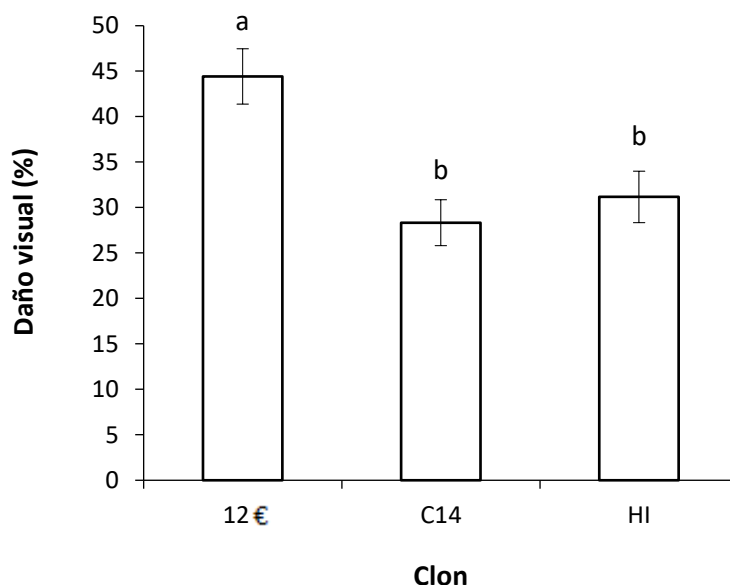


Figura 5.14. Daño visual en hojas (VD) tras el ensayo de tolerancia al frío para cada clon, considerando el conjunto de fechas de medición, temperaturas mínimas, niveles de N y de K (media \pm ET); 0 %: daño no visible; 100 %: hoja totalmente dañada. Letras distintas en cada clon indican diferencias significativas ($p < 0.001$).

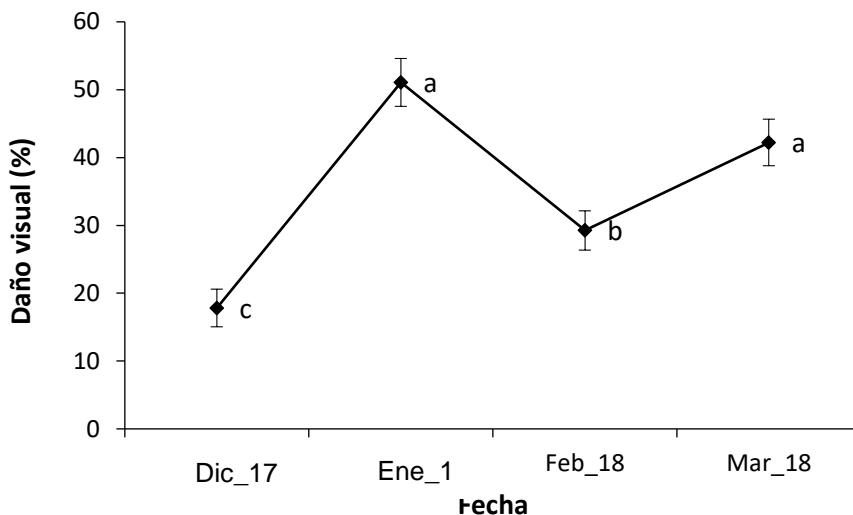


Figura 5.15. Daño visual en hojas (VD) tras el ensayo de tolerancia al frío para cada fecha de medición, considerando el conjunto de clones, temperaturas mínimas y niveles de N y K (media \pm ET); 0 %: daño no visible; 100 %: hoja totalmente dañada. Letras distintas en cada fecha indican diferencias significativas ($p < 0.001$).

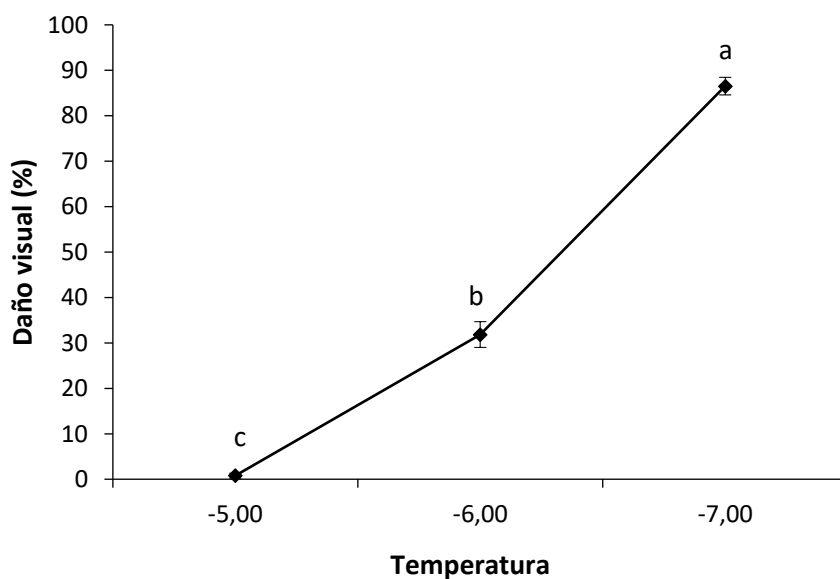


Figura 5.16. Daño visual en hojas (VD) tras el ensayo de tolerancia al frío para cada temperatura mínima ensayada, considerando el conjunto de clones, fechas de medición y niveles de N y de K (media \pm ET); 0 %: daño no visible; 100 %: hoja totalmente dañada. Letras distintas en cada temperatura indican diferencias significativas ($p < 0.001$).

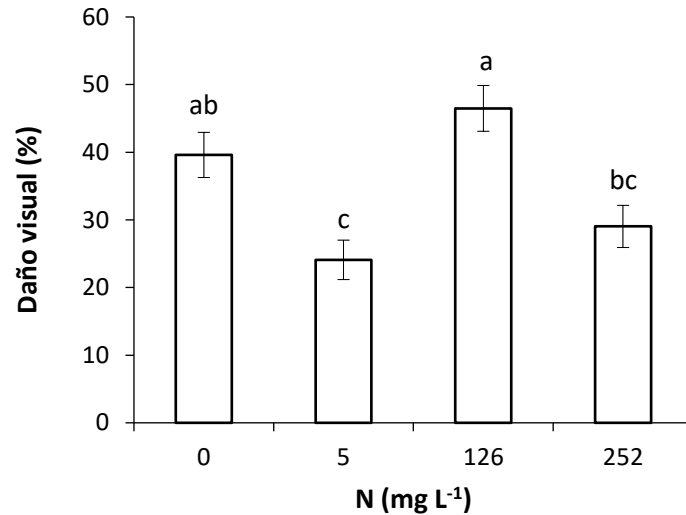


Figura 5.17. Daño visual en hojas (VD) tras el ensayo de tolerancia al frío para cada nivel de N ensayado, considerando el conjunto de clones, fechas de medición, temperaturas mínimas y niveles de K (media \pm ET); 0 %: daño no visible; 100 %: hoja totalmente dañada. Letras distintas en cada nivel de N indican diferencias significativas ($p < 0.001$).

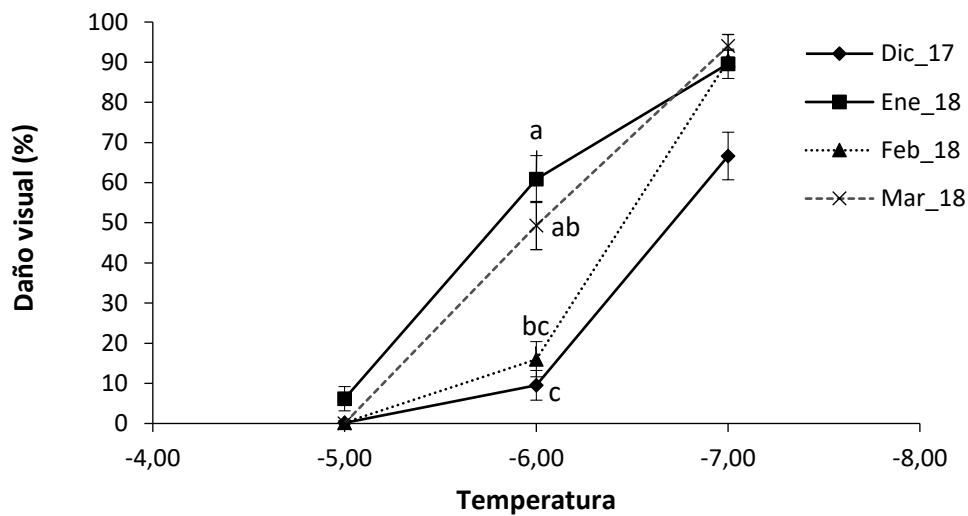


Figura 5.18. Daño visual en hojas (VD) tras el ensayo de tolerancia al frío para cada temperatura mínima ensayada y fecha de medición, considerando el conjunto de clones, niveles de N y de K (media \pm ET), 0 %: daño no visible; 100 %: hoja totalmente dañada. Letras distintas en cada temperatura indican diferencias significativas entre fechas ($p < 0.001$).

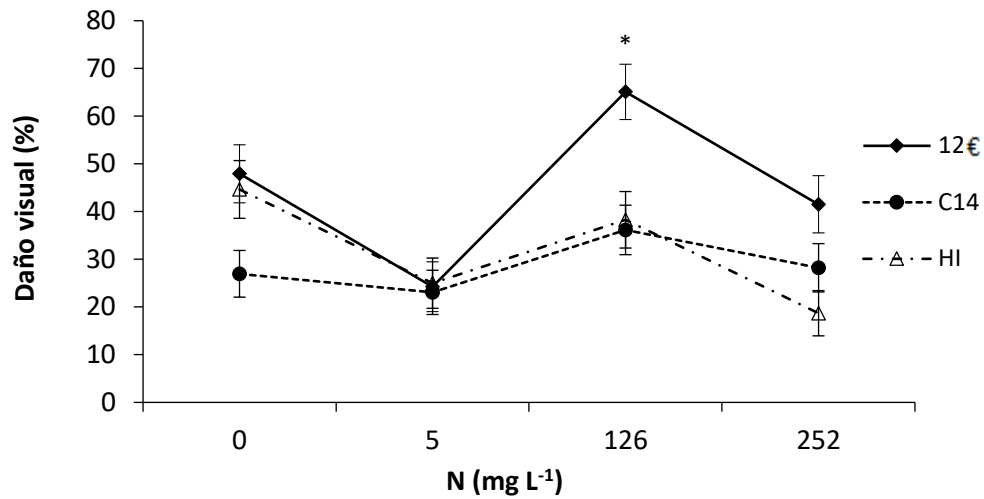


Figura 5.19. Daño visual en hojas (VD) tras el ensayo de tolerancia al frío para cada nivel de N y clon, considerando el conjunto de fechas de medición, temperaturas mínimas y niveles de K (media \pm ET), 0 %: daño no visible; 100 %: hoja totalmente dañada. El asterisco indica diferencias significativas entre clones para esa dosis de N según el test de Bonferroni ($p < 0.05$).

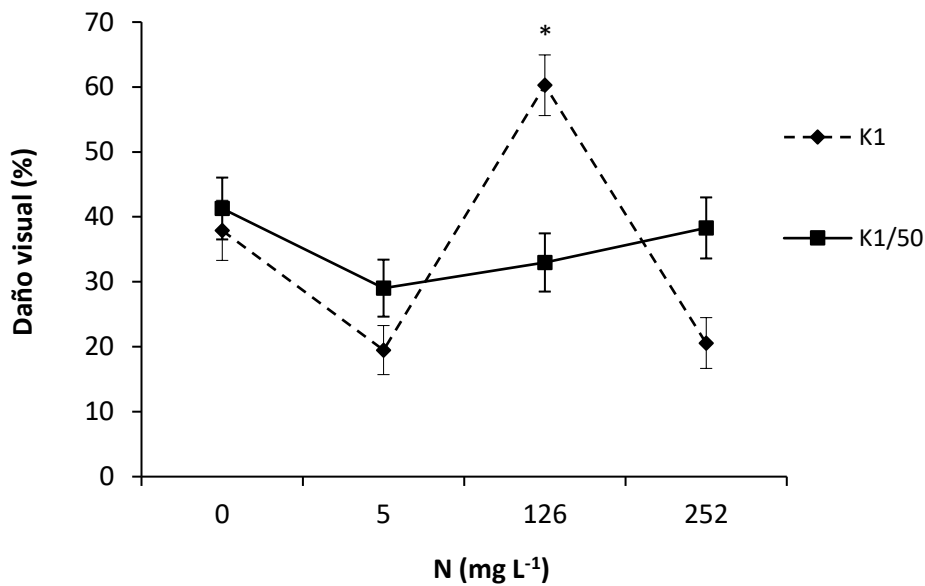


Figura 5.20. Daño visual en hojas (VD) tras el ensayo de tolerancia al frío para cada nivel de N y K, considerando el conjunto de fechas de medición, temperaturas mínimas y clones (media \pm ET), 0 %: daño no visible; 100 %: hoja totalmente dañada. El asterisco indica diferencias significativas entre niveles de K para esa dosis de N ($p < 0.001$).

Considerando el comportamiento de los tres clones para el conjunto de los ocho tratamientos de fertilización, los valores de LT_{50} y LT_{10} se muestran la Figura 5.21.

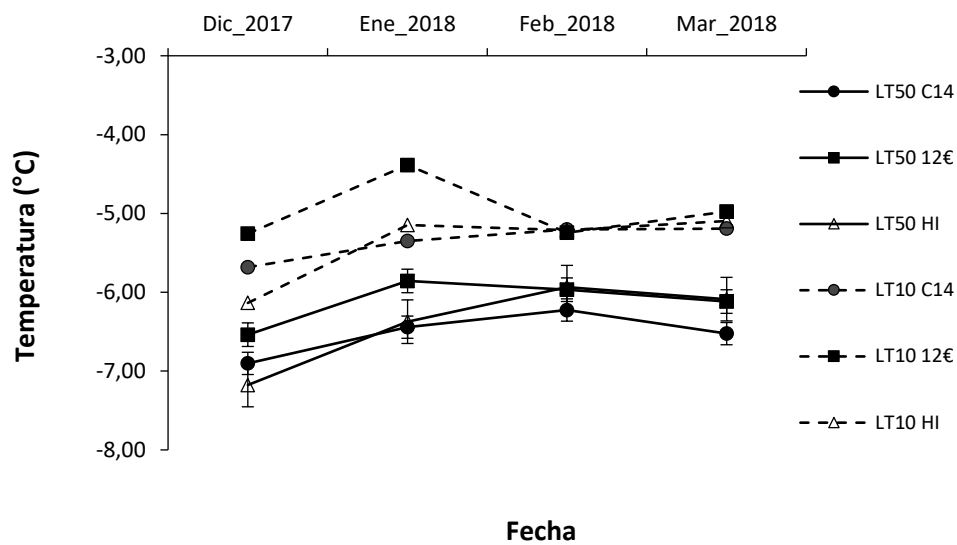


Figura 5.21. Evolución estacional de la resistencia al frío (LT_{50} y LT_{10} , °C) de los tres clones para los distintos tratamientos de fertilización y fechas de medición en el ensayo de 2017/18 (día 1: 18-diciembre; día 93; 23 de marzo).

Considerando los dos años de estudio, los tres ensayos realizados y el conjunto de clones no se obtuvo una relación significativa entre LT_{50} y las horas de frío contabilizadas ($HF_{-7^{\circ}C}$ (15), $HF_{-7^{\circ}C}$ (30) y HF_T), $0.036 \leq R^2 \leq 0.0342$, $0.05 \leq p \leq 0.653$), ni cuando se consideró cada clon individualmente ($p > 0.100$).

5.4.4 - Segundo año. Estado nutricional de las plantas y relación con tolerancia al frío

Los valores de la concentración del nitrógeno en hojas, para los distintos clones, tratamientos y fechas de medición, se situaron entre 9.0 y 18.2 mg g⁻¹, con diferencias significativas solamente entre fechas ($p = 0.027$, Tabla 5.5) pero no entre clones o entre tratamientos de fertilización ni para las distintas interacciones entre los efectos principales ($p \geq 0.253$). En este ensayo y con este rango de valores, la concentración foliar de N no se correlacionó significativamente con LT_{50} para cada clon individualmente ($r < 0.875$, $p > 0.321$), ni para el grupo de clones en su conjunto ($r = -0.102$, $p = 0.614$). Los valores de la concentración del potasio en hojas tampoco resultaron significativamente

diferentes entre clones, tratamientos y fechas de medición, con un valor medio de 0.48 ± 0.05 %.

Tabla 5.5. Valores medios (\pm ET) de la concentración de nitrógeno en hojas para el conjunto de tratamientos de fertilización y clones en las fechas de medición indicadas. p = nivel de significación.

Fecha	N (%)
Diciembre_17	1.11 ± 0.07 b
Enero_18	1.12 ± 0.08 ab
Febrero_18	1.30 ± 0.09 ab
Marzo_18	1.45 ± 0.09 a
p	0.027
Media Total	1.23 ± 0.05

Los valores de la concentración de azúcares solubles en hojas, para los distintos clones, tratamientos y fechas de medición, se situaron entre 43.8 y 161.8 mg g⁻¹. Hubo diferencias significativas entre clones ($p < 0.001$), siendo los contenidos en los clones HI (103.4 mg g⁻¹) y HG (131.3 mg g⁻¹) significativamente mayores que en el clon C14 (72.0 mg g⁻¹), mientras que los demás clones presentaron valores intermedios entre esos, no diferenciándose significativamente. También hubo diferencias significativas entre fechas ($p = 0.003$, Tabla 5.6), pero no entre tratamientos de fertilización ($p = 0.490$) ni para la interacción Clon x Fecha ($p > 0.062$) (Fig. 5.22). La concentración de azúcares solubles no se correlacionó significativamente con LT₅₀ para el conjunto de clones ($r = 0.149$, $p = 0.378$), ni para cada clon por separado ($r > -0.797$, $p > 0.203$).

Tabla 5.6. Valores medios (\pm ET) de la concentración de azúcares solubles en hojas (SS) para el conjunto de tratamientos de fertilización y clones en las fechas de medición indicadas. p = nivel de significación.

Fecha	SS (mg g ⁻¹)
Diciembre_17	104.4 \pm 9.3 b
Enero_18	110.3 \pm 9.6 b
Febrero_18	85.8 \pm 9.1 a
Marzo_18	80.4 \pm 6.8 a
p	0.003
Media Total	95.5 \pm 4.2

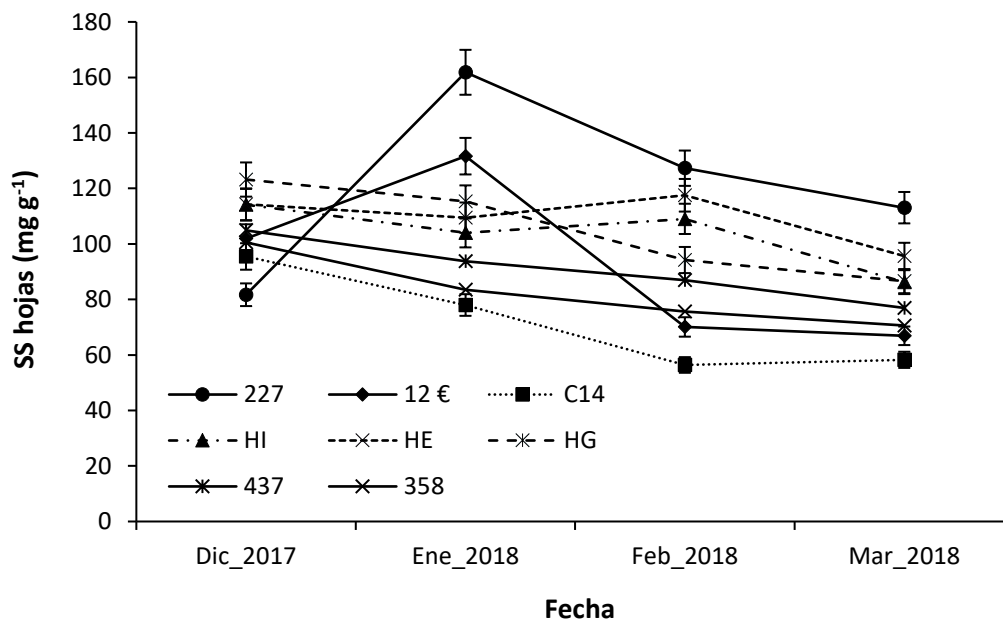


Figura 5.22. Patrón de evolución de azúcares solubles en hojas (SS) para los clones en las distintas fechas de medición.

5.5 - DISCUSIÓN

Se obtuvieron diferencias significativas entre clones para la tolerancia al frío, pero la diferencia entre ellos en cuanto a la temperatura mínima que causaba un cierto nivel de daño resultó tan pequeña (en general menor de 2 °C) que resultó difícil diferenciar entre clones. No obstante, se pudo llegar a detectar diferencias entre clones, al igual que hicieron Almeida et al. (1994) y Moraga et al. (2006) estudiando procedencias y subespecies de *E. globulus*. En nuestro estudio, el clon que presentó mayor nivel de daño visual, situándose generalmente en el rango más bajo de tolerancia en todos los ensayos, fue el 12€. Esto puede ser debido a que dicho clon es *E. x urograndis*, fruto del cruce de dos especies tropicales (*E. urophylla* y *E. grandis*) que, a pesar de poseer variabilidad genética para tolerancia al frío, su porcentaje de daño suele ser mayor comparado con especies subtropicales, tales como *E. globulus*, *E. maidenii* y *E. dunnii* (Flores et al., 2016). Observaciones realizadas en campo constatan que las especies subtropicales, como *E. benthamii* y *E. dunnii*, sufren menos daños por las heladas que especies tropicales como *E. urophylla*, *E. grandis* y *E. saligna*. (Higa et al., 2000; Caron et al., 2011; Moraes et al., 2016). Se pudo apreciar que las temperaturas mínimas que más diferenciaron entre los clones estudiados estuvieron comprendidas entre -5.5 y -6.5 °C, pues apenas se incrementaban éstas 1 °C respecto a ese rango ya no causaban daños y, por el contrario, si se bajaban 1 °C dañaban casi completamente a todas las hojas. Ello implica que en un rango muy estrecho de temperaturas, menor a 3 °C, se puede pasar de tolerancia total a daño total, por lo que hay que afinar bien la temperatura mínima de ensayo para obtener resultados concluyentes.

La respuesta dispar del clon HI entre el primer año de estudio (entre los clones más resistentes) y el segundo (en el grupo intermedio) se debió, posiblemente, a su concentración de N, ya que en el primer año (1.2 a 1.5 %) fue mayor que la del inicio del segundo año (0.9 %), lo que pudo condicionar su respuesta diferente entre los ensayos de ambos años (Fernández et al., 2007). Aunque el manejo y las condiciones de cultivo fueron los mismos para todas las plantas, siempre hay leves diferencias entre clones en la velocidad y ritmos de enraizamiento y crecimiento, por lo que el estado de las plantas no es siempre exactamente el mismo al final del período vegetativo. Como en el ensayo del

primer año se utilizaron plantas de 2 savias (50–80 cm de altura) que habían sido trasplantadas a envases mayores, el aspecto de las plantas era más homogéneo entre clones, ya que se había perdido gran parte de la influencia del primer año de vivero. Sin embargo, durante el segundo año, las plantas usadas eran de una savia, por lo que podrían aún estar condicionadas por algunas diferencias (como la comentada del contenido en N foliar) derivadas del proceso de estaquillado, enraizamiento y crecimiento durante esa etapa en el vivero.

En cuanto a la evolución temporal de la tolerancia al frío y para el conjunto de ensayos realizado, el grado de variación entre fechas de LT_{50} mostrado por todos clones fue muy pequeño, entre 1.0 y 2.2 °C, lo que significa que estos eucaliptos no poseen un alto grado de endurecimiento estimulado por la temperatura, como también ha ocurrido para *E. globulus* con endurecimiento estimulado por otro agente abiótico como el estrés hídrico (Coopman et al., 2010). Sin embargo, en especies de clima templado, de otros géneros distintos a *Eucalyptus*, la variación de LT_{50} durante el período frío puede llegar a superar los 7 °C (Fernández et al., 2008a; Pardos et al., 2014; Fernández-Pérez et al., 2018). Valores de LT_{50} similares a los de este estudio fueron registrados por Moraga et al. (2006) para tres subespecies de *Eucalyptus globulus* Labill.

En el intervalo de fechas que comprendió el experimento, el mes de enero resultó ser el más dañino para las hojas analizadas, seguido del mes de marzo, es decir, no siguiendo un patrón estacional fijo ascendente o descendente. Por tanto, la acumulación de horas de frío no se tradujo en un incremento de tolerancia al frío a lo largo del tiempo para estos clones ensayados. En consecuencia, la temperatura ambiental no actuó como un estímulo determinante que indujera variaciones significativas en la tolerancia al frío (LT_{50}), al contrario que ocurre para otras especies de climas templados (Becwar et al., 1981; Morin et al., 2007). Por otro lado, a pesar de que el análisis estadístico apuntó diferencias significativas entre las dos condiciones de exposición solar (plantas totalmente expuestas a la luz solar y bajo malla de sombreado), esas diferencias fueron mínimas en valor absoluto y no parece que dichas condiciones de cultivo influyeran en la diferenciación entre clones ni en la evolución temporal.

Fernández et al. (2008b) muestran que suele haber cierta discrepancia en cuanto al efecto que la fertilización con N puede tener sobre la tolerancia al frío. Nuestros datos muestran que, aunque la dosis de 252 mg de N dio el mejor valor

de tolerancia al frío, no difirió significativamente de la dosis de 5 mg, pero sí de la de 126 mg, puesto que esa última redujo la tolerancia al frío respecto a las dos anteriores. Ese efecto es contrapuesto al encontrado por Andivia et al. (2012) analizando dos procedencias de *Quercus ilex*, en el cual una mayor dosis (125 mg) mejoró siempre la tolerancia al frío de las plantas respecto a una dosis menor 6.25 mg. En nuestro ensayo, es posible que la interacción entre crecimiento y disponibilidad de nutrientes haya afectado a la tolerancia al frío, por efecto de dilución del N en los tejidos. Para las dosis menores, 0 y 5 mg de N, el crecimiento de las plantas se puede haber visto reducido aunque no anulado, por lo que sólo hay dilución en el que no aporta nada de N (0 mg); mientras que para las dosis altas, 126 y 252 mg de N, aunque las dos puedan activar el crecimiento la menor disponibilidad de N de la primera puede haber originado ese efecto de dilución. No obstante, como no se midió directamente el crecimiento por ser época fría, de crecimiento relativamente lento, y porque a las plantas se les iban arrancando hojas, esta afirmación es especulativa y no puede verse contrastada con datos.

Por otro lado, se apreció un comportamiento distinto entre clones en su respuesta al tratamiento de N, aunque con diferencias también muy pequeñas entre ellos en valor absoluto. Por ello, en el rango de concentraciones foliares de N, obtenido para todos los clones y fechas (0.9–1.8 %), el mayor contenido en N no se tradujo en una mayor tolerancia al frío, posiblemente, porque no han entrado en un estado de deficiencia importante (Fernández et al., 2007). Estos últimos autores citados, estudiando *E. globulus*, observaron que concentraciones foliares de N en el rango 1.3–1.6 % eran suficientes como para no suponer un impedimento en cuanto a la calidad de las plantas producidas y su respuesta en campo, pudiendo incluso enmascarar los efectos de otros nutrientes. En cambio, concentraciones por debajo de 1.0 % sí que limitaban la capacidad de crecimiento y de endurecimiento de las plantas. Con respecto a la relación de la concentración de N en los tejidos con LT_{50} , la ausencia de esta en este estudio también fue observada en el estudio de Gallino et al. (2007) con diferentes clones de *E. globulus*. Estos autores constataron que los clones más plásticos (esto es, con mayor variación estacional de LT_{50}) son los que alcanzaron el mayor grado de tolerancia, pero sin estar éste relacionado con las concentraciones de nutrientes minerales (N, K) en hojas o la acumulación de azúcares solubles.

Acerca de la fertilización con K, Gómez-Ruiz et al. (2016) observaron en especies tropicales de zonas áridas que la fertilización con potasio aumentaba la tolerancia a las heladas, principalmente en las hojas jóvenes. También, Jönsson et al. (2004) relataron, para zonas templado-frías, que los árboles de *Picea abies* con un estado relativamente bajo de K y P tenían una mayor sensibilidad a las heladas. Por el contrario, Garcia y De La Peña (2013), para *Eucalyptus grandis* en plantaciones, constataron que la fertilización de otoño con diferentes dosis de potasio y nitrógeno no afectaba a la resistencia de las plantas a las heladas. Una respuesta similar a este último estudio fue obtenida en el nuestro, en el cual la aplicación de distintos niveles de K no afectó a la tolerancia al frío. Eso demuestra que el comportamiento de los eucaliptos, al menos los aquí ensayados, se diferencia de especies de zonas templadas y templadas-frías. Asimismo, considerando la interacción $N \times K$, el daño visual experimentado en las hojas con tratamiento N_1K_1 fue superior a las sometidas al tratamiento $N_1K_{1/50}$, lo que nos hace pensar que, al igual que comentamos más arriba, debe haber efecto de dilución en el tratamiento N_1K_1 , originado por un mayor crecimiento de este tratamiento, dado que *Eucalyptus* es un género que optimiza su crecimiento aprovechando al máximo los nutrientes (Beadle y Sands, 2004) y diluyendo un poco sus concentraciones siempre que las condiciones ambientales lo permitan.

En cuanto a los azúcares solubles (SS), algunos estudios han demostrado un efecto positivo en la tolerancia al frío con el aumento de la concentración de SS en hojas en varias especies de *Eucalyptus* (Almeida et al., 1994; Travert et al., 1997), coníferas (Ögren et al., 1997; Tinus et al., 2000) y *Quercus* (Morin et al., 2007), aunque la relación entre SS y la tolerancia al frío varía de una especie a otra. Pese a que los clones HI y HG tuvieron una mayor concentración de SS y se mostraron como los clones de mayor tolerancia en algunos de los ensayos en términos de daño visual observado (VD), ésta no llegó a correlacionarse significativamente con LT_{50} para el conjunto de clones estudiados. Esto también es constatado por Andivia et al. (2012), analizando dos procedencias de *Quercus ilex*, en que los datos mostraron unas concentraciones y contenidos similares de SS entre los distintos tratamientos de fertilización con N ensayados, no presentando correlación con la tolerancia al frío. Todo ello podría indicar que deben participar, no solo SS sino otros mecanismos, tales como otros

carbohidratos, aminoácidos, solutos minerales, hormonas, proteínas, incluida la acumulación de lípidos en la resistencia global al frío (Larcher, 2006). En resumen, nuestros datos sugieren una diferente asimilación y/o acumulación de N, K y SS entre distintos clones, pero aspectos fisiológicos como la tolerancia al frío parecen depender de otros aspectos, incluidos los genéticos, por lo que sería conveniente profundizar en ello, analizando diferentes condiciones de cultivo y el efecto de la plasticidad intra- e inter-poblacional en este carácter fisiológico.

5.6 - CONCLUSIONES

Aunque se obtuvieron diferencias significativas entre clones y entre fechas para la tolerancia al frío, esas resultaron tan pequeñas en valor absoluto (en general menor de 2 °C de variación para LT_{50}) que resultó difícil diferenciar entre clones. Esto significa que estos eucaliptos no poseen un alto grado de endurecimiento estimulado por la temperatura. Aun así, se puede decir que el clon 12€ (*E. x urograndis*) fue el que presentó menor grado de tolerancia al frío, con una LT_{50} que varió entre -4.7 y -6.7 °C en el conjunto de ensayos realizados.

Los resultados demostraron cierta discrepancia en cuanto al efecto de la fertilización con N sobre la tolerancia al frío, ya que, aunque la mayor dosis aplicada (N_2 , 252 mg L⁻¹) de N mejoró dicha tolerancia, la dosis intermedia (N_1 , 126 mg L⁻¹) no mejoró respecto a la dosis baja (5 mg L⁻¹), incluso la empeoró, aunque la ausencia de fertilización nitrogenada (N_0 , 0 mg L⁻¹) mostró la tasa de tolerancia en el rango más bajo obtenido. En la misma dirección apuntó la interacción $N \times K$, cuya tolerancia disminuyó en el tratamiento N_1K_1 respecto al $N_1K_{1/50}$, lo que nos hace pensar que algunas situaciones, como el tratamiento N_1K_1 , debe haber disminuido la concentración de nutrientes en los tejidos por efecto de dilución por el crecimiento, o algún otro aspecto no identificado.

En lo que se refiere a las concentraciones foliares de N, no se constató un incremento significativo en las plantas fertilizadas con las dosis más elevadas de nitrógeno aplicadas, a pesar de aumentar a medida que avanzaba el período de ensayo (otoño-invierno). Además, no existió correlación entre LT_{50} y la concentración foliar de N en el rango de concentraciones obtenido, tampoco entre LT_{50} y la concentración foliar de azúcares solubles, a pesar de disminuir a medida que avanzaba el período de ensayo (otoño-invierno).



6. DISCUSIÓN GENERAL

En los clones de eucalipto del presente estudio, la mayor densidad de estomas tuvo lugar en las hojas desarrolladas en la época en que la disponibilidad hídrica en el suelo no era limitante. Esto posibilita un mayor número de puntos de intercambio gaseoso, facilitando la asimilación de CO₂ aún a costa de la salida del agua (Hérault et al., 2013; Bhusal et al., 2018; Haworth et al., 2018a). Sin embargo, en épocas de limitación de agua edáfica y mayor demanda atmosférica, la densidad estomática disminuyó, así como el tamaño de las células oclusivas y el área foliar específica (*SLA*), lo que posibilita que las plantas ahorren agua y resistan mejor los eventos de sequía. Las plantas, por tanto, respondieron a las variaciones de estímulos ambientales, como puede ser el fotoperíodo y la temperatura, ya que dispusieron en todo momento de buena disponibilidad hídrica en el sustrato. Estos estímulos regulan los procesos de morfogénesis, como el caso de los parámetros foliares citados anteriormente (Dai et al., 1992; Eksteen et al., 2013; Haworth et al., 2015). Sin embargo, no todos los clones tuvieron la misma respuesta a lo largo del año. Los clones de *E. globulus* y el clon HE tendieron a mantener la densidad estomática más homogénea (variación anual menor de 150 mm⁻²), mientras que la variación en los clones HG, HI y 12€ estuvo entre 160 mm⁻² y 300 mm⁻² por lo que estos últimos se comportaron más sensibles a los estímulos externos.

De la misma forma, el contenido hídrico relativo en el momento del cierre estomático (CHR_c) varió a lo largo del año, con valores más altos en primavera y verano. El clon HE se comportó como el menos conservador del agua, ya que permitía una mayor deshidratación antes de cerrar estomas, mientras que en el caso contrario estaría el clon HI. En cuanto al tiempo transcurrido hasta el cierre de los estomas (t_c), las hojas formadas en los períodos más secos cerraron sus estomas en la mitad de tiempo que las formadas en períodos más fríos y húmedos. Este comportamiento general mostrado para CHR_c y t_c evidencia, una vez más, estrategias de plasticidad a las condiciones ambientales para prevenir pérdidas excesivas de agua en meses más secos. En cuanto a la transpiración cuticular (E_c), también se observó variación estacional, siendo la tendencia general que las hojas crecidas durante la primavera fueron las que mostraron menor valor. Las diferencias entre clones se manifestaron, casi exclusivamente, para el clon HE, que mostró una estrategia menos eficiente de ahorro de agua (mayor E_c) que los demás y, por tanto, mayor permeabilidad de la epidermis foliar

(Andivia et al., 2012).

Respecto a la transpiración acumulada diaria (T_{LA}), más elevada en el verano y más reducida al final del otoño y el invierno, en coincidencia con los resultados obtenidos por otros autores (Eksteen et al., 2013; Fernández et al., 2015), responde a la mayor demanda atmosférica de la época estival. Fue en esta época estival cuando más se acentuaron las diferencias entre clones, con HE, C14 y 227 presentando mayores tasas de transpiración diaria que 12€, HG, 225, 358 y 437. En cuanto a la evolución de la transpiración a lo largo del día por intervalos horarios, medida en época estival, las diferencias entre clones no fueron tan significativas (Hatton et al., 1998), debido al alto efecto de los factores ambientales (radiación solar y temperatura, déficit en la presión de vapor el aire) en cada intervalo del día. En esta época, la tasa de transpiración varió entre 0.15 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ del intervalo predominantemente nocturno (18:30–06:30, hora solar) y 2.21 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ del intervalo 09:30–12:30. Cuando se aplicaron ciclos de riego-estrés hídrico, los clones 12€ y HE, ambos con algún parental de *Eucalyptus grandis*, presentaron una alta actividad transpiratoria mientras disponían de agua edáfica, lo que les permitió altas tasas de transpiración cuando el agua es abundante. No obstante, estos mismos clones arriesgaron, permitiendo una mayor deshidratación de sus tejidos a medida que disminuía el agua disponible antes de reducir su tasa de transpiración. El potencial hídrico del sustrato (Ψ_{ws}) explicó casi el 60 % de la variación de la transpiración diaria, debido a que T_{LA} es una cuantificación acumulada a lo largo de todo el día, durante el cual el Ψ_{ws} no varía excesivamente, pero sí lo hace el de la planta (Christina et al., 2017). Para $\Psi_{ws} < -0.8$ MPa el sustrato actuó como limitante y se obtuvieron siempre valores de T_{LA} inferiores a unos 1.3 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mientras que para $\Psi_{ws} > -0.8$ MPa T_{LA} no dependía de Ψ_{ws} . Por su parte, el umbral mínimo de potencial hídrico foliar (Ψ), medido justo al amanecer, limitante para T_{LA} se situó entre -1.2 y -1.4 MPa. Los únicos clones que mantuvieron altas tasas de transpiración diaria para $\Psi < -1.0$ MPa (entre -1.0 y -2.0 MPa) fueron HE, HG y 12€, mientras que los demás clones estudiados las redujeron antes de alcanzar el umbral de -1.2 MPa. Es decir, en el caso de las plantas bien regadas ($\Psi \geq -1.0$ MPa), las tasas máximas de transpiración fueron similares entre clones, pero los clones 100% de *E. globulus* y el clon HI mostraron un comportamiento de ahorro

de agua más acentuado en condiciones de estrés hídrico moderado. Además, en este rango de Ψ (-1.0 a -2.0 MPa), la tasa fotosintética (A) se redujo en mayor medida que la tasa de transpiración (E) y que la conductancia estomática, para los tres clones con algún parental de *E. grandis* (HE, HG y 12€), por lo que la eficiencia en el uso del agua se vio disminuida en estos tres clones en mayor medida que para los clones 100% de *E. globulus*.

Se observó una gran variabilidad entre clones en la densidad de vasos xilemáticos en los tres órganos (raíces, ramillos y tallos). En general, los clones de *E. globulus* presentaron vasos con menor diámetro que los otros clones, en especial que 12€, HE y HI, más acentuada esta diferencia en el caso de la raíz. Este menor diámetro en los clones de *E. globulus* sería indicativo de una menor vulnerabilidad a la cavitación (Venturas et al., 2014), por lo que se les podría atribuir una estrategia de resistencia a sequía (Rodríguez-Calcerrada et al., 2017), siendo éstos los mismos clones monoespecíficos que presentaron baja densidad estomática. Referente a la conductancia hidráulica xilemática, en términos generales, los clones monoespecíficos de *E. globulus* mostraron valores más bajos que los clones de híbridos estudiados, debido al menor diámetro de los vasos y, posiblemente, mayor resistencia al flujo de agua (Lens et al., 2011), que no fue compensado por la mayor densidad de vasos. Este menor diámetro puede comprometer el flujo de savia y el crecimiento, así como la rehidratación tras períodos de sequía, pero supone una garantía de supervivencia durante estos últimos (Rodríguez-Calcerrada et al., 2017).

De los parámetros derivados de la construcción de curvas de *presión-volumen*, podemos destacar que solamente se diferenciaron significativamente aquellos clones que presentaron los valores más extremos, para cada parámetro. Entre los nueve clones, el clon HG se manifestó como: de paredes celulares más rígidas, por su mayor módulo de elasticidad (Pita y Pardos, 2001; Bulfe y Fernández, 2014); de bajo potencial osmótico (Ψ_{s100} y Ψ_{s0}) lo que le permitiría mantener la turgencia a potenciales hídricos más negativos; a la vez que un alto CHR_0 que le hace perder la turgencia celular a mayor grado de deshidratación. En cuanto al ajuste del componente osmótico, en el ensayo realizado solo se manifestó significativo para HE, HG y HI. Esto indica que dichos clones, de alta actividad transpiratoria (al menos los dos primeros), han sido más eficientes, sensibles o rápidos que los demás en realizar ajuste osmótico, ya que

E. globulus también es capaz de llevarlo a cabo (Pita y Pardos, 2001; Callister et al., 2008).

Visto el comportamiento de todos los parámetros morfo-fisiológicos arriba indicados, las diferencias entre clones respecto a la resistencia al estrés hídrico o la eficiencia en el uso del agua no parece estar ligada a los valores absolutos de cada uno de ellos, como el componente osmótico celular (Ψ_{s100} , Ψ_{s0}), la densidad o el tamaño de los estomas, la conductancia hidráulica específica del xilema o la transpiración acumulada diaria (T_{LA}). Altas tasas de transpiración pueden favorecer el crecimiento en épocas de buena disponibilidad de agua, pero deben estar acompañadas de medidas de seguridad durante épocas de escasez. Esto parece estar compensado en los clones 100% de *E. globulus*, especialmente en C14, pero los clones de híbridos aquí considerados no presentan las mismas estrategias en todos los parámetros considerados.

Por otro lado, en cuanto a la tolerancia al frío, todos los clones analizados se movieron en un rango muy estrecho de temperatura. En menos de 3 °C se pudo pasar de la tolerancia total a daño total. Aun así, el clon que se mostró más susceptible al frío fue el 12€, quizás debido a ser un de *E. x urograndis* que, a pesar de poseer variabilidad genética para tolerancia al frío, su susceptibilidad suele ser mayor comparada con otras especies tales como *E. globulus*, *E. maidenii* y *E. dunnii* (Flores et al., 2016). Las diferencias encontradas no pudieron explicarse por el contenido en N, porque el rango de concentración no alcanzó un estado de deficiencia importante (Fernández et al., 2007). Tampoco por el contenido en azúcares solubles (SS) que no llegó a correlacionarse significativamente con LT_{50} para el conjunto de clones estudiados, pese a que los clones HI y HG tuvieron una mayor concentración de SS y se mostraron como los clones de mayor tolerancia en algunos de los ensayos. En cuanto a la evolución temporal de la tolerancia al frío, el estrecho grado de variación entre fechas (1.0 y 2.2 °C) indica que estos eucaliptos no poseen un alto grado de endurecimiento estimulado por la temperatura, como también ha ocurrido para *E. globulus* con endurecimiento estimulado por otro agente abiótico como el estrés hídrico (Moraga et al., 2006; Coopman et al., 2010), al contrario que otros géneros vegetales distintos a *Eucalyptus* (Fernández et al., 2008a; Fernández-Pérez et al., 2018). En resumen, nuestros datos sugieren una diferente asimilación y/o acumulación de N, K y SS entre distintos clones, pero aspectos

fisiológicos como la tolerancia al frío parecen estar correlacionados, además, con otros aspectos tales como otros carbohidratos, aminoácidos, solutos minerales, proteínas, lípidos, así como aspectos genéticos y anatómico-morfológicos (Larcher, 2006; Jankowski et al., 2017).



7. CONCLUSIONES

- Las plantas mostraron variación estacional en cuanto a densidad y tamaño de los estomas, área foliar específica, transpiración cuticular, contenido hídrico relativo y tiempo transcurrido hasta el cierre de los estomas a medida que se deshidrata la hoja, transpiración diaria, así como en el crecimiento en diámetro en condiciones variables de humedad del sustrato. Ello evidencia que responden a estímulos como la radiación luminosa, la temperatura y/o la demanda evaporativa del aire que condicionan estos parámetros durante el desarrollo de las hojas, para ajustarse a las condiciones ambientales de cada época del año y optimizar el uso del agua.
- En las condiciones ensayadas, el potencial hídrico del sustrato explicó casi el 60 % de la variación de la transpiración diaria, reduciéndose ésta cuando el estrés hídrico aumentaba. La tasa de transpiración diaria fue independiente del potencial hídrico foliar hasta que éste bajó a -1.2 o -1.4 MPa, en función del clon, reduciéndose considerablemente a partir de dicho umbral.
- Considerando la evolución de la transpiración a lo largo del día, en intervalos horarios, la mayor tasa de transpiración se obtuvo en el intervalo 09:30–12:30 (hora solar), debido posiblemente a la combinación de elevada radiación luminosa y temperatura con un alto potencial hídrico foliar, lo que demuestra una vez más su sensibilidad y capacidad de reacción a las variables meteorológicas.
- En cuanto a la densidad y tamaño de los vasos xilemáticos, se apreció que hay variabilidad genética en los clones estudiados y que, además, los individuos modifican estos parámetros durante el año para acomodarse a las condiciones ambientales, lo que proporciona información para ser incorporada a los programas de selección y mejora genética. En general, la diferencia entre los clones de *E. globulus*, que presentaron mayor densidad de vasos pero éstos más delgados, y los híbridos fue más acusada en los vasos de las raíces que en los de los tallos.
- Referente a la conductancia hidráulica xilemática y a los parámetros derivados de las curvas presión-volumen, en términos generales, los clones monoespecíficos de *E. globulus* mostraron valores más bajos de

conductancia hidráulica y menor ajuste osmótico en respuesta al estrés hídrico inducido que los clones de híbridos estudiados. Por un lado, los resultados sugieren que existe variabilidad en la vulnerabilidad a la cavitación del xilema de ramas entre los clones analizados, pero por otro lado no está claro si ésta menor sensibilidad en el ajuste osmótico constituye una estrategia predominante en *Eucalyptus* como adaptación al estrés hídrico, que ambos deben explorarse más profundamente en futuros estudios.

- Las pequeñas variaciones en valor absoluto, aunque estadísticamente significativas, entre clones y entre fechas para la tolerancia al frío (en general menor de 2 °C de variación para LT_{50}), indican que estos eucaliptos no poseen un alto grado de endurecimiento estimulado por la temperatura y que nos deja un margen muy estrecho a la hora de clasificarlos por este carácter.
- Aunque la tendencia es que a mayor dosis de N, aplicada durante la fertilización, mejora la tolerancia al frío, ésta última también puede haber sido afectada por la interacción con el crecimiento y afectar a dicha tolerancia, por efecto de dilución. En la misma dirección la interacción de N con K afectó al grado de tolerancia al frío más que cada factor por separado. Todo ello, unido a la falta de correlación entre LT_{50} y la concentración foliar de N o de azúcares solubles en el rango de concentraciones obtenido, hace pensar que la tolerancia al frío en estos clones depende varios factores, algunos de ellos no identificados en este estudio.



8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A**BARES. (2016). *Australian forest profiles: Australia's forests*. Canberra: Australian Bureau of Agricultural and Resource Economics and Sciences. 5 p. Disponible en: http://www.agriculture.gov.au/abares/forestsaustralia/PublishingImages/Forest%20profiles%202016/Eucalypt/AusForProf_2016_Eucalypt_v1.0.0.pdf
- Akaike, H. (1974). A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 19(6): 716–723.
- Albaugh, J.M., Dye, P.J., King, J.S. (2013). *Eucalyptus* and water use in South Africa. *International Journal of Forestry Research*, Art. ID 852540, 11 pages.
- Alcorn, P.J., Forrester, D.I., Smith, R.G.B., Thomas, D.S., James, R.N., Nicotra, A.B., Bausch, J. (2013). Crown structure and vertical foliage distribution in 4-year-old plantation-grown *Eucalyptus pilularis* and *Eucalyptus cloeziana*. *Trees-Structure and Function*, 27: 555–566.
- Alfenas, A.C., Zauza, E.A.V., Mafia, R.G., Assis, T.F. (2009). *Clonagem e doenças do eucalipto*. Viçosa: Editora UFV. 500 p. ISBN: 9788572962410.
- Ali, I., Abbas, S.Q., Hameed, M., Naz, N., Zafar, S., Kanwal, S. (2009). Leaf Anatomical Adaptations in Some Exotic Species of *Eucalyptus* L'Hér. (Myrtaceae). *Pakistan Journal of Botany*, 41(6): 2717–2727.
- Almeida, A.C., Soares, J.V., Landsberg J.J., Rezende, G.D. (2007) Growth and water balance of *Eucalyptus grandis* hybrid plantations in Brazil during a rotation for pulp production. *Forest Ecology and Management*, 251(1): 10–21.
- Almeida, A.C., Smethurst, P.J., Siggins, A., Cavalcante, R.B.L., Borges, N.J. (2016). Quantifying the effects of *Eucalyptus* plantations and management on water resources at plot and catchment scales. *Hydrological Processes*, 30: 4687–4703.
- Almeida, M.H., Chaves, M.M., Silva, J.C. (1994). Cold acclimation in eucalypt hybrids. *Tree Physiology*, 14: 921–932.
- Anderegg, W.R.L., Wolf, A., Arango-Velez, A., Choat, B., Chmura, D.J., Jansen, S., Kolb, T., Li, S., Meinzer, F.C., Pita, P., Resco de Dios, V., Sperry, J.S., Wolfe, B.T., Pacala, S. (2017) Plant water potential improves prediction of empirical stomatal models. *PLoS ONE*, 12(10): e0185481.

- Anderegg, W.R.L., Wolf, A., Arango-Velez, A., Choat, B., Chmura, D.J., Jansen, S., Kolb, T., Li, S., Meinzer, F.C., Pita, P., Resco de Dios, V., Sperry, J.S., Wolfe, B.T., Pacala, S. (2018) Woody plants optimise stomatal behaviour relative to hydraulic risk. *Ecology Letters*, 21: 968–977.
- Andivia, E., Carevic, F., Fernández, M., Alejano, R., Vázquez-Piqué, J., Tapias, R. (2012). Seasonal evolution of water status after outplanting of two provenances of holm oak nursery seedlings. *New Forests*, 43: 815–824.
- Andivia, E., Fernández, M., Vázquez-Piqué, J., Alejano, R. (2012). Two provenances of *Quercus ilex* ssp. *ballota* (Desf) Samp. nursery seedlings have different response to frost tolerance and autumn fertilization. *European Journal of Forest Research*, 131: 1091–1101.
- Andivia, E., Fernández, M., Alaejos, J., Tapias, R. (2013). Consumo de agua de distintas especies leñosas utilizables como cultivos energéticos. En: Sociedad Española de Ciencias Forestales, Actas VI Congreso Forestal Español. Vitoria, España. Documento 6CFE01–122.
- Andivia, E., Fernández, M., Vázquez-Piqué, J. (2014). Assessing the effect of late-season fertilization on Holm oak plant quality: Insights from morpho-nutritional characterizations and water relations parameters. *New Forests*, 45: 149–163.
- Araus, J.L., Alegre, L., Tapia, L., Calafell, R., Serret, M.D. (1986). Relationship between photosynthetic capacity and leaf structure in several shade plants. *American Journal of Botany*, 73(12): 1760–1770.
- Aspinwall, M.J., Drake, J.E., Company, C., Vårhammar, A., Ghannoum, O., Tissue, D.T., Reich, P.B., Tjoelker, M.G. (2016). Convergent acclimation of leaf photosynthesis and respiration to prevailing ambient temperatures under current and warmer climates in *Eucalyptus tereticornis*. *New Phytologist*, 212: 354–367.
- Assis, T.F., Bauer, J.F.S., Tafarel, G. (1993). Sintetização de híbridos de *Eucalyptus* por cruzamentos controlados. *Ciência Florestal*, 3(1): 161–170.
- B**ahaji, A., Mateu, I., Sanz, A., Cornejo, M.J. (2002). Common and distinctive responses of rice seedlings to saline- and osmotically-generated stress. *Plant Growth Regulation*, 38: 83–94.

- Barotto, A.J., Fernandez, M.E., Gyenge, J., Meyra, A., Martinez-Meier, A., Monteoliva, S. (2016). First insights into the functional role of vasicentric tracheids and parenchyma in eucalyptus species with solitary vessels: do they contribute to xylem efficiency or safety? *Tree Physiology*, 36: 1485–1497.
- Barotto, A.J., Monteoliva, S., Gyenge, J., Martinez-Meier, A., Moreno, K., Tesón, N., Fernández, M.E. (2017). Wood density and anatomy of three *Eucalyptus* species: implications on hydraulic conductivity. *Forest Systems*, 26(1): 1–11.
- Barotto, A.J., Monteoliva, S., Gyenge, J., Martinez-Meier, A., Fernandez, M.E. (2018). Functional relationships between wood structure and vulnerability to xylem cavitation in races of *Eucalyptus globulus* differing in wood density. *Tree Physiology*, 38: 243–251.
- Battie-Laclau, P., Laclau, J-P., Piccolo, M. de C., Arenque, B.C., Beri, C., Mietton, L., Muniz, M.R.A., Jordan-Meille, L., Buckeridge, M.S., Nouvellon, Y., Ranger, J., Bouillet, J-P. (2013). Influence of potassium and sodium nutrition on leaf area components in *Eucalyptus grandis* trees. *Plant Soil*, 371: 19–35.
- Beadle, C., Sands, P. (2004). Synthesis of the physiological, environmental, genetic and silvicultural determinants of the growth and productivity of eucalypts in plantations. *Forest Ecology and Management*, 193: 1–3.
- Becwar, M.R., Rajashekar, C., Bristow, K.J.H., Burke, M.J. (1981). Deep undercooling of tissue water and winter hardiness limitations in timberline flora. *Plant Physiology*, 68: 111–114.
- Beltrame, R., Bisognin, D.A., Mattos, B.D., Cargnelutti Filho, A., Haselein, C.R., Gatto, D.A., Santos, G.A. (2012). Desempenho silvicultural e seleção precoce de clones de híbridos de eucalipto. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47(6): 791–796.
- Benin, C.C., Wionzek, F.B., Watzlawick, L.F. (2014). Initial assessments on the plantation of *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage deployed in different spacing. *Applied Research & Agrotechnology*, 7(1): 55–61.
- Berger, R., Schneider, P.R., Finger, C.A.G., Haselein, C.R. (2002). Efeito do espaçamento e da adubação no crescimento de um clone de *Eucalyptus saligna* Smith. *Ciência Florestal*, 12(2): 75–87.

- Bhusal, N., Bhusal, S.J., Yoon, T.M. (2018). Comparisons of physiological and anatomical characteristics between two cultivars in bi-leader apple trees (*Malus x domestica* Borkh.). *Scientia Horticulturae*, 231: 73–81.
- Bhusal, N., Han, S.G., Yoon, T.M. (2019). Impact of drought stress on photosynthetic response, leaf water potential, and stem sap flow in two cultivars of bi-leader apple trees (*Malus x domestica* Borkh.). *Scientia Horticulturae*, 246: 535–543.
- Bogeat-Triboulot, M.B., Levy, G. (1998). Contribution of different solutes to the cell osmotic pressure in tap and lateral roots of maritime pine seedlings: effects of a potassium deficiency and of an all-macronutrient deficiency. *Annals of Forest Science*, 55: 315–327.
- Boland, D.J., Brooker, M.I.H., Chippendale, G.M., Hall, N., Hyland, B.P.M., Johnston, R.D., Kleinig, D.A., McDonald, M.W., Turner, J.D. (2006). *Forest Trees of Australia*. Collingwood: CSIRO Publishing. 768 p. ISBN: 9780643069701.
- Bortoletto Júnior, G. (2003). Produção de compensados com 11 espécies do gênero *Eucalyptus*, avaliação das suas propriedades físico-mecânicas e indicações para utilização. *Scientia Forestalis*, 63: 65–78.
- Bouvet, J.M., Vigneron, P. (1996). Variance structure in *Eucalyptus* hybrid populations. *Silvae Genetica*, 45: 171–177.
- Bouvet, A., Nguyen-The, N., Melun, F. (2013). Nutrient concentration and allometric models for hybrid eucalyptus planted in France. *Annals of Forest Science*, 70: 251–260.
- Bowers, M.C. (1994). *Environmental effects of cold on plants*. En: Wilkinson, R.E. (eds) *Plant–Environment Interactions*. New York: Marcel Dekker, pp. 391–411. ISBN: 9780824789404.
- Bulfe, N., Fernandez, M.E. (2014). Efecto del momento de ocurrencia del déficit hídrico sobre el crecimiento de plantines de *Pinus taeda* L. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 113(1): 81–93.
- Bussis, D., Von Groll, U., Fisahn, J., Altman, T. (2006). Stomatal aperture can compensate altered stomatal density in *Arabidopsis thaliana* at growth light conditions. *Functional Plant Biology*, 33: 1037–1043.

- C**allister, A.N., Arndt, S.K., Ades, P.K., Merchant, A., Rowell, D., Adams, M.A. (2008). Leaf osmotic potential of *Eucalyptus* hybrids responds differently to freezing and drought, with little clonal variation. *Tree Physiology*, 28: 1297–1304.
- Camargo, M.A.B., Marengo, R.A. (2011). Density, size and distribution of stomata in 35 rainforest trees species in Central Amazonia. *Acta Amazonica*, 41(2): 205–212.
- Canny, M.J., Huang, C.X. (2006). Leaf water content and palisade cell size. *New Phytologist*, 170(1): 75–85.
- Carevic, F., Fernández, M., Alejano, R., Vázquez-Piqué, J., Tapias, R., Corral, E., Domingo, J. (2010). Plant water relations and edaphoclimatic conditions affecting acorn production in a holm oak (*Quercus ilex* L. ssp. *ballota*) open woodland. *Agroforestry Systems*, 78(3): 299–308.
- Carevic, F., Fernández, M., Alejano, R., Vázquez-Piqué, J. (2014). Xylem cavitation affects the recovery of plant water status and consequently acorn production in a holm oak open woodland. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36: 3283–3290.
- Carins Murphy, M.R., Jordan, G.J., Brodribb, T.J. (2014). Acclimation to humidity modifies the link between leaf size and the density of veins and stomata. *Plant, Cell & Environment*, 37: 124–131.
- Caron, B.O., Souza, V.Q., Eloy, E., Behling, A., Schmidt, D., Trevisan, R. (2011). Resistência inicial de quatro espécies arbóreas em diferentes espaçamentos após ocorrência de geadas. *Ciência Rural*, 41(5): 817–822.
- Carrillo, I, Valenzuela, S., Elissetche, J.P. (2017). Comparative evaluation of *Eucalyptus globulus* and *E. nitens* wood and fibre quality. *IAWA Journal*, 38(1): 105–116.
- Charrier, G., Ngao, J., Saudreau, M., Améglio, T. (2015). Effects of environmental factors and management practices on microclimate, winter physiology, and frost resistance in trees. *Frontiers in Plant Science*, 6: 259.
- Chaves, J.H., Reis, G.G., Reis, M.G.F., Neves, J.C.L., Pezzopane, J.E.M., Polli, H.Q. (2004). Seleção precoce de eucalipto para ambientes com disponibilidade diferenciada de água no solo: relações hídricas de plantas em tubetes. *Revista Árvore*, 28(3): 333–341.

- Christina, M., Nouvellon, Y., Laclau, J.P., Stape, J.L., Bouillet, J.P., Lambais, G.R., le Maire, G. (2017). Importance of deep water uptake in tropical eucalypt forest. *Functional Ecology*, 31, 509–519.
- Coopman, R.E., Jara, J.C., Escobar, R., Corcuera, L.J., Bravo, L.A. (2010). Genotypic variation in morphology and freezing resistance of *Eucalyptus globulus* seedlings subjected to drought hardening in nursery. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(1): 1–9.
- Corcuera, L. (2003). Comparación de dos métodos para generar curvas presión-volumen en especies del género *Quercus*. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales*, 12: 111–121.
- Correia, B., Pintó-Marijuan, M., Neves, L., Brossa, R., Dias, M.C., Costa, A., Castro, B.B., Araújo, C., Santos, C., Chaves, M.M., Pinto, G. (2014) Water stress and recovery in the performance of two *Eucalyptus globulus* clones: physiological and biochemical profiles. *Physiologia Plantarum*, 150(4): 580–592.
- Costa e Silva, F., Shvaleva, A., Broetto, F., Ortuño, M.F., Rodrigues, M.L., Almeida, M.H., Chaves, M.M., Pereira, J.S. (2008). Acclimation to short-term low temperatures in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought resistance. *Tree Physiology*, 29(1): 77–86.
- Cunningham, S.C., Read, J. (2006). Foliar temperature tolerance of temperate and tropical evergreen rain forest trees of Australia. *Tree physiology*, 26: 1435–1443.
- D**ai, Z., Edwards, G.E., Ku, M.S.B. (1992). Control of photosynthesis and stomatal conductance in *Ricinus communis* L. (castor bean) by leaf to air vapor pressure deficit. *Plant Physiology*, 1992, 99: 1426–1434.
- Daley, M.J., Phillips, N.G. (2006). Interspecific variation in nighttime transpiration and stomatal conductance in a mixed New England deciduous forest. *Tree Physiology*, 26(4): 411–419.
- Davis, J.E., Arkebauer, T.J., Norman, J.M., Brandle, J.R. (1987). Rapid measurement of the assimilation rate versus internal CO₂ concentration relationship in green ash (*Fraxinus pennsylvanica* Marsh): the influence of light intensity. *Tree Physiology*, 3: 387–392.

- De Schepper, V., van Dusschoten, D., Copini, P., Jahnke, S., Steppe, K. (2012). MRI links stem water content to stem diameter variations in transpiring trees. *Journal of Experimental Botany*, 63(7): 2645–2653.
- Díaz-Varela, R.A., de la Rosa, R., León, L., Zarco-Tejada, P.J. (2015). High-Resolution Airborne UAV Imagery to Assess Olive Tree Crown Parameters Using 3D Photo Reconstruction: Application in Breeding Trials. *Remote Sensing*, 7(4): 4213–4232.
- Dickinson, G.R., Wallace, H.M., Lee, D.J. (2013). Reciprocal and advanced generation hybrids between *Corymbia citriodora* and *C. torelliana*: Forestry breeding and the risk of gene flow. *Annals of Forest Science*, 70(1): 1–10.
- Doody, T. M., Colloff, M. J., Davies, M., Koul, V., Benyon, R. G., Nagler, P. L. (2015). Quantifying water requirements of riparian river red gum (*Eucalyptus camaldulensis*) in the Murray-Darling Basin, Australia – implications for the management of environmental flows. *Ecohydrology*, 8: 1471–1487.
- Downes, G., Beadle, C., Worledge, D. (1999). Daily stem growth patterns in irrigated *Eucalyptus globulus* and *E. nitens* in relation to climate. *Trees*, 14: 102–111.
- Drake, P.L., Froend, R.H., Franks, P.J. (2013). Smaller, faster stomata: Scaling of stomatal size, rate of response, and stomatal conductance. *Journal of Experimental Botany*, 64(2): 495–505.
- Dukku, U.H. (2011). *Eucalyptus torelliana*: An important naturalized bee plant in northern Nigeria. *Bee World*, 88(1): 16–17.

Eamus, D., Taylor, D.T., Macinnis-Ng, C.M., Shanahan, S., De Silva, L. (2008). Comparing model predictions and experimental data for the response of stomatal conductance and guard cell turgor to manipulations of cuticular conductance, leaf-to-air vapour pressure difference and temperature: feedback mechanisms are able to account for all observations. *Plant, Cell and Environment*, 31(3): 269–277.

- Eksteen, A.B., Grzeskowiak, V., Jones, N.B., Pammenter, N.W. (2013). Stomatal characteristics of *Eucalyptus grandis* clonal hybrids in response to water stress. *Southern Forests: a Journal of Forest Science*, 75(3): 105–111.
- Eldridge, K., Davidson, J., Harwood, C., van Wyk, G. (1993). *Eucalypt Domestication and Breeding*. Oxford: Clarendon Press. 308 p. ISBN: 9780198548669.

Elliott-Kingston, C., Haworth, M., Yearsley, J.M., Batke, S.P., Lawson, T., McElwain, J.C. (2016). Does size matter? Atmospheric CO₂ may be a stronger driver of stomatal closing rate than stomatal size in taxa that diversified under low CO₂. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1253.

FAO. (1981). *El Eucalipto en la repoblación forestal*. Roma: FAO. 723 p. ISBN 92-5-300570-X. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-ac459s.pdf>

FAO. (2016). *El Estado de los bosques del mundo 2016. Los bosques y la agricultura: desafíos y oportunidades en relación con el uso de la tierra*. Roma: FAO. 119 p. ISBN 978-92-5-309208-6. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i5588s.pdf>

Fernández, M., Royo, A., Gil, L., Pardos, J.A. (2003) Effects of temperature on growth and stress hardening development of phytotron-grown seedlings of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.). *Annals of Forest Science*, 60(3): 277–284.

Fernández, M., Marcos, C., Tapias, R., Ruiz, F., Lopez, G. (2007). Nursery fertilisation affects the frost-tolerance and plant quality of *Eucalyptus globulus* Labill. cuttings. *Annals of Forest Science*, 64(8): 865–873.

Fernández, M., Alejano, R., Dominguez, L., Tapias, R. (2008a). Temperature controls cold hardening more effectively than photoperiod in four Mediterranean broadleaf evergreen species. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*, 2(1): 43–49.

Fernández, M. (2008b). Endurecimiento en vivero de especies leñosas mediterráneas destinadas a plantación forestal. *Cuadernos De La Sociedad Española De Ciencias Forestales*, 28: 13–24.

Fernández, M., Tapias, R., Alesso, P. (2010). Adaptación a la sequía y necesidades hídricas de *Eucalyptus globulus* Labill. en Huelva. *Boletín del CIDEU*, 8: 31–41.

Fernández, M., García-Albalá, J., Andivia, E., Alaejos, J., Tapias, R., Menéndez, J. (2015). Sickie bush (*Dichrostachys cinerea* L.) field performance and physical-chemical property assessment for energy purposes. *Biomass and Bioenergy*, 81: 483–489.

Fernández, M., Alaejos, J., Andivia, E., Vázquez-Piqué, J., Ruiz, F., López, F., Tapias, R. (2018). *Eucalyptus x urograndis* biomass production for energy purposes exposed to a Mediterranean climate under different irrigation and fertilisation regimes. *Biomass and Bioenergy*, 111: 22–30.

- Fernández, M.R., Valenzuela, S.A., Balocchi, C.L. (2006). RAPD and freezing resistance in *Eucalyptus globulus*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(3): 303–309.
- Fernández-Pérez, L., Villar-Salvador, P., Martínez-Vilalta, J., Toca, A., Zavala, M.A. (2018). Distribution of pines in the Iberian Peninsula agrees with species differences in foliage frost tolerance, not with vulnerability to freezing-induced xylem embolism. *Tree Physiology*, 34(4): 507–516.
- Ferreira, M., Simões, J.W., Scanavaca Júnior, L., Teles, P.E. dos S. (1992). *Teste de populações de Eucalyptus phaeotricha Blakely & McKie em Anhembi, SP*. Piracicaba: Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais. 18 p.
- Flores, T.B., Alvares, C.A., Souza, V.C., Stape, J.L. (2016). *Eucalyptus no Brasil – Zoneamento climático e guia para identificação*. Piracicaba: Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais - IPEF. 447 p. ISBN 978-85-89142-07-6.
- Fonseca, S.M., Resende, M.D.V., Alfnas, A.C., Guimarães, L.M.S., Assis, T.F., Grattapaglia, D. (2010). *Manual práctico de melhoramento genético do eucalipto*. Viçosa: Editora UFV. 200 p. ISBN: 978-85-87692-83-2.
- Franks, P.J., Drake, P.L., Beerling, D.J. (2009). Plasticity in maximum stomatal conductance constrained by negative correlation between stomatal size and density: an analysis using *Eucalyptus globulus*. *Plant, Cell & Environment*, 32(12): 1737–1748.
- G**allino, J.P., Fernández, M., Tapias, R., Alcuña, M.M., Cañas, I. (2007) Aclimatación al frío en diferentes clones de *Eucalyptus globulus* Labill durante el régimen natural de endurecimiento. *Boletín del CIDEU*, 4: 77–83.
- García-Mata, C., Lamattina, L. (2001). Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiology*, 126(3): 1196–1204.
- García, M. de los Á., De La Peña, C. (2013). Respuesta a la fertilización de otoño en plantaciones de eucalipto en Entre Ríos. *Revista de Ciencias Forestales – Quebracho*, 21(1,2): 16–25.
- Gaulton, R., Danson, F.M., Ramirez, F.A., Gunawan, O. (2013). The potential of dual-wavelength laser scanning for estimating vegetation moisture content. *Remote Sensing of Environment*, 132: 32–39.

- Gerardin, T., Douthe, C., Flexas, J., Brendel, O. (2018). Shade and drought growth conditions strongly impact dynamic responses of stomata to variations in irradiance in *Nicotiana tabacum*. *Environmental and Experimental Botany*, 153: 188–197.
- Gharun, M., Turnbull, T.L., Adams, M.A. (2013). Validation of canopy transpiration in a mixed-species foothill eucalypt forest using a soil-plant-atmosphere model. *Journal of Hydrology*, 492: 219–227.
- Gharun, M., Turnbull, T.L., Pfautsch, S., Adams, M.A. (2015). Stomatal structure and physiology do not explain differences in water use among montane eucalypts. *Oecologia*, 177(4): 1171–1181.
- Givnish, T.J., (1988). Adaptation to Sun and Shade: a whole-plant perspective. *Australian Journal of Plant Physiology*, 15: 63–92.
- Golfari, L., Caser, R.L., Moura, V.P.G. (1978). Zoneamento ecológico esquemático para reflorestamento no Brasil (2ª aproximação). Belo Horizonte: Centro de Pesquisa Florestal da Região do Cerrado. 66 p. (PRODEPEF. Série Técnica, 11).
- Gómez-Ruiz, P.A., Lindig-Cisneros, R., de la Barrera, E., Martorell, C. (2016). Potassium enhances frost tolerance in young individuals of three tropical dry forest species from Mexico. *Functional Plant Biology*, 43: 461–467.
- Gomide, J.L., Fantuzzi Neto, H., Regazzi, A.J. (2010). Análise de critérios de qualidade da madeira de eucalipto para produção de celulose Kraft. *Revista Árvore*, 34(2): 339–344.
- Gonçalves, F.M.A., Rezende, G.D.S.P., Bertolucci, F.L.G, Ramalho, M.A.P. (2001). Progresso genético por meio da seleção de clones de eucalipto em plantios comerciais. *Revista Árvore*, 25(3): 295–301.
- Gonçalves, J.L.D., Alvares, C.A., Higa, A.R., Silva, L.D., Alfenas, A.C., Stahl, J., Ferraz, S.F.D., Lima, W.D.P., Brancalion, P.H.S., Hubner, A., Bouillet, J.P.D., Laclau, J.P., Nouvellon, Y., Epron, D. (2013). Integrating genetic and silvicultural strategies to minimize abiotic and biotic constraints in Brazilian eucalypt plantations. *Forest Ecology and Management*, 301: 6–27.
- Gonçalves, J.L.M., Alvares, C.A., Rocha, J.H.T., Brandani, C.B., Hakamada, R. (2017). Eucalypt plantation management in regions with water stress. *Southern Forests: a Journal of Forest Science*, 79(3): 169–183.

- González-García, M., Hevia, A., Majada, J., Barrio-Anta, M. (2013). Above-ground biomass estimation at tree and stand level for short rotation plantations of *Eucalyptus nitens* (Deane & Maiden) Maiden in Northwest Spain. *Biomass and Bioenergy*, 54: 147–157.
- Greaves, B.L., Borralho, N.M.G., Raymond, C.A. (1997). Breeding objectives for plantation eucalypts grown for production of kraft pulp. *Forest Science*, 43:465–472.
- Griffin, A.R. (2014). Clones or improved seedlings of *Eucalyptus*? Not a simple choice. *International Forestry Review*, 16(2): 216–224.
- Guarnaschelli, A., Mantese, A.I., Battaglia, A. (2009). Cambios anatómicos y morfológicos en plántulas de *Eucalyptus* sp. en respuesta a diferentes niveles de luz. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 44(3-4): 273–285.
- Guo, Z., Tan, J., Zhuo, C., Wang, C., Xiang, B., Wang, Z. (2014). Abscisic acid, H₂O₂ and nitric oxide interactions mediated cold-induced S-adenosylmethionine synthetase in *Medicago sativa* subsp. *falcata* that confers cold tolerance through up-regulating polyamine oxidation. *Plant Biotechnology Journal*, 12(5): 601–612.
- Gusta, L.V., Wisniewskib, M. (2013). Understanding plant cold hardiness: an opinion. *Physiologia Plantarum*, 147: 4–14.
- Gyenge, J., Fernandez, M.E., Sarasola, M., Schlichter, T. (2008). Testing a hypothesis of the relationship between productivity and water use efficiency in Patagonian forests with native and exotic species. *Forest Ecology and Management*, 255: 3281–3287.
- H**an, Q., Kang, G., Guo, T. (2013). Proteomic analysis of spring freeze-stress responsive proteins in leaves of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 63: 236–244.
- Harfouche, A., Meilan, R., Altman, A. (2014). Molecular and physiological responses to abiotic stress in forest trees and their relevance to tree improvement. *Tree Physiology*, 34(11): 1181–1198.
- Hart, P.W., Santos, R.B. (2015). Changing the face of short fiber – a review of the eucalyptus revolution. *Tappi Journal*, 14(6): 353–359.

- Harwood, C.E. (1980). Frost resistance of subalpine *Eucalyptus* species. I. Experiments using a radiation frost room. *Australian Journal of Botany*, 28(6): 587–599.
- Hatton, T.J., Reece, P.H., Taylor, P., Mc Ewan, K. (1998) Does leaf water efficiency vary among eucalypts in water-limited environments? *Tree Physiology*, 18: 529–536.
- Haworth, M., Elliott-Kingston, C., McElwain, J.C. (2011). Stomatal control as a driver of plant evolution. *Journal of Experimental Botany*, 62(8): 2419–2423.
- Haworth, M., Killi, D., Materassi, A., Raschi, A. (2015). Co-ordination of stomatal physiological behavior and morphology with carbon dioxide determines stomatal control. *American Journal of Botany*, 102(5): 677–688.
- Haworth, M., Scutt, C.P., Douthe, C., Marino, G., Gomes, M.T.G., Loreto, F., Flexas, J., Centritto, M. (2018a). Allocation of the epidermis to stomata relates to stomatal physiological control: Stomatal factors involved in the diversification of the angiosperms and development of amphistomaty. *Environmental and Experimental Botany*, 151: 55–63.
- Haworth, M., Marino, G., Cosentino, S.L., Brunetti, C., De Carlo, A., Avola, G., Riggi, E., Loreto, F., Centritto, M. (2018b). Increased free abscisic acid during drought enhances stomatal sensitivity and modifies stomatal behaviour in fast growing giant reed (*Arundo donax* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 147: 116–124.
- Henry, R.J. (2011). Eucalyptus. En: Kole, C. (ed.), *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Forest Trees*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. pp. 65-75. ISBN: 978-3-642-21249-9.
- Hernández, J., del Pino, A., Salvo, L., Arrarte, G. (2009). Nutrient export and harvest residue decomposition patterns of a *Eucalyptus dunnii* Maiden plantation in temperate of Uruguay. *Forest Ecology and Management*, 258(2): 92–99.
- Hernandez, M.J., Montes, F., Ruiz, F., Lopez, G, Pita, P. (2016) The effect of vapour pressure deficit on stomatal conductance, sap pH and leaf-specific hydraulic conductance in *Eucalyptus globulus* clones grown under two watering regimes. *Annals of Botany*, 117(6): 1063–1071.

- Hérault, A., Lin, Y.S., Bourne, A., Medlyn, B.E., Ellsworth, D.S. (2013). Optimal stomatal conductance in relation to photosynthesis in climatically contrasting *Eucalyptus* species under drought. *Plant, Cell & Environment*, 36(2): 262–274.
- Hetherington, A.M., Woodward, F.I. (2003). The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature*, 424(6951): 901–908.
- Higa, R.C.V., Higa, A.R., Trevisan, R., de Souza, M.V.R. (2000). Resistência e resiliência a geadas em *Eucalyptus dunnii* Maiden plantados em Campo do Tenente, PR. *Boletim de Pesquisa Florestal*, 40: 67–76.
- Hong, Z., Fries, A., Wu, H.X. (2014). High negative genetic correlations between growth traits and wood properties suggest incorporating multiple traits selection including economic weights for the future Scots pine breeding programs. *Annals of Forest Science*, 71: 463
- Hu, X-G., Liu, H., Jin, Y., Sun, Y-Q., Li, Y., Zhao, W., El-Kassaby, Y.A., Wang, X-R., Mao, J-F. (2016). *De Novo* Transcriptome Assembly and Characterization for the Widespread and Stress-Tolerant Conifer *Platycladus orientalis*. *PLoS ONE*, 11(2): e0148985.
- Hung, T.D., Brawner, J.T., Meder, R., Lee, D.J., Southerton, S., Thanh, H.H., Dieters, M.J. (2015). Estimates of genetic parameters for growth and wood properties in *Eucalyptus pellita* F Muell. to support tree breeding in Vietnam. *Annals of Forest Science*, 72(2): 205–217.
- IEA. (2017). *Market Report Series: Renewables 2017*. Paris: OECD/IEA. 189 p. ISBN 978-92-64-28187-5.
- Iglesias-Trabado, G., Wilstermann, D. (2009). *Eucalyptus universalis*. *Global cultivated eucalypt forests map 2009 (v 1.2)*. GIT Forestry Consulting's Blog Eucalyptologies: Information resources on Eucalyptus cultivation around the World, Disponible en: <http://git-forestry-blog.blogspot.com/2009/10/global-eucalyptus-map-2009-in-buenos.html>
- Incrocci, L., Marzialetti, P., Incrocci, G., Di Vita, A., Balendonck, J., Bibbiani, C., Spagnol, S., Pardossi, A. (2014). Substrate water status and evapotranspiration irrigation scheduling in heterogenous container nursery crops. *Agricultural Water Management*, 130: 30–40.

IPCC. (2014). *Cambio climático 2014: Impactos, adaptación y vulnerabilidad – Resumen para responsables de políticas*. Contribución del Grupo de trabajo II al Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático [Field, C.B., Barros, V.R., Dokken, D.J., Mach, K.J., Mastrandrea, M.D., Bilir, T.E., Chatterjee, M., Ebi, K.L., Estrada, Y.O., Genova, R.C., Girma, B., Kissel, E.S., Levy, A.N., MacCracken, S., Mastrandrea, P.R., White, L.L.(eds.)]. Organización Meteorológica Mundial, Ginebra, Suiza, 34p. (en árabe, chino, español, francés, inglés y ruso). Disponible en:
https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/2018/03/ar5_wgII_spm_es-1.pdf

Ishiguri, F., Diloksumpun, S., Tanabe, J., Iizuka, K., Yokota, S. (2013). Stress-wave velocity of trees and dynamic Young modulus of logs of 4-year-old *Eucalyptus camaldulensis* trees selected for pulpwood production in Thailand. *Journal of Wood Science*, 59: 506–511.

Jankowski, A., Wyka, T.P., Zytowski, R., Nihlgård, B., Reich, P.B., Oleksyn, J. (2017). Cold adaptation drives variability in needle structure and anatomy in *Pinus sylvestris* L. along a 1,900 km temperate–boreal transect. *Functional Ecology*, 31(12): 2212–2223.

Janmohammadi, M., Zolla, L., Rinalducci, S. (2015). Low temperature tolerance in plants: Changes at the protein level. *Phytochemistry*, 117: 76–89.

Jiménez, E., Vega, J.A., Pérez-Gorostiaga, P., Fonturbel, T., Cuiñas, P., Fernández, C. (2007). Evaluación de la transpiración de *Eucalyptus globulus* mediante la densidad de flujo de savia y su relación con variables meteorológicas y dendrométricas. *Boletín del CIDEU*, 3: 119–138.

Johansen, D.A. (1940). *Plant Microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book Company, Inc. 523 p. ISBN: 978-0070325401.

Jones, H.G., Stoll, M., Santos, T., de Sousa, C., Chaves, M.M., Grant, O.M. (2002). Use of infrared thermography for monitoring stomatal closure in the field: application to grapevine. *Journal of Experimental Botany*, 53: 2249–2260.

Jönsson, A.M., Ingerslev, M., Raulund-Rasmussen, K. (2004). Frost sensitivity and nutrient status in a fertilized Norway spruce stand in Denmark. *Forest Ecology and Management*, 201: 199–209.

- K**ing D.A., Ball M.C. (1998). A model of frost impacts on seasonal photosynthesis of *Eucalyptus pauciflora*. *Australian Journal of Plant Physiology (Functional Plant Biology)*, 25(1): 27–37.
- King, G., Fonti, P., Nievergelt, D., Büntgen, U., Frank, D. (2013). Climatic drivers of hourly to yearly tree radius variations along a 6 °C natural warming gradient. *Agricultural and Forest Meteorology*, 168: 36–46.
- Knapic, S., Pirralho, M., Louzada, J.L., Pereira, H. (2014). Early assessment of density features for 19 *Eucalyptus* species using X-ray microdensitometry in a perspective of potential biomass production. *Wood Science and Technology*, 48(1): 37–49.
- Kozlowski, T.T. (2012). *Water Deficits and Plant Growth, Volume III: Plant Responses and Control of Water Balance*. Cambridge: Academic Press. 382 p. ISBN: 978-0124314993.
- Kröber, W. y Bruelheide, H. (2014). Transpiration and stomatal control: a cross-species study of leaf traits in 39 evergreen and deciduous broadleaved subtropical tree species. *Trees*, 28(3): 901–914.
- Kutschera, U., Niklas, K.J. (2013). Cell division and turgor-driven stem elongation in juvenile plants: A synthesis. *Plant Science*, 207: 45–56.
- L**ammertsma, E.I., de Boer, H.J., Dekker, S.C., Dilcher, D.L., Lotter, A.F., Wagner-Cremer, F. (2011). Global CO₂ rise leads to reduced maximum stomatal conductance in Florida vegetation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 108(10): 4035–4040.
- Larcher, W. (2006). *Ecofisiologia vegetal*. São Carlos: RiMa Editora. 532 p. ISBN: 85-86552-03-8.
- Leal, S., Pereira, H., Grabner, M., Wimmer, R. (2003). Clonal and site variation of vessels in 7-year-old *Eucalyptus globulus*. *IAWA Journal*, 24(2): 185–195.
- Lemcoff, J.H., Guarnaschelli, A.B., Garau, A.M., Bascialli, M.E., Ghera, C.M. (1994). Osmotic adjustment and its use as a selection in *Eucalyptus* seedlings. *Canadian Journal of Forest Research*, 24(12): 2404–2408.

- Lens, F., Sperry, J.S., Christman, M.A., Choat, B., Rabaey, D., Jansen, S. (2011). Testing hypotheses that link wood anatomy to cavitation resistance and hydraulic conductivity in the genus *Acer*. *New Phytologist*, 190: 709–723.
- Leslie, A., Mencuccini, M., Perks, M.P. (2014) Frost damage to eucalypts in a short-rotation forestry trial in Cumbria (England). *iForest - Biogeosciences and Forestry*, 7(3): 156–161.
- Leslie, A.D., Mencuccini, M., Perks, M.P., Wilson, E.R. (2019). A review of the suitability of eucalypts for short rotation forestry for energy in the UK. *New Forests*, 1–19.
- Li, C. (2000). Population differences in water-use efficiency of *Eucalyptus microtheca* seedlings under different watering regimes. *Physiologia Plantarum*, 108(2): 134–139.
- Lima, I.L., Longui, E.L., Garcia, R., Luca, E.F., Silva Júnior, F.G., Florsheim, S.M.B. (2011). Propriedades da Madeira de *Eucalyptus umbra* R. T. Baker em Função do Diâmetro e da Posição Radial na Tora. *Floresta e Ambiente*, 18(3): 289–298.
- Lima, M.A., Lavorente, G.B., da Silva, H.K.P., Bragatto, J., Rezende, C.A., Bernardinelli, O.D., deAzevedo, E.R., Gomez, L.D., McQueen-Mason, S.J., Labate, C.A., Polikarpov, I. (2013). Effects of pretreatment on morphology, chemical composition and enzymatic digestibility of eucalyptus bark: a potentially valuable source of fermentable sugars for biofuel production – part 1. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1): 75.
- Lin, Y., Zheng, H., Zhang, Q., Liu, C., Zhang, Z. (2014). Functional profiling of EcalCE1 transcription factor gene from *Eucalyptus camaldulensis* involved in cold response in tobacco plants. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 23(2): 141–150.
- Lingye, S., Zhanwu, D., Shaohua L., Haiping X. (2015). A novel system for evaluating drought–cold tolerance of grapevines using chlorophyll fluorescence. *BMC Plant Biology*, 15(1): 82.
- Longui, E.L., Romeiro, D., Pflieger, P., Lima, I.L., Silva Jr., F.G., Garcia, J.N., Bortoletto Jr., G., Freire Nero, A.O.L., Florsheim, S.M.B. (2014). Radial variation of anatomical features, physicomechanical properties and chemical constituents and their potential influence on the wood quality of 45-year-old *Eucalyptus propinqua*. *Australian Forestry*, 77: 78–85.

Luo, J., Arnold, R., Lu, W., Lin, Y. (2014). Genetic variation in *Eucalyptus camaldulensis* and *E. tereticornis* for early growth and susceptibility to the gall wasp *Leptocybe invasa* in China. *Euphytica*, 196(3): 397–411.

Machado, F.J.J., Gomide, J.L., Campos, W.O., Capitani, L.R. (1988). Caracterização da madeira de *Eucalyptus pilularis* e estudos para a produção de celulose Kraft. *Revista Árvore*, 12(2): 111–122.

Mandal, R.A., Yadav, B.K.V., Yadav, K.K., Dutta, I.C., Haque, S.M. (2013). Development of allometric equation for biomass estimation of *Eucalyptus camaldulensis*: a study from Sagarnath Forest, Nepal. *International Journal of Biodiversity and Ecosystems*, 1(1): 001–007.

Martín, D., Vázquez-Piqué, J., Fernández, M., Alejano, R. (2014). Effect of ecological factors on intra-annual stem girth increment of holm oak. *Trees*, 28(5): 1367–1381.

Martín, J.A., Solla, A., Ruiz-Villar, M., Gil, L. (2013). Vessel length and conductivity of *Ulmus* branches: ontogenetic changes and relation to resistance to Dutch elm disease. *Trees*, 27: 1239–1248.

Martins, M., da Silva, J.R.M., Lima, J.T., Gonçalves, M.T.T., Filipe, A.P. (2013). Simulação em uso dos pisos de madeira de *Eucalyptus* sp e *Corymbia maculata*. *Cerne*, 19(1): 151–156.

Massaro, R.A.M., Bonine, C.A.V., Scarpinati, E.A., Paula, R.C. (2010). Viabilidade de aplicação da seleção precoce em testes clonais de *Eucalyptus* spp. *Ciência Florestal*, 20(4): 597–609.

Matos, F.S., Oliveira, P.R.C., Anciotti Gil, J.L.R., de Sousa, P.V., Gonçalves, G.A., Sousa, M.P.B.L., da Silveira, P.S., da Silva, L.M. (2016). *Eucalyptus urocan* drought tolerance mechanisms. *African Journal of Agricultural Research*, 11(18): 1617–1622.

Mattei, V.L., Longhi, S.L. (2001). Avaliação da regeneração natural de *Eucalyptus paniculata* Smith. *Ciência Florestal*, 11: 55–65.

McDowell, N.G., Beerling, D.J., Breshears, D.D., Fisher, R.A., Raffa, K.F., Stitt, M. (2011). The interdependence of mechanisms underlying climate-driven vegetation mortality. *Trends in Ecology and Evolution*, 26(10): 523–532.

- McKiernan, A.B., Hovenden, M.J., Brodribb, T.J., Potts, B.M., Davies, N.W., O'Reilly-Wapstra, J.M. (2014). Effect of limited water availability on foliar plant secondary metabolites of two *Eucalyptus* species. *Environmental and Experimental Botany*, 105: 55–64.
- McIvor, I.R., Sloan, S., Pigem, L.R. (2014). Genetic and environmental influences on root development in cuttings of selected *Salix* and *Populus* clones – a greenhouse experiment. *Plant Soil*, 377: 25–42.
- Medrano, H., Bota, J., Cifre, J., Flexas, J., Ribas-Carbó, M., Gulías, J. (2007). Eficiencia en el uso del agua por las plantas. *Investigaciones Geográficas*, 43: 73–84.
- Medrano, H., Tomás, M., Martorell, S., Flexas, J., Hernández, E., Rosselló, J., Pou, A., Escalona, J.M., Bota, J. (2015). From leaf to whole-plant water use efficiency (WUE) in complex canopies: Limitations of leaf WUE as a selection target. *The Crop Journal*, 3: 220–228.
- Meinzer, F.C., Johnson, D.M., Lachenbruch, B., McCulloh, K.A., Woodruff, D.R. (2009). Xylem hydraulic safety margins in woody plants: coordination of stomatal control of xylem tension with hydraulic capacitance. *Functional Ecology*, 23: 922–930.
- Mejía de Tafur, M.S., Burbano, R.A., García, M.A., Baena, D. (2014). Respuesta fotosintética de *Eucalyptus grandis* W. Hill a la disponibilidad de agua en el suelo y a la intensidad de luz. *Acta Agronómica*, 63(4): 311–317.
- Mendes, H.S.J., Paula, N.F., Scarpinatti, E.A., Paula, R.C. (2013). Respostas fisiológicas de genótipos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* à disponibilidade hídrica e adubação potássica. *Cerne*, 19(4): 603–611.
- Merchant, A., Callister, A., Arndt, S., Tausz, M., Adams, M. (2007). Constrasting physiological responses of six *Eucalyptus* species to water deficit. *Annals of Botany*, 100(7): 1507–1515.
- Milgate, A.W., Potts, B.M., Joyce, K., Mohammed, C.L., Vaillancourt, R.E. (2005). Genetic variation in *Eucalyptus globulus* for susceptibility to *Mycosphaerella nubilosa* and its association with tree growth. *Australasian Plant Pathology*, 34(1): 11–18.
- Miranda, I., Pereira, H. (2002). Variation of pulpwood quality with provenances and site in *Eucalyptus globulus*. *Annals of Forest Science*, 59: 283–291.

- Miura, K., Furumoto, T. (2013). Cold Signaling and Cold Response in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3): 5312–5337.
- Moglia, J.G., Bravo, S., Gerez, R. (2008). Anatomía comparada del leño de dos orígenes selectos de *Eucalyptus camaldulensis* (Myrtaceae) de dos orígenes, ensayados en Santiago del Estero. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 43(3–4): 239–246.
- Montagua, K.D., Düttmera, K., Bartonand C.V., Cowie, M.A.L. (2005). Developing general allometric relationships for regional estimates of carbon sequestration - An example using *Eucalyptus pilularis* from seven contrasting sites. *Forest Ecology and Management*, 204(1): 113–127.
- Monteoliva, S., Barotto, A.J., Fernandez, M.E. (2015). Anatomía y densidad de la madera en *Eucalyptus*: variación interespecífica e implicancia en la resistencia al estrés abiótico. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata*, 114(2), 209–217.
- Moraes, C.B., Freitas, T.C.M., Pieroni, G.B., Resende, M.D.V., Zimback, L., Mori, E.S. (2014). Estimativas de parâmetros genéticos para seleção precoce de clones de *Eucalyptus* para região com ocorrência de geadas. *Scientia Forestalis*, 42(102): 219–227.
- Moraes, C.B., Tambarussi, E.V., Gama, L., Abilio, F.M., Carignato, A., Zimback, L., de Paula, R.C., Mori, E. (2016). Controle genético para a tolerância a geadas em progênies de *Eucalyptus urophylla*. *Scientia Forestalis*, 44(110): 373–381.
- Moraga, S.P., Escobar, R., Valenzuela, A.S. (2006). Resistance to freezing in three *Eucalyptus globulus* Labill subspecies. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(3): 310–314.
- Morin, X., Ameglio, T., Ahas, R., Kurz-Besson, C., Lanta, V., Lebourgeois, F., Miglietta, F., Chuine, I. (2007). Variation in cold hardiness and carbohydrates concentration from dormancy induction to bud burst among provenances of three European oak species. *Tree Physiology*, 27: 817–825.
- Mott, K.A., Peak, D. (2013). Testing a vapour-phase model of stomatal responses to humidity. *Plant Cell and Environment*, 36(5): 936–944.
- Mughini, G., Alianiello, F., Benedetti, A., Mughini-Gras, L., Gras, M.A., Salvati, L. (2013). Clonal variation in growth, arsenic and heavy metal uptakes of hybrid *Eucalyptus* clones in a Mediterranean environment. *Agroforestry Systems*, 87: 755–766.

- N**avarrete-Campos, D., Bravo, L.A., Rubilar, R.A., Emhart, V., Sanhueza, R. (2013). Drought effects on water use efficiency, freezing tolerance and survival of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus globulus* x *nitens* cuttings. *New Forests*, 44(1): 119–134.
- Neiva, D.M., Araújo, S., Lourenço, A., Gominho, J., Fernandes, L., Simões, R., Pereira, H. (2015). Chemical composition and kraft pulping potential of 12 eucalypt species. *Industrial Crops and Products*, 66: 89–95.
- Nouri, H., Beecham, S., Kazemi, F., Hassanli, A.M. (2013). A review of ET measurement techniques for estimating the water requirements of urban landscape vegetation. *Urban Water Journal*, 10(4): 247–259.
- Nouvellon, Y., Laclau, J.P., Epron, D., Kinana, A., Mabiála, A., Roupsard, O., Bonnefond, J.M., le Marie, G., Marsden, C., Bontemps, J.D., Saint-André, L. (2010). Within-stand and seasonal variations of specific leaf area in a clonal *Eucalyptus* plantation in the Republic of Congo. *Forest Ecology and Management*, 259(9): 1796–1807.
- Nunes, B.H.S., Rezende, G.D.S.P., Ramalho, M.A.P., Santos, J.B. (2002). Implicações da interação genótipo x ambientes na seleção de clones de eucalipto. *Cerne*, 8: 49–58.
- O**berhuber, W., Gruber, A., Kofler, W., Swidrak, I. (2014). Radial stem growth in response to microclimate and soil moisture in a drought-prone mixed coniferous forest at an inner Alpine site. *European Journal of Forest Research*, 133(3): 467–479.
- Ögren, E., Nilsson, T., Sundblad, L.-G. (1997). Relationship between respiratory depletion of sugars and loss of cold hardiness in coniferous seedlings overwintering at raised temperatures: indications of different sensitivities of spruce and pine. *Plant Cell and Environment*, 20: 247–253.
- Onaindia, M., de Manuel, B.F., Madariaga, I., Rodríguez-Loinaz, G. (2013). Co-benefits and trade-offs between biodiversity, carbon storage and water flow regulation. *Forest Ecology and Management*, 289: 1–9.
- Oteros, J., García-Mozo, H., Vázquez, L., Mestre, A., Domínguez-Vilches, E., Galán, C. (2013). Modelling olive phenological response to weather and topography. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 179: 62–68.

Otto, M.S.G., Hubbard, R.M., Binkley, D., Stape, J.L. (2014). Dominant clonal *Eucalyptus grandis x urophylla* trees use water more efficiently. *Forest Ecology and Management*, 328: 117–121.

Palacios, M.G.V. (2018). Producción y caracterización de nanofibras de celulosa desde diferentes especies de *Eucalyptus* para biomateriales en base de celulosa. Tesis de Máster. Universidad de Concepción. Chile.

Paludzyszyn Filho, E., Santos, P.E.T. (2005). Considerações sobre o plantio de *Eucalyptus dunnii* no estado do Paraná. Colombo: Embrapa. 7p. (Comunicado Técnico, 141).

Paludzyszyn Filho, E., Santos, P.E.T., Ferreira, C.A. (2006). *Eucaliptos indicados para plantio no estado do Paraná*. Colombo: Embrapa Florestas, 45p. (Documentos 129). ISSN: 1679-2599.

Pardos, J.A. (2007). Perspectiva fisiológica en la producción y mejora del eucalipto (con énfasis en *Eucalyptus globulus* Labill). *Boletín del CIDEU*, 3: 7–55.

Pardos, M., Climent, J., Almeida, H., Calama, R. (2014). The role of developmental stage in frost tolerance of *Pinus pinea* L. seedlings and saplings. *Annals of Forest Science*, 71: 551–562.

Passioura, J.A., Ash, J.E. (1993). Phenotypic, Genetic and Ecological Variation in the *Eucalyptus saligna-1 E. botryoides* Complex. *Australian Journal of Botany*, 41: 393–412.

Pearce, D.W., Millard, S., Bray, D.F., Rood, S.B. (2006). Stomatal characteristics of riparian poplar species in a semi-arid environment. *Tree Physiology*, 26(2): 211–218.

Pereira, J.C.D., Sturion, J.A., Higa, A.R., Higa, R.C.V., Shimizu, J.Y. (2000). Características da madeira de algumas espécies de eucalipto plantadas no Brasil. Colombo: Embrapa Florestas. 113 p. (Documentos 38). ISSN: 1517-536X.

Pfautsch, S., Bleby, T.M., Rennenberg, H., Adams, M.A. (2010). Sap flow measurements reveal influence of temperature and stand structure on water use of *Eucalyptus Regnans* forests. *Forest Ecology and Management*, 259: 1190–1199.

- Pfautsch, S., Renard, J., Tjoelker, M.G., Salih, A. (2015). Phloem as capacitor: radial transfer of water into xylem of tree stems occurs via symplastic transport in ray parenchyma. *Plant Physiology*, 167: 963–971.
- Pima, N.E., Chamshama, S.A.O., Iddi S., Maguzu J. (2016). Growth Performance of Eucalypt Clones in Tanzania. *Environment and Ecology Research*, 4(3): 146–154.
- Pirralho, M., Flores, D., Sousa, V.B., Quilhó, T., Knapic, S., Pereira, H. (2014). Evaluation on paper making potential of nine *Eucalyptus* species based on wood anatomical features. *Industrial Crops and Products*, 54: 327–334.
- Pita, P., Pardos, J.A. (2001). Growth, leaf morphology, water use and tissue water relations of *Eucalyptus globulus* clones in response to water deficit. *Tree Physiology*, 21: 599–607.
- Pita, P., Cañas, I., Soria, F., Ruiz, F., Toval. G. (2005). Use of physiological traits in tree breeding for improved yield in drought-prone environments. The case of *Eucalyptus globulus*. *Forest Systems*, 14(3): 383–393.
- Pitz Floriani, M.M., Steffens, C.A., Chaves, D.M., Amarante, C.V.T., Pikart, T.G., Ribeiro, M.S. (2013). Relação entre concentrações foliares de carboidratos solúveis totais e tolerância ao frio em diferentes espécies de *Eucalyptus* spp. *Ciência Florestal*, 23(1): 165–174.
- Plomion, C., Adam-Blondon, A. (2015). *Land Plants – Trees, Volume 74*. Londres: Academic Press. 368 p. ISBN: 978-0-12-398548-4.
- Poke, F.S., Wright, J.A., Raymond, C.A. (2004). Predicting extractives and lignin contents in *Eucalyptus globulus* using Near Infrared Reflectance Analysis. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 24(1): 55–67.
- Poorter, L., Rozendaal, D.M.A. (2008). Leaf size and leaf display of thirty-eight tropical tree species. *Oecologia*, 158(1): 35–46.
- Poot, P., Veneklaas, E. (2013). Species distribution and crown decline are associated with contrasting water relations in four common sympatric eucalypt species in southwestern Australia. *Plant and Soil*, 364: 409–423.
- Potts, B.M., Dungey, H.S. (2004). Interspecific hybridization of *Eucalyptus*: key issues for breeders and geneticists. *New Forests*, 27(2):115–138.

Pulito, A.P., Gonçalves, J.L. de M., Smethurst, P.J., Arthur Jr., J.C., Alvares, C.A., Tertulino Rocha, J.H., Hübner, A., Moraes, L.F. de, Miranda, A.C., Kamogawa, M.Y., Gava, J.L., Chaves, R., Silva, C.R. (2015). Available nitrogen and responses to nitrogen fertilizer in brazilian eucalypt plantations on soils of contrasting texture. *Forests*, 6: 973–991.

Ramalho, J.C., DaMatta, F.M., Rodrigues, A.P., Scotti-Campos, P., Pais, I., Batista-Santos, P., Partelli, F.L., Ribeiro, A., Lidon, F.C., Leitão, A.E. (2014). Cold impact and acclimation response of *Coffea* spp. plants. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 26(1): 5–18.

Raymond, C.A. (2002). Genetics of *Eucalyptus* wood properties. *Annals of Forest Science*, 59:525–531.

Razafimahatratra, A.R., Ramananantoandro, T., Razafimaharo, V., Chaix, G. (2016). Provenance and progeny performances and genotype × environment interactions of *Eucalyptus robusta* grown in Madagascar. *Tree Genetics & Genomes*, 12(3): 38.

Reis, G.G., Reis, M.G.F. (1991). Respostas estomáticas e mudanças nos níveis de reservas de plantas intactas e de brotações de *Eucalyptus camaldulensis* Dehn submetidas à deficiência hídrica no solo. *Revista Árvore*, 15(2): 112–125.

REN21 (2018). *Renewables 2018 Global Status Report*. Paris: REN21 Secretariat. 325 p. ISBN 978-3-9818911-3-3. Disponible en: http://www.ren21.net/wp-content/uploads/2018/06/17-8652_GSR2018_FullReport_web_final_.pdf

Ritter, M. (2014). Field Guide to the cultivated eucalypts (Myrtaceae) and how to identify them. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 99(4): 642–687.

Rodríguez-Calcerrada, J., Li, M., López, R., Cano, F.J., Oleksyn, J., Atkin, O.K., Pita, P., Aranda, I., Gil, L. (2017). Drought-induced shoot dieback starts with massive root xylem embolism and variable depletion of nonstructural carbohydrates in seedlings of two tree species. *New Phytologist*, 213(2): 597–610.

Salazar-Moreno, R., Rojano-Aguilar, A., López-Cruz, I.L. (2014). La eficiencia en el uso del agua en la agricultura controlada. *Tecnología y Ciencias del Agua*, 5(2): 177–183.

- Santos, G.A., Resende, M.D.V., Silva, L.D., Higa, A., Assis, T.F. (2013). Adaptabilidade de híbridos multiespécies de *Eucalyptus* ao estado do Rio Grande do Sul. *Revista Árvore*, 37(4): 759–769.
- Sato, A.S., Sebbenn, A.M., Moraes, E., Zanatto, A.C.S., Freitas, M.L.M. (2007). Seleção dentro de progênies de *Eucalyptus resinifera* aos 21 anos de idade em Luiz Antônio – SP. *Revista do Instituto Florestal*, 19(1): 93–100.
- Schlichting, C.D. (1986). The evolution of phenotypic plasticity in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 17: 677–693.
- Searle, S.Y., Malins, C.J. (2014). Will energy crop yields meet expectations? *Biomass and Bioenergy*, 65: 3–12.
- Sefton, C.A., Montagu, K.D., Atwell, B.J., Conroy, J.P. (2002). Anatomical variation in juvenile eucalypt leaves accounts for differences in specific leaf area and CO₂ assimilation rates. *Australian Journal of Botany*, 50(3): 301–310.
- Shimazaki, K., Doi, M., Assmann, S.M., Kinoshita, T. (2007). Light regulation of stomatal movement. *Annual review of plant biology*, 58: 219–247.
- Sigala Rodríguez, J.Á., González Tagle, M.A., Prieto Ruíz, J.Á., Basave Villalobos, E., Jiménez Pérez, J. (2016). Relaciones alométricas para predecir biomasa en plantas de *Pinus pseudostrobus* cultivadas en diferentes sistemas de producción en vivero. *Bosque*, 37(2): 369–378.
- Silva, C.D., Nascimento, J.S., Scarpinati, E.A., Paula, R.C. (2014). Classification of *Eucalyptus urograndis* hybrids under different water availability based on biometric traits. *Forest Systems*, 23(2): 209–215.
- Silva, I.M.A., de Souza, M.W.R., Rodrigues, A.C.P., Correia, L.P.S., Veloso, R.V.S., dos Santos, J.B., Titon, M., Gonçalves, J.F., de Laia, M.L. (2016). Determination of parameters for selection of *Eucalyptus* clones tolerant to drought. *African Journal of Agricultural Research*, 11(40): 3940–3949.
- Silva, M., Rubilar, R., Espinoza, J., Yáñez, M., Emhart, V., Quiroga, J.J. (2017). Respuesta en parámetros de intercambio gaseoso y supervivencia en plantas jóvenes de genotipos comerciales de *Eucalyptus* spp sometidas a déficit hídrico. *Bosque*, 38(1): 79–87.
- Silva, M.F., Fortes, M.M., Sette Junior, C.R. (2018). Characteristics of Wood and Charcoal from *Eucalyptus* clones. *Floresta e Ambiente*, 25(3): e20160350.

- Silva, P., Campoe, O., Vieira, I., Paula, R. (2015). Aplicação foliar de boro em eucalipto sob estresse hídrico. *Scientia Forestalis*, 43(106): 395–405.
- Silva, P., Campoe, O., Paula, R., Lee, D. (2016). Seedling growth and physiological responses of sixteen eucalypt taxa under controlled water regime. *Forests*, 7(6): 110.
- Simioni, F.J., Buschinelli, C.C.A., Deboni, T.L., Passos, B.M. (2018). Cadeia produtiva de energia de biomassa florestal: o caso da lenha de eucalipto no polo produtivo de Itapeva – SP. *Ciência Florestal*, 28(1): 310–323.
- Smith, W.K., Bell, D.T., Shepherd, K.A. (1998). Associations between leaf structure, orientation, and sunlight exposure in five Western Australian communities. *American Journal of Botany*, 85: 56–63.
- Souza, G.M., Villa Nova, N.A., Gonçalves, A.N. (1999). Entropia, informação e estresse hídrico em *Eucalyptus camaldulensis* in vitro. *Revista Brasileira de Biologia*, 59(3): 471–476.
- Sperry, J., Donnelly, J., Tyree, M. (1988). A method for measuring hydraulic conductivity and embolism in xylem. *Plant, Cell & Environment*, 11: 35–40.
- Spiro, R.G. (1966). Analysis of sugars found in glycoproteins. *Methods in Enzymology*, 8: 3–26.
- Sseremba, O.E., Mugabi, P., Banana, A.Y. (2016). Within-Tree and Tree-Age Variation of Selected Anatomical Properties of the Wood of Ugandan-Grown *Eucalyptus grandis*. *Forest Products Journal*, 66(7-8): 433–442.
- Stape, J.L., Binkley, D., Ryan, M.G. (2008). Production and carbon allocation in a clonal *Eucalyptus* plantation with water and nutrient manipulations. *Forest Ecology and Management*, 255(3–4): 920–930.
- Stape, J.L., Binkley, D., Ryan, M., Fonseca, S., Loos, R.A., Takahashi, E., Silva, C.R., Silva, S.R., Hakamada, R.E., Ferreira, J.M.A., Lima, A.M.N., Gava, J.L., Leite, F.P., Andrade, H.B., Alves, J.M., Silva, G.G.C., Azevedo, M.R. (2010). The Brazil *Eucalyptus* Potential Productivity Project: Influence of water, nutrients and stand uniformity on wood production. *Forest Ecology and Management*, 259(9): 1684–1694.

- T**aiz, L., Zeiger, E., Møller, I.M., Murphy, A. (2017). *Fisiología e Desenvolvimento Vegetal*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed. 858p. ISBN: 978-8582713662.
- Takahashi, D., Li, B., Nakayama, T., Kawamura, Y., Uemura, M. (2013). Plant plasma membrane proteomics for improving cold tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 4: 90.
- Tari, I. (2003). Abaxial and adaxial stomatal density, stomatal conductances and water status of bean primary leaves as affected by paclobutrazol. *Biologia Plantarum*, 47: 215–220.
- Tatagiba, S.D., Pezzopane, J.E.M., Reis, E.F., Dardengo, M.C.J.D., Efgem, T.A.M. (2007). Comportamento fisiológico de dois clones de *Eucalyptus* na época seca e chuvosa. *Cerne*, 13(2): 149–159.
- Teskey, R., Wertin, T., Bauweraerts, I., Ameye, M., McGuire, M.A., Steppe, K. (2015). Response of tree species to heat waves and extreme heat events. *Plant, Cell & Environment*, 38: 1699–1712.
- Thomas, L., Maronedze, C., Ederli, L., Pasqualini, S., Gehring, C. (2013). Proteomic signatures implicate cAMP in light and temperature responses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Proteomics*, 83: 47–59.
- Tibbits, W.N., Potts, B.M., Savva, M.H. (1991). Inheritance of freezing resistance in interspecific F₁ hybrids of *Eucalyptus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 83(1): 126–135.
- Tinus, R.W., Burr, K.E., Atzmon, N., Riov, J. (2000). Relationship between carbohydrate concentration and root growth potential in coniferous seedlings from three climates during cold hardening and dehardening. *Tree Physiology*, 20(16): 1097–1104.
- Toral, M., Manríquez, A., Navarro-Cerrillo, R., Tersí, D., Naulin, P. (2010). Características de los estomas, densidad e índice estomático en secuoya (*Sequoia sempervirens*) y su variación en diferentes plantaciones de Chile. *Bosque*, 31(2): 157–164.
- Travert, S., Valerio, L., Fouraste, I., Boudet, A.M., Teulieres, C. (1997). Enrichment in specific soluble sugars of two eucalyptus cell-suspension cultures by various treatments enhances their frost tolerance via a noncolligative mechanism. *Plant Physiology*, 114(4): 1433–1442.

Tuffi Santos, L.D., Iarema, L., Thadeo, M., Ferreira, F.A., Meira, R.M.S.A. (2006). Características da epiderme foliar de eucalipto e seu envolvimento com a tolerância ao glyphosate. *Planta daninha*, 24(3): 513–520.

Tyree, M., Richter, H. (1981). Alternative methods of analysing water potential isotherms: some cautions and clarifications. *Journal of Experimental Botany*, 32(128): 643–653.

Valladares, F., Chico, J.M., Aranda, I., Balaguer, L., Dizengremel, P., Manrique, E., Dreyer, E. (2002). The greater seedling high-light tolerance of *Quercus robur* over *Fagus sylvatica* is linked to a greater physiological plasticity. *Trees*, 16: 395–403.

Vander Willigen, C., Pammenter, N.W. (1998). Relationship between growth and xylem hydraulic characteristics of clones of *Eucalyptus* spp. at contrasting sites. *Tree Physiology*, 18: 595–600.

Veenin, T., Fujita, M., Nobuchi, T., Siripatanadilok, S. (2005). Radial Variations of Anatomical Characteristics and Specific gravity in *Eucalyptus Camaldulensis* Clones. *IAWA Journal*, 26(3): 353–361.

Vellini, A.L.T.T., Paula, N.F., Alves, P.L.C.A., Pavani, L.C., Bonine, C.A.V., Scarpinati, E.A., Paula, R.C. (2008). Respostas fisiológicas de diferentes clones de eucalipto sob diferentes regimes de irrigação. *Revista Árvore*, 32(4): 651–663.

Venturas, M., López, R., Martín, J.A., Gascó, A., Gil, L. (2014). Heritability of *Ulmus minor* resistance to Dutch elm disease and its relationship to vessel size, but not to xylem vulnerability to drought. *Plant Pathology*, 63: 500–50.

Villegas, M.S. y Rivera, S.M. (2002). Revisión xilológica de las principales especies del género *Eucalyptus* L'Herit. cultivadas en Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata*, 105: 9–28.

Vitasse, Y., Lenz, A., Körner, C. (2014). The interaction between freezing tolerance and phenology in temperate deciduous trees. *Frontiers in Plant Science*, 5: 541.

- W**ang, X.C., Zhao, Q.Y., Ma, C.L., Zhang, Z.H., Cao, H.L., Kong, Y.M., Yue, C., Hao, X.Y., Chen, L., Ma, J.Q., Jin, J.Q., Li, X., Yang, Y.J. (2013). Global transcriptome profiles of *Camellia sinensis* during cold acclimation. *BMC Genomics*, 14: 415.
- Warren, C.R., Tausz, M., Adams, M.A. (2005). Does rainfall explain variation in leaf morphology and physiology among populations of red ironbark (*Eucalyptus sideroxylon* subsp. *tricarpa*) growing in a common garden? *Tree Physiology*, 25(11): 1369–1378.
- Will, R.E., Wilson, S.M., Zou, C.B., Hennessey, T.C. (2013). Increased vapor pressure deficit due to higher temperature leads to greater transpiration and faster mortality during drought for tree seedlings common to the forest-grassland ecotone. *New Phytologist*, 200: 366–374.
- Wolkmer, F.S., Pimmel, N.F. (2013). Política Nacional de Recursos Hídricos: governança da água e cidadania ambiental. *Seqüência*, 67: 165–198.
- Woodward, F.I., Kelly, C. (1995). The influence of CO₂ concentration on stomatal density. *New Phytologist*, 131(3): 311–327.
- Wu, B.S., Xu, J., Li, G., Lu, Z., Han, C., Hu, Y., Hu, X. (2013). Genetic variation and genetic gain in growth traits, stem-branch characteristics and wood properties and their relationships to *Eucalyptus urophylla* clones. *Silvae Genetica*, 62(4–5): 2018-231.
- X**iao, S., Xiao, H., Peng, X., Tian, Q. (2014). Daily and seasonal stem radial activity of *Populus euphratica* and its association with hydroclimatic factors in the lower reaches of China's Heihe River basin. *Environmental Earth Sciences*, 72(2): 609–621.
- Xiong, D., Douthe, C., Flexas, J. (2018). Differential coordination of stomatal conductance, mesophyll conductance, and leaf hydraulic conductance in response to changing light across species. *Plant Cell and Environment*, 41, 436–450.
- Xu, Z., Zhou, G. (2008). Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. *Journal of Experimental Botany*, 59(12): 3317–3325.

- Z**anuncio, A.J.V., Carvalho, A.G., Carneiro, A. de C.O., Valenzuela, P., Gacitúa, W., Leite, F.P., Colodette, J.L. (2017). Characterization of eucalyptus clones subject to wind damage. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 52(11): 969–976.
- Zeppel, M., Eamus, D. (2008). Coordination of leaf area, sapwood area and canopy conductance leads to species convergence of tree water use in a remnant evergreen woodland. *Australian Journal of Botany*, 56: 97–108.
- Zhang, Z.Z., Zhao, P., Oren, R., McCarthy, H.R., Niu, J.F., Zhu, L.W., Ni, G.Y., Huang, Y.Q. (2015). Water use strategies of young *Eucalyptus urophylla* forest in response to seasonal change of climatic factors in South China. *Biogeosciences Discussions*, 12: 10469–10510.
- Zweifel, R., Drew, D.M., Schweingruber, F., Downes, G.M. (2014). Xylem as the main origin of stem radius changes in *Eucalyptus*. *Functional Plant Biology*, 41(5): 520–534.



9. ANEXO

9.1 Sobre el autor

André Carignato nació en Jaú, São Paulo, Brasil, em 17 de febrero de 1991. En 2009, empezó sus estudios en “Ingeniería Forestal” en la Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Brasil. En el año académico de 2012-2013, realizó una estancia con duración de un año en la Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, España, dónde cursó asignaturas de la carrera “Ingeniería Forestal y del Medio Natural”, además de realizar prácticas relacionadas a la Micropropagación de leñosas. Durante los años de su graduación, realizó diversas prácticas en empresas forestales privadas en el período de todas sus vacaciones, tales como Veracel, Lwarcel y Eucatex, además de realizar investigaciones durante todo su grado en el área de Mejora genética forestal y Plagas forestales, siendo este último asociado al Programa de Proteção Florestal (PROTEF) del Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF).



En 2014, terminó sus estudios de grado y al principio de 2015 realizó el Programa de Preparação de Gestores Florestais – PPGF, del IPEF, que tiene por objetivo proporcionar a los recién graduados mejor desempeño profesional inicial en las empresas forestales y órganos públicos. Al término de este programa, en el mismo año, empezó un Doctorado relacionado a la Fisiología del eucalipto (resistencia a la sequía y a las heladas) en la Universidad de Huelva, España, siendo que, dentro de ello, realizó un complemento de formación referente a un Máster Universitario en el mismo proyecto. Durante sus cuatro años de Doctorado, asistió a diversos congresos y conferencias, y tuvo la oportunidad de hacer dos estancias “Erasmus” de investigación: En 2019, en el Instituto Superior de Agronomia (ISA), de la Universidade de Lisboa, Portugal; y en 2020, en el Dipartimento di Biologia, Ecologia e Scienze della Terra (DiBEST), de la Univesità della Calabria, Italia.