



Universidad Nacional de Cuyo

Facultad de Ciencias Agrarias

**Respuestas productivas, vegetativas y metabólicas del
nogal (*Juglans regia* L.) en seto a distintos regímenes
hídricos en un ambiente semiárido del Noroeste de
Argentina**

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Agronomía

Franco Emmanuel Calvo

Ingeniero Agrónomo

Luján de Cuyo, 2023

Director

Eduardo Rafael Trentacoste

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional de Cuyo)

Maestría en Producción Vegetal (Universidad Nacional de Mar del Plata)

Doctorado en Tecnología Agroambiental para una Agricultura Sostenible
(Universidad Politécnica de Madrid)

Codirectora

Sonia Teresa Silvente

Licenciada en Biología (Universidad Nacional de Córdoba)

Doctora en Biología (Universidad Nacional de Córdoba)

Asesora

Romina Paula Monasterio

Licenciada en Química (Universidad Nacional de La Pampa)

Doctora en Química (Universidad Nacional de San Luis)

Jurado

Norberto Francisco Gariglio

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional del Litoral)

Doctor en Producción Vegetal (Universidad Politécnica de Valencia)

Carina Verónica González

Ingeniera Agrónoma (Universidad Nacional de Cuyo)

Doctora en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de Cuyo)

Samuel Ortega-Farías

Ingeniero Agrónomo (Universidad Católica de Chile)

Magister en Ingeniería en Riego (Universidad de Oregón)

Doctor of Philosophy (Universidad de Oregón)

Fecha de defensa

Diciembre de 2023

Índice general

Agradecimientos	I
Resumen.....	II
Abstract.....	V
Índice de tablas	VII
Índice de figuras.....	VIII
1. Capítulo I: Revisión de antecedentes y marco teórico-conceptual	1
1.1 Introducción	2
1.1.1 Generalidades de la especie	2
1.1.2 Requerimientos ambientales del nogal.....	2
1.1.3 Expansión del nogal en zonas semiáridas, el caso de Argentina	4
1.2 Necesidad hídrica del cultivo	4
1.2.1 indicadores de estado hídrico más utilizados	5
1.2.2 Biomarcadores de déficit hídrico	8
1.3 Estrategias de riego para aumentar la productividad del agua	9
1.3.1 Impacto del déficit hídrico en el crecimiento de las plantas	9
1.3.2 Impacto del déficit hídrico en la producción.....	10
1.3.3 Impacto del déficit hídrico en la calidad de la nuez.....	12
1.4 Vacancia de conocimiento	13
2. Capítulo II: Objetivos e hipótesis.....	15
3. Capítulo III: Descripción del experimento.....	17
3.1 Sitio experimental	18
3.2 Diseño del experimento	19
3.2.1 Tratamientos de riego.....	20
4. Capítulo IV: Efecto de los regímenes hídricos sobre el crecimiento vegetativo, producción y composición del rendimiento	22
4.1 Introducción	23
4.2 Metodología	24
4.2.1 Potencial hídrico xilemático y conductancia estomática.....	24
4.2.2 Área seccional transversal del tronco, volumen y porosidad de la canopia	24
4.2.3 Rendimiento, componentes del rendimiento y productividad del agua	25
4.2.4 Análisis estadístico.....	26
4.3 Resultados	26
4.3.1 Condiciones meteorológicas y uso de agua de riego	26
4.3.2 Potencial hídrico xilemático y conductancia estomática.....	27
4.3.3 Área seccional transversal del tronco, volumen y porosidad de la copa.....	28
4.3.4 Rendimiento, componentes del rendimiento y productividad hídrica del cultivo.....	30
4.4 Discusión.....	33
4.4.1 Potencial hídrico xilemático y conductancia estomática.....	33
4.4.2 Comparación de indicadores de crecimiento vegetativo entre regímenes de riego.....	33
4.5 Conclusiones.....	35
5. Capítulo V: Efectos de los regímenes hídricos y temperatura de la temporada sobre la calidad de la producción y del aceite de nuez	36
5.1 Introducción	37
5.2 Metodología	38
5.2.1 Cosecha y procesado de la nuez.....	38
5.2.2 Concentración de aceite y extracción.....	39

5.2.3	Perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases.....	39
5.2.4	Análisis estadístico.....	39
5.3	Resultados	40
5.3.1	Condiciones meteorológicas y uso de agua de riego	40
5.3.2	Parámetros de calidad de la nuez	40
5.3.3	Perfil de ácidos grasos.....	41
5.3.4	Análisis de componentes principales	41
5.4	Discusión.....	43
5.5	Conclusiones	47
6.	Capítulo VI: Influencia del régimen hídrico sobre la expresión de metabolitos en hojas y semillas de nogal (<i>Juglans regia</i> L.) cv. Chandler.....	48
6.1	Introducción	49
6.2	Metodología	50
6.2.1	Colecta de material foliar para análisis foliares	50
6.2.2	Determinación de la concentración foliar de malondialdehído.....	51
6.2.3	Determinación de la concentración foliar de prolina	51
6.2.4	Determinación de la concentración foliar de fenoles y flavonoides	51
6.2.5	Determinación de la concentración foliar de azúcares solubles.....	52
6.2.6	Extracción, derivatización y perfilado de metabolitos no polares de semillas.....	52
6.2.7	Análisis estadístico.....	53
6.3	Resultados y discusión	53
6.3.1	Biomarcadores foliares de déficit hídrico	53
6.3.2	Perfil de metabolitos polares en semillas	55
6.4	Conclusiones	67
7.	Capítulo VII: Discusión general	68
8.	Capítulo VIII: Conclusiones generales	75
9.	Capítulo IX: Referencias bibliográficas.....	77

Agradecimientos

- ❖ A mis directores Eduardo y Sonia por su acompañamiento, enseñanzas y todos los buenos momentos que pasamos durante este trayecto. Siempre estaré agradecido por la oportunidad que me brindaron de poder incluirme en sus grupos de trabajo y formarme junto a ustedes.
- ❖ A mi familia por estar siempre presente. En particular a mi madre Silvia y a mi hermana Lourdes que siempre que necesité ayuda ellas estuvieron allí para auxiliarme.
- ❖ A Lorena Martínez y a Eugenia Poveda por su apoyo y todas las horas compartidas en el laboratorio.
- ❖ A los miembros del jurado por sus valiosos aportes que han enriquecido y contribuido a mejorar la calidad de esta tesis.

-
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la Beca Interna Doctoral para Temas Estratégicos que me fue otorgada.
 - A la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Cuyo (FCA-UNCuyo) por permitirme realizar mi doctorado en este distinguido entorno académico.
 - A la Universidad Nacional de Chilecito (UNdeC) por haberme brindado la oportunidad de desarrollar el proyecto de tesis doctoral en su Laboratorio de Alta Complejidad y por el apoyo recibido desde su Secretaría de Ciencia y Tecnología.
 - A la Universidad Nacional de Chilecito (UNdeC) por permitirme desarrollar funciones como Auxiliar Docente en la Asignatura Fisiología Vegetal de Ingeniería Agronómica.
 - Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria por la compra de los insumos necesarios para el desarrollo del experimento a campo.
 - A Coralino S.A. por permitirme desarrollar el experimento de riego deficitario en una parcela de su propiedad.

Resumen

El cultivo del nogal (*Juglans regia* L.) se expande en Argentina en zonas áridas y semiáridas, significativamente distintas a las zonas de cultivo tradicionales. Este cultivo ha sido caracterizado como altamente demandante de agua y sensible al déficit hídrico. La evapotranspiración anual del nogal se ha estimado en torno a 1000 mm en las principales zonas de cultivo tradicional, caracterizadas por climas de tipo mediterráneo y donde se han realizado la mayoría de los estudios. En la región centro-oeste de Argentina las precipitaciones son escasas y concentradas durante los meses de verano, en contraste con los ambientes mediterráneos donde principalmente se expande la nogalicultura mundial. Las necesidades hídricas del nogal y su respuesta a distintas dosis de riego han sido escasamente evaluadas en Argentina. Los altos requerimientos hídricos de nogal, las escasas precipitaciones, la disponibilidad cada vez más limitada del agua de acuíferos subterráneos y superficiales para el riego, y los altos costos energéticos requieren incrementar el conocimiento sobre las respuestas del nogal a distintas dosis de riego bajo las condiciones agroclimáticas del centro oeste de Argentina.

El objetivo principal de esta tesis fue: describir los efectos de distintos regímenes hídricos sobre el crecimiento vegetativo, producción, calidad de nuez y variables metabólicas-fisiológicas en un nocal joven del Noroeste de Argentina (Chilecito, L. R.). Mientras que los objetivos específicos fueron: i) comparar los efectos de distintos regímenes hídricos aplicados durante todo el ciclo productivo del nogal sobre el crecimiento vegetativo, indicadores del estado hídrico y composición del rendimiento; ii) Contrastar la calidad de frutos y perfiles de ácidos grasos de los aceites obtenidos de plantas tratadas con distintos niveles de reposición hídrica durante todo el ciclo productivo; y iii) Evaluar la concentración de solutos compatibles, antioxidantes, estado oxidativo de las membranas celulares de la hoja y perfil de metabolitos polares de la semilla como biomarcadores de estado hídrico del cultivo.

El experimento siguió un diseño en bloques completamente aleatorizados, con 16 unidades observacionales compuestas cada una por 12 nogales jóvenes (3 filas de 4 plantas cada una y 6 años de edad) de la variedad Chandler, donde las dos plantas centrales conformaron la unidad observacional de las cuales una fue reservada para las medidas de seguimiento intra-temporada, mientras que la otra planta se mantuvo inalterada hasta la cosecha. El factor de bloqueo fue la altura, volumen de copa y área de la sección transversal del tronco. Se definieron 4 bloques, y se aplicaron de forma aleatoria los tratamientos de riego equivalentes al 50, 75, 100 y 125 % (tratamientos denominados T50, T75, T100 y T125, respectivamente) de la evapotranspiración de cultivo de forma sostenida durante dos temporadas consecutivas (2018-2019 y 2019-2020).

En relación con el objetivo específico 1, se evaluaron i) los indicadores de estado hídrico de la planta potencial hídrico xilemático (PHX) y conductancia estomática (gs); ii) los indicadores de crecimiento vegetativo área transversal del tronco, volumen de copa y porosidad de la canopia y iii) la productividad

en términos de rendimiento y productividad del agua. En T100 el PHX se mantuvo entre -0,5 y -0,8 MPa, al igual que en T75, mientras que en T50 alcanzó valores mínimos de - 1,0 MPa. El rango de PHX de T125 fue ligeramente superior a T100 entre -0,5 y -0,75 MPa. La conductancia estomática mostró menor respuesta a los tratamientos que el PHX, mostrando diferencias significativas sólo a los 100 días después de la floración. El crecimiento vegetativo y los componentes del rendimiento no difirieron entre los tratamientos de riego. Comparando a los tratamientos T100 y T50, la productividad del agua del cultivo (PA) aumentó de 4,30 a 5,29 kg mm⁻¹ ha⁻¹ en 2018-2019 y de 5,25 a 7,28 kg mm⁻¹ ha⁻¹ 2019-2020; mientras que la PA de T75 no difirió de la PA de T100. Las dosis de riego superiores a las necesidades del cultivo (T125) no tuvieron efectos sobre el rendimiento si se comparan con T100. En términos de la función de productividad del agua, el riego al 90 % de T100 habría permitido la máxima productividad en ambas temporadas.

En relación con el objetivo 2, se compararon los parámetros de calidad, calibre de nuez y semilla, color de la semilla, concentración de aceite y perfil de ácidos grasos. No se encontraron diferencias entre los parámetros de calidad cuando se compararon en función de los regímenes de riego dentro de cada estación. Por el contrario, al comparar los resultados de las dos temporadas en los parámetros de calidad, las diferencias fueron significativas. La primera temporada (2018-2019) fue más lluviosa (462 mm) y más fría (17,05 °C de temperatura media del aire en el periodo de acumulación de aceite) y produjo mayor proporción de semillas extra claras (92 %). En contraste la segunda temporada (2019-2020) fue más seca (326 mm) y más cálida (19,02 °C), y a pesar de producir una menor proporción de semillas extra claras (82,2 %), las nueces fueron más grandes y con mayor concentración de aceite (62,7 %; + 3,5 % que la temporada 1) y con una mejor relación omega-6 omega-3⁻¹ (3,25 en 2019-2020 frente a 3,70 obtenido en 2018-2019) debido a una mayor acumulación de ácido linolénico.

Con relación al objetivo 3, se evaluó la potencialidad de uso de biomarcadores de estado hídrico, a partir de la segunda temporada cuando los árboles habían sido expuestos a un primer año regados con los distintos tratamientos. Los biomarcadores evaluados fueron prolina, malondialdehído, azúcares solubles, fenoles y flavonoides totales, en tejidos foliares durante las etapas fenológicas de brotación, endurecimiento del endocarpio y madurez fisiológica de la semilla como complementos para la gestión del riego. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, pero sí se detectaron diferencias significativas cuando se clasificaron las medias por fecha de colecta de material vegetal. Lo que parece indicar que la sensibilidad de estos indicadores tiene un umbral crítico en valores de PHX inferiores a -1 MPa, es decir en condiciones de déficit hídrico alto. También la segunda temporada se evaluó el perfil de metabolitos polares de la semilla, advirtiendo una mayor concentración de metabolitos asociados a procesos de ajuste osmótico en las semillas de T50.

Estos resultados en conjunto ponen en evidencia la posibilidad de aplicar dosis de riego inferiores al 100 % de la ETc a fin de mejorar la eficiencia de uso del agua en nogal sin perjuicios a nivel productivo bajo las condiciones agroclimáticas del centro oeste de Argentina.

Palabras clave: riego deficitario, sobre riego, ácidos grasos, calidad de aceite, perfil de metabolitos

Abstract

The walnut (*Juglans regia* L.) cultivation is expanding in Argentina in arid and semiarid areas, significantly different from the traditional cultivation areas. This crop has been characterized as highly water demanding and sensitive to water deficit. The annual evapotranspiration of walnut was estimated around 1000 mm in the main traditional growing areas, characterized by Mediterranean-type climates and where most studies have been carried out. In the central-western region of Argentina, rainfall is scarce and concentrated in the summer months, in contrast to the Mediterranean environments where walnut growing is expanding worldwide. The water requirements of walnut and its response to different irrigation doses in Argentina were scarcely evaluated. The high-water requirements of walnut, low rainfall, the increasing scarcity of water from subway and surface aquifers for irrigation, and the high energy costs, require increasing knowledge about walnut responses to different irrigation doses under the agroclimatic conditions of central western Argentina.

The main objective of this thesis was: to describe the effects of different water regimes on vegetative growth, production, walnut quality, and metabolic-physiological variables in a young walnut orchard (*Juglans regia* L.) in northwestern Argentina (Chilecito, L. R.). The specific objectives were: (i) to compare the effects of different water regimes applied throughout the walnut productive cycle on vegetative growth, water status indicators and yield composition; (ii) to contrast fruit quality and oil fatty acid profiles obtained from plants treated with different levels of water replenishment throughout the productive cycle; and (iii) to evaluate the concentration of compatible solutes, antioxidants, oxidative status of cell membranes and metabolite profile of polar metabolites of the seed as biomarkers of crop water status.

The experiment was designed as a completely randomized block design. with 16 observational units each composed of 12 young walnut trees (3 rows of 4 plants each and 6 years old) of the Chandler variety, where the two central plants conformed the observational unit and one was reserved for the intra-seasonal measures, while the other plant remained unaltered until harvest. The blocking factor was height, canopy volume and trunk cross-sectional area. Four blocks were defined, and irrigation treatments equivalent to 50, 75, 100 and 125 % (treatments named T50, T75, T100 and T125, respectively) of crop evapotranspiration were randomly applied on a sustained way for two consecutive seasons (2018-2019 and 2019-2020).

In relation to the specific objective 1, were evaluated i) water status indicators xylem water potential (XWP) and stomatal conductance (gs); ii) vegetative growth indicators trunk cross-sectional area, canopy volume and canopy porosity; and iii) productivity in terms of yield and crop water productivity. In T100 the XWP remained between -0.5 and -0.8 MPa, as in T75, while in T50 it reached minimum values of - 1.0 MPa. The XWP range of T125 was slightly higher than T100 between -0.5 and -0.75

MPa. Stomatal conductance showed less response to treatments than XWP, showing significant differences only at 100 days after full bloom. Vegetative growth and yield components did not differ between irrigation treatments. Comparing T100 and T50 treatments, crop water productivity (PA) increased from 4.30 to 5.29 mm⁻¹ ha⁻¹ in 2018-2019 and from 5.25 to 7.28 kg mm⁻¹ ha⁻¹ 2019-2020; while T75 PA did not differ from T100 PA. Irrigation rates above crop requirements (T125) had no effect on yield when compared to T100. In terms of the water productivity function, irrigation at 90 % of T100 would have allowed maximum productivity in both seasons.

In relation to objective 2, quality parameters, nut and seed caliber, seed color, oil concentration and fatty acid profile were compared. No differences were found between quality parameters when compared between irrigation regimes within each season. On the contrary, compared the results of the two seasons in the quality parameters, the differences were significant. The first season (2018-2019) was wetter (462 mm) and cooler (17.05 °C mean air temperature in the oil accumulation period) and produced a higher proportion of extra clear kernels (92 %). In contrast the second season (2019-2020) was drier (326 mm) and warmer (19.02 °C), and despite producing a lower proportion of extra clear kernels (82.2 %), the nuts were larger and with higher oil concentration (62.7 %; + 3.5 % than season 1) and with a better omega-6 omega-3⁻¹ ratio (3.25 in 2019-2020 vs. 3.70 obtained in 2018-2019) due to higher linolenic acid accumulation.

In relation to objective 3, the potential use of biomarkers of water status was evaluated, starting in the second season when the trees had been exposed to a first year irrigated with the different treatments. The biomarkers studied were proline, malondialdehyde, soluble sugars, phenols and total flavonoids in leaf tissues at the phenological stages of sprouting, endocarp hardening and physiological seed maturity as complements for irrigation management. No significant differences were found between treatments, but significant differences were detected when the means were classified by date of plant material collection. This seems to indicate that the sensitivity of these indicators has a critical threshold at XWP below -1 MPa, in other words, under conditions of high-water deficit. Also in the second season, the profile of polar metabolites of the kernel was evaluated, showing a higher concentration of metabolites associated with osmotic adjustment processes in the T50 kernels.

Together, these results suggest the possibility of applying irrigation doses lower than 100 % of ETc in order to improve water use efficiency in walnut trees without detriment to production under the agroclimatic conditions of central western Argentina.

Keywords: deficit irrigation, over-irrigation, fatty acids, oil quality, fatty acid profile

Índice de tablas

Tabla 1.1 Artículos publicados que informan sobre las necesidades hídricas de cultivos de frutos secos y los parámetros utilizados para la estimación de las demandas hídricas, incluyendo la evapotranspiración de referencia (ET ₀), los coeficientes de cultivo (K _c) y la evapotranspiración de cultivo resultante (ET _c) para diferentes zonas.	7
Tabla 1.2 Referencias del estado hídrico del nogal basado en PHX y PHF al mediodía para la programación del riego. Extraído y adaptado de Fulton et al. (2001a, 2014).	11
Tabla 3.1 Características fisicoquímicas del suelo del sitio experimental a cuatro profundidades.	19
Tabla 3.2 Coeficientes de cultivo (K _c) usados para la programación de riego propuestos por Goldhamer et al. (1998). Ambas temporadas (2018-2019 y 2019-2020) iniciaron el 1° de Octubre (Día 1 de la temporada) y finalizaron el 15 de mayo (día 230 de la temporada).	21
Tabla 4.1 Valores acumulados por temporada de evapotranspiración de referencia (ET ₀), evapotranspiración de cultivo (ET _c), precipitación acumulada (PP), precipitación efectiva acumulada (PPE), cantidad de eventos de riego, cantidad de agua aplicada por irrigación y total de agua aplicada (riego + precipitación efectiva) en las temporadas 2018-2019 y 2019-2020.	29
Tabla 4.2 Efectos de los tratamientos de riego sobre el rendimiento y componentes del rendimiento en las temporadas 2018-2019 y 2019-2020, respectivamente.	32
Tabla 5.1 Características de calidad de nueces de nogal cv. Chandler (media ± desviación estándar) bajo diferentes regímenes de riego en las temporadas 2018-2019 y 2019-2020 en Guanchín, La Rioja Argentina.	42
Tabla 5.2 Perfil de ácidos grasos (media ± desviación estándar) de aceite de nuez de nogal cv. Chandler bajo diferentes regímenes de riego en las temporadas 2018-2019 y 2019-2020 en Guanchín, La Rioja, Argentina.	44
Tabla 6.1 Concentración de metabolitos foliares: malondialdehído (MDA), fenoles totales (Fenoles), flavonoides totales (Flavonoides), azúcares solubles totales (AST) y prolina (PRO). Estimadas de forma dirigida en folíolos terminales extraídos en tres momentos: brotación (colecta 1), endurecimiento endocarpio (colecta 2) y madurez de cosecha (3) de árboles de nogal cv. Chandler (media ± desviación estándar) bajo diferentes regímenes de riego en Guanchín, La Rioja Argentina.	57
Tabla 6.2 Perfil de metabolitos identificados por comparación con librerías de masas espectrales (media ± desviación estándar) en semillas de nogal cv. Chandler bajo diferentes regímenes de riego aplicados en dos temporadas consecutivas (2018-2019 y 2019-2020) en Guanchín, La Rioja, Argentina.	61
Tabla 6.3 Contribuciones de la varianza a las Dimensiones 1 y 2 del Análisis de Componentes Principales (Fig. 6.7) de las medias de las concentraciones normalizadas de los metabolitos identificados en nueces de nogal cv. Chandler.	65

Índice de figuras

Fig. 1.1 Relación entre el rendimiento relativo de nueces secas con cáscara y el agua aplicada relativa para nogales. Los datos se obtuvieron de Goldhamer et al., 1988; Cohen et al., 1997; Ferreyra et al., 2001; Lampinen et al., 2004 y Buchner et al., 2008.	13
Fig. 3.1 Fotografía satelital del sitio experimental.	18
Fig. 3.2 Fotografía del sitio experimental.	19
Fig. 3.3 Plano del experimento incluyendo la ubicación de las parcelas en el sitio experimental donde el tratamiento aplicado a cada parcela se ha identificado con diferentes colores (T50: Rojo, T75: Anaranjado, T100: Verde y T125: Azul) y el bloque al que pertenece la parcela con números en las plantas centrales de cada parcela. A la derecha (b), plano de parcela experimental (unidad experimental), compuesta por tres filas de cuatro plantas, donde las unidades observacionales (plantas centrales) están marcadas con X.	20
Fig. 4.1 Temperaturas máximas y mínimas mensuales (a) y precipitación y evapotranspiración de referencia (ET ₀) mensuales (b) durante las temporadas 2018-2019 (T1) y 2019-2020 (T2). Las líneas punteadas indican el inicio y final de cada temporada.	27
Fig. 4.2 Dinámica del potencial hídrico xilemático (PHX) (a-b) y conductancia estomática (gs) (c-d) durante las temporadas 2018-2019 (a-c) y 2019-2020 (b-d). Los asteriscos indican diferencias con significancia estadística entre tratamientos a $P < 0.05$. Las barras de error representan la desviación estándar de la media. La letra C y la línea punteada indican las fechas de cosecha.	28
Fig. 4.3 Volumen de copa promedio (a) y área seccional transversal del tronco por tratamiento de riego (c) al inicio, mitad y final de temporada durante las temporadas 2018-2019 y 2019-2020. Porosidad de la copa promedio por tratamiento a cosecha (b). Los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos a $P < 0.05$. Las barras de error representan la desviación estándar de la media. La regresión lineal entre el volumen de copa promedio y la porosidad de la copa son presentados en el panel d. ...	30
Fig. 4.4 Regresión lineal segmentada del rendimiento relativo sobre el total de agua aplicado (irrigación + precipitación efectiva) a la cosecha durante las temporadas 2018-2019 y 2019-2020.	31
Fig. 5.1 Condiciones ambientales en las temporadas 2018-2019 y 2019-2020 en Guanchín, La Rioja, Argentina. Las letras F, EE y C indicaron fecha de floración, endurecimiento del endocarpio y fecha de cosecha, respectivamente.	40
Fig. 5.2 Matrices de correlación de Pearson entre las variables calibre de nuez, calibre de semilla, concentración de aceite, cantidad de semillas extra-claras y relación $\omega_6 \omega_3^{-1}$ de nueces de nogal cv. Chandler en las temporadas 2018-2019 y 2019-2020. Las correlaciones no significativas ($P > 0,05$) están marcadas con X.	43
Fig. 5.3 Relación entre calibre de nueces y calibre de semillas de nogales cv. Chandler regados con diferentes dosis durante las temporadas 2018-2019 (●) y 2019-2020(▲).	45
Fig. 5.4 Biplot del análisis de componentes principales y agrupamiento jerárquico (elipses) de perfiles de ácidos grasos de nueces cv. Chandler en las temporadas 2018-2019 (n=16) y 2019-2020 (n=16). Los ácidos grasos perfilados fueron: palmítico (C16), esteárico, oleico (C18:1), linoleico (C18:2), y linolénico (C18:3).	45

Fig. 5.5 Biplot del análisis de componentes principales y agrupamiento jerárquico (elipses) de características de calidad de nueces cv. Chandler en las temporadas 2018-2019 (n=16) y 2019-2020 (n=16).....	46
Fig. 6.1 Biplot del análisis de componentes principales y agrupamiento jerárquico (elipses) de las concentraciones de metabolitos (MDA = malondialdehído, PRO = prolina, FEN = fenoles totales, FLA = flavonoides totales y AST = azúcares solubles totales) en folíolos terminales de nogales cv. Chandler, en brotación (colecta 1, n = 12), endurecimiento del endocarpio (colecta 2, n = 12) y en madurez de cosecha (colecta 3, n = 12) bajo tres regímenes hídricos al 100, 75 y 50 % de la ETc aplicados durante dos temporadas consecutivas (2018-2020).	56
Fig. 6.2 Cromatogramas de intensidad máxima resultantes del perfilado no dirigido obtenidos por GC-MS en modo SCAN de metabolitos polares de semillas de nogal cv. Chandler bajo tres regímenes hídricos, al 100 % de la ETc (T100 = ● , n = 4) 75 % de la ETc (T75 = ● , n = 4) y al 50 % de la ETc (T50 = ● , n = 4) aplicados durante dos temporadas consecutivas (2018-2019 y 2019-2020).....	56
Fig. 6.3 Arriba, Cromatogramas de intensidad máxima resultantes del perfilado no dirigido obtenidos por GC-MS en modo SCAN de metabolitos polares de semillas de nuez de nogal cv. Chandler bajo tres regímenes hídricos, al 100 % de la ETc (T100 = ● , n = 4) 75 % de la ETc (T75 = ● , n = 4) y al 50 % de la ETc (T50 = ● , n = 4). Abajo, derivas en tiempos de retención para el ajuste según coincidencia de picos cromatográficos.	58
Fig. 6.4 Análisis de componentes principales de las intensidades máximas de los metabolitos perfilados en nueces de nogal cv. Chandler sometidos a tres regímenes hídricos durante dos temporadas al 100 % de la ETc (T100 = ● , n = 4) 75 % de la ETc (T75 = ● , n = 4) y al 50 % de la ETc (T50 = ● , n = 4).	59
Fig. 6.5 Matriz de correlación de Pearson entre metabolito-metabolito perfilado e identificado por comparación con librerías de masas espectrales en semillas de nogal cv. Chandler.	62
Fig. 6.6 Matriz de correlación de Pearson significativas a $p < 0,05$ entre metabolito-metabolito perfilado e identificado por comparación con librerías de masas espectrales en semillas de nogal cv. Chandler.	63
Fig. 6.7 Biplot del análisis de componentes principales (a la izquierda proyección de individuos y a la derecha proyección de variables) de análisis de componentes principales de las medias de las concentraciones normalizadas de los metabolitos identificados en semillas de nogal cv. Chandler sometidos a tres regímenes hídricos durante dos temporadas consecutivas al 100 % de la ETc (T100 = ● , n = 4), 75 % de la ETc (T75 = ● , n = 4) y al 50 % de la ETc (T50 = ● , n = 4).	64

Capítulo I:

Revisión de antecedentes y marco teórico-conceptual

Basado en:

A mini review of the impacts of deficit irrigation strategies for walnut (*Juglans regia* L.) production in semiarid conditions

Franco Emmanuel Calvo ^{ab}, Sonia Teresa Silvente ^c, Eduardo Rafael Trentacoste ^d

^a Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

^b Instituto de Agricultura Sostenible en el Oasis (IASO), Universidad Nacional de Chilecito (UNdeC), Av. Los Peregrinos s/n Chilecito, La Rioja, Argentina

^c Instituto de Ambiente de Montaña y Regiones Áridas (IAMRA), Universidad Nacional de Chilecito (UNdeC), Av. Los Peregrinos s/n Chilecito, La Rioja, Argentina

^d Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Junín, Isidoro Busquets s/n, Junín, Mendoza, Argentina

Publicado en: Irrigation Science (2023)

Q1 Agricultural and Biological Sciences - Agronomy and Crop Science (50/376)

<https://doi.org/10.1007/s00271-022-00815-w>

1.1 Introducción

1.1.1 Generalidades de la especie

El nogal (*Juglans regia* L.), también denominado nogal común, nogal europeo, nogal inglés o nogal persa es una especie de importancia económica mundial cultivada por sus nueces y su madera. *Juglans regia* pertenece botánicamente a la división *Angiosperma*, al orden *Fagales* y a la familia *Juglandaceae*. Es una especie arbórea de gran tamaño (su porte natural puede superar los 30 m de altura), diclino monoica, caducifolia de hojas compuestas alternadas imparipinadas de 7 a 9 folíolos ovales-lanceolados. La producción en plantas injertadas inicia generalmente al tercer año, y la producción tiende a estabilizarse hacia los 10 años desde la plantación. Las yemas pueden ser vegetativas o reproductivas (masculinas y femeninas). Cada yema masculina produce una inflorescencia (amentó) que posee entre 100 y 200 flores apétalas. La distribución de las yemas fructíferas depende del cultivar, pudiendo ser de carga terminal o de carga lateral. Las yemas femeninas pueden encontrarse aisladas o en grupos de hasta tres yemas, y producen flores apétalas con estigmas plumosos (Iannamico, 2009).

La polinización del nogal es anemófila y auto compatible, pero debido a la protandria (i.e., la floración masculina ocurre antes de la femenina) característica de la especie en las plantaciones comerciales se alternan cultivares para maximizar el solapamiento entre la fase fenológica de máxima emisión de polen y fase de máxima receptividad de los estigmas. El fruto botánicamente se clasifica como una drupa indehiscente. El endocarpio es leñoso y se compone, generalmente, por dos valvas selladas que protegen a la semilla (Iannamico, 2009). El crecimiento vegetativo se concentra casi en su totalidad en el periodo comprendido entre la brotación y el endurecimiento del endocarpio (fin de la primavera), periodo en el que también se define el número y tamaño de los frutos (Charrier et al., 2011). Simultáneamente, entre la parada de crecimiento vegetativo e inicio del llenado del fruto acontece la inducción floral. Una vez definido el tamaño de los frutos y agotado el crecimiento vegetativo, inicia la síntesis de aceite, la cual se prolonga hasta la madurez (Jin et al., 2023). La madurez de los frutos acontece a finales de verano e inicio del otoño, indicada por la lignificación de los haces vasculares que nutren la semilla y la parcial ruptura del pericarpio (Iannamico, 2009).

1.1.2 Requerimientos ambientales del nogal

Se estima que la domesticación del nogal inició en la región euroasiática comprendida entre el Cáucaso y el Noroeste de China (Pollegioni et al., 2017). Esa zona, por sus características climáticas y geográficas, habría actuado como refugio natural para la especie hace aproximadamente 10.000 años durante el Último Máximo Glacial (Pollegioni et al., 2017). La introducción y expansión del cultivo en el Viejo Mundo estuvo mediada por el hombre siguiendo la Ruta de la Seda hace unos 5.000 años (Vahdati, 2014). Por su parte, la expansión y consolidación del Imperio Persa y del Imperio Romano contribuyó a incorporar al nogal como un cultivo tradicional en Europa Central (Bernard et al., 2018), donde finalmente se estableció en las regiones costeras de climas mediterráneos. En América la

introducción del nogal tuvo lugar en el siglo XVI en Chile, desde donde se expandió a los Estados Unidos de América (EUA) y a la Argentina (Bernard et al., 2018).

Durante los últimos 15 años la demanda de nueces de nogal se ha incrementado significativamente gracias a la popularización de los beneficios de su consumo en relación con la salud (Sánchez-González et al., 2017). Según la FAO (FAOSTAT, 2023) la producción mundial de nueces de nogal aumentó de 1,8 Mt en 2005 a 3,5Mt en 2023, debido en parte al aumento de nuevas plantaciones que aportan aproximadamente un 50 % de la superficie total cultivada y un 30 % de la producción mundial. Actualmente la superficie cultivada mundial alcanza 1,0 Mha (FAOSTAT, 2023). China posee el 45 % de la superficie cultivada y el 44 % de la producción mundial de nueces de nogal, respectivamente, lo que la sitúa como primer productor. Por su parte, EUA ocupa el segundo lugar, con el 15 % de la superficie cultivada y un ≈ 12 % de la producción mundial, respectivamente.

Teniendo en cuenta que el agua es el factor más limitante para la expansión de la agricultura en zonas semiáridas (Searles et al., 2011), algunos artículos informan que la evapotranspiración de cultivo (ETc) de nogales que han alcanzado la madurez oscila entre los 1.050 y 1.200 mm ha⁻¹ año⁻¹, según el método del balance hídrico (Doorenbos y Pruitt, 1992; Goldhamer, 1998); por lo que el desarrollo de plantaciones económicamente rentables en estas zonas sólo es posible bajo riego. Para estimar las demandas hídricas del cultivo mediante el método del balance hídrico se tiene en cuenta la cantidad de agua disponible en el suelo y el nivel de agotamiento de agua en el suelo que puede tolerar el cultivo a lo largo de la temporada (por ejemplo, para suelos francos, un agotamiento permisible del agua del suelo del 50 % se considera el umbral inferior para conseguir altos rendimientos en nogales; Goldhamer, 1998). Por otro lado, otros trabajos que se presentan en la Tabla 1.1 estimaron las demandas de agua del nogal utilizando indicadores de estado hídrico medidos en la planta, por lo que asumen que la ETc es igual al total de agua aplicada a los nogales que no alcanzaron los umbrales de déficit hídrico en los indicadores de estado hídrico empleados.

Otro factor que ha limitado la expansión del nogal en ambientes semiáridos con inviernos cálidos es la necesidad de frío invernal para romper la endodormancia de las yemas. Dependiendo del cultivar, el requerimiento de frío invernal puede variar entre 60 y 80 porciones de frío (Luedeling et al., 2009). Sin embargo, la deficiencia de frío invernal se puede mitigar parcialmente mediante manejo químico (por ejemplo, mediante la aplicación de cianamida hidrogenada) que sustituye a la dormancia y conduce a una brotación de yemas más uniforme (Lemus, 2010). Por otra parte, las zonas semiáridas se caracterizan por altas temperaturas y baja humedad relativa a fines de la temporada de verano y principios de otoño lo que puede conducir a un retraso en la maduración del pericarpio con respecto a la semilla, quedando así la semilla potencialmente expuesta a procesos de oxidación enzimática y química (Lang et al., 2014). Esta diferencia en la madurez del pericarpio y de la semilla se puede reducir mediante la aplicación de ethephon (ácido 2-cloroetil fosfónico), el cual es usado en una amplia

variedad de cultivos frutales y de frutos secos (Wei et al., 2020) para uniformizar la maduración de frutos y semillas.

1.1.3 Expansión del nogal en zonas semiáridas, el caso de Argentina

En Argentina la superficie cultivada con nogales supera en la actualidad las 18.000 ha (FAOSTAT, 2023), y se encuentra en plena expansión en la región centro-oeste del país, abarcando un amplio rango latitudinal desde los 25°S hasta los 40°S. Esta expansión ha tenido lugar durante los últimos 20 años, en los que se ha plantado un número considerable de nogaes, que se caracterizan por una alta densidad de plantación (>300 árboles ha⁻¹), formación en seto, riego localizado y poda y cosecha mecanizada. Las provincias con mayor superficie cultivada con nogales son Mendoza (36 %), Catamarca (26 %) y La Rioja (20 %) (INDEC, 2020). Los climas de estas provincias son predominantemente áridos y semiáridos con escasas precipitaciones, en general alrededor de 300 mm año⁻¹, concentradas en el verano (Rubí Bianchi y Cravero, 2010). El agua para riego en Catamarca y La Rioja se extrae principalmente de acuíferos subterráneos, mientras que en San Juan y Mendoza el agua se extrae tanto de acuíferos subterráneos como de ríos de deshielo de la Cordillera de los Andes (Searles et al., 2011). Sin embargo, a pesar de esta rápida expansión del cultivo, Argentina dispone de un número limitado de leyes y normativas que regulen el uso del agua de riego a fin de evitar la sobreexplotación de los acuíferos. En este contexto, es que cobra importancia la necesidad de una revisión exhaustiva de la demanda hídrica de los cultivos regionales para mejorar el diseño de las estrategias de riego a aplicar, teniendo como principal fin el aumento sustancial en la eficiencia del uso del agua para permitir un aumento en la productividad del agua.

1.2 Necesidad hídrica del cultivo

Las necesidades hídricas de los cultivos suelen estimarse mediante la evapotranspiración del cultivo (ET_c); es decir, el producto entre la evapotranspiración de referencia (ET₀) y el coeficiente del cultivo (K_c). El K_c es un coeficiente adimensional que representa la proporción de la evapotranspiración real del cultivo en relación a la evapotranspiración del cultivo de referencia ($K_c = ET_c / ET_0$) que varía en función del estado fenológico del cultivo, siendo mínimo durante la brotación (K_c inicial, a principios de primavera) y máximo durante el periodo de llenado de frutos (K_c medio, a finales de verano; Allen et al., 1998). En cultivos frutales, para la estimación de las necesidades hídricas también se considera la fracción cubierta del suelo, la cual es menor tanto en huertos jóvenes como en sistemas de cultivo de baja densidad, donde la cobertura máxima suele ser inferior al 50 % (Tabla 1.1). En esas condiciones, con suelos con baja cobertura vegetal, además del K_c se aplica otro coeficiente denominado coeficiente de reducción (K_r) para la estimación más precisa de la ET_c y con ello definir la programación del riego (ver siguiente ecuación; Steduto et al., 2012).

$$\text{si cobertura} < 50 \% \rightarrow Kr = (2 * \%cobertura)/100$$

$$\text{si cobertura} > 50 \% \rightarrow Kr = 1$$

Con respecto a los valores de K_c del nogal, fueron estimados inicialmente por Goldhamer et al. (1998) para las condiciones agroclimáticas de California (Tabla 1.1). En Argentina se utilizan los K_c estimados en California sin considerar las diferencias en la ET_0 anual y en la distribución de las precipitaciones, que en el centro-oeste argentino se concentran en la estación estival, a diferencia de California donde se concentran principalmente en la estación invernal.

En la Tabla 1.1 se compara la evapotranspiración del nogal con la de otros cultivos de frutos secos. El nogal y el pecan tienen los mayores K_c medio (0,9) a lo largo de toda la temporada de crecimiento seguidos por el almendro y el pistachero ($K_c = 0,8$), y el avellano ($K_c = 0,7$). Es importante destacar que los cultivos de avellano presentados en la Tabla 1.1 se desarrollan en ambientes húmedos con una evapotranspiración de referencia más baja (ET_0 media = 858 mm) que los demás cultivos de frutos secos ($ET_0 > 1100$ mm) revisados. El nogal, el almendro y el pistachero tienen necesidades hídricas similares e inferiores a las del pecano. Sin embargo, el nogal y el avellano son especies sensibles al déficit hídrico (Liu et al., 2019; Mahmoudian et al., 2021) y se utiliza para la programación del riego la máxima demanda de agua del cultivo. Por el contrario, el almendro y el pistachero se consideran especies tolerantes a la sequía (Pérez-López et al., 2018; Álvarez et al., 2020) y la producción máxima podría alcanzarse con una reposición de agua inferior a la máxima ET_c . El pecano por su parte puede tolerar sequías severas de duración moderada, pero con un impacto negativo significativo en el rendimiento (Sparks, 2005).

1.2.1 indicadores de estado hídrico más utilizados

Para una óptima gestión del riego el monitoreo del estado hídrico del cultivo es crucial, más aún cuando se aplican estrategias de riego deficitario. El potencial hídrico es una de las medidas más empleadas para determinar el estado hídrico de la planta (Scholander et al., 1965), expresado como potencial hídrico de la hoja (PHF) o como potencial hídrico xilemático (PHX) (McCutchan y Shackel, 1992). En nogal inicialmente se utilizó la medida del PHF antes del amanecer, aunque el PHX del mediodía es el indicador más comúnmente utilizado en la actualidad (Fulton et al., 2017). La diferencia entre el PHF y PHX radica en que para medir PHX se debe alcanzar un equilibrio entre los potenciales hídricos del xilema y de la hoja. Por su parte, el PHX se determina cubriendo un foliolo terminal con una bolsa de material reflectante a la luz solar e impermeable al agua durante al menos 30 min, durante este tiempo la transpiración de la hoja se detiene y el potencial hídrico foliar se equilibra con el potencial hídrico del xilema (Fulton et al., 2001a). En relación a los valores de PHX al mediodía, valores inferiores a -0,8 MPa a lo largo del ciclo de cultivo del nogal se han relacionado con reducciones en el crecimiento vegetativo y en el rendimiento (Tabla 1.2). A pesar de que PHX al mediodía es ampliamente considerado como un indicador fiable del estado hídrico del nogal las mediciones con la cámara de

presión son destructivas, requieren mano de obra considerable y capacitada, y no son adecuadas para el monitoreo automatizado.

Otro de los indicadores del estado hídrico de la planta es la conductancia estomática (g_s) que mide el grado de apertura estomática y por lo tanto de intercambio gaseoso de la hoja con la atmósfera. Rosati et al. (2006) compararon la g_s de nogales bien regados con otros regados al 50 % de la ET_c durante todo el ciclo del cultivo y advirtieron que los nogales sometidos a riego deficitario sostenido mostraron un rango de valores de g_s de 0,2 a 0,02 mol $H_2O\ m^{-2}\ s^{-1}$, mientras que los árboles bien regados estuvieron en un rango de 0,2 a 0,7 mol $H_2O\ m^{-2}\ s^{-1}$. Estos autores obtuvieron un alto grado de ajuste entre g_s y PHX ($R^2 = 0,99$), y a su vez, los valores de PHX estuvieron altamente correlacionados con el déficit de presión de vapor (DPV; $R^2 = 0,85$). A pesar de los beneficios que tendría el uso de la g_s para la gestión del riego, no se han encontrado trabajos sobre este tema para nogales. Varios estudios han sugerido que los estomas regulan su apertura para maximizar la g_s , a la vez que evitan que se alcancen presiones xilemáticas críticas que provoquen una cavitación excesiva del xilema (Meinzer 1993; Sperry et al., 1993), que puede revertirse rellenando los vasos embolizados. Estudios recientes sugieren que el rellenado de los vasos del xilema puede ocurrir en el nogal a pesar de la presencia de una tensión moderada, siendo responsables de este proceso las proteínas intrínsecas de la membrana plasmáticas transportadoras de agua (PIP o acuaporinas) (Sakr et al., 2003; Cochard et al., 2007).

La detección térmica es otra técnica prometedora, utilizada para detectar el estado hídrico de las plantas mediante la medición de la temperatura de la hoja. Esta variable está altamente correlacionada con la g_s y la transpiración foliar (Jackson et al., 1981). Jones et al. (2009) mostraron que el mayor determinante de la temperatura de la hoja es la temperatura del aire y, en segundo lugar, la tasa de evaporación o transpiración de la hoja. Una de las ventajas de esta metodología es que no es destructiva y puede alcanzar altas resoluciones temporales y espaciales, lo que permitiría monitorizar el estado hídrico de las plantas a escala de campo (Jones, 2004). Dhillon et al. (2019) midieron las temperaturas foliares y del aire, la humedad relativa del aire, la radiación fotosintéticamente activa (RFA) y la velocidad del viento en hojas sombreadas de nogales de siete años durante dos temporadas de crecimiento para modelar un Índice de Estrés Hídrico del Cultivo, obteniendo una relación lineal con el PHX ($R^2 = 0,67$). Los autores concluyeron que la temperatura de la hoja podría utilizarse eficazmente como una herramienta para la gestión del riego.

Tabla 1.1 Artículos publicados que informan sobre las necesidades hídricas de cultivos de frutos secos y los parámetros utilizados para la estimación de las demandas hídricas, incluyendo la evapotranspiración de referencia (ET₀), los coeficientes de cultivo (K_c) y la evapotranspiración de cultivo resultante (ET_c) para diferentes zonas.

Cultivo	Temporada de riego	ET ₀ mm temporada ⁻¹	ET _c	K _c			PP mm año ⁻¹	Edad (años)	Marco plantación (m)	Cobertura (%)	Sitio (país, hemisferio)	Referencia
				ini	med	fin						
Almendro	Ene-Dic	1.400	851	0,40	1,10	0,40	540	4	7,0 x 6,0	sd	Sevilla (España, N)	García-Tejero et al., 2015
	Set-May	1.257	1.450	0,93	1,10	0,55	105	11	7,0 x 5,0	65	Loxton (Australia, S)	Stevens et al., 2012
	Ene-Set	1.274	995	0,30	1,04	sd	548	5	6,7 x 4,3	55	California (EUA, N)	Drechsler et al., 2022
Avellano	Abr-Set	800	610	0,50	0,87	0,55	sd	9	5,0 x 6,0	sd	Clermont-Ferrand (Francia, N)	Mingeau and Rousseau, 1994
	Abr-Set	900	410	0,30	0,70	0,35	350	sd	3,0 x 7,0	sd	El Tarragonès (España, N)	Gispert et al., 2005
	Oct-Mar	875	657	0,70	0,80	sd	516	7	5,0 x 6,0	87	Río Claro (Chile, S)	Ortega-Farias et al., 2020
Pecan	Abr-Oct	1.380	1.310	0,40	1,35	0,40	300	35	9,0 x 12,0	70	Texas (EUA, N)	Miyamoto et al., 1995
	Mar-Nov	1.420	1.215	0,18	1,10	0,40	234	21	9,7 x 9,7	67	The Mesilla Valley (EUA, N)	Sammis et al., 2004
	Abr-Oct	1.425	1.140	0,38	1,26	0,38	sd	sd	sd	77	New Mexico (EUA, N)	Samani et al., 2011
Pistacho	Feb-Oct	1.453	841	0,49	0,80	0,32	139	35	10,0 x 10,0	sd	Urfa (Turquía, N)	Kanber et al., 1993
	Abr-Nov	1.109	1.036	0,07	1,19	0,35	sd	sd	5,2 x 5,2	60	San Joaquin, Ca (EUA, N)	Goldhamer, 2005
	Mar-Nov	1.242	1.021	0,30	1,10	0,60	300	14	5,8 x 5,2	60	Madera, Ca (EUA, N)	Bellvert et al., 2018
Nogal	Mar-Nov	1.580	1.046	0,12	1,14	0,28	sd	sd	7,3 x 7,3	sd	San Joaquin, Ca (EUA, N)	Goldhamer, 1998
	Set-Abr	1.175	1.050	0,35	1,14	0,35	250	sd	6,0 x 8,0	80	La Rioja (Argentina, S)	Morabito et al., 2006
	Mar-Nov	1.192	1.100	0,60	1,04	0,14	350-500	10	6,5 x 6,5	sd	Tehama, Ca (EUA, N)	Fulton et al., 2017
	Mar-Nov	1.192	1.200	0,49	1,06	0,41	350-500	sd	6,6 x 3,3	sd	Tehama, Ca (EUA, N)	Fulton et al., 2017

sd: sin datos

K_c ini: coeficiente de cultivo inicial

K_c med: coeficiente de cultivo media temporada

K_c fin: coeficiente de cultivo fin de temporada

Las variaciones del diámetro del tronco (medidas por dendrómetros) y el flujo de savia muestran correlaciones significativas con medidas de mayor robustez como el PHX, la gs, y la humedad del suelo; lo que permitiría automatizar en cierta medida la gestión del riego. Mediante la automatización de estas medidas se pueden minimizar las necesidades de mano de obra tal como lo reportaron Drew y Downes (2009). En este sentido, Archer et al. (2001) modelizaron para nogal una regresión lineal múltiple para predecir PHX a partir de medidas de variación del diámetro del tronco. Obtuvieron una alta correlación entre los valores estimados y medidos de PHX tanto para árboles bien regados como sometidos a sequía ($R^2 = 0,95$). En otro estudio, Romero et al. (2009) en Sevilla, España, informaron de avances con resultados prometedores en modelos para la gestión del riego totalmente automatizado en nogales y almendros a partir de mediciones de flujo de savia, dendrometría de tronco y humedad del suelo.

1.2.2 Biomarcadores de déficit hídrico

Existe un grupo diverso de metabolitos foliares con aptitud para ser empleados como biomarcadores de déficit hídrico, y que podrían a su vez servir de complemento a las medidas de estado hídrico más difundidas para la gestión del riego en nogal. Entre estos biomarcadores destacan algunos osmolitos compatibles tales como los aminoácidos prolina y betaína alanina o los azúcares solubles, dado que guardan una estrecha relación con indicadores de estado hídrico de gran robustez como el potencial hídrico dado que muestran incrementos significativos en su concentración cuando las vías metabólicas responsables de los procesos de ajuste osmótico están activas (Lotfi et al., 2009). Por otra parte, el malondialdehído es el primer producto de la oxidación de los fosfolípidos constituyentes de las membranas celulares, por lo que podría ser empleado como un biomarcador temprano de estrés oxidativo, causado no solamente por déficit hídrico sino también por la ocurrencia de otros estreses abióticos como salinidad en suelos o agua de riego, altas temperaturas, alta irradiancia en el espectro UV, entre otras (Karimi et al., 2020; Wang et al., 2020). Por último, la concentración de metabolitos foliares antioxidantes como los derivados fenólicos y flavonoides se ha asociado a eventos de estrés biótico (Solar et al., 2006) y abiótico (Karimi et al., 2020). A pesar de las numerosas ventajas del empleo de biomarcadores foliares de déficit hídrico y estrés temprano, como: i) bajo costo de las mediciones, ii) bajo requerimiento de equipamiento especializado, y iii) alta sensibilidad y repetibilidad de las técnicas, no han sido ampliamente difundidas para la gestión del riego.

No se han encontrado reportes que traten la influencia del déficit hídrico sobre la composición química de la semilla y del aceite de nuez. Destaca la metabolómica como una rama de la química analítica que ofrece alternativas para contrastar de los perfiles de metabolitos (por ejemplo, metabolitos polares) bajo condiciones ambientales o fenológicas contrastantes (Bundy et al., 2009) y con ello obtener valiosa información sobre las vías metabólicas activas en cada ambiente o estado fenológico (Rao et al., 2016). Adicionalmente, la metabolómica ha proporcionado información para distinguir y clasificar perfiles aromáticos de nueces producidas bajo sistemas de cultivo poco o altamente tecnificados (Kalogiouri et

al. 2021) o incluso para encontrar el origen de desviaciones de la calidad y seguridad alimentaria de nueces (Kang y Suh 2022). Por lo tanto, se espera obtener resultados mediante la aplicación de este tipo de técnicas a la producción de nogales obtenidos bajo distintos regímenes de riego.

1.3 Estrategias de riego para aumentar la productividad del agua

1.3.1 Impacto del déficit hídrico en el crecimiento de las plantas

En la producción de frutales, en general, existe una marcada tendencia a la intensificación de los procesos productivos asociada al aumento de la densidad de plantación y a la formación de setos. En el cultivo del nogal existe un claro interés en la intensificación del cultivo como lo demuestra el aumento de la densidad de plantación, que se ha cuadruplicado en los últimos 50 años (de ≈ 75 árboles ha^{-1} a >300 árboles ha^{-1}), debido en parte a la introducción del riego presurizado, y a la cosecha y poda mecanizada (Lemus, 2010). Se ha reportado que el aumento de la densidad de plantación repercute directamente en una mayor interceptación de radiación fotosintéticamente activa (RFA), mayor precocidad para la entrada en producción y mayor rendimiento por unidad de superficie, con el beneficio añadido de la reducción de los costos en las tareas de poda y cosecha por la mecanización (Iglesias y Echeverría, 2022). Goldhamer et al. (1985) compararon la ETc y el rendimiento de nogales cv. Chico de 4 años de edad, plantados en alta densidad (446 árboles ha^{-1}) y baja densidad (222 árboles ha^{-1}). El resultado fue una reducción de la ETc del 30 % en los nogales cultivados en alta densidad en los meses de máxima demanda, mientras que el rendimiento de nueces con cáscara en alta densidad fue de 2150 kg ha^{-1} , seis veces superior a los 350 kg ha^{-1} alcanzados en baja densidad. Estos resultados se explican en parte por una mayor fracción de suelo cubierto ($>K_r$) en el tratamiento de alta densidad, lo que repercutió en una reducción del componente evaporación directa del agua y, en consecuencia, reduciendo la integral de la ETc (compuesta por la evaporación directa del agua del área regada y la transpiración foliar).

Para mantener las ventajas del cultivo en alta densidad a lo largo del tiempo es necesario un control eficaz de la estructura y el tamaño de los árboles para evitar un sombreado excesivo, que conlleva una disminución de la cantidad y la calidad de la producción. En manzano, peral, y más recientemente en almendro y duraznero, la existencia de portainjertos enanizantes permite una gestión eficiente del vigor vegetativo (Yahmed et al., 2016; Iglesias y Echeverría, 2022). En otros cultivos, como el olivo, donde no existen portainjertos de probada reducción de vigor, se han implementado estrategias de riego deficitario durante el periodo de crecimiento de los brotes con resultados positivos (Trentacoste et al., 2019). En nogal, aún no se han desarrollado portainjertos enanizantes, y las estrategias de riego enfocadas al control del vigor han sido escasamente evaluadas.

Por lo tanto, un déficit hídrico aplicado durante la primavera conduciría a la disminución del crecimiento vegetativo. Sin embargo, el solapamiento del crecimiento vegetativo y la determinación del

tamaño de la nuez supone una seria limitación a la aplicación de estrategias de riego para controlar el crecimiento vegetativo, ya que podría penalizar la calidad final de la nuez. En este sentido, Ramos et al. (1978) informaron sobre la disminución del tamaño de la nuez cuando los nogales se sometieron a condiciones de déficit hídrico a principios de la temporada. Por su parte Fulton et al. (2001b) encontraron una disminución de la tasa de crecimiento de los brotes, en nogales bajo déficit hídrico a finales de primavera y principios de verano.

La aplicación de inhibidores del crecimiento (por ejemplo, Paclobutrazol) se ha propuesto como una forma de controlar el crecimiento vegetativo, pero este método tiene algunas desventajas, como su costo, la necesidad de aplicaciones sucesivas y la prohibición de su uso en numerosos países debido a los posibles efectos negativos sobre otros cultivos, la flora, la fauna y la salud humana (Kishore et al., 2015). En una amplia gama de cultivos, el crecimiento vegetativo es más sensible a la sequía que el proceso reproductivo (Hsiao, 1973; Kozłowski y Pallardy, 2002), lo que supone una ventaja para controlar el tamaño de las plantas con una ligera reducción del rendimiento.

Las estrategias de riego deficitario para el control del crecimiento vegetativo ofrecen una alternativa interesante y de bajo coste en un intento de reducir el impacto ambiental negativo de las estrategias químicas. Fulton et al. (2014) detectaron que valores de PHX al mediodía en el rango de -0,6 a -0,8 MPa se traducen en una reducción significativa del crecimiento vegetativo del nogal (Tabla 1.2). En ese estudio también se demostró que, en los cultivos de nogales gestionados mediante poda lateral mecánica, el crecimiento estacional de los brotes respondía ligeramente al déficit hídrico. Así, una poda mecánica más intensa podría requerir un déficit hídrico más severo para evitar un vigor excesivo que conduzca a una disminución de la fertilidad de las yemas en las siguientes temporadas. Se requieren más estudios para establecer el nivel de déficit hídrico, y un umbral de PHX asociado, para el control del crecimiento vegetativo dependiendo de las características del cultivo y de las condiciones ambientales.

1.3.2 Impacto del déficit hídrico en la producción

La eficiencia de uso del agua, definida como la relación entre la biomasa total producida por árbol y la cantidad de agua utilizada durante el periodo vegetativo, es difícil de estimar porque la determinación de la biomasa radicular en los árboles no es posible en condiciones de campo (Howell, 2001). A nivel de producción, la productividad del agua (PA) se estima mediante la relación entre el rendimiento y la cantidad de agua aplicada durante la temporada (Ruiz-Sánchez et al., 2010). Así, la PA se podría aumentar manteniendo la producción y disminuyendo la cantidad de agua aplicada, o reduciendo la producción proporcionalmente menos que la reducción de agua aplicada. En este sentido, se han desarrollado mayoritariamente dos estrategias de riego: El Riego Deficitario Sostenido (RDS) y el Riego Deficitario Regulado (RDC). El RDS consiste en reponer una dosis de agua inferior a la evapotranspiración máxima del cultivo a lo largo de - toda la temporada, mientras que el RDC sólo se

aplican dosis de riego inferiores a las máximas requeridas por el cultivo en una etapa de desarrollo menos sensible al déficit hídrico (Chalmers et al., 1981).

Tabla 1.2 Referencias del estado hídrico del nogal basado en PHX y PHF al mediodía para la programación del riego. Extraído y adaptado de Fulton et al. (2001a, 2014).

PHX (MPa)	PHF (MPa)	Nivel de estrés hídrico	Respuesta del cultivo
> -0,2	> -0,8	-	No es usual en nogal.
-0,2 a -0,4	-0,8 a -0,9	Bajo	Asociado a una alta disponibilidad hídrica y posibles efectos negativos a largo plazo en la salinidad, dependiendo del portainjerto.
-0,4 a -0,6	-0,9 a -1,1	Medio-Bajo	Promueve el crecimiento de los brotes. Es ideal una vez que el tamaño del fruto ha sido definido.
-0,6 a -0,8	-1,1 a -1,2	Moderado	La calidad de la producción del año y el rendimiento del año siguiente no son afectados. Baja tasa de crecimiento.
-0,8 a -1,0	-1,2 a -1,4	Moderado-Alto	El crecimiento de brotes se detiene. El calibre de las nueces se reduce significativamente. La producción del año siguiente puede ser afectada.
-1,0 a -1,2	-1,4 a -1,5	Alto	Crecimiento vegetativo muy limitado. Posible marchitamiento y clorosis en hojas y frutos. El rendimiento y la calidad de la producción son afectados.
-1,2 a -1,4	-1,5 a -1,7	Muy alto	caída de hojas moderada a alta.
-1,4 a -1,8	-1,7 a -2,0	Estrés severo	Defoliación total, próximo a la muerte de los árboles.
< -1,8	< -2,0	Muerte de la planta	Estado poco común en nogales irrigados, por lo general mueren antes de alcanzar este punto.

El secado parcial de raíces (SPR), es otra estrategia de riego deficitario que consiste en el riego alternado de la mitad del suelo explorado por las raíces. En manzanos, perales, olivos, cítricos y mangos (Jovanovic y Stikic, 2018), se ha relacionado el SPR con incrementos de la PA. Algunos estudios en vid y frutales como naranjo y manzano señalan que no hay diferencias en la productividad obtenida bajo las estrategias RDC y PRD (Sadras, 2009; Adu et al., 2018). Hasta el momento no hay reportes sobre los efectos del SPR aplicado a nogales.

Goldhamer et al. (1988) informaron que en nogales jóvenes regados al 33 % de la ETc durante toda la temporada de crecimiento durante tres años consecutivos, la producción se redujo en un 50 % en comparación con el control regado al 100 % de la ETc. Además, la PA expresada en rendimiento de nueces secas aumentó de 4,4 kg ha⁻¹ mm⁻¹ (Control) a 5,4 kg ha⁻¹ mm⁻¹ (33 % ETc). Cohen et al. (1997) evaluaron tres estrategias de riego: un Control regado al 100 % ETc, un tratamiento RDC con riego al

20 % de ETc entre junio y septiembre (hemisferio norte), y un tratamiento RDS regado al 70 % ETc durante toda la temporada. Los dos tratamientos de riego deficitarios alcanzaron rendimientos un 40 % menores en comparación con el control. Sin embargo, encontraron un aumento significativo en la PA de 2,4 kg ha⁻¹ mm⁻¹ en el control a 5,6 kg ha⁻¹ mm⁻¹ en el tratamiento RDC y hasta 4,7 kg ha⁻¹ mm⁻¹ en el tratamiento RDS. Es importante señalar que no se observaron diferencias de rendimiento entre los tratamientos RDC y RDS, y que la calidad de la producción, definida en función del calibre de nueces, peso de nueces y color de la semilla, fue similar entre los tratamientos de riego deficitario y el control.

Si bien la tendencia al aumento de la PA bajo estrategias de riego deficitario en nogal es evidente, a comparación de los valores de PA entre los estudios debe hacerse con precaución porque la unidad de agua considerada (por ejemplo, riego, o riego + precipitación) podría diferir. En este sentido es que fue estimada la función de productividad del agua a partir de datos publicados de rendimiento (nuez) y el agua total aplicada a lo largo de la temporada (Fig 1.1). Los datos fueron relativizados según el máximo de cada variable (rendimiento máximo = 9930 kg ha⁻¹; dosis máxima de agua = 1350 mm ha⁻¹). La función obtenida por regresión ($R^2 = 0,52$) fue lineal segmentada. En la región anterior al punto de quiebre la productividad aumentó de 0 a 0,54, periodo en el que el agua total aplicada varió entre 0,20 y 0,81. Las dosis de agua aplicada superiores a 0,81 (posterior al punto de quiebre de la función) no implican aumentos en la productividad debido a un desbalance en los crecimientos vegetativo/reproductivo.

1.3.3 Impacto del déficit hídrico en la calidad de la nuez

Si bien la calidad de la producción se define principalmente por el color de la semilla (las semillas más claras son las mejor apreciadas por el mercado), también influyen el tamaño final de la nuez, el peso de la nuez y la semilla, y el sabor. Ramos et al. (1978) observaron que los nogales expuestos a condiciones de déficit hídrico al principio de la temporada producían nueces más pequeñas y livianas; y si el déficit (moderado-severo) se producía al final de la temporada el color de la semilla se veía severamente afectado, especialmente aquellas provenientes de la parte superior de la copa. El color de la testa de la semilla depende del grado de oxidación de los fenoles presentes en su composición, mientras que el pardeamiento de otras secciones de la semilla (cotiledones) se debe a las reacciones de Maillard (Ortiz et al., 2019). Estos procesos de oxidación y caramelización se producen a finales de la temporada, en el período postcosecha y después del descascarado de las nueces y es estimulado por condiciones de alta temperatura, luminosidad y humedad relativa (Jensen et al., 2001). La mayoría de estos efectos adversos pueden controlarse adelantando la cosecha una vez definida la madurez fisiológica de la semilla. Una vez finalizada la cosecha, el secado inmediato, el descascarado y la conservación de las semillas a bajas temperaturas (por debajo de 1 °C) en una atmósfera enriquecida con N₂ o CO₂ es ideal para preservar la calidad estética y nutricional de las semillas (Christopoulos y Tsantili, 2011).

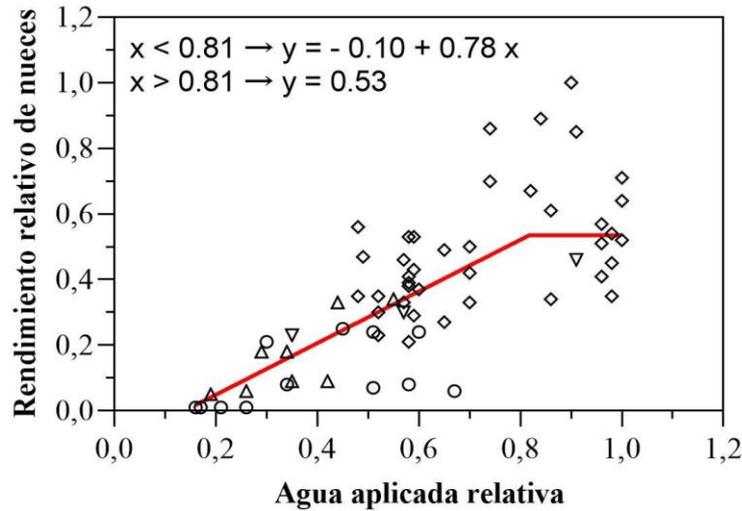


Fig. 1.1 Relación entre el rendimiento relativo de nueces secas con cáscara y el agua aplicada relativa para nogales. Los datos se obtuvieron de Goldhamer et al., 1988; Cohen et al., 1997; Ferreyra et al., 2001; Lampinen et al., 2004 y Buchner et al., 2008.

Es importante destacar que, si las nueces no se conservan en condiciones ideales, surgen nuevos problemas tras la oxidación no enzimática, tales como la oxidación de los ácidos grasos insaturados del aceite por la acción de las enzimas lipasa y lipoxigenasa y el aumento de la rancidez (Ortiz et al., 2019). Adicionalmente, una disminución en el suministro de carbohidratos a la nuez durante la etapa de crecimiento por sombreado y/o caída de hojas también puede oscurecer el tegumento de la nuez (Fields et al., 2020). En este sentido se ha reportado que dos aplicaciones con caolinita al 3 % en forma de aerosol a lo largo de la temporada protegerían al cultivo contra quemaduras solares en hojas, cáscara y semillas en ambientes con altas temperaturas y déficit hídrico (Gharaghani et al., 2018).

1.4 Vacancia de conocimiento

Dada la elevada demanda hídrica del nogal, el desarrollo de cultivos de alta densidad en conjunto con la aplicación de estrategias de riego deficitario podría ser una opción para la expansión del cultivo en zonas semiáridas. Las estrategias de riego deficitario parecen ofrecer una vía para mejorar tanto la calidad de la nuez como del aceite en el nogal, al igual que se ha estudiado en otros frutos secos, como el pistacho o la almendra (Carbonell-Barrachina et al., 2015; Lipan et al., 2019). El control del crecimiento vegetativo es clave, pero las estrategias de riego deficitario han sido poco evaluadas a largo plazo para este fin. Por lo tanto, es necesario abordar y explorar esta cuestión en futuros estudios. Las estrategias de RDC pueden ser útiles cuando se aplican entre la brotación y el endurecimiento del endocarpio para aumentar el PA y reducir el crecimiento vegetativo con un ligero efecto negativo sobre el rendimiento y el tamaño finales de la nuez. El RDS permitiría ahorrar más agua y controlar el crecimiento vegetativo, aunque la producción también podría disminuir. Otras estrategias, como la SPR,

no se han probado en este cultivo. Por último, se necesitan más experimentos de campo centrados en la definición del periodo, intensidad y duración del riego deficitario y los umbrales de PHX (y otros indicadores) para extrapolar los resultados a diferentes condiciones ambientales y de manejo del cultivo.

Capítulo II:

Objetivos e hipótesis

Objetivo general: Describir los efectos de distintos regímenes hídricos sobre el crecimiento vegetativo, producción, calidad de nuez y variables metabólicas-fisiológicas en un nocal joven (*Juglans regia* L.) del Noroeste de Argentina (Chilecito, L. R.).

Hipótesis general: Existe una lámina de riego distinta a la necesidad de riego estimada como óptimas del nogal que permiten reducir el crecimiento vegetativo, sin afectar la producción y calidad de los frutos y aceite.

Objetivo específico 1 (Capítulo 4): Comparar los efectos de distintos regímenes hídricos aplicados durante todo el ciclo productivo del nogal sobre el crecimiento vegetativo, indicadores del estado hídrico y composición del rendimiento.

Hipótesis 1: Existe una dosis de riego distinta a la estimada como óptima que permite mantener similar relación producción/crecimiento vegetativo (i.e. eficiencia productiva).

Objetivo específico 2 (Capítulo 5): Contrastar la calidad de frutos y perfiles de ácidos grasos de los aceites obtenidos de plantas tratadas con distintos niveles de reposición hídrica durante todo el ciclo productivo.

Hipótesis 2: La relación óptima entre la producción y crecimiento vegetativo del nogal, obtenida a partir de la aplicación de dosis de riego deficitarias, estará relacionada con producciones de alta calidad, como son requeridas por los mercados nacionales e internacionales.

Objetivo específico 3 (Capítulo 6): Evaluar la concentración de solutos compatibles, antioxidantes, estado oxidativo de las membranas celulares de la hoja y perfil de metabolitos polares de la semilla como biomarcadores de estado hídrico del cultivo.

Hipótesis 3.1: los metabolitos asociados a procesos de ajuste osmótico (prolina y azúcares solubles totales), antioxidantes (fenoles y flavonoides totales) y productos de la oxidación de las membranas plasmáticas (malondialdehído) son biomarcadores de estrés hídrico en nogal.

Hipótesis 3.2: El perfil de metabolitos polares de la semilla de nogal se ve afectado por el déficit hídrico al que fue sometido la planta durante la temporada.

Capítulo III:

Descripción del experimento

3.1 Sitio experimental

El experimento se realizó en un nocal comercial de seis años de la variedad Chandler en el distrito Guanchín (29° 10' S; 67° 40' O; 1750 msnm; Fig. 3.1), en la provincia de La Rioja, Argentina, durante dos temporadas consecutivas: 2018-2019 (Temporada 1, del 1 de octubre de 2018 al 31 de mayo de 2019) y 2019-2020 (Temporada 2, del 1 de octubre de 2019 al 31 de mayo de 2020). El cultivo se estableció en 2012 con árboles espaciados a 7 m entre filas y 5 m entre árboles (285 árboles ha⁻¹) y regados con un microjet por árbol. La temperatura media anual de la región es 13,5 °C, mientras que la oferta de frío invernal alcanza 1100 horas frío o 65 porciones de frío estimadas a través del modelo dinámico, y la precipitación media anual alcanza 534 mm acumulando la mayor parte de las precipitaciones durante los meses de verano (datos registrados en el sitio experimental durante el periodo 2010-2020). Los datos meteorológicos diarios se registraron en una estación meteorológica instalada en el sitio experimental, incluyendo: temperaturas máxima y mínima del aire, humedad relativa, radiación solar, velocidad del viento, precipitaciones y evapotranspiración de referencia (ET₀). Las características fisicoquímicas del suelo se analizaron a hasta 1 m de profundidad al inicio del experimento (Tabla 3.1). El suelo es de origen aluvional, franco hasta 0,75 m y franco-arcilloso de 0,75 a 1 m de profundidad. La relación de absorción de sodio fue inferior a 0,16 mEq kg⁻¹ en todo el perfil explorado. La materia orgánica fue de 5 % en los primeros 25 cm y de 3,7 % al metro de profundidad; mientras que el pH se mantuvo estable en todo el perfil del suelo en el rango de 8,5 a 8,8.



Fig. 3.1 Fotografía satelital del sitio experimental.

Tabla 3.1 Características fisicoquímicas del suelo del sitio experimental a cuatro profundidades.

Profundidad (cm)	Clase textural	pH	CE ($\mu\text{s cm}^{-1}$)	RAS (mEq kg^{-1})	MO (%)	CAS 10 KPa (%)	CAS 1500 KPa (%)	AD (%)
0-25	F	8,5	511	0,13	5,0	26,6	8,5	18,1
25-50	F	8,6	429	0,15	4,5	26,6	8,5	18,1
50-75	F	8,8	376	0,16	4,0	26,6	8,5	18,1
75-100	F-A	8,8	385	0,16	3,7	31,6	7,3	24,3

EC, conductividad eléctrica; RAS, relación de absorción de sodio; MO, materia orgánica; CAS, contenido de agua del suelo; AD, agua disponible AWC; F, suelo franco; F-A, suelo franco-arcilloso.

3.2 Diseño del experimento

El diseño experimental fue en bloques completos al azar, con cuatro niveles de riego, cada uno con cuatro repeticiones. Al inicio del estudio, se midió la altura total, el volumen de copa y el área seccional transversal del tronco (ASTT) a 50 cm por encima del suelo en 175 árboles distribuidos en 5 filas contiguas para ser utilizados como criterios de bloqueo (Fig. 3.1 y 3.2). Se seleccionaron 16 parcelas experimentales, constituidas cada una por 12 árboles (3 filas x 4 árboles por fila), en las que dos árboles centrales (similares en altura, volumen de copa y ASTT) de la fila central se utilizaron para la toma de datos y los árboles restantes fueron árboles de guarda (Fig. 3.3).



Fig. 3.2 Fotografía del sitio experimental.

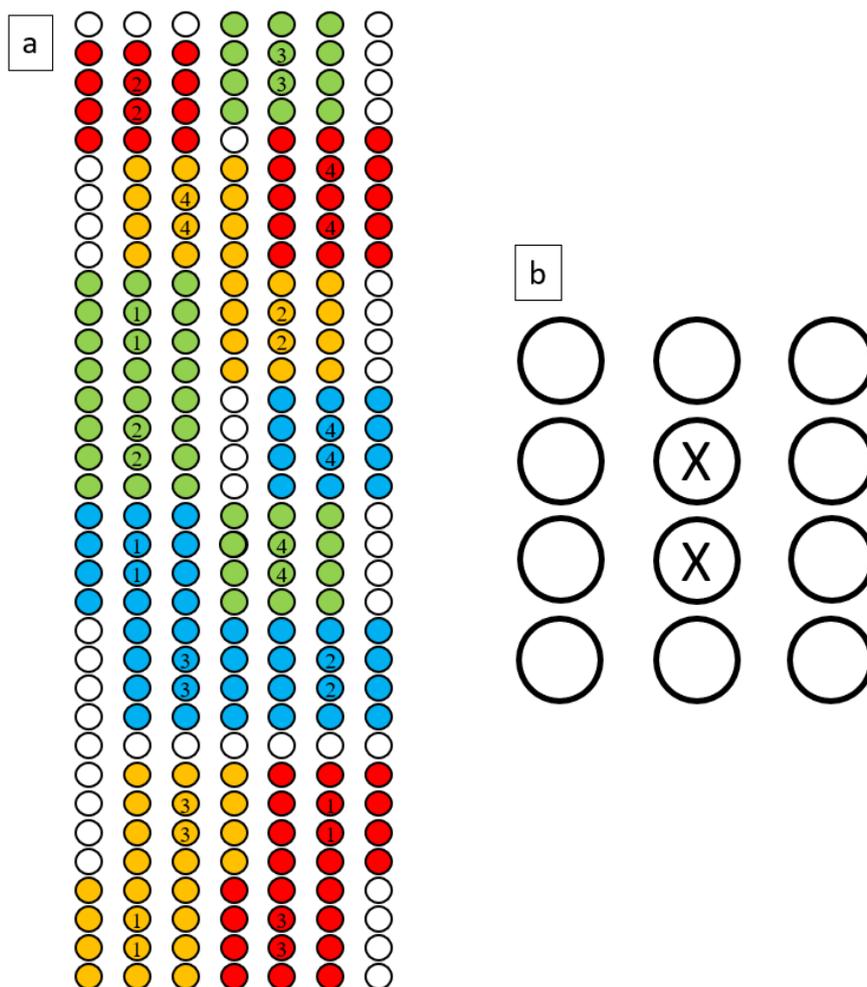


Fig. 3.3 Plano del experimento incluyendo la ubicación de las parcelas en el sitio experimental donde el tratamiento aplicado a cada parcela se ha identificado con diferentes colores (T50: Rojo, T75: Anaranjado, T100: Verde y T125: Azul) y el bloque al que pertenece la parcela con números en las plantas centrales de cada parcela. A la derecha (b), plano de parcela experimental (unidad experimental), compuesta por tres filas de cuatro plantas, donde las unidades observacionales (plantas centrales) están marcadas con X.

De los árboles centrales, uno se mantuvo inalterado hasta la cosecha, en él se realizaron mediciones de crecimiento vegetativo y se determinó el rendimiento en la cosecha, mientras que en el otro árbol se realizaron mediciones potencialmente destructivas, como las de potencial hídrico y conductancia estomática.

3.2.1 Tratamientos de riego

Los cuatro tratamientos (regímenes) de riego se aplicaron desde el 1 de octubre de 2018 hasta el 15 de mayo de 2020. El tratamiento T100 recibió una cantidad de agua equivalente al 100 % de la ETc. Los tratamientos T50, T75 y T125 recibieron cantidades de agua equivalentes al 50 %, 75 % y 125 % del aplicado a T100, respectivamente. Para reponer las necesidades hídricas en cada tratamiento, se

utilizaron microjets de caudal autocompensado con diferentes caudales (T50: 20 L h⁻¹; T75: 30 L h⁻¹; T100: 40 L h⁻¹; y T125: 50 L h⁻¹), lo que permitió mantener una distribución espacial de emisores (un microaspersor entre plantas contiguas) y una frecuencia de riego similares.

La ET_c se estimó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$ET_c = ET_0 * K_c * K_r$$

La ET₀ se estimó a partir de datos obtenidos con la estación meteorológica y luego sometidos a la ecuación de Penman-Monteith modificada por la FAO (Allen et al., 1998), mientras que los valores mensuales de K_c fueron los propuestos por Goldhamer et al. (1998) y que se muestran en la Tabla 3.2. K_r es un coeficiente de reducción asociado al porcentaje de cubierta vegetal, estimado a partir de la siguiente ecuación (Fereres et al., 1982):

$$K_r = \frac{2 * \% \text{ de cobertura}}{100}$$

El coeficiente K_r puede alcanzar un valor máximo igual a 1 (Fereres et al., 1982).

En este caso, dado que los árboles ya habían cubierto más del 50 % de la superficie del suelo al inicio del experimento, el K_r fue igual a 1. El programa de riego consideró la precipitación efectiva (P_{Pe}) a partir de la precipitación diaria (PP) aplicando las siguientes ecuaciones (Puertas, 2009):

$$PP < 12 \text{ mm} \rightarrow P_{Pe} = 0$$

$$PP \geq 12 \text{ mm} \rightarrow P_{Pe} = (PP - 12) * 0.8$$

El intervalo entre riegos desde la brotación hasta la cosecha fue semanal, excepto si P_{Pe} era significativa, en cuyo caso se amplió el intervalo.

Tabla 3.2 Coeficientes de cultivo (K_c) usados para la programación de riego propuestos por Goldhamer et al. (1998). Ambas temporadas (2018-2019 y 2019-2020) iniciaron el 1° de Octubre (Día 1 de la temporada) y finalizaron el 15 de mayo (día 230 de la temporada).

Día de la temporada	K _c
1 - 19	0,4
20 - 34	0,6
35 - 49	0,7
50 - 64	0,9
65 - 144	1,1
145 - 174	1,0
175 - 189	0,8
190 - 204	0,7
205 - 230	0,6

Capítulo IV:

Efecto de los regímenes hídricos sobre el crecimiento vegetativo, producción y composición del rendimiento

Basado en:

Vegetative growth, yield, and crop water productivity response to different irrigation regimes in high density walnut orchards (*Juglans regia* L.) in a semi-arid environment in Argentina

Franco Emmanuel Calvo ^{ab*}, Eduardo Rafael Trentacoste ^c, Sonia Teresa Silvente ^d

^a Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

^b Instituto de Agricultura Sostenible en el Oasis (IASO), Universidad Nacional de Chilecito (UNdeC)

^c Instituto de Ambiente de Montaña y Regiones Áridas (IAMRA), Universidad Nacional de Chilecito (UNdeC)

^d Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Junín

Publicado en: Agricultural Water Management (2022)

Q1 Agricultural and Biological Sciences - Agronomy and Crop Science (16/376)

<https://doi.org/10.1016/j.agwat.2022.107969>

4.1 Introducción

Desde la década del 2000 en la región centro-oeste de Argentina se ha producido un aumento significativo de la superficie cultivada con nogal (de 12.000 ha en 2002 a 18.000 ha en 2018: INDEC, 2020; FAOSTAT, 2023). Luego de más de un siglo de un manejo tradicional del cultivo de nogal en baja densidad (<100 árboles ha^{-1}) y riego superficial, se están estableciendo nuevas explotaciones comerciales utilizando tecnologías que combinan riego localizado y alta densidad de plantación (> 300 árboles ha^{-1}) (Sibbett et al., 1997; Lemus, 2010). La región centro-oeste de Argentina se caracteriza por escasas precipitaciones anuales en el rango de 200 a 600 mm concentradas en los meses de verano (Rubí Bianchi y Cravero, 2010), muy por debajo de los requerimientos óptimos del cultivo que superan los $1.000 \text{ mm ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$. En consecuencia, el cultivo del nogal en Argentina sólo es posible bajo riego. Las crecientes limitaciones en la disponibilidad y costos de bombeo y presurización de los recursos hídricos (Rivera et al., 2021), han incrementado el interés por conocer las necesidades hídricas del nogal y mejorar la productividad del agua (PA) para reducir costos y aumentar la superficie cultivada.

La evapotranspiración del cultivo (ETc) varía según el ambiente, la variedad, la densidad de plantación y la edad del cultivo (Pereira et al., 2015). Las principales limitaciones para la estimación de la ETc son las intrínsecas necesidades de uso de equipos fijos y costosos como lisímetros, y estudios a mediano-largo plazo. En Argentina, los productores de nogal utilizan para la programación de riego coeficientes de cultivo (Kc) estimados para California (EUA) en condiciones agroclimáticas diferentes a las de Argentina. A pesar de la significativa expansión del nogal en Argentina y la creciente demanda de conocimientos en relación a la gestión del riego, los estudios locales centrados en cuantificar la demanda hídrica del cultivo son escasos. En este contexto, la aplicación de diferentes niveles de riego durante toda la temporada parece ser la mejor estrategia para cuantificar la función de la productividad del agua del nogal para definir estrategias de riego que conduzcan al aumento de la productividad del agua (PA).

En cultivos frutales, uno de los indicadores más utilizado para conocer y manejar el estado hídrico de la planta es el potencial hídrico, aunque otras medidas como la detección térmica, la conductancia estomática y la dendrometría del tallo se realizan conjuntamente (Parkash y Singh, 2020). En nogal, el umbral de potencial hídrico xilemático (PHX) al mediodía para evitar pérdidas productivas y controlar el crecimiento vegetativo se estimó en $-0,8 \text{ MPa}$ (Fulton et al., 2014), mientras que la conductancia estomática (gs) inferior a $20 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ se ha asociado a condiciones de déficit hídrico (Rosati et al., 2006). Fulton y Buchner (2015) revisaron artículos sobre el efecto de la aplicación de estrategias de riego deficitario al nogal a lo largo de la temporada en condiciones agroclimáticas de California, categorizando las estrategias en: i) reducción del agua aplicada de hasta el 20 % de la ETc (PHX de $-0,4$ a $-0,8 \text{ MPa}$), que incrementan la cantidad de semillas oscuras y disminuye ligeramente el rendimiento; ii) reducción del riego entre el 20 y el 50 % de la ETc (PHX de $-0,5$ a -1 MPa). En este caso, si la reducción se produce gradualmente entre el llenado de la semilla y la cosecha, el efecto puede

ser una ligera reducción del rendimiento (similar a la primera estrategia). Si la reducción se aproxima al 50 %, no sólo aumentará el porcentaje de semillas oscuras y la reducción del rendimiento, sino que el rendimiento de la temporada siguiente también podría verse afectado por una reducción excesiva del crecimiento vegetativo. iii) Reducciones severas del riego por debajo del 50 % de la ETc (PHX de -0,8 a -1,2 MPa) tienen un efecto negativo inevitable sobre la producción en términos de cantidad y la calidad, y el periodo de recuperación podría durar más de dos temporadas con riego regular. Por otra parte, Cohen et al. (1997) aplicando un tratamiento de riego excedentario equivalente al 130 % de la ETc demostraron que el rendimiento y la calidad no eran significativamente superiores al control regado al 100 % de la ETc y además promovía un crecimiento vegetativo excesivo.

La hipótesis planteada fue que el efecto negativo de las estrategias de riego deficitario aplicadas a lo largo de todo el ciclo del nogal es poco significativo en el centro-oeste de Argentina en términos de rendimiento, ya que el régimen de lluvias estivales de esta región reduce significativamente la demanda hídrica del cultivo. Por lo tanto, el objetivo de este capítulo fue comparar los efectos de distintos regímenes hídricos aplicados durante todo el ciclo productivo del nogal sobre el crecimiento vegetativo, indicadores del estado hídrico y composición del rendimiento.

4.2 Metodología

4.2.1 Potencial hídrico xilemático y conductancia estomática

El potencial hídrico xilemático (PHX) y la conductancia estomática (gs) se midieron mensualmente en días completamente despejados desde el inicio de la brotación (noviembre) hasta la cosecha (marzo). Las mediciones de PHX se realizaron entre las 12:00 y las 13:00 h solares utilizando una cámara de presión tipo Scholander (BioControl 0-4 MPa, Buenos Aires, Argentina) siguiendo la metodología propuesta por McCutchan y Shackel (1992). En resumen, se seleccionaron dos folíolos apicales de hojas maduras de brotes cercanos al tronco del árbol central de cada repetición. Los folíolos seleccionados se colocaron en una bolsa de plástico reflectante e impermeable al menos 90 minutos antes de la medición. La conductancia estomática se midió en dos folíolos apicales de dos hojas completamente desarrolladas de un árbol por repetición a media mañana (10:00-11:00 h solar) con un porómetro de difusión estomática previamente calibrado (Delta-T AP4, Cambridge, Reino Unido).

4.2.2 Área seccional transversal del tronco, volumen y porosidad de la canopia

El área seccional transversal de tronco (ASTT) se estimó a partir del perímetro a 50 cm de la superficie del suelo en un árbol central de cada repetición. El perímetro del tronco se midió en tres estados fenológicos en cada temporada: brotación, endurecimiento del endocarpio (coincidiendo con el final del crecimiento de los brotes) y madurez (mediados de marzo). Con la misma frecuencia de mediciones de ASTT y en los mismos árboles, se estimaron el volumen y la porosidad de la copa. El volumen de la copa se calculó midiendo la altura total del árbol, la altura de inserción de la primera rama y los radios

de la copa en las cuatro direcciones cardinales (según su proyección de sombra sobre el suelo) aplicando la siguiente ecuación:

$$Vol. \text{ copa } (m^3) = \frac{\pi * (\text{ancho medio } (m))^2}{12} * (\text{altura } (m) - \text{altura primer rama}(m))$$

La porosidad de la copa se estimó utilizando fotografías de la proyección de sombra al mediodía solar sobre una manta blanca de una superficie conocida ($1m^2$) extendida a 1 m del tronco del árbol central de cada repetición. A continuación, se procesaron las fotografías para determinar el porcentaje de superficie no sombreada (es decir, el porcentaje de poros) con el software CobCal V2.1.

4.2.3 Rendimiento, componentes del rendimiento y productividad del agua

La madurez de cosecha de las nueces se define una vez que se alcanzan: i) la madurez fisiológica de la semilla, indicada por la lignificación de los tejidos conductivos y de empaquetado en torno a la semilla y ii) la madurez del fruto, alcanzada en torno a 10-15 días después de alcanzada la madurez fisiológica de la semilla, indicada por la pérdida de adherencia entre el endocarpio-pericarpio y el resquebrajado del epicarpio del 80 % de los frutos (Sibbet et al., 1974). Una vez que las nueces alcanzaron la madurez de cosecha (23 de marzo en 2019 y 19 de marzo en 2020) se cosechó manualmente un árbol central por repetición, se retiraron los restos de pericarpio que hubiesen quedado adheridos a la cosecha y se pesaron inmediatamente las nueces recolectadas. Se tomó una muestra de 100 nueces y se pesaron con una balanza de precisión (Precisa 320 XT, Dietikon, Suiza). A continuación, se estimó el peso fresco medio de las nueces. El número de nueces por árbol se determinó a partir del peso total de la cosecha y del peso fresco medio de las nueces. La muestra de 100 nueces se secó en horno con corriente de aire forzado a 30 °C hasta alcanzar una concentración de agua en la semilla del 4 %. Se utilizó una termobalanza con una precisión de 0,001 g (Precisa XM60, Dietikon, Suiza) para comprobar la humedad de la nuez durante el secado. El rendimiento en seco por árbol se estimó a partir del peso en seco de las nueces (humedad de semilla = 4 %) y del número estimado de nueces por árbol.

A continuación, se quebraron manualmente las cáscaras de las 100 nueces y se pesaron las semillas para obtener el porcentaje de llenado de la nuez (% llenado = (peso seco de 100 semillas/peso seco de 100 nueces)*100)). La concentración de aceite se estimó mediante extracción con solvente con un extractor soxhlet automatizado (Ankom XT10, Nueva York, EUA). Se utilizó la metodología oficial AOAC 920.39 (Thiex et al., 2003), que consistió en moler 30 semillas por tratamiento, y se tomaron muestras de 2 g por duplicado de la pasta formada. Las submuestras se secaron hasta peso constante en una estufa con flujo de aire forzado a 70°C. La extracción con solvente se realizó con éter de petróleo en un programa de extracción cíclica de 60 minutos. Una vez finalizada la extracción, se pesó la muestra y se estimó la concentración de aceite en la semilla.

La productividad del agua (PA) se estimó para cada repetición y temporada como la relación entre el rendimiento seco de nueces por hectárea (kg ha^{-1}) y la cantidad total de agua aplicada (es decir, el agua de riego más la precipitación efectiva (mm)). El rendimiento relativo se estimó a partir de la relación proporcional del rendimiento medio de cada tratamiento con respecto al rendimiento del tratamiento de rendimiento máximo promedio en cada temporada.

4.2.4 Análisis estadístico

El análisis de datos se realizó en el entorno R v.4.1.2 para estadística computacional con los paquetes nlme y emmeans . Se utilizó un modelo lineal mixto, asumiendo que el tratamiento era un efecto fijo y el bloque un efecto aleatorio. Los gráficos y análisis de regresión se realizaron con GraphPad Prisms v.8.3.0 (GraphPad Software, San Diego, California, EUA; www.graphpad.com).

4.3 Resultados

4.3.1 Condiciones meteorológicas y uso de agua de riego

Las temperaturas máximas absolutas fueron similares en ambas temporadas, de 35,2 °C el 24 de diciembre de 2018, en la temporada 1, y de 34,2 °C el 25 de enero de 2019, en la temporada 2. Durante la temporada 2018-2019, la temperatura mínima registrada fue de 1,1 °C el 2 de octubre y de -1,1 °C el 7 de mayo al final de la temporada 2019-2020 (Fig. 4.1a). Ambas temporadas registraron similares aportes de frío invernal, alcanzando 1150 horas de frío y 67,7 porciones de frío en el periodo comprendido entre el 1 de mayo y el 1 de septiembre. La ET₀, ET_c, precipitación y dosis de riego aplicada a cada tratamiento en ambas temporadas se muestran en la Tabla 4.1. En 2018-2019, la precipitación total acumulada fue de 524 mm, con eventos en su mayoría superiores a 20 mm distribuidos uniformemente en los meses de verano. La temporada 2019-2020 fue más seca que la temporada 2018-2019, con una precipitación acumulada de 374 mm, con eventos concentrados en enero y febrero (Tabla 4.1 y Fig.4.1b). En este sentido, la ET₀ fue similar entre temporadas, con 774 mm y 802 mm acumulados en las temporadas 2018-2019 y 2019-2020, respectivamente (Fig. 4.1b), También es importante señalar que la ET_c fue de 656 mm y 709 mm, en las temporadas 1 y 2, respectivamente (Tabla 4.3). La precipitación efectiva contribuyó a un equivalente del 20 % y 11 % de la ET_c en 2018-2019 y 2019-2020, respectivamente.

El riego aportado en cada tratamiento más la lluvia efectiva (agua total aplicada) fue ligeramente superior a los tratamientos previstos al 50 %, 75 %, 100 % y 125 % de la ET_c, reponiendo volúmenes equivalentes al 65 %, 80 %, 100 % y 123 % de la ET_c en 2018-2019, y al 62 %, 79 %, 100 % y 125 % de la ET_c en 2019-2020.

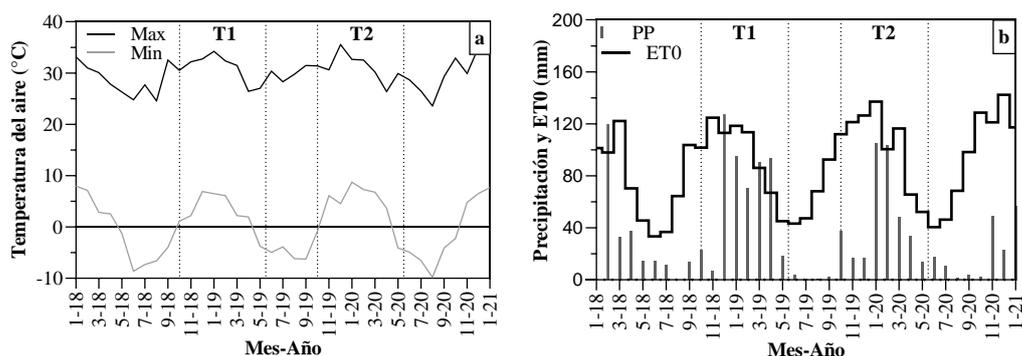


Fig. 4.1 Temperaturas máximas y mínimas mensuales (a) y precipitación y evapotranspiración de referencia (ET0) mensuales (b) durante las temporadas 2018-2019 (T1) y 2019-2020 (T2). Las líneas punteadas indican el inicio y final de cada temporada.

4.3.2 Potencial hídrico xilemático y conductancia estomática

El potencial hídrico xilemático (PHX) tuvo un comportamiento similar entre tratamientos en ambas temporadas (Fig. 4.2a-b). El tratamiento T100 mantuvo valores de PHX en torno a $-0,80$ MPa a lo largo de la temporada de crecimiento. El tratamiento T75 mostró patrones y valores estacionales similares al T100. En T50, los valores de PHX fueron significativamente más bajos que en T100, especialmente a mitad de la temporada, cuando T50 alcanzó un PHX de $-0,90$ MPa. Por otro lado, T125 presentó un PHX consistentemente mayor que T100, de $-0,7$ a $-0,5$ MPa. En la cosecha y postcosecha, todos los tratamientos presentaron un PHX similar de $-0,50$ MPa y $-0,25$ MPa, respectivamente. La conductancia estomática en la primera temporada osciló entre 350 y 450 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para todos los tratamientos (Fig. 4.2c). En la segunda temporada, los valores de g_s oscilaron entre 400 y 600 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 4.2d), más altos que en las primeras temporadas cuando se produjeron mayores precipitaciones acumuladas (Tabla 4.1). Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la g_s entre tratamientos solo en ambas temporadas alrededor de 100 días después de floración en ambas temporadas y hacia la cosecha solo en la primera temporada. A los 100 días después de plena floración las g_s de T125 y T100 fueron superiores a las de T75 y T50. La conductancia estomática hacia la postcosecha se redujo drásticamente a 100 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en ambas temporadas.

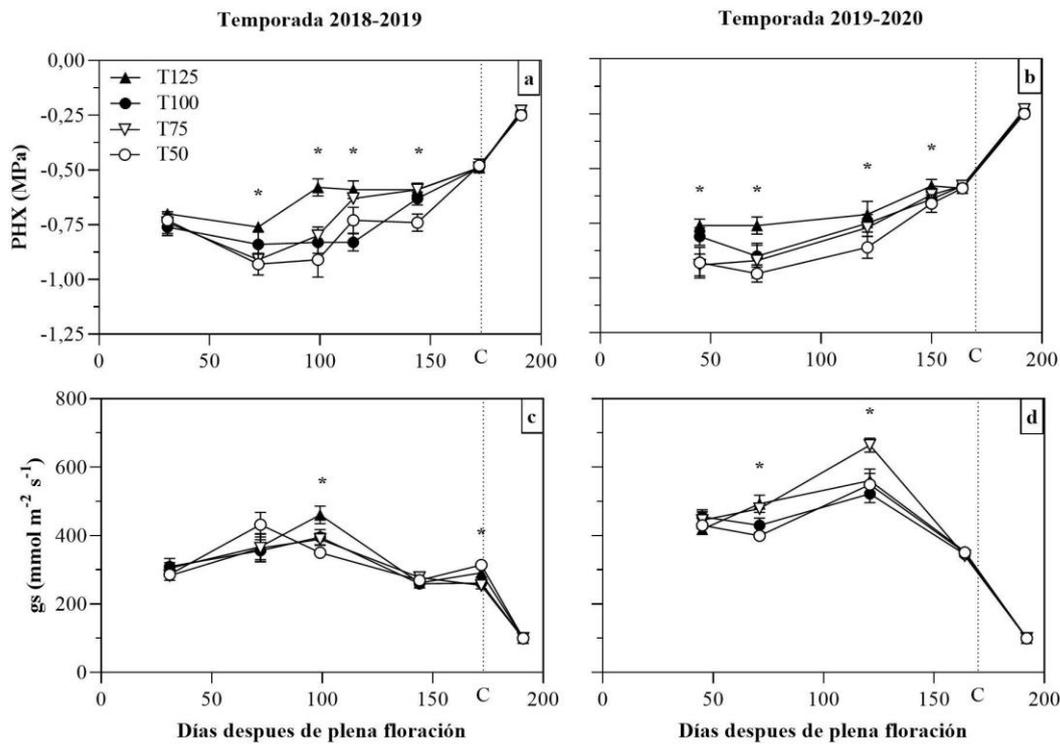


Fig. 4.2 Dinámica del potencial hídrico xilemático (PHX) (a-b) y conductancia estomática (gs) (c-d) durante las temporadas 2018-2019 (a-c) y 2019-2020 (b-d). Los asteriscos indican diferencias con significancia estadística entre tratamientos a $P < 0.05$. Las barras de error representan la desviación estándar de la media. La letra C y la línea punteada indican las fechas de cosecha.

4.3.3 Área seccional transversal del tronco, volumen y porosidad de la copa

El crecimiento del volumen de copa no se vio afectado significativamente por los tratamientos en 2018-2019, pero mostró diferencias a principios de la temporada 2019-2020. Los volúmenes de copa de T100 y T125 fueron similares; T75 fue intermedio, y T50 fue el más bajo (Fig. 4.3a). El área seccional transversal del tronco (ASTT, Fig. 4c) fue más sensible a los tratamientos de riego al inicio de ambas temporadas, cuando el ASTT de T50 fue significativamente menor que el del resto de tratamientos. Posteriormente, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, se pudo observar un comportamiento diferente al comparar T50 con el grupo T75-100-125. El ASTT y el volumen de copa presentaron una relación positiva ($R^2 = 0,52$; Fig. 4.3d). En el momento de la recolección, la porosidad de la copa, determinada como proporción de la radiación solar transmitida al mediodía, no difirió entre los tratamientos durante ambas temporadas (Fig. 4.3b).

Tabla 4.1 Valores acumulados por temporada de evapotranspiración de referencia (ET0), evapotranspiración de cultivo (ETc), precipitación acumulada (PP), precipitación efectiva acumulada (PPE), cantidad de eventos de riego, cantidad de agua aplicada por irrigación y total de agua aplicada (riego + precipitación efectiva) en las temporadas 2018-2019 y 2019-2020).

Temporada	ET0 (mm)	ETc (mm)	PP (mm)	PPE (mm)	Eventos de riego (# temporada ⁻¹)	Tratamiento	Riego (mm)	Agua aplicada total (mm)
2018-2019	774	656	524	134	19	T50	340	474
						T75	452	586
						T100	596	730
						T125	761	895
2019-2020	802	709	374	80	21	T50	363	443
						T75	483	563
						T100	636	716
						T125	813	893

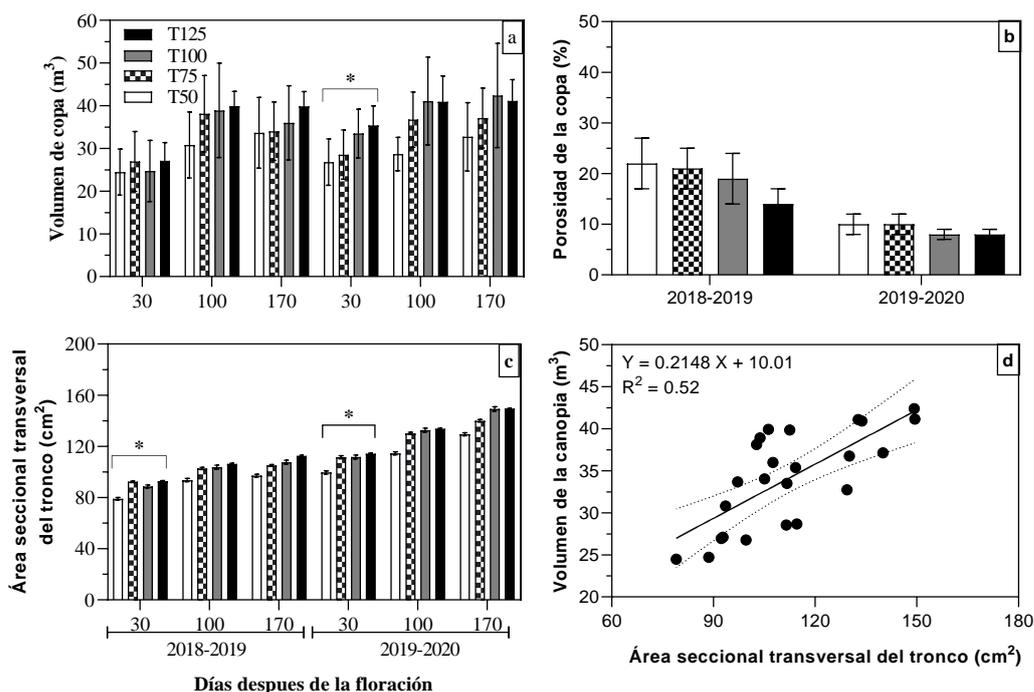


Fig. 4.3 Volumen de copa promedio (a) y área seccional transversal del tronco por tratamiento de riego (c) al inicio, mitad y final de temporada durante las temporadas 2018-2019 y 2019-2020. Porosidad de la copa promedio por tratamiento a cosecha (b). Los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos a < 0.05 . Las barras de error representan la desviación estándar de la media. La regresión lineal entre el volumen de copa promedio y la porosidad de la copa son presentados en el panel d.

4.3.4 Rendimiento, componentes del rendimiento y productividad hídrica del cultivo

El rendimiento y sus componentes no se vieron afectados por los tratamientos de riego (Tabla 4.2). El rendimiento seco de nueces (humedad = 4 %) no difirió estadísticamente entre tratamientos en ambas temporadas. Sin embargo, al comparar los tratamientos T50 y T100, se puede apreciar una tendencia a la reducción es del rendimiento en torno al 20 % en la primera temporada y del 17 % en la segunda temporada en el tratamiento más deficitario. El peso fresco y seco de 100 nueces no varió entre tratamientos. Del mismo modo, el llenado de las nueces no varió entre los tratamientos, pero se observó una marcada tendencia, ya que el tratamiento T50 perdió un 3 % de llenado de nueces en comparación con el grupo T75-100-125. El número de nueces por árbol fue el más alto en T125 (1088 nueces árbol⁻¹ en 2018-2019 y 1270 nueces árbol⁻¹ en 2019-2020) y el más bajo en T50 (805 nueces árbol⁻¹ en 2018-2019 y 1048 nueces árbol⁻¹ en 2019-2020). Aunque la concentración de aceite no fue significativamente diferente entre tratamientos, las nueces del tratamiento T50 acumularon un 5% menos de aceite que T100 en 2018-2019, al mismo tiempo que en esa temporada la concentración de aceite aumentó un 2 % en T125 en comparación con T100. En 2019-2020 T125 tuvo una concentración de aceite 3 % mayor en comparación con el promedio de los otros tratamientos.

La productividad del agua varió significativamente entre los tratamientos, donde T50 mostró la mayor productividad del agua con aumentos de 1 y 2 kg de rendimiento seco $\text{mm}^{-1} \text{ha}^{-1}$ en comparación con T100 en 2018-2019 y 2019-2020, respectivamente. El tratamiento T125 mostró una menor productividad del agua con un valor medio 1 kg rendimiento seco $\text{mm}^{-1} \text{ha}^{-1}$ inferior a T100 en ambas temporadas. En este contexto, es interesante señalar que la PA de T75 no difirió de la obtenida en T100, permitiendo un ahorro de agua de riego del 24 % en ambas temporadas. El rendimiento seco relativo se asoció fuertemente con el total de agua aplicada (Fig. 4.4), en una regresión lineal segmentada única para ambas temporadas ($R^2 = 0,90$), donde la pendiente 0 (punto de ruptura) se obtuvo en 663,2 mm. La pendiente antes del punto de quiebre de la función fue de 0,9 % de rendimiento relativo por mm de agua aplicada, y el intercepto fue del 38 % de rendimiento relativo. Por otra parte, el rendimiento relativo después del punto de quiebre fue del 98 %.

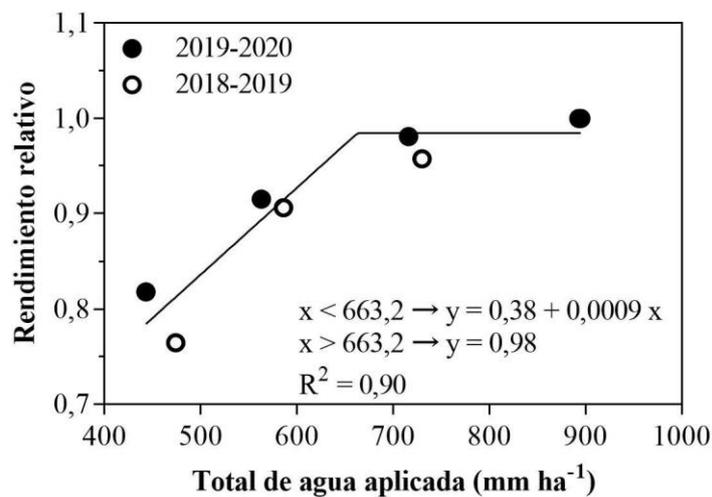


Fig. 4.4 Regresión lineal segmentada del rendimiento relativo sobre el total de agua aplicado (irrigación + precipitación efectiva) a la cosecha durante las temporadas 2018-2019 y 2019-2020.

Tabla 4.2 Efectos de los tratamientos de riego sobre el rendimiento y componentes del rendimiento en las temporadas 2018-2019 y 2019-2020, respectivamente.

Temporada	Tratamiento	Rendimiento fresco (t ha ⁻¹)	Rendimiento seco (t ha ⁻¹)	PF 100 nueces (kg)	PS 100 nueces (kg)	Nueces por árbol (#)	Llenado (%)	[aceite] (% en base seca)	PA (kg rendimiento seco mm ⁻¹ ha ⁻¹)
2018-2019	T50	4,18±1,50	2,50±0,97	1,85±0,15	1,10±0,11	805±321	41±2	56±1	5,29±2,07
	T75	5,27±1,67	2,97±0,78	1,91±0,017	1,09±0,07	956±250	43±1	59±5	5,07±1,34
	T100	5,45±1,76	3,14±1,05	1,91±0,06	1,10±0,03	1.002±321	44±1	59±1	4,30±1,44
	T125	5,63±1,43	3,28±0,88	1,86±0,19	1,07±0,06	1.088±330	43±2	61±2	3,66±0,99
	p-valor	0,5096	0,5751	0,7031	0,9599	0,5312	0,4400	0,1549	0,2717
2019-2020	T50	5,71±1,25	3,13±0,90	1,98±0,35	1,09±0,09	1.048±336	41±2	62±2	7,28±2,04 a
	T75	5,87±1,04	3,50±0,60	1,76±0,12	1,05±0,03	1.173±217	43±1	63±2	6,23±1,07 ab
	T100	6,28±1,58	3,75±1,16	1,87±0,18	1,09±0,05	1.208±407	43±1	62±3	5,25±1,62 ab
	T125	6,57±2,58	3,83±1,58	1,83±0,15	1,06±0,04	1.270±555	43±3	65±2	4,28±1,77 b
	p-valor	0,6973	0,5919	0,5888	0,6730	0,6678	0,5730	0,4700	0,0088

PF, peso fresco; PS, Peso seco; PA, productividad del agua

P-valor > 0.05 no representan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos según la prueba LSD.

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.

4.4 Discusión

4.4.1 Potencial hídrico xilemático y conductancia estomática

En los nogales regados con dosis de riego equivalentes al 75 % y el 125 % de la cantidad de agua aplicada al tratamiento Control se observaron valores de PHX al mediodía superiores a $-0,8$ MPa durante toda la temporada de crecimiento, en línea con el umbral de ausencia de déficit hídrico propuesto por Fulton et al. (2014). Sin embargo, el PHX en el tratamiento T50 fue cercano a -1 MPa desde 25 DDF (es decir, cuajado del fruto) hasta 100 DDF (es decir, llenado de la semilla) sin pérdidas significativas de rendimiento (Tabla 3.4). Este hallazgo sugiere que la severidad, el estado fenológico y la duración del periodo de déficit hídrico con potenciales hídricos inferiores a $-0,8$ MPa son factores determinantes para que haya o no pérdidas de rendimiento. Además, los resultados obtenidos también podrían indicar que los umbrales de PHX varían según las condiciones ambientales de cada sitio de cultivo, en concordancia con lo reportado por Corell et al. (2016) para olivos en diferentes localidades de España.

El potencial hídrico xilemático fue más sensible a los tratamientos de riego que la conductancia estomática, mostrando el PHX diferencias significativas entre tratamientos a lo largo de toda la temporada de crecimiento. La gs media fue similar entre tratamientos dentro de cada una de las temporadas, ya que varió entre 277 y 291 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la temporada 2018-2019 y entre 365 y 405 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la temporada 2019-2020. Rosati et al. (2006) encontraron una relación exponencial entre gs y PHX en nogales regados al 50 % de la ETc; cuando el PHX fue inferior a $-0,8$ MPa (hasta $-1,2$ MPa), la gs osciló entre 20 y 200 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Sin embargo, los mismos autores observaron que árboles de nogal regados al 100 % de ETc y con PHX superior a $-0,8$ MPa (hasta proximidades de 0 MPa), la respuesta fue menos lineal, con una gs variando entre 200 y 800 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Por tanto, la ausencia de diferencias significativas en las medidas de gs dentro de cada temporada puede deberse a que los tratamientos de riego aplicados no alcanzamos niveles críticos de cierre estomático y, por tanto, la cantidad de CO_2 asimilado no se vio severamente afectada. No obstante, la gs se incrementó en la segunda temporada, factor que pudo estar parcialmente explicado por la mayor temperatura y déficit de presión de vapor, aunque un factor de importancia pareció ser el incremento de la carga frutal, dado que las plantas al inicio del experimento se encontraban en pleno crecimiento y aún no habían estabilizado su productividad.

4.4.2 Comparación de indicadores de crecimiento vegetativo entre regímenes de riego

El crecimiento vegetativo, expresado como el volumen de copa, no se vio afectado significativamente por los tratamientos de riego a pesar de que existieron diferencias significativas en el PHX entre 50 y 75 días después de plena floración, momento en el cual los árboles se encontraban en el periodo de elongación de brotes. El ASTT se comportó de forma similar al volumen de copa, por lo que podría

servir como indicador del crecimiento de la copa durante la temporada. En línea con lo reportado por Cohen et al. (1997) una reducción significativa de la reposición de agua equivalente tal como la aplicada al tratamiento T50 podría reducir el crecimiento del ASTT. La diferencia en los volúmenes de copa entre tratamientos cerca del final de la segunda temporada resultó en una diferencia en el número de nueces por árbol entre T50 y T100 de 200 nueces, pero sin alcanzar a ser diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. La combinación de árboles con copa compacta y con alta porosidad (es decir, menor densidad de área foliar) permitiría una reducción significativa de la ETc al reducir la superficie foliar transpirante (Pereira et al., 2006). Aunque estos resultados podrían conducir a una reducción significativa de la proporción de radiación fotosintéticamente activa (RFA) interceptada, parece una buena estrategia para el manejo de huertos de nogales en alta densidad, minimizando así la necesidad de poda y generando al mismo tiempo una reducción de los costos de mantenimiento del cultivo y de la cantidad de agua aplicada (Costa, 2007).

Para mejorar el entendimiento del comportamiento de las variables de crecimiento vegetativo medidas, es necesario asociarlas a la capacidad de retención de agua del suelo, su clase textural (Tabla 3.1) y los aportes de agua atmosférica (Tabla 4.1). La ETc del sitio experimental durante el periodo experimental fue de 656 y 709 mm año⁻¹ en un régimen de precipitación Monzónico. La ETc estimada en ambas temporadas fue equivalente al 70 % de la ETc estimada para California (1050 mm) en un régimen de precipitación Mediterráneo (Goldhamer et al., 1998). Por lo tanto, los Kc utilizados pueden conducir a una sobreestimación de las demandas de agua del cultivo y con ello conducir a respuestas distintas a las revisadas por Fulton y Buchner (2015) en las condiciones ambientales de California, donde el rendimiento se vio severamente afectado por reducciones de riego entre un 20 y 50 %. En este sentido, no encontramos diferencias significativas en el rendimiento ni en sus componentes bajo los distintos niveles de riego deficitario aplicados (Tabla 3.4).

El componente de rendimiento más estable fue el peso de 100 nueces frescas y el llenado del fruto (relación peso de la semilla nuez⁻¹). Ramos et al. (1978) reportaron que si el déficit hídrico ocurre en la primera mitad de la temporada el tamaño y la cantidad de nueces podrían verse afectados; mientras que si el déficit ocurre en la segunda mitad de la temporada la calidad de la semilla y la concentración de aceite serán las más afectadas. En el experimento, el llenado del perfil del suelo al principio de la temporada puede haber tenido un efecto significativo, razón por la cual el tamaño de la semilla se mantuvo estable, ya que a medida que avanzaba la temporada, la reserva de agua del suelo se agotaba en los tratamientos de riego deficitario. La concentración de aceite no mostró diferencias estadísticamente significativas, pero una diferencia del -5 % y -3 % al comparar los resultados de los tratamientos T50 y T75 con el control parece indicar una mayor sensibilidad al déficit en la segunda mitad del ciclo cuando se produce la mayor acumulación de aceite en las semillas (Ramos et al., 1978).

Buchner et al. (2008) evaluaron estrategias de riego deficitario en nogales injertados sobre dos portainjertos diferentes durante tres temporadas consecutivas. La estrategia consistió primero en mantener un PHX alto durante la fase de crecimiento vegetativo (tratando así de asegurar el crecimiento vegetativo y el tamaño de la nuez), y una vez detenido el crecimiento vegetativo, se aplicaron tres niveles de riego: riego completo (PHX de -0,3 a -0,6 MPa), déficit hídrico medio (PHX de -0,7 a -0,9 MPa) y déficit hídrico moderado (-0,9 a -1,1 MPa). Sus resultados indicaron que la carga de nueces se redujo en el tratamiento de déficit medio entre un 19 % y 28 % con respecto al tratamiento de riego completo, mientras que en el tratamiento de déficit moderado la carga se redujo entre un 30 % y 38 %. Considerando los resultados obtenidos, el PHX medio del tratamiento T50 fue de -0,68 y -0,71 MPa para las temporadas 1 y 2, respectivamente, comparable al tratamiento de déficit hídrico moderado aplicado por Buchner et al. (2008).

4.5 Conclusiones

La aplicación de regímenes de riego deficitarios al 50 % y 75 % de la ETc mejoraron la productividad del agua (relación entre rendimiento relativo y agua total aplicada) y controlan parcialmente el crecimiento vegetativo sin implicaciones negativas significativas sobre los componentes de producción y rendimiento. Esto se observó en dos temporadas consecutivas en nogales jóvenes del semiárido centro-oeste argentino, donde el agua es el factor más limitante para la producción y el costo de cada unidad de agua aplicada pesa sobre la eficiencia económica del cultivo. Además, en relación con la función de productividad del agua el riego al 90 % de la dosis aplicada a T100 hubiera permitido alcanzar la máxima productividad en ambas temporadas. Esta relación es interesante para zonas donde el agua no es limitada o tiene un coste bajo. Es necesario continuar la observación en el sitio experimental actual y seguir trabajando en otros sitios de características similares para confirmar estas conclusiones, especialmente en lo que se refiere a la similitud del rendimiento productivo obtenido en T50 y T100. En este contexto, se propone como línea de investigación futura estudiar el efecto de un régimen de riego deficitario controlado más restrictivo que T50 en el periodo de postcosecha, dado que la abrupta reducción de la conductancia estomática debido a la disminución del efecto sumidero de los frutos, proporciona una ventana ideal para el de este tipo de estrategias.

Capítulo V:

Efectos de los regímenes hídricos y temperatura de la temporada sobre la calidad de la producción y del aceite de nuez

Basado en:

Influence of irrigation regime and seasonal temperatures on nut quality and the oil fatty acid profile of walnuts (*Juglans regia* L.)

Franco Emmanuel Calvo ^{ab*}, Eduardo Rafael Trentacoste ^c, Sonia Teresa Silvente ^d

^a Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

^b Instituto de Agricultura Sostenible en el Oasis (IASO), Universidad Nacional de Chilecito (UNdeC)

^c Instituto de Ambiente de Montaña y Regiones Áridas (IAMRA), Universidad Nacional de Chilecito (UNdeC)

^d Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria La Consulta

Publicado en: Journal of Saudi Society of Agricultural Science (2023)

Q1 Agricultural and Biological Sciences - General Agricultural and Biological Sciences (12/213)

<https://doi.org/10.1016/j.jssas.2023.07.004>

5.1 Introducción

La producción mundial de nueces ha aumentado significativamente desde la década del 2000, pasando de 1,2 Mt a 3,3 Mt en 2020 (FAOSTAT, 2023). Este aumento de la demanda de nueces puede atribuirse a la revalorización de los alimentos naturales con propiedades nutraceuticas comprobadas (Ros et al., 2021). Para satisfacer la alta demanda de nueces el cultivo se está expandiendo activamente en nuevas zonas como el centro-oeste de Argentina, donde la superficie cultivada ha aumentado un 400 % en las últimas dos décadas, alcanzando 18.235 ha en 2021 con una producción de 21.500 t (FAOSTAT, 2023). En el centro-oeste de Argentina, la precipitación media anual es limitada, oscilando entre 200 y 600 mm año⁻¹ (Rubí Bianchi y Cravero, 2010), por debajo de la demanda hídrica de los nogales que se ha estimado en torno a 1000 mm año⁻¹ (Goldhamer et al., 1998). En consecuencia, la producción de nueces en esta región sólo es posible bajo riego. Rivera et al. (2021) estudiaron el balance hídrico de la región e identificaron en el período 2010-2020 una reducción significativa de las reservas de agua en los Andes (en forma de nieve y glaciares) y en los caudales de la cuenca principal; de modo que la recarga de los ríos y de los acuíferos subterráneos está limitada y, en caso de continuar con un uso tradicional del agua para riego, se podría conducir a una sobreexplotación del recurso por parte de la agricultura. La aplicación de dosis de riego inferiores a las necesidades óptimas de los cultivos ha sido ampliamente estudiada en cultivos de frutos secos como el almendro y el pistacho (Carbonell-Barrachina et al., 2015; García-Tejero et al., 2020). Las estrategias de riego deficitario también se aplican en frutales porque proporcionan incrementos en la productividad del agua del cultivo, con la ventaja adicional de mejorar la calidad de los frutos obtenidos (Yang et al., 2022). En nogal, los estudios sobre el uso de estrategias de riego deficitario son limitados y se centran mayoritariamente en la mejora de la programación del riego, por lo que es necesario evaluar los efectos del déficit hídrico sobre la productividad y la calidad de las nueces y del aceite.

A nivel estructural se denomina nuez a la conjunción de todas las partes delimitadas por el endocarpio. La calidad comercial de las nueces está determinada principalmente por el calibre de la nuez, medido como el diámetro ecuatorial máximo del endocarpio posterior al secado. Además de la importancia de la cantidad de nueces producidas por unidad de superficie, la relación peso semilla¹ peso nuez⁻¹ (que oscila entre el 0,5 y el 0,6) y la concentración de aceite de la semilla (entre el 50 y el 70 % de la semilla) son claves para la definición del rendimiento (Martínez et al., 2010). El tamaño de la nuez se determina durante el periodo comprendido entre la floración femenina y el endurecimiento del endocarpio, mientras que la acumulación activa de aceite comienza con el endurecimiento del endocarpio y finaliza con la madurez fisiológica de la semilla (Ramos et al., 1978). El mercado aprecia mejor las nueces cuanto mayor sea su diámetro ecuatorial y más claro sea el color del tegumento de la semilla. Algunos estudios sugieren que un déficit hídrico al inicio de la temporada puede afectar significativamente al tamaño final de la nuez (Ramos et al., 1978; Cohen et al., 1997; Fields et al., 2020). Por otro lado, existen evidencias de que un déficit hídrico hacia la madurez (Parkrah et al., 2021), y una mala gestión

de la cosecha y post-cosecha (Ortíz et al., 2019), pueden afectar al color de la semilla, debido a aumentos en la temperatura de la semilla que posibilitan el aumento de procesos oxidativos químicos y enzimáticos.

El aceite de nuez es rico en los ácidos grasos esenciales linoleico ($\omega 6 = C18:2$) y linolénico ($\omega 3 = C18:3$) en proporciones de $57,9 \pm 2,8 \%$ y $13,9 \pm 2,1 \%$, respectivamente, según el cultivar (Özcan y Lemiasheuski, 2020). Está bien documentado que un desequilibrio de consumo en la relación $\omega 6 \omega 3^{-1}$, que idealmente debería estar en el rango de 1:1 a 4:1 pero que en las dietas occidentales alcanza valores en torno a 15:1, está relacionado con enfermedades cardiovasculares, autoinmunes, reumáticas, diabetes, cáncer, obesidad, asma y depresión (Simopoulos et al., 2004; Simopoulos et al., 2016). En este sentido, el aceite de nuez tiene una de las mejores relaciones $\omega 6 \omega 3^{-1}$, en torno a 4:1 (Zec y Glibetic, 2018). Un aumento del consumo de nueces se ha relacionado con la prevención y el tratamiento de la obesidad y el síndrome metabólico y con la modulación del riesgo de enfermedad coronaria (Zibaenezhad et al., 2017; Zec et al., 2020). Luego de una revisión exhaustiva de la bibliografía científica, no se han identificado estudios sobre la influencia del régimen hídrico sobre la composición del aceite en nogal (Calvo et al., 2022a). En contraste, varios estudios han sido realizado en girasol, soja y olivo, donde se ha observado una respuesta general de aumento de la concentración de ácidos grasos poliinsaturados en respuesta a condiciones de déficit hídrico (Dag et al., 2015; Carrera y Dardanelli, 2017; Akbari et al., 2020). En este contexto, este es el primer informe sobre los efectos del régimen hídrico y las condiciones climáticas estacionales sobre el perfil de ácidos grasos en nueces de nogal.

El objetivo de este capítulo fue contrastar la calidad de frutos y perfiles de ácidos grasos de los aceites obtenidos de plantas tratadas con distintos niveles de reposición hídrica durante todo el ciclo productivo.

5.2 Metodología

5.2.1 Cosecha y procesado de la nuez

La lignificación y oscurecimiento de la testa (tejido de envoltura de la semilla) y la ruptura del epicarpio y mesocarpio (comúnmente denominado pelón) indicaron la madurez de la cosecha. En esta fase, uno de los dos árboles centrales de cada unidad experimental se cosechó manualmente. Las nueces recolectadas se secaron en una estufa de aire forzado a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta que el contenido de humedad de la semilla alcanzó el 4 %, monitoreando cada 8 horas con un analizador de humedad (Precisa XM60, Dietikon, Suiza). Posteriormente se tomó una muestra de 100 nueces por repetición y se midió el diámetro ecuatorial de las nueces y de las semillas con un calibre electrónico manual de precisión de 0,01 mm. Para determinar las proporciones de color de la muestra de 100 semillas se utilizó la carta de colores estándar para tipificación de color de semilla de nueces de nogal del SENASA (Res. SENASA 453-2012; basada en USDA Walnut Color Chart), que cuenta con 7 colores en la escala: extra claro (I), claro (II), ambar claro o dorado claro (III), ambar o dorado (IV), cobrizo (V), negro (VI) y amarillo

(VII). Por último, las nueces se almacenaron en bolsas con cierre a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta la extracción de la concentración de aceite.

5.2.2 Concentración de aceite y extracción

La concentración de aceite se estimó por la diferencia de peso antes y después de la extracción del aceite con solvente. La extracción con solvente se realizó con un extractor soxhlet automatizado (Ankom XT10) siguiendo la metodología AOAC 920.39 (Thiex et al., 2003), que consistió en moler 30 semillas por repetición y posteriormente tomar submuestras de 2 g por duplicado. Las submuestras se secaron hasta peso constante en un horno con corriente de aire forzado a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. La extracción se realizó con éter de petróleo en un programa de extracción cíclica de 60 minutos. El resto de las semillas molidas fue utilizado para la extracción de aceite por prensado en frío con una prensa hidráulica manual a una presión de 40 MPa. Posteriormente las muestras de aceite se centrifugaron a 5.000g durante 15 minutos y se filtraron ($14\text{ }\mu\text{m}$ de tamaño de poro). Las muestras de aceite se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la cromatografía.

5.2.3 Perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases

El perfil de ácidos grasos se determinó según la metodología propuesta por el Consejo Oleícola Internacional (International Oil Council, 2017). En resumen, la metodología consistió en pesar 0,1 g de aceite, a los que se le añadieron 2 mL de heptano y la mezcla se agitó en vórtex durante 10 segundos. Posteriormente, se añadieron 0,2 mL de una solución de hidróxido potásico 2 N en medio metanólico y se agitó en vórtex durante 10 segundos. Finalmente, la mezcla se centrifugó a 10.000 g durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a un vial para cromatografía. Se inyectó 1 μL de los ésteres metílicos de ácidos grasos en un cromatógrafo de gases Shimadzu GC 2010 Plus con un detector de ionización de llama (FID) y una columna Phenomenex ZB-FAME ($60\text{ m} \times 0,25\text{ mm} \times 0,2\text{ }\mu\text{m}$). Como gas portador se utilizó H_2 , con un caudal de $1,2\text{ mL minuto}^{-1}$; el detector se ajustó a $260\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el inyector a $240\text{ }^{\circ}\text{C}$ (relación de split 1:10). Los resultados se expresaron como la proporción relativa al área total de los ésteres metílicos de ácidos grasos.

5.2.4 Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó en el entorno R v.4.1.2 para estadística computacional, utilizando las librerías nlme y emmeans para el análisis univariante. Se asumió un modelo lineal mixto con el tratamiento de riego como efecto fijo y el bloque como efecto aleatorio, así como otro modelo lineal mixto con la temporada como efecto fijo y el bloque y tratamiento como efectos aleatorios. Los análisis de componentes principales (ACP) y de agrupación jerárquica de componentes principales (HCPC) se realizaron con las librerías FactoMineR y factoextra.

5.3 Resultados

5.3.1 Condiciones meteorológicas y uso de agua de riego

Las condiciones climáticas durante las temporadas 2018-2019 y 2019-2020 (Fig. 5.1) en este capítulo se dividieron en dos periodos: el primero entre floración-endurecimiento de endocarpios (F-EE) y un periodo posterior entre endurecimiento del endocarpio-madurez de cosecha (EE-M). La temperatura media y la ET₀ en F-EE fueron similares en ambas temporadas: 16,50 °C y 330 mm en 2018-2019 y 16,81 °C y 350 mm en 2019-2020, respectivamente. La precipitación acumulada en el periodo F-EE fue de 157 mm en 2018-2019 y prácticamente la mitad (71 mm) en 2019-2020. En el periodo EE-M, las temperaturas medias fueron de 17,05 °C en 2018-2019 y 19,02 °C en 2019-2020, respectivamente. La ET₀ y la precipitación acumulada a lo largo del periodo EE-M alcanzaron 305 y 255 mm para la temporada 2018-2019, y 337 y 256 mm para la temporada 2019-2020. Al comparar las condiciones meteorológicas estacionales generales, se observa un patrón distinto de distribución de las precipitaciones. En la temporada 2018-2019, las precipitaciones se distribuyeron uniformemente entre diciembre y abril, mientras que en la temporada 2019-2020 se concentraron principalmente entre enero y febrero.

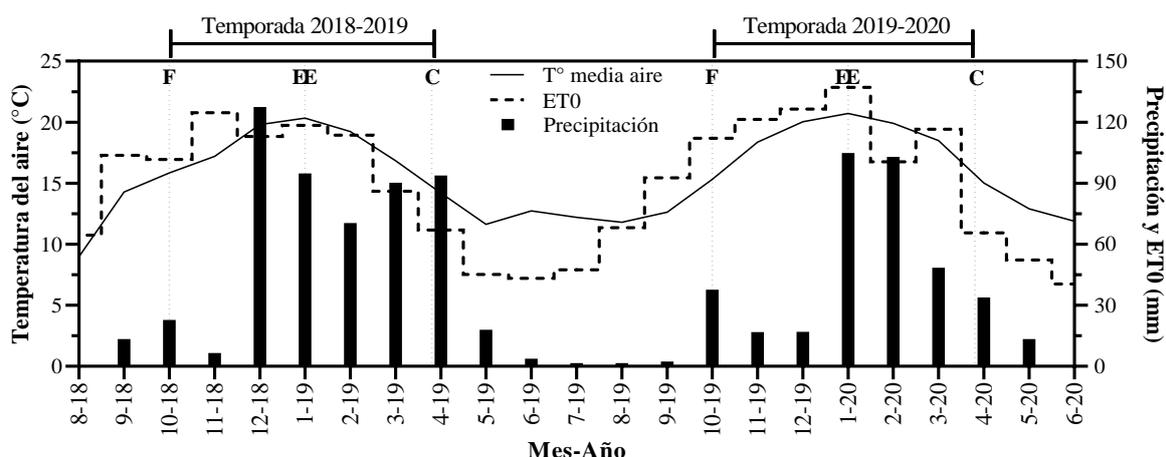


Fig. 5.1 Condiciones ambientales en las temporadas 2018-2019 y 2019-2020 en Guanchín, La Rioja, Argentina. Las letras F, EE y C indicaron fecha de floración, endurecimiento del endocarpio y fecha de cosecha, respectivamente.

5.3.2 Parámetros de calidad de la nuez

Las variables calibre de nuez, calibre de semilla, porcentaje de semillas extra-claras y concentración de aceite (Tabla 5.1) no mostraron diferencias significativas entre los regímenes de riego aplicados dentro de cada temporada, pero si fueron afectadas significativamente por el efecto estacional. El calibre de las nueces fue significativamente mayor en la segunda temporada, alcanzando 32,9 mm, mientras que en la primera temporada el calibre promedio fue de 32,2 mm. Del mismo modo, el calibre de la semilla

fue 1,1 mm mayor en 2019-2020. Ambas variables, calibres de nuez y de semilla, se relacionaron linealmente ($y = 0,75x$, $R^2 = 0,66$; Fig. 5.2). Asimismo, la concentración de aceite fue mayor en la temporada 2019-2020 alcanzando 62,7 %, mientras que en la temporada 2018-2019 la concentración de aceite promedio fue 59,2 %. La cantidad de semillas extra-claras fue un 11,6 % mayor en la primera temporada, alcanzando el 93,8 %, mientras que en la segunda temporada alcanzó el 82,2 %. El número de semillas extra-claras estuvo relacionado negativamente con el calibre de la nuez en 2019-2020, pero no en 2018-2019 (Fig. 4.3).

5.3.3 Perfil de ácidos grasos

Los ácidos grasos encontrados en proporciones superiores al 0,1 % (Tabla 5.2) fueron: palmítico (C16), esteárico (C18), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) y linolénico (C18:3). De forma similar a los parámetros de calidad, no hubo diferencias en las proporciones de ácidos grasos entre los regímenes de riego dentro de las temporadas. En cuanto a los ácidos grasos saturados, el ácido palmítico no mostró diferencias entre temporadas. Por el contrario, el ácido esteárico presentó diferencias significativas, acumulándose un 0,13 % más en 2018-2019 (1,94 %) que en 2019-2020 (1,81 %, Fig. 5.3). Todos los ácidos grasos insaturados presentaron diferencias significativas entre temporadas. Los ácidos oleico y linolénico alcanzaron una mayor concentración en la segunda temporada (15,73 y 18,01 % en 2018-2019, y 15,41 y 16,31 % en 2019-2020, respectivamente). Mientras tanto, el ácido linoleico alcanzó su valor máximo en la primera temporada (60,30 % en 2018-2019 y 58,31 % en 2019-2020, respectivamente). La relación entre ácidos grasos insaturados y saturados ($AGI\ AGS^{-1}$) no mostró diferencias significativas entre tratamientos o temporadas. Por el contrario, la relación entre ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados ($AGMI\ AGPI^{-1}$) fue diferente entre temporadas, alcanzando un valor de 0,21 en la segunda temporada (frente a 0,20 en 2018-2018). Por último, la relación $\omega 6\ \omega 3^{-1}$ se mantuvo por debajo de 4:1 en ambas temporadas, con 3,70:1 en 2018-2019 y 3,32:1 en 2019-2020, respectivamente. Este último parámetro de calidad ($\omega 6\ \omega 3^{-1}$) presentó, solo en 2019-2020, dos correlaciones significativas con otros parámetros de calidad: una relación positiva con el calibre de la nuez y una relación negativa con el porcentaje de semillas extra-claras (Fig. 5.3; Tabla 5.2).

5.3.4 Análisis de componentes principales

Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para evaluar los patrones de agrupación de los perfiles de ácidos grasos (Fig. 5.4). Las dimensiones 1 y 2 (Dim1 y Dim2) explicaron el 54 % y el 25 % de la variabilidad total, respectivamente (Fig. 5.4). Los ácidos esteárico, linoleico y linolénico contribuyeron significativamente (más del 20 % de la variabilidad) a la Dim1, siendo el ácido oleico la variable mejor representada en Dim2. Por su parte, el ácido palmítico sólo contribuyó en un 15 % a la Dim1. Cabe destacar que existe una relación opuesta entre el grupo ácido palmítico-linolénico, por un lado, y el grupo ácido esteárico-linoleico, por otro, y que el ácido oleico no está relacionado con ningún otro ácido graso. Los individuos de 2018-2019 se distribuyen claramente en los cuadrantes I-IV,

mientras que los de 2019-2020 lo hacen en los cuadrantes II-III del plano bidimensional, respectivamente. Aplicando el algoritmo de agrupamiento jerárquico (HCPC) se formaron dos grupos que respetaron las temporadas. Los individuos correspondientes a la temporada 2018-2019 se agruparon en el Clúster-A, distinguiéndose por una mayor concentración de ácidos esteárico y linoleico. Las repeticiones de la temporada 2019-2020 se agruparon en el Clúster-B, caracterizado por una mayor concentración de ácidos palmítico, oleico y linolénico.

Tabla 5.1 Características de calidad de nueces de nogal cv. Chandler (media \pm desviación estándar) bajo diferentes regímenes de riego en las temporadas 2018-2019 y 2019-2020 en Guanchín, La Rioja Argentina.

Temporada	Régimen de riego (% ETc)	Calibre de nuez (mm)	Calibre de semilla (mm)	Semillas extra claras (%)	Concentración de aceite (%)
2018-2019	50	32,1 \pm 0,8	23,7 \pm 0,5	95,8 \pm 5,3	56,9 \pm 0,9
	75	32,3 \pm 0,8	24,2 \pm 0,4	93,8 \pm 9,5	59,9 \pm 3,9
	100	32,2 \pm 0,3	24,1 \pm 0,6	93,2 \pm 5,7	59,2 \pm 0,8
	125	32,0 \pm 0,5	23,8 \pm 0,6	92,2 \pm 8,7	61,0 \pm 2,5
	p-valor	0,9114	0,4869	0,8251	0,1549
2019-2020	50	33,4 \pm 1,0	25,2 \pm 0,4	76,5 \pm 13,8	62,3 \pm 2,2
	75	32,5 \pm 0,5	24,9 \pm 0,4	85,2 \pm 0,5	63,3 \pm 2,2
	100	33,0 \pm 0,4	25,2 \pm 0,4	82,2 \pm 11,2	62,4 \pm 3,0
	125	32,6 \pm 0,2	24,9 \pm 0,3	84,7 \pm 9,8	62,8 \pm 4,8
	p-valor	0,1857	0,3157	0,6163	0,9633
2018-2019		32,2 \pm 0,6 b	23,9 \pm 0,5 b	93,8 \pm 6,8 a	59,2 \pm 2,6 b
2019-2020		32,9 \pm 0,6 a	25,0 \pm 0,3 a	82,2 \pm 9,8 b	62,7 \pm 2,9 a
	p-valor	0,0019	<0,0001	0,0012	0,0030

P-valor $< 0,05$ indican diferencias significativas entre medias de acuerdo con el test LSD. Letras diferentes indican diferencias entre medias.

La Fig. 5.5 muestra un ACP realizado para evaluar el comportamiento de las variables relacionadas con la calidad de la nuez. Las dimensiones 1 y 2 acumularon un total del 76,6 % de la variabilidad total. Las variables mejor representadas en la Dim1 fueron el calibre de la semilla y la cantidad de semillas extra-claras, y en la Dim2 la concentración de aceite y la relación $\omega 6 \omega 3^{-1}$, mientras que el calibre de la nuez aportó más del 20 % de la variabilidad en ambas dimensiones. De forma similar a la Fig. 5.4, los grupos se separaron respetando las temporadas en lugar de los regímenes de riego. La primera temporada (2018-2019) se agrupó en el Clúster-X, en los cuadrantes II y III, grupo caracterizado principalmente por una alta proporción de semillas extra-claras y una relación $\omega 6 \omega 3^{-1}$ más alta. La segunda temporada (2019-2020) se agrupó en el Clúster-Y, caracterizado por un mayor calibre de nueces y semillas (cuadrante I) y alta concentración de aceite (cuadrante IV). Las variables descriptoras de cada grupo estaban altamente correlacionadas dentro del grupo y opuestas a las descriptoras del otro grupo.

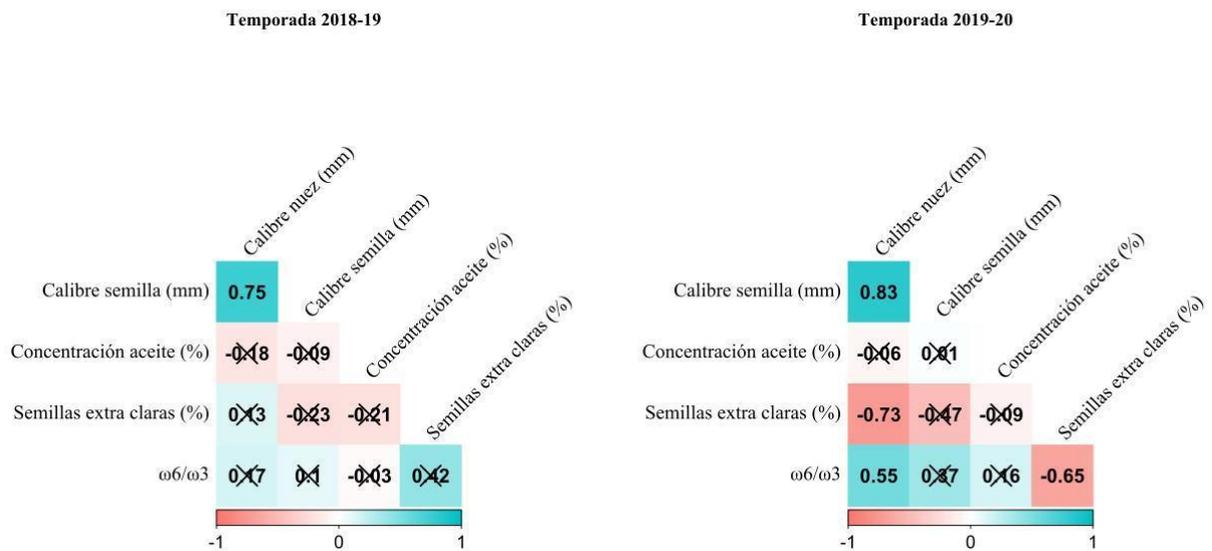


Fig. 5.2 Matrices de correlación de Pearson entre las variables calibre de nuez, calibre de semilla, concentración de aceite, cantidad de semillas extra-claras y relación $\omega 6/\omega 3$ de nueces de nogal cv. Chandler en las temporadas 2018-2019 y 2019-2020. Las correlaciones no significativas ($P > 0,05$) están marcadas con X.

5.1 Discusión

La aplicación de cuatro regímenes de riego al 50, 75, 100 y 125 % de la ETc no afectó a la calidad de la nuez ni al perfil de ácidos grasos. El hecho de que el rendimiento no se viera afectado bajo los regímenes de riego al 50 % y 75 % de ETc sugiere que nunca se alcanzó un umbral de déficit hídrico que generara pérdidas económicas. Tampoco se encontraron incrementos en la calidad de la producción ni en el rendimiento cuando se aplicó el régimen de riego al 125 % de ETc. En este sentido, se considera que el Kc del cultivo propuesto por Goldhamer et al. (1998) sobreestima las demandas hídricas del nogal en el centro-oeste de Argentina, por lo que sugerimos realizar una estimación local para evitar excesos de riego y así aumentar la eficiencia en el uso del agua. A pesar de no observarse diferencias en los distintos regímenes aplicados, existe un claro efecto de las condiciones meteorológicas estacionales sobre la calidad de la producción.

Tabla 5.2 Perfil de ácidos grasos (media \pm desviación estándar) de aceite de nuez de nogal cv. Chandler bajo diferentes regímenes de riego en las temporadas 2018-2019 y 2019-2020 en Guanchín, La Rioja, Argentina.

Temporada	Régimen de riego (% ETc)	Ácido palmítico (C:16)	Ácido esteárico (C:18)	Ácido oleico (C18:1)	Ácido linoleico (C18:2)	Ácido linolénico (C18:3)	AGMI AGPI ⁻¹	AGI AGS ⁻¹	$\omega 6 \omega 3^{-1}$
2018-2019	50	6,06 \pm 0,18	2,02 \pm 0,07	15,28 \pm 0,48	60,16 \pm 0,31	16,49 \pm 0,32	0,20 \pm 0,01	11,39 \pm 0,26	3,65 \pm 0,07
	75	5,96 \pm 0,14	1,97 \pm 0,10	15,42 \pm 0,37	60,31 \pm 0,20	16,36 \pm 0,39	0,20 \pm 0,01	11,63 \pm 0,33	3,69 \pm 0,07
	100	6,19 \pm 0,16	1,92 \pm 0,17	15,57 \pm 0,53	60,33 \pm 0,49	15,99 \pm 0,81	0,20 \pm 0,01	11,34 \pm 0,49	3,78 \pm 0,19
	125	5,96 \pm 0,15	1,87 \pm 0,07	15,37 \pm 0,35	60,40 \pm 0,56	16,41 \pm 0,30	0,20 \pm 0,01	11,77 \pm 0,22	3,68 \pm 0,10
	p-valor	0,1793	0,1924	0,7982	0,8618	0,4880	0,7865	0,2591	0,4576
2019-2020	50	6,07 \pm 0,17	1,86 \pm 0,08	15,60 \pm 0,77	58,40 \pm 0,89	18,07 \pm 1,16	0,20 \pm 0,01	11,61 \pm 0,14	3,25 \pm 0,25
	75	6,13 \pm 0,09	1,77 \pm 0,17	15,61 \pm 0,50	58,15 \pm 0,55	18,36 \pm 0,84	0,20 \pm 0,01	11,67 \pm 0,19	3,17 \pm 0,16
	100	6,13 \pm 0,23	1,85 \pm 0,19	15,89 \pm 0,40	58,60 \pm 0,95	17,53 \pm 1,08	0,21 \pm 0,01	11,53 \pm 0,08	3,36 \pm 0,26
	125	6,22 \pm 0,15	1,77 \pm 0,09	15,83 \pm 0,74	58,08 \pm 0,44	18,10 \pm 0,41	0,21 \pm 0,01	11,51 \pm 0,14	3,21 \pm 0,07
	p-valor	0,6516	0,5488	0,8689	0,4990	0,5195	0,8515	0,1960	0,4418
2018-2019	-	6,04 \pm 0,17	1,94 \pm 0,11 a	15,41 \pm 0,41 b	60,30 \pm 0,38 a	16,31 \pm 0,49 b	0,20 \pm 0,01 b	11,53 \pm 0,35	3,70 \pm 0,12 a
2019-2020	-	6,14 \pm 0,17	1,81 \pm 0,11 b	15,73 \pm 0,42 a	58,31 \pm 0,40 b	18,01 \pm 0,48 a	0,21 \pm 0,01 a	11,58 \pm 0,14	3,25 \pm 0,19 b
	p-valor	0,1257	<0,0001	0,0243	<0,0001	<0,0001	0,0282	0,6142	<0,0001

P-valor < 0,05 indican diferencias significativas entre medias de acuerdo con el test LSD. Letras diferentes indican diferencias entre medias.

AGMI AGPI⁻¹: ácidos grasos monoinsaturados/ácidos grasos poliinsaturados

AGI AGS⁻¹: ácidos grasos insaturados/ácidos grasos saturados

$\omega 6 \omega 3^{-1}$: relación omega-6/omega-3

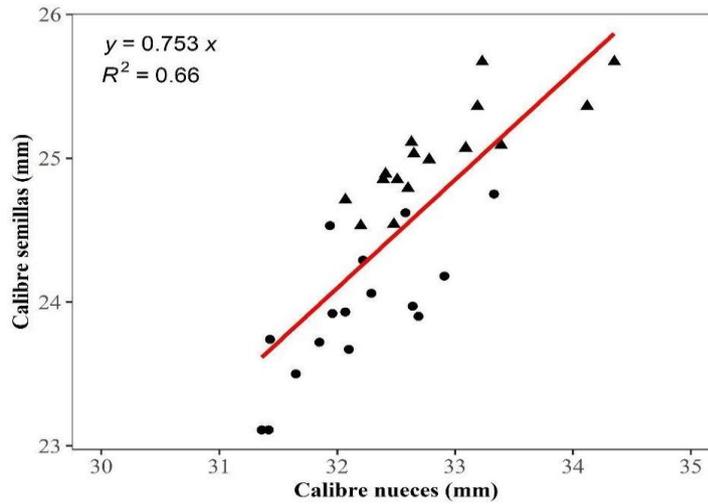


Fig. 5.3 Relación entre calibre de nueces y calibre de semillas de nogales cv. Chandler regados con diferentes dosis durante las temporadas 2018-2019 (●) y 2019-2020(▲).

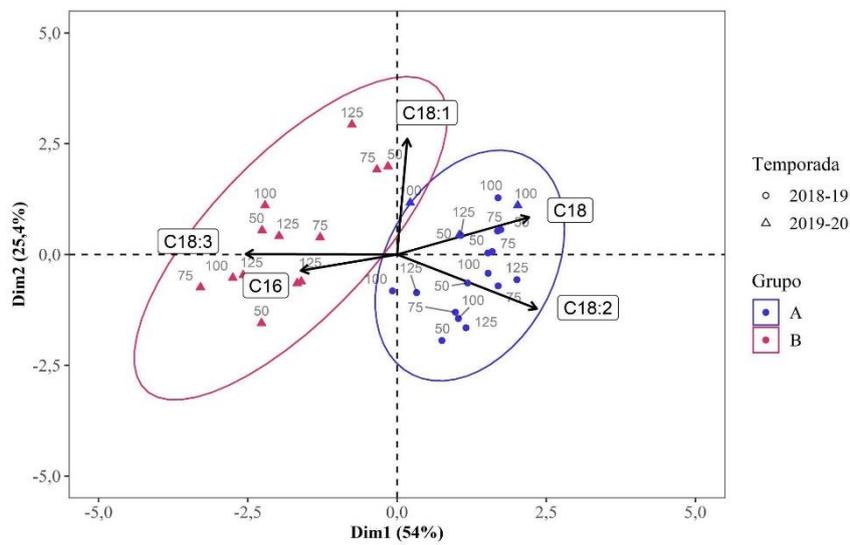


Fig. 5.4 Biplot del análisis de componentes principales y agrupamiento jerárquico (elipses) de perfiles de ácidos grasos de nueces cv. Chandler en las temporadas 2018-2019 (n=16) y 2019-2020 (n=16). Los ácidos grasos perfilados fueron: palmítico (C16), esteárico, oleico (C18:1), linoleico (C18:2), y linolénico (C18:3).

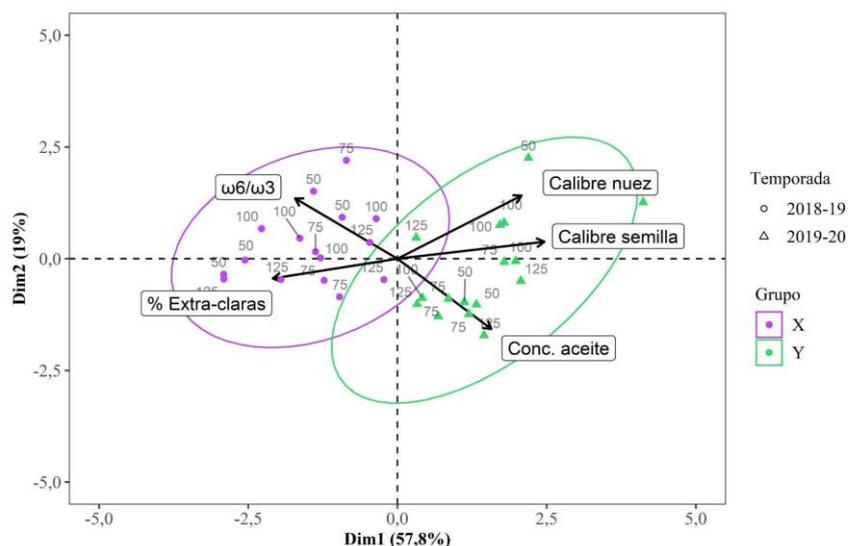


Fig. 5.5 Biplot del análisis de componentes principales y agrupamiento jerárquico (elipses) de características de calidad de nueces cv. Chandler en las temporadas 2018-2019 (n=16) y 2019-2020 (n=16).

En el periodo que va desde la floración hasta el endurecimiento del endocarpio (F-EE), los calibres de las nueces y las semillas son definidos simultáneamente (Ramos et al., 1978); en este sentido, el calibre de la semilla fue 0,75 veces el diámetro ecuatorial de la nuez en ambas temporadas (Fig. 5.2). Mientras tanto, la distribución de la precipitación en el periodo F-EE varió según la temporada; en 2018-2019, se acumuló un 40 % de días lluviosos (precipitación diaria > 0,1 mm), mientras que en 2019-2020 solo se acumularon un 23 % (Fig. 5.1). Este patrón de precipitaciones podría limitar la cantidad de radiación fotosintéticamente activa (RFA) interceptada por la copa y, por lo tanto, disminuir la actividad de la fuente. En relación con estos hallazgos, Wang et al. (2022) descubrieron que la reducción de la actividad de la fuente (a partir de alteraciones en la relación hoja:fruto) redujo el peso fresco y seco de la nuez y de sus semillas, pero no el contenido de aceite y proteínas de la semilla. La no-relación entre los calibres de nuez o semillas con la concentración de aceite (figs. 4.3a y 4.3b) había sido reportada previamente por Martínez y Maestri (2008). Si bien hubo diferencias estadísticamente significativas en el calibre de las nueces, estas fueron menores a 1 mm (Tabla 5.1), por lo que los calibres de ambas temporadas se clasificaron en la categoría III (32 mm < calibre en cáscara \geq 34 mm) de la norma argentina de exportación (Resolución SENASA 453/2013), evidenciando que no hay diferencias a nivel comercial.

En el período de endurecimiento del endocarpio-madurez (EE-M), las altas temperaturas pueden afectar el color de la testa de la semilla (Tabla 5.1) por un incremento de oxidaciones de fenoles y reacciones de Maillard (Ortíz et al., 2019; Fields et al., 2020; Parkash et al., 2021). En línea con otros informes, el color de la semilla fue más claro en 2018-2019 (93,8 % de semillas extra-claras), temporada en la que la temperatura media en el periodo EE-M alcanzó 17,05 °C que, en comparación fue 1,97 °C inferior a

la de la temporada 2019-2020 (19,02 °C), repercutiendo en un aumento de 11,6 % de semillas extra-claras. La relación entre el calibre de las nueces y el color de la semilla sólo fue significativa en la segunda temporada (2019-2020), con una correlación de Pearson de -0,73 (Fig. 5.3; $p < 0,0001$). En la fase EE-M, la acumulación de aceite alcanzó un máximo de 62,7 % en 2019-2020, que fue un 3,5 % superior a la concentración máxima alcanzada en 2018-2019, al contrario de lo que ocurrió con el color de la semilla, que alcanzó el máximo porcentaje de extra-claras en la temporada más fría (2018-2019). García-Inza et al. (2016) observaron una disminución de un 1,2 % de aceite acumulado por cada 1 °C de aumento de la temperatura media del aire a lo largo de la fase de acumulación de aceite en las semillas de olivo, un comportamiento opuesto al detectado en las semillas de nogal en este experimento.

Los ácidos grasos perfilados fueron los esperados para la especie *Juglans regia* L. y dentro de los rangos reportados para el cv. Chandler (Tabla 5.2; Martínez et al., 2010; Cittadini et al., 2020). Las mayores diferencias se encontraron en las proporciones de ácido linoleico (mayor en 2018-2019) y linolénico (mayor en 2019-2020). La concentración de ácidos linoleico (C18:2) y linolénico (C18:3) en semillas de olivo y cultivos anuales está relacionada negativamente con los incrementos de temperatura media diaria durante la fase activa de acumulación de aceite en la semilla (García-Inza et al., 2017) Por otra parte, Martínez et al. (2006) reportaron diferencias significativas en la acumulación de aceite en años sucesivos para la variedad de nogal Criolla (66.88 % en 2004 y 67.61 % en 2005, respectivamente); también en este reporte, la temporada con mayor acumulación de aceite tuvo una mayor concentración de ácido linolénico (15.61 % vs. 11.88 %, respectivamente). Estos hallazgos, que coinciden con los de este capítulo, apuntan a una posible relación entre la concentración de aceite y la acumulación de ácido linolénico, que podría estar relacionada con la sobreexpresión de los genes FAD3 (encargados de la insaturación de C18.2 a C18.3; He y Ding., 2020) inducida por las altas temperaturas. Es necesario seguir investigando sobre las respuestas de la ruta biosintética de los ácidos grasos del nogal bajo diferentes condiciones ecofisiológicas para explicar y predecir las diferencias en el perfil de ácidos grasos en temporadas o ambientes contrastantes.

5.2 Conclusiones

Los regímenes hídricos tanto deficitarios como el excedentario no tuvieron efectos significativos sobre la calidad de la producción bajo las condiciones agroclimáticas de La Rioja, Argentina. Es necesario repetir el experimento para confirmar estos resultados en otros ambientes. Sin embargo, el efecto temporada fue significativo y se puede inferir que las producciones procedentes de i) la temporada 1 (Fig. 5.4, Grupo-X, temporada más fría y húmeda) serían mejor apreciadas por el mercado sólo por el color de la semilla, y ii) la temporada 2 (Fig. 5.5, Grupo-Y, temporada más cálida y seca) sería mejor apreciada desde el punto de vista nutricional ya que produjo nueces más grandes con una mayor concentración de aceite y con una mejor relación $\omega 6 \omega 3^{-1}$.

Capítulo VI:

Influencia del régimen hídrico sobre la expresión de metabolitos en hojas y semillas de nogal (*Juglans regia* L.) cv. Chandler

Basado en:

Leaf biochemical and kernel metabolites profile as potential biomarkers of water deficit in walnut (*Juglans regia*) cv. Chandler

Franco Emmanuel Calvo ^{ab*}, Eduardo Rafael Trentacoste ^c, Sonia Teresa Silvente ^d

^a Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

^b Instituto de Agricultura Sostenible en el Oasis (IASO), Universidad Nacional de Chilecito (UNdeC)

^c Instituto de Ambiente de Montaña y Regiones Áridas (IAMRA), Universidad Nacional de Chilecito (UNdeC)

^d Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria La Consulta

Publicado en: Sustainability (2023)

Q1 Environmental Science (miscellaneous) (27/163)

<https://doi.org/10.3390/su151813472>

6.1 Introducción

A nivel mundial existe un marcado aumento en la demanda de frutos secos, y en particular de nueces de nogal. Si se comparan la superficie cultivada y la producción mundial de nueces han aumentado un 80 % y 82 %, respectivamente, en los últimos 20 años (periodo 2001-2021), alcanzando en la actualidad 1,13 Mha y 3,5 Mt (FAOSTAT, 2023). Para satisfacer la creciente demanda, el cultivo del nogal se ha expandido a nuevas zonas productivas alcanzando incluso regiones semiáridas. Estas nuevas regiones donde el agua para riego es una de las principales limitantes para el desarrollo de la agricultura, difieren marcadamente, de las zonas costeras de climas mediterráneos tradicionales.

El compromiso entre mantener una alta productividad del cultivo y la aplicación de dosis de riego apropiadas a la oferta hídrica es de mayor relevancia en zonas semiáridas como el centro-oeste de Argentina. Si se tiene en cuenta que los aportes pluviales de esta región oscilan entre 300 y 600 mm año⁻¹ (Rubí Cravero y Bianchi, 2010) y que los requerimientos hídricos del nogal se han estimado en torno a 1000 mm año⁻¹ (Goldhamer, 1998) se puede apreciar un balance hídrico negativo de 400 a 700 mm año⁻¹ (equivalente a las necesidades de riego del cultivo). Para satisfacer estas demandas de agua en Argentina se hace uso de aguas de deshielo o de acuíferos subterráneos. El uso no controlado del recurso hídrico podría conducir a la sobreexplotación de los acuíferos (Searles et al., 2011), más evidente en el contexto del cambio climático, que está evidenciado una disminución de la recarga de los acuíferos debido a la disminución de las precipitaciones níveas (Rivera et al., 2021). En este contexto es donde la aplicación de estrategias de riego deficitario cobra relevancia. Una estrategia de riego deficitario consiste en la aplicación de una dosis de riego menor a la demandada por el cultivo, controlada en cuanto a intensidad y duración del déficit de agua, durante todo el ciclo de cultivo (riego deficitario sostenido) o durante una parte del periodo del cultivo de resistencia a la sequía (riego deficitario controlado; Capítulo I).

El impacto de la aplicación de estrategias de riego deficitario en nogal se ha evaluado escasamente. La mayor parte de los reportes publicados trata sobre la gestión de las estrategias de riego y, en segunda instancia, evalúan los efectos en términos ecofisiológicos. Para la gestión del riego en nogal han sido extensamente empleados indicadores de estado hídrico de la planta tales como potencial hídrico xilemático y foliar, conductancia estomática, dendrometría de tronco y termografía infrarroja de la canopia (Capítulo I). Sin embargo, el uso de biomarcadores de déficit hídrico ha sido dejado de lado. Es bien sabido que la concentración de osmolitos compatibles tales como los aminoácidos prolina y betaína-alanina o azúcar solubles en las hojas guardan una estrecha relación con medidas de estado hídrico del cultivo de gran robustez como el potencial hídrico (Lotfi et al., 2009; Wang et al., 2020). Por otra parte, la concentración de malondialdehído aumenta de forma significativa conforme lo hace el estrés hídrico (Karimi et al., 2020). La mayor concentración de metabolitos secundarios en hojas como fenoles y flavonoides también se ha asociado a eventos de estrés biótico y abiótico. En conjunto

estas medidas bioquímicas en la hoja podrían integrar un nuevo grupo de indicadores de estado hídrico del cultivo en complementarios a las tradicionales medidas en la planta.

La calidad de la producción del nogal ha sido bien evaluada en términos de composición química del aceite, donde se han identificado los patrones de perfiles de ácidos grasos, esteroides y fenoles para la mayoría de las variedades cultivadas (Martínez y Maestri, 2008; Martínez et al., 2010). En contraste, la influencia del déficit hídrico sobre las propiedades bioquímicas del aceite de nuez aún no ha sido estudiada. Es en este contexto donde la metabolómica emerge como una rama de la química analítica prometedora para comparar de forma no-dirigida los perfiles de metabolitos bajo condiciones ambientales contrastantes (Bundy et al., 2009). Rao et al. (2016) describieron los perfiles de metabolitos polares del embrión y la endotesta, de cuatro variedades de nogal muy difundidas en China, en 5 momentos de la fase fenológica de llenado de la semilla, proporcionando valiosa información sobre las vías metabólicas activas en cada estado fenológico. Kalogiouri et al. (2021) evaluaron también de forma no-dirigida los perfiles aromáticos de aceites de nuez producidos bajo sistemas de cultivo tradicionales y modernos, obteniendo diferencias significativas entre estos perfiles y permitiendo así la validación de origen de los aceites. Por último, Kang y Suh (2022) revisaron trabajos donde se utilizó a la metabolómica como herramienta para evaluar la calidad y seguridad alimentaria de nueces de nogal, dividiendo las variaciones en los perfiles de metabolitos durante las etapas de pre-cosecha y post-cosecha. Las mayores variaciones en los perfiles de metabolitos en pre-cosecha estuvieron relacionados al metabolismo de los carbohidratos, aminoácidos, lípidos y compuestos fenólicos; mientras que en post-cosecha los metabolitos identificados fueron mayoritariamente compuestos volátiles y ácidos grasos. Finalmente, es interesante remarcar que no se encontraron artículos que utilicen a la metabolómica como herramienta para comparar los efectos a nivel de perfil de metabolitos polares de la aplicación de distintas dosis de riego en nogal.

El objetivo de este capítulo fue evaluar la concentración de solutos compatibles, antioxidantes, estado oxidativo de las membranas celulares de la hoja y el perfil de metabolitos polares de la semilla como biomarcadores de estado hídrico del cultivo.

6.2 Metodología

6.2.1 Colecta de material foliar para análisis foliares

Las muestras de material foliar se recolectaron durante la segunda temporada de estudio (2019-2020), luego que la parcela de estudio fue expuesta a un primer año con los regímenes hídricos al 50, 75 y 100 % de la ETc (T50, T75 y T100, respectivamente. Ver Capítulo III - Materiales y métodos generales). En este capítulo el tratamiento T125 (125 % de la ETc) no fue considerado, debido a que el objetivo está orientado a las respuestas del nogal al déficit hídrico únicamente. Se extrajeron muestras de 10 foliolos terminales en cada una de las 4 repeticiones (bloques) de cada tratamiento. Las muestras se

extrajeran en las etapas fenológicas de brotación (1), endurecimiento del endocarpio (2) y madurez (3). Los foliolos recolectados fueron inmediatamente almacenados en bolsas con cierre hermético y colocados en nitrógeno líquido. En el laboratorio las muestras fueron transferidas a un ultrafreezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las muestras fueron liofilizadas (condensador a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $0,001\text{ mbar}$; FreeZone 4.5, Kansas, EUA) en un programa automatizado, y molidas en mortero cerámico pre-enfriado y almacenadas a temperatura ambiente.

6.2.2 Determinación de la concentración foliar de malondialdehído

La determinación de la concentración de malondialdehído (MDA) fue estimada según el protocolo propuesto por Holdes et al. (1999). El extracto se realizó a partir de 50 mg de tejido foliar liofilizado al que se le agregó 1 mL de etanol 70% . Luego el extracto fue centrifugado a 14.000 g durante 20 minutos y $500\text{ }\mu\text{L}$ del sobrenadante se combinaron con $500\text{ }\mu\text{L}$ de solución reactiva, compuesta por 50% de ácido tiobarbitúrico al $0,5\%$ y 50% de ácido tricloroacético al 20% . La solución compuesta por el extracto y la solución reactiva se incubaron en baño térmico a $92\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos . Las absorbancias se midieron a 540 y 600 nm . La concentración se estimó a partir de la diferencia entre las absorbancias a 540 y 600 nm y fue afectada por el coeficiente de extinción 155 mmol cm^{-1} .

6.2.3 Determinación de la concentración foliar de prolina

La determinación de la concentración de prolina foliar fue realizada utilizando protocolo propuesto por Carillo et al. (2008), que consistió en la extracción sólido-líquido en una relación $1:20$ de 50 mg de material vegetal liofilizado en una solución etanólica al 70% a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos . Posteriormente, el extracto obtenido fue centrifugado a 12.000 g por 5 minutos . En un tubo eppendorf reaccionaron $200\text{ }\mu\text{L}$ del extracto sobrenadante y con $400\text{ }\mu\text{L}$ de la solución reactiva compuesta por Ninhidrina al 1% (p v^{-1}) + 60% de Ac. Acético Glacial (v v^{-1}) + 20% de etanol (v v^{-1}) + 20% de agua destilada. Esta mezcla se incubó a baño maría a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos , una vez cumplido el tiempo de incubación la reacción se cortó enfriando los tubos con hielo molido. Finalmente se midió la absorbancia a 520 nm en un lector de microplacas. La concentración se estimó mediante un coeficiente de extinción específico obtenido a partir de una curva de calibración en un rango de $10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ a $50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$.

6.2.4 Determinación de la concentración foliar de fenoles y flavonoides

Para ambas determinaciones se partió del mismo extracto, a partir de la homogeneización $1:20$ (p v^{-1}) de 50 mg de tejido foliar con etanol 70% . Posteriormente este extracto se diluyó con agua destilada en una proporción de $1:20$. Para la determinación de la concentración de los fenoles se siguió el protocolo propuesto por Singleton y Rossi (1965), el cual consistió en la reacción de $50\text{ }\mu\text{L}$ del extracto diluido con $1000\text{ }\mu\text{L}$ de agua destilada y $50\text{ }\mu\text{L}$ de reactivo Folin-Ciocalteu 1 N , luego de homogeneizar en vortex durante 5 minutos , se añadieron $100\text{ }\mu\text{L}$ de Na_2CO_3 al 20% , se homogeneizó nuevamente con

vortex y se dejó reposar la mezcla reactiva durante 1 hora en la oscuridad a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 760 nm. La concentración de fenoles totales de la hoja se expresó como equivalentes de ác. gálico (EAG).

La estimación de la concentración de flavonoides totales se realizó mediante el protocolo de Karadeniz et al. (2005), que en resumen consistió en la reacción de 150 μL de extracto diluido, al cual se le agregaron 750 μL de agua destilada y 75 μL de NaNO_2 al 5 %. Luego de homogeneizar la mezcla y pasados 5 minutos en la oscuridad se agregaron 150 μL de AlCl_3 al 10 % (p v⁻¹ en agua). Posteriormente, la mezcla se incubó durante 15 minutos en la oscuridad y se añadieron 500 μL de NaOH 1M. La absorbancia se midió a 510 nm y los resultados se expresaron como equivalente de catequina por unidad de peso. La concentración de fenoles totales de la hoja se expresó como equivalente catequina (EAG).

6.2.5 Determinación de la concentración foliar de azúcares solubles

Se siguió el protocolo propuesto por Irigoyen et al. (1992), utilizando 50 μg de tejido foliar liofilizado los cuales homogeneizaron con etanol 70 % (v v⁻¹) en una proporción 1:20 (p v⁻¹). El homogenizado se centrifugó a 10.000 g durante 10 min a 4°C. De este extracto crudo se extrajo una alícuota de 50 μL que se añadieron a 3 mL de antrona en solución sulfo-etanólica (150 mg de antrona en una solución de 60 ml de etanol y 100 ml de H_2SO_4 concentrado). La mezcla se incubó en baño maría a 50 °C durante 30 minutos. Finalmente, la absorbancia se midió a 620 nm. La curva de calibración usada tuvo un rango entre 0,4 y 2 mg glucosa mL^{-1} .

6.2.6 Extracción, derivatización y perfilado de metabolitos no polares de semillas

Una vez alcanzada la madurez de cosecha, se cosecharon todas las nueces de la planta central de cada de los tratamientos T100, T75 y T50 de todos los bloques, luego se tomó una muestra de 100 nueces y se secaron en estufa con corriente de aire forzado a 30 °C (protocolo similar al seguido a nivel industrial) hasta alcanzar el 4 % de humedad en la semilla. Una vez secas las muestras de 100 nueces, se quebraron manualmente, y 50 semillas por repetición se almacenaron a -80 °C. Los metabolitos polares fueron extraídos del tejido de las semillas de nogal, siguiendo el protocolo publicado por Roessner y Beckles (2012) con ligeras modificaciones. En un tubo tipo eppendorf de 2 mL previamente enfriado con nitrógeno líquido se pesaron 50 mg de tejido de la semilla liofilizado, se añadieron 700 μL metanol grado HPLC, 300 μL de agua milli-Q y 30 μL de ribitol (estándar interno) en una concentración de 0,2 mg mL^{-1} . Luego la mezcla se incubó en termoagitador a 950 rpm y 70 °C durante 15 minutos. Una vez alcanzado el tiempo de extracción la solución se centrifugó a 13.000 g a 4 °C durante 15 minutos. 150 μL del sobrenadante polar se transfirió a un nuevo tubo tipo eppendorf de 1,5 mL donde se concentró bajo corriente de N_2 .

Para la derivatización, en cada tubo con extracto concentrado se añadió 40 μL de clorhidrato de metoxiamina 20 mg mL^{-1} en piridina, y se incubó durante 2 h en termoagitador a 37 °C y 950 rpm.

Terminado el tiempo de incubación, se centrifugó durante 5 minutos a 13.000 g. Posteriormente se agregaron 70 μL de MSTFA (N-metil-N-trimetilsilil trifluoroacetamida) y se incubó en el termoagitador a 37 °C y 950 rpm durante 30 minutos. La solución resultante fue transferida a viales para cromatografía con micro-inserto (100 μL) y tapa a presión. Las inyecciones de 1 μL de muestras derivatizados se realizaron de forma aleatoria mediante un autoinyector (Shimadzu AOC-5000), en un cromatógrafo gaseoso acoplado a un espectrómetro de masas tipo cuadrupolo (Shimadzu GCMS-QP2010, Tokio, Japón), con una columna Phenomenex ZB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,1 μm). Se utilizó He como gas portador con un caudal de 1 mL min^{-1} . El inyector se ajustó a 280 °C (split 1:10) y la rampa de temperatura mantuvo inicialmente la columna a 45 °C durante 5 minutos, para luego aumentar 10 °C min^{-1} hasta alcanzar 295 °C y mantener finalmente 10 minutos. La temperatura de la fuente de iones se programó a 220 °C y la temperatura de la interfase a 300 °C. El rango de escaneo fue de 40 a 700 m z^{-1} .

6.2.7 Análisis estadístico

El análisis de los datos resultantes de los análisis foliares se realizó en el entorno R v.4.1.2 para estadística computacional, utilizando las librerías nlme y emmeans para el análisis univariado. En este sentido, se asumió un modelo lineal mixto con el tratamiento de riego como efecto fijo y el bloque como efecto aleatorio. El análisis de componentes principales (ACP) y la agrupación jerárquica de componentes principales (HCPC) se realizaron con las librerías FactoMineR y factoextra.

En cuanto a los análisis del perfil de metabolitos no dirigido, los datos se procesaron y analizaron en el entorno R v.4.1.2 con las librerías XCMS (www.bioconductor.com) empleando los parámetros recomendados por Rao et al. (2016). La identificación de los diferentes metabolitos se realizó con el software GCMS-Solution (Shimadzu) y AMDIS (NIST) con las librerías de masas espectrales NIST y Wiley, con una línea de corte de similitud del 70 %. El análisis de componentes principales (ACP) y la agrupación jerárquica de componentes principales (HCPC) se realizaron con las librerías FactoMineR y factoextra.

6.3 Resultados y discusión

Por la naturaleza de los resultados de este capítulo las secciones resultados y discusión se presentan en conjunto.

6.3.1 Biomarcadores foliares de déficit hídrico

Las concentraciones de malondialdehído (MDA) prolina (PRO), fenoles totales (FEN), flavonoides (FLA) totales y azúcares solubles totales (AST) no presentaron diferencias significativas entre los diferentes regímenes hídricos en cada fecha de colecta (Tabla 6.1.). Sin embargo, cuando los datos se analizaron por fecha de colecta (1: brotación; 2: endurecimiento del endocarpio y 3: cosecha) la concentración de todos los compuestos estudiados presentó diferencias significativas con excepción de

la concentración de MDA. Estos resultados revelan un menor impacto de la dosis de riego respecto a los cambios producidos en las hojas con el avance de la temporada. Teniendo en cuenta que el malondialdehído es resultante de la peroxidación de los ácidos grasos insaturados de las membranas celulares por la acción de especies reactivas del oxígeno (Tommasino et al., 2012; Morales y Munné-Bosch., 2019), la estabilidad en su concentración durante toda la temporada y bajo los distintos regímenes hídricos indica la inexistencia de estrés.

La concentración de PRO disminuyó más de un 70 % luego de la brotación. En cuanto a la concentración de azúcares solubles totales, se mantuvo en valores máximos hasta el endurecimiento del endocarpio, para luego disminuir significativamente un 35 % hacia la cosecha, lo que estaría relacionado con la acción sumidero del fruto que alcanza su máxima actividad durante la síntesis de aceite (Zhang et al., 2019). En conjunto la concentración de azúcares solubles totales y prolina fue máxima en la primera colecta (brotación), lo que parece indicar una relación con los procesos de ajuste osmótico necesarios para reconstituir la conductividad hidráulica del xilema y con ello permitir una reanudación de la marcha transpiratoria (Améglío et al., 2002). Si bien no hay reportes donde se relacione el ajuste osmótico con la brotación en nogal, si está documentada una alta correlación entre la concentración de azúcares solubles, prolina y el nivel de déficit hídrico al que fueron sometidos los nogales durante la germinación (Lotfi et al., 2009). Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron ponderados por el área foliar al momento de la recolección, por lo cual podría existir un efecto concentración de metabolitos en las etapas más tempranas del ciclo del cultivo no contemplado.

Fenoles y flavonoides presentaron patrones similares, aumentando significativamente conforme avanzó la temporada, alcanzando la máxima concentración en la fecha de cosecha (Tabla 6.1). La concentración de fenoles totales durante las etapas de brotación y de endurecimiento del endocarpio representaron el 87 % y 92 %, y la de flavonoides el 77 y 95 %, de las concentraciones máximas alcanzadas en la etapa de madurez, respectivamente. Los fenoles y flavonoides presentes en las hojas de nogal se han relacionado con adaptaciones antimicrobianas y antioxidantes. En este sentido Wichtl y Anton (1999) identificaron a las naftoquinonas (juglona: 5-hidroxi-1,4-naftoquinona) y flavonoides (quercetina y derivados) como los compuestos fenoles mayoritarios presentes en las hojas de nogal. En la región centro-oeste de Argentina, donde se realizó este experimento, el aumento de la concentración de fenoles y flavonoides foliares observada hacia el final de la temporada tendría especial relevancia teniendo en cuenta la concentración estacional de las precipitaciones, factor predisponente para la proliferación de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, organismo causante del tizón bacteriano del nogal. El tizón bacteriano del nogal puede causar graves daños en toda la parte aérea de la planta, ataca principalmente a las hojas por lo que existe una marcada disminución en la actividad fotosintética de la fuente, necrosando frutos y por consiguiente disminuyendo la calidad final de la nuez, y afectando las yemas fructíferas y florales, con lo que podría afectar incluso la productividad de la siguiente temporada (Fernandes et al., 2020).

El análisis de componentes principales (ACP) de las concentraciones de metabolitos foliares revela que se acumuló un 70,8 % de la varianza total en las dimensiones 1 y 2 (Dim1: 42,4 % y Dim2: 28,3 %, respectivamente). Las variables mejor representadas en la Dim1 fueron fenoles totales (FEN), flavonoides (FLA), azúcares solubles totales (AST) y prolina (PRO) aportando contribuciones a la variación de 28 %, 19 %, 25 % y 26 %, respectivamente. La única variable representada en la Dim2 fue el MDA (Fig. 6.1). La aplicación del algoritmo de clasificación jerárquica condujo a la formación de 2 grupos: el grupo I (cuadrantes I y IV) que engloba a todos los tratamientos en la primer fecha de colecta del material vegetal (brotación) representado por las variables azúcares solubles totales y prolina, que a su vez están altamente correlacionadas entre sí, confirmando la predominancia de los procesos de ajuste osmótico durante la etapa inicial del desarrollo de las hojas. El grupo II, agrupa a todos los tratamientos en las fechas de colecta correspondientes a endurecimiento del endocarpio (2) y cosecha (3), ocupando el espacio multivariado comprendido entre los cuadrantes II y III, estando este grupo caracterizado principalmente por fenoles y flavonoides. La variable MDA no presentó un patrón apreciable en ninguno de los grupos.

6.3.2 Perfil de metabolitos polares en semillas

Se perfilaron 71 metabolitos (Fig. 6.2), de los cuales 40 fueron identificados y confirmados usando las librerías NIST (National Institute of Standard and Technology) y Wiley (Tabla 6.2). Los metabolitos identificados pertenecen, según la librería Compound KEGG (Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto), a los grupos: carbohidratos (n = 11), ácidos grasos (n = 11), ácidos orgánicos (n = 9), aminoácidos (n = 5), alcohol saturado (n = 1), fosfolípido (n = 1), vitamina (n = 1), amina (n = 1) y flavonoide (n = 1). Las vías metabólicas cubiertas por los metabolitos identificados en la semilla según la librería KEGG fueron: biosíntesis de ácidos grasos, ciclo de ácidos tricarbóxicos, metabolismo del ascorbato, metabolismo de beta-alanina, metabolismo de la prolina, metabolismo de la fructosa y manosa, metabolismo de la galactosa, glucólisis, metabolismo del almidón y la sacarosa, biosíntesis de fenoles y flavonoides, y metabolismo de inositol fosfato.

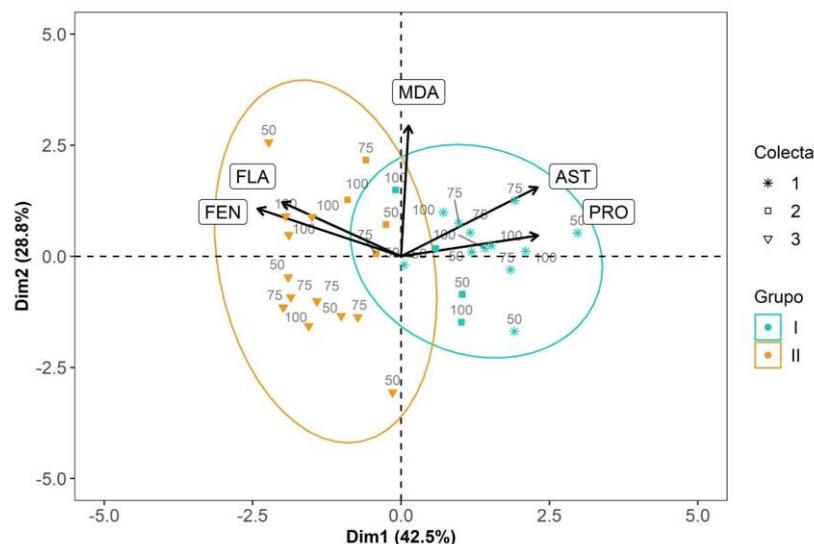


Fig. 6.1 Biplot del análisis de componentes principales y agrupamiento jerárquico (elipses) de las concentraciones de metabolitos (MDA = malondialdehído, PRO = prolina, FEN = fenoles totales, FLA = flavonoides totales y AST = azúcares solubles totales) en folíolos terminales de nogales cv. Chandler, en brotación (colecta 1, n = 12), endurecimiento del endocarpio (colecta 2, n = 12) y en madurez de cosecha (colecta 3, n = 12) bajo tres regímenes hídricos al 100, 75 y 50 % de la ETc aplicados durante dos temporadas consecutivas (2018-2020).

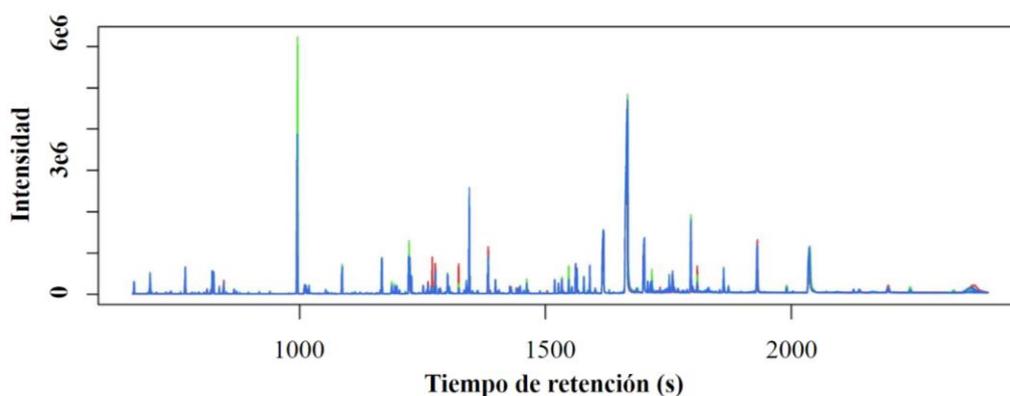


Fig. 6.2 Cromatogramas de intensidad máxima resultantes del perfilado no dirigido obtenidos por GC-MS en modo SCAN de metabolitos polares de semillas de nogal cv. Chandler bajo tres regímenes hídricos, al 100 % de la ETc (T100 = ●, n = 4) 75 % de la ETc (T75 = ●, n = 4) y al 50 % de la ETc (T50 = ●, n = 4) aplicados durante dos temporadas consecutivas (2018-2019 y 2019-2020).

Tabla 6.1 Concentración de metabolitos foliares: malondialdehído (MDA), fenoles totales (Fenoles), flavonoides totales (Flavonoides), azúcares solubles totales (AST) y prolina (PRO). Estimadas de forma dirigida en folíolos terminales extraídos en tres momentos: brotación (colecta 1), endurecimiento endocarpio (colecta 2) y madurez de cosecha (3) de árboles de nogal cv. Chandler (media \pm desviación estándar) bajo diferentes regímenes de riego en Guanchín, La Rioja Argentina.

Colecta	Tratamiento	MDA ($\mu\text{mol gPS}^{-1}$)	Fenoles (EAG mg gPS ⁻¹)	Flavonoides (ECat mg gPS ⁻¹)	AST (mg gPS ⁻¹)	PRO ($\mu\text{g gPS}^{-1}$)
1	T50	0,18 \pm 0,02	59,90 \pm 9,22	11,67 \pm 0,90	162,11 \pm 17,89 b	4,11 \pm 1,14
	T75	0,20 \pm 0,01	58,26 \pm 3,17	11,72 \pm 0,93	189,45 \pm 10,31 a	2,31 \pm 0,34
	T100	0,19 \pm 0,01	58,51 \pm 4,14	13,26 \pm 0,88	158,38 \pm 6,04 b	4,19 \pm 1,63
	p-valor	0,2048	0,8797	0,6610	0,0151	0,0560
2	T50	0,19 \pm 0,02	61,39 \pm 7,16	15,00 \pm 7,09	175,18 \pm 4,14	1,18 \pm 0,10
	T75	0,20 \pm 0,02	64,93 \pm 4,11	15,50 \pm 1,15	165,99 \pm 10,31	1,36 \pm 0,42
	T100	0,18 \pm 0,02	59,71 \pm 6,49	15,40 \pm 8,57	162,24 \pm 16,68	1,42 \pm 0,33
	p-valor	0,7170	0,4793	0,4573	0,3343	0,5539
3	T50	0,18 \pm 0,04	65,14 \pm 10,10	16,28 \pm 2,89	111,27 \pm 12,20	1,13 \pm 0,54
	T75	0,17 \pm 0,01	66,71 \pm 4,14	15,00 \pm 1,86	103,97 \pm 6,92	0,90 \pm 0,15
	T100	0,19 \pm 0,02	69,68 \pm 3,28	16,35 \pm 1,73	111,40 \pm 13,90	0,99 \pm 0,12
	p-valor	0,4775	0,5457	0,3954	0,2044	0,6266
1		0,19 \pm 0,02	58,89 \pm 5,58 b	12,21 \pm 1,12 b	169,98 \pm 18,32 a	3,54 \pm 1,39 a
2		0,19 \pm 0,02	62,01 \pm 5,94 ab	15,20 \pm 5,97 ab	167,80 \pm 11,91 a	1,32 \pm 0,30 b
3		0,18 \pm 0,03	67,18 \pm 6,27 a	15,88 \pm 2,11 a	108,88 \pm 10,93 b	1,00 \pm 0,31 b
	p-valor	0,3503	0,0064	0,027	<0,0001	<0,0001

P-valor < 0,05 indican diferencias significativas entre medias de acuerdo con el test LSD. Letras diferentes indican diferencias entre medias.

Inicialmente los datos se exploraron mediante un análisis de componentes principales, donde se proyectaron las intensidades máximas de todas las repeticiones, incluyendo también los metabolitos no confirmados por comparación con las librerías de masas espectrales. Para ello se alinearon los picos cromatográficos (Fig. 6.3) en relación a la repetición 3 del régimen de riego al 75 % de la ETc, por ser el más representativo de todos los cromatogramas. Las desviaciones extremas en los Tr (tiempos de retención) fueron $\pm 1,5$ segundos, que considerando un tiempo de corrida cromatográfica total de 2500 segundos representan una desviación del 0,06 %. Las dimensiones 1 y 2 (Dim 1 y Dim 2) del ACP (Fig. 6.4) acumularon 35,3 y 20,5 % de la varianza total. La superposición de las áreas de proyección (elipses) de los tratamientos de riego indica que no existieron diferencias significativas. A pesar de la total superposición de los tratamientos también se graficaron los centros de inercia de cada grupo (centroides) con puntos de mayor dimensión. El centroide del tratamiento T100 se ubicó próximo a la intersección (0,0), indicando una varianza general del tratamiento próxima a 0, y en términos de distancia multivariada, el centroide del tratamiento T75 fue más similar a T100 que T50, lo que indica inicialmente una mayor similitud entre el tratamiento T100 y T75.

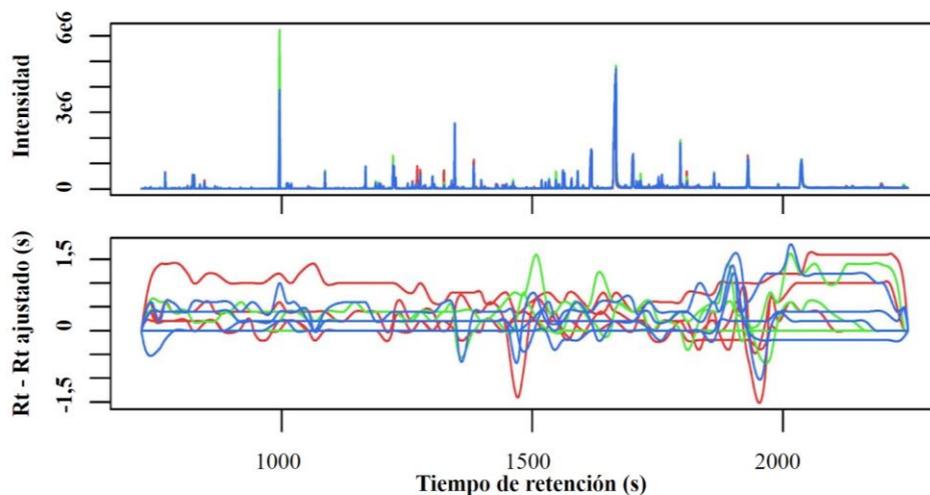


Fig. 6.3 Arriba, Cromatogramas de intensidad máxima resultantes del perfilado no dirigido obtenidos por GC-MS en modo SCAN de metabolitos polares de semillas de nuez de nogal cv. Chandler bajo tres regímenes hídricos, al 100 % de la ETc (T100 = ●, n = 4) 75 % de la ETc (T75 = ●, n = 4) y al 50 % de la ETc (T50 = ●, n = 4). Abajo, derivas en tiempos de retención para el ajuste según coincidencia de picos cromatográficos.

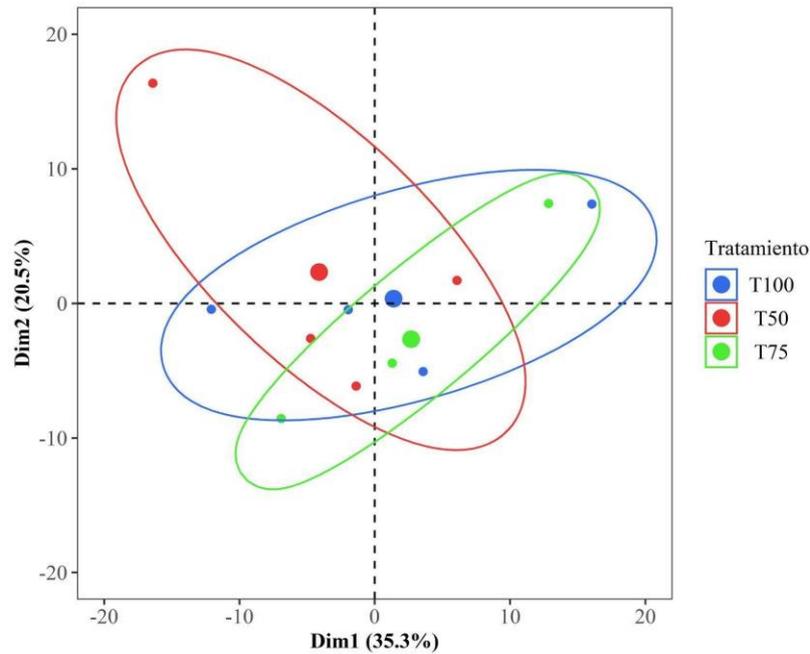


Fig. 6.4 Análisis de componentes principales de las intensidades máximas de los metabolitos perfilados en nueces de nogal cv. Chandler sometidos a tres regímenes hídricos durante dos temporadas al 100 % de la ETc (T100 = ●, n = 4) 75 % de la ETc (T75 = ●, n = 4) y al 50 % de la ETc (T50 = ●, n = 4).

Posteriormente se normalizaron las concentraciones de los metabolitos identificados en relación al estándar interno (Tabla 6.2). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de metabolitos cuando se compararon los tratamientos de riego. Sin embargo, se apreció una tendencia a la concentración en un 35 % del total de metabolitos identificados en el tratamiento T50. Las correlaciones metabolito-metabolito a partir de las concentraciones normalizadas (Fig. 6.5) revelaron 160 correlaciones negativas (22,4 %) y 640 positivas (77,6 %). De las 800 correlaciones, 149 fueron significativas (todas positivas) a $P < 0,05$ (Fig. 6.6).

El ACP de las concentraciones medias normalizadas de los metabolitos identificados (Fig. 6.7) acumuló el 100 % de la variación total, con un 53,6 % en la Dim. 1 y un 46,4 % en la Dim. 2. La contribución de las variables a la variación total de cada dimensión fue prácticamente simétrica (50 % y 50 %, Tabla 6.3). Las contribuciones de los tratamientos T50 (cuadrante II) y T100 (cuadrante IV) a la variabilidad total de las dimensiones fueron contrastantes. T50 aportó un 66,62 % de la variación de Dim.1, y un 48 % a la Dim.2; por su parte T100 aportó 12,01 % a la Dim.1 y 54,65 % a Dim.2. La proyección de T75 (cuadrante I) fue similar a T100, y aportó 21,80 % a la Dim.1 y 44,86 % de la variación total a la Dim.2. Los metabolitos asociados al tratamiento T50 fueron: ácido butanodioico, L-glutámico, D-manosa, glucopiranososa, maltosa, mio-inositol, mio-inositol-fosfato y ácido arabino-hexárico. También se encuentran asociados los ácidos grasos palmítico y linoleico en sus formas libres. Los ácidos grasos libres tienen polaridad positiva, a diferencia de los ácidos grasos conjugados, sin embargo, el perfil de

ácidos grasos fue evaluado previamente en el Capítulo 5 por lo que no se abordará el análisis en este Capítulo.

Las concentraciones medias de ácido succínico (sinónimo de ácido butanodioico) y D-manosa en las semillas del tratamiento T50 fueron un 27 % y 36 % más altas que las estimadas en el tratamiento T100, respectivamente. Estudios previos realizados en dos especies de tomillo sensibles al déficit hídrico (*Thymus vulgaris* y *Thymus kotschyanus*) sometidas a déficit hídrico, aumentaron significativamente la concentración foliar de ácido succínico como estrategia de ajuste osmótico. El aumento en la concentración de ácido succínico se ha relacionado a incrementos en la expresión y la actividad de las enzimas succinato dehidrogenasa e isocitrato liasa (Ashrafi et al., 2022). Al igual que el ácido succínico, el monosacárido manosa es un soluto compatible en plantas, que además se ha reconocido tiene un lugar especial en la regulación de la tolerancia al estrés hídrico en las plantas. Zhao et al. (2020) evaluaron los efectos de aplicaciones exógenas de manosa en trébol blanco (*Trifolium repens*) sometidos a estrés hídrico, encontraron aumentos significativos en la concentración de manosa, prolina y azúcares solubles totales en hojas, además de mantener la actividad enzimática antioxidante y una tasa fotosintética estable. Resultados similares reportaron Ibrahim y Abdellatif (2016) cuando aplicaron maltosa y trehalosa foliarmente a plantas de trigo sometidas a tratamientos de déficit hídrico, concluyendo que estos azúcares inducen la tolerancia al estrés hídrico.

Los azúcares solubles maltosa y glucopiranososa alcanzaron concentraciones 17 %, 185 % más altas en T50 que en T100, de forma similar a lo observado en relación a la D-manosa (incremento del 27 % en T50 respecto a T100). Lee et al. (2008) advirtieron que en hojas de trébol blanco (*Trifolium repens*) los procesos de ajuste osmóticos mediados por azúcares solubles (carbohidratos no estructurales) están relacionados principalmente a la degradación del almidón a sus formas monoméricas (forma abierta de la glucopiranososa) y no a la síntesis de novo de los azúcares. Las semillas sometidas al tratamiento T50, donde los árboles recibieron un 50 % de agua aplicada en T100, presentaron una concentración media estimada de ácido arabino-hexárico 21 % mayor que la observada en T100. Poco se ha explorado sobre la síntesis del ácido arabino hexárico (sinónimo de ácido 2-oxo-glucónico) en relación al déficit hídrico en plantas, pero se ha identificado como un producto de la degradación oxidativa de los carbohidratos en frutilla, cuando se compararon los perfiles de metabolitos en frutos en distintos momentos de la maduración (Zhang et al., 2011). Además, existen evidencias sobre la producción de ácido arabino hexárico a partir de la irradiación con rayos gama a moléculas de fructosa, por lo que el intermediario anterior al ácido arabino hexárico podría variar entre especies vegetales (Phillips y Moody, 1960).

Tabla 6.2 Perfil de metabolitos identificados por comparación con librerías de masas espectrales (media \pm desviación estándar) en semillas de nogal cv. Chandler bajo diferentes regímenes de riego aplicados en dos temporadas consecutivas (2018-2019 y 2019-2020) en Guanchín, La Rioja, Argentina.

Tr (s)	Metabolito	Grupo	T100 mg gPS ⁻¹	T75 mg gPS ⁻¹	T50 mg gPS ⁻¹	p-valor
695,8	Ácido oxálico	Ácido orgánico	1,41 \pm 0,74	1,90 \pm 0,64	1,62 \pm 0,28	> 0.05
825,0	Glicerol	Alcohol saturado	1,24 \pm 0,73	1,51 \pm 0,43	0,90 \pm 0,18	> 0.05
836,6	L-Isoleucina	Aminoácido	0,52 \pm 0,22	0,62 \pm 0,20	0,64 \pm 0,41	> 0.05
861,4	Ácido butanodioico	Ácido orgánico	0,61 \pm 0,31	0,63 \pm 0,47	0,78 \pm 0,40	> 0.05
994,9	Ácido málico	Ácido orgánico	8,44 \pm 3,10	11,49 \pm 6,85	6,85 \pm 1,93	> 0.05
1012,6	Ácido piroglutámico	Ácido orgánico	0,93 \pm 0,32	0,82 \pm 0,25	0,77 \pm 0,35	> 0.05
1017,7	L-Aspártico	Aminoácido	0,80 \pm 0,54	0,64 \pm 0,56	0,49 \pm 0,36	> 0.05
1086,1	L-Glutámico	Aminoácido	2,69 \pm 0,83	2,31 \pm 1,60	3,71 \pm 1,17	> 0.05
1187,3	Ácido fosfórico	Ácido orgánico	1,32 \pm 0,42	1,53 \pm 0,51	1,34 \pm 0,70	> 0.05
1193,3	Ácido ribónico	Ácido orgánico	0,68 \pm 0,38	0,91 \pm 0,54	0,63 \pm 0,17	> 0.05
1197,4	D-Psico Furanosa	Carbohidrato	0,91 \pm 0,46	1,13 \pm 0,22	0,80 \pm 0,27	> 0.05
1221,9	Ácido cítrico	Ácido orgánico	2,73 \pm 1,00	3,01 \pm 1,98	2,11 \pm 0,59	> 0.05
1224,0	Ácido mirístico	Ácido orgánico	4,77 \pm 1,01	5,37 \pm 0,40	5,35 \pm 0,49	> 0.05
1227,1	Metil galactosido	Carbohidrato	1,24 \pm 0,28	1,55 \pm 0,38	1,25 \pm 0,13	> 0.05
1276,1	D-manosa	Carbohidrato	1,88 \pm 0,63	1,50 \pm 0,55	2,57 \pm 1,78	> 0.05
1286,1	D-Talosa	Carbohidrato	0,98 \pm 1,06	0,67 \pm 0,46	0,61 \pm 0,27	> 0.05
1300,7	Ácido gálico	Ácido orgánico	2,34 \pm 1,29	2,09 \pm 1,74	2,12 \pm 0,50	> 0.05
1323,9	Glucopiranososa	Carbohidrato	0,57 \pm 0,22	0,94 \pm 0,28	1,63 \pm 2,04	> 0.05
1338,6	Acido palmítico	Ácido graso	1,66 \pm 0,70	1,75 \pm 0,43	1,92 \pm 0,56	> 0.05
1344,9	Ácido glucónico	Ácido orgánico	6,31 \pm 3,70	6,9 \pm 2,86	5,52 \pm 0,95	> 0.05
1383,0	Mio-inositol	Vitamina	3,70 \pm 1,22	3,89 \pm 0,57	4,39 \pm 1,04	> 0.05
1398,1	Acido Arabino-hexarico	Ácido orgánico	0,84 \pm 0,46	0,85 \pm 0,21	1,02 \pm 0,44	> 0.05
1427,7	Ácido linoleico	Ácido graso	1,48 \pm 0,46	1,76 \pm 0,35	1,95 \pm 0,99	> 0.05
1430,7	Acido oleico	Ácido graso	1,09 \pm 0,45	1,54 \pm 0,45	1,48 \pm 0,57	> 0.05
1439,1	Triptamina	Aminoácido	0,45 \pm 0,41	0,36 \pm 0,26	0,31 \pm 0,53	> 0.05
1444,1	Ácido esteárico	Ácido graso	0,93 \pm 0,18	1,17 \pm 0,43	1,04 \pm 0,43	> 0.05
1526,3	Ácido monomirístico	Ácido orgánico	2,66 \pm 0,74	3,07 \pm 0,16	3,04 \pm 0,56	> 0.05
1533,7	Mio-inositol-fosfato	Fosfolípido	0,81 \pm 0,29	0,89 \pm 0,25	1,03 \pm 0,35	> 0.05
1561,2	Dopamina	Amina	1,45 \pm 0,97	1,55 \pm 0,35	1,29 \pm 1,28	> 0.05
1600,9	2-Palmitoil Glicerol	Carbohidrato	1,57 \pm 0,63	1,43 \pm 0,17	1,46 \pm 0,42	> 0.05
1617,4	1-Monopalmitato	Ácido graso	36,67 \pm 8,95	41,78 \pm 2,05	42,67 \pm 5,89	> 0.05
1665,8	D-Trehalosa	Carbohidrato	54,67 \pm 12,71	66,42 \pm 9,23	53,83 \pm 5,02	> 0.05
1684,9	2-Monoestearato	Ácido graso	0,94 \pm 0,27	1,07 \pm 0,16	0,88 \pm 0,29	> 0.05
1700,6	Glicerol-estearato	Ácido graso	26,52 \pm 6,40	30,29 \pm 1,81	31,66 \pm 5,21	> 0.05
1707,8	Maltosa	Carbohidrato	0,74 \pm 0,13	0,52 \pm 0,17	0,87 \pm 1,01	> 0.05
1751,8	Catequina	Flavonoide	1,27 \pm 0,77	1,46 \pm 0,31	0,99 \pm 0,38	> 0.05
1762,1	D-Celobiosa	Carbohidrato	1,17 \pm 0,38	1,23 \pm 1,08	0,95 \pm 0,72	> 0.05
1780,2	Glicerol-eicosanoico	Carbohidrato	0,69 \pm 0,63	0,43 \pm 0,10	0,63 \pm 0,21	> 0.05
1811,5	Melibiosa	Carbohidrato	3,68 \pm 2,60	3,26 \pm 1,24	2,28 \pm 0,40	> 0.05
2036,4	Sucrosa	Carbohidrato	18,5 \pm 5,02	23,91 \pm 4,49	22,31 \pm 5,20	> 0.05

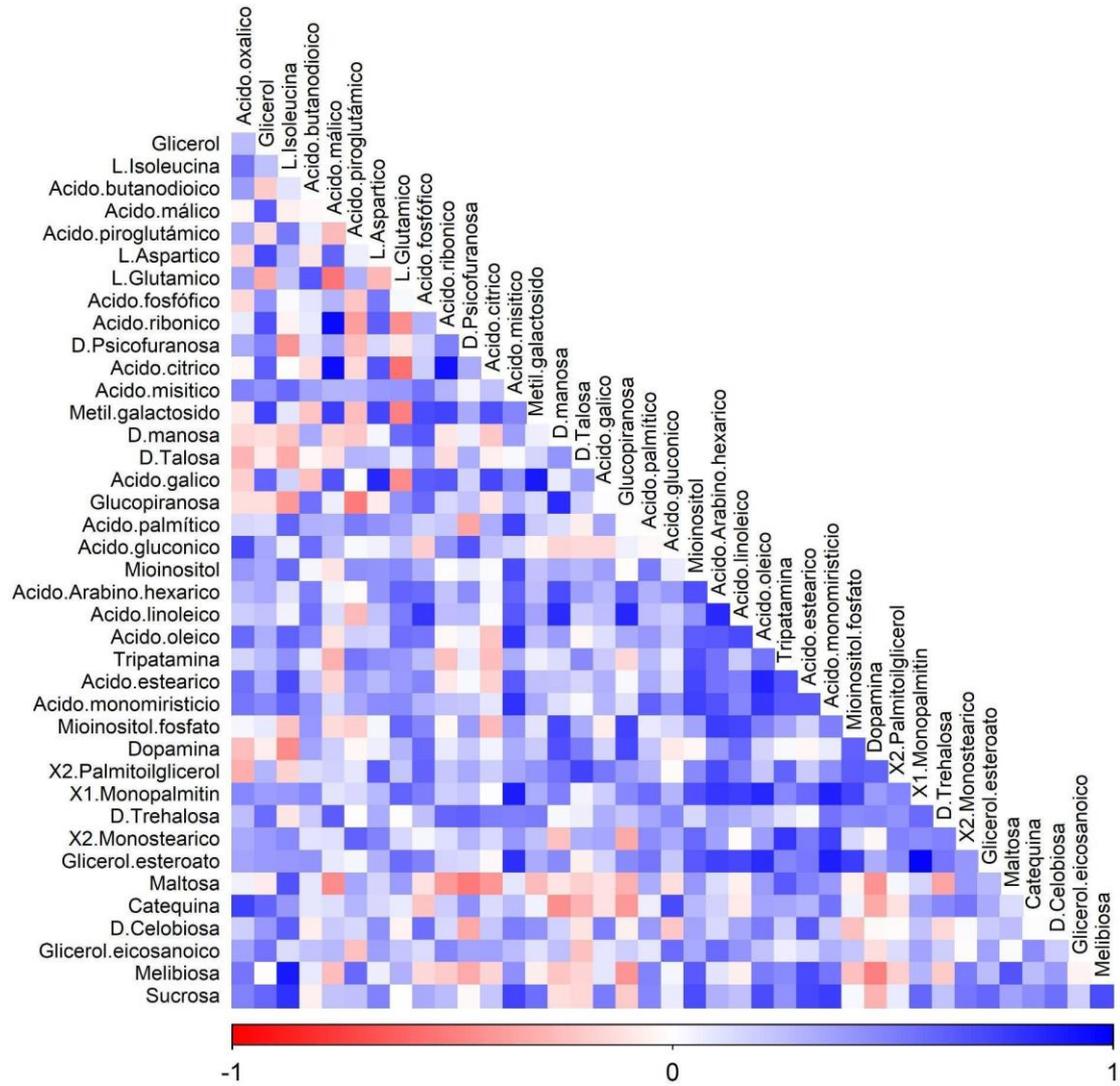


Fig. 6.5 Matriz de correlación de Pearson entre metabolito-metabolito perfilado e identificado por comparación con librerías de masas espectrales en semillas de nogal cv. Chandler.

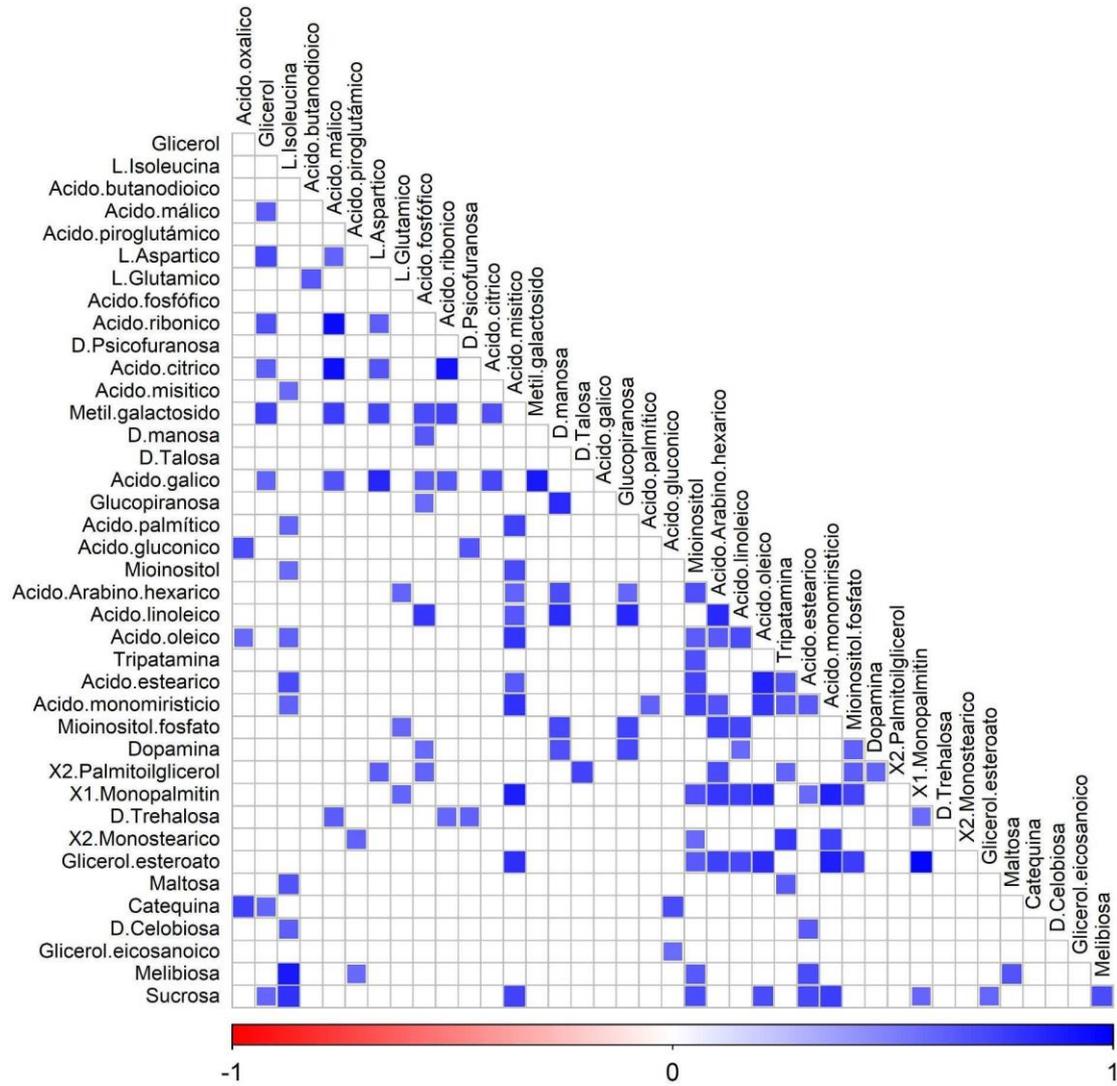


Fig. 6.6 Matriz de correlación de Pearson significativas a $p < 0,05$ entre metabolito-metabolito perfilado e identificado por comparación con librerías de masas espectrales en semillas de nogal cv. Chandler.

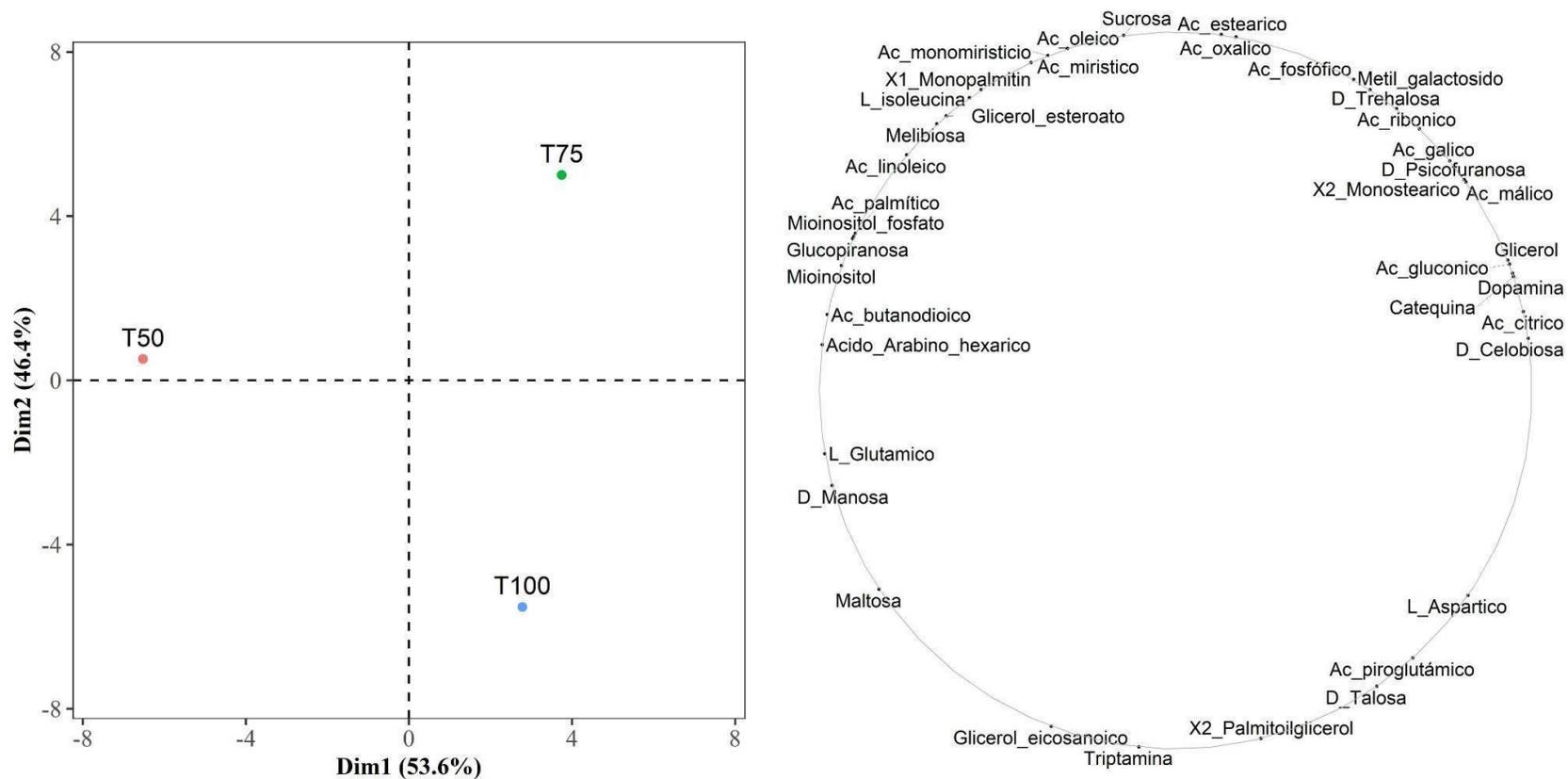


Fig. 6.7 Biplot del análisis de componentes principales (a la izquierda proyección de individuos y a la derecha proyección de variables) de análisis de componentes principales de las medias de las concentraciones normalizadas de los metabolitos identificados en semillas de nogal cv. Chandler sometidos a tres regímenes hídricos durante dos temporadas consecutivas al 100 % de la ETc (T100 = ●, n = 4), 75 % de la ETc (T75 = ●, n = 4) y al 50 % de la ETc (T50 = ●, n = 4).

Tabla 6.3 Contribuciones de la varianza a las Dimensiones 1 y 2 del Análisis de Componentes Principales (Fig. 6.7) de las medias de las concentraciones normalizadas de los metabolitos identificados en nueces de nogal cv. Chandler.

Metabolito	Cont. Dim. 1 (%)	Cont. Dim. 2 (%)
Ácido oxálico	0,13	5,22
Glicerol	4,05	0,70
L-Isoleucina	1,56	3,58
Ácido butanodioico	4,45	0,23
Ácido málico	3,09	1,81
Ácido piroglutámico	2,06	3,00
L-Aspártico	3,14	1,75
L-Glutámico	4,52	0,16
Ácido fosfórico	1,16	4,04
Ácido ribónico	2,18	2,86
D-Psico Furanosa	3,05	1,85
Ácido cítrico	4,44	0,26
Ácido mirístico	0,76	4,49
Metil galactosido	1,38	3,78
D-manosa	4,33	0,37
D-Talosa	1,48	3,66
Ácido gálico	2,75	2,20
Glucopiranososa	3,83	0,96
Acido palmítico	3,80	0,98
Ácido glucónico	4,09	0,66
Mio-inositol	4,10	0,65
Ácido Arabino-hexarico	4,59	0,08
Ácido linoleico	2,65	2,31
Ácido oleico	0,43	4,86
Triptamina	0,04	5,32
Ácido esteárico	0,07	5,29
Ácido monomirístico	0,05	4,65
Mio-inositol-fosfato	3,77	1,03
Dopamina	4,17	0,57
2-Palmitoil Glicerol	0,26	5,07
1-Monopalmitato	1,38	3,78
D-Trehalosa	1,79	3,31
2-Monoestearato	3,05	1,85
Glicerol-estearato	1,93	3,15
Maltosa	3,23	1,65
Catequina	4,19	0,54
D-Celobiosa	4,56	0,11
Glicerol-eicosanoico	0,56	4,72
Melibiosa	2,09	2,96
Sucrosa	0,01	5,26

El aminoácido prolina es ampliamente reconocido como un osmoprotector principal en las plantas, además de cumplir funciones de detoxificación de especies reactivas del oxígeno (Silvente et al., 2012). En el perfilado no dirigido de metabolitos polares de semillas de nogal no se encontró prolina, pero sí se identificó una tendencia al aumento de la concentración de L-glutamato, aminoácido que también se ha relacionado a procesos de ajuste osmótico, y en relación a la vía de la biosíntesis de prolina es el intermediario anterior. En este sentido, la concentración de L-glutamato fue un 39 % mayor en las semillas de T50, cuando se compararon con las de T100. Ünal y Okatan (2023) compararon las concentraciones de L-glutamato en frutos de frutillas sometidas a riego deficitario (al 50 % de la ETc), y reportaron un aumento del 50 % en la concentración del aminoácido en comparación a los frutos de plantas regadas al 100 % de las demandas hídricas del cultivo. Rizhsky et al. (2004) reportaron que cuando *Arabidopsis thaliana* es sometida a condiciones de estrés hídrico y térmico combinados no acumulan prolina como osmoprotector, situación que sí ocurriría en *Arabidopsis thaliana* únicamente sometidas a sequía. Finalmente, las semillas recolectadas del tratamiento T50, alcanzaron concentraciones de mio-inositol y mio-inositol fosfato un 23 y 27 % más altas, respectivamente, que en el tratamiento T100. Los metabolitos mio-inositol y mio-inositol-fosfato son sintetizados a partir de la conversión enzimática irreversible de D-glucosa en uno y tres pasos, respectivamente, y ambos puede actuar como osmoprotectores y antioxidantes ante las especies reactivas del oxígeno en condiciones de estrés hídrico y/o salino (Loewus y Murthy., 1999).

En síntesis, la mayor proporción de los metabolitos identificados en concentraciones más altas en las semillas del tratamiento T50 respecto a T100 y T75 están relacionados a procesos de ajuste osmótico. No se han encontrado artículos que traten sobre los procesos de ajuste osmótico en el fruto o semilla del nogal. Sin embargo, existen algunas evidencias de traslocación de fotoasimilados producidos en el epicarpio del fruto hacia la semilla (Wu et al., 2009). Contextualizando, en angiospermas los estomas de los frutos permanecen funcionales en tanto que la vía de la fotosíntesis esté activa en el epicarpio y no hayan sido cubiertos con ceras que imposibiliten el intercambio gaseoso con la atmósfera (Simkim et al., 2019). En nogal, particularmente, el epicarpio mantiene una alta concentración de clorofila hasta la madurez, en ese momento el contenido de ceras de la epidermis del epicarpio a la madurez alcanza un 0,035 % del peso seco del fruto, valor significativamente menor al 1,64 % alcanzado por las hojas en el mismo estado fenológico (Prasad y Gülz, 1990). Así, las características del epicarpio no parecen generar una limitación física para que la fotosíntesis y respiración se mantengan estable durante toda la fase de crecimiento y llenado del fruto. La relación entre la tasa transpiratoria y la temperatura de los frutos ha sido poco estudiada, mientras que se asume una relación lineal negativa entre transpiración y temperatura foliar para la mayor parte de las especies vegetales (Gates, 1964). Además, se ha reportado que el nogal tiene capacidad para ajustar el potencial osmótico de las hojas cuando es sometido a altas temperaturas o déficit hídrico (Gauthier y Jacobs, 2011). Debido la escasa información publicada en nogal y su importancia en el contexto del calentamiento global, resulta importante realizar futuros

estudios enfocados i) Evaluar la eficiencia de uso de la radiación y asimilación fotosintética neta del fruto a lo largo del periodo de crecimiento y llenado del fruto bajo distintos regímenes hídricos y ii) Evaluar la concentración de los metabolitos identificados en mayor concentración en las semillas provenientes del tratamiento T50 en tratamientos de riego más restrictivos a fin de confirmar si forman parte o no de un proceso de ajuste osmótico y su uso como potenciales biomarcadores de déficit hídrico temprano en el fruto.

La sensibilidad de la lipogénesis a las altas temperaturas está bien documentada en olivo, frutal que al igual que el nogal produce drupas indehiscentes. En este sentido García-Inza et al. (2016) observaron que en semillas (en contraste con lo observado en la pulpa o mesocarpio) de olivo, durante la fase de acumulación de aceite de la semilla (entre cuajado y endurecimiento del endocarpio), la concentración final de aceite disminuyó 1,1 % por cada 1 °C incrementado en la temperatura media del ambiente. En contraste, Jin et al. (2023) monitorearon la acumulación de aceite en semillas de nogal durante toda la temporada, y encontraron que la concentración aumentó rápidamente entre los 60 y 90 días luego de la polinización (alcanzando el 50 % de la concentración final), pero la lipogénesis continuó hasta los 140 días posteriores a la polinización, cerca de la madurez de cosecha de los frutos. Esto deja en evidencia que el proceso de lipogénesis en la semilla del nogal queda expuesto a un rango de temperaturas más amplio que en el olivo, incluidas las temperaturas máximas absolutas que ocurren durante mediados y fines del verano, con la posible existencia de procesos de ajuste osmótico en el fruto cobra relevancia como estrategia evolutiva y adaptativa en nogal para mantener la lipogénesis a tasa máxima aún en los meses más cálidos de la temporada.

6.4 Conclusiones

Los biomarcadores de déficit hídrico prolina, malondialdehído, azúcares solubles totales, fenoles y flavonoides totales medidos en hojas de nogal no mostraron diferencias significativas entre los regímenes de riego aplicado al nogal. Sin embargo, sí presentaron diferencias en la concentración a lo largo del ciclo del cultivo. Los metabolitos foliares asociados a procesos de ajuste osmótico tales como prolina y azúcares solubles totales alcanzaron sus máximos en la etapa de brotación, en tanto que los fenoles y flavonoides totales alcanzaron su máximo hacia la madurez. El malondialdehído no varió ni entre etapas fenológicas, ni entre tratamientos de riego. Respecto al perfil de metabolitos, este es el primer estudio donde se analiza el perfil de metabolitos polares de la semilla de nogal obtenidas a partir de la aplicación de distintos niveles de riego, y se pudo apreciar una tendencia a la concentración de los metabolitos asociados al ajuste osmótico L-glutamato, D-manosa, glucopiranososa, maltosa, mio-inositol y mio-inositol-fosfato en el tratamiento de riego más deficitario (T50).

Capítulo VII:

Discusión general

El aumento en la demanda de alimentos está estrechamente relacionado con el crecimiento de la población. Por esta razón la frontera agrícola se ha expandido hacia nuevas zonas de cultivo significativamente diferentes de las zonas de cultivo tradicionales, y, por otra parte, la agricultura en general debe alcanzar una mayor eficiencia en relación al uso de los recursos naturales no-renovables, especialmente en relación al más limitante, el agua. En particular el nogal evolucionó y posteriormente se domesticó en zonas costeras de climas mediterráneos de Asia y Europa. Siendo uno de los cultivos más demandantes de agua, por encima de otros frutos secos como el pistacho, pecano, almendro o avellano. Los requerimientos hídricos del nogal fueron inicialmente estimados para las condiciones agroclimáticas de California (EUA). En Argentina el cultivo del nogal se ha expandido a lo largo de la región Centro-Oeste (comprendiendo la parte sur del Noroeste Argentino y el oeste de Cuyo), donde los climas son predominantemente áridos y semiáridos, con escasas precipitaciones; por lo que la oferta de agua de la región no alcanza a satisfacer la totalidad de la demanda hídrica del cultivo. Otro aspecto de relevancia a tener en cuenta sobre la región donde es cultivado en Argentina es el patrón de la distribución de precipitaciones, que ocurre mayoritariamente en los meses de verano, a diferencia de las zonas de cultivo tradicional donde las precipitaciones se reparten durante los meses invernales. En este contexto es donde la pregunta de investigación toma relevancia ¿cuáles son las respuestas del nogal a distintas dosis de riego durante toda la temporada en una región de clima semiárido con un patrón de precipitaciones principalmente concentradas en el verano?

La respuesta a esta pregunta es compleja, y requiere un abordaje desde distintos niveles de organización, por ello es que los objetivos específicos apuntaron a tres tipos de respuestas del nogal a distintos regímenes de riego: i) en primer lugar a nivel de cultivo y de planta entera (objetivo específico 1) enfatizando en la productividad, composición del rendimiento, crecimiento vegetativo e indicadores de estado hídrico; ii) posteriormente, (objetivo específico 2) el foco fue puesto sobre la calidad de la producción, en términos de tamaño de nueces y semillas, acumulación de aceite y composición del aceite, por último, iii) de forma transversal a los dos niveles de respuesta evaluados anteriormente (objetivo específico 3) buscando entender los procesos de ajuste bioquímico a nivel foliar y del metaboloma de la semilla (perfilado de metabolitos polares). En conjunto la evaluación de estos tres niveles de organización y sus interrelaciones permitieron cumplir con el objetivo principal de esta tesis: **Describir los efectos de distintos regímenes hídricos sobre el crecimiento vegetativo, producción, calidad de nuez y variables metabólicas-fisiológicas en un nocal joven (*Juglans regia* L.) del Noroeste de Argentina (Chilecito, L. R.).**

Para asegurar la originalidad de este trabajo se optó por la revisión bibliográfica sistemática de los artículos publicados que evalúen las respuestas del nogal a la aplicación de estrategias de riego deficitario en regiones semiáridas (Capítulo 1). Si bien no se encontró una gran cantidad de artículos que aborden dichas temáticas, sentó un precedente sobre la potencialidad de aplicación de estrategias de riego deficitario y otros tipos de manejo para mantener la productividad y calidad de la producción

del nogal en condiciones limitantes de agua. Además, permitió la comparación de la demanda hídrica del nogal frente a otros frutos secos (Tabla 1.1) y, por último, el meta-análisis de los resultados de productividad en función del agua aplicada (Fig. 1.1) que evidenció interesantemente que la productividad máxima alcanzada fue del 60 % del rendimiento relativo, con dosis de riego equivalentes al 80 % de agua aplicada relativa (sumatoria de la irrigación y la precipitación efectiva).

A nivel experimental, se diseñó un ensayo donde se aplicaron de forma sostenida, durante dos temporadas consecutivas, de cuatro niveles de riego que repusieron: 125, 100, 75 y 50 % de la evapotranspiración del cultivo (denominados T125, T100, T75 y T50, respectivamente). La ETc fue estimada con los coeficientes de cultivo más difundidos para el nogal a nivel mundial (Goldhamer et al., 1998), que inicialmente fueron estimados para las condiciones agroclimáticas de California. En este sentido, no se han encontrado coeficientes de cultivo locales en reportes publicados. El tratamiento T125 se aplicó por dos razones: i) en primer lugar como un testigo auxiliar en caso de que el tratamiento denominado T100 no repusiera efectivamente el 100 % de la ETc bajo las condiciones agroclimáticas del centro oeste de Argentina y, por otra parte, ii) en caso de que el tratamiento T100 repusiera la totalidad de la demanda del cultivo, permitiría explorar las respuestas del cultivo a la sobre irrigación.

La integración y jerarquización de los resultados obtenidos se realizará en conjunto; mientras que la validación de las hipótesis seguirá un orden funcional a la presentación de los resultados.

H-1 (OE 1, C4): Existe una dosis de riego distinta a la estimada como óptima que permite mantener similar relación producción/crecimiento vegetativo (i.e. eficiencia productiva).

Las dosis de riego deficitario al 50 y 75 % de la ETc (T50 y T75) alcanzaron rendimientos similares al del tratamiento regado a 100 % de la ETc (T100) durante todo el periodo experimental. De forma similar al rendimiento, la composición del rendimiento en términos de número de nueces, peso fresco y seco de las nueces, y concentración de aceite no se vio afectada por la dosis de riego a lo largo del experimento (Tabla 3.4). La productividad del agua fue similar entre tratamientos durante la primera temporada, pero aumentó significativamente durante la segunda donde el tratamiento T50 alcanzó una productividad un 38 % mayor a la de T100 (Tabla 3.4). En relación al estado hídrico, el potencial hídrico xilemático presentó diferencias significativas entre los tratamientos de riego durante prácticamente toda la temporada, mientras que la conductancia estomática fue menos sensibles al tratamiento de riego presentando diferencias entre tratamientos únicamente a la mitad de ambas temporadas (100 DDPF, Fig. 3.2). Sin embargo, y a pesar de que el umbral de potencial hídrico xilemático planteado por Fulton et al. (2014) asociados a pérdidas económicas es de -0,8 MPa (Tabla 1.2), el tratamiento T50 alcanzó potenciales hídricos mínimos absolutos inferiores a -1 MPa entre los 25 y 100 días después de floración (DDF, momento de acumulación de aceite a tasa máxima). Lo que indicaría que el umbral de potencial hídrico crítico para la gestión del riego en el centro oeste de Argentina alcanza valores menores a -0,8 MPa (en torno a -1 MPa) en la ventana de tiempo entre los 25 y 100 DDF.

Por otra parte, el crecimiento vegetativo, se estimó en términos de volumen de copa, porosidad de la copa y área seccional transversal del tronco en tres etapas fenológicas del cultivo: brotación, endurecimiento del endocarpio y maduración. En general, el volumen y la porosidad de la copa se mantuvieron similares entre tratamientos, en tanto que el área seccional del tronco mostró diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento T50 y el resto de los tratamientos durante la brotación de ambas temporadas (Fig. 3.3). En conjunto las evidencias asociadas a productividad y las asociadas a estimaciones del crecimiento vegetativo permiten apoyar la hipótesis H-1, relacionada al objetivo específico 1, dado que existen tres niveles de riego, al 50, 75 y 125 % de la ETc, que permiten mantener una productividad similar a la obtenida aplicando la dosis de riego estimada como óptima. Asimismo, es importante destacar que la dosis de riego más interesante en este aspecto fue T50, puesto que incrementó significativamente la productividad del agua sin implicancias negativas sobre el rendimiento y su composición. Por su parte, el tratamiento T125 apoya la hipótesis subsidiaria (pre-supuesto) sobre el desbalance entre los crecimientos vegetativo y reproductivo cuando la dosis de riego aplicada es superior al 100 % de la ETc, dado que T125 no solo no incrementó el rendimiento, sino que tampoco aportó al control del crecimiento vegetativo. En línea con esta última afirmación, Cohen et al. (1997) reportaron resultados similares al sobrieriego en nogales al 130 % de la ETc.

H-3.1 (OE 3, C6): Los metabolitos asociados a procesos de ajuste osmótico (prolina y azúcares solubles totales), antioxidantes (fenoles y flavonoides totales) y productos de la oxidación de las membranas plasmáticas (malondialdehído) son biomarcadores de estrés hídrico en nogal.

A diferencia de la sensibilidad de los indicadores de estado hídrico potencial hídrico xilemático y conductancia estomática (Fig. 3.2) ante cambios en la dosis de riego en nogal, los metabolitos evaluados como potenciales biomarcadores de déficit hídrico no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos de riego (Tabla 6.1 y Fig. 6.1). Esto contribuye a rechazar la hipótesis 3.1, dado que no existió una asociación entre la concentración de ninguno de los metabolitos evaluados con el nivel de reposición hídrica que permitiera suplantar a los indicadores de estado hídrico medidos en las plantas. A partir de estos resultados se puede formular una nueva pregunta de investigación: ¿cuál es el umbral crítico de potencial hídrico o conductancia estomática a partir del cual los metabolitos foliares evaluados como potenciales biomarcadores evidencian sus diferencias? En este sentido, puede que el déficit hídrico umbral a partir del cual los procesos de ajuste osmótico u protección antioxidante se activan no se haya alcanzado durante las dos temporadas que duró el experimento.

Cuando se compararon las concentraciones de los biomarcadores foliares clasificándolos únicamente por fecha de colecta del material vegetal (brotación, endurecimiento del endocarpio y madurez) se apreció un interesante patrón asociado a la fenología del cultivo (Tabla 6.1 y Fig. 6.1). La concentración de prolina y azúcares solubles totales fue máxima al inicio de la temporada (brotación), momento en que los procesos de ajuste osmótico son de suma importancia para reconstituir la conductividad

hidráulica del xilema (Améglio et al., 2002). Por otra parte, la concentración de fenoles y flavonoides totales alcanzó su máximo durante la madurez, periodo en el cual los procesos oxidativos desencadenados por factores bióticos y abióticos cobran más relevancia. Por último, no se observaron diferencias significativas en la concentración de malondialdehído (MDA) durante toda la temporada, a pesar de ser un biomarcador de estrés oxidativo altamente sensible (Morales y Munné-Bosch et al., 2019). En este contexto, a pesar de la menor sensibilidad de los biomarcadores de déficit hídrico en comparación al potencial hídrico xilemático y la conductancia estomática a los cambios en la disponibilidad de agua para el cultivo, su utilización parece factible como complemento en condiciones más limitantes de agua que las alcanzadas por el tratamiento T50.

En conjunto, los principales aportes de los objetivos específicos 1 y 3 (en relación a la hipótesis H-1 y H-3.1) ponen en evidencia la limitada posibilidad de extrapolación de coeficientes de cultivo (K_c y K_r) y umbrales de indicadores de estado hídrico entre zonas con características agroclimáticas sustancialmente diferentes. Un segundo aporte de relevancia es la puesta de manifiesto de la adaptabilidad del nogal a distintas dosis de riego, ya que aún con diferencias del 75 % de la ET_c entre los tratamientos extremos (T50 vs. T125) el rendimiento y la composición del rendimiento se mantuvieron en rangos similares.

H-2 (OE 2, C5): La relación óptima entre la producción y crecimiento vegetativo del nogal, obtenida a partir de la aplicación de dosis de riego deficitarias, estará relacionada con producciones de alta calidad, como son requeridas por los mercados nacionales e internacionales.

La calidad de la producción en términos de calibre ecuatorial máximo (de la nuez y de la semilla), y color de la misma semilla no difirió bajo los distintos niveles de riego aplicados durante las dos temporadas (Tabla 4.1). En todos los tratamientos el calibre de la nuez superó los 32 mm, con un calibre de pulpa superior a 23 mm. En cuanto al color se identificó un porcentaje de nueces extra-claras superior al 92 % en la primera temporada y superior al 75 % en la segunda temporada. El perfil de ácidos grasos no presentó diferencias en la composición ácida del aceite entre tratamientos de riego dentro de cada temporada, con valores compatibles con los reportados para la especie y variedad (Martínez et al., 2010). En este contexto, de forma similar a la validación de la hipótesis H-1 se apoya la hipótesis H-2, dado que las dosis de riego deficitario (T50 y T75) que permitieron mantener una equilibrada relación producción/crecimiento vegetativo junto a un aumento sustancial de la eficiencia del uso del agua, también alcanzaron calidades de producción similares a las del tratamiento regado al 100 % de la ET_c .

Sin embargo, al contrastar entre temporadas las variables de calidad, si se aprecian diferencias significativas. En este punto cobra relevancia el efecto del ambiente y por ello se optó por segmentar la temporada en dos periodos (Fig. 4.1): i) desde la floración hasta el endurecimiento del endocarpio (F-EE) y ii) desde el endurecimiento del endocarpio hasta la madurez (EE-M). Durante en el periodo F-EE las temperaturas medias y ET_0 fueron similares entre temporadas, donde la temporada 1 acumuló

más del doble de volumen precipitado que la temporada 2 (157 vs 71 mm, respectivamente). En tanto que durante el periodo EE-M la temperatura media de la temporada 1 fue 2 °C (17 °C) inferior a la registrada en la temporada 2 (19 °C) y las precipitaciones acumuladas fueron prácticamente iguales (temporada 1: 305mm y temporada 2: 255 mm). La similitud en las condiciones del periodo F-EE permitieron que las producciones de ambas temporadas alcancen calibres similares y se clasifiquen dentro de la misma categoría de exportación, a pesar de que si existieron diferencias estadísticamente significativas entre las medias alcanzadas (32,2 mm en 2018-2019 vs. 32,9 mm 2019-2020). Sin embargo, las variables calibre de semilla, cantidad de semillas extra claras y concentración de aceite se definen durante el periodo EE-M y fueron afectadas de forma severa por la temperatura media del ambiente. En este sentido, la estación más fresca (temporada 1) se asoció con un mayor porcentaje de semillas extra claras, mientras que la temporada más cálida (temporada 2) produjo semillas de mayor tamaño con mayor concentración de aceite. En relación al perfil de ácidos grasos la temporada más cálida (2019-2020) produjo el aceite de mayor calidad desde un punto de vista nutricional, dado que acumuló más ácido linolénico y con ello mejoró la relación $\omega 6 \omega 3^{-1}$.

Los aportes a la ciencia del objetivo específico 2 se puede dividir y jerarquizar en tres partes. En primer lugar, se apoya la H-2, dado que no se encontraron diferencias en la calidad de producción de los nogales tratados con dosis de riego deficitarias o excedentarias, lo que pone de manifiesto junto a los resultados de los objetivos específicos 1 y 3 la potencialidad de aplicación de estrategias de riego deficitario en zonas con ofertas de agua limitadas sin necesariamente perder cantidad o calidad de producción. En segundo lugar, se puso en relevancia que en el periodo posterior al endurecimiento del endocarpio la temperatura tiene un efecto significativo sobre i) el tamaño final y color de la semilla (resultados reportados anteriormente por otros autores) y sobre ii) la acumulación síntesis y la composición del aceite (no se encontraron reportes que aborden esta temática). Por último, en tercer lugar, se evidenció que existe una asociación entre semillas de colores menos apreciados por el mercado (semillas más oscuras) con aceites con composiciones más interesantes desde un punto de vista nutracéutico, lo que podría contribuir a revalorizar producciones menos apreciadas actualmente por el mercado.

H-3.2 (OE 3, C6): El perfil de metabolitos polares de la semilla de nogal se ve afectado por el déficit hídrico al que fue sometido la planta durante la temporada.

El perfil de metabolitos polares de la semilla condujo, cuando fue comparado por un modelo lineal, a resultados similares entre tratamientos de riego, con lo que se evidencia que las vías metabólicas de la semilla no se alteran de forma significativa aun cuando la dosis de riego se redujo un 50 %. Por lo que la hipótesis H-3.2 se rechaza. Sin embargo, se apreció en el tratamiento de riego más deficitario (T50) una tendencia a la concentración de metabolitos asociados a procesos de ajuste osmótico. Por lo que se puede hipotetizar que estos procesos de ajuste podrían actuar como un mecanismo protector de la lipogénesis en condiciones de déficit hídrico y altas temperaturas. Apoyando esta última hipótesis se

han reportado evidencias sobre la sensibilidad de la lipogénesis en la semilla de olivo a los incrementos de la temperatura media del aire (García-Inza et al., 2016). En este contexto, si se considera a la temperatura del fruto como una función de la transpiración, teniendo en cuenta que en nogal los estomas del fruto no pierden funcionalidad durante gran parte del ciclo del cultivo, parece interesante evaluar la potencial translocación de osmolitos entre el exocarpio y la semilla como así también las respuestas a los incrementos manipulativos de temperatura en el fruto durante el periodo de síntesis de aceite.

Limitaciones del experimento

La principal limitación del dispositivo experimental fue el rango de dosis de riego propuestas, si bien el tratamiento T50 inicialmente y basado en bibliografía, pareció apropiado para alcanzar condiciones de déficit hídrico alto esto no sucedió. Explorar las respuestas en un tratamiento que repusiera dosis de riego inferiores hubiese aportado datos de relevancia en relación a los umbrales de indicadores de estado hídrico físicos y bioquímicos para la gestión del riego, el control del crecimiento vegetativo e identificación de potenciales cambios en las rutas biosintéticas activas en la semilla. En el mismo sentido, la elección del sitio experimental pudo haber interferido con las respuestas del cultivo al déficit hídrico, por una combinación de suelos profundos con clases texturales entre franco y franco-arcilloso, ricos en materia orgánica, y una cobertura vegetal limitada en comparación a las alcanzadas en huertos maduros.

Por último, la mayor limitación para el normal desarrollo del proyecto de tesis doctoral y del experimento en sí mismo fue la imposibilidad de evaluar durante una tercera temporada (periodo 2020-2021) las respuestas del cultivo a las dosis de riego, debido a las limitaciones a la libre circulación y acceso al lugar de trabajo en el marco de la pandemia de COVID-19.

Capítulo VIII:

Conclusiones generales

- I. La aplicación de dosis de riego deficitario sostenidas al 50 y 75 % de la ETc durante dos temporadas consecutivas permitieron aumentar la productividad del agua en comparación a un testigo regado al 100 % de la ETc en un nocal de la variedad Chandler cultivado en seto en una región semiárida del centro-oeste de Argentina.
- II. El potencial hídrico fue un indicador de estado hídrico más sensible al déficit hídrico que la conductancia estomática o que los biomarcadores prolina, malondialdehído, azúcares solubles, fenoles totales, y flavonoides totales.
- III. La calidad de la producción en términos morfológicos de la nuez y semilla, y la composición del aceite, fueron más sensibles a las condiciones ambientales entre-temporada que a los regímenes de riego estudiados intra-temporada.
- IV. La temperatura media del aire, la pluviometría y la distribución de las precipitaciones en el periodo post-endurecimiento del endocarpio juegan un papel fundamental sobre la cantidad y composición del aceite acumulado. En este sentido, la temporada más cálida y seca alcanzó una mayor concentración y calidad de aceite.
- V. El color del tegumento de la semilla menos apreciado por el mercado (más oscuro) estuvo positivamente correlacionado con altas temperaturas durante el periodo de llenado del fruto. Sin embargo, la calidad nutricional de las semillas más oscuras presentó correlaciones positivas con las variables calibre de nuez, concentración de aceite y concentración de ácido linolénico.
- VI. Las hojas de nogal presentaron importantes cambios en las concentraciones de biomarcadores de déficit hídrico evaluados a lo largo de la temporada, por lo que la posibilidad de utilizarlos no se descarta en rangos de potencial hídrico xilemático inferior a -1 MPa.
- VII. Se identificó una tendencia a la concentración de metabolitos asociados a procesos de ajuste osmótico en las semillas de nogales sometidos a riego deficitario (al 50 % de la ETc).
- VIII. Se requieren más estudios que evalúen las respuestas del nogal a la severidad y duración de las condiciones limitantes de agua, a fin de identificar periodos de resistencia a la sequía y con ello definir estrategias de riego deficitario controlado.

Capítulo IX:

Referencias bibliográficas

- Adu MO, Yawson DO, Armah FA, Asare PA, Frimpong KA (2018) Meta-analysis of crop yields of full, deficit and partial root-zone drying irrigation. *Agric Water Manag* 197:79–90. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2017.11.019>
- Akbari GA, Heshmati S, Soltani E, Amini Dehaghi M (2020) Influence of seed priming on seed yield, oil content and fatty acid composition of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) grown under water deficit. *Int. J Plant Prod* 14:245–258. <https://doi.org/10.1007/s42106-019-00081-5>
- Améglio T, Bodet C, Lacoite A, Cochard H (2002) Winter embolism, mechanisms of xylem hydraulic conductivity recovery and springtime growth patterns in walnut and peach trees. *Tree Physiol* 22(17):1211–20. <https://doi.org/10.1093/treephys/22.17.1211>
- Allen RG, Pereira LS, Raes D, Smith M (1998) Crop evapotranspiration - Guidelines for computing crop water requirements - FAO Irrigation and Drainage Paper No. 56, 1–15. <http://www.fao.org/3/x0490e/x0490e00.htm>
- Álvarez, S, Martín, H, Barajas, E, Rubio, JA, Vivaldi, GA (2020) Rootstock effects on water relations of young almond trees (cv. Soleta) when subjected to water stress and rehydration. *Water* 12: 3319. <https://doi.org/10.3390/w12123319>
- Archer P, Cohen M, Améglio T, Valancogne C, Antón A (2001) Trunk diameter variations in relation to walnut water potential. *Acta Hort* 562:47–53. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2001.562.4>
- Ashrafi M, Azimi-Moqadam MR, Mohseni Fard E, Shekari F, Jafary H, Moradi P, Pucci M, Abate G, Mastinu A (2022) Physiological and molecular aspects of two *Thymus* species differently sensitive to drought stress. *BioTech* 11:8. <https://doi.org/10.3390/biotech11020008>
- Bellvert J, Adeline K, Baram S, Pierce L, Sanden BL, Smart DR (2018) Monitoring crop evapotranspiration and crop coefficients over an almond and pistachio orchard throughout remote sensing. *Remote Sens* 10:2001. <https://doi.org/10.3390/rs10122001>
- Bernard A, Lheureux F, Dirlewange E (2018) Walnut: past and future of genetic improvement. *Tree Genet. Genomes* 14(1):1–28. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11295-017-1214-0>
- Buchner RP, Fulton AE, Gilles CK, Lampinen BD, Shackel KA, Metcalf SG, Little CC, Prichard TL, Schwankl LJ (2008) Effects of regulated deficit irrigation on walnut grafted on 'Northern California Black' or 'Paradox' rootstock. *Acta Hort* 795:141–146. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.792.14>
- Bundy JG, Davey MP, Viant MR (2009) Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives. *Metabolomics* 5:3–21. <https://doi.org/10.1007/s11306-008-0152-0>
- Calvo FE, Silvente ST, Trentacoste ER (2022a) A mini review of the impacts of deficit irrigation strategies for walnut (*Juglans regia* L.) production in semiarid conditions. *Irr Sci* 41:501–509. <https://doi.org/10.1007/s00271-022-00815-w>
- Calvo FE, Trentacoste ER, Silvente ST (2022b) Vegetative growth, yield, and crop water productivity response to different irrigation regimes in high density walnut orchards (*Juglans regia* L.) in a semi-arid environment in Argentina. *Agric Water Manag* 274:107969. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2022.107969>
- Carbonell-Barrachina ÁA, Memmi H, Noguera-Artiaga L, Gijón-López MDC, Ciapa R, Pérez-López D (2015) Quality attributes of pistachio nuts as affected by rootstock and deficit irrigation. *J Sci Food Agric* 95(14):2866–2873. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7027>
- Carrera CS, Dardanelli JL (2017) Water deficit modulates the relationship between temperature and unsaturated fatty acid profile in soybean seed oil. *Crop Sci* 57(6):3179. <https://doi.org/10.2135/cropsci2017.04.0214>

- Carillo P, Mastrodonato G, Nacca F, Parisi D, Verlotto A, Fuggi A (2008) Nitrogen metabolism in durum wheat under salinity: accumulation of proline and glycine betaine. *Func Plant Biol* 35:412–426. <https://doi.org/10.1071/FP08108>
- Chalmers DJ, Mitchell PD, van Heek L (1981) Control of peach tree growth and productivity by regulated water supply, tree density and summer pruning. *J Am Soc Hortic Sci* 106:307–12. ISSN: 0003-1062
- Charrier G, Bonhomme M, Lacoite A, Améglio T (2011) Are budburst dates, dormancy and cold acclimation in walnut trees (*Juglans regia* L.) under mainly genotypic or environmental control?. *Int J Biometeorol* 55:763–774. <https://doi.org/10.1007/s00484-011-0470-1>
- Christopoulos MV, Tsantili E (2011) Effects of temperature and packaging atmosphere on total antioxidants and colour of walnut (*Juglans regia* L.) kernels during storage. *Sci Hortic* 131:49–57. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.09.026>
- Cittadini MC, Martín D, Gallo S, Fuente G, Bodoira R, Martínez M, Maestri D (2020) Evaluation of hazelnut and walnut oil chemical traits from conventional cultivars and native genetic resources in a non-traditional crop environment from Argentina. *Eur Food Res Technol* 246:833–843. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03453-8>
- Cochard H, Vanisse JS, Barigah TS, Brunel N, Herbette S, Guilliot A, Tyree MT, Sakr S (2007) Putative role of aquaporins in variable hydraulic conductance of leaves in response to light. *Plant Physiol* 143:122–133. <https://doi.org/10.1104/pp.106.090092>
- Cohen M, Valancogne C, Dayau S, Améglio T, Cruziat P, Archer P (1997) Yield and physiological responses of walnut trees in semi-arid conditions: applications to irrigation scheduling. *Acta Hortic* 449:273–280. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1997.449.39>
- Corell M, Pérez-López D, Martín-Palomo MJ, Centeno A, Gíron I, Galindo A, Moreno MM, Moreno C, Memmi H, Torrecillas A, Moreno F, Moriana A (2016) Comparison of the water potential baseline in different locations. Usefulness for irrigation scheduling of olive orchards. *Agric Water Manag* 177:308–316. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2016.08.017>
- Costa JM, Ortuño MF, Chaves MM (2007) Deficit Irrigation as a Strategy to Save Water: Physiology and Potential Application to Horticulture. *J. Integr. Plant Biol* 49(10):1421–1434. <https://doi.org/10.1111/j.1672-9072.2007.00556.x>
- Dag A, Naor A, Ben-Gal A, Harvey G, Zipori I, Schneider D, Birger R, Peres M, Gal Y, Kerem Z (2015) The effect of water stress on super-high-density ‘Koroneiki’ olive oil quality. *J Sci Food and Agric* 95(10):2016–2020. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6913>
- Dhillon R, Rojo F, Upadhyaya SK, Roach J, Coates R, Delwiche M (2019) Prediction of plant water status in almond and walnut trees using a continuous leaf monitoring system. *Precis Agric* 20:723–745. <https://doi.org/10.1007/s11119-018-9607-0>
- Doorenbos J, Pruitt WO (1992) Crop water requirements. Food and Agriculture Organization of the United Nations Guidelines for predicting water requirements. FAO Irrigation and Drainage Paper No. 24. FAO, Rome. ISBN 92-5-104219-5
- Drechsler K, Fulton A, Kisekka I (2022) Crop coefficients and water use of young almond orchards. *Irrigation Science* 40:379–395. <https://doi.org/10.1007/s00271-022-00786-y>
- Drew DM, Downes GM (2009) The use of precision dendrometers in research on daily stem size and wood property variation: a review. *Dendrochronologia* 27:159–172. <https://doi.org/10.1016/j.dendro.2009.06.008>
- FAOSTAT. Statistical database. [Rome]: FAO, c1997. (2023) Retrieved from <https://www.fao.org/faostat>

- Fereres E, Martinich D, Aldrich T, Castel J, Holzzapfel E, Schulbach H (1982) Drip irrigation saves money in young almond orchards. *Calif Agric* 36(9):12–13
- Ferreira ER, Sellés Van SG, Sellés MI (2001) Boletín INIA N°58: Riego deficitario controlado en nogales. Estrategias de riego para enfrentar situaciones de escasez de agua en frutales. Santiago, Chile: Instituto de Investigaciones Agropecuarias. <https://biblioteca.inia.cl/handle/123456789/7563>
- Fernandes C, Albuquerque P, Mariz-Ponte N, Cruz L, Tavares F (2020) Comprehensive diversity assessment of walnut-associated xanthomonads reveal the occurrence of distinct *Xanthomonas arboricola* lineages and of a new species (*Xanthomonas euroxanthea*) within the same tree. *Plant Pathology* 70:943–958. <https://doi.org/10.1111/ppa.13355>
- Fields RP, Donis-Gonzalez IR, Lampinen B, Crisosto CH (2020) Late maturity and excess irrigation trigger kernel darkening in ‘Howard’ english walnut (*Juglans regia* L.) at harvest, but not in ‘Chandler’. *J Am Pomol Soc* 74:135–145. http://www.pubhort.org/aps/74/v74_n3_a2.htm
- Fulton A, Buchner R, Olson B, Schwankl L, Gilles C, Bertagna N, Walton J, Shackel K (2001a) Rapid equilibration of leaf and stem water potential under field conditions in almonds, walnuts, and prunes. *Hortechology* 11:609–615. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.11.4.609>
- Fulton A, Buchner R, Little D, Gilles C (2001b) Shoot growth response of third leaf Howard walnuts to midday stem water potential. *Walnut Research Reports* 2001:151–155. http://walnutresearch.ucdavis.edu/2001/2001_151.pdf
- Fulton A, Grant J, Buchner R, Connel J (2014) Using the pressure chamber for irrigation management in walnut, almond, and prune. ANR Publication 8503. <https://doi.org/10.3733/ucanr.8503>
- Fulton AE, Little CC, Snyder RL, Lampinen BD, Buchner RP (2017) Evaluation of crop coefficients and evapotranspiration in English walnut. ASABE Annual International Meeting. <https://doi.org/1701457>, 10.13031/aim.201701457
- Fulton A, Buchner R (2015) Drought strategies for California walnut production. ANR Publication 8533. <https://doi.org/10.3733/ucanr.8533>
- Fulton A, Grant J, Buchner R, Connell J (2014) Using the Pressure Chamber for Irrigation Management in Walnut, Almond, and Prune. ANR Publication:8503. <https://doi.org/10.3733/ucanr.8503>
- García J, Romero P, Botía P, García F (2004) Cost-benefit analysis of almond orchard under regulated deficit irrigation (RDI) in SE Spain. *SJAR* 2:157–165. <http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2004022-70>
- García-Inza GP, Castro DN, Hall AJ, Rousseaux MC (2016) Opposite oleic acid responses to temperature in oils from the seed and mesocarp of the olive fruit. *Eur J Agron* 76:138–147. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2016.03.003>
- García-Tejero IF, Hernández A, Rodríguez VM, Ponce JR, Ramos V, Muriel JL, Durán-Zuazo VH (2015) Estimating almond crop coefficients and physiological response to water stress in semiarid environments (SW Spain). *J Agric Sci Tech* 17:1255–1266. <http://jast.modares.ac.ir/article-23-5237-en.html>
- García-Tejero IF, Lipan L, Gutiérrez-Gordillo S, Durán Zuazo VH, Jančo I, Hernández F, Cárceles Rodríguez B, Carbonell-Barrachina AA (2020) Irrigation and its implications for HydroSOSustainable almond production. *Agronomy* 10:1632. <https://doi.org/10.3390/agronomy10111632>
- Gates DM (1964). Leaf Temperature and Transpiration. *Agronomy Journal* 56(3):273 [doi:10.2134/agronj1964.0002196200560003000](https://doi.org/10.2134/agronj1964.0002196200560003000)
- Gauthier MM, Jacobs DF (2011) Walnut (*Juglans* spp.) ecophysiology in response to environmental stresses and potential acclimation to climate change. *Ann For Sci* 68:1277–1290. <https://doi.org/10.1007/s13595-011-0135-6>

- Gharaghani A, Javarzari A M, Vahdati K (2018) Kaolin particle film alleviates adverse effects of light and heat stresses and improves nut and kernel quality in Persian walnut. *Sci Hortic* 239:35–40. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.05.024>
- Gispert JR, Tous J, Romero A, Plana J, Gil J, Company J (2005) The influence of different irrigation strategies and the percentage of wet soil volume on the productive and vegetative behaviour of the hazelnut tree (*Corylus avellana* L.). *Acta Hortic* 686:333–342. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.686.47>
- Goldhamer DA (1998) Irrigation scheduling for walnut orchards. In Ramos D (Ed.). *Walnut production manual* (1st ed.) Oakland, California: University of California Division of Agriculture and Natural Resources
- Goldhamer DA (2005) Tree water requirements and regulated deficit irrigation. En Ferguson L (Ed.) *Pistachio production manual* (4th ed.). Oakland, California: University of California Fruit and Nut Research and Information Center
- Goldhamer DA, Beede R, Sibbett S, DeJong TM, Ramos D, Phene RC, Doyle J (1988) Third year effects of deficit irrigation on walnut tree performance. *Walnut Research Reports* 1988:42–52
- Goldhamer DA, Phene RC, Bedee R, DeJong TM, Ramos D (1985) Water use requirements of high and conventional density walnut orchards. *Walnut Research Reports* 1985:26–29.
- He M, Ding N-Z (2020) Plant unsaturated fatty acids: multiple roles in stress response. *Front Plant Sci* 11:562785. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.562785>
- Iannamico L (2009) El nogal. En: Iannamico L (Ed.) *El cultivo del nogal en climas templado-fríos* (1era ed.). Buenos Aires: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
- Ibrahim HA, Abdellatif YMR (2016) Effect of maltose and trehalose on growth, yield and some biochemical components of wheat plant under water stress. *Ann Agric Sci* 61(2):267–274. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2016.05.002>
- International Oil Council (2017) Determination of free fatty acids, cold method. <https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2019/11/COI-T.20-Doc.-No-34-Rev.-1-2017.pdf>
- Holdes RL, DeLong JD, Forney CF, Pranger RK (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207:604–611
- Howell TA (2001) Enhancing water use efficiency in irrigated agriculture. *Agron J* 93:281–289. <https://doi.org/10.2134/agronj2001.932281x>
- Hsiao TC (1973) Plant responses to water stress. *Annu Rev Plant Physiol* 24:519–570. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.24.060173.002511>
- Iglesias I, Echeverria G (2022) Current situation, trends, and challenges for efficient and sustainable peach production. *Sci Hortic* 296:110899. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.110899>
- INDEC (Instituto Nacional de Estadística y Censos) (2020) Censo Nacional Agropecuario 2018. Resultados preliminares. Agricultura. Ministerio de Economía de la Nación, Buenos Aires, Argentina. <https://I2018.indec.gob.ar/>
- Irigoyen JJ, Emerich DW, Sánchez-Díaz M (1992) Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia Plantarum* 84:55–60. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb08764.x>
- Jackson RD, Idso SB, Reginato RJ, Pinter PJ (1981) Temperature as a crop water stress indicator. *Water Resour Res* 17:1133–1138. <https://doi.org/10.1029/WR017i004p01133>

- Jensen PN, Sørensen G, Engelsen SB, Bertelsen G (2001) Evaluation of quality changes in walnut kernels (*Juglans regia* L.) by Vis / NIR Spectroscopy. *J Agric Food Chem* 49:5790–5796. <https://doi.org/10.1021/jf010509t>
- Jin F, Zhou Y, Zhang P, Huang R, Fan W, Li B, Li G, Song X, Pei D (2023) Identification of Key Lipogenesis Stages and Proteins Involved in Walnut Kernel Development. *J Agric Food Chem* 71:4306–4318. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c08680>
- Jones HG (2004) Irrigation scheduling: advantages and pitfalls of plant-based methods. *J Exp Bot* 55:2427–2436. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh213>
- Jones HG, Serraj R, Loveys BR, Xiong L, Wheaton A, Price AH (2009) Thermal infrared imaging of crop canopies for remote diagnosis and quantification of plant responses to water stress in the field. *Funct Plant Biol* 36:978–989. <https://doi.org/10.1071/FP09123>
- Jovanovic Z, Stikic R (2018) Partial root-zone drying technique: from water saving to the improvement of a fruit quality. *Front Sustain Food Syst* 1:3. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2017.00003>
- Kalagiouri NP, Manousi N, Rosenberg E, Zachariadis GA, Paraskevopoulou A, Samanidou V (2021) Exploring the volatile metabolome of conventional and organic walnut oils by solid-phase microextraction and analysis by GC-MS combined with chemometrics. *Food Chemistry* 363:130331. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130331>
- Kang MN, Suh JH (2022) Metabolomics as a tool to evaluate nut quality and safety. *Trends in Food Science & Technology* 129:528–543. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.11.002>
- Karadeniz F, Burdurlu HS, Koca N, Soyer Y (2005) Antioxidant activity of selected fruits and vegetables grown in Turkey. *Turk J Agric For* 29(4):297–303
- Karimi S, Karami H, Vahdati K, Mokhtassi-Bidgoli A (2020) Antioxidative responses to short-term salinity stress induce drought tolerance in walnut. *Scientia Horticulturae* 267:109322. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109322>
- Kanber R, Önder S, Köksal H (1993) Irrigation response of pistachio (*Pistacia vera* L.). *Irr Sci* 14:7–14. <https://doi.org/10.1007/BF00195000>
- Kishore K, Singh, HS, Kurian RM (2015) Paclobutrazol use in perennial fruit crops and its residual effects: A review. *Indian J Agric Sci* 85:863–872
- Kozłowski TT, Pallardy SG (2002) Acclimation and adaptive responses of woody plants to environmental stresses. *Bot Rev* 68:270–334. <https://doi.org/10.1663/0006-8101>
- Lampinen B, Buchner R, Fulton A, Grant J, Mills N, Prichard T, Gamble V (2004) Irrigation management in walnut using evapotranspiration, soil and plant based data. *Calif Walnut Board* 24:113–136
- Lang MD, Sulcs JA, Evans KJ (2014) Loss of kernel quality associated with harvest delays in Tasmania, Australia. *Acta Hort* 1050:309–314. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1050.42>
- Lee BR, Jin YL, Jung WJ, Avice JC, Morvan-Bertrand A, Ourry A, Park CW, K WH (2008) Water-deficit accumulates sugars by starch degradation –not by de novo synthesis– in white clover leaves (*Trifolium repens*). *Physiol Plant* 134(3):403–411. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01156.x>
- Lemus G (2010) Innovative methods of walnut production in South America. *Acta Hort* 861:191–198. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.861.25>
- Lipan L, Martín-Palomo MJ, Sánchez-Rodríguez L, Cano-Lamadrid M, Sendra E, Hernández F, Burló F, Vázquez-Araújo L, Andreu L, Carbonell-Barrachina AA (2019) Almond fruit quality can be improved by means of deficit irrigation strategies. *Agric Water Manag* 2179:236–242. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2019.02.041>

- Liu B, Lian J, Tang G, Wang X, Liu F, Zhao D (2019) Drought stress affects on growth, water use efficiency, gas exchange and chlorophyll fluorescence of *Juglans* rootstocks. *Sci Hort* 250:230–235. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.02.056>
- Luedeling E, Zhang M, McGranahan G, Leslie C (2009) Validation of winter chill models using historic records of walnut phenology. *Agric For Meteorol* 149:1854–1864. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2009.06.013>
- Loewus FA, Murthy PPN (2000) myo-Inositol metabolism in plants. *Plant Science* 150(1):1–19. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00150-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00150-8)
- Lotfi N, Vahdati K, Kholdebarin B, Amiri R (2009) Soluble sugars and proline accumulation play a role as effective indices for drought tolerance screening in Persian walnut (*Juglans regia* L.) during germination. *Fruits* 65(2):97–112. <https://doi.org/10.1051/fruits/20010005>
- Mahmoudian M, Rahemi M, Karimi S, Yazdani N, Tajdini Z, Sarikhani S, Vahdati K (2021) Role of kaolin on drought tolerance and nut quality of Persian walnut. *J Saudi Soc Agric Sci* 20:409–416. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2021.05.002>
- Martínez ML, Labuckas DO, Lamarque AL, Maestri DM (2010) Walnut (*Juglans regia* L.): genetic resources, chemistry, by-products. *J Sci Food Agric* 90:1959–1967. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4059>
- Martínez ML, Maestri DM (2008) Oil chemical variation in walnut (*Juglans regia* L.) genotypes grown in Argentina. *Eur J Lipid Sci Tech* 110(12):1183–1189. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200800121>
- Martínez ML, Mattea MA, Maestri DM (2006) Varietal and crop year effects on lipid composition of walnut (*Juglans regia*) genotypes. *J Amer Oil Chem Soc* 83:791–796. <https://doi.org/10.1007/s11746-006-5016-z>
- McCutchan H, Shackel KA (1992) Stem-water potential as a sensitive indicator of water stress in prune trees (*Prunus domestica* L. cv. French). *J Am Soc Hortic Sci* 117(4):607–611. <https://doi.org/10.21273/JASHS.117.4.607>
- Meinzer FC (1993) Stomatal control of transpiration. *Tree* 8:289–294. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(93\)90257-P](https://doi.org/10.1016/0169-5347(93)90257-P)
- Mingeau M, Rousseau P (1994). Water use of hazelnut trees as measured with lysimeters. *Acta Hort* 351:315–322. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1994.351.34>
- Miyamoto S, Henggeler J, Benton Storey J (1995) Water management in irrigated pecan orchards in the Southwestern United States. *Hortecchnology* 5:214–218. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.5.3.214>
- Morabito JS, Salatino C, Mirábile Y, Guillén D (2006) Riego por microaspersión de nogal en Chilecito, La Rioja: Necesidades de riego y estrategias de manejo (2da parte). Mendoza: III Jornada de Actualización en Riego y Fertilización (Instituto Nacional del Agua)
- Morales M, Munné-Bosch S (2019) Malondialdehyde: Facts and Artifacts. *Plant Physiol* 180: 1246–1250. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00405>
- Ortega-Farias S, Villalobos-Soublett E, Riveros-Burgos C, Zúñiga M, Ahumada-Orellana LE (2020) Effect of irrigation cut-off strategies on yield, water productivity and gas exchange in a drip-irrigated hazelnut (*Corylus avellana* L. cv. Tonda di Giffoni) orchard under semiarid conditions. *Agric Water Manag* 238:106173. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2020.106173>
- Ortiz CM, Vicente AR, Fields RP, Grilo F, Labavitch JM, Donis-González I, Crisosto CH (2019) Walnut (*Juglans regia* L.) kernel postharvest deterioration as affected by pellicle integrity, cultivar and oxygen concentration. *Postharvest Biol Technol* 156:1–8. <http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.110948>

- Özcan, M.M., Lemiasheuski, V. (2020) The effect of harvest times on mineral contents of almond and walnut kernels. *Erwerbs-obstbau* 62, 455–458. <https://doi.org/10.1007/s10341-020-00523-9>.
- Parkrah S, Rahemi M, Nabipour A, Zahedzadeh F, Kakavand F, Vahdati K (2021) Sensory and nutritional attributes of Persian walnut kernel influenced by maturity stage, drying method, and cultivar. *J Food Process and Preserv* 45(6):15513. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15513>
- Parkash V, Singh S (2020) A review on potential plant-based water stress indicators for vegetable crops. *Sustainability* 12(10):3945. <https://doi.org/10.3390/su12103945>
- Pereira AR, Green S, Nova NAV (2006) Penman–Monteith reference evapotranspiration adapted to estimate irrigated tree transpiration. *Agric. Water Manag* 83:153–161. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2005.11.004>
- Pereira LS, Allen RG, Smith M, Dirk R (2015) Crop evapotranspiration estimation with FAO56: Past and future. *Agric. Water Manag* 147:4–20. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2014.07.031>
- Pérez-López D, Memmi H, Gijón-López MC, Moreno MM, Couceiro JF, Centeno A, Martín-Palomo MJ, Corell M, Noguera-Artiaga L, Galindo Egea A, Torrecillas A, Moriana A (2018) Irrigation of pistachios: Strategies to confront water scarcity. In Ivan García-Tejero IF y Duran Zuazo VH (Eds.). *Water Scarcity and Sustainable Agriculture in Semiarid Environment* (1st ed.) Cambridge, Massachusetts: Academic Press
- Phillips GO, Moody GJ (1960) Radiation chemistry of carbohydrates. Part V. The effect of ultraviolet light on aqueous solutions of D-glucose in oxygen. *J Chem Soc* 1960:3398–3404. <https://doi.org/10.1039/JR9600003398>
- Pollegioni P, Woeste K, Chiocchini F, Del Lungo S, Ciolfi M, Olimpieri I, Tortolano V, Clark J, Hemery GE, Mapelli S, Malvolti ME (2017) Rethinking the history of common walnut (*Juglans regia* L.) in Europe: Its origins and human interactions. *PLoS ONE* 12:1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172541>
- Prasad RBN, Gülz PG (1990) Surface waxes from leaves and fruits of walnut. *Phytochemistry* 29(7):2097–2099. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)83012-P](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)83012-P).
- Puertas CM (2009). Efecto del riego deficitario controlado sobre el rendimiento y calidad de aceite en Olivo (*Olea europaea* L.) cv. Arbequina. Thesis MSc. Universidad Nacional de Cuyo
- Rao G, Sui J, Zhang J (2016). Metabolomics reveals significant variations in metabolites and correlations regarding the maturation of walnuts (*Juglans regia* L.). *Biology Open* 5:829–836. <https://doi.org/10.1242/bio.017863>
- Ramos D, Brown L, Uriu K, Marangoni B (1978). Water stress affects the size and quality of walnuts. *Calif. Agric.* 32(10):5–8
- Rivera JA, Otta S, Lauro C, Zazulie N (2021) A Decade of hydrological drought in Central-Western Argentina. *Front Water* 3:640544. <https://doi.org/10.3389/frwa.2021.640544>
- Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V, Davletova S, Mittler R (2004) When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol* 134(4):1683–1696. <https://doi.org/10.1104/pp.103.033431>
- Roessner U, Beckles DM (2012) Metabolomics for Salinity Research. En: Shabala S, Cuin T (Eds) *Plant Salt Tolerance. Methods in Molecular Biology*, vol 913. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-986-0_13
- Romero R, Muriel JL, García I (2009) Automatic irrigation system in almonds and walnuts trees based on sap flow measurements. *Acta Hort* 846:135–142. <http://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.846.13>

- Ros E, Singh A, O'Keefe JH (2021) Nuts: Natural Pleiotropic Nutraceuticals. *Nutrients* 13:3269. <https://doi.org/10.3390/nu13093269>
- Rosati A, Metcalf S, Buchner R, Fulton A, Lampinen B (2006) Tree water status and gas exchange in walnut under drought, high temperature and vapour pressure deficit. *J Hortic Sci Biotechnol* 81:415–420. <https://doi.org/10.1080/14620316.2006.11512082>
- Rubí Bianchi A, Cravero SAC (2010) Atlas climático digital de la República Argentina (1st ed.). Buenos Aires: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
- Ruiz-Sánchez MC, Domingo R, Castel JR (2010) Review. Deficit irrigation in fruit trees and vines in Spain. *SJAR* 8:5–20. <http://dx.doi.org/10.5424/sjar/201008S2-1343>
- Sadras VO (2009) Does partial root-zone drying improve irrigation water productivity in the field? A meta-analysis. *Ir Sci* 27:183–190. <http://dx.doi.org/10.1007/s00271-008-0141-0>
- Sakr S, Alves G, Morillon R, Maurel K, Decourteix M, Guillot A, Fleurat-Lessard P, Julien JL, Chrispeels MJ (2003) Plasma membrane aquaporins are involved in winter embolism recovery in walnut trees. *Plant Physiol* 133(2):630-641. <https://doi.org/10.1104/pp.103.027797>
- Samani Z, Bawazir S, Skaggs R, Longworth J, Piñon A, Tran V (2011) A simple irrigation scheduling approach for pecans. *Agric Water Manag* 98:661–664. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2010.11.002>
- Sammis TW, Mexal JG, Miller D (2004) Evapotranspiration of flood-irrigated pecans. *Agric Water Manag* 69(3):179–190. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2004.05.005>
- Sánchez-González C, Ciudad CJ, Noé V, Izquierdo-Pulido M. (2017) Health benefits of walnut polyphenols: An exploration beyond their lipid profile. *Crit Rev Food Sci Nutr* 57 (16):3373–3383. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1126218>
- Scholander PF, Hammel HT, Bradstreet ED, Hemmingsen EA (1965) Sap pressure in vascular plants negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science* 148:339–346. <https://doi.org/10.1126/science.148.3668.339>
- Searles PS, Alcarás MA, Rousseaux MC (2011) Water use by olive orchards (*Olea europaea* L.) in the Northwest of Argentina: A comparison with the Mediterranean Basin. *Ecol Austral* 21:15–28. http://hdl.handle.net/20.500.12110/ecologiaaustral_v021_n01_p015
- Sibbett GS, Hendricks LC, Carnill G, Olson WH, Jeter R, Ramos DE, Martin GC, Davis CS (1974) Walnut quality and value maximized by harvest management. *Calif Agric* 28(7):15–17. <https://calag.ucanr.edu/Archive/?article=ca.v028n07p15>
- Sibbett GS, Coates W, Edstrom J (1997) Orchard planning, design and planting. En: *Walnut Production Manual*. (Ed. D.E. Ramos). University of California, Division of Agriculture and Natural Resources
- Silvente S, Sobolev AP, Lara M (2012) Metabolite adjustments in drought tolerant and sensitive soybean genotypes in response to water stress. *PLoS One* 7(6):e38554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038554>
- Simkin AJ, Lopez-Calcagno PE, Raines CA (2019) Feeding the world: Improving photosynthetic efficiency for sustainable crop production. *J Exp Bot* 70:1119–1140. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery445>
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *J Enol Vitic* 16:144–158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>
- Simopoulos AP (2004) Omega-6/omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases. *Food Rev Int* 20(1):77–90. <https://doi.org/10.1081/FRI-120028831>
- Simopoulos AP (2016) An increase in the omega-6/omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. *Nutrients* 8(3):128 <https://doi.org/10.3390/nu8030128>

- Solar A, Colarič M, Usenik V, Stampar F (2006) Seasonal variations of selected flavonoids, phenolic acids and quinones in annual shoots of common walnut (*Juglans regia* L.). *Plant Sci* 170(3):453–461. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.09.012>
- Sparks D (2005) Adaptability of pecan as a species. *HortScience* 40:1175–1189. <http://doi.org/10.21273/HORTSCI.40.5.1175>
- Sperry JS, Alder NN, Eastlack SE (1993) The effect of reduced hydraulic conductance on stomatal conductance and xylem cavitation. *J Exp Bot* 44:1075–1082. <https://doi.org/10.1093/jxb/44.6.1075>
- Steduto P, Hsiao TC, Fereres E, Raes D (2012) Crop yield response to water. *FAO Irrigation and Drainage Paper No. 66*. FAO, Rome
- Thiex NJ, Anderson S, Gildemeister B, (2003) Crude fat, diethyl ether extraction, in feed, cereal grain, and forage (Randall/Soxtec/submersion method): collaborative study. *J AOAC Int* 86:888–898. <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.5.888>
- Trentacoste ER, Calderón FJ, Contreras-Zanessi O, Galarza W, Banco AP, Puertas CM (2019) Effect of regulated deficit irrigation during the vegetative growth period on shoot elongation and oil yield components in olive hedgerows (cv. Arbosana) pruned annually on alternate sides in San Juan, Argentina. *Irr Sci* 37:533–546. <https://doi.org/10.1007/s00271-019-00632-8>
- Tommasino E, Griffa S, Grunberg K, Ribotta A, López Colomba E, Carloni E, Quiroga M, Luna CM (2012) Malondialdehyde content as a potential biochemical indicator of tolerant *Cenchrus ciliaris* L. Genotypes under heat stress treatment. *Grass and Forage Science* 67:456–459. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.2012.00851.x>
- Ünal N y Okatan V (2023) Effects of drought stress treatment on phytochemical contents of strawberry varieties, *Sci Horti* 316:112013. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112013>
- Vahdati K (2014) Traditions and folks for walnut growing around the silk road. *Acta Horti* 1032:19–24. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1032.1>
- Wang SW, Zhang CF, Pan CD, Zhao SC (2022) Analysis of walnut fruit quality based on source-sink relationships. *Hort Sci* 49:102–108. <https://doi.org/10.17221/93/2021-HORTSCI>
- Wang B, Zhang J, Pei Dong, Yu L. (2020) Combined effects of water stress and salinity on growth, physiological, and biochemical traits in two walnut genotypes. *Physiol Plant* 177 (2):176–187. <https://doi.org/10.1111/ppl.13316>
- Wei F, Chen Q, Du Y, Han C, Fu M, Jiang H, Chen X (2020) Effects of hulling methods on the odor, taste, nutritional compounds, and antioxidant activity of walnut fruit. *LWT - Food Sci Technol* 120:108938. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108938>
- Wichtl M, Anton R (1999). *Plantes thérapeutiques*. Tec& Doc 1999:291–293
- Wu GL, Liu QL, Teixeira da Silva JA (2009) Ultrastructure of pericarp and seed capsule cells in the developing walnut (*Juglans regia* L.) fruit. *S Afr J Bot* 75(1):128–136. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2008.09.001>
- Yahmed JB, Ghrab M, Mimoun MB (2016) Eco-physiological evaluation of different scion-rootstock combinations of almond grown in Mediterranean conditions. *Fruits* 71:185–193. <http://dx.doi.org/10.1051/fruits/2016003>
- Yang B, Fu P, Lu J, Ma F, Sun X, Fang Y (2022) Regulated deficit irrigation: an effective way to solve the shortage of agricultural water for horticulture. *Stress Biology* 2:28. <https://doi.org/10.1007/s44154-022-00050-5>
- Zhang CF, Pan CD, Chen H. (2019). The long-term response of photosynthesis in walnut (*Juglans regia* L.) leaf to a leaf-to-fruit ratio. *Photosynthetica* 57:762–771. <https://doi.org/10.32615/ps.2019.079>

Zhang J, Wang X, Yu O, Tang J, Gu X, Wan X, Fang C (2011) Metabolic profiling of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) during fruit development and maturation. *J Exp Bot* 62(3):1103–1118. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq343>

Zhao SY, Zeng WH, LI Z, Peng Y (2020) Mannose regulates water balance, leaf senescence, and genes related to stress tolerance in white clover under osmotic stress. *Biol Plant* 64:406–416. <https://doi.org/10.32615/bp.2020.017>

Zec M, Glibetic M (2018) Health benefits of nut consumption. Reference Module in Food Science 2018. <http://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22511-0>

Zec M, Krga I, Takić M, Debeljak-Martačić J, Korićanac G, Ranković S, Popović T, Pantelić M, Glibetic M (2020) Walnut consumption induces tissue-specific omega-6/omega-3 decrease in high-fructose-fed Wistar rats. *ACS omega* 5(43):28136–28145. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03784>

Zibaenezhad MJ, Farhadi P, Attar AR, Amirmoezi AM, Azimi A (2017) Effects of walnut oil on lipid profiles in hyperlipidemic type 2 diabetic patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutr Diabetes* 7(4):e259. <https://doi.org/10.1038/nutd.2017.8>