

Familial variation in *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. & Cham. seedlings in response to drought: water and osmotic potential

Variación familiar en plántulas de *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. & Cham. en respuesta a la sequía: potencial hídrico y osmótico

Natalia Castelán-Muñoz¹; Marcos Jiménez-Casas¹; Humberto A. López-Delgado³; Hutziméngari Campos-García²; J. Jesús Vargas-Hernández¹.

¹Postgrado en Ciencias Forestales, ²Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Fisiología Vegetal, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5. C. P. 56230. Montecillo, Edo. de México.

Correo-e: marcosjc@colpos.mx Tel.: 595 95 20246 ext. 1454 (*Autor para correspondencia).

³Laboratorio de Fisiología-Biotecnología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Conjunto SEDAGRO. C. P. 52140. Metepec, Estado de México.

Abstract

The seedling variation in four families of *Pinus leiophylla* with different origins was evaluated regarding the reaction to drought, considering water potential variables (Ψ_a), osmotic potential variables (Ψ_o), components and biomass allocation. The families of *P. leiophylla* are located in a seed orchard of the Colegio de Postgraduados in the State of Mexico. The study was done with the purpose of identifying the genotypes resistant to water stress. After 26 days without water, 50 % of the seedlings presented permanent decay in the apex of the stem, with $\Psi_a = -3.35$ MPa and $\Psi_o = -3.23$ MPa, which represented a decrease of 596 and 112 %, respectively, due to drought. The accumulation of biomass was also significantly affected ($P = 0.05$) in the families assessed, with the exception of the family from San Rafael. On average, the biomass of the root of the seedlings in drought was 38 % smaller than that of the seedlings under normal circumstances. The *P. leiophylla* families from San Juan Tetla and Santa María Atepetzingo (both from the state of Puebla) presented a weaker response to the stress imposed, whereas the family from Tlalmanalco (State of Mexico) was the most affected.

Keywords: Water stress, water potential, osmotic potential, biomass allocation.

Resumen

La variación de plántulas de cuatro familias de *Pinus leiophylla* de diferentes procedencias se evaluó en respuesta a la sequía, considerando las variables potencial hídrico (Ψ_a), potencial osmótico (Ψ_o), componentes y asignación de biomasa. Las familias de *P. leiophylla* se localizan en un huerto semillero del Colegio de Postgraduados en el Estado de México. El estudio se hizo con el fin de identificar los genotipos resistentes al estrés hídrico. Después de 26 días sin riego, 50 % de las plántulas presentaron decaimiento permanente del ápice del tallo, con $\Psi_a = -3.35$ MPa y $\Psi_o = -3.23$ MPa, lo que representó disminución de 596 y 112 %, respectivamente, por efecto de la sequía. La acumulación de biomasa también fue afectada significativamente ($P = 0.05$) en las familias evaluadas, a excepción de la procedente de San Rafael. En promedio, la biomasa de la raíz de las plántulas en sequía fue 38 % menor que las plántulas sin sequía. Las familias de *P. leiophylla* provenientes de San Juan Tetla y de Santa María Atepetzingo (ambas del estado de Puebla) presentaron mejor respuesta al estrés impuesto, mientras que la familia de Tlalmanalco (Estado de México) fue la más afectada.

Palabras clave: Estrés hídrico, potencial hídrico, potencial osmótico, asignación de biomasa.

Introduction

Generally, zones to be reforested are open or clear spaces with microclimates and low levels of humidity; therefore, the seedlings in the establishment phase frequently go through water stress. In this phase, the length of the roots is less than 40 cm, and they are therefore in the ground area where the loss of water is rapid due to the infiltration of precipitation, evaporation and competition of other plant species (Su, Li, Liu, & Xu, 2014). Plants under water stress present a series of physiological changes that can indicate damage or resistance or repair mechanisms. These changes can be observed in the water potential, photosynthesis, enzymatic activity, protoplasm, osmotic adjustment and levels of endogenous hormones (Zhu, Li, & Jia, 2011). Variation studies on the response of plants to water stress can provide important information for the identification of genotypes that are resistant to drought; in addition, it could ensure success for reforestation and restoration programs because any adjustment that decreases water content could determine plant survival (Young, Boshier, & Boyle, 2000).

Pinus leiophylla Schiede ex Schlechtendal & Chamisso is an important species that produces resin, included in reforestation and preservation programs of soil due to its ability to settle in poor and stony soils and to its relative resistance to abiotic stress factors (Dvorak, Hodge, & Kietzka, 2007; Jiménez & Zwiazek, 2014; Morales, Ramírez, Delgado, & López, 2010). Although *P. leiophylla* presents a wide natural distribution, its population in the central region of Mexico has been reduced due to the change of soil use (Morales et al., 2010; Richardson et al., 2007).

In 1991, the postgraduate college in Forest Sciences of the Colegio de Postgraduados (CP) established in Montecillo, State of Mexico a *P. leiophylla* seed orchard with 180 specimens of 12 different origins from the central region of the Trans-Mexican Volcanic Belt. The specimens were selected from a progeny study for their *ex situ* conservation and production of germplasm resistant to adverse factors through geographical hybridization. This study was done with material obtained from the same orchard. The objective was to determine the response of *P. leiophylla* to extreme drought and the subsequent recovery in water potential, osmotic potential, dry biomass and biomass allocation. The seedlings correspond to four families selected for their outstanding growth, resistance to *Toumeyella pinicola* (an incident plague in the orchard) and high quality in seed production.

Materials and methods

Plant material

The seeds were collected in 2009 from four families from the *P. leiophylla* seed orchard, whose origins were:

Introducción

Las zonas a reforestar, generalmente, son espacios abiertos o claros que presentan microclimas con bajos contenidos de humedad, por lo que las plántulas en la etapa de establecimiento enfrentan frecuentemente estrés hídrico. En dicha etapa, la longitud de las raíces es menor de 40 cm, de tal modo que se encuentran en la zona del suelo donde el agua se pierde rápidamente por la infiltración de la precipitación, por la evaporación y la competencia de otras especies vegetales (Su, Li, Liu, & Xu, 2014). Las plantas bajo condiciones de estrés hídrico manifiestan una serie de cambios fisiológicos que pueden ser indicadores de daño o mecanismos de resistencia o reparación. Esos cambios se observan en el potencial hídrico, la fotosíntesis, la actividad enzimática, el protoplasma, el ajuste osmótico y el nivel de hormonas endógenas (Zhu, Li, & Jia, 2011). Los estudios de variación en las respuestas de las plantas al estrés hídrico pueden proveer información importante para la identificación de genotipos resistentes a la sequía; además, se aseguraría el éxito de los programas de reforestación y restauración, pues cualquier ajuste que atenúe la reducción del contenido hídrico puede determinar la supervivencia de la planta (Young, Boshier, & Boyle, 2000).

Pinus leiophylla Schiede ex Schlechtendal & Chamisso es una especie importante productora de resina que se incluye en programas de reforestación y conservación de suelos debido a la capacidad para establecerse en suelos pobres y pedregosos y por presentar resistencia relativa a factores de estrés abiótico (Dvorak, Hodge, & Kietzka, 2007; Jiménez & Zwiazek, 2014; Morales, Ramírez, Delgado, & López, 2010). Aunque *P. leiophylla* presenta amplia distribución natural, su población en la región central de México se ha reducido por el cambio de uso de suelo (Morales et al., 2010; Richardson et al., 2007).

En 1991, el Postgrado en Ciencias Forestales del Colegio de Postgraduados (CP) estableció en Montecillo, Estado de México, un huerto semillero de *P. leiophylla* con 180 individuos de 12 procedencias de la región central del Eje Neovolcánico Transversal. Los individuos fueron seleccionados de un estudio de progenie para su conservación *ex situ* y la producción de germoplasma resistente a factores adversos mediante hibridación geográfica. El presente estudio se realizó con material obtenido de dicho huerto. El objetivo fue determinar la respuesta de plántulas de *P. leiophylla* a la sequía extrema y la recuperación posterior en el potencial hídrico, el potencial osmótico, la biomasa seca y la asignación de biomasa. Las plántulas corresponden a cuatro familias seleccionadas por su crecimiento sobresaliente, resistencia a *Toumeyella pinicola* (plaga incidente en el huerto) y alta calidad en la producción de semillas.

San Rafael (SR) and Tlalmanalco (TL), State of Mexico; San Juan Tetla (JT) and Santa María (SM) Atepetzingo, Puebla. Table 1 shows some characteristics of each origin. The seeds germinated (October, 2011) and were transplanted to plastic containers (310 cm³) with a mixture of peat, perlite and vermiculite (ratio 2:1:1). The seeds grew and were kept in greenhouse conditions, watering them with tap water two times per week and fertilizing (20-20-20) every 15 days. A total of 90 seedlings of one year of age were used in total for each of the four families, all in individual rhizotrons formed with two PVC tubes (20 x 10 cm) joined with coupling bands and a net backing. A substrate from the mixture of peat, perlite and vermiculite was used (2:1:1), adding an extended-release fertilizer.

Experimental design

The experiment was developed from December 4, 2012 to January 17, 2013 in a greenhouse at the Montecillo Campus of the CP. The experiment was designed in complete random blocks with an arrangement of divided parcels, with three repetitions. The large parcel corresponded to the humidity level in the substrate and the small parcel corresponded to the family; eight treatments of the combination of the two humidity levels were assessed from the four families. For the control treatment (T), 45 seedlings from each family were kept under an optimal watering regime in order to conserve the substrate with a volumetric humidity (Θ_a) between 65 and 85 %; whereas for the drought treatment (D), the other 45 seedlings had their last watering on day zero of the experiment at 95 % of Θ_a . In the drought treatment, watering was suspended until 50 % of the plants presented permanent wilt signs (26 days after). When these signs were evident, the recovery watering close to 85 % of Θ_a began and lasted for 17 days. The Θ_a was monitored every third day with

Materiales y métodos

Material vegetal

Las semillas se recolectaron en 2009 de cuatro familias del huerto semillero de *P. leiophylla*, cuyas procedencias son: San Rafael (SR) y Tlalmanalco (TL), Estado de México; San Juan Tetla (JT) y Santa María (SM) Atepetzingo, Puebla. El Cuadro 1 muestra algunas características de cada procedencia. Las semillas germinaron (octubre, 2011) y se trasplantaron a contenedores de plástico (310 cm³) con una mezcla de turba, perlita y vermiculita (proporción 2:1:1). Las plántulas crecieron y se mantuvieron en condiciones de invernadero con riegos de agua corriente, dos veces por semana y con fertilización (20-20-20) cada 15 días. En total se utilizaron 90 plántulas de un año de edad de cada una de las cuatro familias en rizotrones individuales formados con dos tubos de PVC (20 x 10 cm) unidos con un cople y con una malla en el fondo. Se utilizó un sustrato de mezcla de turba, perlita y vermiculita (2:1:1), adicionado con fertilizante de liberación prolongada.

Diseño experimental

El experimento se desarrolló del 4 de diciembre de 2012 al 17 enero de 2013 en un invernadero del Campus Montecillo del CP. El experimento tuvo un diseño en bloques completos al azar con arreglo de parcelas divididas, con tres repeticiones. La parcela grande correspondió al nivel de humedad en el sustrato y la parcela chica correspondió a la familia; se evaluaron ocho tratamientos de la combinación de los dos niveles de humedad por las cuatro familias. Para el tratamiento testigo (T), 45 plántulas de cada familia se mantuvieron bajo un régimen de riego óptimo, para conservar el sustrato con una humedad volumétrica

Table 1. Geographical location, altitude and annual precipitation of the places of origin of the four *Pinus leiophylla* families evaluated in the experiment.

Cuadro 1. Localización geográfica, altitud y precipitación anual de las procedencias de cuatro familias de *Pinus leiophylla* evaluadas en el experimento.

Origin/Procedencia	State/Estado	Location/Localización		Altitude (m)/ Altitud (m)	Precipitation (mm)/ Precipitación (mm)
		LN	LW		
Tlalmanalco (TL)	State of Mexico/ Estado de México	19° 11'	98° 47'	2,550	1,072
San Rafael (SR)	State of Mexico/ Estado de México	19° 13'	98° 45'	2,600	1,072
San Juan Tetla (JT)	Puebla	19° 15'	98° 32'	2,550	1,160

a time domain reflectometry sensor (WET Sensor, AT Delta-T Devices Ltd, United Kingdom) in the first 8 cm of the surface of the rhizotron, in one sample of the three plants per family per humidity level. The same plants were always used.

Evaluation of the variables and statistical analysis

The water potential of the stem (Ψ_a) was obtained before sunrise through the pressure balance method (Scholander, Hammel, Bradstreet, & Hemmingsen, 1965) with a Scholander pressure chamber (model 3005, Soilmoisture Equipment Corp., USA). The osmotic potential (Ψ_o) of the needles was calculated through the van't Hoff equation (Taiz & Zeiger, 2006):

$$\Psi_o = -cRT$$

where:

c = Solute concentration ($\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$)

R = General constant of the gases ($0.00831 \text{ kg}\cdot\text{MPa}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$)

T = Absolute temperature (K).

The solute concentration was measured at 20 °C in a vapor pressure osmometer (Vapro, Model-5520, Wescor Inc., USA) from 20 μL of needle sap. The measurements were done in four dates: day 0 (start of the experiment), day 17, day 26 (end of the drought period), and day 44 (last day of the recovery watering period). A random sample of four plants per treatment was used.

The dry biomass of each specimen comprised the root and the aerial part; these were dried on a stove at 70 °C until reaching a constant weight in an analytical scale with a 0.001 g precision (Scout Ohaus, USA). The biomass allocation was estimated with the biomass relation of the root/biomass of the aerial part (r/pa). The sampling (six plants per treatment) was carried out on the same dates as the Ψ_a , with the exception of day 17 of the drought period.

All variables were analyzed with an ANOVA ($P \leq 0.05$). The initial measurements were analyzed with a completely random design and the remaining sampling dates with a completely random block design with a divided parcel arrangement. Subsequently, the measurements were compared with a minimum significant difference (MSD, $P = 0.05$). The data was analyzed with the statistical analysis program Statistix 8 (2005).

Results and discussion

Water and osmotic state of *P. leiophylla*

Figure 1 shows the behavior of the water (Ψ_a) and osmotic (Ψ_o) potential in *P. leiophylla* during the 44 days of evaluation. At the start of the experiment, the

(Θ_a) entre 65 y 85 %; mientras que para el tratamiento de sequía (S), las otras 45 plántulas tuvieron el último riego en el día cero del experimento a 95 % de Θ_a . En el tratamiento de sequía, el riego quedó suspendido hasta que 50 % de las plantas presentó signos de marchitez permanente (26 días después). Cuando dichos signos fueron evidentes, los riegos de recuperación cercanos a 85 % de Θ_a iniciaron y se mantuvieron durante 17 días. La Θ_a fue monitoreada cada tercer día con un sensor de reflectometría de dominio temporal (WET Sensor, AT Delta-T Devices Ltd, Reino Unido) en los primeros 8 cm de la superficie del rizotrófon, en una muestra de tres plantas por familia por nivel de humedad; se utilizaron siempre las mismas plantas.

Evaluación de las variables y análisis estadístico

El potencial hídrico del tallo (Ψ_a) se obtuvo antes del amanecer mediante el método de balance de presiones (Scholander, Hammel, Bradstreet, & Hemmingsen, 1965) con una cámara de presión tipo Scholander (modelo 3005, Soilmoisture Equipment Corp., EUA). El potencial osmótico (Ψ_o) de las acículas se calculó a partir de la ecuación de van't Hoff (Taiz & Zeiger, 2006):

$$\Psi_o = -cRT$$

donde:

c = Concentración de solutos ($\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$)

R = Constante general de los gases ($0.00831 \text{ kg}\cdot\text{MPa}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$)

T = Temperatura absoluta (K).

La concentración de solutos se midió a 20 °C en un osmómetro de presión de vapor (Vapro, Modelo-5520, Wescor Inc., EUA) a partir de 20 μL de savia de acícula. Las mediciones se realizaron en cuatro fechas: día 0 (inicio de experimento), día 17, día 26 (final del periodo de sequía) y día 44 (último día del periodo de riego de recuperación). Se utilizó una muestra aleatoria de cuatro plantas por tratamiento.

La biomasa seca de cada individuo comprendió la raíz y la parte aérea; éstas se secaron en una estufa a 70 °C hasta alcanzar peso constante en una balanza analítica con precisión de 0.001 g (Scout Ohaus, EUA). La asignación de la biomasa se estimó con la relación biomasa de la raíz/biomasa de la parte aérea (r/pa). El muestreo (seis plantas por tratamiento) se hizo en las mismas fechas que el Ψ_a , con excepción del día 17 del periodo de sequía.

Todas las variables se analizaron con un ANOVA ($P \leq 0.05$); las mediciones iniciales con un diseño completamente al azar y las fechas de muestreo restantes con un diseño en bloques completamente al azar con arreglo de parcelas divididas. Posteriormente, las medias se compararon por diferencia mínima significativa (DMS,

seedlings presented a Ψ_a of -0.38 at -0.43 MPa and a Ψ_o of -1.68 at -1.91 MPa. Cuadro 2 shows that there was no statistical difference among the four families. The progressive water stress caused the gradual increase of the tension with which the water was retained in the xylem. This tension resulted in the foliar demand to replace the lost water to the atmosphere through transpiration during the day and the inability of the roots to absorb enough water from the ground (Tai & Zeiger, 2006).

On day 17, the average Ψ_a of the control seedlings (between -0.44 and -0.53 MPa) was statistically equal among the families, whereas in drought conditions, the seedlings of the SM family presented a Ψ_a statistically higher (less negative) than the rest of the families (Figure 1). The Ψ_a of the seedlings in drought decreased 307, 373, 405 and 450 % in the SM, JT, SR and TL families, respectively, in relation to the control seedlings, indicating considerably severe water stress (Prieto et al., 2004). On the other hand, the Ψ_o was also statistically equal among families, whereas in the seedlings in drought it decreased 41, 42, 59 and 62 % in SM, SR, JT and TL, respectively, with relation to the control seedlings. On day 17, the Ψ_o had not yet decreased in such an abrupt manner as the Ψ_a and both were close, which indirectly indicated that the loss of water content caused a decrease mainly in the turgor potential (Steudle, 1993). Turgor loss is extremely sensitive to water deficit; it is the first biophysical effect (Taiz & Zeiger, 2006), and in the case of guard cells, it is one of the factors that regulates the closure of stomata (Su et al., 2014).

After 26 days of treatment, the Ψ_a of the seedlings in drought (between -2.6 and -5 MPa) reflected extreme water stress, considered in woody plants from -2.5 MPa (Landis, 1989). The difference of the Ψ_a between seedlings in both levels of humidity increased significantly; the Ψ_a decreased 522 % in SM, 553 % in JT, 589 % in SR and 720 % in TL compared to the control seedlings (in normal conditions). The foregoing could mean a relative resistance to drought of *P. leiophylla* in comparison to other conifers. The descent limit of Ψ_a that the woody species resist without presenting irreversible physical damage varies with the species. In *Pinus engelmannii* Carr. seedlings that are five months old, decay of the apical sprout has been observed between -2.4 and -1.7 MPa (Prieto et al., 2004); while in olive varieties (*Olea europaea* L.) it has been registered up to 6.5 MPa after 21 days without water (Sofa, 2011). Regarding the Ψ_o in drought conditions, JT and SR presented a Ψ_o (-3.4 MPa) significantly smaller ($P = 0.05$) than the rest of the families (Figure 1). The Ψ_o of the control seedlings was statistically the same ($P > 0.05$) among the families (between -1.47 and -1.56 MPa). The decrease caused by the water deficit was 97 % for the

$P = 0.05$). Los datos se analizaron con el programa de análisis estadístico Statistix 8 (2005).

Resultados y discusión

Estado hídrico y osmótico de *P. leiophylla*

La Figura 1 muestra el comportamiento del potencial hídrico (Ψ_a) y osmótico (Ψ_o) en *P. leiophylla* durante los 44 días de evaluación. Al inicio del experimento, las plántulas presentaron Ψ_a de -0.38 a -0.43 MPa y Ψ_o de -1.68 a -1.91 MPa; el Cuadro 2 demuestra que no hubo diferencias estadísticas entre las cuatro familias. El estrés hídrico progresivo provocó el aumento paulatino de la tensión con la que el agua es retenida en el xilema. Esta tensión resulta de la demanda foliar para reemplazar el agua perdida hacia la atmósfera por transpiración durante el día y de la incapacidad de las raíces para absorber agua suficiente del suelo (Taiz & Zeiger, 2006).

Para el día 17, el Ψ_a promedio de las plántulas testigo (entre -0.44 y -0.53 MPa) fue estadísticamente igual entre las familias, mientras que en condiciones de sequía, las plántulas de la familia SM presentaron Ψ_a estadísticamente mayor (menos negativo) que el resto de las familias (Figura 1). El Ψ_a de las plántulas en sequía disminuyó 307, 373, 405 y 450 % en las familias SM, JT, SR y TL, respectivamente, con relación a las plántulas testigo, denotando estrés hídrico considerablemente severo (Prieto et al., 2004). Por otra parte, el Ψ_o también fue estadísticamente igual entre familias, mientras que en las plántulas con sequía disminuyó 41, 42, 59 y 62 % en SM, SR, JT y TL, respectivamente, con relación al testigo. En el día 17, el Ψ_o aún no había disminuido tan abruptamente como el Ψ_a y ambos se encontraban cercanos, lo cual señala indirectamente que la pérdida del contenido del agua provocó disminución principalmente en el potencial de turgencia (Steudle, 1993). La pérdida de turgencia es extremadamente sensible al déficit hídrico; es el primer efecto biofísico (Taiz & Zeiger, 2006) y en las células guarda es uno de los factores que regulan el cierre estomático (Su et al., 2014).

Después de 26 días de tratamiento, el Ψ_a de las plántulas en sequía (entre -2.6 y -5 MPa) reflejó estrés hídrico extremo, considerado así en plantas leñosas a partir de -2.5 MPa (Landis, 1989). Las diferencias del Ψ_a entre las plántulas en los dos niveles de humedad se incrementaron en gran medida; el Ψ_a disminuyó 522 % en SM, 553 % en JT, 589 % en SR y 720 % en TL con respecto a las plántulas testigo (sin sequía). Lo anterior puede significar relativa resistencia a la sequía de *P. leiophylla* en comparación con otras coníferas. El límite de descenso del Ψ_a que las especies leñosas resisten sin presentar daños físicos irreversibles

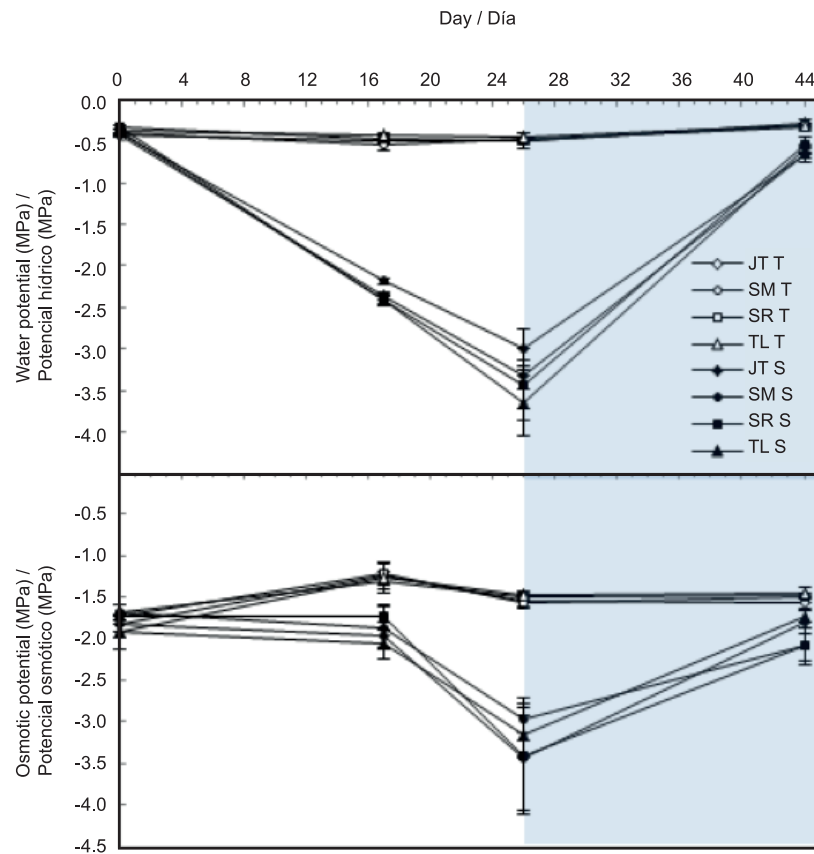


Figure 1. Water potential of the stem and osmotic potential of the seedling needles from four families (JT = San Juan Tetla, SM = Santa María, SR = San Rafael y TL = Tlalmanalco) of *Pinus leiophylla*, under drought treatments (D) and normal treatments (T), during a period of 26 days of progressive drought and another period of 17 days with recovery watering (shade). The bars represent the standard error of the mean (n = 6).

Figura 1. Potencial hídrico del tallo y potencial osmótico de las acículas de plántulas de cuatro familias (JT = San Juan Tetla, SM = Santa María, SR = San Rafael y TL = Tlalmanalco) de *Pinus leiophylla*, bajo tratamientos de sequía (S) y sin sequía (T), durante un periodo de 26 días de sequía progresiva y otro de 17 días con riegos de recuperación (sombreado). Las barras representan el error estándar de la media (n = 6).

Table 2. ANOVA of the water potential of the stem and the osmotic potential of the seedling needles from four families (F) of *Pinus leiophylla* exposed to two humidity levels (HL) during a period of 26 days of progressive drought (0, 17 and 26) and a period of 17 days with recovery watering (17R).

Cuadro 2. ANOVA del potencial hídrico del tallo y del potencial osmótico de las acículas de plántulas de cuatro familias (F) de *Pinus leiophylla* expuestas a dos niveles de humedad (NH), durante un periodo de 26 días de sequía progresiva (0, 17 y 26) y un periodo de 17 días con riegos de recuperación (17R).

Variation source / Fuente de variación	Water potential /Potencial hídrico				Osmotic potential /Potencial osmótico			
	Day 0 / Día 0	Day 17 / Día 17	Day 26 / Día 26	Day 17R / Día 17R	Day 0 / Día 0	Day 17 / Día 17	Day 26 / Día 26	Day 17R / Día 17R
Humidity level / Nivel de humedad	-	0.000*	0.000*	0.000*	-	0.000*	0.000*	0.000*
Family / Familia	0.205	0.454	0.729	0.675	0.579	0.755	0.001*	0.352
HL x F / NH x F	-	0.023*	0.666	0.703	-	0.835	0.001*	0.290

*Significant differences (MSD, $P = 0.05$).

*Diferencias significativas (DMS, $P = 0.05$).

SM family, 114 % for TL, 119 % for SR and 122 % for JT, which indicates a higher concentration of the solutes in the cells of the plants in drought. This could be due to the decrease in the cellular volume by the loss of water of the turgor pressure or the total increase of osmotically active substances (inorganic ions, organic acids, carbohydrates and amino acids) that could be associated with protective functions against the dehydration of the cell walls (Sander & Arndt, 2012). Major and Johnson (2001) found differences in the Ψ_o between families of *Picea mariana* Mill. trees; the most tolerant to water deficit with a higher osmotic adjustment presented lower Ψ_o , even when there were no inter-family differences in the Ψ_a . Shvaleva et al. (2005) evaluated clones of *Eucalyptus globulus* Labill. of 11 months of age and reported a decrease between 43 and 75 % of the Ψ_o (between -1.14 and -1.19 MPa) due to the effect of the water deficit.

The standard error of the seedlings under the drought treatment was higher in accordance to the availability of water and it decreased in the substrate. This indicates, up until a certain limit, that the stronger the intensity of the drought, the higher phenotypical variation in response to the stress between specimens of the same family (Ψ_a and Ψ_o) and between families of *P. leiophylla* (in the case of Ψ_o). This behavior was also observed in *E. globulus* by Shvaleva et al. (2005).

On day 27, recovery watering began, and 17 days after, the last sampling procedure was done. Even though the differences of Ψ_a were significant ($P < 0.05$) among the levels of humidity in all families, said potential decreased significantly in the tension units, indicating a recovery tendency. The Ψ_a of the seedlings of the SM, TL, SR and JT families with water stress was 82, 90, 97 and 132 % smaller, respectively, than that of the control seedlings. The Ψ_o of the seedlings of the SM and SR families remained smaller (40 %) than that of their corresponding control, whereas the seedlings of the JT and TL families recovered completely.

Components and biomass allocation in *P. leiophylla*

Tables 3 and 4 indicate that at the start of the experiment, the seedlings of the four families of *P. leiophylla* had statistically the same biomass, both in the root and in the aerial part and in the r/pa relation (0.27). The values indicate that there was a smaller allocation of dry biomass for the root in comparison to the aerial part, which could be due to their growth in containers with limited volume.

The progressive water deficit of 26 days affected the accumulation of biomass in three families of *P. leiophylla* in drought conditions in comparison to the control (Table 5); it restricted the growth of the root (23 %) of the JT family seedlings, it facilitated the increase (36 %)

varía con la especie. En plántulas de *Pinus engelmannii* Carr. de cinco meses de edad se ha visto decaimiento de la yema apical entre -2.4 y -1.7 MPa (Prieto et al., 2004); mientras que en variedades de olivo (*Olea europaea* L.) se han registrado hasta -6.5 MPa después de 21 días sin riego (Sofó, 2011). Con respecto al Ψ_o , en condiciones de sequía, JT y SR presentaron Ψ_o (-3.4 MPa) significativamente menor ($P = 0.05$) que el resto de las familias (Figura 1). El Ψ_o de las plántulas testigo fue estadísticamente igual ($P > 0.05$) entre las familias (entre -1.47 y -1.56 MPa). La disminución por efecto del déficit hídrico fue de 97 % para la familia SM, 114 % para TL, 119 % para SR y 122 % para JT, lo cual indica mayor concentración de los solutos en las células de las plantas bajo sequía. Posiblemente esto se deba a la reducción del volumen celular por la pérdida de agua de la presión de turgencia o del incremento neto de sustancias osmóticamente activas (iones inorgánicos, ácidos orgánicos, carbohidratos y aminoácidos) que pudieran estar asociadas con funciones protectoras contra la deshidratación de las membranas celulares (Sanders & Arndt, 2012). Major y Johnson (2001) encontraron diferencias en el Ψ_o entre familias de árboles de *Picea mariana* Mill.; las más tolerantes al déficit hídrico con mayor ajuste osmótico presentaron Ψ_o más bajos, aun cuando no se encontraron diferencias interfamiliares en el Ψ_a . Shvaleva et al. (2005) evaluaron clones de *Eucalyptus globulus* Labill. de 11 meses de edad y reportaron disminución entre 43 y 75 % del Ψ_o (entre -1.14 y -1.19 MPa) por efecto del déficit hídrico.

El error estándar de las plántulas del tratamiento de sequía fue mayor conforme la disponibilidad de agua y en el sustrato disminuyó. Esto indica, hasta cierto límite, que entre más intensa sea la sequía, se expresa mayor variación fenotípica en la respuesta al estrés entre los individuos de la misma familia (Ψ_a y Ψ_o) y entre familias de *P. leiophylla* (para el caso de Ψ_o). Este comportamiento también se observó en *E. globulus* por Shvaleva et al. (2005).

El día 27 se comenzaron a aplicar los riegos de recuperación y 17 días después se hizo el último muestreo. Aunque las diferencias de Ψ_a fueron significativas ($P < 0.05$) entre los niveles de humedad en todas las familias, dicho potencial disminuyó en gran medida en unidades de tensión, indicando tendencia de recuperación. El Ψ_a de las plántulas de las familias SM, TL, SR y JT con estrés hídrico fue 82, 90, 97 y 132 % menor, respectivamente, que las plántulas testigo. El Ψ_o de las plántulas de las familias SM y SR permaneció menor (40 %) que el de su testigo correspondiente, mientras que las plántulas de las familias JT y TL se recuperaron totalmente.

Componentes y asignación de la biomasa en *P. leiophylla*

Los Cuadros 3 y 4 señalan que al inicio del experimento, las plántulas de las cuatro familias de *P. leiophylla*

Table 3. ANOVA of the dry biomass of seedlings from four families (F) of *Pinus leiophylla* exposed to two humidity levels (HL), during a period of 26 days of progressive drought and a period of 17 days with recovery watering (17R).

Cuadro 3. ANOVA de la biomasa seca de plántulas de cuatro familias (F) de *Pinus leiophylla* expuestas a dos niveles de humedad (NH), durante un periodo de 26 días de sequía progresiva y un periodo de 17 días con riegos de recuperación (17R).

Variation source / Fuente de variación	Day 0 / Día 0			Day 26 / Día 26			Day 17R / Día 17R		
	Root / Raíz	Aerial part / Parte aérea	Root / Aerial part / Raíz / Parte aérea	Root / Raíz	Aerial part / Parte aérea	Root / Aerial part / Raíz / Parte aérea	Root / Raíz	Aerial part / Parte aérea	Root / Aerial part / Raíz / Parte aérea
HL / NH	-	-	-	0.480	0.009*	0.095	0.000*	0.000*	0.000*
F	0.660	0.999	0.664	0.646	0.892	0.633	0.271	0.284	0.943
HL x F / NH x F	-	-	-	0.007*	0.203	0.071	0.093	0.502	0.651

**Significant differences (MSD, $P = 0.05$).

**Diferencias significativas (DMS, $P = 0.05$).

Table 4. Comparison of measurements of the initial dry biomass of seedlings from four families of *Pinus leiophylla*.

Cuadro 4. Comparación de medias de la biomasa seca inicial de plántulas de cuatro familias de *Pinus leiophylla*.

Family / Familia	Root (g) / Raíz (g)	Aerial part (g) / Parte aérea (g)	Root / Aerial part (g) / Raíz / Parte aérea (g)
San Juan Tetla (JT)	1.13 ± 0.08 a	4.26 ± 0.27 a	0.27 ± 0.01 a
Santa María Atepetzingo (SM)	1.20 ± 0.10 a	4.23 ± 0.21 a	0.28 ± 0.01 a
San Rafael (SR)	1.16 ± 0.13 a	4.26 ± 0.18 a	0.28 ± 0.04 a
Tlalmanalco (TL)	1.02 ± 0.11 a	4.22 ± 0.39 a	0.25 ± 0.02 a
MSD / DMS	0.308	0.814	0.066

± Standard error of the mean (n = 6).

± Error estándar de la media (n = 6).

of the root in the SM family and restricted the aerial part (27 %) of the TL seedlings. The SR family did not present any impact on their biomass. In the drought treatment, the JT family had a smaller biomass on the root and the SM family had a larger biomass, whereas in the control treatment, the seedlings of the SM family had a smaller root biomass. At the same time, the aerial part of the seedlings had statistically similar biomass on a familial level. Furthermore, the proportion in the biomass allocation between the root and the aerial part was not significantly affected ($P < 0.05$) in any of the families. In comparative studies of several species of pines, no significant changes were observed in the r/pa relation after a similar drought period (Prieto et al., 2004). However, a significant increase in the r/pa

tuvieron biomasa estadísticamente igual, tanto en la raíz como en la parte aérea y en la relación r/pa (0.27). Los valores indican que hubo menor asignación de biomasa seca hacia la raíz en comparación con la parte aérea, lo cual podría ser producto del crecimiento en contenedores con volumen limitado.

El déficit hídrico gradual durante 26 días afectó la acumulación de biomasa en tres familias de *P. leiophylla* bajo sequía con respecto al testigo (Cuadro 5); restringió el crecimiento de la raíz (23 %) de las plántulas de la familia JT, propició el incremento (36 %) de la raíz en la familia SM y restringió la parte aérea (27 %) de las plántulas de TL. La familia SR no presentó afectación en la biomasa. En el tratamiento de sequía, la familia

relation in favor of the radical system in *P. leiophylla* (Martínez, Vargas, López, & Muñoz, 2002), *Eucalyptus microtheca* F. Muell. (Susiluoto & Berninger, 2007), *P. pinceana* Gordo. (Martíñón, Vargas, López, Gómez, & Vaquera, 2010) and *Quercus brantii* Lindl. (Zolfaghari, Fayyaz, Nazari, & Valladares, 2013) seedlings has been reported. The increase can be caused by a longer period of water stress, which has been considered to be a resistance mechanism to drought, when maintaining a more beneficial balance between the absorption capacity and the use of water (Duan, Yin, & Li, 2005). In this study, the tendency to allocate more biomass to the root was observed in the SM family.

The results of this study were probably influenced by the period in which it was developed, since the cellular elongation of the apical meristems decreases in winter, in order to enter latency. In addition to the small evaluation period, Xu, Zhou, and Shimizu (2010) indicate that the regulation capacity through the asymmetric growth could be abruptly lost when the plants are subjected to extreme drought. This implies that there could be a soil humidity threshold in response to the biomass allocation during water stress. At the end of the recovery period, the seedlings

JT tuvo la menor biomasa de la raíz y la familia SM tuvo la mayor, mientras que en el tratamiento testigo, las plántulas de la familia SM tuvieron la menor biomasa de raíz. Al mismo tiempo, la parte aérea de las plántulas tuvo biomasa estadísticamente similar a nivel de familia. Por otra parte, la proporción en la asignación de la biomasa entre la raíz y la parte aérea no se afectó significativamente ($P > 0.05$) en alguna familia. En estudios comparativos de varias especies de pinos no se observaron cambios significativos en la relación r/pa después de un periodo similar de sequía (Prieto et al., 2004). No obstante, se ha reportado el aumento significativo en la relación r/pa en favor del sistema radical en plántulas de *P. leiophylla* (Martínez, Vargas, López, & Muñoz, 2002), *Eucalyptus microtheca* F. Muell. (Susiluoto & Berninger, 2007), *P. pinceana* Gordo. (Martíñón, Vargas, López, Gómez, & Vaquera, 2010) y *Quercus brantii* Lindl. (Zolfaghari, Fayyaz, Nazari, & Valladares, 2013). El aumento puede ser efecto de estrés hídrico más prolongado, lo que se ha considerado un mecanismo de resistencia a la sequía, al mantener equilibrio más favorable entre la capacidad de absorción y uso del agua (Duan, Yin, & Li, 2005). En este estudio, la tendencia de asignar mayor biomasa a la raíz se observó en la familia SM.

Table 5. Comparison of measurements of the final dry biomass (day 26) of the *Pinus leiophylla* seedlings under two humidity conditions in the substrate: drought (D) and normal circumstances (T).

Cuadro 5. Comparación de medias de la biomasa seca final (día 26) de plántulas de *Pinus leiophylla*, bajo dos condiciones de humedad en el sustrato: sequía (S) y sin sequía (T).

Family/Familia	Humidity level/ Nivel de humedad	Root (g)/ Raíz (g)	Aerial part (g)/ Parte aérea (g)	Root/Aerial part (g)/ Raíz/Parte aérea (g)
JT	T	1.60 ± 0.11 a	4.74 ± 0.32 a	0.34 ± 0.03 a
JT	D	1.23 ± 0.05 bc	4.20 ± 0.38 ab	0.30 ± 0.03 a
SM	T	1.14 ± 0.10 c	4.56 ± 0.32 ab	0.25 ± 0.02 a
SM	D	1.54 ± 0.11 a	4.47 ± 0.28 ab	0.35 ± 0.03 a
SR	T	1.51 ± 0.11 ab	4.81 ± 0.34 a	0.32 ± 0.03 a
SR	D	1.43 ± 0.10 abc	4.43 ± 0.21 ab	0.32 ± 0.01 a
TL	T	1.52 ± 0.14 ab	5.07 ± 0.33 a	0.30 ± 0.02 a
TL	D	1.35 ± 0.11 abc	3.70 ± 0.22 b	0.37 ± 0.04 a
MSD/DMS		0.306	0.874	0.134

JT = San Juan Tetla, SM = Santa María, SR = San Rafael and TL = Tlalmanalco.

± Standard error of the mean (n = 6). The change of letter in the same column indicates a minimum significant difference between the mean (MSD, $P = 0.05$).

JT = San Juan Tetla, SM = Santa María, SR = San Rafael y TL = Tlalmanalco.

± Error estándar de la media (n = 6). Letra distinta en la misma columna indica diferencia mínima significativa entre las medias (DMS, $P = 0.05$).

showed a limitation in the accumulation of root and aerial biomass as a result of the previous drought period (Cuadro 6), possibly determined by a decrease in the CO₂ assimilation rates, due to a reduced stomatal conductance (Ramachandra, Viswanatha, & Vivekanandan, 2004). Due to the previous drought period, the TL, SM, SR and JT family seedlings had a root that was 30, 36, 41 and 48 % smaller, respectively, and an aerial part that was 24, 12, 19, and 16 % smaller, respectively, in comparison to the seedlings from the control treatment. A decrease in the biomass allocation for almost all of the families, with the exception of TL, was also recorded. The difference in the r/pa relation of the JT, SM and SR in drought was 32, 27 and 28 % respectively, regarding the treatment under normal circumstances.

Los resultados del presente estudio probablemente estén influenciados por la época en que se desarrolló, pues la elongación celular de los meristemos apicales disminuye en el invierno, para entrar en latencia. Además del corto periodo de evaluación, Xu, Zhou, y Shimizu (2010) señalan que la capacidad de regulación a través del crecimiento asimétrico podría perderse abruptamente cuando las plantas están sujetas a sequía extrema. Esto implica que podría existir un umbral de la humedad del suelo en la respuesta de la asignación de biomasa al estrés hídrico.

Al final del periodo de recuperación, las plántulas mostraron limitación en la acumulación de biomasa de raíz y de la parte aérea como resultado del periodo previo de sequía extrema (Cuadro 6), posiblemente determinada

Table 6. Comparison of measurements of the dry biomass of *Pinus leiophylla* seedlings under two humidity conditions: drought (D) and normal (T), after the 17 day period with recovery watering (day 27- day 44).
Cuadro 6. Comparación de medias de la biomasa seca de plántulas de *Pinus leiophylla*, bajo dos condiciones de humedad: sequía (S) y sin sequía (T), después del periodo de 17 días de riegos de recuperación (día 27-día 44).

Family/Familia	Humidity level/ Nivel de humedad	Root(g)/ Raíz (g)	Aerial part (g)/ Parte aérea (g)	Root/Aerial part (g)/ Raíz/Parte aérea (g)
JT	T	2.19 ± 0.19 a	5.36 ± 0.33 a	0.41 ± 0.04 a
JT	D	1.14 ± 0.06 c	4.09 ± 0.27 c	0.28 ± 0.02 c
SM	T	1.80 ± 0.11 b	4.55 ± 0.23 bc	0.40 ± 0.03 a
SM	D	1.15 ± 0.05 c	3.98 ± 0.29 c	0.30 ± 0.02 bc
SR	T	1.92 ± 0.07 ab	4.99 ± 0.24 ab	0.39 ± 0.03 a
SR	D	1.14 ± 0.10 c	4.05 ± 0.15 c	0.28 ± 0.02 c
TL	T	1.76 ± 0.10 b	4.78 ± 0.18 ab	0.37 ± 0.02 ab
TL	D	1.22 ± 0.12 c	4.02 ± 0.20 c	0.31 ± 0.03 bc
MSD/DMS		0.300	0.698	0.081

JT = San Juan Tetla, SM = Santa María, SR = San Rafael y TL = Tlalmanalco.

± Standard error of the mean (n = 6). The change of letter in the same column indicates a minimum significant difference between the mean (MSD, P = 0.05).

JT = San Juan Tetla, SM = Santa María, SR = San Rafael y TL = Tlalmanalco.

± Error estándar de la media (n = 6). Letra distinta en la misma columna indica diferencia mínima significativa entre las medias (DMS, P = 0.05).

Conclusions

After 26 days without water, 50 % of the *Pinus leiophylla* seedlings of the four families withstood an extreme drought of up to -3.35 MPa of Ψ_a without presenting any permanent wilt, showing a decrease of 112 % of the Ψ_0 and 12 % in the accumulation of biomass in the aerial part, and a variable effect for each family on the root and the r/pa. The response to drought depended on the family. The JT family manifested a higher osmotic sensitivity; the SM took longer to be affected than the others, keeping the best water status at the end of the drought since it was the only one that increased the biomass of the root. On the other hand, the SR family showed the best recovery, even when the accumulation of biomass of the root and of the aerial part was limited. The seedlings of the TL family were the most affected even though they showed an efficient recovery capacity. Consequently, the JT and SM families could have the highest survival capacity in the field, under limited conditions of humidity.

Acknowledgements

To the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) and the Colegio de Postgraduados for the funding given to carry out this study. To Dr. Carlos Trejo López, Dr. Armando Gómez Guerrero, Dr. Víctor M. Ordaz Chaparro and Luis Méndez Hidalgo for their counseling and the material and technical support they provided.

End of English version

References / Referencias

- Duan, B., Yin, C., & Li, C. (2005). Responses of conifers to drought stress. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 11, 115–122. Obtenido de <http://www.cibj.com/Upload/PaperUpload/ebook/2005/001/27.pdf>
- Dvorak, W. S., Hodge, G. R., & Kietzka, J. E. (2007). Genetic variation in survival, growth, and stem form of *Pinus leiophylla* in Brazil and South Africa and provenances resistance to pitch canker. *Southern Forest*, 67, 125–135. doi: 10.2989/SHFJ.2007.69.3.1.351#.VASOr21yce8
- Major, J. E., & Johnson, K. H. (2001). Shoot water relations of mature black spruce families displaying a genotype x environment interaction in growth rate. III: Diurnal patterns as influenced by vapor pressure deficit and internal water status. *Tree Physiology*, 21, 579–587. doi: 10.1093/treephys/21.9.579
- Martínez, T. T., Vargas, H. J. J., López, U. J., & Muñoz, O. A. (2002). Respuesta al déficit hídrico en *Pinus leiophylla*: Acumulación de biomasa, desarrollo de hojas

por una disminución en las tasas de asimilación de CO_2 , debido a una conductancia estomática reducida (Ramachandra, Viswanatha, & Vivekanandan, 2004). Por efecto del periodo de sequía previo, las plántulas de las familias TL, SM, SR y JT tuvieron una raíz 30, 36, 41 y 48 % menor, respectivamente, y una parte aérea 24, 12, 19 y 16 % menor, respectivamente, que las plántulas del tratamiento testigo. También se registró una disminución en la asignación de biomasa para casi todas las familias con excepción de TL. La diferencia en la relación r/pa de las familias JT, SM y SR bajo sequía fue 32, 27 y 28 %, respectivamente, con respecto al tratamiento sin sequía.

Conclusiones

Después de 26 días sin riego, 50 % de las plántulas de *Pinus leiophylla* de las cuatro familias resistieron una sequía extrema de hasta -3.35 MPa de Ψ_a sin presentar marchitez permanente, presentando disminución de 112 % del Ψ_0 y 12 % en la acumulación de biomasa en la parte aérea, y un efecto variable para cada familia sobre la raíz y la r/pa. La respuesta a la sequía dependió de la familia. La familia JT manifestó mayor sensibilidad osmótica; la familia SM tardó más días en ser afectada que las demás, manteniendo el mejor estado hídrico al final de la sequía, pues fue la única que aumentó la biomasa de la raíz. Por otra parte, la familia SR presentó la mejor recuperación, aun cuando la acumulación de biomasa de raíz y de la parte aérea fue limitada. Las plántulas de la familia TL fueron las más afectadas aunque presentaron buena capacidad de recuperación. Por lo anterior, las familias JT y SM podrían tener mayor capacidad para sobrevivir en campo, bajo condiciones limitadas de humedad.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Colegio de Postgraduados por el financiamiento para llevar a cabo este estudio. Al Dr. Carlos Trejo López, al Dr. Armando Gómez Guerrero, al Dr. Víctor M. Ordaz Chaparro y al Sr. Luis Méndez Hidalgo por la asesoría y el apoyo material y técnico brindado.

Fin de la versión en español

- secundarias y mortandad de plántulas. *Terra*, 20, 291–301. Obtenido de <http://www.chapingo.mx/terra/contenido/20/3/art291-301.pdf>
- Martiñón, M. R. J., Vargas H. J. J., López, U. J., Gómez, G. A., & Vaquera, H. H. (2010). Respuesta de *Pinus pinceana* Gordon a estrés por sequía y altas temperaturas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 33, 239–248. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v33n3/v33n3a8.pdf>
- Morales, V. M. G., Ramírez, M. C. A., Delgado, V. P., & López, U. J. (2010). Indicadores reproductivos de *Pinus leiophylla* Schlttdl. et Cham. en la cuenca del río Angulo, Michoacán. *Revista Mexicana Ciencias Forestales*, 1, 31–38. Obtenido de <http://revistas.inifap.gob.mx/index.php/Forestales/article/view/154/145>
- Jiménez, C. M., & Zwiazek, J. J. (2014). Adventitious sprouting of *Pinus leiophylla* in response to salt stress. *Annals of Forest Science*, 71, 811–819. doi: 10.1007/s13595-014-0379-z
- Landis, T. D. (1989). Irrigation and water management. In T. D. Landis, R. W. Tinus, S. E. McDonald, & J. P. Barnett, (Eds.), *The container tree nursery manual* (vol. IV, pp. 69–118). Washington: US Department of Agriculture, Forest Service. Obtenido de http://admin.rngr.net/publications/ctnm/volume-4/vol_4_chapter_2.pdf
- Prieto, R. J., Cornejo, O. E., Domínguez, C. P., Nívar, J. J., Marmolejo, M. J., & Jiménez, P. J. (2004). Estrés hídrico en *Pinus engelmannii* Carr. producido en vivero. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales*, 13, 443–451. Obtenido de <http://recyt.fecyt.es/index.php/IA/article/view/2386/1782>
- Ramachandra, R. A., Viswanatha, C. K., & Vivekanandan, M. (2004). Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 161, 1189–1202. doi: 10.1016/j.jplph.2004.01.013
- Richardson, D. M., Rundel, P. W., Jackson, S. T., Teskey, R. O., Aronson, J., Bytnerowicz, A., & Procheş, S. (2007). Human impacts in pine forests: Past, present and future. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 38, 275–297. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095650
- Sanders, G. J., & Arndt, S. K. (2012). Osmotic adjustment under drought conditions. In R. Arcona (Ed.), *Plant responses to drought stress: From morphological to molecular features* (pp. 199–229). Berlin, Germany: Springer Berlin Heidelberg.
- Scholander, P. F., Hammel, H. T., Bradstreet, E. D., & Hemmingsen, E. (1965). Sap pressure in vascular plants. *Science*, 148, 339–346. doi: 10.1126/science.148.3668.339
- Shvaleyva, A. L., Silva, C. E., Breia, E., Jouve, L., Hausman, J. F., Almeida, M. H., ...Chaves, M. M. (2005). Metabolic responses to water deficit in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought sensitivity. *Tree Physiology*, 26, 239–248. doi: 10.1093/treephys/26.2.239
- Sofo, A. (2011). Drought stress tolerance and photoprotection in two varieties of olive tree. *Acta agriculturae Scandinavica*, 61, 11–720. doi:10.1080/09064710.2010.545071
- Statistix 8. (2005). Statistix. Data analysis software for researchers. Tallahassee, FL, USA: Analytical Software.
- Steudle, E. (1993). Pressure probe technique: Basic principles and application to studies of water and solute relations at the cell, tissue and organ level. In J. A. C. Smith, & H. Griffiths (Eds.), *Water deficits plant responses from cell to community* (pp. 5–31). London: Bios Scientific Publishers Limited.
- Su, H., Li, Y., Liu, W., & Xu, H. (2014). Changes in water use with growth in *Ulmus pumila* in semiarid sandy land of northern China. *Trees Structure and Function*, 28, 41–52. doi: 10.1007/s00468-013-0928-3
- Susiluoto, S., & Berninger, F. (2007). Interactions between morphological and physiological drought responses in *Eucalyptus microtheca*. *Silva Fennica*, 41, 221–229. doi: 10.14214/sf.292
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal* (3a. ed.). Castelló de la Plana: Universitat Jaume I.
- Xu, Z., Zhou, G., & Shimizu, H. (2010). Plant responses to drought and rewatering. *Plant Signaling & Behavior*, 5, 649–654. doi: 10.4161/psb.5.6.11398
- Young, R. A., Boshier, D., & Boyle, T. (2000). *Forest conservation genetics: Principles and practice*. Australia: Csiro Publishing.
- Zhu, Y. J., Li, L., & Jia, Z. Q. (2011). Research advances on drought resistance mechanism of plant species in arid zones of China. *Sciences in Cold and Arid Regions*, 3, 448–454. doi: 10.3724/SP.J.1226.2011.00448
- Zolfaghari, F., Fayyaz, P., Nazari, M., & Valladares, F. (2013). Interactive effects of seed size and drought stress on growth and allocation of *Quercus brantii* Lindl. seedlings from two provenances. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37, 361–368. Obtenido de <http://journals.tubitak.gov.tr/agriculture/issues/tar-13-37-3/tar-37-3-13-1206-54.pdf>