

*Tesis para optar por el grado de
Doctor de la Facultad de Ciencias Agrarias y
Forestales de la Universidad Nacional de La Plata*

**Significado funcional de la madera en el
género *Eucalyptus*: relaciones entre
microestructura y mecanismos de
resistencia a estrés por sequía y heladas**

Antonio José Barotto
Ingeniero Forestal

Directora: Dra. Maria Elena Fernández
Co-Directora: Dra. Silvia Estela Monteoliva



Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales
Universidad Nacional de La Plata



La Plata, Abril de 2021

Resumen

La capacidad de transporte de agua dentro de los árboles, a través del xilema, se relaciona funcionalmente con su capacidad de fijación de carbono y, por lo tanto, con su crecimiento y supervivencia. Este proceso se ve afectado, de manera más o menos reversible, por el fenómeno de cavitación, consistente en la ruptura de la columna de agua, debida fundamentalmente a dos procesos: el aumento de la tensión en el xilema durante procesos de sequía y los ciclos de congelamiento y descongelamiento del agua durante las heladas. La estructura anatómica de la madera juega un rol clave en la estrategia hidráulica de las plantas, con implicancias directas en el proceso de cavitación y, por lo tanto, en su fisiología y ecología, por lo que su estudio permite evaluar cómo varía el transporte de agua dentro del xilema en función del estrés abiótico. El estudio de las relaciones entre estructura y función hidráulica de la madera, a nivel inter- e intraespecífico, adquiere especial relevancia frente a un escenario de cambio climático, en el cual se prevé el aumento de sequías y extremos térmicos.

El objetivo general de esta tesis fue conocer el valor funcional de la microestructura de la madera de *Eucalyptus* spp. en relación con ciertas variables descritas por la bibliografía referente al tema como claves para explicar la resistencia a sequía y heladas en especies leñosas. Este género, de gran importancia comercial a nivel mundial, se caracteriza por poseer una compleja anatomía de la madera, poco conocida en términos funcionales. En particular, uno de los objetivos que se plantearon fue analizar y comparar la estructura anatómica de cuatro especies de *Eucalyptus*, caracterizadas por poseer un amplio rango de variación en densidad de madera y requerimientos de hábitat. Se hipotetizó que existe una relación en la resistencia general al estrés abiótico que puede ser explicada por las características diferenciales de su madera (estudiada a nivel de ramas y fustes), las cuales determinan, en última instancia, los requerimientos ambientales de las diferentes especies. Otro objetivo particular se centró en relacionar la estructura anatómica de la madera con parámetros funcionales como conductividad hidráulica específica máxima, capacitancia y vulnerabilidad a la cavitación por frío y por sequía. Se hipotetizó que las tasas máximas de conductividad hidráulica se relacionan positivamente con el tamaño de los elementos conductivos, mientras que la seguridad hidráulica se relaciona con las características de los elementos celulares asociados a éstos (traqueidas vasicéntricas, fibrotraqueidas y parénquima). Los resultados hallados permitieron validar parcialmente estas hipótesis ya que, por un lado, la relación directa entre la resistencia a la cavitación por sequía medida en laboratorio y el desempeño a campo indicaría que este último está influenciado principalmente por las características anatómicas de la madera. Por otro lado, la relación inversa entre resistencia a la cavitación por congelamiento/descongelamiento y la resistencia a las heladas indicaría que estos procesos se encuentran determinados por las características de otros órganos. Si bien la influencia significativa del tamaño de los vasos en el nivel de conductividad fue confirmada en los diferentes capítulos de esta tesis (vasos más grandes y mayor amplitud en la distribución de tamaños, presentan mayor eficiencia conductiva), el rol de las células acompañantes de los vasos

en la seguridad del sistema fue parcialmente verificado. Así, en el caso de la cavitación por sequía, se encontró evidencia del rol de estos elementos en la protección del sistema de conducción, por un lado, aumentando la conectividad hidráulica entre vasos solitarios y, al mismo tiempo, limitando la propagación de aire (y, por ende, de embolismos) entre elementos conductivos cercanos. Por el contrario, en la cavitación por frío, los resultados indican que este proceso está directamente relacionado con el tamaño de los elementos conductivos, sin efectos significativos por parte de las células acompañantes. Por otro lado, los vasos más grandes no solo presentaron mayor conductividad sino también menor vulnerabilidad a la cavitación por tensión, lo cual sería explicado por la relación inversa entre el tamaño de los elementos conductivos y de sus punteaduras. Las relaciones entre anatomía y función de la madera se estudiaron a nivel interespecífico, pero también a nivel intraespecífico en dos de las especies, *E. viminalis* y *E. globulus*, a través del análisis de progenies con diferencias en densidad media. Varias de las relaciones observadas a nivel interespecífico se verificaron también dentro de las especies, aunque el menor rango de variación de los caracteres de madera en este nivel de organización resultó en cambios en el nivel de significancia y signo de algunas relaciones.

El tercer objetivo particular fue determinar las relaciones existentes entre los espectros de absorción de infrarrojo cercano (NIR) de la madera de *Eucalyptus* y su anatomía y función, de manera de contribuir al desarrollo de metodologías de selección genética en base a caracteres adaptativos de fácil cuantificación. En este sentido, fue posible establecer calibraciones entre espectros NIR y las características anatómicas, físicas e hidráulicas de la madera de *Eucalyptus* y generar modelos de predicción con diferente grado de ajuste. Entre estos últimos se destacan aquellos desarrollados para los parámetros de la curva de cavitación que definen el potencial al cual se pierde el 12 y el 88% de la conductividad máxima y la pendiente entre estos dos puntos, que define la velocidad del proceso de cavitación. Estos resultados son los primeros de su tipo reportados para especies de *Eucalyptus*, en particular, y Angiospermas, en general.

Los resultados de esta tesis permiten afirmar que la particular estructura anatómica de la madera del género *Eucalyptus* determina la existencia de complejas relaciones entre anatomía y función, las cuales regulan, en diferente grado según el estrés considerado, la capacidad de adaptación al ambiente de las especies de este género. En este sentido, se halló evidencia acerca de una falta de compromiso entre eficiencia y seguridad hidráulica frente a la cavitación por sequía, pero se observó una compensación entre ambos procesos en el caso de la cavitación por frío. El potencial compromiso funcional en la resistencia a ambos tipos de estrés, se evitaría mediante la separación espacial de los mecanismos de control de estos procesos, ubicándose en órganos diferentes. Esto, por un lado, explicaría las diferencias observadas en la resistencia al estrés por frío a campo y en laboratorio y, por otro, permitiría mejorar la resistencia a ambos tipos de estrés de manera simultánea. En este sentido, el establecimiento de modelos predictivos de características anatómicas, físicas e hidráulicas por métodos de fenotipado de alto rendimiento permitiría mejorar el proceso de selección de genotipos resistentes dentro de los programas de mejoramiento forestal.

Abstract

Water transport capacity within trees, through xylem, is functionally related to their carbon fixation capacity and, therefore, to their growth and survival. This process is affected, more or less reversibly, by the cavitation phenomenon, consisting of the water column breakage, mainly due to two processes: the increase in xylem tension during drought and the freezing/thawing cycles of water during frost. Wood anatomic structure plays a key role in the hydraulic strategy of plants, with direct implications in the cavitation process and, therefore, in their physiology and ecology, and its study allows to evaluate how water transport varies within xylem as a function of abiotic stress. The study of the relationships between wood structure and hydraulic function, at inter- and intraspecific level, becomes especially relevant in a climate change scenario, in which an increase in droughts and thermal extremes are expected.

The general objective of this thesis was to understand the functional value of *Eucalyptus* spp. wood microstructure in relation to certain traits described by the reference literature as keys to explain the resistance to drought and frost in woody species. This genus, of great commercial importance worldwide, is characterized by having a complex wood anatomy, little known in functional terms. In particular, one of the objectives was to analyze and compare the anatomical structure of four *Eucalyptus* species, characterized by having a wide variation range of wood density and habitat requirements. It was hypothesized that there is a relationship in general resistance to abiotic stress that can be explained by wood differential characteristics (studied at branch and stem level), which ultimately determine the environmental requirements of the different species. Another particular objective was focused on the relationship between wood anatomical structure and functional parameters like maximum specific hydraulic conductivity, capacitance and vulnerability to cavitation due to frost and drought. It was hypothesized that maximum rates of hydraulic conductivity are positively related with the size of conductive elements, while hydraulic security is related to the characteristics of vessel related cellular elements (vasicentric tracheids, fibre tracheids and parenchyma). The results obtained in this work allows to partially validate the established hypotheses since, on the one hand, the direct relationship between drought cavitation resistance measured in laboratory and the field performance of species indicates that the latter is mainly influenced by wood characteristics. On the other hand, the inverse relationship between the resistance to freeze/thaw induced cavitation and frost tolerance indicates that these processes are determined by the attributes of different organs. Although the significative influence of vessel size on hydraulic conductivity was confirmed in the different chapters of this thesis (larger vessels and wider vessel size distribution has greater conductive efficiency), the role of vessel surrounding cells in conductive safety was partially verified. Thus, in the case of drought-induced cavitation, evidence about the role of these cells in xylem conductive safety was found, on the one hand, increasing the hydraulic connectivity

between solitary vessels and, at the same time, limiting air propagation (and, therefore, embolisms) between nearby conductive elements. On the contrary, in freeze/thaw-induced cavitation, results indicate that this process is directly related to vessel size, without significant effects of the surrounding cells. Secondly, larger vessels not only showed greater conductivity but also lower vulnerability to drought-induced cavitation, which would be explained by the inverse relationship between vessel and pit sizes. The relationships between wood anatomy and function were studied at interspecific level, but also at intraspecific level in the case of two species, *E. globulus* and *E. viminalis*, analyzing progenies with differences in mean wood density. Several relationships observed between species were also verified within species, although the narrower range of variation of wood characteristics at this level of organization resulted in changes of the significance level and sign in some of them.

The third particular objective was to determine the underlying relationships between near infrared absorption spectra (NIR) of *Eucalyptus* wood and its anatomy and function, in order to contribute to the development of genetic selection methodologies based on easy quantification characters. In this sense, it was possible to establish calibrations between NIR spectra and anatomical, physical and hydraulic properties of *Eucalyptus* wood, and to generate prediction models with different degrees of fit. Among the latter, those developed for the parameters of the cavitation curve that define the potential at which 12 and 88% of the maximum hydraulic conductivity is lost and the slope between these two points, which defines the speed of the cavitation process, stand out. These results are the first of their kind reported for *Eucalyptus* species, in particular, and Angiosperms, in general.

The results of this thesis allow to affirm that the peculiar wood anatomical structure of *Eucalyptus* genus determines the existence of complex relationships between anatomy and function, which regulate, to a different degree according to the stress considered, this genus environmental adaptive capacity. In this sense, evidence was found about a lack of trade-off between hydraulic efficiency and safety in the case of drought-induced cavitation, but a compromise was observed between both processes in the case of frost-induced xylem cavitation. The potential trade-off in the resistance to both type of stress would be avoided through the spatial separation of the control mechanisms of these processes, being located in different organs. This, on the one hand, could explain the contrast between field and laboratory observations in the resistance to frost stress and, on the other hand, could allow to improve the resistance to both type of stress simultaneously. In this sense, the establishment of predictive models for anatomical, physical and hydraulic characteristics through high throughput phenotyping methods would allow to improve of the selection process for resistant genotypes in genetic improvement programs.

Agradecimientos

A la educación pública, laica, gratuita y de calidad, por formarme como persona y profesional a lo largo de toda mi vida.

Al sistema nacional de ciencia y tecnología por mantener una política pública de incentivos a la investigación que me permitió realizar esta tesis.

A mi familia, por el amor y el apoyo constante, en múltiples y diversas ocasiones.

A la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, mi segundo hogar, y a mis compañerxs estudiantes, graduadxs, docentes y nodocentes, mi segunda familia.

A María Elena y Silvia, por su guía, consejo, confianza y, sobre todo, paciencia durante este largo recorrido.

A las y los investigadores que, mediante su cooperación brindando datos, ideas y auxilio, me ayudaron en cada paso de este trabajo.

A mis amigos, por estar siempre cerca.

Y a Paula, por su amor y compañía, que hacen más fácil todo.

Índice de contenido

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Problema de estudio	1
El proceso de cavitación del xilema en los árboles y sus implicancias funcionales y ecológicas	1
Influencia de la anatomía de la madera en el proceso de cavitación	2
Fenotipado para la selección de genotipos resistentes	5
Fundamentos de la elección del sistema de estudio	6
Importancia del género <i>Eucalyptus</i> a nivel mundial	6
Breve historia del desarrollo de este género en la Argentina	6
Situación actual en Argentina	7
Características y requerimientos ecológicos de las especies escogidas	9
Relevancia del sistema de estudio	14
Objetivos	16
Objetivo general	16
Objetivos específicos	16
Hipótesis	16
CAPÍTULO 2: ANATOMÍA DE LA MADERA DE <i>EUCALYPTUS</i> Y SUS POSIBLES IMPLICANCIAS FUNCIONALES	18
Introducción	18
Objetivos	22
Hipótesis	22
Materiales y métodos	23
Sitio y material vegetal	23
Procesamiento de las muestras	24
Variables anatómicas analizadas	25
Análisis estadísticos	26
Resultados	27
Características anatómicas y densidad	27
Discriminación de las especies en base a la anatomía y densidad de la madera	33
Variación de las características de vasos	34
Influencia de F y S en la conductividad hidráulica	34
Relaciones entre variables	35

Análisis de componentes principales (ACP)	37
Discusión	38
Relaciones entre variables	39
En <i>Eucalyptus</i> la ks max teórica está más influenciada por F que por S	41
Anatomía y densidad de la madera: ¿indicadores de la resistencia diferencial al estrés?	42
Consideraciones	44
Conclusiones	46
CAPÍTULO 3: RELACIONES ENTRE ANATOMÍA Y VULNERABILIDAD A LA CAVITACIÓN POR SEQUÍA EN EUCALIPTOS DE CLIMA TEMPLADO	48
Introducción	48
Objetivos	50
Hipótesis	51
Materiales y métodos	52
Sitio y material vegetal	52
Elaboración de las curvas de vulnerabilidad a la cavitación	52
Variables anatómicas analizadas	55
Análisis estadístico	58
Resultados	58
Rol funcional de las células que rodean a los vasos (hipótesis a y b)	58
Compromiso entre eficiencia y seguridad conductiva en el xilema (hipótesis c)	62
Relación entre el refuerzo de las células y la densidad de madera con la seguridad del xilema (hipótesis d y e)	65
Asociación múltiple entre variables anatómicas y funcionales	65
Discusión	67
Rol hidráulico de las traqueidas vasicéntricas y el parénquima	68
Rol de la distribución de tamaño de vasos, las características de las fibras y la densidad de madera en la eficiencia y seguridad hidráulica	70
Conclusiones	71
CAPÍTULO 4: RELACIONES FUNCIONALES ENTRE ESTRUCTURA DE LA MADERA Y VULNERABILIDAD A LA CAVITACIÓN A NIVEL INTRAESPECÍFICO EN EUCALIPTOS TEMPLADOS	73
Introducción	73
Objetivos	75

Hipótesis	75
Materiales y métodos	75
Sitio y material vegetal	75
Recolección y procesamiento de las muestras	77
Curvas de vulnerabilidad a la cavitación	78
Variables anatómicas analizadas	79
Capacitancia	80
Análisis estadístico	81
Análisis de senderos	81
Resultados	83
Anatomía de la madera	83
Vulnerabilidad a la cavitación	85
Relación entre las variables	86
Capacitancia	87
Análisis de sendero	89
Discusión	91
Conclusiones	97
CAPÍTULO 5: RELACIONES ENTRE ANATOMÍA Y VULNERABILIDAD A LA CAVITACIÓN POR FRÍO EN EUCALIPTOS DE CLIMA TEMPLADO	99
Introducción	99
Objetivos	104
Hipótesis	104
Materiales y métodos	106
Sitio y material vegetal	106
Recolección y procesamiento de las muestras	106
Determinación de conductividad hidráulica específica máxima (ks max)	106
Medición de vulnerabilidad a la cavitación por frío	107
Variables anatómicas analizadas	108
Análisis estadístico	108
Resultados	109
Tasa de descenso de temperatura	109
Exotermas	110
Conductividad máxima y porcentaje de pérdida de conductividad (PPC)	111
Anatomía	112
Distribución de vasos	112

Relaciones entre variables	113
Discusión	115
Conclusiones	120
CAPÍTULO 6: ESTIMACIÓN DE PROPIEDADES FÍSICAS E HIDRÁULICAS Y CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS DE LA MADERA DE <i>EUCALYPTUS</i> A TRAVÉS DEL USO DE ESPECTROSCOPIA EN EL RANGO DEL INFRARROJO CERCANO	122
Introducción	122
Objetivos	128
Materiales y métodos	128
Sitio y material vegetal	128
Recolección y procesamiento de las muestras	129
Determinación de las propiedades de referencia a nivel de rama	131
Determinación de microdensidad de la madera por rayos X	131
Adquisición de espectros NIR	133
Procesamiento de los datos	135
Calibración de los modelos	137
Estadísticos de la calibración	139
Resultados	140
Espectros NIR	140
Calibración a nivel de rama	142
Calibración a nivel de fuste	149
Discusión	155
Calibraciones a nivel de rama	156
Calibraciones a nivel de fuste	160
Conclusiones	163
CAPÍTULO 7: RELACIONES GENERALES ENTRE ANATOMÍA Y FUNCIÓN PARA EL GÉNERO <i>EUCALYPTUS</i>	165
Contrastación de Hipótesis	165
Hipótesis I	165
Hipótesis II	172
Hipótesis III	174
Consideraciones finales	177
Futuras líneas de investigación	179

Índice de Figuras

Figura 1.1. Representación esquemática de los dos principales procesos a través de los cuales se produce la cavitación de los elementos conductivos	2
Figura 1.2. Ubicación de la zona de origen del género <i>Eucalyptus</i>	6
Figura 1.3. <i>Panel izquierdo:</i> Zona de distribución natural de <i>Eucalyptus grandis</i> (modificado de Boland et al. 2006). <i>Panel derecho:</i> Aptitud climática de <i>E. grandis</i> , con especial hincapié en la región pampeana (modificado de Moschini 2000).	9
Figura 1.4. <i>Panel izquierdo:</i> Zona de distribución natural de <i>Eucalyptus globulus</i> (modificado de Boland et al. 2006). <i>Panel derecho:</i> Aptitud climática de <i>E. globulus</i> , con especial hincapié en la región pampeana (modificado de Moschini 2000).	11
Figura 1.5. <i>Panel izquierdo:</i> Zona de distribución natural de <i>Eucalyptus viminalis</i> (modificado de Boland et al. 2006). <i>Panel derecho:</i> Aptitud climática de <i>E. viminalis</i> , con especial hincapié en la región pampeana (modificado de Moschini 2000).	12
Figura 1.6. <i>Panel izquierdo:</i> Zona de distribución natural de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> (modificado de Boland et al. 2006). <i>Panel derecho:</i> Aptitud climática de <i>E. camaldulensis</i> , con especial hincapié en la región pampeana (modificado de Moschini 2000).	13
Figura 2.1. Imágenes microscópicas de los elementos celulares que componen la madera de fuste y ramas de <i>Eucalyptus</i> , en diferentes aumentos y secciones de estudio.	20
Figura 2.2. Mapa de los sitios de muestreo utilizados para llevar a cabo el análisis.	24
Figura 2.3. Imágenes en corte transversal (panel superior: 40x; panel inferior 200x) del fuste de <i>E. grandis</i> (A y B), <i>E. viminalis</i> (C y D) y <i>E. globulus</i> (E y F).	28
Figura 2.4. Distribución de vasos en clases diamétricas a nivel de fuste para las tres especies de <i>Eucalyptus</i> estudiadas. <i>Panel izquierdo:</i> porcentaje de vasos en cada clase diamétrica. <i>Panel derecho:</i> frecuencia de vasos (<i>FV</i>) observada en cada clase diamétrica.	29
Figura 2.5. Composición porcentual de los tejidos en fuste (<i>panel izquierdo</i>) y ramas (<i>panel derecho</i>) de <i>E. grandis</i> , <i>E. viminalis</i> y <i>E. globulus</i> .	30
Figura 2.6. Densidad de la madera en fuste y ramas de <i>E. grandis</i> , <i>E. viminalis</i> y <i>E. globulus</i> .	31
Figura 2.7. <i>Figura izquierda:</i> cociente entre los valores promedio de medidas anatómicas observados en ramas y en el tronco del árbol. <i>Figura derecha:</i> cociente entre la proporción de distintos elementos celulares observados en ramas y en el tronco del árbol.	32
Figura 2.8. Análisis discriminante realizado en base a las variables estudiadas en este trabajo, para tres especies de <i>Eucalyptus</i> .	33
Figura 2.9. Cambio en conductividad hidráulica específica teórica máxima (<i>ks max</i>) según: a) la variación en el área total ocupada por lúmenes (<i>F</i>) y b) la distribución de tamaño de los vasos (<i>S</i>), estimado para las tres especies del género <i>Eucalyptus</i> bajo estudio.	35
Figura 2.10. Frecuencia de vasos (<i>FV</i>) en función del área de vasos (<i>AV</i>), para las tres especies del género <i>Eucalyptus</i> bajo estudio.	36
Figura 2.11. Correlaciones entre densidad de la madera y espesor de pared de fibras, diámetro de fibras, diámetro y número de vasos según especie y órgano. Coeficiente de correlación (significativo para $p < 0,05$) discriminado por órgano y en conjunto.	37
Figura 2.12. Distribución de las variables medidas en fuste (<i>panel izquierdo</i>) y ramas (<i>panel derecho</i>) en tres factores del ACP.	38
Figura 2.13. Esquema simplificado de la matriz fibrosa con células que presentan el mismo espesor de pared, pero diferente lumen celular.	40

Figura 3.1. Esquema del sistema utilizado para la medición de conductividad hidráulica específica.	53
Figura 3.2. Sistema utilizado para la elaboración de las curvas de vulnerabilidad a la cavitación en las tres especies de <i>Eucalyptus</i> analizadas.	53
Figura 3.3. Porcentaje de pérdida de conductividad hidráulica (<i>PPC</i>) medida en segmentos de rama de 20 cm (puntos blancos) y de 30 cm de longitud (puntos negros) de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> , <i>E. globulus</i> y <i>E. viminalis</i> .	54
Figura 3.4. Metodología de determinación del área de los halos celulares que rodean a los vasos.	56
Figura 3.5. Relación entre el porcentaje de pérdida de conductividad (<i>PPC</i>) y la tensión aplicada al xilema (MPa) en 4 a 6 ramas de tres especies de <i>Eucalyptus</i> .	59
Figura 3.6. <i>Columna izquierda:</i> potencial agua al 12 por ciento de pérdida de conductividad hidráulica (P_{12} ; panel A), potencial agua al 50 por ciento de pérdida de conductividad hidráulica (P_{50} ; Panel B) y conductividad hidráulica máxima (ks_{max} ; panel C) en función de la superficie promedio de células acompañantes (halo) que rodean a los vasos. <i>Columna derecha:</i> potencial agua al 12 por ciento de pérdida de conductividad hidráulica (P_{12} ; panel D), potencial agua al 50 por ciento de pérdida de conductividad hidráulica (P_{50} ; Panel E) y conductividad hidráulica máxima (ks_{max} ; panel F) en función del parámetro b de la función de densidad de probabilidad de la distribución de Weibull (PDF) para la distribución de diámetro de vasos (que cuantifica la amplitud de esa distribución).	59
Figura 3.7. Imágenes de elementos de vaso (A, C y D) y traqueidas vasicéntricas (A, B y D) en macerados y cortes en sección transversal. Detalle de las punteaduras de TV (B) y pares de punteaduras entre vasos y TV (D, flechas). Especie: <i>E. globulus</i> .	60
Figura 3.8. Interconexión entre vasos solitarios determinada mediante tinción con safranina. Imágenes en sección transversal de las tres especies. <i>Paneles A-B:</i> <i>E. globulus</i> ; <i>C-D:</i> <i>E. viminalis</i> ; <i>E-F:</i> <i>E. camaldulensis</i> . <i>Columna izquierda:</i> aumento de 40x. <i>Columna derecha:</i> aumento de 100x.	60
Figura 3.9. <i>Panel superior:</i> potencial agua al 50% de pérdida de conductividad hidráulica (P_{50}) como función de la conductividad hidráulica máxima (ks_{max}) para tres especies de <i>Eucalyptus</i> . <i>Panel inferior:</i> potencial agua al 12% de pérdida de conductividad hidráulica (P_{12}) como función de ks_{max} .	62
Figura 3.10. <i>Panel izquierdo:</i> distribución de frecuencia de diámetro de vasos para las tres especies de <i>Eucalyptus</i> bajo estudio. <i>Panel derecho:</i> curvas de ks teórica acumulada (relativa al máximo valor de cada especie) como función del tamaño de vasos.	64
Figura 3.11. <i>Panel superior:</i> análisis de componentes principales (ACP) mostrando los ejes 1 y 2. <i>Panel inferior:</i> ACP de los ejes 1 y 3.	66
Figura 4.1. Mapa ilustrativo donde se observa la ubicación de los dos ensayos de procedencias utilizados para la realización de este trabajo.	77
Figura 4.2. Peso acumulado de agua liberada por unidad de volumen de madera versus potencial agua.	81
Figura 4.3. Distribución de tamaño de vasos en dos especies del género <i>Eucalyptus</i> con procedencias de alta y baja densidad de madera a nivel de fuste (<i>E. globulus</i> : AD n = 12, BD n = 12; <i>E. viminalis</i> : AD n = 10, BD n = 12).	84
Figura 4.4. Curvas de vulnerabilidad a la cavitación (VC) en dos especies del género <i>Eucalyptus</i> con procedencias de alta y baja densidad de madera a nivel de fuste (<i>E. globulus</i> : AD n = 12, BD n = 12; <i>E. viminalis</i> : AD n = 10, BD n = 12).	86
Figura 4.5. Análisis de correlación entre variables medidas en dos especies del género <i>Eucalyptus</i> con procedencias de alta y baja densidad de madera a nivel de fuste (<i>E. globulus</i> : AD n = 12, BD n = 12; <i>E. viminalis</i> : AD n = 10, BD n = 12).	87
Figura 4.6. Peso acumulado de agua liberada por unidad de volumen de madera en función del potencial agua (Ψ) para dos procedencias de <i>Eucalyptus viminalis</i> de alta y baja densidad	

de madera a nivel de fuste. <i>Panel izquierdo</i> : progenie de alta densidad (AD). <i>Panel derecho</i> : progenie de baja densidad (BD).	88
Figura 4.7. Comparación de curvas de peso acumulado de agua liberada por unidad de volumen en función del potencial agua (Ψ) para dos procedencias de <i>Eucalyptus viminalis</i> de alta y baja densidad de madera a nivel de fuste.	88
Figura 4.8. Modelos finales desarrollados por medio de análisis de sendero para a) <i>E. globulus</i> y b) <i>E. viminalis</i> .	90
Figura 4.9. Relación entre el diámetro de vasos y el diámetro de las punteaduras medido en tres especies de <i>Eucalyptus</i> .	95
Figura 5.1. Representación esquemática de la terminología utilizada en relación con la nucleación heterogénea de hielo dentro de los vasos (m)	100
Figura 5.2. Representación esquemática de las punteaduras intervasculares entre dos conductos llenos de agua.	101
Figura 5.3. Tasa de disminución de temperatura utilizada en los seis ciclos de congelamiento llevados a cabo para la determinación de la vulnerabilidad a la cavitación de tres especies de <i>Eucalyptus</i> creciendo bajo condiciones de jardín común en Tandil, Argentina.	109
Figura 5.4. Representación gráfica de las exotermas de congelamiento registradas en los seis ciclos de congelamiento llevados a cabo para la determinación de la vulnerabilidad a la cavitación de tres especies de <i>Eucalyptus</i> creciendo bajo condiciones de jardín común en Tandil, Argentina.	110
Figura 5.5. Representación gráfica del nivel de pérdida de conductividad y de recarga medido en ramas durante la determinación de la vulnerabilidad a la cavitación de tres especies de <i>Eucalyptus</i> creciendo bajo condiciones de jardín común en Tandil, Argentina.	111
Figura 5.6. Modelización de la distribución de tamaño de vasos ajustada a través del modelo de Weibull en base a la distribución de tamaños observados en ramas utilizadas en la determinación de la vulnerabilidad a la cavitación de tres especies de <i>Eucalyptus</i> creciendo bajo condiciones de jardín común en Tandil, Argentina.	113
Figura 5.7. Relación entre la duración de las exotermas de congelamiento y a) diámetro hidráulico (D_h) y b) frecuencia de vasos (FV) para tres especies de <i>Eucalyptus</i> creciendo bajo condiciones de jardín común en Tandil, Argentina.	114
Figura 5.8. Tendencias observadas entre los niveles medios de distintas variables medidas durante la determinación de la vulnerabilidad a la cavitación de tres especies de <i>Eucalyptus</i> creciendo bajo condiciones de jardín común en Tandil, Argentina.	115
Figura 6.1. Espectro electromagnético	123
Figura 6.2. Modos de vibración del grupo hidroxilo alcohólico (modificado de Burns & Ciurzak 2007).	124
Figura 6.3. Zonas del espectro electromagnético en la región NIR correspondientes a bandas de combinación y sobretonos.	124
Figura 6.4. a) Formas de interacción de la radiación electromagnética con la madera b) Diagrama de una esfera de integración y sus partes constituyentes	125
Figura 6.5. Espectro de absorción NIR típico de la madera.	126
Figura 6.6. Procedimiento realizado para obtener planchetas a partir de muestras de barreno.	130
Figura 6.7. Radiografía obtenida en laboratorio de planchetas de <i>Eucalyptus viminalis</i> y <i>E. globulus</i> .	132
Figura 6.8. Perfil de microdensidad típico obtenido de una plancheta de <i>Eucalyptus</i> spp.	133
Figura 6.9. Diagrama de la toma de espectros en las ramas	134
Figura 6.10. Diagrama de la toma de espectros en planchetas obtenidas a partir de muestras de barreno de <i>Eucalyptus</i> spp.	135

Figura 6.11. Delimitación de segmentos en un perfil de microdensidad obtenido por la técnica de rayos X a partir de una plancheta de <i>Eucalyptus</i> spp.	136
Figura 6.12. Métodos utilizados para calibrar los modelos de regresión PLS entre los espectros NIR y las distintas variables medidas en la madera. a) Validación cruzada. b) Validación cruzada completa.	138
Figura 6.13. Espectros de absorción NIR obtenidos a nivel de rama y fuste	141
Figura 6.14. Análisis de componentes principales (ACP) de los espectros obtenidos a nivel de rama, discriminado por especie y sección de toma de espectros	142
Figura 6.15. Valores observados versus valores esperados a partir de la calibración de modelos predictivos para las variables analizadas a nivel de rama, ordenadas en función del coeficiente de determinación (R^2).	145
Figura 6.16. Números de onda con coeficientes de regresión significativos para las variables analizadas a nivel de rama, seleccionados a través del algoritmo CARS.	146
Figura 6.17. Comparación gráfica de las porciones del espectro con coeficientes de regresión significativos para el modelado de las variables analizadas a nivel de rama.	147
Figura 6.18. Números de onda con coeficientes de regresión significativos para las variables de microdensidad a nivel de fuste, seleccionados a través del algoritmo CARS.	151
Figura 6.19. Números de onda con coeficientes de regresión significativos para las variables de microdensidad a nivel de fuste, seleccionados a través del algoritmo CARS, para la primera derivada de los espectros normalizados	152
Figura 6.20. Gráfica de valores observados y esperados para las calibraciones de microdensidad de la madera seleccionadas en función de mayor IAM, discriminados por especie: <i>E. globulus</i> (EG) y <i>E. viminalis</i> (EV).	154
Figura 6.21. Valores observados y esperados a partir de la calibración en conjunto de las dos especies, a partir de longitudes de onda significativas para ambas, a través de la transformación de los espectros por la primera derivada de los datos normalizados (pre-tratamiento ND 1).	155
Figura 7.1. Relación entre el diámetro de vasos (DV) y el área de halo (Ha) con el nivel de conductividad hidráulica específica máxima (ks_{max}) en ramas de cuatro especies de <i>Eucalyptus</i> .	166
Figura 7.2. Relación entre el diámetro de vasos (DV) y el área de halo (Ha) con la tensión necesaria para producir el 12% y 50% de pérdida de conductividad hidráulica (P_{12} y P_{50} , respectivamente) en ramas de cuatro especies de <i>Eucalyptus</i> .	168
Figura 7.3. Relación entre el nivel de conductividad hidráulica específica máxima (ks_{max}) y la tensión necesaria para producir el 50% de pérdida de dicha conductividad (P_{50}) en ramas de cuatro especies de <i>Eucalyptus</i> .	169
Figura 7.4. Relación entre el porcentaje de pérdida de conductividad (PPC) y el diámetro de vasos (DV), área de halo (Ha)	170
Figura 7.5. Relación entre el nivel de vulnerabilidad a la cavitación por sequía (P_{50}) y por frío (PPC) en ramas de cuatro especies de <i>Eucalyptus</i> .	172
Figura 7.6. Esquema de la relación entre el nivel de resistencia esperado y observado.	173
Figura 7.7. Representación de las curvas de vulnerabilidad a la cavitación de dos individuos con el mismo nivel de resistencia media, pero con diferencias significativas en el resto de los parámetros de la curva (P_{12} , P_{88} y <i>pendiente</i>).	176

Índice de Tablas

Tabla 1.1. Distribución de las plantaciones forestales de <i>Eucalyptus</i> en las distintas provincias y regiones de Argentina	7
Tabla 1.2. Cuadro resumen de las características de resistencia a estrés por sequía y frío de las especies consideradas en este trabajo.	15
Tabla 2.1. Morfometría de fibras y vasos, fracción de pared de fibras, densidad básica de la madera y conductividad hidráulica específica teórica máxima, a nivel de fuste para tres especies de <i>Eucalyptus</i> . Media \pm desvío estándar.	28
Tabla 2.2. Variables anatómicas (fibras y vasos) y densidad de madera a nivel de ramas para tres especies del género <i>Eucalyptus</i> . Media \pm desvío estándar.	31
Tabla 2.3. Valor estimado de los parámetros del modelo ($ks_{max} = \alpha \cdot F \beta \cdot S \delta$)	35
Tabla 3.1. Variables anatómicas y funcionales medidas en tres especies comerciales del género <i>Eucalyptus</i> creciendo en Tandil, provincia de Buenos Aires, Argentina.	61
Tabla 3.2. Tabla de coeficientes de correlación de Spearman para las diversas variables analizadas	63
Tabla 3.3. Parámetros de las curvas de ks teórica acumulada como función del diámetro de vasos (Figura 3.10, <i>panel derecho</i>).	64
Tabla 3.4. Variables utilizadas en el ACP y su asociación con los ejes 1, 2 y 3.	66
Tabla 4.1. Procedencias de <i>Eucalyptus globulus</i> , familias incluidas, número de individuos muestreados, valores medios de las variables fenotípicas (penetración del Pilodyn –PILO– y diámetro a la altura del pecho –DAP–) y clasificación relativa (alta o baja densidad).	76
Tabla 4.2. Procedencias de <i>E. viminalis</i> , familias incluidas, número de individuos muestreados y valor medio de penetración de Pilodyn (PILO) y clasificación relativa de las procedencias como de alta o baja densidad.	77
Tabla 4.3. Pruebas de bondad de ajuste y criterio estadístico utilizado para evaluar el ajuste de los modelos desarrollados.	83
Tabla 4.4. Media \pm desvío estándar de las variables anatómicas medidas en dos especies del género <i>Eucalyptus</i> con procedencias de alta (AD) y baja densidad (BD) de madera a nivel de fuste (<i>E. globulus</i> : AD n = 12, BD n= 12; <i>E. viminalis</i> : AD n = 10, BD n = 12).	83
Tabla 4.5. Media \pm desvío estándar de la proporción y longitud de los distintos elementos celulares en dos procedencias de <i>Eucalyptus globulus</i> de alta (AD) y baja densidad (BD) de madera a nivel de fuste	84
Tabla 4.6. Media \pm desvío estándar de las variables hidráulicas medidas en dos especies del género <i>Eucalyptus</i> con procedencias de alta (AD) y baja densidad (BD) de madera a nivel de fuste (<i>E. globulus</i> : AD n = 12, BD n= 12; <i>E. viminalis</i> : AD n = 10, BD n = 12). Valores en negrita indican diferencias significativas entre procedencias (test LSD de Fisher; $p < 0,05$).	85
Tabla 4.7. Resultados de las pruebas de bondad de ajuste para el modelo propuesto.	91
Tabla 5.1. Media \pm desvío estándar de la temperatura de comienzo y finalización promedio de las exotermas de congelamiento y de la duración media de las mismas, registradas durante la determinación de la vulnerabilidad a la cavitación de tres especies de <i>Eucalyptus</i> creciendo bajo condiciones de jardín común en Tandil, Argentina.	111
Tabla 5.2. Media \pm desvío estándar de la conductividad hidráulica específica máxima (ks_{max}), porcentaje de pérdida de conductividad en el tiempo 1 (PPC 1) y 2 (PPC 2), y nivel de recarga medidos en ramas utilizadas para la determinación de la vulnerabilidad a la cavitación de tres especies de <i>Eucalyptus</i> creciendo bajo condiciones de jardín común en Tandil, Argentina.	111

Tabla 5.3. Media \pm desvío estándar de las diferentes variables anatómicas medidas sobre ramas utilizadas durante la determinación de la vulnerabilidad a la cavitación de tres especies de <i>Eucalyptus</i> creciendo bajo condiciones de jardín común en Tandil, Argentina. Letras diferentes indican diferencias significativas entre especies.	112
Tabla 6.1. Intensidad de bandas para MIR y NIR	123
Tabla 6.2. Cuadro resumen de las diferentes determinaciones llevadas a cabo en ramas y fuste.	131
Tabla 6.3. Resumen de las calibraciones a nivel de rama para los modelos de cada variable, obtenidas a través de tres etapas sucesivas.	143
Tabla 6.4. Comparación de la calibración de los modelos para las diferentes variables realizadas en la tercera etapa del análisis.	144
Tabla 6.5. Tabla resumen con el número de muestras de barreno utilizadas, longitud y cantidad de segmentos promedio para las dos especies analizadas, y resultados del análisis de la varianza y test <i>post hoc</i> de comparaciones múltiples de Tukey para microdensidad mínima, media y máxima promedio.	149
Tabla 6.6. Resumen de las calibraciones de microdensidad para la elaboración de modelos predictivos de estas variables a nivel fuste, discriminados por especie, obtenidas a través de tres etapas sucesivas.	150
Tabla 6.7. Calibración de las variables de microdensidad a nivel de fuste mediante la transformación ND 1.	151
Tabla 6.8. Calibración de las variables de microdensidad de fuste a nivel de especie, realizada a partir del subconjunto de ondas significativas para ambas especies según el pre-tratamiento ND 1.	153
Tabla 6.9. Cuadro resumen de las calibraciones llevadas a cabo para las tres variables analizadas a nivel de fuste en ambas especies.	153
Tabla 6.10. Calibración de las variables a nivel interespecífico realizada a partir del conjunto de datos depurado y del subconjunto de ondas significativas para ambas especies, según el pre-tratamiento ND 1 de los espectros.	154
Tabla 7.1. Resistencia a la cavitación esperada (a partir de requerimientos a campo) y observada (en laboratorio) para los dos tipos de estrés probados.	173
Tabla 7.2. Comparación de la calibración de los modelos PLS-R entre los espectros NIR y las diferentes variables analizadas.	175

Listado de variables y parámetros utilizados

	Variables	Abreviatura	Unidades
<i>Vasos</i>	Diámetro de vasos	<i>DV</i>	μm
	Diámetro hidráulico	<i>Dh</i>	μm
	Área promedio de vasos	<i>AV</i>	μm^2
	Frecuencia de vasos	<i>FV</i>	mm^{-2}
	Longitud de elementos de vaso	<i>LV</i>	μm
	Diámetro mayor de las punteaduras de los vasos	<i>Vp</i>	μm
	Composición de vasos	<i>S</i>	mm^4
	Proporción de vasos	<i>V%</i>	%
	Fracción de lúmenes	<i>F</i>	adimensional
	Parámetro de amplitud de la curva de distribución de vasos	<i>b</i>	adimensional
Parámetro de forma de la curva de distribución de vasos	<i>c</i>	adimensional	
<i>Células acompañantes</i>	Área de halo	<i>Ha</i>	μm^2
	Proporción de fibrotraqueidas	<i>FT%</i>	%
	Proporción de traqueidas vasicéntricas	<i>TV%</i>	%
	Longitud de fibrotraqueidas	<i>LFT</i>	μm
	Longitud de traqueidas vasicéntricas	<i>LTV</i>	μm
Diámetro mayor de las punteaduras de las TV	<i>TVp</i>	μm	
<i>Fibras</i>	Espesor de pared de fibras	<i>EPF</i>	μm
	Diámetro de fibras	<i>DF</i>	μm
	Diámetro de lumen de fibras	<i>DLF</i>	μm
	Proporción de fibras	<i>F%</i>	%
<i>Parénquima</i>	Longitud de fibras	<i>LF</i>	μm
	Cantidad de radios por milímetro lineal	<i>Rmm</i>	mm^{-1}
	Proporción de parénquima radial	<i>R%</i>	%
<i>Combinadas</i>	Proporción de parénquima axial	<i>PA%</i>	%
	Distancia intervascular	<i>DiV</i>	μm
	Puentes hidráulicos intervasculares (distancia)	<i>PiV_d</i>	μm
	Puentes hidráulicos intervasculares (células)	<i>PiV_n</i>	n°
	Área de contacto entre vasos y radios	<i>V-R</i>	%
	Área de halo/área de vaso	<i>RHV</i>	adimensional
	Factor de refuerzo de la pared de los vasos	$(t/b)^2$	adimensional
Factor de refuerzo de la pared de los vasos (incluido el halo)	$(t/b)^2_h$	adimensional	
<i>Integradoras</i>	Densidad normal (15% CH)	<i>Dn</i>	g cm^{-3}
	Densidad básica	<i>DB</i>	g cm^{-3}
	Fracción de Pared de Fibras	<i>FPF</i>	%
	Fracción sin lúmenes	<i>I-F</i>	adimensional
<i>Eficiencia y seguridad hidráulica</i>	Conductividad hidráulica específica máxima	<i>ks max</i>	$\text{kg m}^{-1} \text{MPa}^{-1} \text{s}^{-1}$
	Porcentaje de pérdida de conductividad	<i>PPC</i>	%
	Potencial agua al 50% de pérdida de conductividad	<i>P₅₀</i>	MPa
	Potencial agua al 12% de pérdida de conductividad	<i>P₁₂</i>	MPa
	Potencial agua al 88% de pérdida de conductividad	<i>P₈₈</i>	MPa
Pendiente de la curva de VC	<i>pendiente; \triangleleft</i>	% MPa^{-1}	
<i>Estado hídrico</i>	Contenido relativo de agua	<i>CRA</i>	%
	Potencial hídrico	Ψ	MPa
	Capacitancia	<i>C</i>	$\text{kg m}^{-3} \text{MPa}^{-1}$
	Potencial agua	<i>P_{agua}</i>	kg m^{-3}

Capítulo 1: Introducción general

Problema de estudio

El proceso de cavitación del xilema en los árboles y sus implicancias funcionales y ecológicas

El agua se mueve dentro del árbol, desde el suelo hacia las hojas a través de un sistema de conducción altamente eficiente que involucra diversos órganos (Rockwell et al. 2014). Esta capacidad de transporte de agua a través de la madera es cuantificada por el parámetro “conductividad hidráulica”, el cual se relaciona funcionalmente con la capacidad de fijación de carbono del individuo (Hubbard et al. 2001, Santiago et al. 2004) y, por lo tanto, con su crecimiento (p.ej. Kondoh et al. 2006, Brodribb et al. 2005) y supervivencia (Cavender-Bares & Holbrook 2001). La conductividad hidráulica (k_s) de la madera depende fundamentalmente del tamaño y el número de elementos de conducción por unidad de sección transversal que la conforman (Tyree 1999). A su vez, el flujo de agua a través del sistema de elementos conductivos encuentra resistencias, dadas principalmente por la rugosidad de las paredes de los mismos, sus terminaciones más o menos abiertas y las características de las estructuras que los interconectan (punteaduras y placas de perforación), siendo estas últimas las que finalmente determinan la k_s máxima (Sperry et al. 2005). La capacidad de conducción se ve afectada, de manera más o menos reversible, por el fenómeno de “cavitación”, consistente en la ruptura de la columna de agua, debida fundamentalmente a dos procesos: el aumento de la tensión en el xilema durante procesos de sequía y los ciclos de congelamiento y descongelamiento del agua dentro del sistema durante las heladas (Tyree & Sperry 1989; Figura 1.1). La pérdida de conductividad por cavitación limita el crecimiento en el mejor de los casos y, si se desarrolla de manera “catastrófica”, expandiéndose a grandes porciones del xilema activo, puede llevar a la muerte del individuo (p.ej. Sperry & Pockman 1993, Rice et al. 2004, Bréda et al. 2006). Por otro lado, la seguridad del sistema conductivo de una planta no sólo depende de su vulnerabilidad a cavitación, sino también de su potencialidad para producir nuevo xilema conductivo (p.ej. Cruiziat et al. 2002, Klein et al. 2018) o bien reparar los embolismos (Brodersen & McElrone 2013). Este último proceso, cuando ocurre a gran distancia de la raíz y bajo tensión (referido como *novel refilling* en inglés), si bien se postula y ha sido descrito para varias especies (p.ej. Johnson et al. 2012, Trifilò et al. 2014, 2015, Knipfer et al. 2016), está muy debatido en la actualidad (Cochard & Delzon 2013, Rockwell et al. 2014, Klein et al. 2018). Una mayor resistencia a la cavitación y/o una rápida recuperación de la conductividad una vez producidos los embolismos resultan de gran importancia en la estrategia de tolerancia al estrés por sequía y heladas en especies leñosas, y en su potencial adaptativo a nuevos ambientes (p.ej. Pockman & Sperry 2000, Maherali et al. 2004).

La anatomía de la madera juega un rol clave en la estrategia hidráulica de las plantas, y es por esta razón que la vulnerabilidad a la cavitación es crucial para entender la respuesta productiva y supervivencia ante condiciones ambientales limitantes para su desarrollo (Anderegg & Meinzer 2001), particularmente frente al escenario de cambio climático (Anderegg et al. 2016, Adams et al. 2017, Choat et al. 2018). A pesar del gran interés de la comunidad científica en esta temática, evidenciada en una gran cantidad de trabajos publicados a lo largo de las últimas décadas, especialmente a partir del contexto de cambio climático, existe aún cierta controversia acerca de la dinámica del proceso y las estructuras que condicionan funcionalmente la vulnerabilidad a cavitar.

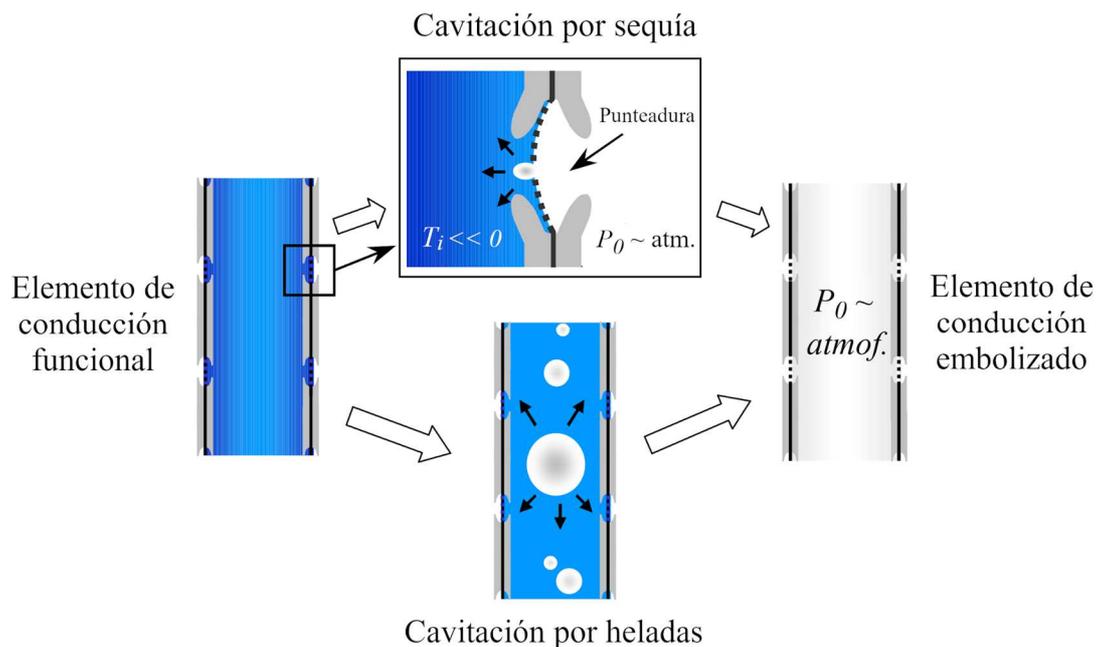


Figura 1.1. Representación esquemática de los dos principales procesos a través de los cuales se produce la cavitación de los elementos conductivos (modificado de Hacke & Sperry 2001)

Influencia de la anatomía de la madera en el proceso de cavitación

La teoría tenso-coheso-transpiratoria establece que el movimiento de agua dentro del xilema se produce a través de un proceso pasivo, a favor de un gradiente de potencial hídrico (Hacke & Sperry 2001). Este proceso se desarrolla en un equilibrio metaestable ya que, a pesar de ser termodinámicamente inestable, una columna de agua bajo tensión es cinéticamente estable dentro de ciertos límites (Rockwell et al. 2014). Durante una sequía, el potencial hídrico del suelo y del aire que rodea las hojas disminuye, lo cual conlleva un aumento de la tensión dentro del xilema que, en caso de superar cierto límite, desencadenaría el proceso de cavitación. Si bien existen diversas hipótesis acerca de cómo se desarrolla este evento, la gran mayoría de los investigadores coincide en que sería la entrada de aire a través de las punteaduras lo que iniciaría este proceso (Rockwell et al. 2014; Figura 1.1). De acuerdo con esta hipótesis, la cavitación ocurriría cuando el diferencial de presión entre el agua dentro de un elemento conductor y el aire circundante excede la fuerza capilar en la interfaz aire-agua (Hacke & Sperry 2001). Así, diferentes

características de la membrana de las punteaduras (que se relacionarían con el área total de punteaduras de un elemento conductivo y, en definitiva, con su tamaño) determinarían la máxima diferencia de presión a ambos lados de la misma (Wheeler et al. 2005, Rockwell et al. 2014). Por otro lado, durante las heladas, el agua dentro del xilema se congela y los gases disueltos en ella forman burbujas, las cuales pueden nuclear el proceso de cavitación una vez que el hielo se derrite, expandiéndose hasta ocupar todo el volumen del elemento conductivo (Hacke & Sperry 2001; Figura 1.1). En el caso de este proceso, existe consenso acerca de la relación directa entre el tamaño de los elementos conductivos y la vulnerabilidad a la cavitación por congelamiento-descongelamiento (p.ej. Davis et al. 1999).

Cada especie y genotipo, así como cada planta y órgano dentro de ella, tiene una curva diferente de vulnerabilidad a la cavitación (Tyree 1999) determinada por las características anatómicas de la madera, las cuales varían con la edad cambial, la posición dentro de la planta, las condiciones climáticas y de disponibilidad de recursos y el acervo genético de cada individuo (Spicer & Gartner 2001, Holbrook & Zwieniecki 2005, Martínez-Cabrera et al. 2009). En este sentido, la estructura de los elementos conductivos encargados del transporte de agua en el xilema es de vital importancia ya que determinadas combinaciones de espesor de pared, diámetro del lumen y cantidad y diámetro de punteaduras en estos elementos celulares serían las principales variables que determinarían el nivel de seguridad en el transporte de agua (Hacke et al. 2001, Tyree & Zimmermann 2002). Así, en términos generales, se plantea que existe un compromiso entre la capacidad de conducción de agua y la resistencia a la cavitación por sequía y heladas, debido a que, en general, ambos procesos se relacionan inversamente con el tamaño de los elementos del sistema de conducción (p.ej. Kondoh et al. 2006, Domec et al. 2006, Sperry et al. 2008). Por otro lado, la densidad de la madera es una característica integradora que refleja la combinación de diferentes tipos celulares que componen la madera y representa, en última instancia, la proporción de lúmenes y paredes de los elementos que la conforman (Jacobsen et al. 2005). Esta es una variable de gran valor tecnológico y, a su vez, se relaciona con diversas propiedades del xilema, entre ellas las hidráulicas (Hacke & Sperry 2001, Pittermann et al. 2006, Sperry et al. 2008).

La madera de las especies angiospermas es anatómicamente más compleja que la perteneciente a especies gimnospermas. A diferencia de la doble función (conducción-sostén) de las traqueidas de las coníferas, las especies latifoliadas presentan un sistema axial compuesto de vasos, que tienen como función el transporte de agua, y una matriz de fibras que le brinda soporte, con cantidades variables de parénquima donde se almacenan carbohidratos de reserva. Asimismo, algunas especies presentan otros tipos de células con una anatomía y función intermedia entre vasos y fibras, como traqueidas y fibrotraqueidas (Carlquist, 1985). La complejidad anatómica de la madera de estas especies contribuye de manera coordinada con el proceso de transporte de agua dentro del xilema, el cual depende directamente de las características de los vasos e indirectamente del conjunto de células acompañantes (Holbrook & Zwieniecki 2005). Además, esta diversidad anatómica genera que, en este tipo de maderas, las relaciones funcionales sean más

complejas que en especies coníferas, razón por la cual este último grupo ha sido más profundamente estudiado. En el caso de las especies latifoliadas, existe una gran cantidad de trabajos donde se analizan relaciones entre morfometría de vasos, conductividad y vulnerabilidad a la cavitación. Sin embargo, existe un relativo vacío de conocimiento acerca del valor funcional de la distribución espacial de los elementos conductivos y el rol que desempeñan los demás tipos celulares, particularmente las traqueidas vasicéntricas, en el nivel de conductividad y vulnerabilidad a la cavitación, y el de las fibras (fibras libriformes y fibrotraqueidas) en este último proceso.

Las traqueidas son células imperforadas que pueden estar asociadas a los vasos, rodeándolos (vasicéntricas) o entre las fibras (vasculares), y que funcionalmente pueden participar en la conducción y almacenamiento de agua (Carlquist 1984). Este tipo de estructura aparece en algunas especies de zonas áridas (p.ej. especies arbustivas de California), y en otras familias de amplia distribución, entre ellas las Fagáceas y Mirtáceas, que incluyen a las numerosas especies del género *Eucalyptus* (Carlquist 1985). Este autor ha propuesto que es justamente la presencia de traqueidas vasicéntricas la que les ha permitido a estas familias irradiar en ambientes con estrés hídrico, especialmente manteniendo el hábito siempreverde. La razón funcional es que estas células actuarían como sistema hidráulico subsidiario al principal (conformado por los vasos, de mayor diámetro), sirviendo como reservorio de agua y manteniendo la capacidad conductiva cuando el sistema principal está cavitado (Carlquist 1984, 1985). De ser así, las traqueidas vasicéntricas deberían tener menor vulnerabilidad a la cavitación que los propios vasos, permitiendo una mínima –pero funcionalmente importante– capacidad conductiva cuando éstos han cavitado. Alternativamente, las traqueidas vasicéntricas (y también las fibrotraqueidas) podrían contribuir principalmente a la capacitancia del sistema hidráulico, aportando una fuente de agua en momentos claves para disminuir las tensiones en los vasos, y evitar o demorar la cavitación de los mismos (Tyree & Zimmermann 2002). Si este fuera el caso, estos elementos deberían ser más vulnerables a la cavitación que los propios vasos, sirviendo este mecanismo como liberador del agua contenida en estos reservorios. Otro posible rol de este tipo celular sería en el proceso de reversión de embolismos. Más allá del mecanismo por el cual puedan colaborar en disminuir la vulnerabilidad del sistema conductivo, el hecho de que tengan un rol clave para el mismo es una hipótesis muy importante desde el punto de vista de los mecanismos causales de la resistencia al estrés de especies de gran valor ecológico y comercial, que hasta el momento no ha sido puesta a prueba. A su vez, se ha propuesto un rol funcional por parte de las fibras en relación con la vulnerabilidad a la cavitación de los vasos en especies latifoliadas (Jacobsen et al. 2005). Este es otro aspecto que es necesario considerar en el análisis funcional de la madera de este conjunto de especies.

Fenotipado para la selección de genotipos resistentes

Si se verificara la hipótesis del valor funcional de los distintos tipos celulares acompañantes de los vasos, sería posible esperar que, en especies con este tipo de anatomía (p.ej. los eucaliptos), pueda sortearse, al menos parcialmente, el compromiso entre eficiencia de conducción y seguridad del sistema conductivo, por depender las máximas tasas de conductividad hidráulica de un tipo de estructura anatómica (vasos) y la resistencia a la cavitación (o su reversión) de otras (traqueidas, fibras y/o parénquima). Así, al menos teóricamente, podrían identificarse genotipos que sean capaces de combinar ambos atributos favorables al mismo tiempo: gran crecimiento y alta resistencia a estrés. Estos genotipos podrían ser seleccionados tanto por la mano del hombre (a través de programas de mejoramiento genético) como por el proceso de selección natural, afectando los procesos evolutivos de las poblaciones.

Cuando se intentan aplicar los conceptos precedentes en el marco de un programa de mejoramiento genético, surge el problema de que la medición de las variables anatómicas y funcionales mencionadas es prácticamente imposible de llevar a cabo en un número alto de entidades genéticas, acorde con la precisión requerida para la estimación de ciertos parámetros genéticos. Por ello se torna necesario identificar variables alternativas, funcionalmente relacionadas con las anteriores que, al ser más fácilmente medibles, actúen como carácter de selección. Algunos estudios en especies de coníferas (p.ej. Martínez-Meier et al. 2008, Dalla-Salda et al. 2009) han demostrado que la densidad de la madera es una variable altamente correlacionada con su respuesta al estrés por sequía. Más específicamente, los perfiles de microdensidad de la madera, obtenidos por la técnica indirecta de densitometría de rayos X (Polge 1966), permiten analizar esta variable a nivel de gran detalle dentro del árbol, a partir de un muestreo no destructivo. Además, su aplicabilidad se ajusta a las necesidades de un programa de mejoramiento y/o estudios a gran escala espacial y temporal de los procesos de adaptación a condiciones ambientales adversas. Sin embargo, no se ha probado aún la utilidad de esta técnica en especies del género *Eucalyptus*, las cuales, como se mencionó, tienen una madera conformada por varios tipos celulares, cuya función específica tampoco ha sido cuantificada en términos de resistencia a la cavitación y conductividad hidráulica. Otra de las posibilidades para el fenotipado de genotipos resistentes a la cavitación es el uso de espectroscopía NIR, la cual combina dos ventajas: primero, la alta velocidad de toma de espectros, y segundo, los pocos requisitos de preparación de las muestras. Actualmente es la herramienta más usada para el fenotipado de alto rendimiento en los programas de mejoramiento genético forestal (PMGF), donde el desarrollo de calibraciones para variables de interés, como podría ser la vulnerabilidad a la cavitación, constituye el primer paso de estos programas.

Fundamentos de la elección del sistema de estudio

Importancia del género Eucalyptus a nivel mundial

El género *Eucalyptus* L'Hér. comprende aproximadamente 700 especies nativas de Oceanía (Moschini 2000, Jakobsen 2018; Figura 1.2), principalmente de Australia y Tasmania, pero que incluye también a las islas cercanas como Papua Nueva Guinea, Indonesia y Filipinas, entre las más importantes (FAO 1981). Este constituye uno de los principales componentes de la actividad forestal mundial, con más de 20 millones de hectáreas plantadas en el mundo (Iglesias-Trabado et al. 2009), constituyendo el segundo género en importancia detrás de *Pinus* (Carle et al. 2002). A esta superficie se le suman las formaciones naturales que integran los bosques nativos de su zona original de distribución, cuya superficie representaba más de 92 millones de hectáreas (Jakobsen 2018) antes de producirse los incendios registrados a finales de 2019. El principal productor de madera (para pulpa y usos sólidos) de especies de este género es Brasil, con más de 6 millones de hectáreas plantadas (Ferraz et al. 2018), seguido por India y China.



Figura 1.2. Ubicación de la zona de origen del género *Eucalyptus* (en verde)

Breve historia del desarrollo de este género en la Argentina

La historia de este género en la Argentina comienza en 1857 con la introducción de semillas de *E. globulus*, que luego se continúa con introducciones puntuales de *E. camaldulensis* y *E. tereticornis* y, posteriormente, *E. grandis* (Cozzo 2007, Bedetti et al. 2017). La introducción en la llanura pampeana acompañó el desarrollo de los grandes establecimientos agrícolas, donde se lo plantó con fines ornamentales y de protección, existiendo arboledas en estancias y casas rurales, caminos perimetrales y pequeños montes para la producción de leña y reparo para el ganado (Cozzo 2007, Bedetti et al. 2017). Luego de la Segunda Guerra Mundial, al reconocerse el potencial de este género

para abastecer de madera al mercado interno, surgen iniciativas gubernamentales y privadas para instalar amplias forestaciones de diversas especies en distintos puntos del país (Elliot 1959, Bedetti et al. 2017). Entre estas acciones cabe mencionar especialmente las llevadas a cabo por la administración de ferrocarriles, que realizó numerosas plantaciones en las cercanías de pueblos y estaciones (Bedetti et al. 2017). Los primeros centros de desarrollo de forestaciones con especies de este género fueron la provincia de Buenos Aires, Mendoza y la Mesopotamia, utilizando principalmente *E. camaldulensis* y *E. tereticornis*, sumados a *E. globulus* y *E. viminalis* en Buenos Aires, y *E. grandis* en Entre Ríos (Carpineti et al. 1995, Cozzo 2007). El criterio seguido por estas forestaciones fue industrial, planteándose el uso de la madera para la producción de pilotes y tirantes, parquet, cajas de fruta y muebles, así como para chapas, tableros y pasta de papel (Elliot 1959). Sin embargo, este proceso, que fue particularmente intenso entre 1950 y 1958, comienza a decaer hasta casi detenerse en 1965 debido, en parte, a la utilización de materiales con poca o nula selección, lo cual limitó de manera significativa su uso como madera aserrada (Elliot 1959, Sanchez Acosta & Sepiarsky 2005). Sin embargo, a partir de la década de 1970, a través de sistemas de fomento mediante la desgravación impositiva, las forestaciones de eucaliptos volvieron a tomar impulso, sobre todo en Entre Ríos y Corrientes (Sanchez Acosta 1995).

Situación actual en Argentina

Actualmente, el cultivo de eucaliptos en Argentina ocupa un lugar de preponderancia, ubicándose en el segundo lugar en importancia, detrás del cultivo de pinos, con cerca del 25% de la superficie forestada a nivel nacional (Gorzycki 2019). Las estimaciones disponibles más recientes, indican que en Argentina hay aproximadamente 300.000 ha cultivadas con *Eucalyptus*, distribuidas principalmente en dos regiones: la Mesopotamia (Entre Ríos, Corrientes y Misiones) y la región pampeana, que concentran aproximadamente el 90% de la superficie implantada con este género (Gorzycki 2019; Tabla 1.1). La Mesopotamia es la región más importante y con mayor grado de industrialización y, dentro de esta, la zona noreste de Entre Ríos es considerada el mayor núcleo de eucaliptos del país.

Tabla 1.1. Distribución de las plantaciones forestales de *Eucalyptus* en las distintas provincias y regiones de Argentina

Provincia / Región	Superficie (ha)	Participación (%)
Corrientes	121.857	38,8
Entre Ríos	112.785	35,9
Misiones	40.902	13,0
Buenos aires	7.818	2,5
<i>Noroeste</i>	15.875	5,1
<i>Centro</i>	14.632	4,7
Total	313.869	100

En Buenos Aires, más del 70% de la superficie forestada con especies de este género se concentra en el sudeste de la provincia. El resto de la provincia se caracteriza por presentar emprendimientos productivos de pequeña escala y, sobre todo, montes de protección pequeños y dispersos (MMA-BA 2010, MAA-BA 2011). Si bien esta provincia conjuga una serie de condiciones favorables para la realización de inversiones forestales en su territorio (buenas aptitudes ecológicas, amplia red de infraestructura y servicios y cercanía a los principales centros de consumo y de transformación de la madera), tradicionalmente las principales actividades vinculadas con el uso de suelo han sido la agricultura y la ganadería (Pathauer 2005, MMA-BA 2010).

Por otro lado, las características ambientales de las zonas de origen de las especies de *Eucalyptus* (dadas por diferencias en el régimen de precipitaciones, temperaturas – medias, máximas, mínimas, cantidad de días con heladas, etc.–, distintos grados de continentalidad, textura y profundidad de los suelos, capacidad de drenaje de los mismos, niveles de salinidad, etc.) determinan que distintas especies, y diferentes genotipos dentro de ellas, sean más o menos aptas para su implantación en las diversas regiones de nuestro país. Actualmente, en la región mesopotámica, de clima subtropical sin estación seca, las principales especies utilizadas son: *E. grandis*, *E. dunnii*, *E. urophylla*, *E. camaldulensis* y *E. tereticornis* (López et al. 2015). De estas, la más importante es *E. grandis*, ocupando más del 90% de la superficie forestada en esa región. Por otro lado, en la región pampeana, clasificada como templado-húmeda, su gran extensión tiene como consecuencia una importante variedad de condiciones climáticas y edáficas, que se traducen en la necesidad de trabajar con diferentes especies forestales (Pathauer 2005). Las especies utilizadas en esta región son: *E. globulus*, *E. viminalis*, *E. dunnii*, *E. camaldulensis* y *E. tereticornis* (Sanchez Acosta 1995, López et al. 2015).

De la diversidad total de especies de este género implantadas en Argentina, para el presente trabajo se seleccionaron cuatro de gran interés comercial y superficie forestada (Sanchez Acosta & Sepiarsky 2005), las cuales presentan diferencias de densidad de madera y requerimientos ecológicos. En función de las características de su madera, en cuanto a color y densidad, se las puede dividir en:

- Eucaliptos claros:
 - Livianos: a) *E. grandis*
 - Semipesados: b) *E. globulus*,
c) *E. viminalis*
- Eucaliptos colorados:
 - Pesados: d) *E. camaldulensis*

Características y requerimientos ecológicos de las especies escogidas

a) *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden

En su zona de distribución natural, a lo largo de la costa este de Australia continental (Figura 1.3, panel izquierdo), a esta especie se la encuentra en llanuras o laderas bajas de valles profundos y fértiles, en zonas con suelos húmedos, bien drenados, profundos, arcillosos, de origen aluvial o volcánico. En estos sitios la temperatura media del mes más cálido suele oscilar entre 24 y 30 °C y la del mes más frío, entre 3 y 8 °C, con baja incidencia de heladas y un régimen de lluvias entre 1000 - 3500 mm anuales, con máximos en verano (Boland et al. 2006).

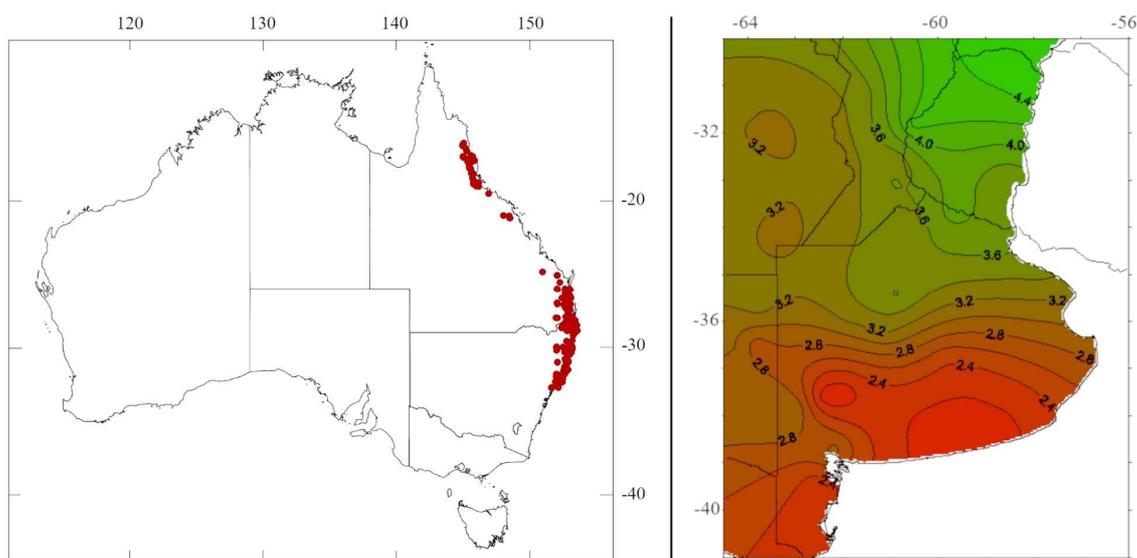


Figura 1.3. Panel izquierdo: Zona de distribución natural de *Eucalyptus grandis* (modificado de Boland et al. 2006). Panel derecho: Aptitud climática de *E. grandis*, con especial hincapié en la región pampeana (modificado de Moschini 2000). Mayor número (color verde) indica mayor aptitud climática.

En Argentina, como se mencionó anteriormente, ha demostrado una muy buena adaptabilidad a las condiciones ecológicas generales imperantes en la región mesopotámica. Los materiales genéticos utilizados presentan tolerancia a altas temperaturas y tolerancia media a la sequía, con crecimientos aceptables en sitios con más de 1.000 mm de precipitación media anual, de régimen estival. Su principal limitante es la escasa tolerancia a las bajas temperaturas (es la de mayor sensibilidad de las especies consideradas), sobre todo en los primeros años de implantación, adaptándose a zonas templado-cálidas con baja frecuencia e intensidad de heladas. Estos requerimientos restringen su implantación en los sectores litoraleños de Buenos Aires y sur de Entre Ríos y Santa Fe (Moschini 2000; Figura 1.3, panel derecho). En cuanto a los requerimientos edáficos, presenta los mayores rendimientos en suelos fértiles y profundos, ligeramente ácidos y sin salinidad (Cozzo 2007). A pesar de su limitada plasticidad edafoclimática, es la principal especie latifoliada cultivada en el país (si bien no existen estadísticas oficiales actuales, se puede estimar que más de 200.000 ha están cultivadas con esta especie, concentradas principalmente en Corrientes y Entre Ríos). Esto se debe a que presenta una

combinación de alta productividad (20-50 m³ ha⁻¹ año⁻¹), buena forma y madera relativamente liviana, con una densidad media aparente de aproximadamente 510 kg m⁻³ (Martinuzzi 2010), lo cual le brinda buenas características de trabajabilidad y resistencia (Carpinetti et al. 1995, Sanchez Acosta 1995, López et al. 2015). Estas características la hacen adecuada para una gran diversidad de usos: postes impregnados de líneas aéreas, tablas y tirantes, parquet, tableros de fibra MDF, tableros de partículas (aglomerado), celulosa, y leña (Sanchez Acosta & Sepliarsky 2005).

b) *Eucalyptus globulus* Labill.

Su zona de distribución original es, principalmente, a lo largo de la costa este de Tasmania (Figura 1.4, panel izquierdo). Suele crecer en terrenos suavemente ondulados cerca del mar, pero el mejor desarrollo se presenta en valles húmedos de áreas montañosas, sobre suelos francos de buena calidad, aunque en las zonas costeras a menudo se encuentra en suelos arenosos bastante pobres. En los sitios donde se desarrolla naturalmente, la temperatura media del mes más cálido suele oscilar entre 18 y 24 °C y la del mes más frío, entre 0 y 7 °C, con una baja incidencia de heladas y un régimen pluviométrico de 600 a 1400 mm anuales, de distribución uniforme, con máximo en invierno (Boland et al. 2006). En Argentina, encuentra las mejores condiciones ecológicas para su cultivo en el sudeste de la provincia de Buenos Aires, más precisamente la zona comprendida entre Mar del Plata, Balcarce y Necochea. Esta faja costera con influencia marítima resulta la de mayor aptitud climática para la implantación de esta especie debido a que presenta sensibilidad a heladas (aunque algo menor que *E. grandis*) y a altas temperaturas, y tolerancia media a sequía, con preferencia por sitios con escasa amplitud térmica y régimen de lluvias uniforme, superior a 600 mm (Moschini 2000, Pathauer 2005, Cozzo 2007, Ramilo et al. 2018). Su sensibilidad a heladas limita el desarrollo de esta especie hacia el oeste de la provincia de Buenos Aires, y su sensibilidad a altas temperaturas limita su expansión hacia el noreste, mientras que en el noroeste el régimen estival de lluvias influye negativamente en su aptitud (Moschini 2000, Figura 1.4, panel derecho). En cuanto a los suelos, esta especie requiere para un normal desarrollo suelos profundos, bien drenados, no salinos ni alcalinos, de textura franco arenoso a franco arcilloso (Pathauer 2005).

Sus características de rápido crecimiento, tolerancia moderada a la sequía y madera semipesada, con una densidad media aparente de aproximadamente 780 kg m⁻³ (Martinuzzi 2010) y una excelente calidad de fibras para la producción de papel de impresión (Drew et al. 2008, Drew et al. 2009) la han consolidado como una de las principales especies del género cultivadas a nivel mundial, con más de 2 millones de hectáreas plantadas (López 2010). Además de la producción de papel, otro uso de importancia es en la producción de aceite esencial a partir de sus hojas. En nuestro país, desde mediados de la década de 1980 se comenzó a exportar la madera de esta especie hacia Europa y Japón, en forma de madera rolliza y de chips, para la industria celulósica-papelera. Al principio se aprovecharon las cortinas rompevientos y pequeñas

forestaciones y luego se comenzaron a realizar plantaciones con semillas de procedencia local, chilena y portuguesa, aumentando la calidad de las masas que alcanzaron crecimientos del orden de $30 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$. Hacia fines de la década de 1990 se registraron las mayores tasas de forestación, que alcanzaron las 2.000-2.500 ha anuales. A principios de la década del 2000 la exportación fue interrumpida lo que, sumado a la crisis económico-institucional y el contexto macroeconómico posterior, redundó en una disminución en la tasa de plantación. Como consecuencia, la superficie forestada disminuyó significativamente, de 15.000 ha estimadas en el año 2005 a 5.622 ha para el año 2011, momento donde se realizó el inventario de macizos forestales (Pathauer 2005, MAA-BA 2011, Di Marco 2015, Ramilo et al. 2018).

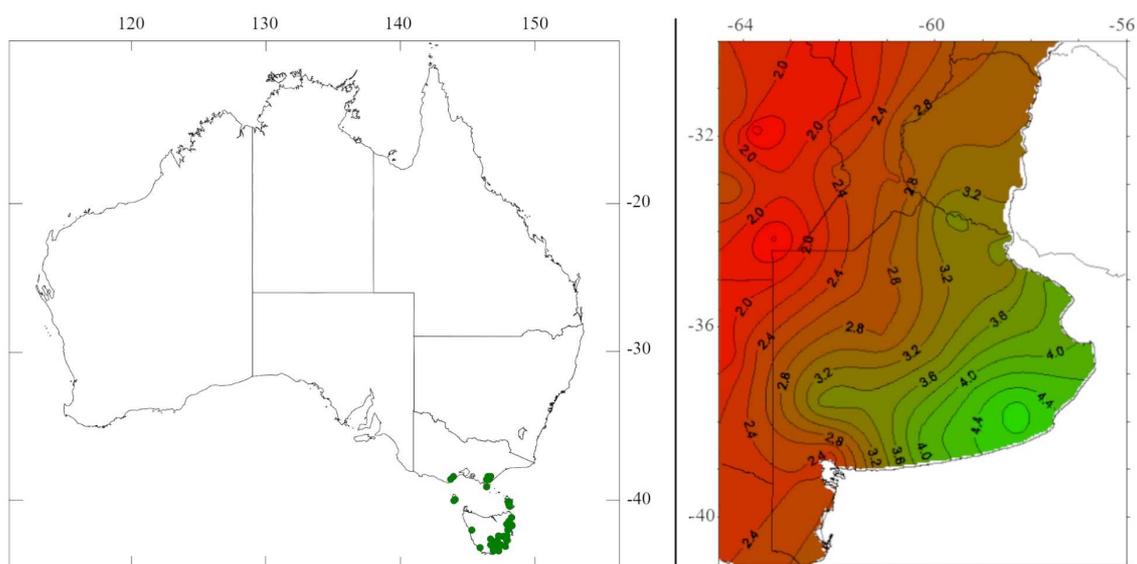


Figura 1.4. Panel izquierdo: Zona de distribución natural de *Eucalyptus globulus* (modificado de Boland et al. 2006). Panel derecho: Aptitud climática de *E. globulus*, con especial hincapié en la región pampeana (modificado de Moschini 2000). Mayor número (color verde) indica mayor aptitud climática.

c) *Eucalyptus viminalis* Labill.

Esta especie crece naturalmente desde llanuras costeras hasta mesetas y montañas de Australia continental y Tasmania (Figura 1.5, panel izquierdo), pero muestra el mejor desarrollo en valles montañosos. Se desarrolla preferentemente en suelos arenosos o franco-arenosos húmedos y bien drenados, pero también puede hacerlo en suelos más pesados o en piedra caliza. En esa distribución relativamente amplia, el clima es variado, con temperaturas medias del mes más cálido entre 18 y 30 °C, mientras que la del mes más frío se ubica entre 3 y 7 °C, con una incidencia de heladas que, dependiendo de la zona, puede ser bastante alta (hasta 100 al año en las mayores alturas), y un régimen de lluvias uniforme entre 500 y 1700 mm anuales, con máximo en invierno (Boland et al. 2006). Esta variabilidad, tanto geográfica como ambiental, ha producido razas ecológicas adaptadas a diferentes condiciones de pluviometría y tipos de suelo (Ladiges & Ashton 1974) lo cual genera diferencias en resistencia a la sequía (Ladiges 1974).

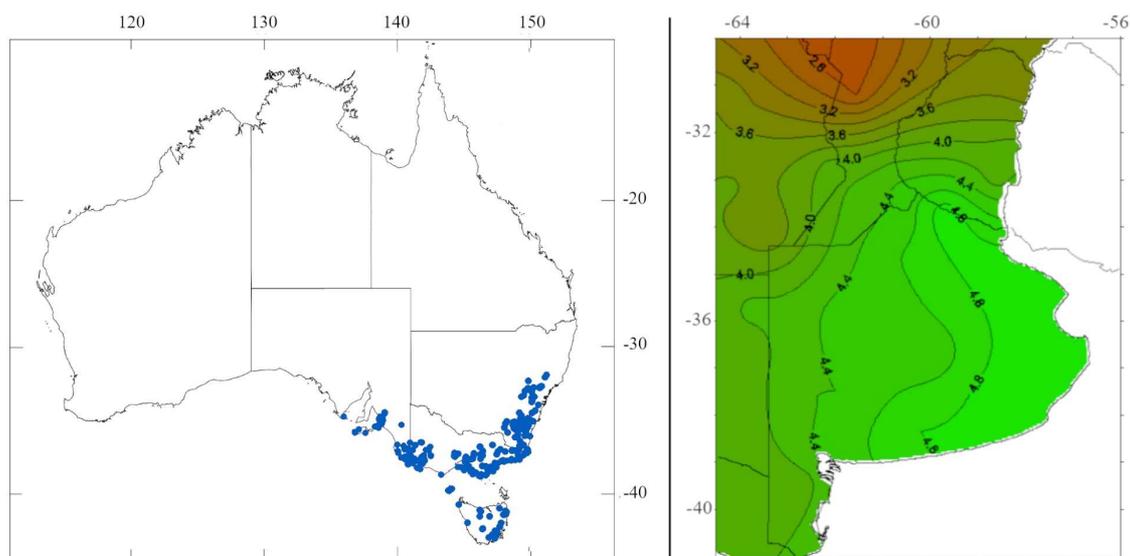


Figura 1.5. Panel izquierdo: Zona de distribución natural de *Eucalyptus viminalis* (modificado de Boland et al. 2006). Panel derecho: Aptitud climática de *E. viminalis*, con especial hincapié en la región pampeana (modificado de Moschini 2000). Mayor número (color verde) indica mayor aptitud climática.

En Argentina, los materiales genéticos introducidos de esta especie han encontrado condiciones favorables para su cultivo en una amplia región que comprende la provincia de Buenos Aires, sur de Córdoba y Santa Fe y este de La Pampa y, en menor medida, en pequeñas parcelas en San Luis, Mendoza y algunas áreas de montaña de Córdoba. Su resistencia a estrés hídrico (hasta 200 mm anuales) y a altas temperaturas, y su gran resistencia a heladas (la más resistente de las especies consideradas, soportando mínimas de hasta $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$), así como la necesidad de un régimen pluviométrico relativamente uniforme y su adaptabilidad a una amplia variedad de suelos (desde arenosos profundos hasta arcillosos pobres) la hacen muy adecuada para su implantación en la zona centro, oeste y suroeste de la provincia de Buenos Aires (Moschini 2000, Pathauer 2005; Figura 1.5, panel derecho). Si bien climáticamente la zona este de la provincia (*Pampa Deprimida*) es muy apta para esta especie, la presencia de suelos fuertemente arcillosos y sódicos es una gran limitante para su cultivo (Cozzo 2007). Por otro lado, su amplia zona de distribución potencial se superpone con las áreas donde otras especies encuentran las condiciones edafoclimáticas más adecuadas, como por ejemplo el caso de *E. globulus* en el sudeste bonaerense (Pathauer 2005).

Su introducción en varios países se debió a la combinación de alto potencial de crecimiento, resistencia a estrés hídrico y heladas y madera de excelente calidad para pulpa y tableros (Cappa et al. 2010), y probablemente Argentina sea el país donde más se la cultiva a nivel mundial (Cozzo 2007). Los mayores crecimientos se dan en el centro de la provincia de Buenos Aires (donde presenta incrementos medios de entre $25\text{ y }30\text{ m}^3\text{ ha}^{-1}\text{ año}^{-1}$), área caracterizada por tener suelos arenosos, húmiferos, profundos y bien drenados (Cappa et al. 2010). A pesar de ello, cuestiones de orden cultural y financiero hacen que la superficie plantada con esta especie represente una fracción ínfima del área potencial disponible en la región, inclusive en sectores con presencia de suelos no

compatibles con la actividad agrícola (Ferrere et al. 2008, Cappa et al. 2010). Como resultado, la mayor parte de las forestaciones se encuentran en forma de cortinas y pequeños montes como apoyo de la actividad agropecuaria, si bien existen también plantaciones comerciales (Pathauer 2005). En cuanto a las características de su madera, esta es clasificada como semipesada, con una densidad media aparente que ronda los 720 kg m⁻³ (Martinuzzi 2010), y entre los destinos que se le han encontrado en nuestro país destacan el uso para parquet, tableros de partículas (Sanchez Acosta & Sepiarsky 2005), tableros compensados (Iwakiri et al. 2013) y, recientemente, para la producción de celulosa.

d) *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.

Es el eucalipto de mayor amplitud en su distribución natural, encontrándose en casi todas las regiones de Australia continental (Figura 1.6, panel izquierdo) y el de mayor distribución mundial en zonas áridas (Eldridge 1994). Se lo encuentra a lo largo de casi todos los cursos de agua estacionales en las zonas áridas y semiáridas de Australia, además de arroyos y ríos en zonas más húmedas. Aunque es principalmente un árbol ribereño, a veces se extiende a las llanuras aluviales y las laderas de montañas. Puede crecer en suelos arenosos, franco-arenosos, franco-arcillosos y calcáreos. Considerando todo el rango ambiental de distribución, se lo encuentra en sitios con temperatura media del mes más cálido oscilante entre 26 y 39 °C y temperatura media del mes más frío entre 1 y 18 °C, con un rango de precipitaciones entre 150 y 1100 mm anuales (Boland et al. 2006).

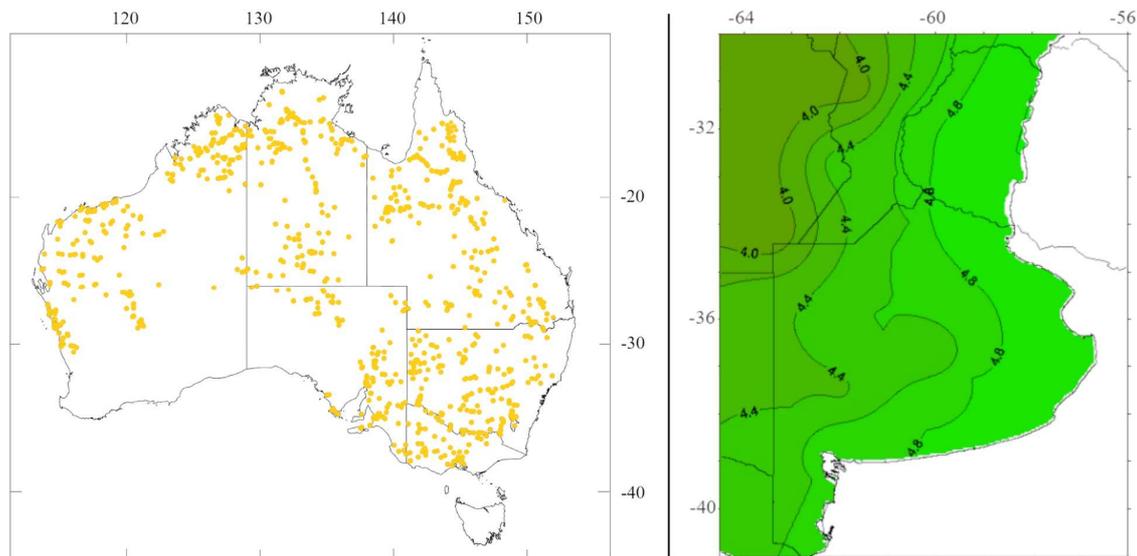


Figura 1.6. Panel izquierdo: Zona de distribución natural de *Eucalyptus camaldulensis* (modificado de Boland et al. 2006). Panel derecho: Aptitud climática de *E. camaldulensis*, con especial hincapié en la región pampeana (modificado de Moschini 2000). Mayor número (color verde) indica mayor aptitud climática.

En su zona de origen, se distinguen dos grupos poblacionales: septentrional y meridional, con caracteres morfológicos y fisiológicos diferentes. El material genético introducido en la Argentina correspondería al segundo grupo, el cual, dada su variabilidad genética, presenta una gran plasticidad, aspecto que le permite adaptarse a condiciones extremas de temperatura, así como a distintos tipos de suelos y condiciones de humedad (sequía o anegamiento) (Moschini 2000; Figura 1.6, panel derecho). Estas características le brindan rusticidad, pero, al ser materiales con poco o ningún grado de mejoramiento genético, limitan su capacidad productiva (Cozzo 2007). Así, en la región pampeana, alcanza crecimientos medios del orden de 20-25 m³ ha⁻¹ año⁻¹ (MAA-BA 2010). Por otro lado, el hecho de ser una especie de madera pesada, con una densidad media aparente de 870 kg m⁻³ (Martinuzzi 2010) y alto poder calorífico, la hacen adecuada para usos energéticos (Sanchez Acosta 1995, González & Moglia 2017). Por ello, en las zonas donde se cultiva, se lo usa principalmente como productor de leña y carbón, si bien admite otros usos como la producción de parquet, tableros de fibra Hardboard (*Chapadur*), tableros de partículas y muebles (Sanchez Acosta & Sepiarsky 2005).

Relevancia del sistema de estudio

El género *Eucalyptus* no solamente ofrece una gran variedad de especies, sino también la posibilidad de generar combinaciones híbridas que permitan asegurar la adaptabilidad a nuevos escenarios, producidos, en gran medida, por el fenómeno del cambio climático. Si bien *Eucalyptus grandis* es la especie del género de mayor importancia en el país, se torna necesario el estudio de especies con diferentes nichos ecológicos o usos específicos (López et al. 2015). En nuestro país existen programas de mejoramiento genético forestal (PMGF), a cargo del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), con mayor desarrollo para *E. grandis*, *E. globulus* y *E. viminalis*, y con menor desarrollo en *E. camaldulensis*. A esta última especie, sin embargo, se la ha utilizado dentro de los PMGF en el desarrollo de genotipos híbridos con *E. grandis* para aumentar la resistencia al estrés ambiental de este último. En países como Chile y Nueva Zelanda, los programas de mejoramiento genético están dando cada vez mayor importancia a *E. camaldulensis*, particularmente por su alta resistencia a estrés (expuesto en diversas exposiciones orales dictadas en Reunión IUFRO 2012 “Eucaliptos mejorados para aumentar la competitividad del sector forestal en América Latina”, Pucón, Chile), lo cual permite su cultivo en zonas donde *Pinus radiata* (en Nueva Zelanda) o *E. globulus* (en Chile) no pueden cultivarse por sus altos requerimientos de sitio. Cabe destacarse que los resultados de esta tesis son de interés para los mencionados PMGF de Argentina.

Como se mencionó precedentemente, las cuatro especies seleccionadas poseen distintos requerimientos de sitio asociados a distintas tolerancias a estrés, especialmente por heladas y por sequía (Tabla 1.2), constituyendo un buen modelo para poner a prueba las hipótesis de este proyecto. Por otro lado, el sistema de estudio resulta adecuado para describir tendencias del género en su conjunto ya que se abarca todo el rango de

densidades de madera del mismo, desde 500 kg m^{-3} hasta casi 900 kg m^{-3} . Los resultados obtenidos contribuyen al conocimiento de los mecanismos de resistencia al estrés ambiental en especies arbóreas latifoliadas, y en particular para el género *Eucalyptus*. Si bien este tiene una gran importancia comercial a nivel mundial y sus bosques representan ecosistemas únicos en Oceanía, existe un notable vacío de conocimiento en cuanto al rol funcional de la madera en este género. En este sentido, en contraposición a la abundante cantidad de publicaciones respecto a aspectos ecológico-productivos del género (productividad, uso de recursos, respuesta a la silvicultura, etc.), es sorprendente la relativa escasez de antecedentes sobre la relación anatómico-funcional del tejido xilemático.

Tabla 1.2. Cuadro resumen de las características de resistencia a estrés por sequía y frío de las especies consideradas en este trabajo.

Resistencia	Sequía	Frío
+ resistente	<i>E. camaldulensis</i>	<i>E. viminalis</i>
	<i>E. viminalis</i>	<i>E. camaldulensis</i>
	<i>E. globulus</i>	<i>E. globulus</i>
- resistente	<i>E. grandis</i>	<i>E. grandis</i>

Luego de una búsqueda intensiva de información sobre curvas de vulnerabilidad a la cavitación para este género, al momento de iniciar este trabajo sólo fue posible encontrar 5 publicaciones en donde se midiesen ambos aspectos de anatomía y vulnerabilidad a la cavitación (Franks et al. 1995; Pammenter & Vander Willigen 1998; Prior & Eamus 2000; Feild & Brodribb 2001; Pita et al. 2003). En estos trabajos sólo se tuvieron en cuenta los vasos, aunque ya se sabía con anterioridad del aporte de las traqueidas vasicéntricas como miembros del sistema hidráulico (Carlquist 1985). En cuanto al valor adaptativo de la vulnerabilidad a la cavitación en este género, pueden mencionarse además de los trabajos citados, los de Rice et al. (2004) y Poot & Veneklaas (2013), que relacionan la cavitación diferencial con fenómenos de mortalidad de árboles en respuesta a eventos de sequía extrema en bosques nativos de Australia (ninguna especie comercial), y el de Franks et al. (1995) que asocian la diferente vulnerabilidad a la cavitación en plantines de *E. camaldulensis* al origen geográfico de las dos procedencias evaluadas, más y menos xéricas. Estos resultados sugerían que la madera podía jugar un rol determinante en la resistencia al estrés abiótico en este género.

Más allá del valor conceptual del conocimiento generado, la información obtenida de especies con aptitud diferencial para su implantación en diferentes regiones seguramente contribuirá a la selección genética y la planificación de las forestaciones en base a materiales adecuados considerando no sólo su productividad potencial y su uso industrial, sino también su capacidad de respuesta a condiciones de estrés ambiental.

Objetivos

En función del problema de estudio planteado y el sistema de estudio elegido para llevar a cabo este trabajo se plantearon los siguientes objetivos.

Objetivo general

Conocer el valor funcional de la microestructura de la madera de *Eucalyptus* en relación con la resistencia a sequía y heladas. Este conocimiento es fundamental para entender y predecir la respuesta productiva en el ambiente actual, así como a variaciones en el mismo debido al proceso de cambio climático y/o a su instalación en ambientes más marginales por competencia con otros usos de la tierra.

Objetivos específicos

- Analizar y comparar la estructura anatómica de la madera de distintas especies de *Eucalyptus* (*E. grandis*, *E. viminalis*, *E. camaldulensis* y *E. globulus*), caracterizadas por poseer una gran variación en densidad de madera y requerimientos de hábitat (resistencia a estrés), determinando las diferencias morfológicas de elementos de vaso, traqueidas vasicéntricas, fibrotraqueidas y fibras y la proporción de tipos celulares (vasos, fibras, traqueidas y parénquima).
- Relacionar, a nivel inter e intraespecífico, la estructura anatómica de la madera con parámetros funcionales de la misma como conductividad hidráulica específica máxima, capacitancia, vulnerabilidad a la cavitación (VC) por estrés por frío (procesos de congelamiento-descongelamiento), y por sequía (tensión) en *E. grandis*, *E. viminalis*, *E. camaldulensis* y *E. globulus*.
- Determinar las relaciones entre perfiles de espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS) de la madera de *Eucalyptus* y su anatomía, microdensidad de la madera y función, de manera de contribuir al desarrollo de metodologías de selección genética en base a caracteres adaptativos de fácil cuantificación.

Hipótesis

A fin de alcanzar los objetivos planteados, el presente trabajo se basó en las siguientes hipótesis generales:

- Hipótesis I: Las tasas máximas de conductividad hidráulica de la madera de *Eucalyptus* se relacionan con el diámetro medio y máximo de los vasos, mientras que la seguridad hidráulica del tejido se correlaciona con las características de los elementos celulares asociados a los vasos (traqueidas vasicéntricas, fibras, parénquima) que contribuyen a la reparación de embolismos y/o capacitancia. Debido a ello, es posible encontrar genotipos que optimicen eficiencia y seguridad

conductiva, lo que podría resultar en altas tasas de crecimiento cuando las condiciones ambientales son favorables y un buen desempeño ante condiciones de sequía o heladas.

- Hipótesis II: A nivel del género, existe correlación en la resistencia a estrés por heladas y por sequía (tolerancia general al estrés abiótico) en las distintas especies, que puede ser explicada por las características diferenciales de su madera, que a su vez determinan los requerimientos ambientales de las diferentes especies.
- Hipótesis III: Existen patrones de variación en los perfiles de espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS) de la madera de *Eucalyptus* que pueden ser explicados por la variabilidad medida en los niveles de conductividad hidráulica y vulnerabilidad a la cavitación de distintos genotipos.

Estas hipótesis serán puestas a prueba total o parcialmente a lo largo de los capítulos subsiguientes, en los cuales se abordarán diferentes metodologías para alcanzar los objetivos planteados:

Capítulo 2: Caracterización anatómica de la madera de 3 especies de *Eucalyptus* a nivel de fuste y ramas, análisis interespecífico de la variación de esos caracteres y establecimiento de relaciones con la densidad de madera y la eficiencia hidráulica de estas especies.

Capítulo 3: Análisis interespecífico de la vulnerabilidad a la cavitación por sequía en 3 especies de *Eucalyptus* y su relación con la densidad de la madera y la anatomía de estas especies, con el fin de dilucidar el rol primario de las traqueidas vasicéntricas y cuantificar el grado de compromiso entre eficiencia y seguridad conductiva.

Capítulo 4: Análisis intraespecífico de la vulnerabilidad a la cavitación por sequía en progenies de densidad contrastante para 2 especies de *Eucalyptus*, con el fin de modelar las relaciones entre caracteres y propiedades de la madera y establecer como determinan la resistencia a la cavitación.

Capítulo 5: Análisis interespecífico de la vulnerabilidad a la cavitación por frío en 3 especies de *Eucalyptus* y su relación con la densidad de la madera y la anatomía de estas especies.

Capítulo 6: Establecimiento de calibraciones entre espectros NIR y características anatómicas, físicas e hidráulicas a nivel de rama y fuste, y determinación de las porciones que resultan de importancia para la estimación de esas propiedades.

Capítulo 7: Integración de los principales resultados, establecimiento de posibles líneas de investigación a futuro y conclusiones.



*Capítulo 2: Anatomía de la madera de *Eucalyptus* y sus posibles implicancias funcionales*^{1 2}

Introducción

La estructura del xilema varía a lo largo del árbol y con la edad del individuo (Gartner 1995) y tiene grandes implicancias en sus funciones (Zanne et al. 2010). A su vez, el xilema de las especies angiospermas conforma un tejido anatómicamente complejo formado esencialmente por tres componentes celulares: los vasos con función de conducción de agua, las fibras de sostén, y el parénquima, tanto radial como axial, de reserva y transporte de agua y nutrientes (Pratt & Jacobsen 2017). También pueden aparecer otros tipos celulares con anatomía y función intermedia entre los vasos y fibras, tales como las traqueidas y fibrotraqueidas (Carlquist 1985), las cuales muestran capacidad conductiva y resistencia a la formación de embolismos (Sano et al. 2011). Además de las mencionadas funciones de sostén, las fibras participarían indirectamente en el transporte de agua al colaborar en la evitación de la implosión de los vasos debido a la tensión generada durante el proceso de conducción (Jacobsen et al. 2005), o bien aportando agua para disminuir las tensiones en el xilema (Pratt et al. 2007). Los radios, compuestos únicamente de parénquima, pueden presentar una gran variedad de tamaños estableciendo una comunicación radial entre los elementos celulares axiales, y particularmente con los elementos de conducción, formando una red tridimensional (Carlquist 2012). A pesar de la falta de consenso (p.ej. Charrier et al. 2016), muchos autores proponen que los radios tendrían un rol central en la reparación de embolismos, aportando los solutos necesarios para generar un gradiente osmótico. Este gradiente permitiría la entrada de agua en el vaso cavitado desde células cercanas que actuarían como capacitores (Tyree et al. 1999, Hacke & Sperry 2003, Salleo et al. 2006, Brodersen et al. 2010). A su vez, las células de parénquima radiales procumbentes conducen fotoasimilados radialmente y los acumulan (Carlquist 2012), mientras que las células radiales erectas conducen verticalmente y proveen una buena interrelación con el parénquima axial, permitiendo que se forme una red de células vivas en la madera (Carlquist 2012). El parénquima axial difuso está altamente correlacionado con la presencia de traqueidas y se presenta usualmente disperso entre ellas (Carlquist 2012). Este hecho sugiere una relación con la función de conducción, al constituir reservorios de agua que permitirían el mantenimiento de la columna de agua en los vasos (capacitancia) (Pratt & Jacobsen 2017). Por todo lo expuesto, resulta evidente que la complejidad

¹ La mayor parte de los resultados del presente capítulo ha sido publicada en el siguiente artículo: Barotto, A.J., Monteoliva, S., Gyenge, J., Martínez-Meier, A., Moreno, K., Tesón, N., Fernández, M.E. 2017. Wood density and anatomy of three *Eucalyptus* species: Implications for hydraulic conductivity. *Forest Systems*, 26 (1): e010. DOI: 10.5424/fs/2017261-10446

² Agradezco particularmente a la Dra. Natalia Tesón por compartir conmigo material vegetal proveniente de su investigación, el cual fue integrado en el análisis llevado a cabo en el presente capítulo.

anatómica de la madera de angiospermas contribuye coordinadamente al proceso de transporte de agua, el cual depende en forma directa de las características de los vasos, e indirecta del conjunto de las células acompañantes.

El género *Eucalyptus* presenta una alta diversidad, con aprox. 700 especies que ocupan una gran variedad de nichos ecológicos. La madera de este género exhibe características particulares, presentando porosidad difusa; elementos de vaso solitarios de gran diámetro (50-170 μm ; Pfautsch et al. 2016), poco numerosos, en disposición diagonal (Figura 2.1 A, F), con placa de perforación simple y puntuaciones intervasculares areoladas, alternas, ornadas y de apertura generalmente elíptica. Presenta parénquima axial paratraqueal vasicéntrico y/o apotraqueal difuso, traqueidas vasicéntricas, fibras de contorno angular y/o circular, diferenciadas en dos tipos, una con puntuaciones simples (fibras libriformes) y otra con puntuaciones areoladas (fibrotraqueidas) y parénquima radial en radios uniseriados, biseriados, triseriados y, excepcionalmente, tetraseriados (Villegas & Rivera 2002; Figura 2.1 B-F). En la madera de este género, los vasos se hallan siempre rodeados por traqueidas vasicéntricas. Estas traqueidas, como así también el parénquima axial, son raramente cuantificados debido a que suelen ser difíciles de identificar en corte transversal. Se ha descrito la presencia de parénquima axial vasicéntrico en *E. globulus* y *E. viminalis* y escaso en *E. grandis*, aunque no se ha cuantificado (Dadswell 1972, Villegas & Rivera 2002, Pirralho et al. 2014). Esta anatomía compleja resulta en un amplio rango de densidades de madera dentro del género, con especies de densidad menor a 400 kg m^{-3} hasta otras con una densidad mayor a 1000 kg m^{-3} (Chave et al. 2009, Zanne et al. 2009). Esta gran variabilidad en densidades de madera podría ser en parte reflejo de la alta radiación adaptativa del género, si bien son pocos –comparativamente con los existentes para otras especies y géneros– los antecedentes que relacionan las características de la madera con su resistencia al estrés ambiental. Existe cierta variación interespecífica que ha sido cuantificada por diversos autores con fines de identificación taxonómica o clasificación de calidad para pulpa y papel o aserrado. Dentro de la estructura xilológica básica descrita anteriormente, para algunas especies se han encontrado diferencias en el parénquima radial (estructura y cantidad), el parénquima axial y la densidad de madera (Dadswell 1972, Villegas & Rivera 2002, Pirralho et al. 2014), pero no se ha establecido una asociación con la función. En este sentido, a pesar del detallado conocimiento de su anatomía y de la importancia de este género a nivel mundial, existe un notable vacío de conocimiento en cuanto al rol funcional de su madera.

De acuerdo con la teoría actual, que relaciona anatomía y función de la madera en especies angiospermas (Carlquist 2012), el conjunto de caracteres anatómicos que conforman la madera estaría relacionado con algunos de sus requerimientos ecológicos, y podría ser un indicador de la resistencia diferencial al estrés en sus respectivas zonas de distribución natural o cultivo. Desde el punto de vista evolutivo puede generalizarse que los caracteres xilológicos han sido primeramente de alta resistencia hidráulica para luego diferenciarse en taxones con alta resistencia y otros con baja resistencia hidráulica, siendo este último carácter más reciente (Carlquist 2012).

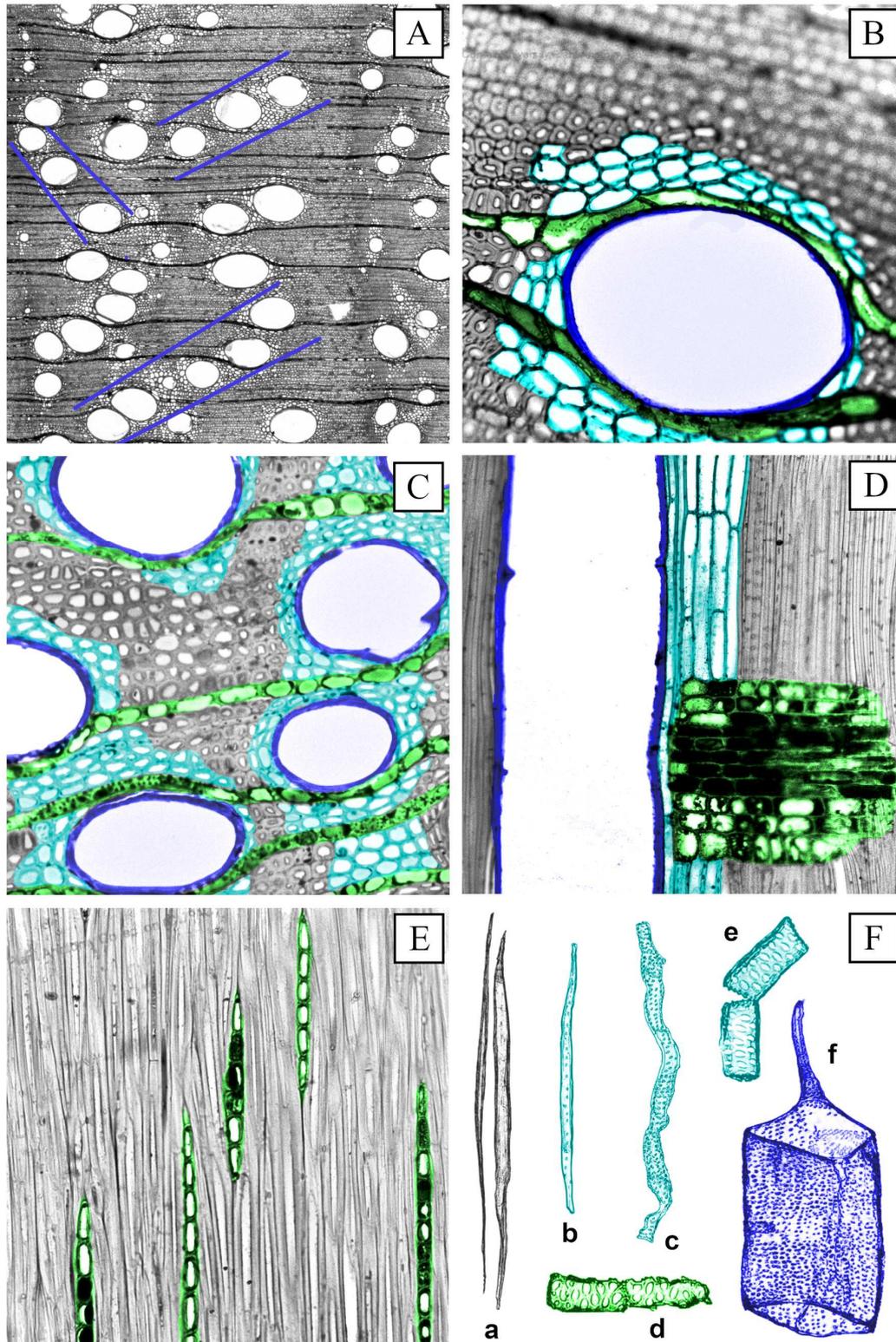


Figura 2.1. Imágenes microscópicas de los elementos celulares que componen la madera de fuste y ramas de *Eucalyptus*, en diferentes aumentos y secciones de estudio. A) Corte transversal (CT) 4X - fuste. Las líneas indican la disposición diagonal de los vasos respecto al eje radial B) CT 20X - fuste. C) CT 20X - ramas, D) Corte longitudinal radial (Crd) 20X - fuste. E) Corte longitudinal tangencial (Ctg) 20X - fuste. F) diferentes elementos individualizados. a) fibras libriformes, b) fibrotraqueidas, c) traqueidas vasicéntricas, d) parénquima radial, e) parénquima axial y f) elementos de vaso. Los colores indican diferentes estructuras y los elementos celulares que las componen.

Es decir, en términos generales, la madera ha ido aumentando su conductividad hidráulica, lo cual es necesario para proveer eficientemente agua desde las raíces hasta las hojas y permitir así la apertura estomática y fijación de C, a expensas de ir disminuyendo su resistencia al estrés. En las especies angiospermas, la conductividad hidráulica (kh) y la vulnerabilidad a la cavitación están determinadas primariamente por las características anatómicas de los vasos por donde circula el agua. Sin embargo, estudios anatómicos en diferentes familias han demostrado que existen otros tipos celulares, además de los vasos, que cumplen un rol decisivo en el compromiso entre eficiencia y seguridad conductiva (Cai et al. 2014; Pan & Tyree 2019). En este sentido, a nivel general existe una correspondencia entre la densidad de la madera y la resistencia a la cavitación, lo que sugiere que el engrosamiento de la pared de los vasos y las fibras estaría correlacionado con la tensión que deben soportar los vasos durante períodos de alta tensión en el xilema (Hacke et al. 2001).

La densidad de la madera juega un rol fundamental en la estrategia ecológica de las plantas (Chave et al. 2009). Dentro del xilema, esta característica se ve afectada por la estructura y proporción relativa de los diversos tipos celulares que conforman la madera (Ziemińska et al. 2013). La densidad de la madera puede ser considerada como una medida de la estructura interna del xilema, reflejando la combinación de características de los diferentes elementos celulares que la componen, así como su composición química (Naidoo et al. 2006). Esta variable está directamente correlacionada con la resistencia mecánica (Gartner 1995) y con las dimensiones de los elementos celulares que la integran (Naidoo et al. 2006). La bibliografía referente al tema muestra que, en general, la fracción de vasos no se correlaciona con la densidad de la madera o lo hace negativamente (Martínez-Cabrera et al. 2009, Poorter et al. 2010, Zanne et al. 2010, Zheng & Martínez-Cabrera 2013, Ziemińska et al. 2013), mientras que las características de las fibras, principalmente la fracción de pared de fibras en el conjunto del tejido, se correlacionan muy bien con la densidad en múltiples especies (Fujiwara et al. 1991, Thomas et al. 2007, Drew et al. 2009, Zheng & Martínez-Cabrera 2013, Ziemińska et al. 2013). Sin embargo, no existen estudios donde se aborde exhaustivamente la relación de la densidad con los diferentes componentes celulares del xilema y las interacciones entre ellos.

Para adecuar el suministro de agua, las plantas pueden alterar las propiedades de la madera de varias maneras, incluyendo variaciones en la fracción de albura ocupada por vasos, la composición de esos vasos en cuanto a su distribución de tamaños, y/o el área de albura que abastece a una determinada superficie foliar (Zanne et al. 2010). Relacionada con estas variables estructurales, la conductividad hidráulica específica (ks) resulta una medida de la porosidad del xilema por unidad de área (Tyree & Ewers 1991) y, por consiguiente, del tamaño y frecuencia de vasos. Esta característica se relaciona funcionalmente con la capacidad de fijación de carbono del individuo (Hubbard et al. 2001, Santiago et al. 2004) y, por lo tanto, con su crecimiento (p.ej. Brodribb et al. 2005, Kondoh et al. 2006) y supervivencia. Asimismo, diversos trabajos han mostrado el fuerte valor adaptativo de la resistencia a pérdidas de conductividad hidráulica (vulnerabilidad a la cavitación) en distintas especies leñosas, observándose en estudios multiespecíficos

un aumento promedio de la resistencia a la cavitación a medida que aumenta la aridez (Pockman & Sperry 2000, Maherali et al. 2004), así como el rol esencial de este carácter para explicar eventos de mortalidad de árboles ante sequías extremas (Anderegg et al. 2012, Choat et al. 2018). A partir de un análisis global (Zanne et al. 2010) se ha encontrado que la eficiencia hidráulica está más influenciada por el espacio disponible para mover agua (carácter más conservativo en las especies) que por la forma en que ese espacio se distribuye en los distintos vasos, característica que presenta un mayor rango de variación.

Objetivos

Con el fin de contribuir al conocimiento de las relaciones entre la anatomía conocida del género *Eucalyptus* y la función que esta desempeña, así como las implicancias ecológicas potenciales de la diversidad anatómica de la madera dentro de un mismo género, se propusieron como objetivos:

- Caracterizar la anatomía de la madera (morfometría de vasos, fibras, traqueidas vasicéntricas y parénquima axial y radial) a nivel de fuste y ramas de *E. grandis*, *E. globulus* y *E. viminalis*.
- Analizar variaciones interespecíficas y establecer relaciones entre los caracteres anatómicos y la densidad de la madera, considerando a esta última como un determinante importante de la funcionalidad de la madera.
- Analizar las relaciones entre los caracteres anatómicos y la densidad de la madera con la eficiencia hidráulica teórica.
- Discutir las posibles relaciones encontradas con las condiciones ecológicas generales necesarias para el desarrollo de estas especies.

Cabe destacarse que en este capítulo no se presentan mediciones funcionales (para ello, ver próximos capítulos) sino que se realizan inferencias funcionales y ecológicas a partir de las características anatómicas y estructurales de la madera, y se contrastan con la bibliografía. Además, en este capítulo se ahonda en las relaciones entre la anatomía de las ramas y del fuste, elemento a tener en cuenta considerando que las mediciones funcionales solo pueden hacerse (al menos en árboles adultos) en ramas, mientras que la información de la madera normalmente reportada corresponde a fustes.

Hipótesis

- a) Las principales variables que determinan los niveles de conductividad hidráulica teórica y, en consecuencia, los crecimientos medios observados en condiciones de cultivo son aquellos relacionados con los vasos y sus células acompañantes.

- b) La conductividad hidráulica específica (teórica) está mayormente determinada por la fracción de lúmenes disponible para transportar agua que por la composición (distribución de tamaños) de vasos.
- c) Las principales variables que determinan la densidad de la madera en cada especie son aquellas relacionadas con la matriz fibrosa del xilema.
- d) Dentro de las especies, existe una estrecha relación entre las características de los componentes celulares que conforman el xilema a nivel de fuste y a nivel de rama (p.ej. las especies con vasos más grandes a nivel de fuste también poseerán los vasos más grandes a nivel de ramas, aunque el tamaño medio de los mismos sea menor en estas últimas).
- e) Los requerimientos ecológicos de cada especie están determinados, al menos en parte, por las características de su madera.

Materiales y métodos

Sitio y material vegetal

a) Ramas

Se trabajó con material proveniente de 24 ejemplares adultos de tres especies de *Eucalyptus*: *E. grandis* (n = 12), *E. viminalis* (n = 6) y *E. globulus* (n = 6). En el caso de *E. grandis*, se analizaron muestras de 4 clones instalados en Concordia, provincia de Entre Ríos (31°22' S, 58°07' O, 43 msnm; Figura 2.2), pertenecientes a la red de ensayos genéticos de INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria). Más información sobre estos clones puede obtenerse en Tesón et al. (2011, 2012). Para las otras dos especies se seleccionaron árboles, de implantación no comercial, instalados en Tandil, provincia de Buenos Aires (37°20' S, 59°08' O, 188 msnm; Figura 2.2). Se colectaron ramas terminales de la porción basal de la copa de los diferentes individuos, procurando que las mismas tuvieran dimensiones similares (4-10 mm de diámetro con corteza).

b) Fuste

Para el análisis a nivel de fuste se muestrearon 86 individuos adultos de las mismas tres especies de *Eucalyptus* utilizadas para el análisis a nivel de rama (*E. grandis*, *E. viminalis* y *E. globulus*), instalados en diferentes ensayos: 20 individuos de 11-15 años de *E. globulus*, 30 de *E. viminalis* y 36 de *E. grandis*, ambos de 14 años. Los datos de *E. viminalis* pertenecen a individuos que también forman parte de la red de ensayos genéticos de INTA (EEA Castelar), instalados en las localidades de Del Valle (35°51' S, 60°43' O, 63 msnm) y Guaminí, provincia de Buenos Aires (37°6' S, 62°26' O, 95 msnm). El material correspondiente a *E. globulus* proviene de individuos creciendo en plantaciones comerciales con dos fuentes de semillas –local y Valdivia– instalados en la localidad de Necochea, provincia de Buenos Aires (38°57' S, 58°57' O, 17 msnm) que fueron muestreados en el marco de otro proyecto de investigación y sus resultados están parcialmente publicados (Igartúa & Monteoliva 2010). En cuanto a *E. grandis*, los

materiales muestreados se corresponden con los utilizados para el análisis a nivel de rama. Los sitios donde fueron muestreadas estas especies (Figura 2.2) se corresponden con los ambientes habituales de cultivo.

En el caso de *E. grandis* y *E. viminalis* se tomaron muestras de barreno completas (médula a corteza) a la altura del pecho (1,3 m), una por ejemplar sobre la porción de fuste con exposición norte. En *E. globulus* se tomaron muestras destructivas (rodajas) a la altura de pecho. Solo en *E. grandis* se tomaron muestras a nivel de fuste de los mismos árboles donde se tomaron muestras de ramas. Para las otras dos especies, los datos de ramas y fustes no pertenecen a los mismos individuos, por lo que no se realizaron correlaciones entre órganos a nivel de individuo. En todos los casos se analizó la porción de albura correspondiente, aproximadamente, al último período de crecimiento.

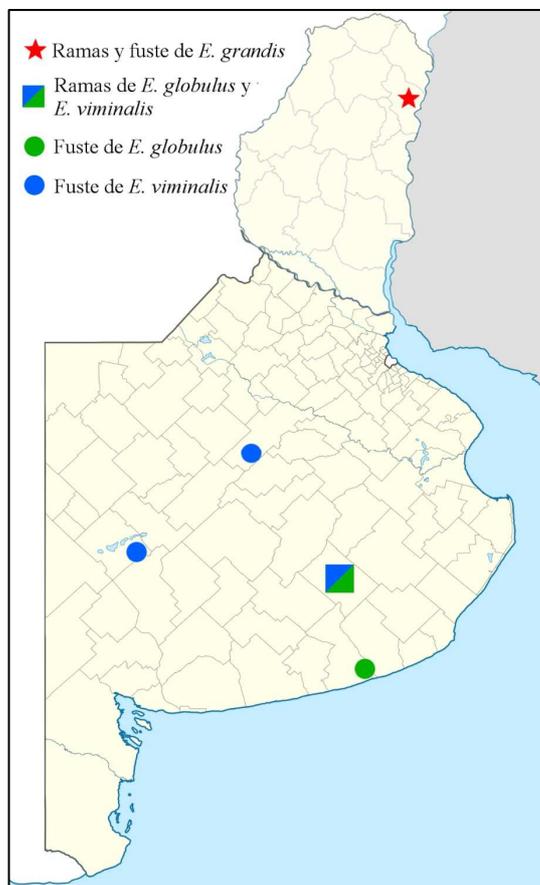


Figura 2.2. Mapa de los sitios de muestreo utilizados para llevar a cabo el análisis.

investigación (Olympus BX50 y CX31, Japón) usando el objetivo de 4X (20-25 imágenes para tomar el total del segmento muestreado) y de 20X (20 imágenes para tomar dos radios completos de médula a corteza por muestra).

Procesamiento de las muestras

Las ramas y muestras del tronco principal fueron hervidas en agua entre 2 y 4 horas para ablandarlas, a fin de obtener los cortes histológicos para realizar las mediciones anatómicas. Se obtuvieron preparados de 20-25 μm de espesor de la totalidad de la sección transversal de las ramas y de, aproximadamente, el último anillo de crecimiento en los troncos, utilizando un micrótopo de deslizamiento. Por otro lado, se realizaron macerados sobre una porción de 1 cm de largo de cada muestra, con una solución 1:1 de ácido acético glacial (6% P/V) y peróxido de hidrógeno (30% P/V) (Franklin 1945) para el conteo de fibras, traqueidas vasicéntricas y parénquima axial.

Las imágenes de la sección transversal y de macerados fueron capturadas mediante una cámara digital (Sony DXC-390, Japón; Olympus DP71, Japón; Infinity 1-2CB, Canadá) montada sobre un microscopio de

Variables anatómicas analizadas

Las imágenes fueron procesadas a través de un software específico para el análisis de imágenes (ImagePro Plus 6.0, Media Cybernetics, Carlsbad, CA, EE. UU.) a fin de cuantificar las siguientes variables:

a) Variables de vasos

Diámetro medio de vasos (DV , μm , $n = 100$ por muestra), área promedio de vasos (AV , μm^2 , $n = 100$ por muestra), frecuencia de vasos (FV , mm^{-2} , $n = 5$ fotos por muestra) y distancia intervascular (DiV , μm , $n = 10$ fotos). El diámetro y el área de vasos se midieron en sección transversal y se contabilizó su frecuencia en sectores de 1 mm^2 para obtener la frecuencia de vasos. La distancia intervascular se midió para cada elemento de vaso como la distancia lineal mínima que separa un vaso del vecino más cercano.

b) Variables de fibras

Espesor de pared de fibras (EPF , μm , $n = 100$ por muestra), diámetro de fibras (DF , μm , $n = 100$ por muestra), diámetro del lumen de fibras (DLF , μm , $n = 100$ por muestra) y fracción de pared de fibras (FPF , %, $n = 10$ fotos 200x). Para determinar el EPF se midió el espesor de las dos paredes que separan los lúmenes de dos fibras contiguas, tanto en paredes radiales como tangenciales, y luego su promedio se dividió por dos. El DLF se determinó en dirección radial y tangencial. El DF se calculó como la suma del diámetro del lumen más dos veces el espesor de pared. La FPF se calculó contabilizando la proporción del área ocupada por paredes de fibras en porciones de imágenes en corte transversal que presentaran únicamente estos elementos.

c) Proporción de elementos celulares

Se determinó la proporción (% de la cantidad de células totales) de vasos ($V\%$), parénquima radial ($R\%$), fibras ($F\%$), traqueidas vasicéntricas ($TV\%$) y parénquima axial ($PA\%$). Debido a que estos tres últimos elementos celulares no es posible distinguirlos en corte transversal de microscopía óptica, esta determinación se llevó a cabo en macerados. La identificación de cada tipo celular se realizó por el tipo y cantidad de puntuaciones de las paredes. La cuantificación se realizó siguiendo la norma TAPPI 401 om-93 contando la cantidad de los diversos tipos celulares presentes en un extendido de macerado referido a la cantidad total de células contadas ($n \geq 1000$).

d) Variables calculadas

A partir de las variables de vasos iniciales, anteriormente mencionadas, se calcularon las siguientes:

- Fracción de lúmenes (F , adimensional): es una medida de la superficie de lúmenes de vasos disponibles para conducir agua. Se calculó como el producto entre el área promedio de vasos (AV) y la frecuencia media de vasos (FV) para cada individuo.

- Composición de vasos (también conocida como “Índice de vulnerabilidad”, S , mm^4): propuesta como una medida de la distribución de tamaño de vasos dentro de la superficie total que ocupan. Se calculó como el cociente entre el área promedio de vasos (AV) y la frecuencia media de vasos (FV) por individuo.

- Conductividad hidráulica específica teórica máxima (ks_{max} , $\text{kg m}^{-1}\text{MPa}^{-1}\text{s}^{-1}$): se calculó por medio de la ley de Hagen-Poiseuille, de la siguiente forma:

$$ks_{max} = \Sigma \frac{[(\pi \rho DV^4) / \eta]}{128 \cdot FV}$$

donde ρ es la densidad del agua (kg m^{-3}), η es la viscosidad del agua (MPa s), DV es el diámetro medio de cada categoría diamétrica (m) y FV es la frecuencia de vasos en esa categoría (m^{-2}). Como se desprende de la fórmula de cálculo, ks_{max} fue estimada teniendo en cuenta la contribución proporcional de los vasos de diferente tamaño (es decir, no a partir del diámetro promedio).

- Fracción sin lúmenes ($I-F$, adimensional): es una medida de la superficie ocupada por células diferentes a los vasos (fibras, traqueidas vasicéntricas y parénquima). Surge de restarle al total de área de leño la fracción de lúmenes de vasos (F).

Además, se determinó la densidad básica (DB , g cm^{-3}), calculada como el cociente entre el peso seco y el volumen saturado de agua, de la sección central de los segmentos de rama y de la porción más externa de las muestras de fuste.

Análisis estadísticos

Los análisis se realizaron separadamente en ramas y fuste debido a que, en general, pertenecían a diferentes individuos. Se testeó si la especie es una fuente significativa de variación entre las variables evaluadas mediante análisis de la varianza (ANOVA) de un factor, según el siguiente modelo:

$$Y_i = m + E_i + e_i$$

Donde: Y_i = observación sobre la especie i , m = media general del experimento, E_i = efecto fijo de la especie i y e_i = error experimental asociado a la parcela que contiene a la especie i .

Se analizaron los resultados en busca de diferencias significativas entre especies mediante la prueba de comparación múltiple HSD de Tukey, para un nivel de significancia del 5%. Se realizaron correlaciones (evaluadas a través del coeficiente de Pearson) para analizar la relación entre variables. Se utilizó, además, como herramienta exploratoria, un análisis discriminante para determinar si el conjunto de variables anatómicas analizadas, junto a la densidad de la madera, permiten separar estas 3 especies. Se utilizaron tablas de contingencia para establecer diferencias entre especies en la distribución diamétrica de los vasos. Los cambios en las características de los elementos conductivos fueron

analizados a través de la varianza de las cuatro variables seleccionadas para vasos (AV , FV , F y S), a nivel general, así como también para cada especie. En base a estos resultados se examinó el nivel de variación que representan S y F con respecto a la variación mostrada por las otras dos variables en conjunto, a través de la siguiente fórmula:

$$\text{var}(AV) + \text{var}(FV) = 0,5 \cdot [\text{var}(S) + \text{var}(F)]$$

Por otro lado, se analizó el coeficiente de apertura de S y F , es decir el cociente entre los valores máximos y mínimos de cada variable, tanto a nivel general, así como para cada especie en particular. Esta es una medida de dispersión relativa que representa el número de veces que el máximo valor es mayor que el mínimo:

$$C_A = \frac{\max(x_i)}{\min(x_i)}$$

La influencia de F y S sobre ks_{max} fue estimada de acuerdo con Zanne et al. (2010) por medio de la siguiente fórmula:

$$ks_{max} = \alpha \cdot F^\beta \cdot S^\delta$$

La estimación de los parámetros de la ecuación se llevó a cabo por medio de técnicas de regresión no lineal. Se analizó a su vez la bondad de ajuste del modelo y la significancia de los parámetros estimados. Se examinó y cuantificó la influencia de F y S sobre la ks_{max} , calculando el nivel de variación experimentado por esta como resultado del cambio de magnitud de las variables predictoras del modelo.

Se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) en forma separada en ramas y fuste, para establecer relaciones entre densidad y las variables anatómicas en conjunto. Estos análisis estadísticos fueron realizados mediante el uso de los programas estadísticos InfoStat (versión 2015, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) y Statistica (v.10, Statsoft, Tulsa, EE. UU).

Resultados

Características anatómicas y densidad

a) Fuste

En este órgano, y de acuerdo con el análisis de la varianza, la especie fue una fuente significativa de variación ($p < 0,05$). Se encontraron diferencias significativas entre al menos dos de las tres especies en todas las variables analizadas (Tabla 2.1, Figura 2.3). La distribución de tamaño de vasos (Figura 2.4) fue significativamente diferente entre especies ($\chi^2 < 0,001$).

Tabla 2.1. Morfometría de fibras y vasos, fracción de pared de fibras, densidad básica de la madera y conductividad hidráulica específica teórica máxima, a nivel de fuste para tres especies de *Eucalyptus*. Media \pm desvío estándar.

	Variable	<i>E. grandis</i>	<i>E. viminalis</i>	<i>E. globulus</i>
Fibras	<i>EPF</i> (μm)	3,21 b \pm 0,38	2,23 a \pm 0,28	2,29 a \pm 0,49
	<i>DF</i> (μm)	20,49 b \pm 2,38	12,58 a \pm 0,68	13,61 a \pm 0,80
	<i>DLF</i> (μm)	13,00 b \pm 2,36	8,14 a \pm 0,53	9,37 a \pm 1,03
Vasos	<i>DV</i> (μm)	115,46 c \pm 19,72	100,3 b \pm 13,73	84,08 a \pm 17,21
	<i>AV</i> (μm^2)	10743 c \pm 3624	8222 b \pm 2258	5767 a \pm 2240
	<i>FV</i> (mm^{-2})	14,43 b \pm 8,45	7,50 a \pm 2,08	11,88 ab \pm 3,80
	<i>DiV</i> (μm)	118,98 a \pm 17,48	183,49 c \pm 15,82	149,78 b \pm 24,29
	<i>F</i>	0,144 b \pm 0,005	0,087 a \pm 0,004	0,092 a \pm 0,004
	<i>S</i> (mm^4)	0,0006 a \pm 0,0001	0,0015 b \pm 0,0002	0,0006 a \pm 0,0001
	<i>I-F</i>	0,856 a \pm 0,0035	0,913 b \pm 0,0041	0,908 b \pm 0,0038
Fracción de pared	<i>FPP</i> (%)	73% b	78% c	71% a
Densidad básica	<i>DB</i> (g cm^{-3})	0,421 a \pm 0,02	0,665 c \pm 0,05	0,550 b \pm 0,04
Conductividad	<i>ks max</i> ($\text{kg m}^{-1}\text{MPa}^{-1}\text{s}^{-1}$)	88,28 b \pm 4,25	53,76 a \pm 9,84	34,82 a \pm 9,95

Letras diferentes indican diferencias significativas

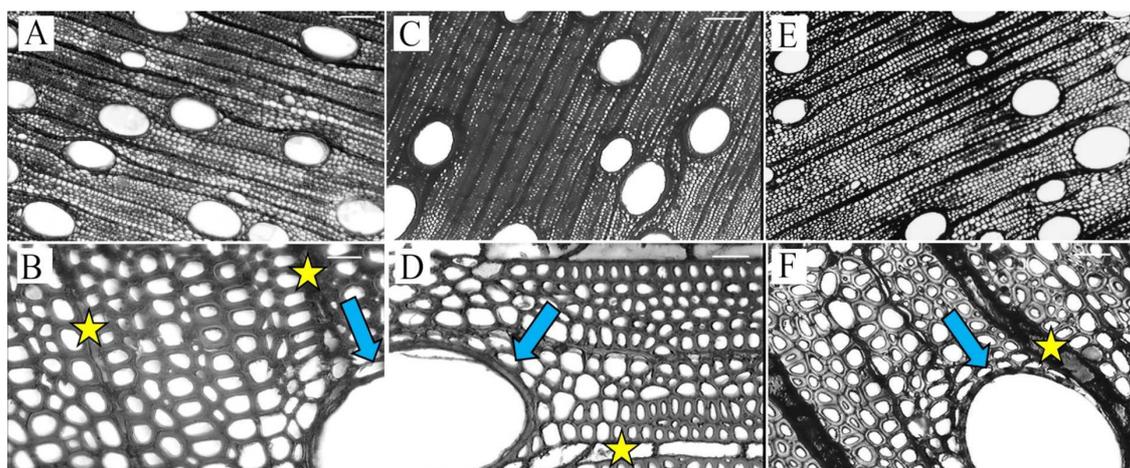


Figura 2.3. Imágenes en corte transversal (panel superior: 40x; panel inferior 200x) del fuste de *E. grandis* (A y B), *E. viminalis* (C y D) y *E. globulus* (E y F). Las imágenes A, C y E muestran la mayor frecuencia de vasos de *E. grandis* (A) en comparación a las otras especies. Las imágenes B, D y F muestran detalles de las fibras, radios (estrellas) y traqueidas vasicéntricas (flechas). En *E. grandis* (B) las fibras son más grandes (mayor lumen) y los radios más angostos, mientras que en *E. viminalis* (D) y *E. globulus* (F) las fibras son pequeñas y los radios ocupan mayor porcentaje. En la imagen D se aprecia también la mayor proporción de traqueidas vasicéntricas que rodean el vaso. Escala de la barra: A, C, E = 100 μm ; B, D y F = 20 μm .

La especie *E. grandis* presentó las fibras de mayores dimensiones (mayor espesor de pared a nivel individual, ancho y diámetro de lumen, lo que implica una menor cantidad de fibras por unidad de superficie en comparación con las otras especies estudiadas) y los vasos de área individual más grande. La frecuencia de vasos en esta especie resultó, a su vez, la más alta, por lo que la distancia entre vasos resultó la menor de todas, redundando en un alto valor de la variable *F*. En consecuencia, esta especie se caracterizó por una alta fracción de lúmenes, distribuida en un número similar de vasos en cada clase diamétrica,

pero con mayor proporción de vasos en las clases superiores ($>160 \mu\text{m}$) con respecto a las otras dos especies (Figura 2.4). La ks_{max} teórica reflejó esta tendencia presentando el mayor valor. A pesar de esto, el porcentaje ocupado por este tipo de tejido a nivel del conjunto de la madera no difirió significativamente de las otras especies. En este sentido, en todas las especies los vasos ocuparon aproximadamente el 5-6% del total de los elementos que conforman la madera (Figura 2.3). La variable S mostró en *E. grandis* un valor bajo, resultado de dividir un diámetro medio grande por un gran número de vasos. Esta variable fue similar a la observada en *E. globulus*, a pesar de las grandes diferencias en F y ks_{max} entre especies (Tabla 2.1), así como en la distribución de tamaño de vasos (Figura 2.4).

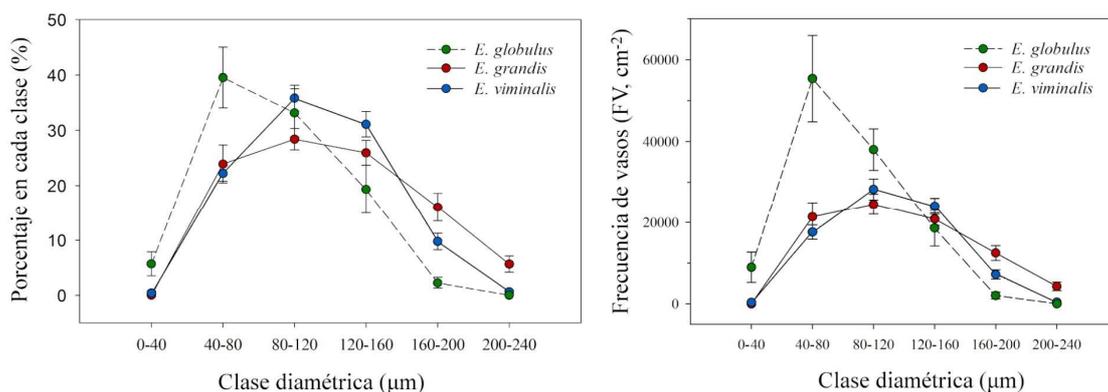


Figura 2.4. Distribución de vasos en clases diamétricas a nivel de fuste para las tres especies de *Eucalyptus* estudiadas. *Panel izquierdo:* porcentaje de vasos en cada clase diamétrica. *Panel derecho:* frecuencia de vasos (FV) observada en cada clase diamétrica.

Si bien no hubo diferencias significativas en la proporción de fibras (Figura 2.5), estas representaron el mayor porcentaje para esta especie, aunque con una fracción de pared intermedia, debido al gran lumen de sus fibras (Tabla 2.1). *E. grandis* fue la especie que presentó el menor porcentaje de parénquima radial, diferenciándose significativamente de las otras dos especies (Figura 2.3 A y B, Figura 2.5).

E. viminalis mostró el menor tamaño de fibras, con lúmenes y espesores de pared similares a los de *E. globulus*. Estas fibras ocuparon proporcionalmente la misma superficie que en las otras especies (Figura 2.5), teniendo además la mayor fracción de pared de las 3 especies estudiadas (Tabla 2.1). *E. viminalis* se destacó también como la de menor frecuencia de vasos y mayor distancia entre ellos, los cuales presentaron un tamaño (diámetro y área) intermedio entre las otras dos especies, lo cual dio como resultado un alto valor de la variable S . Su distribución de tamaño de vasos (Figura 2.4) produjo una ks_{max} intermedia a la de las otras especies, aunque no significativamente diferente a *E. globulus* (Tabla 2.1). Esta especie presentó una proporción de radios similar a *E. globulus* y superior a *E. grandis* (Figura 2.3 C y D; Figura 2.5).

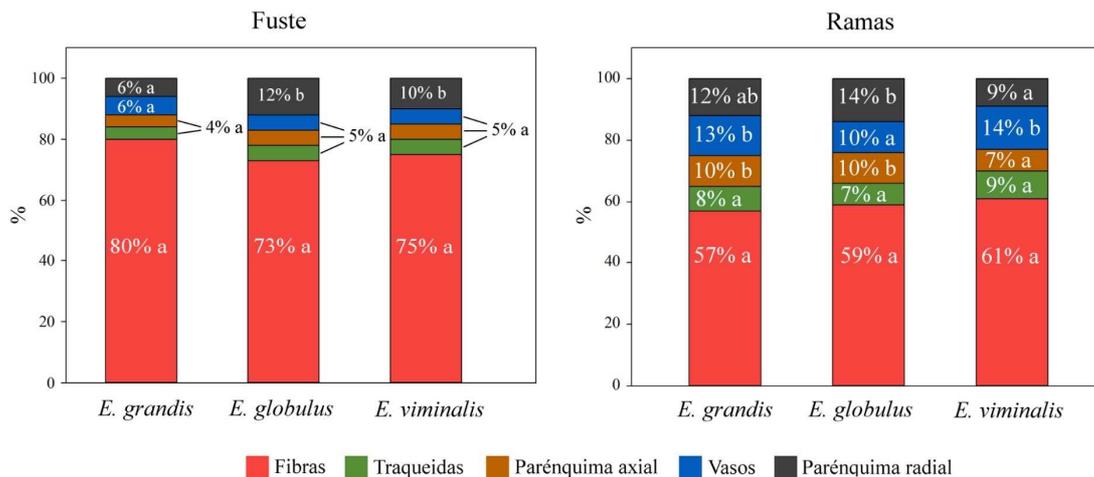


Figura 2.5. Composición porcentual de los tejidos en fuste (*panel izquierdo*) y ramas (*panel derecho*) de *E. grandis*, *E. viminalis* y *E. globulus*. Letras distintas indican diferencias significativas comparando las especies dentro de cada órgano.

E. globulus se caracterizó anatómicamente por poseer vasos pequeños, en forma comparativa a las otras especies, en una frecuencia relativamente baja (intermedia entre las otras dos especies). Las fibras fueron de tamaño intermedio, resultando en una fracción de pared ocupada menor a la de las otras especies, pero un porcentaje de fibras en el total del tejido, similar a las otras especies. Esta especie presentó la menor k_s *max* teórica (aunque similar estadísticamente a la de *E. viminalis*) y, como se mencionó anteriormente, un bajo valor de *S*, similar al de *E. grandis* (Tabla 2.1, Figura 2.3 E y F). En cuanto a la proporción de tejidos, se destacó principalmente por la alta proporción de radios, con diferencias significativas sólo con *E. grandis* (Tabla 2.1, Figura 2.5 panel izquierdo).

La densidad de madera se encontró dentro del rango esperado en función de los antecedentes para las distintas especies, desde 0,421 g/cm³ en *E. grandis* hasta 0,665 g/cm³ en *E. viminalis*, con un valor intermedio para *E. globulus* (Tabla 2.1, Figura 2.6). Como se esperaba en función de los valores de densidad, *I-F* (fracción sin vasos) fue mayor en *E. viminalis* y *E. globulus*, y menor en *E. grandis*, pero no difirió entre los dos primeros, a pesar de tener valores de densidad significativamente distintos (Tabla 2.1).

b) Ramas

En este órgano no se observaron diferencias en densidad de madera entre las especies ($p > 0,05$), siendo esta variable más alta que la observada a nivel del fuste para las tres especies, con valores entre 0,742 g/cm³ y 0,776 g/cm³ (Tabla 2.2, Figura 2.6). Hubo mayor variación en porcentaje de vasos, parénquima axial y parénquima radial entre especies, aunque con similar composición porcentual de fibras y traqueidas en todas ellas (Figura 2.5). *E. viminalis* presentó alto porcentaje de vasos, similar al de *E. grandis*, pero con el menor porcentaje de parénquima radial y axial. Las ramas de *E. grandis* presentaron alto porcentaje de vasos (aunque los de menor diámetro), parénquima radial

y axial; estos últimos similares a los valores de *E. globulus*, el cual presentó el menor porcentaje de vasos. Como se mencionó, la cantidad relativa de fibras y de traqueidas vasicéntricas no se diferenció entre las especies y constituyeron el 65-70% de la composición total del tejido, siendo este porcentaje inferior al observado a nivel de fuste (78-84%; Figura 2.5).

Tabla 2.2. Variables anatómicas (fibras y vasos) y densidad de madera a nivel de ramas para tres especies del género *Eucalyptus*. Media \pm desvío estándar.

Variable	<i>E. grandis</i>	<i>E. viminalis</i>	<i>E. globulus</i>	Rango de variación
EPF_R (μm)	2,29 b \pm 0,22	2,07 ab \pm 0,10	1,83 a \pm 0,17	1,3
DF_R (μm)	10,34 b \pm 0,36	8,26 a \pm 0,62	8,56 a \pm 0,64	1,3
DV_R (μm)	31,82 a \pm 3,95	49,68 b \pm 3,39	34,33 ab \pm 6,52	1,6
FV_R (mm^2)	142 c \pm 25	62 a \pm 8	119 b \pm 36	2,3
DB_R (g cm^{-3})	0,776 a \pm 0,049	0,756 a \pm 0,054	0,771 a \pm 0,068	1,0

Letras diferentes indican diferencias significativas.

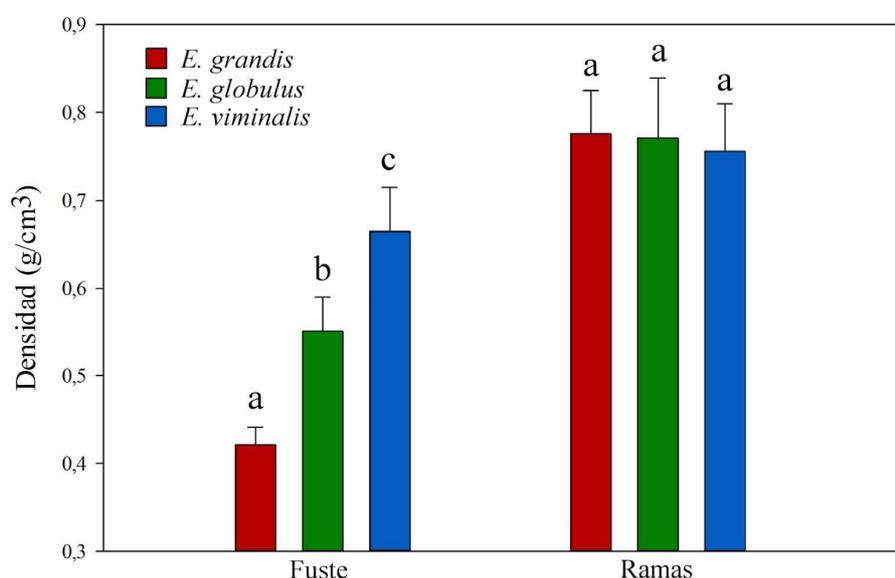


Figura 2.6. Densidad de la madera en fuste y ramas de *E. grandis*, *E. viminalis* y *E. globulus*. Las letras distintas indican diferencias significativas entre especies dentro de cada órgano ($p < 0,05$).

Las diferencias en la proporción de elementos del tejido de las ramas pueden explicarse en parte por las diferencias observadas en el número de vasos por unidad de superficie, que fue el carácter que presentó mayor variación (2,3 veces el más grande con respecto al más pequeño; Tabla 2.2) al comparar especies, seguido del diámetro de los mismos (1,6 veces). La morfometría de las fibras (espesor de pared y diámetro) presentó una variación de 1,3 (Tabla 2.2). *E. grandis* presentó, a nivel de rama, las fibras de mayor espesor de pared y mayor diámetro (al igual que a nivel de fuste), así como los vasos de menor diámetro (contrario a lo observado en fuste) y en mayor frecuencia (Tabla 2.2). Por otro lado, *E. viminalis* se mostró en el extremo opuesto, presentando los vasos de mayor diámetro y menor frecuencia, así como fibras de poco diámetro (sin diferencias con *E. globulus*) y espesor de pared intermedio (Tabla 2.2). En el caso de *E. globulus*, sus

fibras fueron las de menores dimensiones en general, presentando sus vasos características intermedias entre las otras dos especies. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, estas diferencias en la morfometría de vasos y fibras no se vieron reflejadas en la densidad básica de ramas, la cual no varió entre especies.

Si analizamos la variación de la morfometría celular desde el tronco hacia las ramas (Figura 2.7, panel izquierdo) se observa que las tres especies presentan una evolución de la misma magnitud y sentido, disminuyendo el diámetro de sus vasos y fibras y el espesor de la pared de estas últimas, con un gran aumento en la frecuencia de vasos.

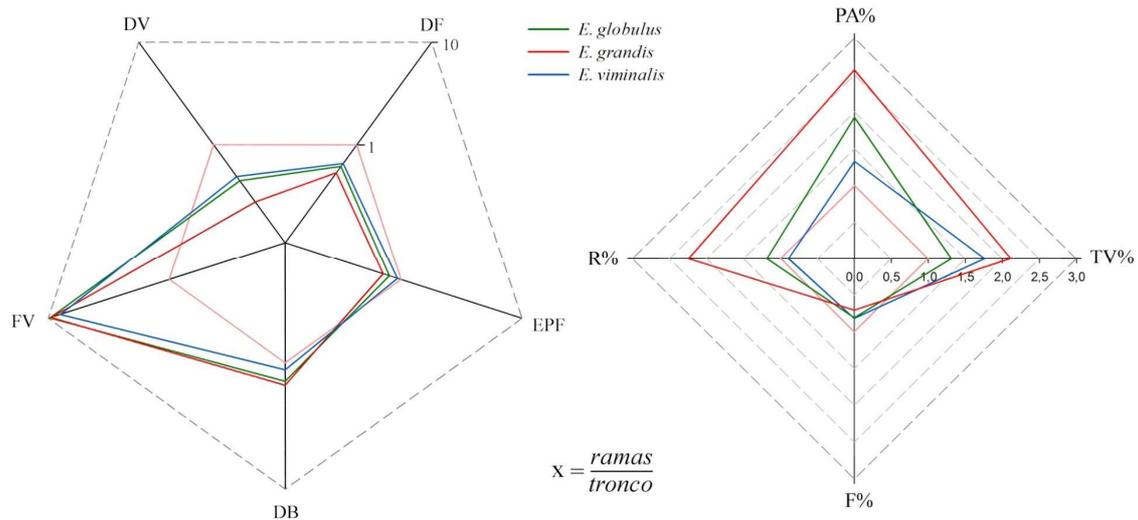


Figura 2.7. Figura izquierda: cociente entre los valores promedio de medidas anatómicas observados en ramas y en el tronco del árbol. Figura derecha: cociente entre la proporción de distintos elementos celulares observados en ramas y en el tronco del árbol. Los valores superiores a 1 (umbral indicado con una línea rosada en el gráfico) indican un valor promedio en ramas superior al del tronco, valores menores a 1 indican lo contrario. Los ejes del gráfico de la izquierda están en escala logarítmica para facilitar la visualización. Referencias: DV: diámetro de vasos, DF: diámetro de fibras, EPF: espesor de pared de fibras, FV: frecuencia de vasos, DB: densidad básica, R%: proporción de parénquima radial, PA%: proporción de parénquima axial, TV%: proporción de traqueidas vasicéntricas, F%: proporción de fibras.

Estos cambios se ven reflejados en un aumento de la densidad de madera de las ramas, respecto del tronco. En este sentido, a pesar de la similitud en la variación de las características anatómicas, *E. grandis* es la especie en la que se produce la mayor disminución en diámetro de vasos (-72,4%), diámetro de fibras (-46,7%) y espesor de pared (-28,7%) respecto a los valores observados en el tronco. A su vez es la especie que, junto a *E. globulus*, aumenta de manera más considerable la frecuencia de vasos (851,7%). En suma, esta mayor variación sería la responsable de la mayor variación en densidad (50% superior a la del fuste). Por otro lado, y avalando lo anteriormente dicho, se observa que *E. viminalis* es la especie donde se produce la menor variación en el tamaño de las características anatómicas de las ramas con respecto al tronco, lo cual explicaría la mayor similitud en los valores de densidad (Figura 2.6).

En cuanto a la variación de las proporciones de elementos celulares (Figura 2.7; panel derecho) se observa que, a nivel general, tanto el porcentaje de parénquima radial, parénquima axial y traqueidas vasicéntricas aumentan, desde el tronco hacia las ramas. Por otro lado, el porcentaje de fibras disminuye proporcionalmente. En particular se observa que *E. grandis* es la especie que varía en mayor medida los porcentajes de elementos celulares, mientras que *E. viminalis* es la especie que presenta menor variación. Si bien gráficamente se observa cierta simetría, esta última especie presentó un comportamiento un tanto disímil al de las otras dos, disminuyendo su proporción de parénquima radial en ramas, respecto del tronco, y aumentando en mayor magnitud el porcentaje de traqueidas vasicéntricas.

Discriminación de las especies en base a la anatomía y densidad de la madera

El análisis discriminante, utilizado como herramienta exploratoria, permitió determinar que las variables analizadas en este trabajo pueden utilizarse para separar las 3 especies en estudio (Figura 2.8). En este sentido, de la totalidad de variables incorporadas al análisis, 9 de ellas resultaron significativas para agrupar a los individuos de cada especie en grupos homogéneos ($p < 0,001$). Estas fueron: densidad de la madera, espesor de pared de fibras, área y diámetro de vasos, distancia intervascular, la proporción de algunos tejidos (fibras, vasos y parénquima radial) y la fracción de pared de fibras. Las variables densidad y distancia intervascular se correlacionan con el eje 1 ($r = -0,30$ y $r = -0,21$ respectivamente), mientras que las variables diámetro de vasos ($r = 0,32$), espesor de fibras ($r = 0,26$), fracción de pared de fibras ($r = 0,37$) y diámetro de fibras ($r = 0,38$) se correlacionan con el eje 2. La proporción de parénquima radial y de vasos presentaron correlaciones de similar magnitud con ambos ejes.

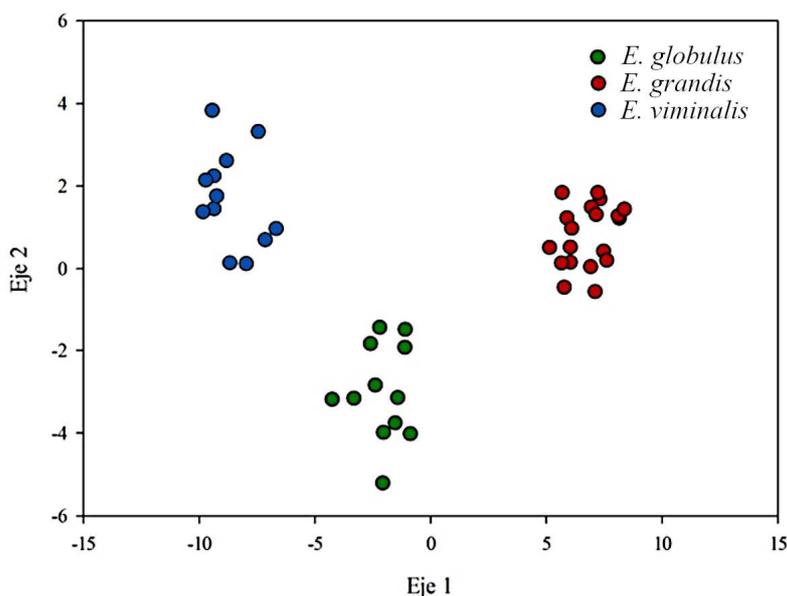


Figura 2.8. Análisis discriminante realizado en base a las variables estudiadas en este trabajo, para tres especies de *Eucalyptus*.

Variación de las características de vasos

Desde el punto de vista funcional, no sólo importa el tamaño medio de los tipos celulares presentes en la madera, sino también su variación. Así, pocos vasos de gran tamaño pueden ser responsables de un aumento significativo de la capacidad (teórica) de conducción de agua del xilema, como fue observado en el fuste en *E. grandis* (Tabla 2.1, Figura 2.4). A nivel general, teniendo en cuenta las tres especies, *S* fue la característica que mostró mayor variación (coeficiente de variación –CV–: 69,6%), seguida por *FV*, *AV* y *F* (CV: 55,6%, 48,1% y 33,8%, respectivamente). Esta misma tendencia general también se registró a nivel de especie para *E. grandis*, mientras que para *E. globulus* y *E. viminalis* se modificó el orden, manteniéndose *S* como la característica que más varianza presentó, pero seguida por *F*, *AV* y *FV*.

En general, la composición de vasos (*S*) explicó un 87,3% del total de la variación descrita por *AV* y *FV*, en comparación con el 12,7% que representó la fracción de lúmenes (*F*). A su vez, este porcentaje también varió dentro de las especies, si bien se registró la misma tendencia general. En un extremo, la variación en *S* representó el 95,5% de la variación de *AV* y *FV* para *E. grandis*, mientras que en *E. globulus* sólo representó el 65,6%. Otro indicador que muestra la gran variación en *S*, con respecto a *F*, es el coeficiente de apertura (valor mayor/valor menor de una determinada variable), que a nivel general exhibió una amplitud superior a 50 veces para *S* y de sólo 6 veces para *F*. Si bien esta tendencia también se registró dentro de las especies, cabe destacarse nuevamente que *E. grandis* se diferenció de las otras dos especies, mostrando el mismo nivel de cambio general para *S*, mientras que *F* apenas varió 3 veces. Por otro lado, tanto *E. globulus* como *E. viminalis* mostraron una amplitud en *S* de apenas 8 veces, mientras que en *F* fue de 5 y 3 veces, respectivamente.

Influencia de *F* y *S* en la conductividad hidráulica

Al ajustar el modelo que relaciona la *ks max* teórica (estimada por la ley de Hagen-Poiseuille) con *F* y *S* (ver Materiales y métodos), se observaron diferencias entre especies para los valores de los parámetros β y δ (exponentes que afectan a *F* y *S*, respectivamente) (Tabla 2.3). Este modelo presentó un ajuste adecuado para todas las especies analizadas, y los parámetros empleados resultaron altamente significativos. La aplicación del modelo al conjunto de datos dio como resultado los siguientes valores promedio: $\beta = 1,5$ y $\delta = 0,5$.

Las diferencias encontradas en el parámetro β para *E. viminalis*, *E. globulus* y *E. grandis* representan una variación de aproximadamente 21, 34 y 41 veces en la magnitud de *ks max* por cada aumento de magnitud 10 en *F*, respectivamente (Figura 2.9a). Por otro lado, los valores encontrados para δ son similares para *E. globulus* y *E. grandis*, y un poco menores para *E. viminalis*. Estos producen un cambio de 2,7 y 2,6 veces la magnitud de *ks max* para un aumento de magnitud 10 en *S*, respectivamente (Figura 2.9b).

Tabla 2.3. Valor estimado de los parámetros del modelo ($ks_{max} = \alpha \cdot F^\beta \cdot S^\delta$)

Especie	Parámetro	Estimado	p-valor	R ² _{aj}	ECM
<i>E. globulus</i>	α	39201,72	0,0002	98,89	2,15
	β	1,53	0,0001		
	δ	0,44	0,0001		
<i>E. grandis</i>	α	50797,04	0,0001	97,94	35,50
	β	1,61	0,0001		
	δ	0,44	0,0001		
<i>E. viminalis</i>	α	21207,75	0,0002	97,27	7,95
	β	1,32	0,0001		
	δ	0,42	0,0001		

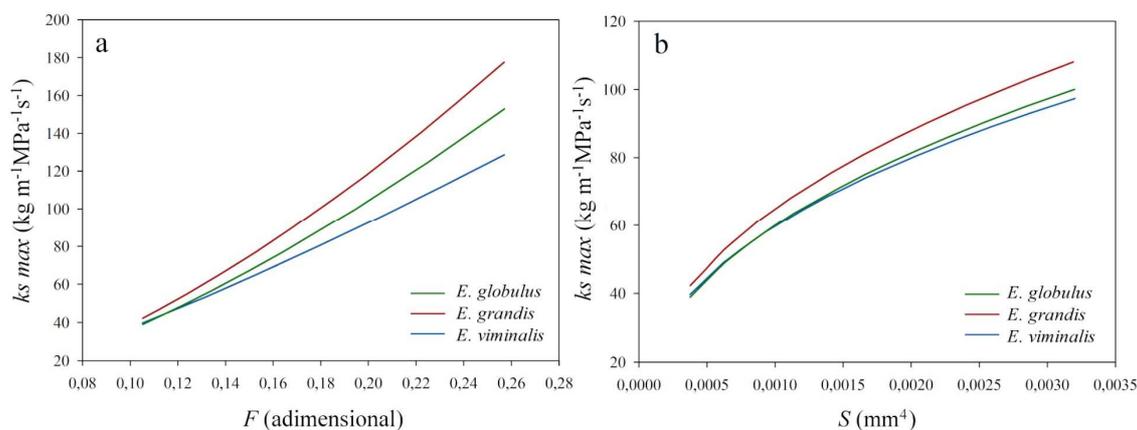


Figura 2.9. Cambio en conductividad hidráulica específica teórica máxima (ks_{max}) según: a) la variación en el área total ocupada por lúmenes (F) y b) la distribución de tamaño de los vasos (S), estimado para las tres especies del género *Eucalyptus* bajo estudio.

Estos resultados indican que, para las 3 especies en consideración, la conductividad hidráulica depende en mayor medida de la fracción de lúmenes de los vasos (F) que de la composición de vasos (S). Esto también puede observarse en la Figura 2.10, donde F y S fueron graficadas frente a ks_{max} . En esta figura puede verse que la variación en F corta más perpendicularmente las isolíneas de conductividad, mientras que S lo hace más oblicuamente. La mayor varianza general de S sobre F queda expresada gráficamente por la diferencia en longitud de las flechas correspondientes, la cual refleja la mayor contribución de la primera en la variación entre AV (eje Y, Figura 2.10) y FV (eje X, Figura 2.10).

Relaciones entre variables

A nivel de fuste, las características de los vasos (diámetro, área y frecuencia) se relacionaron negativamente y en forma moderada con el parénquima radial ($r = -0,44$, $p = 0,001$; $r = -0,44$, $p = 0,001$; $r = -0,31$, $p = 0,008$, respectivamente), mientras que la distancia entre vasos y la cantidad de parénquima radial se relacionaron en forma positiva ($r = 0,54$, $p = 0,005$). Se observó una relación negativa (aunque relativamente baja) entre

la frecuencia de vasos y el porcentaje de traqueidas vasicéntricas ($r = -0,30$, $p = 0,008$). Las correlaciones entre la frecuencia de vasos y su tamaño (diámetro y área) fueron no significativas ($p = 0,168$). La densidad de la madera, como propiedad emergente de la combinatoria de algunas de las variables anatómicas, presentó una correlación alta y negativa con el espesor ($r = -0,43$, $p = 0,001$) y el diámetro de las fibras individuales ($r = -0,76$, $p < 0,001$) (Figura 2.11). Asimismo, la correlación de la densidad de madera con las características de los vasos fue negativa, siendo relativamente baja con el diámetro ($r = -0,26$, $p = 0,018$), y moderada con la frecuencia de los mismos ($r = -0,46$, $p < 0,001$; Figura 2.11). Por otro lado, la densidad se relacionó positivamente con el porcentaje de radios ($r = 0,63$, $p < 0,001$) y de traqueidas vasicéntricas ($r = 0,31$, $p = 0,006$) y negativamente con la distancia intervascular ($r = -0,37$, $p = 0,001$).

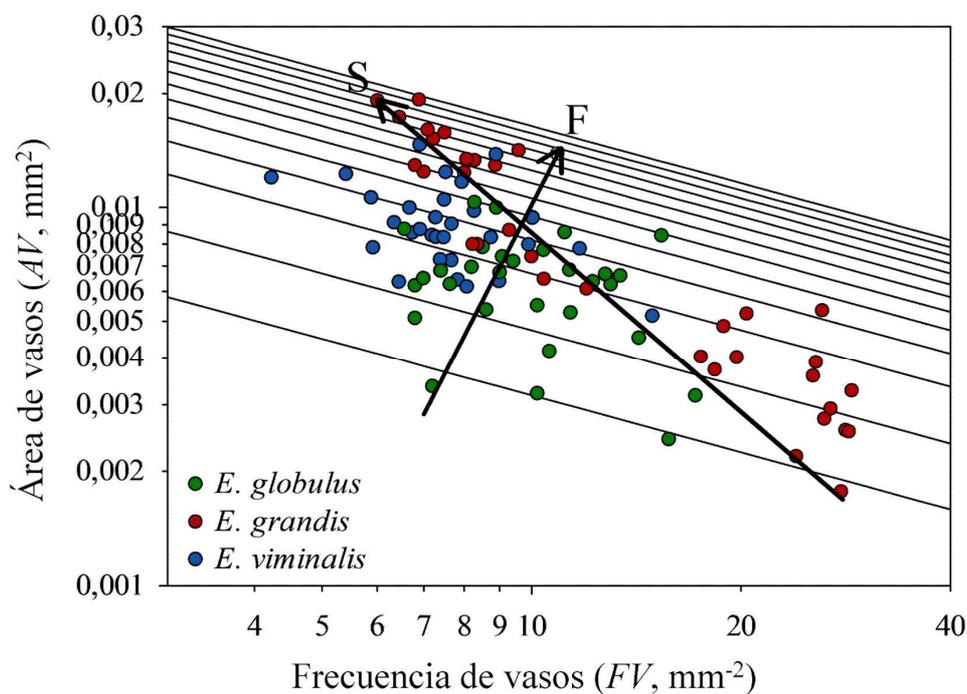


Figura 2.10. Frecuencia de vasos (FV) en función del área de vasos (AV), para las tres especies del género *Eucalyptus* bajo estudio. Las líneas paralelas corresponden a isolíneas de conductividad hidráulica específica teórica máxima (ks_{max}) y las flechas indican la dirección y sentido de aumento del área ocupada por lúmenes (F) y de la composición de los vasos (S) en relación con el cambio en ks_{max} . Ejes en escala logarítmica.

Considerando sólo las ramas, y tomando de manera agrupada el conjunto de datos de las tres especies estudiadas ($n = 24$), la densidad de la madera se asoció solamente con el diámetro y frecuencia de vasos (Figura 2.11, parte inferior). No se halló ninguna otra correlación significativa entre densidad y las otras variables anatómicas individuales en este órgano.

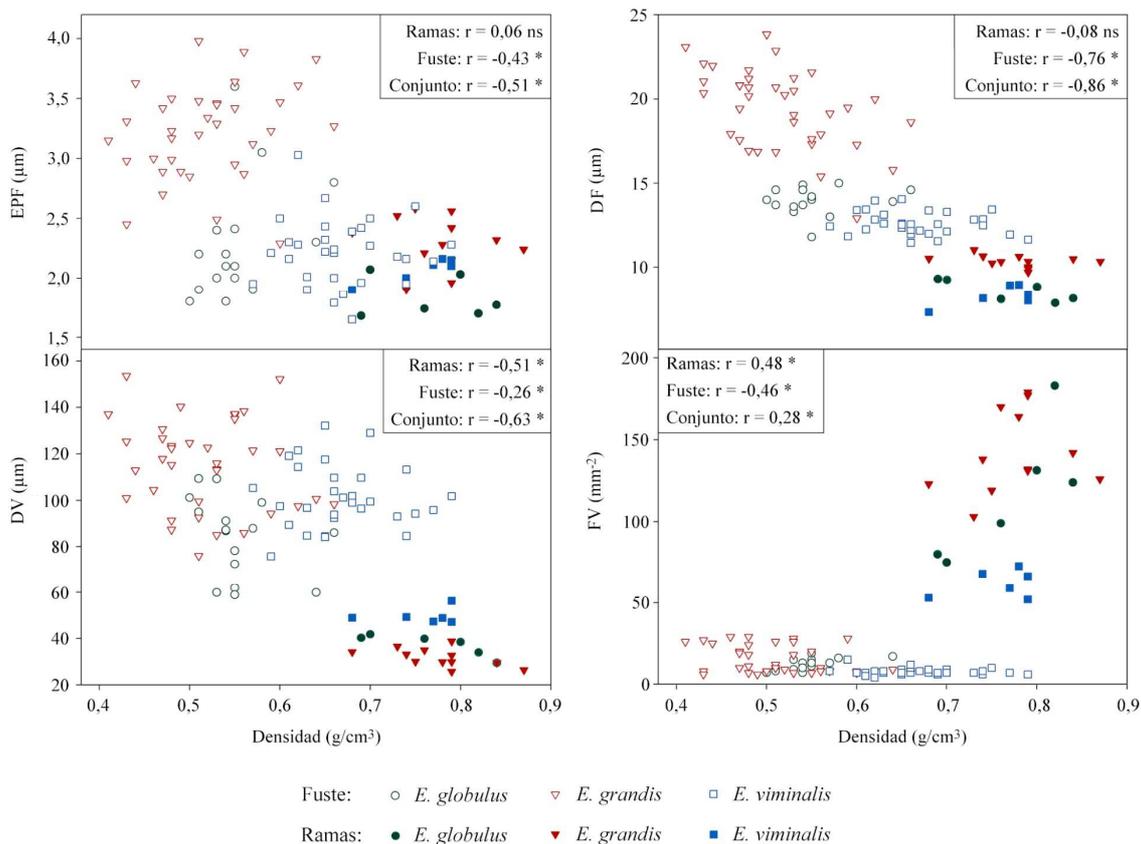


Figura 2.11. Correlaciones entre densidad de la madera y espesor de pared de fibras, diámetro de fibras, diámetro y número de vasos según especie y órgano. Coeficiente de correlación (significativo para $p < 0,05$) discriminado por órgano y en conjunto.

Análisis de componentes principales (ACP)

A nivel de fuste, la densidad de la madera se relacionó con los dos ejes principales (Figura 2.12), aunque sus valores de correlación fueron levemente superiores con el factor 1 (47% de la variación). Sobre este eje se asociaron las variables de morfometría de fibras (*EPF*, *DF* y *DLF*) y vasos (*DV* y *FV*), y los porcentajes de fibras y radios (*F%* y *R%*), todas en sentido negativo con respecto a la densidad, excepto *R%*. Sobre el eje 2 (17%) se asociaron los otros tejidos como parénquima axial, traqueidas y vasos (*PA%*, *TV%* y *V%*), situándose en forma inversa a la densidad, mientras que en el eje 3 (12%) se presentaron en forma inversa las variables individuales de morfometría de vasos (*DV* y *FV*) (Figura 2.12).

A nivel de rama, el diámetro de vasos (*DV*) y la morfometría de fibras (*DF* y *DLF*) junto con el número de vasos (*FV*), el porcentaje de fibras (*F%*) y radios (*R%*) se asociaron con el factor 1 explicando el 42% de la variación. La densidad se asoció inversamente al porcentaje de vasos (*V%*) y traqueidas (*TV%*) en el factor 2 (16%), mientras que en el factor 3 se asociaron el parénquima axial (*PA%*) y el espesor de pared de fibras (*EPF*) (13%) (Figura 2.12).

Este tipo de análisis, que toma el conjunto de las variables, muestra que la densidad puede ser considerada como una variable integradora de determinadas combinaciones de atributos. Por un lado, si consideramos solo las ramas, la densidad se asocia a la cantidad de pared medida a través del espesor de pared (*EPF*) y del porcentaje de lúmenes (*V%*), mientras que el tamaño individual de las variables de morfometría de fibras y vasos (*DF*, *DLF*, *DV*, *FV*) no reflejan por sí solas la variación en densidad. Por el contrario, en el fuste, las medidas individuales de morfometría de fibras sí se reflejan en la densidad. La asociación negativa entre *DF* y densidad indica que, con fibras más anchas, la cantidad de fibras por unidad de superficie es menor y, por lo tanto, la densidad baja (igual resultado fue hallado en las correlaciones de a pares, Figura 2.11). Los tejidos con menor aporte de pared como el parénquima (*PA%*), las traqueidas (*TV%*) y los vasos (*V%*) se asociaron negativamente con la densidad.

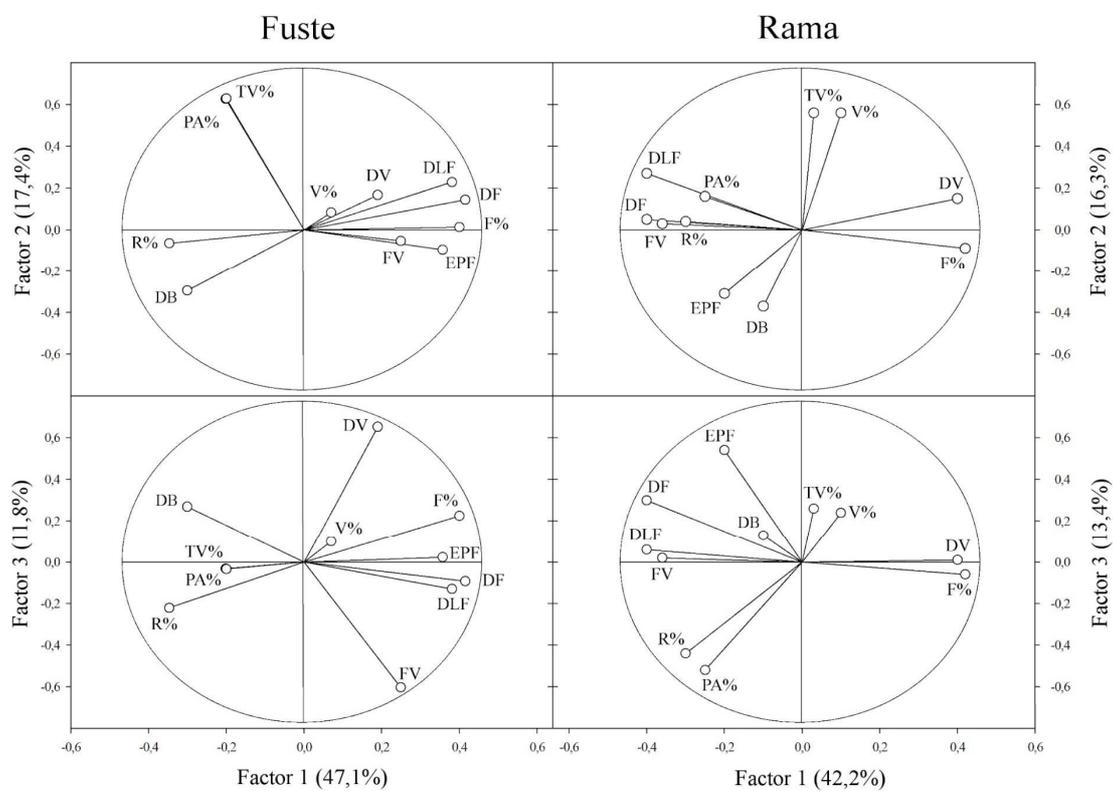


Figura 2.12. Distribución de las variables medidas en fuste (panel izquierdo) y ramas (panel derecho) en tres factores del ACP. Referencias: *F%*: porcentaje de fibras, *TV%*: porcentaje de traqueidas vasicéntricas, *PA%*: porcentaje de parénquima axial, *V%*: porcentaje de vasos, *R%*: porcentaje de radios, *DV*: diámetro de vasos, *FV*: número de vasos por mm², *EPF*: espesor de pared de fibras, *DF*: diámetro de fibras, *DLF*: diámetro del lumen de fibras.

Discusión

A nivel de fuste, la anatomía general y los valores de morfometría celular y densidad básica observados en este trabajo se hallan dentro del rango de valores publicados en la bibliografía para las especies bajo estudio (Dadswell 1972, Villegas & Rivera 2002, Pirralho et al. 2014). A este nivel, se encontraron diferencias interespecíficas para todas

las variables morfométricas estudiadas, así como también en densidad y conductividad hidráulica específica teórica, en al menos una de las especies respecto de las demás. A nivel de ramas, las dimensiones de fibras (diámetro y espesor) fueron menores a las registradas a nivel de fuste, en coincidencia con estudios previos donde se analiza esta variación en especies angiospermas (Samaraha et al. 2011, Kiaei & Moya 2015). Por otro lado, los vasos redujeron su diámetro, pero aumentaron su frecuencia respecto de lo observado en el fuste. Esto último está en concordancia con la ley de Murray (Murray 1926), que establece que la configuración óptima que maximiza la conductancia hidráulica de un sistema vascular está conformada por un número mínimo de vasos grandes que abastecen a un número creciente de vasos pequeños, desde el tronco hasta las ramas (McCulloh et al. 2003, Schuldt et al. 2013, Pfautsch et al. 2018). Además, existe evidencia que indica que el tamaño y la frecuencia de vasos están fuertemente relacionados con las dimensiones del órgano considerado (McCulloh et al. 2011). Cabe destacar que las dimensiones de los elementos anatómicos evaluados mantuvieron un ordenamiento relativo similar al observado en el fuste, salvo para diámetro de vasos donde ese orden se vio parcialmente alterado. Esto indicaría que los cambios anatómicos que se producen dentro del árbol, desde el fuste hacia las ramas, son de magnitud similar para las tres especies, dentro de cierto rango de variación (Figura 2.7).

Relaciones entre variables

Las correlaciones entre densidad y anatomía halladas en la bibliografía para una amplia variedad de angiospermas indican que, de acuerdo con el subconjunto de especies analizadas, los resultados pueden variar. Así encontramos correlaciones dispares con diámetro y número de vasos que pueden ser positivas (Jacobsen et al. 2005), negativas (Preston et al. 2006) o no significativas (Jacobsen et al. 2007, Poorter et al. 2010, Ziemińska et al. 2013). En este estudio, la correlación negativa entre densidad de madera y el diámetro de vasos fue significativa en los dos órganos estudiados, aunque con diferente magnitud en la relación, siendo más fuerte en las ramas que en el fuste. Esta relación ha sido demostrada en un trabajo previo donde se trabajó con 10 especies angiospermas del bosque tropical panameño y se analizó la variación de la arquitectura hidráulica en ambos órganos (McCulloh et al. 2011). La misma se fundamenta en que, para una determinada sección, a medida que aumenta el tamaño de los vasos (sin modificar las demás variables), la proporción de lúmenes sobre la proporción de pared de los diferentes elementos celulares dentro del xilema aumenta, disminuyendo la densidad. Por otro lado, la frecuencia de vasos mostró una correlación de magnitud similar pero positiva con la densidad de madera a nivel de ramas, y negativa a nivel de fuste. Una correlación positiva, como la observada a nivel de rama, era esperable debido a la variación inversa de los dos caracteres que se utilizan comúnmente para describir los vasos (Preston et al. 2006, McCulloh et al. 2011), pero una relación negativa entre *DB* y *FV* indicaría un desacople, a nivel de fuste, de la variación entre diámetro y frecuencia de vasos. Esto sería concordante con la falta de correlación observada entre estos dos caracteres, relación que ha sido ampliamente reportada en trabajos multiespecíficos

(Sperry et al. 2008, Zanne et al. 2010, Carlquist 2012). Sin embargo, dentro del rango de valores que puede tomar la densidad de madera (el cual estará influenciado por los distintos tipos celulares que componen el xilema de una especie), un determinado valor de densidad podrá ser el resultado de diferentes combinaciones de área y frecuencia de vasos (Preston et al. 2006). Es probable que, debido al menor rango de variación de densidad evaluado en este trabajo (al centrarse en un solo género y en comparación con trabajos donde se analizan múltiples especies), esta relación negativa entre tamaño y frecuencia de vasos no haya sido observada.

En cuanto a la morfometría de fibras, en la bibliografía se describen relaciones positivas entre la densidad y el espesor de pared de fibras (Thomas et al. 2007), negativas tanto con espesor como con ancho y diámetro de lumen de fibras (Fujiwara et al. 1991, Jacobsen et al. 2007, Thomas et al. 2007, Drew et al. 2009, Martínez-Cabrera et al. 2009) o no significativas con espesor de pared (Jacobsen et al. 2007), dependiendo de las especies consideradas. Esto se debe a que las fibras constituyen el elemento celular en mayor proporción dentro del xilema y, en consecuencia, sus dimensiones (espesor de pared + diámetro del lumen) tienen un gran impacto en la densidad de madera (Jacobsen et al. 2005; Figura 2.13).

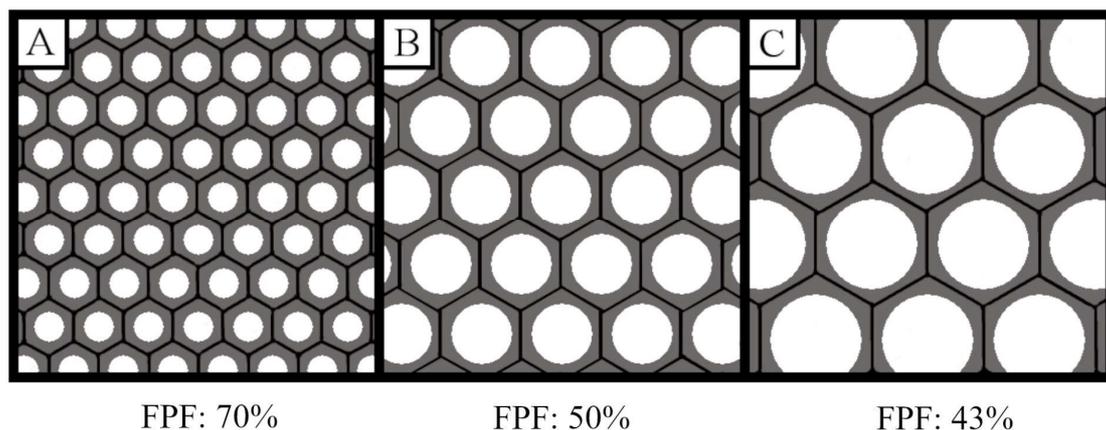


Figura 2.13. Esquema simplificado de la matriz fibrosa con células que presentan el mismo espesor de pared, pero diferente lumen celular. Partiendo de la situación A, con un 70% de *FPF*, al duplicar el diámetro del lumen, la fracción de pared se reduce al 50%. Si el diámetro se triplica, la *FPF* pasa al 43%.

En este trabajo, a nivel de fuste, la densidad de madera con el espesor de pared y el ancho total de las fibras presentaron una correlación negativa, pero no mostraron relación alguna al analizar las ramas. Esto pone de manifiesto que las relaciones entre densidad y morfometría de fibras, ampliamente descritas para diversas especies, deben ser consideradas válidas exclusivamente para el órgano donde fueron medidas (generalmente, fuste), existiendo una importante variación entre órganos para estas relaciones. En este sentido, resulta probable que los cambios de densidad observados a nivel de rama hayan dependido en mayor proporción de la variación en las características de los vasos y no tanto de los cambios en las dimensiones de las fibras. Por otro lado, el hecho de que el lumen de las fibras (a nivel de fuste) presente una mayor correlación con

la densidad implicaría que, espacialmente, los cambios en densidad se deben en mayor proporción a un aumento en las dimensiones del lumen de las fibras, más que a un cambio en el espesor de pared de las mismas.

La relación negativa entre las características de vasos (diámetro y frecuencia) y radios podría implicar que, a menor área conductiva dada por el tamaño y cantidad de vasos, la estrategia de las especies de *Eucalyptus* sea aumentar la proporción de radios con el fin de aumentar la conectividad entre vasos solitarios (Loepfe et al. 2007), así como también para colaborar en la conducción radial entre floema y xilema (Pfausch et al. 2015) y/o participar en los procesos de reparación de embolismos (Nardini et al. 2011, Brodersen & McElrone 2013). Es probable que, a nivel de fuste, la relación negativa de la densidad con el tamaño y la frecuencia de vasos haya traccionado la relación positiva entre la primera y el porcentaje de radios y traqueidas vasicéntricas. La correlación positiva entre porcentaje de radios y densidad también fue hallada en trabajos anteriores (Taylor 1969, Rahman et al. 2005, Zheng & Martínez-Cabrera 2013), pero es opuesta a la hallada por Martínez-Cabrera et al. (2009).

En Eucalyptus la ks max teórica está más influenciada por F que por S

Al ajustar el modelo que relaciona la *ks max* teórica con F (fracción de lúmenes) y S (composición de vasos), y tomando los datos de las 3 especies en conjunto, se obtuvieron valores de los parámetros β y δ similares a los valores estimados por Zanne *et al.* (2010) para el conjunto de especies angiospermas, es decir, 1,5 y 0,5, respectivamente. Se observó además una falta de ortogonalidad entre S y F , así como una mayor influencia de esta última sobre la *ks max*, tal como reportan Zanne et al. (2010). Pero, de forma contraria a los resultados de estos autores, en nuestro estudio la variación en *ks max* se vio explicada en mayor medida por el aporte de F . Además, contrariamente a lo esperado, el peso relativo de S sobre *ks max* (coeficiente δ) fue ligeramente menor en cada una de las especies estudiadas (o similar, si tenemos en cuenta el análisis con la totalidad de los datos agrupados) al encontrado por estos autores. Esto indicaría que la composición de vasos, estimada a través de S , tiene un efecto relativamente bajo sobre *ks max* (estimada teóricamente), la cual estaría más influenciada por la cantidad total de área disponible para conducir agua que por la “calidad” (distribución de tamaños) de los vasos presentes. Este resultado es contra-intuitivo si se piensa en el alto peso relativo de los vasos grandes en el nivel de conductividad, dado que esta variable aumenta con la cuarta potencia del diámetro de los elementos conductivos (Ley de Hagen-Poiseulle). Cabe destacar que, a pesar de su menor peso relativo, S tiene una influencia no despreciable sobre la *ks max*, ya que su mayor variabilidad indica que la planta puede acomodar su sistema conductivo para alcanzar una mayor eficiencia conductiva sin modificar sustancialmente la fracción de lúmenes de vasos involucrada, la cual fue una característica de mayor estabilidad en todas las especies bajo estudio. A su vez, debido a que la conductividad aumenta aproximadamente con el cuadrado de AV y sólo con la primera potencia de FV , alterar la composición puede tener grandes influencias sobre la *ks max* potencial. Sin embargo, en

términos cuantitativos, el modelo aplicado a las tres especies de *Eucalyptus* estudiadas sugiere que la gran variación de S solo produce un cambio del orden de 17 veces en la conductividad teórica, mientras que F produce un cambio de 32 veces.

Anatomía y densidad de la madera: ¿indicadores de la resistencia diferencial al estrés?

En concordancia con las tendencias entre anatomía y función indicadas por Carlquist (2012), y que pueden aplicarse al género *Eucalyptus*, la presencia de vasos solitarios rodeados de traqueidas vasicéntricas fue observada en las tres especies. Si bien son muy pocos los estudios que relacionan la funcionalidad del xilema con la resistencia general al estrés en *Eucalyptus*, se ha encontrado que, tal como sucede con otras especies leñosas (Pockman & Sperry 2000), las relaciones hídricas, y la vulnerabilidad a la cavitación en particular, son claves para explicar eventos de mortalidad ante condiciones de sequía extrema tanto en bosques nativos de especies de este género (Rice et al. 2004, Poot & Veneklaas 2013) como en plantaciones (Vander Willigen & Pammenter 1998). Por lo tanto, es de esperarse que las diferencias en los requerimientos ecológicos de las especies aquí estudiadas puedan deberse -al menos en parte- a una resistencia diferencial al estrés dada por una vulnerabilidad a la cavitación y/o una capacidad de reparación de embolismos diferenciales entre ellas. De ser así, la anatomía de la madera podría ser un indicador de ello, tal como queda evidenciado en algunas de las tendencias observadas: proporción de traqueidas vasicéntricas, tamaño y número de vasos, proporción de radios y densidad de la madera, tendencias que son citadas por la bibliografía para una amplia variedad de familias de angiospermas leñosas (Baas 1982, Carlquist 1984, 1987, 2012, Alves & Angyalossy-Alfonso 2002, Sano et al. 2011, Kallarackal et al. 2013, Wheeler & Holbrook 2015).

Así, se observa que *E. grandis* se caracterizó por presentar, a nivel de fuste, una alta fracción de lúmenes, distribuida en muchos vasos cercanos entre sí de diámetro medio grande, y el menor porcentaje de traqueidas vasicéntricas, cuyo rol propuesto sería el de sistema de conducción subsidiario (Carlquist 1985). También presentó la menor cantidad de parénquima radial y la menor densidad de madera, lo cual refleja tendencias halladas en especies de ambientes cálidos con disponibilidad de agua (Baas 1982, Alves & Angyalossy-Alfonso 2002). Este menor porcentaje de radios podría influir negativamente en la reparación de embolismos, aunque cabe señalarse que existe en la literatura un gran debate actual acerca de la existencia o no de este fenómeno (p.ej. Charrier et al. 2016). A su vez, no presentó diferencias con las demás especies en el porcentaje de parénquima axial, cuyo rol suele asociarse a esta función y puede aumentar en especies con alta capacidad de conducción de agua (Zheng & Martínez-Cabrera 2013). La baja densidad de madera del fuste en *E. grandis*, asociada a su alta fracción de lúmenes de vasos, pero también a la alta fracción de lúmenes de fibras, sugiere que podría tener un alto nivel de capacitancia. Esta capacidad de aporte de agua desde las células que rodean a los vasos hacia los mismos disminuiría las tensiones en el xilema, permitiendo mantener ciertos niveles de conductividad hidráulica (y fijación de C) aún en condiciones de alta demanda

evaporativa, las cuales son propias de los sitios donde se cultiva esta especie. Estas características anatómicas son consistentes con una alta capacidad de conducción de agua (alta eficiencia hidráulica), lo que podría explicar, al menos en parte, las altas tasas de crecimiento de los clones analizados en este ensayo (entre 45 y 55 m³ ha⁻¹ año⁻¹ a los 14 años, en condiciones de alta disponibilidad hídrica; Tesón & Licata, INTA EEA Concordia, comunicación personal), pero también con una alta vulnerabilidad a la cavitación por heladas y/o sequía. De acuerdo con esto, los antecedentes en esta especie (mismos clones que los analizados aquí) indican que posee una alta vulnerabilidad a la cavitación por sequía (tensión en el xilema), con un potencial hídrico promedio al que se produce el 50% de pérdida de ks_{max} (P_{50}) de -1,5 MPa (Tesón et al. 2012). Estos valores de P_{50} , y aún menores, son alcanzados a nivel foliar en condiciones normales durante la temporada de crecimiento de esta especie en sus sitios de implantación, y son consistentes con aquellos reportados para *E. grandis* plantados en Sudáfrica (Vander Willigen & Pammenter 1998). En este último trabajo se propone que la tendencia general de resistencia al estrés en esta especie sería la de “evitación” (Levitt 1980), sugerida por la alta vulnerabilidad a la cavitación, pero compensada por alta conductividad hidráulica de la madera y alta capacitancia que permiten disminuir tensiones en el xilema (Meinzer & McCulloh 2013). Es importante señalar que esta alta vulnerabilidad a la cavitación medida en ramas no es debida a la presencia de vasos de gran tamaño en las ramas. Por el contrario, como se vio anteriormente, *E. grandis* presentó el menor tamaño de vasos a nivel de rama. Por lo tanto, en el caso de esta especie, los resultados obtenidos permiten inferir que el significado funcional de la alta vulnerabilidad a la cavitación es el de cavitarse relativamente temprano durante una sequía, actuando sus ramas como “fusibles” en momentos de alta tensión en el xilema, con el objeto de preservar la integridad hidráulica del fuste principal. Este mecanismo también se describe como propio de especies evitadoras, que disminuyen la superficie transpiratoria como mecanismo para disminuir tensiones en el resto del xilema y preservar así su funcionalidad. El alto nivel de vulnerabilidad en ramas no nos permite, sin embargo, aseverar que posea una alta vulnerabilidad a la cavitación a nivel de fuste. De hecho, no existen antecedentes que hayan medido tal propiedad en este órgano sobre árboles adultos de *Eucalyptus*, por lo que sólo puede inferirse a partir de rangos de tamaño de elementos anatómicos (ver próximo capítulo). Por otro lado, existen antecedentes acerca de la recuperación post-sequía en esta especie, medida a través de variables como densidad de flujo de savia y crecimiento (Tesón et al. 2011), que sugieren una alta resiliencia, posiblemente ligada al mantenimiento de la integridad hidráulica del fuste principal.

La especie ecológicamente más resistente al estrés de las estudiadas es *E. viminalis*, la cual presentó, a nivel de fuste, menor frecuencia de vasos que *E. grandis*, pero de diámetro intermedio entre las especies estudiadas, con una proporción de traqueidas vasicéntricas intermedia y mayor proporción de parénquima radial, todos los cuales podrían intervenir en la reparación de embolismos. Comparativamente, sus vasos estuvieron alejados entre sí, lo que posiblemente disminuye la probabilidad de propagación de embolismos entre ellos. La densidad de la madera del fuste fue la más alta, propiedad que se asocia en la bibliografía con una mayor resistencia a la cavitación

(Hacke et al. 2001), y que en especies angiospermas estaría relacionado con el refuerzo de las paredes de los vasos necesario para evitar la implosión de los mismos, cuando existe una diferencia de presión a ambos lados de la pared entre un vaso en tensión y uno vecino cavitado. Sin embargo, en los eucaliptos, la presencia de vasos solitarios sugiere que la teoría general propuesta no aplica a este tipo de anatomía, en la que no existe la posibilidad de que un vaso cavitado se encuentre contiguo a otro bajo tensión. Otro estudio, que podría ser aplicable a eucaliptos, sugiere la importancia de la densidad de la madera en la resistencia a la cavitación, a través del aporte de la matriz de fibras al mantenimiento de la integridad hidráulica en condiciones de altas tensiones (Jacobsen et al. 2005). En base a los crecimientos medios observados en las zonas de implantación de estas especies, a la relación funcional existente entre la capacidad de conducción de agua y el crecimiento (Tyree & Ewers 1991, Vander Willigen & Pammenter 1998, Kondoh et al. 2006), y a las características anatómicas presentes a nivel de fuste, se espera que *E. viminalis* presente un nivel de conductividad similar al de *E. globulus*, y que ambas presenten una ks_{max} menor a la de *E. grandis*. En este sentido, la conductividad teórica calculada para el fuste de *E. viminalis* se ubicó por debajo de la conductividad de *E. grandis* (muchos vasos grandes), sin separarse estadísticamente de *E. globulus* (muchos vasos pequeños). El nivel de conductividad calculado sugiere que esta es una especie con una alta capacidad de conducción de agua, al menos a nivel de fuste, lo cual sugiere que las tasas de crecimiento normalmente reportadas se encuentran por debajo de su potencial productivo. Posiblemente, esto sea consecuencia de su cultivo en zonas con algún tipo de limitante ambiental al crecimiento (déficits hídricos temporales, bajas temperaturas), producto de su alta resistencia a esas condiciones.

La especie *E. globulus* presentó, a nivel de fuste, una densidad de madera intermedia entre las otras especies, y se destacó por una alta proporción de parénquima radial. Los vasos de pequeño diámetro no se condicen con la alta susceptibilidad a heladas observada a campo, en términos comparados con *E. viminalis* (de baja sensibilidad). Respecto de *E. grandis* (de alta sensibilidad al frío), las dimensiones de los elementos conductivos de ambas especies se ubicaron en extremos opuestos. Esto indicaría que la resistencia a heladas no está determinada, en gran medida, por la constitución anatómica del fuste, sino que dependería de otras estructuras.

Consideraciones

La interpretación funcional que se ha realizado en los párrafos precedentes requiere algunas consideraciones que restringen sus alcances. En primer lugar, aquí se han estudiado individuos de tres especies distintas creciendo cada una en su sitio habitual de desarrollo. Sin embargo, el proceso de formación de madera es afectado por el ambiente, a través de la respuesta fisiológica a nivel del *cambium* (Zobel & Jett 1995). Existen, para algunos eucaliptos, antecedentes de estudios anatómicos en función de ciertas características ambientales que claramente muestran esta respuesta plástica del *cambium* ante condiciones ambientales variables (Searson et al. 2004, Drew et al. 2006, 2009,

O'Grady et al. 2009). Por ello, es difícil definir en nuestros resultados cuánto de las características asignadas a la especie son en realidad producto de una respuesta plástica al ambiente, el cual seguramente varió de un lugar a otro, exponiendo a las distintas especies a distintas condiciones de desarrollo. En el caso particular de la densidad, tampoco debe descartarse un efecto debido a respuestas plásticas diferenciales (interacción genotipo x ambiente). La densidad de la madera es un carácter que puede mostrar distinto grado de plasticidad fenotípica en respuesta al ambiente en función de los genotipos o especies (p.ej. Martínez-Meier et al. 2008, mostrando variación en densidad de madera entre individuos y en respuesta al ambiente en *Pseudotsuga menziesii*; Corcuera et al. 2011, reportando que la densidad de madera difiere entre genotipos, pero no presenta plasticidad con respecto al sitio en *Pinus pinaster*). En el caso particular de *Eucalyptus*, se ha reportado que existe variación significativa, aunque muy baja, de la densidad de madera en función del nivel de estrés hídrico en *E. grandis*, pero no en otras especies del mismo género (*E. sideroxylon* y *E. occidentalis*) ensayadas bajo las mismas condiciones y una vez removido el efecto de los cambios en el contenido de extractivos (conjunto heterogéneo de compuestos orgánicos minoritarios de la madera, Searson et al. 2004). La densidad de la madera aumenta plásticamente con la temperatura media del sitio de crecimiento en *E. camaldulensis* (Thomas et al. 2004), y en el caso de *E. viminalis*, estudios preliminares de similares progenies creciendo en dos sitios distintos sugieren que la densidad de la madera aumenta significativamente en sitios con mayor estrés (Alarcón et al. 2016). Por lo tanto, es esperable que en las especies estudiadas exista un cierto componente de las condiciones ambientales del sitio de muestreo en los valores medios de densidad de la madera. Sin embargo, la diferenciación interespecífica no se verificó en la densidad de las ramas, a pesar de que hubo una diferenciación ambiental similar a aquella de los fustes. Esto sugiere que las tendencias en densidad no necesariamente son similares entre órganos.

Por otro lado, *E. grandis* fue la especie que presentó la mayor variación en sus características de vasos, lo cual sugiere que poseería una plasticidad relativamente alta (mayor que en las otras especies) para acomodar su sistema conductivo a las condiciones del ambiente (p.ej. diferencias climáticas durante el período de crecimiento). La plasticidad fenotípica en la madera (“dendroplasticidad”) es un mecanismo fundamental en la adaptabilidad de las especies arbóreas ante las condiciones ambientales cambiantes (Martínez-Meier et al. 2008, 2009). Su cuantificación y su asociación a las condiciones climáticas de los sitios donde se muestrearon los árboles de este estudio permitirá dilucidar si efectivamente *E. grandis* es una especie más plástica que *E. viminalis* y *E. globulus*, o si en realidad las condiciones ambientales donde crecieron los individuos de esta especie tuvieron un mayor rango de variación, lo que se tradujo en una mayor variabilidad en los caracteres de su madera. Más allá de esto, para remover el efecto del sitio, no es posible analizar madera de árboles adultos creciendo en la misma localidad geográfica para las tres especies estudiadas ya que, debido a los distintos requerimientos de sitio de estas, no existe ningún ensayo o plantación comercial que las sitúe en un jardín común. Este tipo de problema es usual, sin embargo, en cualquier análisis interespecífico, en el que normalmente se usan bases de datos con información proveniente de cada

especie en su lugar de desarrollo. De cualquier manera, la separación de las especies lograda mediante el análisis discriminante permite inferir que las variaciones interespecíficas de las variables anatómicas y densidad de la madera son mayores que las posibles variaciones intraespecíficas que presentan estos árboles adultos creciendo en sus respectivos sitios de implantación. Finalmente, si bien la madera puede tener un rol clave en la adaptación al ambiente en especies leñosas, y estar correlacionada con numerosos procesos fisiológicos (p.ej. Kallarackal et al. 2013, O’Grady et al. 2009), hay que tomar en cuenta que el hábito foliar y las características de las hojas (ej. área foliar total y foliar específica, capacidad de ajuste osmótico) pueden moderar la influencia de la madera en la resistencia al estrés. Por ello, el valor predictivo de la anatomía de la madera debe analizarse siempre a la luz del conocimiento del conjunto de estrategias que pueda tener la planta para responder al ambiente (Carlquist 2012).

Conclusiones

Los resultados de este capítulo permiten confirmar la primera hipótesis planteada. En este sentido *E. grandis*, la especie con mayor frecuencia y tamaño de vasos en fuste, fue la que presentó mayor conductividad teórica, coincidiendo a su vez con las altas tasas de crecimiento observadas en las zonas de implantación. Sin embargo, sus ramas presentaron los vasos de menor diámetro. En el otro extremo se encontró *E. globulus*, que presentó vasos pequeños, aunque en alta frecuencia. *E. viminalis*, si bien presenta tasas de crecimiento similares a las de *E. globulus*, presentó niveles de conductividad teórica (estimados a nivel de fuste) intermedios entre las dos especies lo que sugiere que su potencialidad de crecimiento superaría las tasas observadas en las zonas de implantación.

Por otro lado, el análisis de la influencia de la fracción de lúmenes (F) y la composición de vasos (S) sobre la conductividad teórica permitió confirmar la segunda hipótesis planteada. La baja influencia relativa de S sobre la ks_{max} , en comparación con F , está indicando que la conductividad está más influenciada por la cantidad total de área disponible para conducir agua que por la “calidad” (distribución de tamaños) de los vasos presentes.

El análisis de los coeficientes de correlación entre la densidad de madera, medida en ambos órganos (fuste y ramas), permitió confirmar la tercera hipótesis de estudio. En este sentido, las correlaciones entre la densidad de la madera, como propiedad emergente de la combinatoria de las variables anatómicas, presentó una correlación alta y negativa con aquellas variables relacionadas con la matriz fibrosa del xilema, mientras que la relación con las características de vasos fue moderada. El análisis de la morfometría de los diferentes elementos anatómicos que componen el xilema de fuste y ramas de las especies bajo estudio permitió confirmar parcialmente la cuarta hipótesis. Así, si bien se observaron algunos cambios en el ordenamiento relativo de las especies respecto a la dimensión y proporción de los diferentes elementos anatómicos evaluados, el grado de variación entre ambos órganos fue similar en magnitud y sentido.

Por último, la comparación de las características de la madera de las especies bajo estudio con los requerimientos ambientales de las zonas donde se cultivan permite inferir que las características de la madera de estas especies determinan, al menos en parte, el potencial de adaptación al ambiente de estas especies. Cabe destacar, sin embargo, que, dentro de la planta, la madera y sus características forman parte de un sistema de órganos que integra un conjunto de estrategias para adaptarse al ambiente.



Capítulo 3: Relaciones entre anatomía y vulnerabilidad a la cavitación por sequía en eucaliptos de clima templado^{3 4}

Introducción

Como se vio en el capítulo anterior, la madera del género *Eucalyptus* exhibe características particulares, presentando porosidad difusa, elementos de vaso en disposición diagonal y, por lo general, solitarios, con placa de perforación simple y puntuaciones intervasculares areoladas, alternas, ornadas y de apertura generalmente elíptica; presenta traqueidas vasicéntricas, fibras de contorno angular y/o circular, diferenciadas en dos tipos, una con puntuaciones simples y otra con puntuaciones areoladas (“fibrotraqueidas”); parénquima axial paratraqueal vasicéntrico y/o apotraqueal difuso, y parénquima radial en radios uniseriados, biseriados, triseriados y excepcionalmente tetraseriados (Dadswell 1972). Esta anatomía compleja podría ser, en parte, reflejo de la alta radiación adaptativa del género. En particular, la contribución de los elementos traquearios imperforados (como las traqueidas vasicéntricas –TV– y las fibrotraqueidas) en funciones como la conducción hidráulica ha sido poco estudiada (Carlquist 1985, 2012, Pan & Tyree 2019). Sano et al. (2011) han demostrado que la función de conducción de estos elementos depende fundamentalmente de la estructura, tamaño y densidad del par de puntuaciones entre el elemento imperforado y el vaso. Según algunos autores, la función de las traqueidas en especies con vasos no agrupados (es decir, solitarios), como es el caso de las del género *Eucalyptus*, es esencialmente de comunicación entre vasos (Carlquist 2012), aumentando de esta forma la conectividad del xilema (Loepfe et al. 2007, Martínez-Vilalta 2012, Pan & Tyree 2019). Asimismo, se ha propuesto (Carlquist 1985) que las TV constituirían un sistema de conducción de agua subsidiario cuando el principal –constituido por los vasos– se encuentra cavitado, manteniendo así una funcionalidad basal que permite el intercambio gaseoso en condiciones de estrés hídrico. Esta hipótesis supone una menor vulnerabilidad a la cavitación de las TV respecto de los vasos, y la necesidad de cierto aislamiento entre ambos, de manera que el aire que se encuentra dentro del vaso cavitado no penetre en las TV contiguas, las cuales permanecerían en tensión. Esta hipótesis implica que, ante

³ La mayor parte de los resultados del presente capítulo han sido publicados en el siguiente artículo: Barotto, A.J., Fernández, M.E., Gyenge, J., Meyra, A., Martínez-Meier, A., Monteoliva, S. 2016. First insights into the functional role of vasicentric tracheids and parenchyma in *Eucalyptus* species with solitary vessels: Do they contribute to xylem efficiency or safety? *Tree Physiology*, 36 (12): 1485-1497. DOI: 10.1093/treephys/tpw072

⁴ Agradezco particularmente al Dr. Javier Gyenge, quien colaboró activamente en todos los muestreos necesarios para confeccionar esta tesis, y al Dr. Ariel Meyra, cuyos aportes fueron fundamentales para pensar el análisis de este sistema de estudio.

similares características de los vasos, una madera con mayor proporción de TV sería más resistente a la cavitación que una con menor proporción de este tipo de células. Alternativamente, las TV podrían actuar como reservorios de agua, aumentando la capacitancia del sistema (Scholz et al. 2007, Ziemińska et al. 2013, Oliva Carrasco et al. 2014, Pfautsch et al. 2015). En este caso, una mayor vulnerabilidad a la cavitación de las mismas, en comparación con los vasos, podría disminuir las tensiones en el sistema de conducción principal. Hasta donde se tiene conocimiento, no existen estudios que dilucidan este rol –alternativo– de las TV (conducción, capacitancia, resistencia a la cavitación) en especies de vasos solitarios, por lo que se requieren estudios que combinen enfoques anatómicos y ecofisiológicos.

La conductividad hidráulica específica de una porción de madera (k_s) resulta una medida de la porosidad del xilema (Tyree & Ewers 1991) y, por consiguiente, para el caso de angiospermas, del tamaño y frecuencia de vasos. Esta se relaciona funcionalmente con la capacidad de fijación de carbono del individuo (Hubbard et al. 2001; Santiago et al. 2004) y, por lo tanto, con su crecimiento (p.ej. Brodribb et al. 2005, Kondoh et al. 2006) y supervivencia. Asimismo, diversos trabajos han mostrado el fuerte valor adaptativo de la resistencia a pérdidas de conductividad hidráulica (es decir, vulnerabilidad a la cavitación –VC–) en distintas especies leñosas, observándose en estudios multiespecíficos un aumento promedio de la resistencia a la cavitación a medida que aumenta la aridez (Pockman & Sperry 2000; Maherali 2004). La disminución de la VC como mecanismo de resistencia a la sequía se asocia a una estrategia tolerante de la desecación (*sensu* Levitt 1980), mientras que otras especies resisten el estrés hídrico mediante una estrategia evitadora (Levitt 1980), que se apoya en evitar altas tensiones en el xilema mediante una alta conductancia hidráulica general (favorecida por una alta k_s del xilema), alta capacitancia en los tejidos, y/o un fuerte control estomático del potencial hídrico mínimo (Meinzer & McCulloh 2013).

La relación entre la conductividad hidráulica y la vulnerabilidad a la cavitación con el tamaño y frecuencia de vasos ha sido estudiada en diversas especies angiospermas (p.ej. Tyree & Zimmermann 2002, Wheeler et al. 2005, Loepfe et al. 2007, Cai & Tyree 2010). Los resultados indican que, a mayor diámetro de vasos y mayor conductividad, se observa una menor resistencia a la cavitación, si bien no hay una relación directa causal entre el diámetro del vaso y la VC por tensión. Sin embargo, son escasos los estudios que relacionen otros tipos celulares, como las TV, las fibrotraqueidas, los radios y el parénquima axial, con la conductividad y la vulnerabilidad a la cavitación en general, y nulos los antecedentes de este tipo para las especies del género *Eucalyptus*, objeto de estudio de esta tesis.

Hacke et al. (2009) demostraron, para especies leñosas del desierto californiano (EE. UU.), cuya anatomía incluye traqueidas (vasicéntricas y vasculares), que ciertas diferencias en la resistencia a la cavitación no podían ser explicadas por el área de punteaduras de los vasos (una de las hipótesis más aceptadas). Por lo tanto, en la discusión de sus resultados incorporaron la idea de que debería incluirse el área de punteaduras

entre vasos y traqueidas para explicar los patrones encontrados, ya que estas aumentarían la conectividad del sistema. Por otra parte, un estudio en el arbusto *Hippophae rhamnoides* (Cai et al. 2014) sugiere que las fibrotraqueidas que rodean a los vasos son las responsables de la existencia de curvas de vulnerabilidad a la cavitación “recalcitrantes” en dicha especie. Estas curvas constan de dos fases, una de las cuales es de mayor vulnerabilidad debido probablemente a la cavitación de vasos interconectados directamente, y una segunda fase, más resistente (o recalcitrante), que correspondería a los vasos conectados a través de “puentes” de fibrotraqueidas. Estas células contribuirían así con la interconexión entre vasos necesaria para mantener la conductividad, disminuyendo a su vez la posibilidad de propagación de embolismos. Un estudio reciente (Pan & Tyree 2019) muestra, a partir de teorizaciones hidráulicas, que, si bien el aporte a la conductividad hidráulica de las traqueidas que rodean vasos solitarios es muy bajo para largas distancias axiales, estas células pueden tener un rol central actuando como puentes hidráulicos entre vasos gracias a las cortas distancias en dirección radial y a la amplia superficie de contacto entre el vaso y la traqueida. Según estos autores, las traqueidas en estos puentes actuarían aumentando la conectividad entre vasos, y a la vez, disminuyendo la VC del xilema gracias a que podrían “atrapar” los embolismos, retrasando su pasaje a los vasos funcionales. Sin embargo, estos autores reconocen la necesidad de ampliar los estudios a otras especies leñosas dado el escaso conocimiento funcional de estas células.

Objetivos

El objetivo del presente capítulo fue relacionar la anatomía de la madera de ramas con la conductividad hidráulica y la vulnerabilidad a la cavitación en tres especies de *Eucalyptus* de importancia comercial a nivel mundial y para la región pampeana argentina en particular. La intención es contribuir al conocimiento del valor funcional de la madera en este género debido a que constituye un sistema modelo para estudiar la contribución de los diferentes elementos celulares en el funcionamiento hidráulico del xilema para especies latifoliadas de anatomía compleja. Para este propósito se seleccionaron tres especies caracterizadas por tener madera de mediana (*E. globulus* y *E. viminalis*) y alta (*E. camaldulensis*) densidad en el fuste (InsideWood 2004 – en adelante).

En función de este objetivo general se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Dilucidar el rol primario de las TV en el funcionamiento coordinado del xilema
- Cuantificar el grado de compromiso existente entre eficiencia y seguridad conductiva en las especies analizadas.
- Poner a prueba la hipótesis establecida por Hacke et al. (2001), establecida tanto para especies gimnospermas como para angiospermas de vasos agrupados, donde el refuerzo de la pared de los vasos se encuentra relacionado con la resistencia a la cavitación de las especies.
- Cuantificar la relación entre vulnerabilidad a la cavitación y densidad de madera en las especies de *Eucalyptus* seleccionadas.

Hipótesis

En función de los diferentes objetivos planteados, se plantearon diferentes hipótesis. Entre ellas, en primer término, se plantean dos hipótesis alternativas en cuanto al posible rol de las TV y otras células acompañantes de los vasos:

a) Las TV contribuyen a la seguridad del sistema conductivo, al disminuir la vulnerabilidad a la cavitación general del xilema;

b) Las TV aumentan la conectividad entre vasos, aumentando la eficiencia de conducción del xilema.

Teniendo en cuenta la complejidad que atañe la puesta a prueba de estas hipótesis alternativas, se plantearon predicciones que deberían cumplirse de manera de aportar evidencia a favor de una u otra, lo cual podrá complementarse con investigaciones futuras. En este sentido, las predicciones que se plantean son: a) si las traqueidas vasicéntricas (y las demás células que rodean a los vasos: parénquima axial y fibrotraqueidas) contribuyen principalmente a disminuir la vulnerabilidad a la cavitación, habrá diferencias entre especies en la proporción de TV de acuerdo a su VC (es decir, mayor proporción de TV en especies o genotipos con mayor resistencia a la cavitación); y b) Si las TV contribuyen mayormente a incrementar la conectividad del xilema, actuando a manera de puentes hidráulicos, las diferencias entre especies en la cantidad de TV (y las demás células que rodean a los vasos) ayudarán a explicar las diferencias en conductividad hidráulica específica máxima (*ks max*), además de aquellas derivadas de cambios en el diámetro de vasos.

Adicionalmente se plantean las siguientes hipótesis:

c) Si las células acompañantes contribuyen significativamente tanto a aumentar la resistencia a la cavitación como la eficiencia hidráulica, podría existir un bajo o nulo compromiso entre eficiencia y seguridad conductiva entre especies. Esto se vería reflejado, por un lado, en correlaciones no significativas o inversas a las esperadas entre los parámetros derivados de la curva de VC y *ks max*, así como con el tamaño de vasos y los parámetros que describen su distribución diamétrica.

d) No existe relación entre los parámetros que describen la VC y el refuerzo de las paredes de los vasos, pero sí con las células acompañantes. Así, en especies de vasos solitarios como *Eucalyptus*, la cantidad de células que rodean los vasos, así como su espesor de pared y nivel de turgencia (de las células vivas), constituirían un refuerzo de la pared para vasos solitarios y ayudarían a explicar, por ejemplo, posibles relaciones entre la vulnerabilidad a la cavitación y las dimensiones de las fibras o la cantidad de parénquima vasicéntrico.

e) Existe una relación inversa entre la densidad de madera y la VC en las especies de *Eucalyptus*, siendo *E. camaldulensis* más resistente a la cavitación que *E. viminalis*, y

este ligeramente más resistente que *E. globulus*. Esta relación estaría mediada por la necesidad de que la matriz fibrosa que rodea a los vasos tenga paredes celulares gruesas, de manera de brindar un mayor soporte mecánico frente a la gran tensión que se genera dentro del xilema en aquellas especies más resistentes a la cavitación (Jacobsen et al. 2005).

Materiales y métodos

Sitio y material vegetal

Este estudio se llevó a cabo utilizando material vegetal proveniente de 15 ejemplares adultos (15-25 metros de altura) de *E. camaldulensis* (n = 5), *E. viminalis* (n = 4) y *E. globulus* (n = 6), creciendo en condiciones de jardín común (Tandil, provincia de Buenos Aires, Argentina, 37°20' S, 59°08' O, 188 msnm), como parte de plantaciones no comerciales. Se colectaron ramas de la porción basal de la copa (entre 1,5 y 3 metros sobre el nivel del suelo), teniendo en cuenta que las mismas tuvieran dimensiones similares (aprox. 5 mm de diámetro con corteza y 1,5 metros de longitud). Previo al muestreo final reportado en este capítulo, se determinó la longitud máxima de vasos para cada especie mediante el método de inyección de aire (Greenidge 1952), la cual se encontró que varía entre 50 y 72 cm, siendo significativamente (test HSD de Tukey, $p < 0,05$) más largos en *E. camaldulensis* y *E. viminalis* que en *E. globulus*.

Elaboración de las curvas de vulnerabilidad a la cavitación

Las ramas (n = 4-6, dependiendo de la especie) se colectaron durante la primavera, a la mañana temprano (entre las 8:00 y 9:00 am), y fueron colocadas en bolsas de polietileno negras, las cuales fueron asperjadas con agua para lograr un ambiente saturado de humedad y así evitar su deshidratación. Luego, las ramas fueron llevadas al laboratorio, donde fueron acondicionadas y almacenadas adecuadamente (Jinagool et al. 2015).

Previo a la determinación de la conductividad máxima, y con el objetivo de remover los posibles embolismos pre-existentes, se utilizó un perfusionador de “alta” presión (0,1 MPa; Fernández & Gyenge 2010), el cual se conectó, a través de un sistema de mangueras, con una rama a la vez. La medición de la conductividad hidráulica específica máxima (ks_{max} , $kg\ m^{-1}\ MPa^{-1}\ s^{-1}$), así como de la conductividad a cada nivel de tensión, se realizó por el método de la pipeta (Sperry et al. 1988), a través de la siguiente ecuación:

$$ks = \frac{f \cdot l}{\Delta P \cdot a}$$

donde f ($kg\ s^{-1}$) es el flujo de agua, calculado como el volumen de agua transportado durante un período de tiempo, el cual atraviesa una muestra de longitud l (m) y área a (m^2), en función de una diferencia de potencial ΔP (MPa) (Figura 3.1).

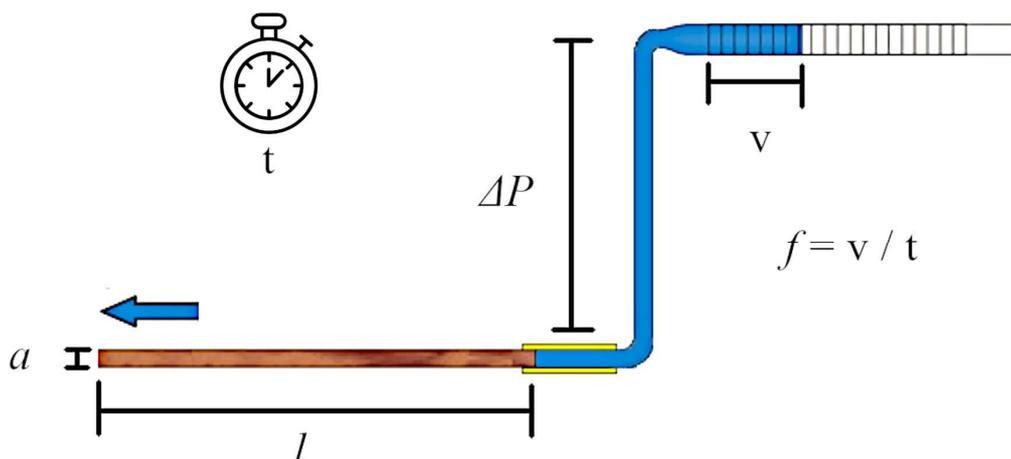


Figura 3.1. Esquema del sistema utilizado para la medición de conductividad hidráulica específica.

Luego de probar con diversos tiempos de presurización y estabilización (mediante la realización de mediciones preliminares en otras ramas), se estableció el siguiente protocolo:

1. Perfusión durante 5 minutos a 1 bar (0,1 MPa) de presión, para remover posibles embolismos dentro de la rama;
2. Medición de k_s máxima (k_s max);
3. Tensión constante, aplicada dentro de la cámara de cavitación, durante dos minutos (desde -0,5 hasta -7,5 MPa);
4. Estabilización durante al menos 5 minutos (o hasta que ninguna burbuja salía por los extremos del segmento de rama), tiempo durante el cual el agua fluyó a través de la rama a baja presión (ΔP máximo = 0,01 MPa); y
5. Medición de k_s .

Los pasos 1 y 2 fueron realizados sólo al comienzo de cada curva, mientras que los pasos 3, 4 y 5 se repitieron para cada punto de la curva.

Las curvas de vulnerabilidad a la cavitación fueron obtenidas mediante la utilización de una bomba de presión de Scholander (Bio-Control, modelo 10, Argentina) la cual contaba con una cámara de cavitación de doble entrada de la misma firma (Figura 3.2).

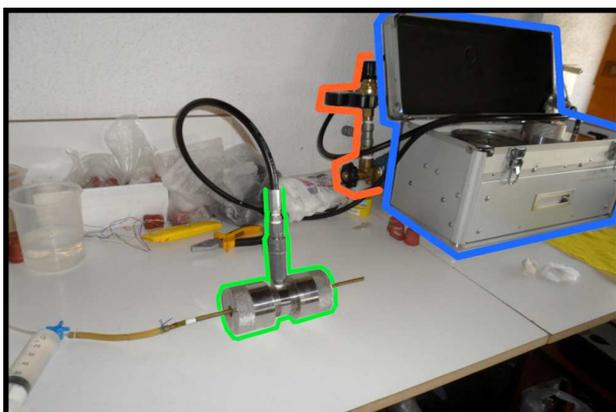


Figura 3.2. Sistema utilizado para la elaboración de las curvas de vulnerabilidad a la cavitación en las tres especies de *Eucalyptus* analizadas. Al centro (verde) se observa la cámara de cavitación con un segmento de rama en su interior, el cual se encuentra unido a la pipeta donde se realizan las determinaciones de conductividad (Figura 3.1). A la derecha (azul) se observa la bomba de presión de Scholander, en la cual se controla la tensión a la que se somete la rama. Esta tensión se genera a través de la unión del sistema a un tubo cargado con N_2 presurizado (naranja).

El porcentaje de pérdida de conductividad (*PPC*) fue estimado a partir de las pérdidas de *ks*, para cada nivel de tensión impuesto, con relación a la *ks* máxima (*ks max*) de cada rama. Luego de obtenidos los valores de pérdida de conductividad se ajustaron esos datos a la función sigmoidea descrita por Pammenter y Vander Willigen (1998), pero debido a su falta de ajuste en los valores más bajos de tensión para *E. globulus*, se decidió utilizar la función de distribución acumulada (CDF, por sus siglas en inglés) de la distribución de Weibull. Esta distribución ha sido propuesta como la más útil para curvas con diferentes formas, más o menos sigmoideas (Sperry et al. 2012, citado en Cai et al. 2014):

$$PPC / 100 = 1 - \exp [-(T/b)^c]$$

donde: *T* es la tensión aplicada dentro de la cámara de cavitación, *b* es el parámetro de escala y *c* es el parámetro de forma de la distribución de Weibull. Los parámetros usuales como *P*₅₀, *P*₁₂ y *P*₈₈ (MPa), esto es la tensión que induce un 50, 12 y 88% de pérdida de conductividad, así como la *pendiente* (% MPa⁻¹) entre *P*₁₂ y *P*₈₈ para cada curva (que denota cuán rápida es la pérdida de conductividad) fueron estimados a partir de este modelo. *P*₁₂ corresponde al punto de entrada del aire (Sparks & Black 1999), y *P*₈₈ es considerado el punto después del cual el xilema se vuelve completamente no conductivo (Domec & Gartner 2001).

Como se mencionó previamente, durante el establecimiento del protocolo para la elaboración de las curvas de cavitación, se llevaron a cabo curvas de VC preliminares en numerosos segmentos de ramas de distinta longitud (Figura 3.3). Dentro de esta amplia gama de curvas, aquellas realizadas con segmentos cercanos a los 30 cm produjeron curvas de forma relativamente sigmoidea (con forma de s), mientras que los segmentos de 20 cm dieron como resultado curvas exponenciales (con forma de r). Consecuentemente, y a pesar de ser conocido que algunos vasos largos están siendo cortados, por razones operacionales (para evitar bifurcaciones de las ramas) y debido a que las curvas mostraron patrones aceptables, se definió como adecuadas para llevar a cabo la experimentación a aquellas ramas cuyas dimensiones fueran de aproximadamente 30 cm de longitud y de 4 a 6 mm de diámetro.

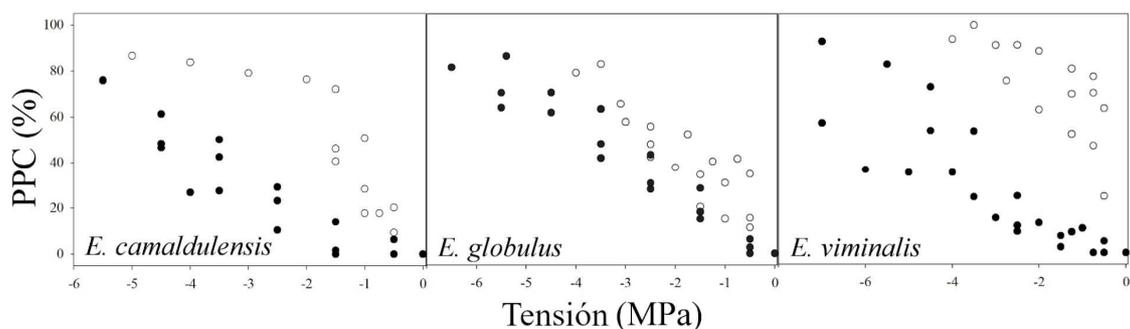


Figura 3.3. Porcentaje de pérdida de conductividad hidráulica (*PPC*) medida en segmentos de rama de 20 cm (puntos blancos) y de 30 cm de longitud (puntos negros) de *Eucalyptus camaldulensis*, *E. globulus* y *E. viminalis*.

Variables anatómicas analizadas

Una vez realizadas las curvas de vulnerabilidad a la cavitación, las ramas fueron acondicionadas adecuadamente a fin de obtener los cortes histológicos para las mediciones anatómicas ($n = 4-6$ ramas, según la especie). Se obtuvieron preparados de la totalidad de la sección transversal, de 20-25 μm de espesor, utilizando un micrótopo de deslizamiento. A los cortes histológicos obtenidos no se les aplicó tinción (ver más adelante) y fueron montados en forma transitoria en agua. Además, se realizaron macerados en una porción de 1 cm de largo de cada segmento de rama, con una solución 1:1 de ácido acético glacial (6% P/V) y peróxido de hidrógeno (30% P/V) (Franklin 1945) para el conteo de fibras y traqueidas y la medición de sus longitudes. Las imágenes de la sección transversal y de macerados fueron capturadas con una cámara digital (Infinity1-2CB, Lumenera Corporation, Ottawa, Canadá) montada a un microscopio óptico de investigación (CX31, Olympus, Tokio, Japón) usando el objetivo de 4X (20–25 imágenes para tomar el total del segmento de rama) y de 20X (20 imágenes para tomar dos radios completos de médula a corteza por rama). Estas imágenes luego fueron procesadas a través de un software específico para el análisis de imágenes (ImagePro Plus 6.0, Media Cybernetics, Carlsbad, EE. UU.).

Las siguientes variables se midieron en sección transversal (la metodología de medición se explicita seguidamente): diámetro de vasos (DV , μm), frecuencia de vasos (FV , mm^{-2}), área del halo⁵ comprendido por las células acompañantes de cada vaso (Ha , μm^2), área de halo/área de vaso (RHV , adimensional), factor de refuerzo de los vasos ($(t/b)^2$, adimensional), puentes hidráulicos intervasculares (PiV , longitud y número de células), diámetro mayor de las punteaduras de los vasos (Vp , μm), diámetro mayor de las punteaduras de las TV (TVp , μm), espesor de pared de fibras (EPF , μm), diámetro de lumen (DLF , μm), diámetro de fibras (DF , μm), cantidad de radios por mm lineal (Rmm , mm^{-1}) y área de contacto entre vasos y radios ($V-R$, %). En macerados se realizaron las siguientes mediciones: porcentaje de fibras ($F\%$), porcentaje de fibrotraqueidas ($FT\%$), porcentaje de TV ($TV\%$), porcentaje de parénquima axial ($PA\%$), longitud de fibras (LF , μm), longitud de TV (LTV , μm) y longitud de elementos de vaso (LV , μm). A su vez, se determinó la densidad normal de la madera a nivel de rama al 15% de contenido de humedad (Dn , g cm^{-3}).

Se utilizó el software de procesamiento de imágenes previamente mencionado para marcar el perímetro del halo manualmente y calcular el área automáticamente (Figura 3.4). Se procedió de la misma manera con cada vaso individual en cada una de las imágenes (20 por muestra).

⁵Halo: se utiliza este término para referirse al conjunto de células que rodean a los vasos solitarios, compuesto principalmente por traqueidas vasicéntricas y parénquima axial. En corte transversal no es posible distinguir las traqueidas del parénquima axial, esto se logra en cortes longitudinales y macerados. La no tinción de los preparados hizo posible resaltar el halo (mediante ajustes de los valores gamma de la imagen) para su mejor cuantificación en corte transversal (Figura 3.4). La medición del área de halo se realizó sobre las imágenes digitales de los cortes transversales usando un aumento de 200x.

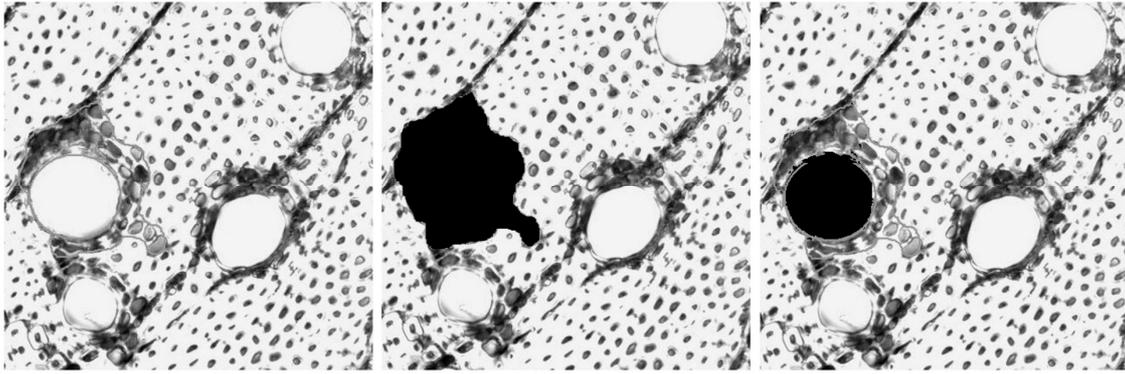


Figura 3.4. Metodología de determinación del área de los halos celulares que rodean a los vasos. Cortes transversales (200x) sin teñir de *E. globulus* mostrando los vasos solitarios rodeados de “halos” más oscuros compuestos de traqueidas vasicéntricas y parénquima axial (*panel izquierdo*). Se marcó manualmente el área del vaso más el halo (*panel central*), y luego se le descontó la superficie del vaso (*panel derecho*).

El diámetro y la frecuencia de vasos se midieron (sobre imágenes digitales con un aumento de 200x en corte transversal; 20 imágenes por muestra) en forma automática, mediante el conteo de áreas claras con determinadas características de diámetro (entre 10 y 100 μm). El porcentaje de vasos en cada clase diamétrica fue ajustado mediante la función de densidad de probabilidad de la distribución de Weibull (*PDF*, por sus siglas en inglés):

$$\text{PDFV}(x; b, c) = \frac{c}{b} \left(\frac{x}{b}\right)^{(c-1)} \exp\left[-\left(\frac{x}{b}\right)^c\right]$$

donde: b y c son parámetros (equivalentes a los de la función de distribución acumulada) y x es la categoría diamétrica, definida como $x = dc/dw$, donde dw es la amplitud de la clase diamétrica (10 μm en este estudio) y dc es el diámetro en el centro de la clase diamétrica. Los parámetros b y c describen la amplitud y la forma (más o menos simétrica) de la distribución de vasos, respectivamente, y fueron usados para el análisis de componentes principales y análisis de correlación con otras variables anatómicas y funcionales.

Se estimó el factor de refuerzo de los vasos $(t/b)^2$ según Hacke et al. (2001), siendo b = diámetro de lumen y t = grosor de la doble pared conformada por dos vasos contiguos. Debido a que las especies estudiadas solo presentan vasos solitarios, y al estar siempre en comunicación con TV, el cálculo de b se realizó de dos formas: a) como la suma del ancho de la pared del vaso más la de las TV contiguas $(t/b)^2$, y b) como la suma del ancho de la pared del vaso más el espesor del halo completo $(t/b)^2_h$. Se midieron 25 pares de vasos-TV por muestra, sobre imágenes de la sección trasversal (200x).

Las punteaduras intervasculares y de las traqueidas se midieron en imágenes de macerados con un aumento de 400x en forma manual. Se computó la longitud mayor de la cámara de la puntuación ($n=60$) en 20 células individuales por muestra. Los puentes intervasculares fueron medidos manualmente como la distancia entre 6 y 8 vasos

adyacentes por imagen (aumento de 200x en corte transversal; 20 imágenes por muestra). Esta distancia (medida en micrones) fue determinada tanto en sentido radial como tangencial, y se contabilizó, además, el número de células comprendido en ella. El término “puente” es utilizado para hacer referencia a todos los tipos de células ubicados entre dos vasos solitarios, incluidas las TV, fibrotraqueidas, fibras y parénquima axial. Esta es una medida lineal de la distancia entre vasos que puede actuar, de acuerdo con Cai et al. (2014), como “puente hidráulico” en ciertas especies.

Las dimensiones de las fibras ($n = 60$ por muestra) fueron medidas manualmente en imágenes con un aumento de 200x en corte transversal. Se determinó el doble espesor de la pared de fibras y luego se dividió por 2 el promedio, obteniéndose así el espesor de pared de fibras. El diámetro del lumen se calculó como dos medidas de longitud ortogonales de pared interna a pared interna de la fibra. El diámetro de las fibras se calculó como la suma del diámetro del lumen más dos veces el espesor de pared. La proporción de los diferentes tipos celulares (fibras, fibrotraqueidas, TV y parénquima axial) se calculó como la cantidad de cada tipo celular presente en un extendido de macerado referido a la cantidad total de células contadas ($n \geq 1000$) sobre imágenes tomadas en 200x (15 imágenes por muestra). La longitud de los distintos tipos celulares (fibras, TV y elementos de vaso) se midió en forma manual en imágenes obtenidas de los macerados en 4x. Se midieron 25 elementos de vaso (sin apéndices) y 50 fibras y traqueidas vasicéntricas por muestra. Los radios se contabilizaron sobre las imágenes obtenidas en sección trasversal (200x, 20 imágenes por muestra) sobre una línea trazada en sentido perpendicular a los radios, llevando luego el número obtenido a cantidad por mm lineal. El contacto entre vasos y radios se midió en forma manual sobre las imágenes 200x de los cortes transversales (20 imágenes por muestra). En cada vaso cuya pared estaba en contacto con un radio, se midió el perímetro del vaso y la longitud del contacto vaso-radio. Esa medida se expresó como % siendo el 100% el perímetro completo del vaso.

La densidad de la madera se determinó en las ramas descortezadas secas al aire (con un contenido de humedad del 15%), como masa/volumen. El volumen se determinó por desplazamiento de fluidos.

Adicionalmente, a fin de confirmar cualitativamente si los elementos celulares que rodean a los vasos actúan como “puentes hidráulicos”, se hicieron cortes en sección transversal (a mano alzada) de ramas a las cuales se les hizo pasar una solución de safranina al 0,1%. La solución de safranina se hizo pasar a través de segmentos de rama de 30 cm de longitud, similares a aquellos utilizados para elaborar las curvas de VC, mediante el método de la pipeta, con un gradiente de presión de 0,007 MPa. Se hicieron cortes a varias distancias desde el extremo proximal y a diferentes tiempos de perfusión (tiempo mínimo: momento en el cual la solución de safranina apareció en el extremo distal de la rama, lo cual demandó diferente tiempo dependiendo de la conductividad de la especie considerada).

Análisis estadístico

Las hipótesis fueron testeadas por medio del análisis de las relaciones entre pares de variables a través del análisis de correlación de Spearman (debido a que los datos no cumplían con los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas). Con el fin de dilucidar la contribución de las TV en el funcionamiento del xilema (hipótesis alternativas a y b), se testeó la relación entre la proporción de TV y el área de halo con los parámetros de VC (P_{12} , P_{50} , P_{88}) y ks_{max} . Para determinar si existe compromiso entre eficiencia y seguridad conductiva (hipótesis c) se analizaron las relaciones entre los parámetros de VC, ks_{max} , dimensión de vasos y parámetros de la curva de distribución de vasos (parámetros b y c de la función de densidad de probabilidad de la distribución de Weibull). La hipótesis d fue probada por medio del análisis de la relación entre los factores de refuerzo ($(t/b)^2$ y $(t/b)^2_h$) y los parámetros de VC, y para la hipótesis e se consideró las relaciones de la densidad de la madera con los parámetros de VC y aquellas variables anatómicas que describen la matriz fibrosa y las células que rodean a los vasos.

Además de los análisis entre pares de variables descriptos anteriormente, se llevó a cabo un análisis multivariado utilizando análisis de componentes principales (ACP) a fin de detectar asociaciones importantes no tenidas en cuenta en nuestras hipótesis. Para ello se estandarizaron las variables básicas y los factores ortogonales (F1, F2 y F3) fueron construyéndose sucesivamente como combinaciones lineales de estas variables, de manera de maximizar la porción de la variabilidad explicada por estos factores.

Las diferencias significativas entre valores medios de las variables entre especies ($\alpha = 5\%$) fueron detectadas a través de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y fueron posteriormente analizadas a través de un test de comparación múltiple de medias (Statistica v.7, Statsoft, Tulsa, EE. UU.).

Se utilizó la metodología de tablas de contingencia para establecer diferencias entre especies en la distribución del tamaño de vasos. Además, se utilizó la metodología de Análisis de Sendero (*path analysis*, InfoStat versión 2015 - Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) para determinar los efectos directos e indirectos del diámetro de vasos y el área de halo sobre la ks_{max} .

Resultados

Rol funcional de las células que rodean a los vasos (hipótesis a y b)

Eucalyptus viminalis y *E. camaldulensis* mostraron curvas de vulnerabilidad a la cavitación similares, con una forma claramente sigmoidea, mientras que la forma de la curva correspondiente a *E. globulus* puede ser descripta como exponencial (Figura 3.5). *E. globulus* mostró el mayor nivel de vulnerabilidad ($P_{50} = -2,44$ MPa y $P_{12} = -0,61$ MPa), mostrando valores significativamente mayores (menos negativos) que aquellos de las otras dos especies (*E. viminalis*: $P_{50} = -3,76$ MPa y $P_{12} = -1,85$ MPa; *E. camaldulensis*:

$P_{50} = -4,22$ MPa y $P_{12} = -2,12$ MPa). No se observaron diferencias en P_{88} ni en la pendiente de las curvas entre las tres especies (Tabla 3.1).

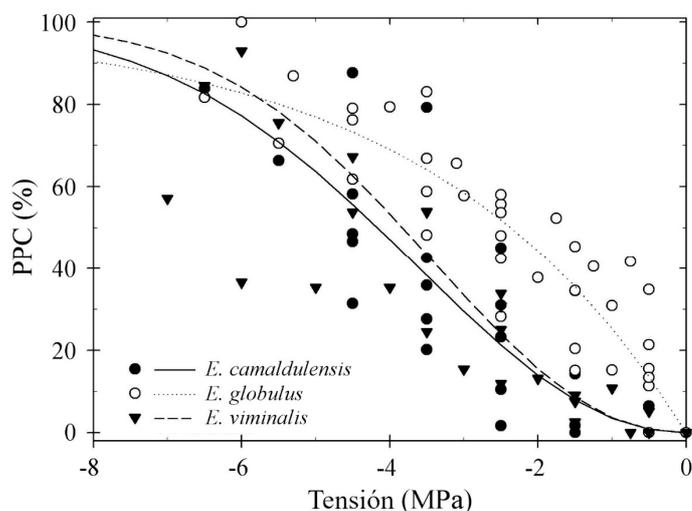


Figura 3.5. Relación entre el porcentaje de pérdida de conductividad (PPC) y la tensión aplicada al xilema (MPa) en 4 a 6 ramas de tres especies de *Eucalyptus*. Los símbolos representan el porcentaje de pérdida a una determinada tensión, para cada rama de la especie. Las curvas representan la pérdida de conductividad predicha por el modelo Weibull. Los parámetros de cada curva se muestran en la Tabla 3.1.

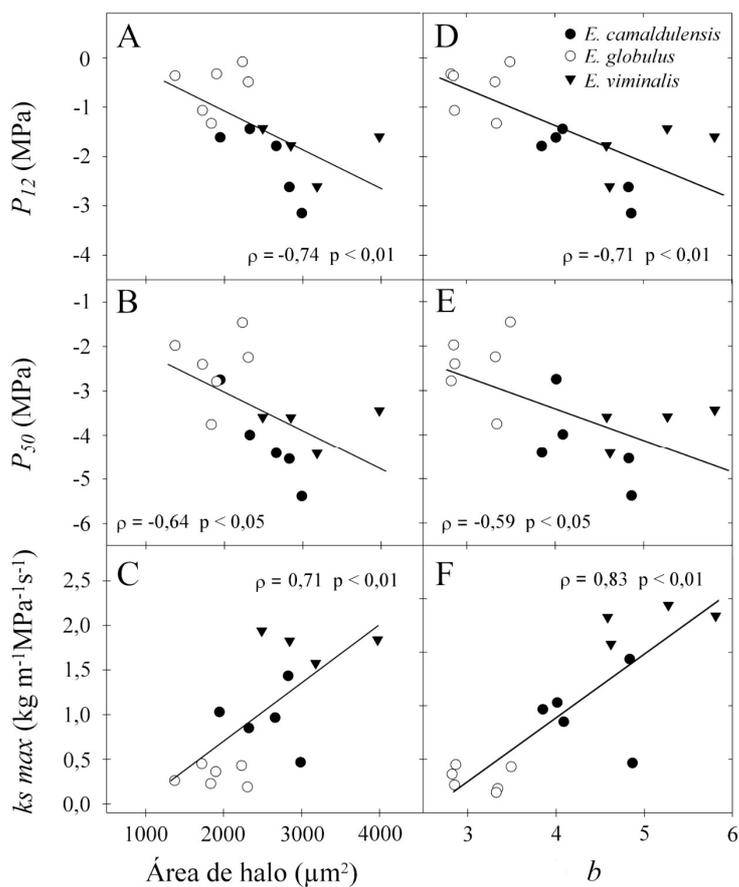


Figura 3.6. Columna izquierda: potencial agua al 12 por ciento de pérdida de conductividad hidráulica (P_{12} ; panel A), potencial agua al 50 por ciento de pérdida de conductividad hidráulica (P_{50} ; Panel B) y conductividad hidráulica máxima (ks_{max} ; panel C) en función de la superficie promedio de células acompañantes (halo) que rodean a los vasos. Columna derecha: potencial agua al 12 por ciento de pérdida de conductividad hidráulica (P_{12} ; panel D), potencial agua al 50 por ciento de pérdida de conductividad hidráulica (P_{50} ; Panel E) y conductividad hidráulica máxima (ks_{max} ; panel F) en función del parámetro b de la función de densidad de probabilidad de la distribución de Weibull (PDF) para la distribución de diámetro de vasos (que cuantifica la amplitud de esa distribución).

A pesar de las diferencias observadas en VC (P_{12} y P_{50}) entre *E. globulus* y las otras dos especies, no se encontraron diferencias significativas en la proporción o tamaño de TV entre especies (Tabla 3.1). A pesar de ello, se observó una correlación significativa ($\rho = -0,55$, $p < 0,05$) entre $TV\%$ y P_{12} (Tabla 3.2), lo cual indica que aquellos individuos con

mayor proporción de TV son menos vulnerables a la cavitación a valores de tensión más bajos, iniciándose la fase exponencial del proceso de cavitación a menor potencial agua (es decir, a mayor tensión en el xilema). A su vez, se observaron correlaciones negativas y altamente significativas entre P_{12} y P_{50} con el área de halo (Figura 3.6 A-B; Tabla 3.2), que incluye a TV y células de parénquima.

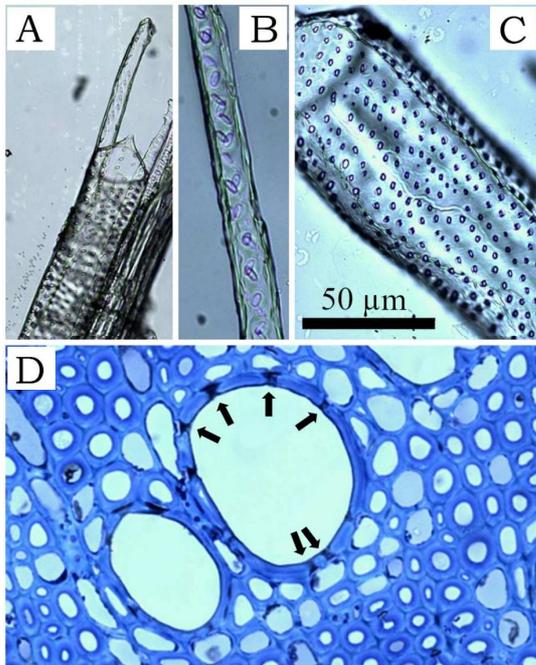


Figura 3.7. Imágenes de elementos de vaso (A, C y D) y traqueidas vasicéntricas (A, B y D) en macerados y cortes en sección transversal. Detalle de las punteaduras de TV (B) y pares de punteaduras entre vasos y TV (D, flechas). Especie: *E. globulus*.

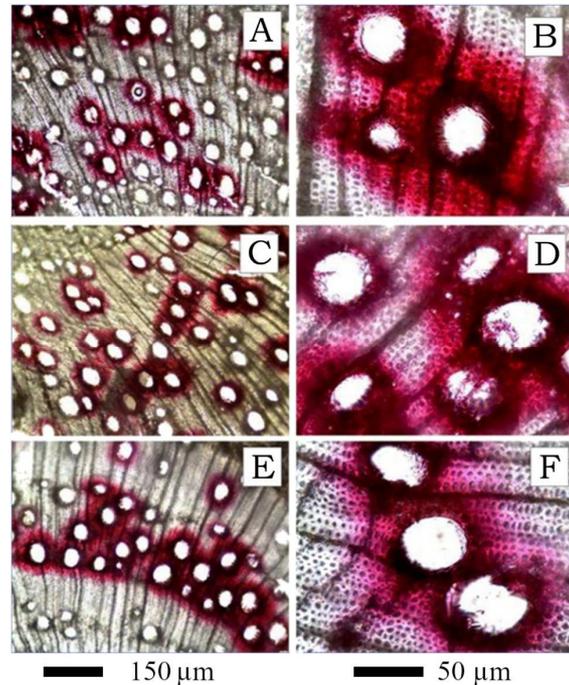


Figura 3.8. Interconexión entre vasos solitarios determinada mediante tinción con safranina. Imágenes en sección transversal de las tres especies. Paneles A-B: *E. globulus*; C-D: *E. viminalis*; E-F: *E. camaldulensis*. Columna izquierda: aumento de 40x. Columna derecha: aumento de 100x.

Considerando la conectividad entre TV y vasos, se observaron conjuntos de punteaduras areoladas de gran tamaño en todas las paredes radiales y tangenciales de las TV (Figura 3.7 A y B). El eje mayor de la cámara de la punteadura de las TV varió desde 5,47 a 5,89 μm (Fig. 3.7 B) sin diferencias significativas entre especies ($p = 0,07$, Tabla 3.1). En contraste, las punteaduras vasculares de *E. viminalis* ($V_p = 4,32 \mu\text{m}$) fueron significativamente menores (Tabla 3.1) que aquellas de *E. globulus* (5,68 μm , Figura 3.7 A y C) y *E. camaldulensis* (6,36 μm). La conexión de las TV con los vasos a través de punteaduras se detectó a través de imágenes en sección transversal sobre cortes microfinos, incluyendo a veces dos pares de punteaduras por cada traqueida (flechas en la Figura 3.7 D).

En concordancia con esta alta conexión entre vasos y TV, las células acompañantes (TV, fibrotraqueidas y parénquima axial) que forman el halo alrededor de los vasos fueron rápidamente teñidas cuando la solución de safranina se hizo pasar a través del segmento de rama (Figura 3.8). El área teñida alrededor de cada vaso se incrementó cuando se hizo pasar la solución de safranina durante más tiempo, y a medida que la distancia desde el

extremo proximal se acortó. En todos los casos, algunos vasos (así como las células alrededor de ellos) no se tiñeron, lo que indica que las ramas utilizadas se encontraban parcialmente embolizadas (Figura 3.8). No se encontraron diferencias significativas entre especies en la dimensión de los puentes intervascuales (Tabla 3.1), presentando una longitud de 37-39 μm y de 4 a 5 células dentro de esa distancia (dos vasos consecutivos).

Tabla 3.1. Variables anatómicas y funcionales medidas en tres especies comerciales del género *Eucalyptus* creciendo en Tandil, provincia de Buenos Aires, Argentina. Valor H del test de Kruskal-Wallis y p-valor. Para cada variable se reporta media \pm desvío estándar (n = 4-6). Letras diferentes indican diferencias significativas entre especies (test de comparación múltiple de medias). Códigos de probabilidad asociada: < 0,001 = ***, entre 0,001 y 0,01 = **, entre 0,01 y 0,05 = *

Variable	Test H Kruskal-Wallis	<i>E. globulus</i>	<i>E. viminalis</i>	<i>E. camaldulensis</i>
Diámetro de vasos (DV), μm	H (2,18) = 11,09**	34,4 \pm 6,5 a	49,7 \pm 3,4 b	45,5 \pm 4,9 b
Frecuencia de vasos (FV), mm^{-2}	H (2,18) = 11,68**	119,7 \pm 36,1 b	61,5 \pm 8,5 a	86,8 \pm 21,3 ab
Área de halo (Ha), μm^2	H (2,18) = 11,82**	1893,8 \pm 343,2 a	3168,7 \pm 724,4 b	2511,5 \pm 384,3 ab
Área de halo/área de vasos (RHV), adim.	H (2,18) = 1,31	2,29 \pm 0,63	1,87 \pm 0,4	1,83 \pm 0,3
Refuerzo de la pared del vaso (tb) ² , adim.	H (2,18) = 3,82	0,012 \pm 0,004	0,009 \pm 0,004	0,008 \pm 0,002
Refuerzo de la pared del vaso (halo) (tb) ² _h , adim	H (2,18) = 6,89*	0,23 \pm 0,08 b	0,14 \pm 0,05 a	0,14 \pm 0,02 a
Diámetro de punteadura del vaso (Vp), μm	H (2,18) = 13,35**	5,68 \pm 0,63 b	4,32 \pm 0,33 a	6,36 \pm 0,45 b
Diámetro de punteadura de TV (TVp), μm	H (2,18) = 5,42	5,69 \pm 0,24	5,47 \pm 0,26	5,89 \pm 0,30
Puentes (distancia) (PiV _d), μm	H (2,18) = 0,80	39,1 \pm 9,3	38,8 \pm 7,3	37,23 \pm 3,2
Puentes (n° de células) (PiV _n), n°	H (2,18) = 2,90	4,66 \pm 0,87	4,12 \pm 0,85	4,30 \pm 0,27
Espesor de pared de fibras (EPF), μm	H (2,18) = 5,30	1,83 \pm 0,17	2,07 \pm 0,10	1,93 \pm 0,23
Diámetro de fibras (DF), μm	H (2,18) = 4,01	8,56 \pm 0,64	8,26 \pm 0,62	9,02 \pm 0,51
Diámetro del lumen de fibras (DLF), μm	H (2,18) = 9,58**	4,90 \pm 0,55 ab	4,10 \pm 0,48 a	5,08 \pm 0,27 b
Porcentaje de fibras (F%), %	H (2,18) = 3,10	80,3 \pm 3,8	80,4 \pm 4,0	76,8 \pm 3,0
Porcentaje de fibrotraqueidas (FT%), %	H (2,18) = 8,08*	2,92 \pm 0,86 a	4,22 \pm 1,88 ab	6,24 \pm 1,84 b
Porcentaje de TV (TV%), %	H (2,18) = 1,56	7,06 \pm 1,96	8,82 \pm 1,00	8,60 \pm 2,08
Porcentaje de parénquima axial (PA%) %	H (2,18) = 6,22*	10,43 \pm 1,76 b	6,57 \pm 1,89 a	8,33 \pm 3,73 a
Longitud de fibras (LF), μm	H (2,18) = 11,47**	582,8 \pm 19,8 b	498,3 \pm 15,2 a	483,5 \pm 45,4 a
Longitud de TV (LTV), μm	H (2,18) = 2,00	365,9 \pm 21,9	330,4 \pm 28,1	358,3 \pm 61,7
Longitud de elementos de vasos (LV), μm	H (2,18) = 6,98*	296,7 \pm 21,6 b	245,2 \pm 51,4 a	249,8 \pm 12,2 a
Radios por mm lineal (Rmm), mm^{-1}	H (2,18) = 6,81*	26,5 \pm 5,3 b	18,8 \pm 3,1 a	19,7 \pm 2,2 ab
Contacto vaso-radio (V-R), %	H (2,18) = 3,35	36,1 \pm 3,5	35,0 \pm 3,1	32,5 \pm 3,1
Densidad normal al 15% CH (Dn), g cm^{-3}	H (2,18) = 1,10	0,771 \pm 0,061	0,753 \pm 0,052	0,751 \pm 0,043
Conductividad hidráulica específica máxima (ks max), $\text{kg m}^{-1}\text{MPa}^{-1}\text{s}^{-1}$	H (2,15) = 14,36***	0,32 \pm 0,11 a	1,79 \pm 0,15 b	0,95 \pm 0,34 ab
Potencial agua al 50% de conductividad (P ₅₀), MPa	H (2,15) = 7,24*	-2,44 \pm 0,78 a	-3,76 \pm 0,44 ab	-4,22 \pm 0,96 b
Potencial agua al 12% de conductividad (P ₁₂), MPa	H (2,15) = 10,49**	-0,61 \pm 0,48 a	-1,85 \pm 0,52 ab	-2,12 \pm 0,73 b
Potencial agua al 88% de conductividad (P ₈₈), MPa	H (2,15) = 1,40	-7,48 \pm 2,69	-6,07 \pm 0,43	-6,79 \pm 1,72
Pendiente de la curva de vulnerabilidad a la cavitación (pendiente), % MPa^{-1}	H (2,15) = 2,75	13,17 \pm 6,50	18,33 \pm 2,58	18,71 \pm 8,75

De acuerdo con lo esperado en caso de una contribución a la conectividad y eficiencia del xilema por parte de las células acompañantes de los vasos, el área de halo (Ha =

parénquima axial + TV) se correlacionó positiva y significativamente con la ks_{max} ($\rho = 0,71$, $p < 0,01$; Tabla 3.2), siendo su contribución complementaria a la derivada del tamaño de los vasos, que fue la principal determinante en esta relación (de acuerdo con el análisis de senderos). Es interesante resaltar que el tamaño de halo varió entre especies, así como su composición celular. En este sentido, *E. globulus* presentó la menor área de halo, pero la mayor proporción de parénquima axial (Tabla 3.1).

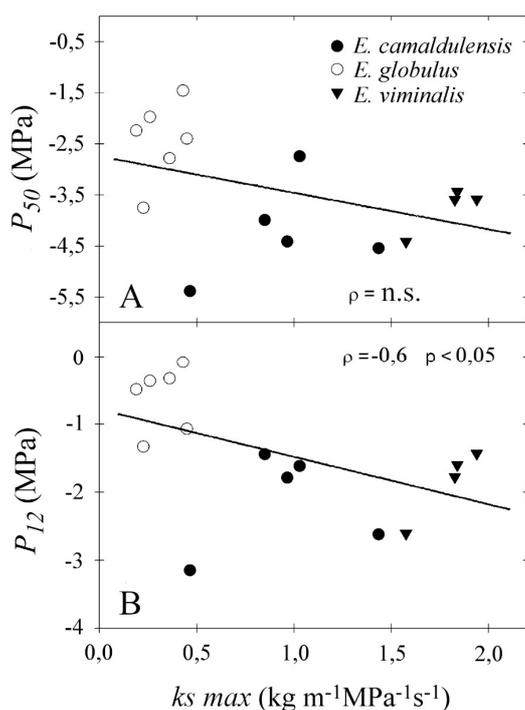


Figura 3.9. Panel superior: potencial agua al 50% de pérdida de conductividad hidráulica (P_{50}) como función de la conductividad hidráulica máxima (ks_{max}) para tres especies de *Eucalyptus*. Panel inferior: potencial agua al 12% de pérdida de conductividad hidráulica (P_{12}) como función de ks_{max} .

Compromiso entre eficiencia y seguridad conductiva en el xilema (hipótesis c)

No se observó un compromiso entre eficiencia y seguridad conductiva en el xilema de las especies de *Eucalyptus* estudiadas, sino el fenómeno contrario: la ks_{max} se correlacionó negativamente con P_{12} ($\rho = -0,6$, $p < 0,05$; Figura 3.9 B), y marginalmente con la pendiente de la curva de VC ($\rho = 0,49$, $p < 0,1$; Tabla 3.2). No se observaron relaciones significativas entre ks_{max} y los demás parámetros derivados de la curva de VC (P_{50} y P_{88}) (Figura 3.9 A; Tabla 3.2). La conductividad hidráulica máxima reflejó las tendencias observadas para diámetro medio de vasos ($\rho = 0,8$, $p < 0,01$; Tabla 3.2) y área de halo entre especies (Figura 3.6 C). *E. globulus*, la especie más vulnerable a la cavitación, presentó la menor ks_{max} ($0,32\ kg\ m^{-1}\ MPa^{-1}\ s^{-1}$), seguida por *E. camaldulensis* ($0,95\ kg\ m^{-1}\ MPa^{-1}\ s^{-1}$) y por último *E. viminalis* ($1,79\ kg\ m^{-1}\ MPa^{-1}\ s^{-1}$).

Se observó una clara diferencia entre especies en la distribución de vasos, siendo esta similar entre *E. viminalis* y *E. camaldulensis* y significativamente diferente en *E. globulus* ($\chi^2 = 60,08$, $p < 0,01$; Figura 3.10, panel izquierdo). Esta última mostró un gran número de vasos de pequeño diámetro, lo cual se reflejó en su bajo diámetro medio ($DV = 34\ \mu m$). *Eucalyptus viminalis* estuvo en el otro extremo, con una pequeña contribución de vasos pequeños (hasta $30\ \mu m$) y mayor frecuencia cerca de su valor medio ($50\ \mu m$). Las diferencias en distribución de diámetro resultaron en diversas curvas de ks teórica acumulada (estimada a través de ley de Hagen-Poiseuille, y relativizada al valor máximo de cada especie) como función del diámetro de vasos (Figura 3.10, panel derecho).

Tabla 3.2. Tabla de coeficientes de correlación de Spearman para las diversas variables analizadas

	<i>b</i>	<i>c</i>	\angle	<i>P</i> ₈₈	<i>P</i> ₁₂	<i>P</i> ₅₀	<i>ks max</i>	<i>Dn</i>	<i>V-R</i>	<i>Rmm</i>	<i>LV</i>	<i>LTV</i>	<i>LF</i>	<i>PA%</i>	<i>TV%</i>	<i>FT%</i>	<i>F%</i>	<i>DLF</i>	<i>DF</i>	<i>EPF</i>	<i>PiV_d</i>	<i>TVp</i>	<i>Vp</i>	$(t/b)^2_n$	<i>RHV</i>	<i>Ha</i>	<i>FV</i>	
<i>DV</i>	<u>0,91</u>				<u>-0,66</u>	<u>-0,59</u>	<u>0,8</u>			<u>-0,68</u>	-0,48		<u>-0,74</u>			<u>0,52</u>	-0,45								<u>-0,67</u>	-0,49	<u>0,84</u>	<u>-0,73</u>
<i>FV</i>	<u>-0,8</u>	<u>-0,58</u>	-0,48		0,45		<u>-0,76</u>	<u>0,53</u>		<u>0,66</u>													0,49			<u>-0,68</u>		
<i>Ha</i>	<u>0,85</u>				<u>-0,74</u>	<u>-0,64</u>	<u>0,71</u>			<u>-0,55</u>					<u>0,57</u>													
<i>RHV</i>																									<u>0,83</u>			
t/b^2_n	<u>-0,6</u>				0,49	0,46	<u>-0,53</u>			<u>0,57</u>	<u>0,71</u>		<u>0,61</u>															
<i>Vp</i>																												
<i>TVp</i>																												
<i>PiV_d</i>										0,46																		
<i>EPF</i>					-0,49		0,5										0,45											
<i>DF</i>																												
<i>DLF</i>																												
<i>F%</i>																												
<i>FT%</i>					<u>-0,51</u>					<u>-0,54</u>	<u>-0,58</u>		<u>-0,72</u>															
<i>TV%</i>	<u>0,52</u>				<u>-0,55</u>					<u>-0,54</u>																		
<i>PA%</i>											0,46																	
<i>LF</i>	<u>-0,62</u>				<u>0,7</u>	<u>0,63</u>	<u>-0,64</u>			<u>0,52</u>	<u>0,61</u>	<u>0,71</u>	<u>0,67</u>															
<i>LTV</i>												0,49																
<i>LV</i>					<u>0,53</u>		<u>-0,6</u>																					
<i>Rmm</i>	<u>-0,54</u>				0,49		-0,48																					
<i>V-R</i>					<u>0,54</u>	<u>0,55</u>																						
<i>Dn</i>	-0,44																											
<i>ks max</i>	<u>0,83</u>	0,5	0,49		<u>-0,6</u>																							
<i>P₅₀</i>	<u>-0,59</u>				<u>0,86</u>																							
<i>P₁₂</i>	<u>-0,71</u>		<u>-0,54</u>																									
<i>P₈₈</i>			<u>0,83</u>																									
\angle	0,5																											

Referencias: *DV*: diámetro de vasos, *FV*: frecuencia de vasos, *Ha*: área de halo, *RHV*: área de halo/área de vasos, $(t/b)^2_n$: refuerzo de la pared del vaso (halo), *Vp*: diámetro de la punteadura del vaso, *TVp*: diámetro de la punteadura de TV, *PiV_d*: puentes intervasculares (distancia), *EPF*: espesor de pared de fibras, *DF*: diámetro de fibras, *DLF*: diámetro del lumen de fibras, *F%*: porcentaje de fibras, *FT%*: porcentaje de fibrotraqueidas, *TV%*: porcentaje de TV, *PA%*: porcentaje de parénquima axial, *LF*: longitud de fibras, *LTV*: longitud de TV, *LV*: longitud de vasos, *Rmm*: radios por milímetro lineal, *V-R*: contacto vaso-radio, *Dn*: densidad normal, *ks max*: conductividad hidráulica específica máxima, *P₅₀*: potencial agua al 50% de pérdida de conductividad, *P₁₂*: potencial agua al 12% de pérdida de conductividad, *P₈₈*: potencial agua al 88% de pérdida de conductividad, \angle pendiente de la curva de VC, *b*: parámetro de escala de la función de densidad de probabilidad de la distribución de Weibull para la distribución de tamaño de vasos, *c*: parámetro de forma de la función de densidad de probabilidad de la distribución de Weibull para la distribución de tamaño de vasos. Sin subrayado: $p < 0,1$; subrayado simple: $p < 0,05$; subrayado doble: $p < 0,01$.

La correlación entre la k_s medida y la teórica fue alta ($\rho = 0,8$, $p < 0,01$), pero aquella medida experimentalmente solo representó el 6,41%, 10,10% y 14,27% de la k_s max estimada a través de la distribución de diámetro de vasos para *E. globulus*, *E. camaldulensis* y *E. viminalis*, respectivamente. En términos generales, las curvas que relacionan la k_s acumulada y el diámetro de los vasos (Fig. 3.10, *panel derecho*) fueron similares a las de VC, con *E. globulus* mostrando una pendiente algo más pronunciada (aunque sin diferencias significativas; parámetro α ; Tabla 3.3) y un menor valor medio de conductividad que las otras dos especies (parámetro β ; Tabla 3.3). A este respecto, se encontraron relaciones significativas entre el parámetro b de la función PDF de Weibull y P_{12} ($\rho = -0,71$, $p < 0,01$; Figura 3.6 D) y P_{50} ($\rho = -0,59$, $p < 0,05$; Fig. 3.6 E). Este parámetro identifica la amplitud de la distribución de vasos, por lo que las relaciones mencionadas indican que aquellos individuos con mayor rango de tamaño de vasos fueron más resistentes a la cavitación (valores de P_{12} y P_{50} más negativos).

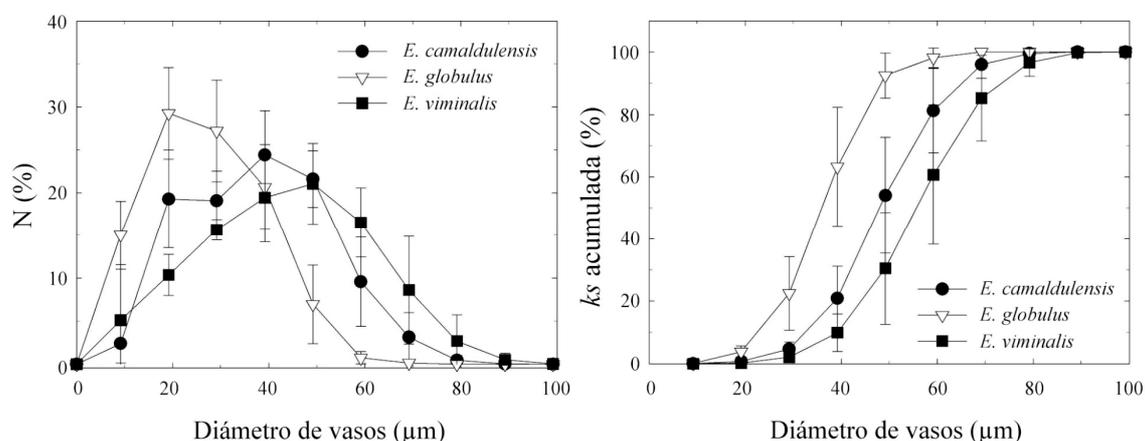


Figura 3.10. *Panel izquierdo:* distribución de frecuencia de diámetro de vasos para las tres especies de *Eucalyptus* bajo estudio. *Panel derecho:* curvas de k_s teórica acumulada (relativa al máximo valor de cada especie) como función del tamaño de vasos. N (%) = porcentaje de vasos en cada clase diamétrica, con respecto al total de vasos.

Tabla 3.3. Parámetros de las curvas de k_s teórica acumulada como función del diámetro de vasos (Figura 3.10, *panel derecho*). Media \pm desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre especies para el parámetro considerado. Prueba de T y p-valor entre pares de especies.

Parámetro de la curva de k_s acumulada	<i>E. globulus</i> (EG)	<i>E. viminalis</i> (EV)	<i>E. camaldulensis</i> (EC)	Prueba de T
α	0,18 $\pm 0,02$	0,13 $\pm 0,02$	0,15 $\pm 0,01$	$t = 1,69$; $p = 0,13$ (e/EG y EV) $t = 1,26$; $p = 0,24$ (e/EG y EC) $t = 0,82$; $p = 0,44$ (e/EV y EC)
β	36,10 a $\pm 0,52$	55,70 c $\pm 0,98$	48,35 b $\pm 0,68$	$t = 18,79^{**}$; $p < 0,01$ (e/EG y EV) $t = 14,26^{**}$; $p < 0,01$ (e/EG y EC) $t = 6,057^{**}$; $p < 0,01$ (e/EV y EC)

Relación entre el refuerzo de las células y la densidad de madera con la seguridad del xilema (hipótesis d y e)

El refuerzo de las paredes de los vasos $(t/b)^2$ (calculado sobre las paredes que separan vasos de TV; ver *materiales y métodos*) presentó valores entre 0,009 y 0,012, sin diferencias significativas entre especies ($p = 0,15$; Tabla 3.1). En cambio, $(t/b)^2_h$ (calculado a partir del espesor del halo) varió significativamente entre especies ($p = 0,03$), siendo mayor en *E. globulus* (0,23) que en *E. viminalis* y *E. camaldulensis* (0,14). Este parámetro anatómico mostró cierta correlación marginal ($p < 0,1$) con P_{50} y P_{12} ($\rho = 0,46$ y $0,49$, respectivamente), pero en un sentido opuesto al esperado, en caso de actuar como refuerzo mecánico: a mayor factor de refuerzo, mayor vulnerabilidad a la cavitación.

No hubo diferencias significativas en la densidad de la madera de ramas entre especies ($p = 0,58$; Tabla 3.1). Los valores de densidad de madera variaron entre $0,751$ y $0,771$ g cm⁻³. Por lo tanto, no se encontró relación entre la densidad de madera y los parámetros de las curvas de VC (test de correlación de Spearman, $p > 0,05$; Tabla 3.2).

Asociación múltiple entre variables anatómicas y funcionales

Se llevó a cabo un análisis de componentes principales (ACP) con los valores medios de las variables medidas en cada árbol (Figura 3.11). Las variables se representan sobre el plano definido por los tres ejes factoriales del ACP, mostrando las relaciones (a nivel de individuo) entre la estructura de la madera y las variables ecofisiológicas. Los primeros dos ejes representaron el 52% de la variación observada entre árboles de las 3 especies en conjunto (37,9% y 14% para los ejes 1 y 2, respectivamente). Se identificaron dos grupos de variables independientes en los ejes factoriales 1 y 2, lo que permitió hacer inferencias acerca de la relación entre la estructura y la función de la madera.

Las variables asociadas en el eje 1 estuvieron relacionadas principalmente con la función de conducción de agua, incluyendo características de los vasos (tamaño, frecuencia, longitud y amplitud de la distribución de diámetros) y otros tipos celulares asociados: área de halo, TV, radios y el refuerzo de las paredes del vaso, todas ellas asociadas con *ks max* (Figura 3.11). P_{50} y P_{12} también se asociaron con el eje 1, pero inversamente a *ks max*.

El eje 2 asoció las variables anatómicas con *ks max* de una manera difícil de interpretar. *Ks max* se asoció positivamente con las variables de fibras (proporción y espesor de la pared), e inversamente con caracteres como tamaño de las punteaduras y proporción de fibrotraqueidas. El tercer eje, que explicó el 10,9% de la variación total, mostró una asociación de variables relacionadas con las funciones de la matriz fibrosa y el parénquima, como soporte, almacenaje de carbohidratos y, potencialmente, reparación de embolismos: proporción de parénquima axial, número de radios, número de células entre vasos (puentes), densidad de la madera y espesor de pared de fibras. P_{50} también se asoció con este factor.

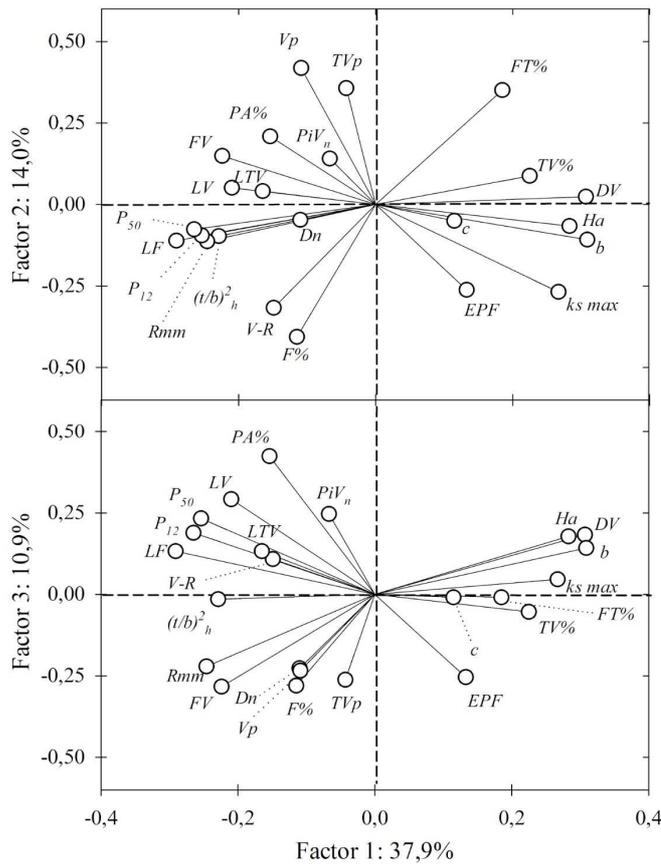


Figura 3.11. Panel superior: análisis de componentes principales (ACP) mostrando los ejes 1 y 2. Panel inferior: ACP de los ejes 1 y 3.

Referencias: *b*: parámetro de escala de la función PDF de Weibull, *c*: parámetro de forma de la función PDF de Weibull, *Dn*: densidad normal, *DV*: diámetro de vasos, *EPF*: espesor de pared de fibras, *F%*: porcentaje de fibras, *FT%*: porcentaje de fibrotraqueidas, *FV*: frecuencia de vasos, *Ha*: área de halo, *ks max*: conductividad hidráulica específica máxima, *LF*: longitud de fibras, *LTV*: longitud de TV, *LV*: longitud de vasos, *P₁₂*: potencial agua al 12% de pérdida de conductividad, *P₅₀*: potencial agua al 50% de pérdida de conductividad, *PA%*: porcentaje de parénquima axial, *PiV_n*: puentes intervasculares (n° células), *Rmm*: radios por milímetro lineal, $(t/b)^2_h$: refuerzo de la pared del vaso (halo), *TV%*: porcentaje de TV, *TVp*: diámetro de la punteadura de TV, *Vp*: diámetro de la punteadura del vaso, *V-R*: contacto vaso-radio.

Variables	Eje 1	Eje 2	Eje 3
<i>b</i>	0,309	-0,108	0,142
<i>c</i>	0,115	-0,050	-0,009
<i>Dn</i>	-0,110	-0,047	-0,227
<i>DV</i>	0,307	0,024	0,183
<i>EPF</i>	0,133	-0,262	-0,254
<i>F%</i>	-0,115	-0,406	-0,280
<i>FT%</i>	0,185	0,351	-0,009
<i>FV</i>	-0,224	0,149	-0,283
<i>Ha</i>	0,283	-0,066	0,178
<i>ks max</i>	0,267	-0,268	0,046
<i>LF</i>	-0,291	-0,111	0,132
<i>LTV</i>	-0,165	0,041	0,132
<i>LV</i>	-0,210	0,051	0,292
<i>P₁₂</i>	-0,265	-0,076	0,189
<i>P₅₀</i>	-0,254	-0,095	0,233
<i>PA%</i>	-0,154	0,209	0,424
<i>PiV_n</i>	-0,067	0,141	0,247
<i>Rmm</i>	-0,246	-0,113	-0,221
$(t/b)^2_h$	-0,229	-0,097	-0,015
<i>TV%</i>	0,225	0,088	-0,054
<i>TVp</i>	-0,043	0,357	-0,262
<i>Vp</i>	-0,109	0,419	-0,234
<i>V-R</i>	-0,149	-0,317	0,108

Tabla 3.4. Variables utilizadas en el ACP y su asociación con los ejes 1, 2 y 3.

Referencias: *b*: parámetro de escala de la función PDF de Weibull, *c*: parámetro de forma de la función PDF de Weibull, *Dn*: densidad normal, *DV*: diámetro de vasos, *EPF*: espesor de pared de fibras, *F%*: porcentaje de fibras, *FT%*: porcentaje de fibrotraqueidas, *FV*: frecuencia de vasos, *Ha*: área de halo, *ks max*: conductividad hidráulica específica máxima, *LF*: longitud de fibras, *LTV*: longitud de TV, *LV*: longitud de vasos, *P₁₂*: potencial agua al 12% de pérdida de conductividad, *P₅₀*: potencial agua al 50% de pérdida de conductividad, *PA%*: porcentaje de parénquima axial, *PiV_n*: puentes intervasculares (n° células), *Rmm*: radios por milímetro lineal, $(t/b)^2_h$: refuerzo de la pared del vaso (halo), *TV%*: porcentaje de TV, *TVp*: diámetro de la punteadura de TV, *Vp*: diámetro de la punteadura del vaso, *V-R*: contacto vaso-radio.

A pesar de la dificultad para encontrar patrones claros que relacionen la anatomía de la madera con la seguridad conductiva del xilema (resistencia/vulnerabilidad a la cavitación) en estas especies de *Eucalyptus*, tanto P_{50} como P_{12} estuvieron representados a lo largo del eje 1, variando inversamente con el diámetro de vasos, el área de halo, el parámetro b de la función PDF de Weibull (que mide la amplitud de la distribución de vasos), y la proporción de TV (Tabla 3.4). Estos dos parámetros (P_{50} y P_{12}) de la curva de VC además variaron positivamente con el largo de fibras, elementos de vaso y TV, el factor de refuerzo de la pared de los vasos y el número de radios (Figura 3.11), en un sentido tal que –como se mencionó anteriormente– resulta opuesto al esperado. En el eje 3, P_{50} se asoció de manera inversa con la densidad de la madera, pero de manera positiva con el parénquima axial (aunque no así P_{12}).

Discusión

En este estudio se obtuvieron curvas de vulnerabilidad a la cavitación de tipo sigmoidal (forma de s) en el caso de *E. viminalis* y *E. camaldulensis*, y de tipo exponencial (forma de r) para *E. globulus*. A pesar del debate actual concerniente a la metodología utilizada para determinar vulnerabilidad a la cavitación en especies de vasos largos (Christman et al. 2012, Jansen et al. 2015), en este capítulo se encontró que las especies de vasos más largos son aquellas que presentaron mayor resistencia a la cavitación (P_{12} y P_{50} más negativos), y con curvas de tipo sigmoidal. Esto resulta opuesto a lo que se esperaría en el caso de que existieran demasiados vasos abiertos en el segmento de rama. Adicionalmente, el valor de P_{50} para *E. camaldulensis* (-4,2 MPa) fue muy similar al reportado por Trifilò et al. (2015) para la misma especie creciendo en Italia ($P_{50} = -4,6$ MPa). Además, estos valores de P_{50} fueron menores (más resistentes) que aquellos reportados para otras especies de *Eucalyptus* creciendo en Australia (Rice et al. 2004), Sudáfrica (Vander Willigen & Pammenter 1998) y Argentina (Tesón et al. 2012). En este sentido, se encontró evidencia que avala la hipótesis acerca de la relación entre la densidad de madera y la vulnerabilidad a la cavitación en *Eucalyptus*, con especies de baja densidad de madera a nivel de fuste, como *E. grandis* y sus genotipos híbridos (densidad media alrededor de 400 kg m^{-3}), más vulnerables a la cavitación en ramas (P_{50} alrededor -1,5 MPa, determinada tanto por el método de deshidratación al aire –Vander Willigen & Pammenter 1998– como por inyección de aire –Tesón et al. 2012–). En base a estos antecedentes, se puede concluir que las curvas de VC del presente estudio reflejan de manera adecuada las características del xilema (respecto de la seguridad conductiva) de los genotipos estudiados. Por otro lado, estudios posteriores a los reportados en este capítulo realizados en las tres especies por el mismo equipo de trabajo, pero con otro método (pneumático), mostraron valores siempre muy conservativos en *E. viminalis* y *E. camaldulensis*, similares a los reportados aquí, y una enorme variación en *E. globulus*, observada entre individuos creciendo en un mismo sitio, y mayor aún, entre individuos con distinta procedencia genética (como progenies cultivadas en Argentina vs clones españoles; Barigah et al. 2019, Fernández et al. 2019). En los individuos más vulnerables, las curvas tendieron a ser siempre pronunciadas (poco sigmoideas) en esta especie.

Asimismo, en las mediciones reportadas en el capítulo 4 se observó una gran variación entre ramas de un mismo árbol en *E. globulus*, no así en *E. viminalis*. En todos los casos, la variación pudo ser explicada por variación en anatomía de la madera, demostrando que no se debió a errores metodológicos durante la confección de las curvas, sino a una gran variabilidad genética y/o plasticidad fenotípica en la anatomía de la madera en esta especie.

Rol hidráulico de las traqueidas vasicéntricas y el parénquima

Carlquist (1985, 2012) propuso que las TV pueden llegar a tener un rol importante en la resistencia a la cavitación, actuando como un sistema de conducción subsidiario, cuando el principal se encuentra cavitado. Esta teoría implica que las TV tendrían una vulnerabilidad a la cavitación menor que los vasos y, al mismo tiempo, cierta capacidad de conducción lo que le permitiría a la planta mantener un flujo basal de agua. En acuerdo con esta hipótesis, Pratt et al. (2015) señalan que las especies del chaparral californiano que poseen TV son aquellas con menor valor promedio de P_{50} , en comparación con especies que presentan otros tipos de elementos imperforados (fibras, traqueidas verdaderas, traqueidas vasculares). A pesar de ello, notaron que este era el grupo que presentaba la mayor variación en estos valores (incluyendo especies muy vulnerables como *Quercus berberidifolia*) y, por lo tanto, que la presencia de TV *per se* no resultaba necesariamente en una baja vulnerabilidad a la cavitación (Pratt et al. 2015). Teniendo en consideración la contribución de las TV a la conductancia total del xilema, y a pesar de que el porcentaje de ks_{max} atribuido a ellas no fue medido en este trabajo, de acuerdo con la ley de Hagen-Poiseuille y el tamaño relativo de estos elementos en comparación con los vasos, esta debería ser insignificante, lo cual fue parcialmente confirmado por el análisis de senderos llevado a cabo en este estudio. En concordancia con esto, Cai et al. (2014) y Pan & Tyree (2019), quienes trabajaron con otras especies en las que se midió experimentalmente la ks de las fibrotraqueidas luego de obstruir artificialmente los vasos, encontraron que esta representa menos del 2% de la ks total. En el presente estudio, la contribución potencial de las TV a incrementar la resistencia a la cavitación en las especies de *Eucalyptus* estudiadas fue parcialmente verificada debido a que se encontró una correlación significativa de P_{12} con $TV\%$ y Ha , así como también entre esta última variable y P_{50} . A favor de esta hipótesis, se observó que estas cuatro variables se asociaron en el mismo eje del ACP (eje 1) en un sentido inverso, lo que significa que individuos con mayor proporción de TV presentan menor P_{50} y P_{12} . Vale remarcar que estas especies poseen una anatomía similar, compuesta de vasos largos rodeados por TV, lo que genera una resistencia al flujo de agua relativamente baja y, al mismo tiempo, limitaría la propagación de embolismos. Esto último podría lograrse por medio del confinamiento del embolismo dentro del vaso, una vez producido, evitando la diseminación de aire hacia vasos adyacentes (tal como ha sido sugerido por Pan & Tyree 2019).

Por otro lado, la relación positiva y significativa entre ks_{max} y el área de halo sugiere que las células acompañantes (TV y/o parénquima) tendrían una función relacionada con

la conductividad, probablemente incrementando la conectividad entre vasos. En concordancia con esta hipótesis, modelizaciones y estudios empíricos previos en otras especies han mostrado un incremento en la conectividad del xilema como consecuencia de la presencia de elementos imperforados como TV (Loepfe et al. 2007, Hacke et al. 2009, Martínez-Vilalta et al. 2012) o puentes hidráulicos formados por fibrotraqueidas (Cai et al. 2014, Pan & Tyree 2019). Sano et al. (2011), en un estudio de 15 especies angiospermas (donde no había especies de *Eucalyptus* presentes), demostraron la función conductiva de algunos tipos de elementos celulares imperforados, a través de la inyección de sustancias colorantes, Crio-MEB (Microscopía Electrónica de Barrido realizada sobre muestras congeladas) y otras técnicas morfométricas. De acuerdo con estos autores, un tamaño de punteaduras igual o superior a 5 μm y una alta densidad de ellas entre vasos y traqueidas (77 punteaduras/10000 μm^2) sugerirían, entre otras cosas, un rol conductivo de este tipo de elementos. Para el caso de este trabajo en particular, a pesar de que la relación entre la ks_{max} y el área de halo fue traccionada, en parte, por la alta correlación entre el área de halo y el diámetro de vasos, las tres especies bajo estudio exhibieron TV con punteaduras grandes y numerosas (5,45-5,89 μm), tanto en las paredes radiales como en las tangenciales. En corte transversal, los pares de punteaduras entre vasos y TV fueron fácilmente distinguibles (Figura 3.7 D), lo que indicaría una alta frecuencia de contacto y, posiblemente, una función conductiva de estas últimas. Asimismo, el patrón de tinción observado en todas las especies (Figura 3.8) es consistente con el rol de conducción propuesto para los diferentes tipos celulares que rodean a los vasos, los cuales incrementarían la interconexión del sistema conductivo (Cai et al. 2014).

La correlación funcional encontrada en este capítulo entre ks_{max} y diámetro de vasos es consistente con la ley de Hagen-Poiseuille, pudiendo ser considerada como una relación estructura-función de cumplimiento universal en plantas (Hacke et al. 2009). Adicionalmente, se encontró que *E. viminalis* y *E. camaldulensis*, las especies con los vasos más largos, fueron aquellas de mayor ks_{max} , algo que también ha sido reportado en otras especies (p.ej. Lens et al. 2011). En este estudio no se evaluó la distribución de la longitud de los vasos, pero es de esperarse que esta variable afecte la conductividad máxima, particularmente en especies de vasos solitarios. Sin embargo, el hecho de que la mayor ks_{max} se verificó en *E. viminalis* no puede ser explicada únicamente en base al diámetro de vasos o el diámetro de las punteaduras (que fue el menor entre las especies estudiadas). Es claro que otros factores, más allá de la resistencia al flujo dada por las paredes del vaso y el pasaje a través de las punteaduras, influyen fuertemente la capacidad de flujo del xilema en estas especies de vasos solitarios. En este sentido, la relación entre el área de halo y ks_{max} encontrada en este capítulo podría contribuir a entender el rol de otras células, diferentes a los vasos, en la conducción eficiente a través del xilema.

Por otro lado, de acuerdo con las relaciones encontradas en este estudio al hacer comparaciones interespecíficas, la cantidad de parénquima axial y radial no contribuyó de manera positiva a la conductividad (ks_{max} se asoció de manera negativa con R_{mm} en el eje 1 del ACP y no mostró asociación con $PA\%$). Esto se debe a que la especie con

mayor proporción de parénquima respecto al total de tejidos, *E. globulus*, presentó la menor conductividad, producto de sus vasos de menor tamaño y baja área de halo. Probablemente la presencia de estos vasos relativamente pequeños hubiera resultado en conductividades incluso más bajas si no existiera una alta conectividad dada por la gran proporción de puentes y tejido parenquimatoso. A su vez, existiría un rol alternativo de estas células (parénquima axial y radial), más relacionado con la reparación de embolismos. Estas son las únicas células vivas del xilema en contacto con los vasos que podrían estar involucradas en la conducción de osmolitos y/o agua para el rellenado de los vasos embolizados (p.ej. Zwieniecki & Holbrook 2009, Brodersen et al. 2010, Liu et al. 2019). La asociación positiva entre P_{50} y P_{12} con R_{mm} (eje 1 y 3) y $PA\%$ (eje 3) está en línea con esta hipótesis, y podría relacionarse –indirectamente– con una mayor capacidad de reparación de embolismos en aquellos individuos más vulnerables.

En base a estos resultados, es probable que las traqueidas vasicéntricas y el parénquima puedan contribuir a incrementar la conectividad entre vasos adyacentes –y, por consiguiente, la eficiencia en la conducción del xilema–, disminuyendo al mismo tiempo la probabilidad de propagación de embolismos dentro del tejido, es decir aumentando la seguridad conductiva. De esta manera, la presencia de estas células acompañantes de los vasos permitiría sortear el compromiso entre eficiencia y seguridad del sistema conductivo que se observa en general en las especies leñosas (Gleason et al. 2016).

Rol de la distribución de tamaño de vasos, las características de las fibras y la densidad de madera en la eficiencia y seguridad hidráulica

Se ha postulado que, en especies angiospermas, a pesar de no existir relación causal entre el tamaño de vasos y la vulnerabilidad a la cavitación, los vasos pequeños se relacionan con una mayor seguridad conductiva (p.ej. Cai & Tyree 2010). Contrariamente a esto, en este estudio la especie con mayor vulnerabilidad a la cavitación (*E. globulus*) fue aquella que presentó el menor tamaño medio de vasos, aunque no se encontró correlación significativa entre ks_{max} y los parámetros de la curva de VC tal como P_{50} y P_{88} al considerar el conjunto de especies. A pesar de que se registró una relación marginalmente positiva entre ks_{max} y la pendiente de la curva de VC (en el sentido de una mayor velocidad del proceso al aumentar la conductividad), esta parece ser producto de un artefacto del modelo matemático utilizado para el ajuste de las curvas, ya que produce valores de P_{88} muy negativos para *E. globulus*, los cuales, si bien pueden ser reales, afectan el cálculo de la *pendiente*, la cual finalmente no refleja el crecimiento exponencial de la curva en los primeros tramos (que representan valores de tensión usuales durante una sequía moderada). Sin embargo, se observó una correlación negativa entre el tamaño de vasos y ks_{max} con P_{12} . Esta correlación negativa implica que aquellos individuos con mayor ks_{max} tendieron a ser menos vulnerables a la cavitación a valores bajos de tensión. Este resultado es contrario a lo reportado para muchas especies angiospermas de vasos agrupados, que exhiben un compromiso entre eficiencia y seguridad a nivel del xilema

(p.ej. Tyree et al. 1994, Pockman & Sperry 2000, Hacke et al. 2001, Lens et al. 2011, Martínez-Vilalta et al. 2012, Gleason et al. 2016).

Asimismo, desde el punto de vista de la base física detrás de la hipótesis desarrollada por Hacke et al. (2001), por la cual hay una relación entre P_{50} y la densidad de la madera, la misma no parece ser aplicable a este sistema de estudio, debido a diferencias en la anatomía de la madera de estas especies. Esta relación, mediada por la necesidad de un refuerzo de las paredes de los vasos para evitar la implosión que ocurriría debido al contacto entre vasos embolizados y no embolizados (o entre traqueidas en el caso de especies gimnospermas), no sería adecuada para especies de vasos solitarios. A lo sumo, un vaso embolizado estará en contacto con traqueidas bajo tensión, pero seguramente las diferencias de presión se distribuirán de manera diferente ya que las TV están en contacto con solo una porción de la pared del vaso. En concordancia con estas ideas, el cálculo del factor de refuerzo $(t/b)^2$ resultó en valores bastante menores a los predichos por Hacke et al. (2001) para los valores de P_{50} encontrados en este estudio. En este sentido, la cantidad de células que rodean un vaso, así como su espesor de pared y nivel de turgencia (en el caso de células vivas), constituirían los principales determinantes del factor de refuerzo en vasos solitarios, los cuales presentaron un espesor de pared relativamente bajo. Más allá de esto, el análisis de componentes principales mostró cierta asociación entre el refuerzo de la matriz fibrosa que rodea los vasos y P_{50} . En el tercer eje del ACP se agruparon de manera positiva este parámetro de seguridad con la densidad de la madera y el espesor de pared de fibras. En concordancia con estos resultados, un estudio que podría ser aplicable a eucaliptos sugiere la importancia de la densidad de la madera en la resistencia a la cavitación explicada a través de la contribución de la matriz fibrosa para mantener la integridad hidráulica del xilema bajo tensión (Jacobsen et al. 2005).

Conclusiones

Los resultados de este trabajo permitieron verificar parcialmente las hipótesis alternativas a y b. Por un lado, se encontró evidencia que indica que el aumento en la cantidad de traqueidas vasicéntricas que se encuentran rodeando los vasos y, por lo tanto, el tamaño del halo compuesto, en parte, por este tipo celular, repercutiría en la progresión de los eventos de cavitación ocurridos al interior de los elementos conductivos, contribuyendo con la seguridad hidráulica del sistema. Por otro lado, la alta interconexión observada entre las traqueidas vasicéntricas y los vasos, a través de punteaduras grandes y numerosas, indicaría una función conductiva de las mismas, lo cual fue corroborado por los patrones de tinción observados. Este rol resultaría insignificante en cuanto a la eficiencia general del sistema conductivo en sentido axial, pero tomaría relevancia en la interconexión del mismo en sentido radial, donde actuarían como puentes hidráulicos entre vasos solitarios.

En cuanto a la hipótesis c, los resultados aquí obtenidos permiten inferir que las especies de *Eucalyptus* bajo estudio no presentarían un compromiso entre eficiencia y seguridad

conductiva. En este sentido *E. globulus*, la especie con menor tamaño de vasos fue la de mayor vulnerabilidad a la cavitación. Así, la existencia de un sistema hidráulico compuesto por vasos solitarios de gran diámetro y alta eficiencia conductiva, rodeados por traqueidas vasicéntricas y diseminados en la matriz fibrosa del xilema, permitiría desacoplar parcialmente las funciones de conducción y resistencia a la cavitación. En base a la información disponible, no existen antecedentes que describan este patrón, por lo que resulta interesante profundizar su exploración a futuro.

La falta de relación entre el factor de refuerzo de los vasos y la vulnerabilidad a la cavitación (hipótesis d) fue avalada por el nivel de refuerzo registrado en la pared de los vasos, el cual se ubicó no solo por debajo del límite establecido empíricamente para especies angiospermas, sino que este fue incluso menor al límite teórico de implosión de vasos y traqueidas. Esto implicaría que la cantidad de células que rodean un vaso, constituirían los principales determinantes del factor de refuerzo en vasos solitarios.

Por último, los resultados hallados permiten confirmar la hipótesis e, observándose una asociación entre el refuerzo de la matriz fibrosa y el nivel de vulnerabilidad evidenciado. Respecto a esto, las especies de mayor densidad de madera (característica determinada principalmente por las dimensiones de las fibras) presentaron los mayores niveles de resistencia a la cavitación, lo cual es consistente con resultados observados en otras especies de este género.

En este trabajo la función específica de cada tipo celular no fue completamente dilucidada. Es por esta razón que se precisan de estudios complementarios (por ejemplo, sobre morfometría y ultraestructura de las punteaduras de vasos y traqueidas, entre otros) así como el desarrollo de hipótesis acerca de la operación coordinada del xilema en estas especies de anatomía compleja (propagación de embolismos en vasos solitarios a través de puentes, rol del parénquima axial respecto a la capacitancia o la reparación de embolismos, etc.). Por otro lado, se torna necesario complementar este trabajo con estudios sobre un número de muestras mayor, que incorporen nuevos genotipos o sitios, con el fin de entender la plasticidad fenotípica y la variabilidad genética de estos caracteres.



Capítulo 4: Relaciones funcionales entre estructura de la madera y vulnerabilidad a la cavitación a nivel intraespecífico en eucaliptos templados^{6 7}

Introducción

La estructura anatómica de la madera del género *Eucalyptus* tiene características particulares (vasos solitarios, traqueidas vasicéntricas y fibrotraqueidas, entre otras), lo que determina una funcionalidad singular que aún no ha sido profundamente estudiada (Capítulo 3), así como un amplio rango de densidades de madera (InsideWood, 2004 – en adelante). La densidad de la madera puede ser considerada como una variable que cuantifica la estructura interna de la madera y que representa la combinación de los diferentes tipos celulares que la componen (Ziemińska et al. 2013). Esta es comúnmente utilizada como un indicador de las características mecánicas y funcionales de la madera ya que está fuertemente correlacionada con una gran variedad de procesos funcionales (Lachenbruch & McCulloh 2014). En particular, existe evidencia que indica que, a nivel interespecífico, la densidad de la madera está relacionada de manera negativa con la vulnerabilidad del xilema a la cavitación, en el sentido de que una mayor resistencia a este proceso (es decir, xilema que se mantiene conductivo a mayor tensión) está asociada a mayor densidad de madera (Hacke et al. 2001, Jacobsen et al. 2005). Esta correlación puede ser explicada por la necesidad de refuerzo en las paredes de los elementos conductivos (Hacke et al. 2001) y/o por la contribución de los elementos no conductivos (matriz fibrosa) en el mantenimiento del equilibrio de fuerzas durante el transporte de agua bajo tensión (Jacobsen et al. 2005, 2007). Estas relaciones han sido halladas mediante el análisis de un amplio conjunto de especies, pero los estudios enfocados a nivel intraespecífico son escasos. Si el rol funcional adaptativo de la densidad de madera fuera el anteriormente propuesto se esperaría observar las mismas relaciones a nivel de especie, al considerar genotipos con diferente densidad. Los estudios que relacionan microdensidad de madera en diferentes porciones del anillo de crecimiento con vulnerabilidad a la cavitación en especies de coníferas como *Pseudotsuga menziesii* (Dalla-Salda et al. 2011, 2014) y *Picea abies* (Rosner 2013) sugieren que esta correspondencia se mantiene a nivel intraespecífico. Sin embargo, el hecho de que estas

⁶ Parte de los resultados del presente capítulo han sido publicados en el siguiente artículo:

Barotto, A.J., Monteoliva, S., Gyenge, J., Martínez-Meier, A., Fernández, M.E. 2018. Functional relationships between wood structure and vulnerability to xylem cavitation in races of *Eucalyptus globulus* differing in wood density. *Tree Physiology*, 38 (2): 243-251. DOI: 10.1093/treephys/tpx138

⁷ Agradezco particularmente al Ing. Ftal. Pablo Pathauer, responsable en INTA de los programas de mejoramiento genético de *Eucalyptus* templados para la región pampeana, quien aportó información referente a los ensayos de progenies de *E. globulus* y *E. viminalis*, la cual resultó fundamental para planificar los muestreos de los capítulos 4 y 6.

relaciones solo emerjan al considerar porciones específicas del anillo sugiere que el efecto causal entre estas características está lejos de ser dilucidado y extrapolable a otras especies y, en particular, a especies angiospermas. En este sentido, hasta donde se tiene conocimiento, no existen estudios que exploren estas relaciones a nivel intraespecífico para este grupo de especies.

Eucalyptus globulus es una de las especies forestales de mayor importancia a nivel mundial (Drew et al. 2009), pero su crecimiento se ve afectado significativamente por la disponibilidad de agua (Drew et al. 2008). *Eucalyptus viminalis*, en cambio, presenta una mayor resistencia a la sequía, posiblemente debido a que su distribución nativa en Australia es más amplia, tanto geográfica como ambientalmente. Así, para esta última especie, existen varias razas ecológicas adaptadas a diferentes condiciones de pluviometría y tipos de suelo (Ladiges & Ashton, 1974). Esta plasticidad adaptativa genera diferencias en su resistencia a la sequía (Ladiges, 1974), lo cual resulta una característica de importancia al tener en cuenta el escenario actual de cambio climático, con proyecciones que predicen un incremento en la extensión y severidad de los períodos de sequía en muchas regiones del planeta (Dai 2013) y que incluye áreas de bosque de *Eucalyptus* tanto naturales como implantados.

La relación entre densidad de la madera y vulnerabilidad a la cavitación ha sido poco estudiada en el género *Eucalyptus*, donde la presencia de vasos solitarios hace improbable el desbalance de fuerzas propuesto por Hacke et al. (2001), por lo que requiere de hipótesis específicas. En este sentido, algunos estudios (Vander Willigen & Pammenter 1998, Tesón et al. 2012), entre los que se encuentra el reportado en el capítulo anterior (Barotto et al. 2016), han evaluado la resistencia a la cavitación en especies de *Eucalyptus* con diferente densidad de madera. La tendencia general a nivel interespecífico muestra que las especies de baja densidad de madera (en el tronco) son más vulnerables a la cavitación (en las ramas). Sin embargo, no existen antecedentes a nivel intraespecífico que permitan inferir si la tendencia que se observa entre especies es aplicable dentro de las mismas. Este tipo de análisis se ve dificultado por la complejidad anatómica de este género, por lo que se hace necesario recurrir a técnicas y análisis más complejos para dilucidar la forma en que los diferentes elementos anatómicos se integran funcionalmente. El análisis de senderos (*path analysis* en inglés), una aplicación particular de los modelos de ecuaciones estructurales (*SEM*, por sus siglas en inglés), es un método multivariado que permite evaluar el ajuste de modelos causales teóricos en los que se propone un conjunto de relaciones de dependencia entre variables (Pérez et al. 2013). Esta metodología es una extensión de la regresión múltiple (Norman & Streiner 2003) donde se verifica no solo la contribución directa de una variable independiente sobre otra dependiente, sino también la interacción entre variables predictoras y sus efectos indirectos (Pérez et al. 2013).

Objetivos

Para contribuir al conocimiento acerca de las relaciones entre estructura de la madera y su función a nivel de especies del género *Eucalyptus* se seleccionaron y analizaron procedencias de *E. globulus* y *E. viminalis* con diferencias intraespecíficas en densidad de madera en el tronco. Los objetivos del presente capítulo fueron:

- Caracterizar en detalle la morfometría de los elementos anatómicos en procedencias con densidad de madera contrastante,
- Determinar los parámetros funcionales (conductividad hidráulica específica máxima, vulnerabilidad a la cavitación y capacitancia) de las procedencias seleccionadas,
- Establecer relaciones entre elementos anatómicos y las propiedades de la madera que de ellos derivan, y
- Proponer y validar un modelo que explique cómo estos caracteres y propiedades están relacionados (directa y/o indirectamente), y cómo determinan la resistencia a la cavitación dentro de cada especie.

Hipótesis

La hipótesis general en torno a la relación entre variables se basa en los antecedentes referentes a este género, y considera que las mismas relaciones observadas a nivel interespecífico aplican a nivel intraespecífico. En este sentido, se esperó que:

- a) Los genotipos de mayor densidad de madera en tronco presentaran mayor resistencia a la cavitación en sus ramas, y
- b) Exista una falta de compromiso a nivel de xilema entre eficiencia conductiva (conductividad hidráulica específica máxima) y seguridad, debido a la influencia significativa de la distribución de tamaño de vasos en la vulnerabilidad a la cavitación (es decir, el xilema con mayor amplitud en la distribución de vasos, que incluye vasos de mayor tamaño, estará relacionado con menor P_{50} , tal como fue descrito en el Capítulo 3).

Materiales y métodos

Sitio y material vegetal

a) *Eucalyptus globulus*

El material vegetal utilizado para este estudio forma parte de un ensayo que pertenece al Programa de Mejoramiento Genético (PMG) de *E. globulus* (Labill.) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), el cual consta de 250 progenies que incluye 12 procedencias correspondientes a razas geográficas nativas de Australia, así como procedencias de Portugal, España, Chile y Argentina, las cuales fueron plantadas

en 1995 (Lopez et al. 2001). El ensayo se encuentra ubicado en Balcarce, provincia de Buenos Aires (*Sitio 1*: 37°45' S, 58°17' O, 97 msnm; Figura 4.1). El clima de esta región se define, de acuerdo con la clasificación climática de Köppen, como Cfb: clima oceánico. La temperatura media anual es 13,3 °C, y la precipitación media anual es de aprox. 800 mm. Al momento del muestreo los individuos tenían 20 años y la selección de los mismos se basó en estimaciones indirectas de densidad de madera realizadas previamente a través del uso de Pilodyn sobre los árboles en pie, provistas por el PMG de INTA (Ing. Ftal. Pablo Pathauer, INTA Castelar, comunicación personal). Esta herramienta de muestreo no destructivo está compuesta de un clavo de acero de punta plana que se inserta en la madera con una fuerza conocida, siendo la profundidad de penetración un indicador indirecto de la densidad de madera (Greaves et al. 1996). De la totalidad de progenies disponibles, se seleccionaron las dos procedencias con densidad de madera más contrastante (es decir, aquellas ubicadas en los extremos superior e inferior del rango de distribución para esta variable; Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Procedencias de *Eucalyptus globulus*, familias incluidas, número de individuos muestreados, valores medios de las variables fenotípicas (penetración del Pilodyn –PILO– y diámetro a la altura del pecho –DAP–) y clasificación relativa (alta o baja densidad).

Procedencia	Latitud	Longitud	Familia	n	PILO (mm)	DAP (cm)	Clasificación
Jeeralang, Victoria	38° 20' S	146° 31' E	1	4	9,75	18,85	<i>Alta densidad</i>
			2	2	10,25	32,54	
Parker Spur, Victoria	38° 47' S	143° 35' E	61	2	12,12	27,01	<i>Baja densidad</i>
			63	4	11,75	27,13	

b) *Eucalyptus viminalis*

El material vegetal utilizado forma parte de una red de ensayos de procedencias que pertenece al Programa de Mejoramiento Genético (PMG) de *E. viminalis* (Labill.) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Esta red consta de 148 familias nativas de Australia (además de procedencias locales desarrolladas por polinización abierta), que están replicadas en 5 ensayos a lo largo de la provincia de Buenos Aires. Para este trabajo en particular se muestreó el ensayo ubicado cerca de la localidad de Del Valle (*Sitio 2*: 35°51' S, 60°43' O, 63 msnm; Figura 4.1), el cual está compuesto por 77 familias y que fue plantado en octubre del año 2000, con un diseño de bloques completos al azar, con 16 repeticiones y un espaciamiento de 5 m x 2 m (Cappa et al. 2010).

De acuerdo con la clasificación de Köppen el clima de esta región se define como Cfa: clima subtropical húmedo sin estación seca o clima pampeano, con una temperatura media anual de 15,8 °C, y una precipitación media anual de aprox. 970 mm. En base a determinaciones hechas con Pilodyn previo al muestreo (PMG de INTA, Ing. Ftal. Pablo Pathauer, comunicación personal), se seleccionaron árboles de 4 procedencias de alta y baja densidad, que a su vez incluyeron 5 familias (Tabla 4.2)



Figura 4.1. Mapa ilustrativo donde se observa la ubicación de los dos ensayos de procedencias utilizados para la realización de este trabajo. El Sitio 1 representa el ensayo de *E. globulus* ubicado en la Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, en cercanías de la localidad homónima. El Sitio 2 representa el ensayo de *E. viminalis* ubicado en la Escuela Agrotécnica Salesiana “Carlos M. Casares”, en cercanías de la localidad de Del Valle, provincia de Buenos Aires, Argentina.

Tabla 4.2. Procedencias de *E. viminalis*, familias incluidas, número de individuos muestreados y valor medio de penetración de Pilodyn (PILO) y clasificación relativa de las procedencias como de alta o baja densidad.

Procedencia	Latitud	Longitud	Familia	n	PILO (mm)	Clasificación
Errinundra Road, Victoria	37° 26' S	148° 52' E	84	2	9,08	<i>Alta densidad</i>
Bald Hills, Victoria	37° 12' S	148° 11' E	27	4	9,13	
			25	4	10,00	
Federation Road, Victoria	37° 28' S	146° 00' E	118	10	11,79	<i>Baja densidad</i>
Bonang, Victoria	37° 16' S	148° 44' E	55	2	11,38	

Recolección y procesamiento de las muestras

La toma de muestras se realizó en años consecutivos, durante los primeros días de febrero (febrero de 2015, en el caso de *E. globulus*, y de 2016, para *E. viminalis*), por la mañana y durante un periodo con alta disponibilidad de agua en el suelo, para minimizar el estrés hídrico. En el caso de *E. globulus*, se seleccionaron seis árboles de cada procedencia, incluyendo 2 familias en cada caso, y se extrajeron dos ramas de la porción basal de la copa de cada árbol, lo que totalizó 24 ramas. Para *E. viminalis* se seleccionaron 3 y 2 familias para las procedencias de alta y baja densidad, respectivamente. Esto dependió de la disponibilidad de individuos vivos al momento del muestreo, en el cual se obtuvieron un total de 22 ramas: 10 de alta densidad y 12 de baja densidad. En todos los casos se tuvo en cuenta que las mismas fueran de dimensiones similares (3-6 mm de diámetro). Una vez obtenidas las ramas, estas se volvieron a cortar bajo el agua y se almacenaron en bolsas de polietileno negro, envueltas en trozos de tela húmedos para evitar la deshidratación.

En el laboratorio, las ramas fueron nuevamente recortadas bajo el agua hasta alcanzar su dimensión final. En el capítulo anterior se demostró que, en especies de *Eucalyptus*, los segmentos mayores a 30 cm producen curvas de forma sigmoidea (con forma de s, o *s-shaped*), por lo cual esta medida fue tomada como longitud mínima para realizar las curvas de cavitación. Las ramas fueron descortezadas y almacenadas en agua destilada con un 1% de hipoclorito de sodio, a 4 °C (Jinagool et al. 2015), para evitar el desarrollo de actividad microbiana durante el almacenaje (no más de dos semanas, en heladera).

Curvas de vulnerabilidad a la cavitación

El protocolo seguido fue similar al establecido en el Capítulo 3:

1. Perfusión durante 5 minutos a 1 bar de presión para remover posibles embolismos dentro de la rama;
2. Medición de conductividad hidráulica específica máxima (*ks max*);
3. Tensión constante, aplicada dentro de la cámara de cavitación, durante dos minutos (desde -0,5 hasta -6,5 MPa);
4. Estabilización hasta *ks* constante (ninguna burbuja saliendo por los extremos del segmento de rama)
5. Medición de *ks*

Los pasos 1 y 2 fueron realizados sólo al comienzo de cada curva, mientras que los pasos 3, 4 y 5 se repitieron para cada punto de la curva.

Al igual que en el capítulo anterior, las curvas de vulnerabilidad a la cavitación fueron obtenidas mediante la utilización de una bomba de presión de Scholander (Bio-Control, modelo 10, Argentina) con una cámara de cavitación de doble entrada de la misma marca. El porcentaje de pérdida de conductividad (*PPC*) fue estimado a partir de las pérdidas de *ks*, para cada nivel de tensión impuesto, con respecto a la *ks* máxima (*ks max*) de cada rama, y a cada curva de vulnerabilidad a la cavitación realizada se le ajustó la función de distribución acumulada (CDF, por sus siglas en inglés) de la distribución de Weibull:

$$PPC / 100 = 1 - \exp [-(T/b)^c]$$

donde: *T* es la tensión aplicada dentro de la cámara de cavitación, *b* es el parámetro de escala y *c* es el parámetro de forma de la distribución de Weibull. Los parámetros usuales como *P*₅₀, *P*₁₂ y *P*₈₈ (esto es la tensión que induce un 50, 12 y 88% de pérdida de conductividad; MPa) y la *pendiente* entre *P*₁₂ y *P*₈₈ para cada curva (que denota cuán rápida es esa pérdida; % MPa⁻¹) fueron estimados a partir de este modelo.

Variables anatómicas analizadas

Una vez realizadas las curvas de vulnerabilidad a la cavitación, las ramas fueron acondicionadas adecuadamente a fin de obtener los cortes histológicos para las mediciones anatómicas. Se obtuvieron preparados de la totalidad de la sección transversal (20-25 μm de espesor) mediante el uso de un micrótopo de deslizamiento. A los cortes histológicos obtenidos no se les aplicó tinción y fueron montados en forma transitoria en agua. Las siguientes variables se midieron en sección transversal: frecuencia de vasos (FV , mm^{-2}), área del halo (Ha , μm^2 ; variable definida en el Capítulo 3), espesor de pared de fibras (EPF , μm), fracción de paredes de fibras (FPF , %) y número de radios por milímetro lineal (Rmm , mm^{-1}). La densidad básica de la madera (DB , g cm^{-3}) a nivel de rama se calculó como el cociente entre el peso de la muestra seca al horno (peso anhidro) y el volumen totalmente saturado (o volumen verde).

El diámetro hidráulico de los vasos (Dh , μm) fue estimado a partir del diámetro de vasos (DV , μm) mediante la siguiente ecuación:

$$Dh = \frac{\sum DV^5}{\sum DV^4}$$

Debido a la relación significativa existente entre la distribución de vasos y la vulnerabilidad a la cavitación a nivel interespecífico (determinada en el Capítulo 3), se utilizó la función de densidad de probabilidad de la distribución de Weibull para ajustar el porcentaje de vasos en cada clase diamétrica:

$$\text{PDFV}(x; b, c) = \frac{c}{b} \left(\frac{x}{b}\right)^{(c-1)} \exp\left[-\left(\frac{x}{b}\right)^c\right]$$

donde: b y c son parámetros (equivalentes a los de la función de distribución acumulada) y x es la categoría diamétrica. Los parámetros b y c describen la amplitud y la forma (más o menos simétrica) de la distribución de vasos, respectivamente.

En el caso de *E. globulus* se realizaron además macerados en una porción de 1 cm de largo de cada segmento de rama, con una solución 1:1 de ácido acético glacial (6% P/V) y peróxido de hidrógeno (30% P/V) (Franklin 1945). Se realizaron las siguientes determinaciones: porcentaje de fibras ($F\%$, %), porcentaje de fibrotraqueidas ($FT\%$, %), porcentaje de traqueidas vasicéntricas ($TV\%$, %), porcentaje de parénquima axial ($PA\%$, %), longitud de fibras (LF , μm), longitud de fibrotraqueidas (LFT , μm), longitud de traqueidas vasicéntricas (LTV , μm) y longitud de los elementos de vaso (LV , μm).

Las imágenes de la sección transversal y de macerados fueron capturadas con una cámara digital (Infinity1-2CB, Lumenera Corporation, Ottawa, Canadá) montada sobre un microscopio óptico de investigación (CX31, Olympus, Tokio, Japón) mediante el uso de un objetivo de 4X (20–25 imágenes para tomar el total del segmento de rama) y de 20X (20 imágenes para tomar dos radios completos de médula a corteza por rama). Estas imágenes luego fueron procesadas a través de un software específico para el análisis de imágenes (ImagePro Plus 6.0, Media Cybernetics, Carlsbad, EE. UU.).

Capacitancia

El cálculo de la capacitancia de la madera solo se realizó sobre ramas de *E. viminalis*. Esta variable, definida como la razón de cambio en el contenido de agua debida a cambios en el potencial hídrico de un tejido, puede jugar un rol importante como amortiguador de los cambios en potencial hídrico a lo largo del xilema durante la transpiración. Su determinación fue llevada a cabo sobre segmentos de poco espesor, obtenidos de manera previa a la determinación de la vulnerabilidad a la cavitación, del extremo proximal de la rama. La determinación de esta propiedad fue realizada con un microvoltímetro (Wescor, Utah, EE. UU.), al cual se le adosó una cámara que permite el mantenimiento de las condiciones térmicas estables durante la determinación del potencial hídrico de la muestra ubicada en su interior por el método de Punto de Rocío (*Dew Point*). En cuanto a la metodología seguida, se partió de una muestra a saturación, la cual se pesó (P_{sat}) y luego se le determinó el potencial hídrico (Ψ , MPa). Las muestras se dejaron desecar al aire en diferentes intervalos de tiempo, realizando determinaciones de peso (para estimar cambios en el volumen de agua; P_{fresco}) y potencial hídrico de manera consecutiva. Estos pasos se repitieron entre 6 y 8 veces por muestra, hasta que la misma alcanzó valores de potencial entre -6 y -9 MPa aproximadamente. Posteriormente la muestra fue secada en estufa (60 °C) hasta peso constante, determinándose el peso seco de la misma (P_{seco}). Con estos valores se calculó el contenido relativo de agua (CRA , %) para cada potencial hídrico, según la fórmula:

$$CRA = \frac{P_{fresco} - P_{seco}}{P_{sat} - P_{seco}}$$

Las curvas que relacionaban CRA con Ψ se usaron luego para calcular la capacitancia (C ; $\text{kg m}^{-3} \text{Mpa}^{-1}$). Esta se normalizó sobre la base del volumen de madera (para facilitar la comparación de los volúmenes de agua liberados por cada cambio en el potencial) a través de la siguiente fórmula:

$$C = \frac{\Delta P_{agua}}{\Delta \Psi}$$

donde P_{agua} (kg m^{-3}) es el peso de agua por unidad de volumen de madera. Este se calculó de la siguiente manera:

$$P_{agua} = \left(\left(\frac{P_{sat}}{P_{seco}} \right) DB \right) - DB$$

El peso acumulado de agua liberado por unidad de volumen se calculó multiplicando este último por el déficit relativo de agua ($1 - CRA$) para cada nivel de Ψ .

Los valores de capacitancia fueron entonces determinados a partir de las pendientes de las curvas de peso acumulado de agua liberada versus Ψ . Estas curvas presentan una fase inicial (con el tejido saturado de agua), donde la liberación de agua progresa de manera casi lineal frente a Ψ , seguida por una fase de incremento marginal en la liberación de

agua a medida que el Ψ decrece de manera marcada. Los valores fueron estimados como la pendiente de la regresión lineal en la fase inicial de la curva (Figura 4.2).

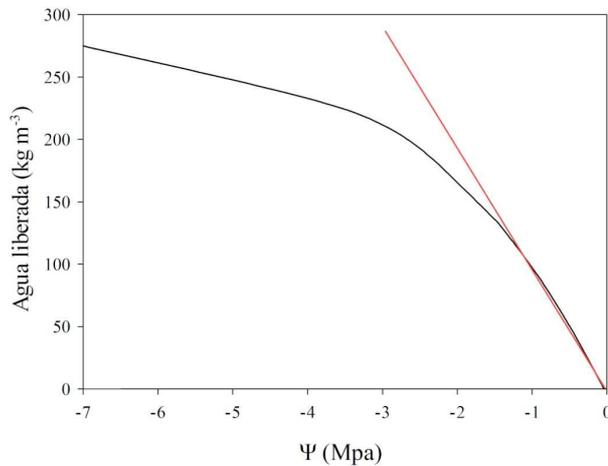


Figura 4.2. Peso acumulado de agua liberada por unidad de volumen de madera versus potencial agua. Los valores de capacitancia fueron estimados como la pendiente de la región lineal (línea roja) de la curva de liberación de agua (línea negra).

Análisis estadístico

Dentro de cada especie, la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre procedencias de alta y baja densidad ($\alpha = 5\%$) para las variables anatómicas, hidráulicas y de densidad de la madera, fue evaluada mediante un análisis de la varianza (ANOVA), seguido por la prueba de comparaciones múltiples LSD de Fisher. Para establecer diferencias en la distribución de tamaño de vasos y en las curvas de vulnerabilidad a la cavitación entre procedencias se utilizó la metodología de tablas de contingencia. Las relaciones entre pares de variables a nivel individual fueron cuantificadas a través del coeficiente de correlación de Pearson. Estos análisis se llevaron a cabo con el software estadístico InfoStat (versión 2015 - Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

Análisis de senderos

Como insumo para el desarrollo de los modelos correspondientes a ambas especies se utilizó la información estadística obtenida previamente acerca de las diferencias entre procedencias (por medio de ANOVA) y de cómo las variables se relacionaban entre ellas (análisis de correlación). Se seleccionaron primero aquellas variables que presentaban diferencias significativas entre procedencias, y luego se agregaron aquellas variables que mostraron correlaciones significativas con otras. De esta forma, se trató de minimizar el número de variables con el fin de obtener el modelo más simple posible capaz de reflejar las principales relaciones entre variables. Se seleccionó P_{50} como el indicador principal de resistencia a la cavitación debido a que es el parámetro más utilizado para comparar la sensibilidad a este proceso.

La técnica de *análisis de senderos* se basa en diagramas de senderos (o caminos) que permiten modelizar fácilmente las relaciones entre variables. Estas son representadas por

rectángulos, y cada camino está representado por una flecha, cuya dirección indica la dirección de la relación. Las correlaciones entre variables están representadas por flechas de doble punta (Norman & Streiner 2003). A través de estos diagramas, es posible descomponer las asociaciones entre variables en términos de efectos directos e indirectos. El efecto directo de una variable sobre otra se estima a través de coeficientes de sendero, que son similares a los coeficientes beta (*beta weights*) en una regresión múltiple. La magnitud del efecto indirecto es el resultado de multiplicar los coeficientes de sendero entre dos variables relacionadas.

Hay dos tipos de variables: variables exógenas y endógenas. Las variables exógenas son aquellas cuyas causas (o variables predictoras) son externas al modelo, y su función es explicar las variables internas del modelo. Estas variables tienen senderos de salida, pero no de entrada (las correlaciones no son consideradas senderos). Las variables endógenas tienen sus causas en una o más variables del modelo. Estas variables tienen senderos de entrada e incluyen a las variables dependientes (solo entrada) y las variables intervinientes con flechas de entrada y salida (Pérez et al. 2013). Se consideró como variables exógenas aquellos caracteres anatómicos que no dependen de otros (al menos, de los medidos en este análisis), siendo el resto variables endógenas. El primer paso fue crear las variables exógenas y conectarlas mediante flechas de doble punta. Luego se agregaron las variables endógenas y se conectaron en base a la magnitud y significancia del índice de correlación para cada par de variables. En el ordenamiento y disposición de las variables y su interconexión se trató de abordar los posibles efectos causales, en base a lo expuesto en la bibliografía disponible y la propia experiencia.

A partir de este modelo inicial, que contenía una gran cantidad de variables y senderos (flechas) entre ellas, se comenzó un proceso iterativo en el que, en primer lugar, se examinaron los componentes individuales del modelo (magnitud de los coeficientes de regresión de cada sendero y sus niveles de significancia), y se eliminaron aquellos senderos que se encontraban por debajo del nivel de aceptación estadística fijado (p -valor $\leq 0,05$). Los coeficientes de sendero se estimaron por medio del método de máxima verosimilitud (*maximum likelihood method*), el cual no depende de la escala de medición. Al mismo tiempo, se analizó el ajuste del modelo a los datos por medio de varios estadísticos de bondad de ajuste (Tabla 4.3). Entre estos, hay dos tipos: los índices de ajuste absoluto y los índices de ajuste relativo (que comparan el ajuste respecto a otro modelo). Debido a que ninguno de estos estadísticos aporta toda la información necesaria para valorar el modelo, habitualmente se utiliza un conjunto de ellos simultáneamente. Se pueden encontrar más detalles acerca de los diferentes índices en Ullman (2013). Finalmente, una vez que se llegó a un modelo compuesto solo por senderos estadísticamente significativos, se procedió a re-especificar el modelo con el objetivo de mejorarlo y obtener un mejor ajuste. Para ello se utilizó una herramienta denominada “índices de modificación” (*modification indices*). Todas las determinaciones estadísticas involucradas en la formulación y evaluación del modelo fueron llevadas a cabo mediante el uso de software estadístico específico (SPSS AMOS 22.0.0, IBM Corp., Armonk, EE. UU.).

Tabla 4.3. Pruebas de bondad de ajuste y criterio estadístico utilizado para evaluar el ajuste de los modelos desarrollados. Entre paréntesis, debajo de cada estadístico, se cita el nombre del índice en inglés ya que es la forma más difundida de presentarlo. En estos casos, la abreviatura de cada test corresponde a las siglas en inglés.

Test	Abreviatura	Criterio
Índices de ajuste absoluto		
Chi-cuadrado	χ^2	Significancia > 0,05
Chi-cuadrado relativo	χ^2/df	< 2
Índice de bondad de ajuste (<i>Goodness of Fit Index</i>)	GFI	> 0,9
Error cuadrático medio de aproximación (<i>Root Mean Square Error of Approximation</i>)	RMSEA	< 0,06
Raíz cuadrada estandarizada del error cuadrático medio (<i>Standardized Root Mean Square Residual</i>)	SRMR	< 0,08
Índices de ajuste relativo		
Índice de Ajuste Normalizado (<i>Normed Fit Index</i>)	NFI	> 0,95
Índice Tucker-Lewis (<i>Tucker-Lewis Index</i>)	TLI	> 0,95
Índice de ajuste comparativo (<i>Comparative Fit Index</i>)	CFI	> 0,95

Resultados

Anatomía de la madera

En coincidencia con la estimación de densidad en los fustes de árboles en pie, llevada a cabo con Pilodyn, las procedencias seleccionadas de ambas especies analizadas presentaron diferencias significativas en la densidad básica de sus ramas (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Media \pm desvío estándar de las variables anatómicas medidas en dos especies del género *Eucalyptus* con procedencias de alta (AD) y baja densidad (BD) de madera a nivel de fuste (*E. globulus*: AD n = 12, BD n = 12; *E. viminalis*: AD n = 10, BD n = 12). Valores en negrita indican diferencias significativas entre procedencias de la misma especie (test LSD de Fisher; $p < 0,05$).

Variable	<i>E. globulus</i>		<i>E. viminalis</i>	
	Alta densidad	Baja densidad	Alta densidad	Baja densidad
<i>DB</i> (g cm ⁻³)	0,65 \pm 0,03	0,59 \pm 0,04	0,58 \pm 0,05	0,53 \pm 0,05
<i>Dh</i> (μ m)	49,94 \pm 4,07	53,11 \pm 6,60	52,35 \pm 5,85	49,6 \pm 3,13
<i>FV</i> (mm ⁻²)	78,08 \pm 16,84	70,74 \pm 19,14	51,11 \pm 6,90	52,13 \pm 8,16
<i>Ha</i> (μ m ²)	2090 \pm 292	2514 \pm 566	3853 \pm 623	4014 \pm 481
<i>Rmm</i> (mm ⁻¹)	22,48 \pm 3,05	24,17 \pm 4,55	21 \pm 2,14	22,18 \pm 2,62
<i>EPF</i> (μ m)	1,855 \pm 0,12	1,82 \pm 0,15	1,96 \pm 0,2	1,82 \pm 0,18
<i>FPF</i> (%)	66,46 \pm 7,15	60,38 \pm 4,83	61,45 \pm 0,03	53,49 \pm 0,04
<i>b</i>	4,97 \pm 0,34	5,34 \pm 0,74	5,09 \pm 0,51	4,71 \pm 0,35
<i>c</i>	4,41 \pm 0,81	4,95 \pm 0,77	4,14 \pm 0,54	3,79 \pm 0,3

Referencias: *DB*: densidad básica; *Dh*: diámetro hidráulico; *FV*: frecuencia de vasos; *Ha*: área del halo; *Rmm*: número de radios por milímetro lineal; *EPF*: espesor de pared de fibras; *FPF*: fracción de pared de fibras; *b*: parámetro de escala de la función de densidad de probabilidad de Weibull para la distribución de vasos; *c*: parámetro de forma de la función de densidad de probabilidad de Weibull para la distribución de vasos.

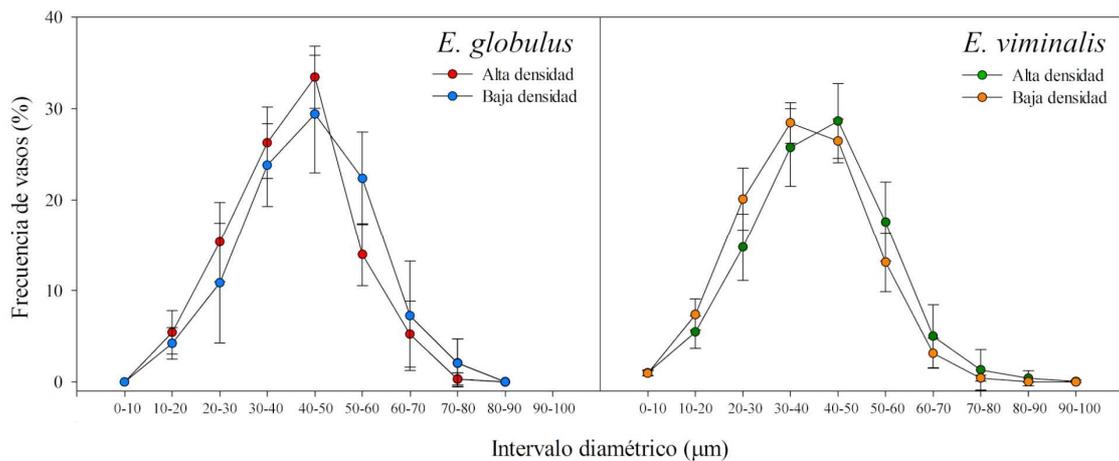


Figura 4.3. Distribución de tamaño de vasos en dos especies del género *Eucalyptus* con procedencias de alta y baja densidad de madera a nivel de fuste (*E. globulus*: AD n = 12, BD n= 12; *E. viminalis*: AD n = 10, BD n = 12). Cada punto representa el valor medio para cada intervalo de diámetro de vasos. Las barras representan el desvío estándar de la media.

Las diferencias observadas en la densidad de ramas no se vieron reflejadas en variaciones de diámetro hidráulico y frecuencia de vasos (es decir, número de vasos por unidad de área), lo cual sugiere la existencia, en ambas especies, de una arquitectura hidráulica similar a nivel de tejido xilemático entre procedencias. En este sentido, el análisis con tablas de contingencia de la distribución de tamaños de vasos no mostró diferencias entre las procedencias de ambas especies (*E. globulus*: $\chi^2 = 5,17$, $p = 0,52$; *E. viminalis*: $\chi^2 = 3,97$, $p = 0,78$; Figura 4.3). Sumado a esto, los parámetros de la función de Weibull que describen la amplitud y la forma de la distribución de vasos (b y c , respectivamente) tampoco presentaron diferencias significativas.

Tabla 4.5. Media \pm desvío estándar de la proporción y longitud de los distintos elementos celulares en dos procedencias de *Eucalyptus globulus* de alta (AD) y baja densidad (BD) de madera a nivel de fuste (AD n = 12, BD n= 12), de un ensayo ubicado en las cercanías de Balcarce, provincia de Buenos Aires. Valores en negrita indican diferencias significativas entre procedencias (test LSD de Fisher; $p < 0,05$).

	Variable	Alta densidad	Baja densidad
Proporción	PA% (%)	9,53 \pm 2,04	10,46 \pm 2,40
	FT% (%)	5,27 \pm 1,18	6,54 \pm 1,56
	TV% (%)	8,11 \pm 1,66	8,82 \pm 1,48
	F% (%)	77,09 \pm 4,05	74,18 \pm 4,26
Longitud	LF (μ m)	543,77 \pm 28,38	581,72 \pm 18,54
	LFT (μ m)	448,58 \pm 25,09	469,39 \pm 25,87
	LTV (μ m)	365,11 \pm 17,81	378,46 \pm 27,44
	LV (μ m)	242,07 \pm 20,25	230,51 \pm 24,66

Referencias: PA%: porcentaje de parénquima axial; FT%: porcentaje de fibrotraqueidas; TV%: porcentaje de traqueidas vasicéntricas; F%: porcentaje de fibras; LF: longitud de fibras; LFT: longitud de fibrotraqueidas; LTV: longitud de traqueidas vasicéntricas; LV: longitud de los elementos de vaso.

Con relación a la proporción de los distintos elementos celulares (Tabla 4.5), analizada solo para *E. globulus*, se observaron diferencias en el porcentaje de fibrotraqueidas. Esto sería, en parte, responsable por la variación detectada en el tamaño del halo, debido a que este elemento celular es uno de sus componentes principales. Las fibras presentaron diferencias en longitud, pero no en espesor, a pesar de que la procedencia con mayor densidad de madera presentó una mayor fracción de pared de fibras.

Vulnerabilidad a la cavitación

Tal como se esperaba (en función de las características de los vasos) no se registraron diferencias en conductividad hidráulica específica máxima (ks_{max}) entre procedencias, para ambas especies (Tabla 4.6).

En *E. globulus*, a pesar de no encontrarse diferencias para el nivel de tensión que impone una pérdida de conductividad del 12% (P_{12}), los parámetros P_{50} y P_{88} fueron más negativos en la procedencia de alta densidad de madera, lo cual significa que es necesaria mayor tensión para alcanzar un determinado nivel de pérdida de conductividad y, por lo tanto, es indicador de una mayor resistencia al proceso de cavitación (Tabla 4.6). Además, a través del análisis con tablas de contingencia, se encontraron diferencias en las curvas de cavitación entre procedencias ($\chi^2 = 267,21$; $p < 0,001$). Sin embargo, esto no se vio reflejado en la *pendiente* de la curva, si bien las procedencias de baja densidad de madera perdieron, en promedio, 10% más de conductividad por cada MPa de tensión impuesto respecto de las progenies de alta densidad (Figura 4.4).

En el caso de *E. viminalis*, por otro lado, no se encontraron diferencias entre procedencias para ninguno de los niveles de tensión analizados (Figura 4.4), lo cual fue confirmado por el análisis de tablas de contingencia, el cual no mostró diferencias entre procedencias ($\chi^2 = 1,97$; $p > 0,99$). A pesar de esto, se encontraron diferencias en la *pendiente* de la curva de cavitación, siendo más pronunciada en la procedencia de mayor densidad.

Tabla 4.6. Media \pm desvío estándar de las variables hidráulicas medidas en dos especies del género *Eucalyptus* con procedencias de alta (AD) y baja densidad (BD) de madera a nivel de fuste (*E. globulus*: AD n = 12, BD n= 12; *E. viminalis*: AD n = 10, BD n = 12). Valores en negrita indican diferencias significativas entre procedencias (test LSD de Fisher; $p < 0,05$).

Variable	<i>E. globulus</i>		<i>E. viminalis</i>	
	Alta densidad	Baja densidad	Alta densidad	Baja densidad
ks_{max} (kg m ⁻¹ MPa ⁻¹ s ⁻¹)	1,55 \pm 0,76	2,20 \pm 1,46	2,24 \pm 0,7	1,79 \pm 0,59
P_{12} (MPa)	-2,13 \pm 1,02	-1,51 \pm 0,78	-1,79 \pm 0,36	-1,65 \pm 0,53
P_{50} (MPa)	-3,73 \pm 1,27	-2,70 \pm 1,02	-3,81 \pm 0,42	-3,92 \pm 0,53
P_{88} (MPa)	-5,62 \pm 1,79	-4,10 \pm 1,37	-6,36 \pm 0,99	-7,18 \pm 0,93
<i>pendiente</i> (% MPa ⁻¹)	25,8 \pm 10,7	35,3 \pm 18,6	17,42 \pm 3,62	14,33 \pm 2,92

Referencias: ks_{max} : conductividad hidráulica específica máxima; P_{12} : potencial agua al 12% de pérdida de conductividad; P_{50} : potencial agua al 50% de pérdida de conductividad; P_{88} : potencial agua al 88% de pérdida de conductividad, *pendiente*: pendiente de la curva de vulnerabilidad a la cavitación.

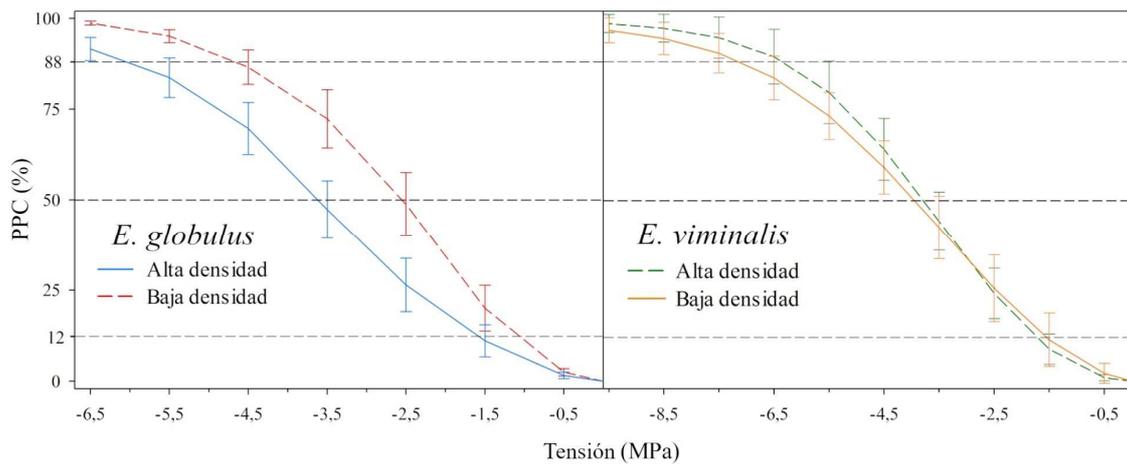


Figura 4.4. Curvas de vulnerabilidad a la cavitación (VC) en dos especies del género *Eucalyptus* con procedencias de alta y baja densidad de madera a nivel de fuste (*E. globulus*: AD n = 12, BD n = 12; *E. viminalis*: AD n = 10, BD n = 12).

Relación entre las variables

Debido al gran número de variables analizadas, se decidió agrupar los resultados de acuerdo con el grado de relación funcional y el tipo de determinaciones llevadas a cabo (Figura 4.5).

Considerando las variables comunes a ambas especies, se observó un número de correlaciones significativas diferente entre ellas, siendo mayor para *E. globulus*. Sin embargo, aquellas correlaciones que fueron significativas para ambas especies (6) presentaron el mismo signo. Entre estas, la densidad básica de las ramas (*DB*) se correlacionó positivamente con la fracción ocupada por paredes de fibras (*FPF*), mientras que el diámetro hidráulico (*Dh*) se relacionó positivamente con el nivel de conductividad (*Ks max*) y negativamente con el comienzo de proceso de cavitación (*P₁₂*).

Entre las relaciones más importantes para *E. globulus* (Figura 4.5) se puede mencionar aquella entre el área de halo (*Ha*) y *ks max*. *Ha* también mostró una correlación significativa con *Dh* y la frecuencia de vasos (*FV*), aunque con distinto signo. *Ks max* se asoció negativamente con *DB* y el número radios por mm lineal (*Rmm*) y exhibió una relación positiva con la *pendiente* de la curva de vulnerabilidad a la cavitación. Esta última variable se correlacionó negativamente con *DB* (es decir, a menor densidad, más pronunciada la *pendiente*) y positivamente con *Ha* y *LTV*. Además de la *pendiente* y *ks max*, *DB* se asoció negativamente con *Dh*, *Ha*, la longitud de fibras (*LF*), proporción de fibrotraqueidas (*FT%*) y *P₈₈*. La longitud de las células fibrosas acompañantes de los vasos (fibras, fibrotraqueidas y traqueidas vasicéntricas) se correlacionó positivamente con *Dh* y *Ha*, lo que sugiere una relación de coordinación estructural entre los diversos tipos celulares tanto en el eje radial/transversal como en el longitudinal.

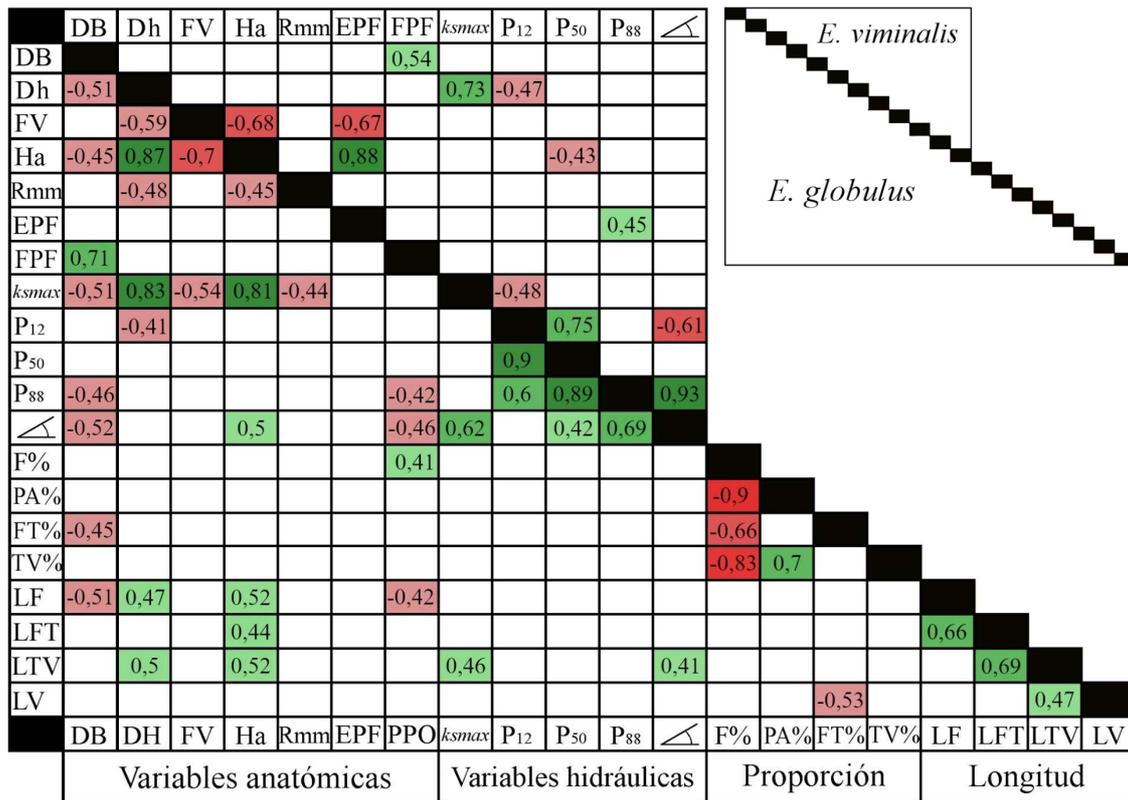


Figura 4.5. Análisis de correlación entre variables medidas en dos especies del género *Eucalyptus* con procedencias de alta y baja densidad de madera a nivel de fuste (*E. globulus*: AD n = 12, BD n= 12; *E. viminalis*: AD n = 10, BD n = 12). Las correlaciones mostradas son aquellas que resultaron significativas para un nivel de significancia menor a 0,05. En rojo se muestran las correlaciones negativas y en verde las correlaciones positivas. La diferencia en intensidad de color refleja la magnitud de la correlación, siendo más intensas aquellas que son numéricamente más importantes. Referencias: Dh: diámetro hidráulico; FV: frecuencia de vasos; Ha: área del halo; Rmm: número de radios por milímetro lineal; EPF: espesor de pared de fibras; FPF: fracción de pared de fibras; ks max: conductividad hidráulica específica máxima; P₁₂: potencial agua al 12% de pérdida de conductividad; P₅₀: potencial agua al 50% de pérdida de conductividad; P₈₈: potencial agua al 88% de pérdida de conductividad; ∠: pendiente de la curva de vulnerabilidad a la cavitación; F%: porcentaje de fibras; PA%: porcentaje de parénquima axial; FT%: porcentaje de fibrotraqueidas; TV%: porcentaje de traqueidas vasicéntricas; LF: longitud de fibras; LFT: longitud de fibrotraqueidas; LTV: longitud de traqueidas vasicéntricas; LV: longitud de los elementos de vaso; DB: densidad básica.

En cuanto a las correlaciones significativas detectadas en *E. viminalis* (Figura 4.5), el espesor de pared de fibras (EPF) se relacionó negativamente con FV y positivamente con Ha. Esta última variable se correlacionó negativamente con P₅₀, mientras que P₈₈ presentó una correlación positiva con EPF.

Capacitancia

El análisis de la capacitancia entre las procedencias de *E. viminalis* de alta y baja densidad no arrojó diferencias entre ellas (Figura 4.6). En este sentido, el análisis por medio de

tablas de contingencia del agua liberada en función de la tensión no presentó diferencias significativas ($\chi^2 = 21,49$; $p < 0,21$).

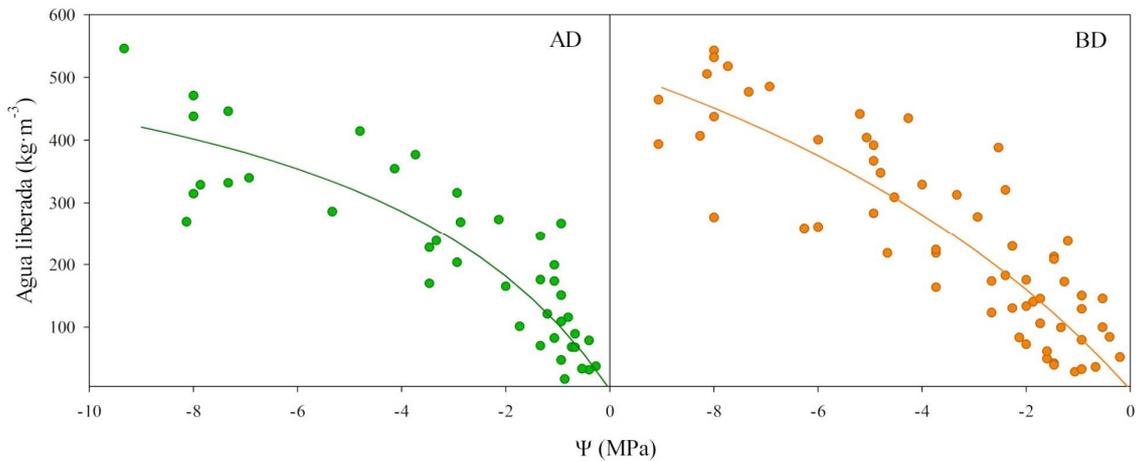


Figura 4.6. Peso acumulado de agua liberada por unidad de volumen de madera en función del potencial agua (Ψ) para dos procedencias de *Eucalyptus viminalis* de alta y baja densidad de madera a nivel de fuste. *Panel izquierdo:* progenie de alta densidad (AD). *Panel derecho:* progenie de baja densidad (BD). Los puntos representan los valores de pérdida de agua acumulada para el total de muestras analizadas en cada progenie (AD n = 10, BD n = 12; aproximadamente 6 a 8 puntos por muestra). La línea curva representa la regresión establecida para cada progenie.

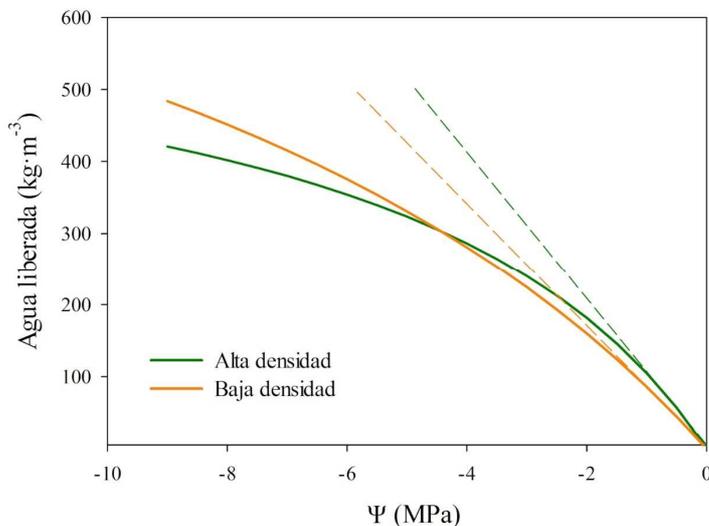


Figura 4.7. Comparación de curvas de peso acumulado de agua liberada por unidad de volumen en función del potencial agua (Ψ) para dos procedencias de *Eucalyptus viminalis* de alta y baja densidad de madera a nivel de fuste. Las líneas solidas representan la regresión para cada progenie (Figura 4.6). La línea punteada representa la porción lineal de la curva en la fase inicial de pérdida de agua.

El valor de capacitancia, establecido a partir del ajuste de un modelo hiperbólico del tipo $y = \alpha \cdot x / (x + \beta)$, no presentó diferencias significativas entre procedencias a pesar de observarse mayor pendiente y, por lo tanto, mayor cantidad de agua liberada en la fase inicial de la curva en la progenie de mayor densidad ($C_{AD} = 108 \text{ kg m}^{-3} \text{ MPa}^{-1}$, $C_{BD} = 84,8 \text{ kg m}^{-3} \text{ MPa}^{-1}$; Figura 4.7). Sumado a esto, el nivel de capacitancia determinado no se correlacionó significativamente con ninguna variable anatómica o hidráulica, tanto a nivel de especie como dentro de cada procedencia ($p > 0,05$ en todos los análisis de correlación; datos no mostrados).

Análisis de sendero

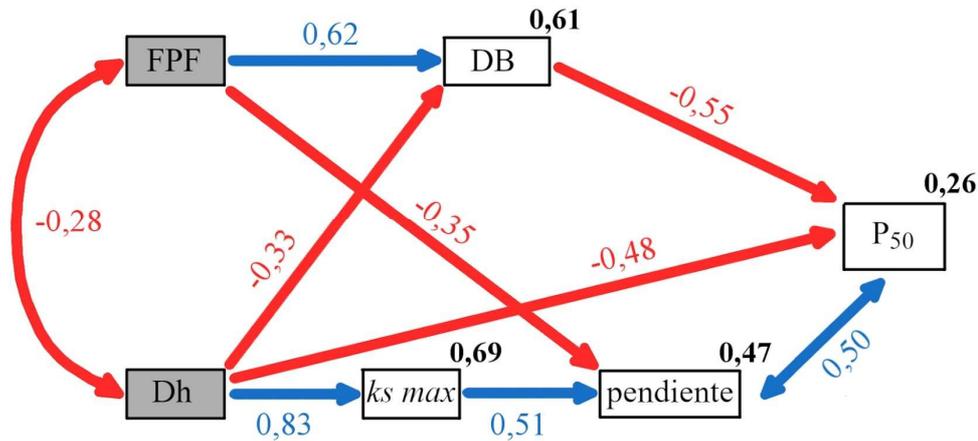
De acuerdo con el análisis llevado a cabo (Figura 4.8, *panel superior*), para *E. globulus* las principales variables exógenas que predicen la vulnerabilidad a la cavitación son el diámetro hidráulico de los vasos (*Dh*) y la fracción de pared de fibras (*FPF*). Esta última mostró un impacto directo positivo sobre la densidad de madera (*DB*) y negativo sobre la *pendiente* de la curva de VC (a mayor fracción de paredes, menor *pendiente*), mientras que presentó, a través de ellas, un efecto negativo indirecto sobre *P₅₀* (a mayor porcentaje de pared, mayor tensión necesaria para alcanzar el 50% de pérdida de conductividad). Por otro lado, el *Dh* exhibió un impacto directo positivo sobre la *ks max* y negativo sobre *DB*. Esta última evidenció un efecto negativo sobre *P₅₀* (es decir, a mayor densidad, menor vulnerabilidad a la cavitación). La *pendiente*, que se correlacionó positivamente con *P₅₀* (a mayor *pendiente*, mayor vulnerabilidad), se vio directa y positivamente afectada por *ks max*. Según el modelo desarrollado, *Dh* presentó un efecto negativo directo sobre la vulnerabilidad a la cavitación (es decir, a mayor tamaño de vasos, menor vulnerabilidad) y, al mismo tiempo, un efecto positivo indirecto sobre la misma, a través de la *DB* por un lado y a través de *ks max* y la *pendiente*, por el otro.

En el caso de *E. viminalis* (Figura 4.8, *panel inferior*), además de *Dh* y *FPF*, el área de halo (*Ha*) también resultó una variable exógena significativa. El nivel de correlación observado entre estas variables no fue significativo en ningún caso. En el modelo desarrollado para esta especie, la capacitancia (*C*) fue una variable endógena relevante, la cual se vio afectada directa y positivamente por *Ha* y *DB* (e, indirectamente, a través de esta última por *FPF*), mientras que se observó un efecto negativo directo de *Dh*. Es decir, que el aumento en la fracción de pared de fibras, y por consiguiente de la densidad, o del área de células acompañantes de los vasos, repercutirían en un aumento en la capacitancia, mientras que un aumento en el tamaño de vasos tendría un efecto contrario. Por otro lado, el tamaño de vasos presentó una influencia significativa en el comienzo del proceso de cavitación (*P₁₂*). A su vez, *P₁₂* se relacionó negativamente con la *pendiente* de la curva y positivamente con *P₅₀*. Esto indicaría que, al aumentar el tamaño de vasos, aumenta la tensión necesaria para que se produzca el ingreso de aire en los elementos conductivos y, como consecuencia de esto, aumenta la tensión necesaria para alcanzar el 50% de pérdida de conductividad, si bien la velocidad de progresión de este proceso también aumenta. Estas dos últimas variables estuvieron altamente correlacionadas entre sí. Por último, *Dh* presentó una influencia positiva directa sobre el nivel de conductividad medido en las ramas de esta especie.

La mayoría de las pruebas de bondad de ajuste llevadas a cabo superaron los criterios de aceptación previamente establecidos (Tabla 4.7). En el caso de *E. globulus*, la única excepción fue el Índice de Ajuste Normalizado (*NFI*, por sus siglas en inglés), el cual no es recomendable para tamaños muestrales pequeños, ya que puede subestimar el ajuste del modelo (Ullman 2013). Para *E. viminalis*, además de este índice, tampoco alcanzaron el criterio de aceptación el Índice de bondad de ajuste (*GFI*) y la raíz cuadrada estandarizada del error cuadrático medio (*SRMR*). Estos índices de ajuste absoluto suelen mejorar aumentando el tamaño muestral, por lo que el acotado número de muestras

disponible pudo ser, en parte, responsable del bajo nivel de ajuste. Consecuentemente, en base a estos resultados, se concluye que los modelos propuestos se ajustan adecuadamente a los datos de las dos especies bajo estudio.

a) *Eucalyptus globulus*



b) *Eucalyptus viminalis*

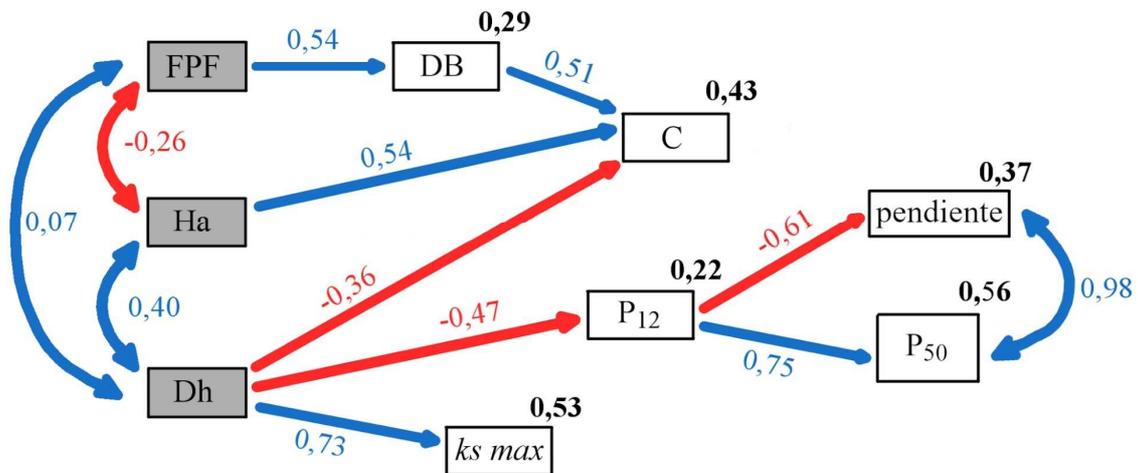


Figura 4.8. Modelos finales desarrollados por medio de análisis de sendero para a) *E. globulus* y b) *E. viminalis*. Los valores de las flechas de doble punta corresponden al coeficiente de correlación de Pearson entre las variables unidas por ellas. Los valores de los demás senderos representan los coeficientes de sendero (equivalentes a los coeficientes beta de una regresión múltiple). La coloración roja de las flechas corresponde a correlaciones/relaciones negativas y la azul a positivas. Las variables encerradas en cajas grises representan a las variables exógenas, mientras que las blancas representan a las variables endógenas. Los valores en la esquina superior derecha de las variables corresponden al coeficiente de determinación (R^2).

Referencias: *FPF*: fracción de pared de fibras; *Ha*: área de halo; *Dh*: diámetro hidráulico; *C*: capacitancia; *ks max*: conductividad hidráulica específica máxima; *DB*: densidad básica; *pendiente*: pendiente de la curva de vulnerabilidad a la cavitación; *P₅₀*: potencial agua al 50% de pérdida de conductividad. *P₁₂*: potencial agua al 12% de pérdida de conductividad.

Tabla 4.7. Resultados de las pruebas de bondad de ajuste para el modelo propuesto. Valores en negrita indican cumplimiento del criterio de aceptación.

Prueba	Criterio de aceptación	<i>E. globulus</i>	<i>E. viminalis</i>
χ^2	p > 0,05	5,258; p = 0,511	2,189; p = 0,902
χ^2/df	< 2	0,876	0,978
<i>GFI</i>	> 0,9	0,929	0,810
<i>RMSEA</i>	< 0,06	0	0
<i>SRMR</i>	< 0,08	0,054	0,1231
<i>NFI</i>	> 0,95	0,939	0,852
<i>TLI</i>	> 0,95	1	1
<i>CFI</i>	> 0,95	1	1

Discusión

El muestreo realizado se basó en la selección de progenies contrastantes en densidad básica de la madera a nivel de fuste, tratando de maximizar la variación funcional a observar a nivel intraespecífico, sobre el supuesto de que la densidad se relaciona con la vulnerabilidad a la cavitación del xilema. Las ramas reflejaron las tendencias en densidad observadas a nivel de fuste, sin embargo, las variables funcionales medidas no respondieron -en general- al agrupamiento de progenies de alta vs baja densidad, sino que pudieron ser explicadas mediante un análisis integrador de variables medidas a nivel individual, dentro de cada especie. En términos generales, si bien hubo diferencias entre especies en el número de correlaciones significativas entre variables anatómicas y funcionales, el hecho de que no se observaran correlaciones de signo inverso entre ambas hace pensar que, más allá del nivel de significancia, ambos sistemas son homólogos. A su vez, y de manera análoga a lo observado a nivel interespecífico (Capítulo 3), no hubo una única variable anatómica que claramente explique las diferencias en magnitud en las variables funcionales medidas, sino que se pudo probar (mediante el análisis de senderos) la existencia de una compleja interrelación entre variables, con efectos directos e indirectos.

Al considerar las relaciones esperadas –según la bibliografía–, la falta de correlación entre el espesor de pared de las fibras y la densidad básica para ambas especies podría ser explicada por la importancia del lumen celular (no medido) al momento de definir las dimensiones de las fibras (Figura 2.13). Como se mencionó en el Capítulo 2, las fibras constituyen el elemento celular en mayor proporción dentro del xilema y, en consecuencia, sus dimensiones (espesor de pared + diámetro del lumen) tienen un gran impacto en la densidad de madera (Jacobsen et al. 2005). Como resultado, la relación entre estas variables suele tomar valores positivos (Carrillo et al. 2015), negativos (Capítulo 2, Martínez-Cabrera et al. 2009) o no presentar relación alguna (Capítulo 3, Sterck et al. 2012). Por otro lado, la *FPF* (una medida indirecta y relativa del espesor de pared de fibras, que integra en ella al lumen celular) mostró en ambas especies una relación positiva y altamente significativa con *DB*. Debido a que la densidad no solo

refleja la proporción de paredes dentro del xilema, sino también la fracción de lúmenes, la relación negativa entre DB y Dh era esperable y se encuentra en concordancia con trabajos previos en otros géneros o especies (Jacobsen et al. 2005). A pesar de ello, esta correlación solo fue significativa en *E. globulus*. En *E. viminalis*, si bien esta relación no fue significativa, se observa que la tendencia general es contraria a la esperada, siendo las procedencias de mayor densidad las que presentaron los vasos de mayor diámetro (Tabla 4.4). Es probable que esta falta de correlación se deba a la poca variabilidad observada en los caracteres anatómicos para esta última especie, la cual solo mostró diferencias significativas para FPF . A su vez, a esta falta de correlación puede haber contribuido la escasa, aunque significativa, variación en densidad de madera entre las procedencias estudiadas. En consonancia con estos resultados, no se encontraron diferencias significativas en la distribución de tamaño de vasos entre procedencias de alta y baja densidad para ambas especies. Como consecuencia, es probable que la correlación significativa entre densidad de madera y diámetro de vasos, comúnmente reportada para estudios interespecíficos para rangos de densidad de madera amplios y contrastantes, no se observe a nivel intraespecífico (*E. viminalis*) o, en caso de registrarse, esta sea de una magnitud menor a la esperada (*E. globulus*). Por otro lado, de acuerdo con Jacobsen et al. (2005), esta nula o débil relación entre densidad de madera y diámetro de vasos, probablemente sea debida a que la densidad de madera de las especies angiospermas depende en mayor medida de las características de las fibras. El análisis de senderos confirmó los valores de correlación entre estas variables, observándose que, en *E. globulus*, Dh y FPF influyen significativamente DB y permiten explicar el 61% de su variación. El modelo desarrollado para *E. viminalis* muestra que Dh no influye directamente sobre DB , cuya variación puede ser explicada en un 29% por la sola influencia de FPF .

La poca variabilidad observada en *E. viminalis* para las características morfométricas de vasos y fibras, probablemente haya sido la causal de la escasa diferencia observada en los valores de capacitancia. En este sentido, si bien esta variable no presentó diferencias entre procedencias y no se correlacionó con ninguna variable anatómica o funcional, se observa que las procedencias de mayor densidad presentaron, en general, mayor liberación de agua en la fase inicial pero que, a menores niveles de potencial agua (potenciales más negativos), acumularon menor peso de agua liberada. Lo contrario se observó en las procedencias de menor densidad, que, si bien liberan menos agua al comienzo, ceden proporcionalmente mayor cantidad de agua a medida que el potencial agua baja. A pesar de la falta de correlación observada entre estas variables, el análisis de senderos permitió modelar el efecto de estas sobre la capacitancia, observándose un efecto negativo del tamaño de vasos sobre la capacitancia, mientras que la densidad y el área de halo se relacionaron positivamente. En particular, la relación positiva entre densidad y capacitancia es contraria a los resultados habitualmente reportados en análisis multiespecíficos (Meinzer et al. 2003, Santiago et al. 2004, 2018, Pratt et al. 2007, Scholz et al. 2007, Trifilò et al. 2015). De acuerdo con estos trabajos, la relación negativa entre ellas sería resultado de que, a menor densidad, existe un mayor volumen de espacios vacíos (espacios intercelulares y lúmenes de fibras) que representan la porción del xilema

donde es posible acumular agua capilar. Así, la pendiente inicial de las curvas de liberación de agua en función de la tensión sería una medida del volumen de agua capilar, que representa el mayor volumen de agua en el xilema. Por otro lado, el agua puede ser almacenada elásticamente en los tejidos y, si bien este volumen generalmente es pequeño, también puede ser cuantificado a través de estas curvas. Este se relaciona con el espesor de pared y con la cantidad de parénquima de los tejidos. Por último, el agua en los lúmenes de los vasos puede ser considerada como un compartimento para el almacenamiento de agua que se libera durante la cavitación (Pratt & Jacobsen 2017). Si bien estos tres tipos de agua (capilar, elástica y de cavitación) están relacionados con las características anatómicas del xilema, existen ciertas dificultades metodológicas que dificultan su separación y análisis. Por un lado, debido al tamaño restrictivo de la cámara del microvoltímetro utilizado, los segmentos de rama tenían los vasos abiertos. Por otro, el agua capilar está disponible a potenciales relativamente altos, entre 0 y -0,2 MPa (Pratt & Jacobsen 2017). La capacitancia calculada a partir de la pendiente inicial de la curva de liberación de agua, tal como fue medida en este trabajo, representaría principalmente a la porción de agua almacenada en los tejidos (agua almacenada elásticamente). Esto explicaría la relación positiva observada con DB (que resulta una medida de la proporción de paredes en el xilema) y con Ha (compuesto por proporciones variables de parénquima axial). Además, la relación negativa con Dh podría explicarse a través de la disminución del área de xilema compuesto por fibras (y, por consiguiente, del área de sus paredes) a medida que aumenta el tamaño de los vasos.

Como era de esperarse, en base a los coeficientes de correlación, la única variable predictora de ks_{max} en ambos modelos fue el Dh . Esto concuerda con la ley de Hagen-Poiseuille y es una relación que ha sido ampliamente informada en numerosos trabajos referentes al tema, incluso en especies de *Eucalyptus* (Capítulo 3). La relación directa entre conductividad máxima y la *pendiente* de la curva de vulnerabilidad a la cavitación, aunque solo observada en *E. globulus*, fue previamente reportada en el capítulo 3 y sugeriría, en principio, un cierto compromiso entre eficiencia y seguridad, ya que una mayor *pendiente* implica un aumento en la velocidad del proceso de cavitación. Si bien en *E. viminalis* esta relación no resultó significativa, la tendencia observada en los valores medios para cada procedencia va en el mismo sentido. Así, en esta especie, Dh se relacionó en forma indirecta y positiva con la *pendiente* a través del efecto negativo del diámetro de vasos sobre P_{12} , indicando un aumento en la velocidad de progresión del evento de cavitación a medida que aumenta el diámetro. En *E. globulus*, la correlación positiva entre la *pendiente* y P_{50} (análisis de sendero), trajo aparejado un compromiso indirecto entre esta última y ks_{max} . Se observó también, en ambas especies, una correlación positiva entre la *pendiente* y P_{88} lo que indica que la vulnerabilidad a la cavitación aumenta con el aumento de la *pendiente*, al menos a niveles de potencial agua medios o bajos. Del análisis de senderos surgió además otra relación positiva entre Dh y P_{50} : en *E. globulus* un incremento en Dh resulta en una menor DB que a su vez produce un aumento en P_{50} (valores menos negativos: mayor vulnerabilidad a la cavitación). Este compromiso entre eficiencia y seguridad conductiva, aunque débil (ver próximo párrafo), ha sido demostrado en trabajos previos a nivel interespecífico, a través del análisis de

múltiples especies leñosas (Maherali et al. 2004, Gleason et al. 2016), y a nivel intraespecífico, al tomar en consideración los cambios en la distribución de tamaño de vasos (Cai & Tyree 2010).

A pesar de no presentar una correlación significativa entre Dh y P_{50} para ninguna de las dos especies, y en contraste con el signo de los efectos indirectos entre estas, observado en el modelo para *E. globulus* –a través de ks_{max} y la *pendiente*, por un lado, y DB por el otro–, el efecto *directo* de una sobre la otra fue negativo. Por otro lado, el efecto negativo directo de Dh sobre P_{12} , e indirecto sobre P_{50} , en el modelo de *E. viminalis* permite inferir un patrón similar en ambas especies. La relación negativa entre Dh y P_{12} , si bien no se registró en el análisis de sendero, también fue significativa para *E. globulus* en el análisis de correlación. Así, un aumento en el tamaño de los vasos traería aparejado un aumento en la tensión necesaria para el ingreso de aire (punto de entrada de aire: P_{12}), y haría necesaria una mayor tensión para producir una pérdida de conductividad del 50% (P_{50}). Por otro lado, dado la alta correlación positiva entre P_{50} y la *pendiente* de la curva, indicaría que una vez que el aire logra entrar en los vasos, la velocidad del proceso es dependiente del tamaño de los vasos. Todo esto parece indicar que la relación entre diámetro hidráulico y vulnerabilidad a la cavitación es compleja, con efectos directos e indirectos que en cierto punto se contrarrestan y que parecieran determinar, en conjunto, una falta de compromiso neta entre eficiencia y seguridad conductiva a nivel general. La relación negativa entre estas variables (observada en ambos modelos) sugiere que la resistencia a la cavitación no escala directamente con el diámetro de vasos, sino que dependería, en parte, de la estructura y el tamaño de las punteaduras (Tyree & Sperry 1989). En este sentido, el efecto del tamaño de los elementos conductivos sobre la vulnerabilidad a la cavitación estaría mediado, en parte, por la relación negativa reportada para algunas especies de *Eucalyptus* (aunque no medida en este trabajo) entre el diámetro de los elementos conductivos y el diámetro de las punteaduras (Fernández et al. 2019). En ese trabajo, llevado a cabo por el grupo de investigación en el que se inserta esta tesis, se analizó la relación entre el tamaño de las punteaduras y el de los elementos de conducción en tres especies de *Eucalyptus*, entre las que se encuentran las especies evaluadas en este trabajo (Figura 4.9). De acuerdo con los resultados de esta investigación, los vasos de mayor diámetro presentarían punteaduras de menor tamaño, las cuales le permitirían resistir una mayor tensión y permanecer conductivos durante mayor tiempo. Si bien esto sería contrario a lo establecido por la hipótesis del “poro raro” (*rare pit hypothesis* en inglés), donde a medida que aumenta el tamaño de los elementos conductivos aumenta la probabilidad de existencia de un poro de gran tamaño, estaría en concordancia con lo reportado en otros trabajos donde se analizó el efecto del tamaño de las punteaduras sobre la vulnerabilidad a la cavitación (p.ej. Wheeler et al. 2005, Hacke et al. 2006, Jansen et al. 2009, Scholz et al. 2013).

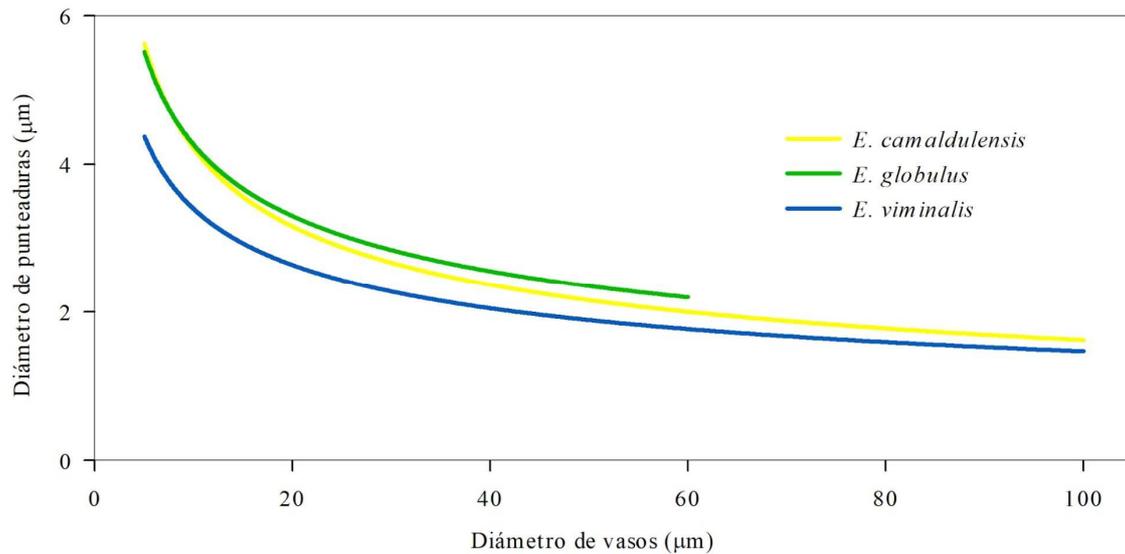


Figura 4.9. Relación entre el diámetro de vasos y el diámetro de las punteaduras medido en tres especies de *Eucalyptus*. Modificado de Fernández et al. 2019.

Por otro lado, la organización compleja de los diversos elementos celulares que rodean cada vaso actuaría como barrera de contención para prevenir la diseminación de los embolismos una vez producidos (Cai et al. 2014). La correlación negativa entre Ha y P_{50} observada en *E. viminalis* confirmarían esta hipótesis. Además, existe una relación entre el grado de agrupamiento de los vasos y la resistencia a la cavitación, siendo las especies con menor nivel de agrupamiento (vasos mayoritariamente solitarios) las más resistentes (Lens et al. 2011, Scholz et al. 2013). Esto sugeriría que el compromiso entre eficiencia conductiva y seguridad no tendría una base evolutiva (respecto a la hipótesis de que los vasos agrupados son menos eficientes, pero más seguros que los vasos solitarios), sino que depende en gran medida de la anatomía de la especie y, dentro de ciertos límites, de la distribución espacial y de las dimensiones de los diferentes tipos de células que componen el xilema. Se han encontrado resultados similares tanto en gimnospermas (Burgess et al. 2006) como en angiospermas (Vander Willigen et al. 2000), que a su vez concuerdan con los resultados del capítulo 3, a través del análisis interespecífico de tres especies de *Eucalyptus*. Por otro lado, a pesar de la falta de correlación entre FPF y la resistencia a la cavitación (P_{50}), se encontró en *E. globulus* un efecto indirecto de la variable anatómica sobre la funcional, a través de DB y la *pendiente* de la curva de VC. Esto también se manifestó en la correlación negativa existente entre P_{88} y densidad de madera. Estos resultados a nivel intraespecífico están en consonancia con la tendencia a nivel interespecífico, que establece un incremento en la resistencia a la cavitación con la densidad (Hacke et al. 2001). Aun así, es interesante señalar que la principal causa potencial de esta relación enunciada por Hacke et al. (2001) –esto es, la necesidad de refuerzo en las paredes celulares de los vasos funcionales (bajo tensión) para evitar el colapso cuando están en contacto con vasos embolizados (o traqueidas, en el caso de especies gimnospermas)– no es aplicable a especies de *Eucalyptus*. En estas especies, y en otras con vasos solitarios, el desbalance de fuerzas a ambos lados de la pared celular no ocurre, debido a la particular disposición de los vasos. Es por ello que, en estas

especies, la relación entre densidad y resistencia a la cavitación debe ser explicada por otras hipótesis, como la propuesta por Jacobsen et al. (2005) acerca del rol de las fibras con gran espesor de pared en la prevención de eventos de cavitación de los vasos adyacentes. Los resultados obtenidos en este capítulo sugieren que la matriz fibrosa podría contribuir al refuerzo mecánico de los vasos durante el transporte de agua en condiciones de alta tensión y/o actuar como barrera al pasaje de aire desde vasos embolizados hacia aquellos que se encuentran conductivos. Esto afectaría la velocidad de desarrollo del evento de cavitación, la cual es cuantificada a través de la *pendiente* de la curva de vulnerabilidad a la cavitación. Esta hipótesis cobra relevancia al considerar la contribución cuantitativa de las paredes de las fibras en la densidad de madera de especies angiospermas en general y no solo en aquellas de vasos solitarios (Jacobsen et al. 2005, Ziemińska et al. 2013). Nuevamente, la falta de relación observada en *E. viminalis* puede deberse a la escasa variabilidad general del material seleccionado para esta especie, lo cual puede haber repercutido en la no existencia de diferencias en vulnerabilidad a la cavitación entre procedencias.

Los valores de P_{50} de *E. globulus* obtenidos en este análisis son más negativos (mayor resistencia a la cavitación) que los reportados en el capítulo anterior (Capítulo 3) al analizar ramas de árboles adultos provenientes de plantaciones no comerciales, así como también a los hallados por Pita et al. (2003) y Fernández et al. (2019) en clones españoles. Estas diferencias pueden deberse, al menos en parte, al hecho de utilizar árboles adultos de un programa de mejoramiento genético, los cuales poseerían características hidráulicas y de densidad de madera diferentes a aquellas presentes en los árboles sin selección del capítulo anterior y de los clones que se cultivan en España (que presentan baja densidad de madera y alta vulnerabilidad a la cavitación; Fernández et al. 2019). Esto sugiere una alta variación genética dentro de la especie, lo cual podría constituir una base suficientemente amplia como para llevar a cabo la selección de genotipos resistentes al estrés hídrico. La alta variabilidad relativa en VC de esta especie –dentro de ciertos límites– también queda evidenciada por las diferencias en VC entre procedencias. En contraposición, los valores obtenidos en *E. viminalis* son del mismo orden que los obtenidos en el Capítulo 3, correspondientes a una plantación no comercial, los cuales son (hasta donde se tiene conocimiento) los primeros valores de vulnerabilidad a la cavitación reportados para esta especie. Lo mismo se observó para las características anatómicas (sobre todo en diámetro, pero también en frecuencia de vasos y área de halo). A su vez, tampoco se observaron diferencias significativas entre procedencias con distinta densidad media. Si bien es necesario aumentar el número de genotipos a explorar, los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que existe una baja variación en VC en los materiales de *E. viminalis* introducidos en nuestro país, lo que se condice con el rango geográfico acotado de las introducciones (Cappa et al. 2010). De todas maneras, si bien el rango de variación fue menor que en *E. globulus*, presentó mayor resistencia a la cavitación. La variación diferencial de estas características dentro de cada especie puede deberse a que el material estudiado (aquellos genotipos introducidos en Argentina y utilizados en los programas de mejoramiento genético de INTA) representa en distinta proporción el grado de variabilidad de cada especie, o a la existencia de diferencias en el

nivel de variabilidad genética dentro de cada especie. Esto podrá ser corroborado con análisis más detallados que relacionen cada material genético con las características ambientales de origen.

Conclusiones

Considerando la primera hipótesis planteada, acerca de la relación existente entre la densidad de madera en fustes (tallo principal) y la resistencia a la cavitación en ramas, esta fue parcialmente validada. Los resultados de este estudio sugieren que la variabilidad intraespecífica en la resistencia a la cavitación en las especies del género *Eucalyptus* puede estar asociada a la densidad de la madera- como en el caso de *E. globulus*- o no – como en el caso de *E. viminalis*. La falta de diferenciación en esta última especie pudo deberse a un menor rango de variación –aunque estadísticamente significativo- en la densidad de la madera, que requeriría ampliar los estudios a procedencias con mayor diferenciación en densidad. En este estudio se trabajó con los extremos de densidad presentes en los ensayos de Mejoramiento Genético en INTA, y es posible que una parte importante de la variación natural de la especie no haya sido estudiada.

En el caso de *E. globulus*, donde sí se encontró cierta asociación entre densidad de madera y VC, es importante resaltar que esta relación no es lineal ni simple, sino que es la resultante de la combinación de las características morfométricas de los elementos que componen la madera y que determinan sus propiedades hidráulicas y mecánicas. En este sentido, las procedencias de *E. globulus* con mayor densidad de madera a nivel de tallo presentaron también mayor densidad a nivel de rama y mayor resistencia a la cavitación por sequía. Por ello, para esta especie, la densidad de madera aparece como una posible variable integradora para el fenotipado de genotipos más resistentes a este tipo de estrés, aunque se requieren estudios complementarios para corroborar estos resultados alentadores. Uno de los factores claves a analizar es la heredabilidad de los caracteres estudiados, incluyendo no solo la densidad sino también variables complementarias, como el diámetro hidráulico, ya que el efecto de la densidad de madera sobre P_{50} es significativo, pero relativamente bajo.

En cuanto a la segunda hipótesis, que establecía la falta de compromiso entre eficiencia y seguridad del sistema conductivo, esta pudo ser correctamente validada. Para cada especie se constató una correlación no significativa entre Dh y P_{50} , y el modelo desarrollado mediante análisis de senderos sugirió la inexistencia de este compromiso a nivel intraespecífico, siendo la vulnerabilidad a la cavitación el resultado de la combinación de efectos positivos y negativos que ejerce el tamaño de vasos en esta variable funcional. Por otro lado, no se encontraron diferencias en la distribución de tamaño de vasos entre procedencias de alta y baja densidad. Así, la falta de compromiso, o incluso la tendencia inversa, como se observa en las correlaciones negativas entre Dh y P_{12} en ambas especies, están de acuerdo con lo observado a nivel interespecífico (Capítulo 3), lo que parece ser el reflejo de la constitución anatómica particular e intrincada de este

género. En este sentido, la relación inversa entre el tamaño de los elementos conductivos y el de las punteaduras en especies de *Eucalyptus*, recientemente reportado por Fernández et al. (2019) sería clave para explicar la falta de compromiso existente entre eficiencia conductiva y seguridad hidráulica, a nivel intra e interespecífico, dentro de este género.



*Capítulo 5: Relaciones entre anatomía y vulnerabilidad a la cavitación por frío en eucaliptos de clima templado*⁸

Introducción

El agua se mueve dentro del árbol, desde las raíces hacia las hojas, a través del xilema de acuerdo con la teoría de Cohesión-Tensión (Dixon & Joly 1894) debido a una fuerte atracción intermolecular. Este es un proceso pasivo que no requiere de gasto energético por parte de la planta y que permite transportar grandes cantidades de agua de manera eficiente. Sin embargo, este mecanismo provoca que el agua contenida dentro del xilema se encuentre bajo tensión (Hacke & Sperry 2001). Esta tensión aumenta a medida que disminuye la disponibilidad de agua en el suelo y a medida que aumenta la tasa de transpiración (Lintunen et al. 2013). Bajo estas condiciones, el transporte de agua resulta potencialmente vulnerable a la cavitación. En este sentido, existen dos tipos de estrés que pueden llevar a la cavitación del xilema: un aumento de la tensión en el xilema asociada al estrés hídrico causado por sequía (caso particular que fue motivo de análisis en los capítulos precedentes) y los eventos de congelamiento y descongelamiento inducidos por bajas temperaturas (Sperry et al. 1994).

El mecanismo que subyace al proceso de cavitación inducido por frío difiere de aquel producido por sequía. A temperaturas menores a 0 °C el agua líquida es propensa a congelarse ya que la presión de vapor sobre el hielo es menor que sobre el agua líquida (Lintunen et al. 2013; Figura 5.1). En estas condiciones, el agua dentro del xilema se encuentra en un estado termodinámico metaestable en dos direcciones: está simultáneamente súper-enfriada (la temperatura del agua líquida está por debajo de la temperatura de nucleación del hielo de equilibrio) y bajo tensión (la presión del agua líquida está por debajo de la presión de vapor de saturación) (Lintunen et al. 2013). El agua puede permanecer en este estado metaestable mientras no haya impurezas sólidas o fases gaseosas (burbujas o meniscos) suficientemente grandes como para actuar de nucleadores y catalizar la formación de una nueva fase (nucleación heterogénea). En el caso del agua pura, las moléculas de agua se transforman espontáneamente en nucleadores (nucleación homogénea; Pearce 2001) aproximadamente a -40 °C (Debenedetti, 1996). Sin embargo, el agua dentro del xilema normalmente contiene cantidades variables de solutos, lo cual hace que la temperatura de congelamiento baje entre 1 y 2 °C respecto a la temperatura de equilibrio (Levitt 1980, Franks 1985, Pearce 2001). Es por ello que, en

⁸ Agradezco particularmente al “grupo forestal” del Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE), conformado por investigadores formados y becarios doctorales y posdoctorales, con el cual hemos compartido lecturas y discusiones que resultaron muy enriquecedoras durante el transcurso de esta tesis.

condiciones normales, la nucleación dentro del árbol se produce por nucleación heterogénea.

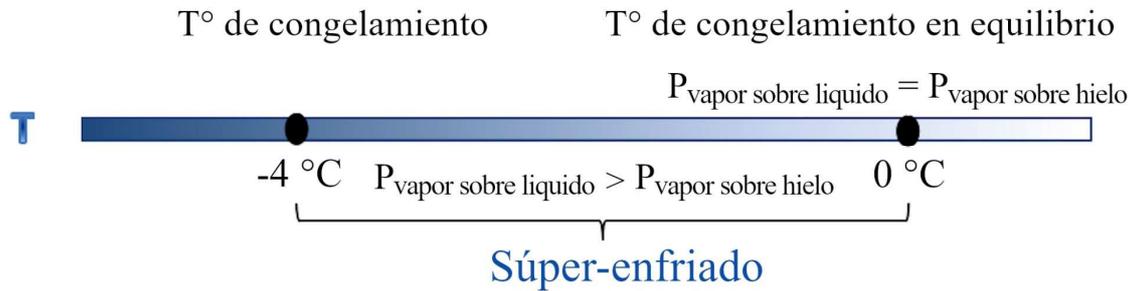


Figura 5.1. Representación esquemática de la terminología utilizada en relación con la nucleación heterogénea de hielo dentro de los vasos (modificado de Lintunen et al. 2013).

Durante la transición del agua desde el estado líquido al estado sólido, los gases disueltos en ella salen de la solución. La menor solubilidad de estos gases (principalmente aire) en el hielo produce la formación de burbujas dentro del sistema vascular que quedan atrapadas en el hielo (Sperry et al. 1994). Una vez que el hielo se derrite, esas burbujas pueden disolverse nuevamente en la solución xilemática o pueden expandirse hasta llenar el volumen correspondiente al conducto vascular, produciéndose la cavitación, lo cual resulta en un bloqueo del transporte de agua. El riesgo de formación de embolismos dependerá de la estabilidad de estas burbujas cuando se liberan en la fase líquida al descongelarse (Sperry & Sullivan, 1992). Esta estabilidad dependerá del equilibrio de fuerzas ejercidas sobre el menisco aire-agua que actúan para comprimir o expandir la burbuja (Pockman & Sperry 1997). De acuerdo con la ecuación de Young-Laplace, este equilibrio se expresa a través de la presión interna de la burbuja (P_b), la cual está en función de su radio de curvatura (r), la tensión superficial de la savia (γ), y la presión de la savia dentro del xilema (P_x), según la siguiente ecuación:

$$P_b = 2(\gamma/r) + P_x$$

Ya que la tensión superficial es un valor relativamente constante, el equilibrio de fuerzas estará determinado básicamente por el radio de curvatura y la presión dentro del xilema. Estos dos componentes son altamente variables (Choat et al. 2011). La magnitud de P_x dependerá en parte de la tasa de transpiración y del potencial hídrico del suelo durante el evento de congelamiento/descongelamiento. Por otro lado, r dependerá (al menos en parte) del tamaño del elemento de conducción (Davis et al. 1999). Cuanto más grande es el elemento conductivo, mayor es la cantidad de gas que es forzado a salir de la solución cuando se produce el congelamiento, lo que resulta en burbujas de mayor diámetro que pueden expandirse más fácilmente durante el descongelamiento (Feild & Brodribb 2001). Las burbujas pequeñas, o aquellas sujetas a presiones externas grandes y positivas tienden a colapsar o disolverse. En consecuencia, la probabilidad de que una burbuja se expanda y produzca la cavitación del elemento conductivo se incrementa con el aumento del radio de curvatura de la burbuja y la tensión dentro del xilema (Choat et al. 2011).

De manera complementaria al mecanismo anterior (por el cual el diámetro de los elementos conductivos determina el tamaño de las burbujas formadas y, en consecuencia, la probabilidad de ocurrencia de eventos de cavitación) se ha propuesto que el tamaño de los vasos también estaría relacionado con la temperatura de nucleación del hielo dentro de los mismos (Lintunen et al. 2013). Estos autores encontraron que la temperatura de nucleación de hielo en el xilema aumenta a medida que lo hace el diámetro de los conductos, sin importar la especie o la parte del árbol, e hipotetizan que la relación entre la temperatura de nucleación y el radio del conducto puede ser explicada sobre la base de la teoría clásica de nucleación y la relación directa entre el radio del conducto, de los poros de las puntuaciones y de los nucleadores. El tamaño de un determinado nucleador estará determinado por los poros de las puntuaduras intervasculares que actúan como filtros restringiendo el tamaño de las partículas que pueden entrar en un conducto (Figura 5.2). Luego, existen dos hipótesis que relacionan el tamaño de poros y el tamaño de los conductos: la hipótesis de la “resistencia del poro”, de acuerdo con la cual el tamaño del conducto debe escalar aproximadamente con el tamaño de los poros (la conductancia de la puntuadura debe escalar con la conductancia del lumen) si el uso del carbono disponible es eficiente (Hölttä et al. 2011), y la hipótesis del “poro raro”, de aumento casi lineal entre el tamaño máximo de los poros, el área total de puntuaduras y las dimensiones de los conductos (Wheeler et al. 2005). Es por ello por lo que concluyen que la temperatura a la cual se producirá la nucleación del hielo en los elementos de conducción estará relacionada directamente con su tamaño, debido a que el tamaño de las partículas más grandes que son capaces de penetrar a través de los poros de la membrana de las puntuaduras determinará la temperatura de nucleación en el xilema. Sin embargo, estos modelos no representarían lo que ocurre en *Eucalyptus*, donde se ha encontrado una relación inversa entre el tamaño de los elementos conductivos y el diámetro de las puntuaduras (Fernández et al. 2019). La relación entre el tamaño de las puntuaduras y el de los poros en la membrana de las mismas no ha sido estudiada, si bien un estudio (Pfautsch et al. 2018) en *E. grandis* muestra que los vasos más pequeños de las ramas poseen membranas más delgadas en sus puntuaciones (potencialmente para compensar la alta resistencia al flujo) que los vasos más grandes del fuste en esta especie. Estos antecedentes sugieren que, en *Eucalyptus*, los vasos grandes son menos susceptibles al pasaje de aire a través de sus membranas -y, por ende, de partículas grandes- que los más pequeños, contrariamente a lo descrito para la mayoría de las especies.

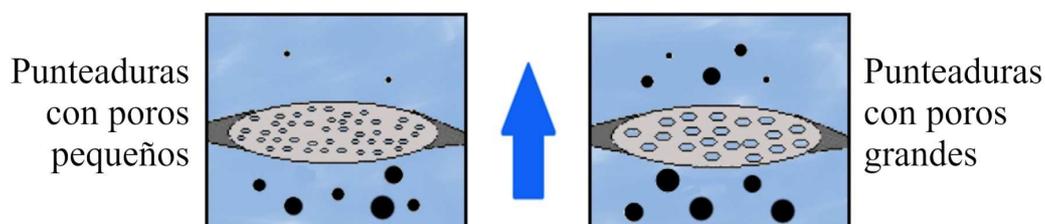


Figura 5.2. Representación esquemática de las puntuaduras intervasculares entre dos conductos llenos de agua. En el cuadro de la izquierda se observa una representación de la membrana de la puntuadura con poros pequeños, donde hay una gran restricción al pasaje de partículas. En el cuadro de la derecha se observan poros grandes, con una restricción relativamente baja. Modificado de Lintunen et al. 2013.

La susceptibilidad a la cavitación por congelamiento proporciona un vínculo hipotético entre la estructura del xilema, la fenología, la distribución geográfica de las plantas, la capacidad de intercambio de gases y, consecuentemente, el crecimiento y supervivencia en un ambiente dado (Cavender-Bares & Holbrook 2001). A pesar de que los elementos conductivos más pequeños tendrían menor probabilidad de sufrir embolismos inducidos por congelamiento, estos pueden afectar negativamente el intercambio de carbono y agua de las plantas, una vez que las condiciones resultan favorables para la fotosíntesis y el crecimiento. Una pequeña reducción en el diámetro de los conductos produce una disminución considerable de la conductividad, debido a que, como lo establece la ley de Hagen-Poiseuille, la conductividad es proporcional al radio de los vasos a la cuarta potencia (Choat et al. 2011). Además, como se mencionó anteriormente, las conductividades del lumen y de los poros de las punteaduras, a nivel general, también están relacionadas, por lo que al reducir el tamaño de vasos se aumenta la resistencia al pasaje de agua a través de los poros (Hölttä et al. 2011). De esta forma, *a priori*, surge un compromiso entre eficiencia conductiva –crecimiento– y seguridad hidráulica frente a los eventos de cavitación por congelamiento/descongelamiento (Sperry & Sullivan 1992). Sin embargo, en el caso particular de *Eucalyptus*, de acuerdo con los antecedentes citados previamente (Pfaustch et al. 2018; Fernández et al. 2019), este compromiso sería únicamente consecuencia del efecto del tamaño de vasos, el cual afecta el nivel de conductividad y la curvatura de la burbuja, y no por efecto de las puntuaciones. Por otro lado, la temperatura de nucleación del hielo en los elementos conductivos del xilema determinará, en primer lugar, el período de tiempo que durará el congelamiento y, en segundo término, el número de ciclos de congelamiento/ descongelamiento que un árbol experimentará durante la temporada. Un período corto y pocos ciclos tienen un efecto positivo en el funcionamiento y supervivencia del árbol debido a que, mientras el agua dentro del xilema no esté congelada, no hay riesgo de daños por frío, el cual aumenta a medida que la planta está sujeta a mayor cantidad de ciclos. Además, una temperatura de nucleación baja hace posible que una especie siempreverde fotosintetice en días soleados incluso cuando la temperatura es menor a 0 °C (Lintunen et al. 2013).

La vulnerabilidad del xilema al estrés por congelamiento puede variar considerablemente entre especies (Lemoine et al. 1999). El hecho de que los embolismos puedan representar una amenaza significativa para la supervivencia y el crecimiento de los árboles significa que la forma en que un árbol enfrenta el problema en un hábitat determinado puede determinar su éxito competitivo y, en última instancia, su rango ecológico (Sperry & Sullivan 1992). En este sentido, la tolerancia al estrés por frío resulta un factor importante en la ecofisiología de los árboles (Sperry et al. 1988) y determinante de la distribución de plantas en muchos hábitats (Pockman & Sperry 1997) ya que los embolismos causados por ciclos de congelamiento/descongelamiento son, probablemente, la principal causa de disfunción del xilema en especies arbóreas de clima templado (Lemoine et al. 1999). Este estrés es especialmente problemático si se produce congelamiento durante la temporada de crecimiento, cuando la planta está fisiológicamente activa (Davis et al. 1999), o en el caso de especies leñosas siempreverdes. En estas últimas, el mantenimiento de la actividad fotosintética durante todo el año puede llegar a contribuir significativamente al

crecimiento anual, ayudando al sostenimiento del crecimiento radical y contribuyendo con el crecimiento en el comienzo de la primavera, cuando los recursos del suelo son relativamente abundantes (Choat et al. 2011).

La resistencia al frío se puede definir como la capacidad de una planta para sobrevivir a los efectos que produce el frío, ya sea por ausencia de daño o por recuperación luego de sufridos los daños (FAO, 1981). Frente al frío, las especies arbóreas presentan un conjunto de mecanismos que pueden sintetizarse en tres estrategias (Sperry et al. 1994):

1. Evitación, en la cual no ocurre cavitación;
2. Reversión, donde los vasos embolizados se rellenan con agua antes del comienzo de la temporada de crecimiento; y
3. Tolerancia, donde la cavitación ocurre, pero no influencia significativamente el crecimiento en la temporada de crecimiento subsiguiente.

Las coníferas, las plantas perennes más representativas de la zona templada, evitan la cavitación por congelamiento debido que poseen elementos conductivos (traqueidas) de muy pequeño volumen (Pockman & Sperry 1997). De esta manera disminuyen la cantidad de agua y, por lo tanto, de aire disponible para formar burbujas, así como también la temperatura de nucleación. Por otro lado, las especies angiospermas presentan elementos conductivos de tamaño considerable, por lo que muchas de ellas cavitan extensamente durante las heladas. Estas plantas tienden a ser deciduas en invierno y restablecen el transporte después de la época invernal. En el caso de la reversión, esto se logra mediante la recarga de los vasos cavitados a través del aumento de la presión dentro de los vasos (P_x) (Davis et al. 1999), y ha sido observada en muchas especies de porosidad difusa (Sperry & Sullivan 1992). En este sentido, la presión radical es el mecanismo más ampliamente propuesto para la generación de un gradiente de presión positiva capaz de producir la recarga estacional de los vasos cavitados y restituir la conductividad (Sperry et al. 1994, Davis et al. 1999). Sin embargo, este mecanismo, que requiere de la inversión de metabolitos, solo sería de importancia para especies herbáceas o especies leñosas de pequeño tamaño (Cochard et al. 1994, Ewers et al. 1997). Otro de los mecanismos propuestos involucra la recarga activa de los vasos embolizados, a través de la intervención de las células de parénquima que rodean los vasos. De acuerdo con este modelo, las células de parénquima serían las encargadas de liberar grandes cantidades de azúcares dentro de los vasos, lo cual aumentaría la presión osmótica dentro de los mismos y produciría la subsecuente reparación del embolismo (Decourteix et al. 2006). En el caso de la estrategia tolerante, la planta recupera su capacidad conductiva mediante la producción de nuevos conductos (Davis et al. 1999), siendo esta una estrategia propia de especies de porosidad circular (Sperry & Sullivan 1992). Estudios comparativos (Davis et al. 1999) han demostrado que las especies coníferas siempreverdes son más resistentes que las especies caducifolias al proceso de cavitación por congelamiento/descongelamiento, mientras que las especies de porosidad difusa son más resistentes que las de porosidad circular. Estos autores atribuyeron la resistencia diferencial, observada en las especies evaluadas, al efecto del tamaño de vasos. Además de los mecanismos

previamente mencionados, estos autores también señalan que existen otros como la regulación temporal de la fenología vegetativa (hojas) y el control de la pérdida de agua a través de sus superficies (Davis et al. 1999). A su vez, las plantas que crecen en ciertos climas están expuestas tanto a estrés por frío como por sequía (Lo Gullo & Salleo 1993). La disminución en el potencial (aumento de la tensión) causado por la sequía (transitoria o crónica) aumenta la probabilidad de que se produzcan eventos de cavitación (Pockman & Sperry 1997). Por lo tanto, la potencialidad de experimentar pérdidas hidráulicas catastróficas puede aumentar si existen períodos inusualmente secos durante el invierno (Choat et al. 2011). En un escenario futuro de clima cambiante, con predicciones que auguran una mayor variación en los patrones de precipitación regionales, las plantas se encontrarán frente a nuevas condiciones medioambientales (Choat et al. 2011, Lintunen et al. 2013). Es por ello que la pregunta acerca de si la adaptación de las plantas a la sequía y las heladas implica o no a las mismas estructuras xilemáticas, parece ser de importancia tanto ecológica como evolutiva y productiva (Lo Gullo & Salleo 1993).

El género *Eucalyptus* está compuesto por especies de hoja perenne con una anatomía de madera particularmente compleja, caracterizada principalmente por poseer vasos solitarios rodeados de traqueidas vasicéntricas y parénquima axial, y porosidad difusa. Dentro de este género existe una gran variabilidad en la susceptibilidad al daño por frío (Almeida et al. 1994). En este sentido, Menzies et al. (1981) señalan que algunas especies de este género logran sobrevivir a temperaturas mínimas absolutas de $-9,5^{\circ}\text{C}$, aunque hay una gran variación de acuerdo con las procedencias, siendo más resistentes aquellas fuentes de semillas de mayor altitud y hacia el interior del continente. Por otro lado, la introducción de eucaliptos tropicales y subtropicales de gran potencial de crecimiento en zonas templadas, con ocurrencia de heladas considerables, en algunos casos ha resultado en una mala adaptación, con pérdidas cuantiosas (Arnold et al. 2015).

Objetivos

Teniendo en cuenta la importancia forestal de este género en el mundo, y particularmente en la Argentina, es que se plantean los siguientes objetivos de trabajo:

- Cuantificar y comparar la resistencia a la cavitación por frío en tres especies de *Eucalyptus* extensamente implantadas en la región pampeana: *E. globulus*, *E. viminalis* y *E. camaldulensis*.
- Relacionar las posibles diferencias entre especies con las características anatómicas de su madera.

Hipótesis

En base a los objetivos planteados y de acuerdo con los antecedentes previamente mencionados y las características de las especies de *Eucalyptus* seleccionadas, es que planteamos las siguientes hipótesis de trabajo:

a) Las especies de *Eucalyptus* analizadas se ubican en una situación intermedia en cuanto a su resistencia a la cavitación por frío, entre las especies gimnospermas y las especies angiospermas de hoja caduca y porosidad circular. El hecho de ser especies angiospermas siempreverdes de porosidad difusa con vasos solitarios de tamaño intermedio, estaría indicando que estas especies presentan una resistencia a los eventos de congelamiento/descongelamiento relativamente alta.

b) Dentro de las especies seleccionadas para este trabajo existen diferencias interespecíficas en la resistencia a la cavitación del xilema por eventos de congelamiento/descongelamiento. Se espera que el xilema de las especies que presenten menor tamaño de vasos sea más resistente a la cavitación por frío. De acuerdo con los resultados de anatomía del xilema presentados en los capítulos anteriores, la especie más resistente sería *E. globulus*, mientras que *E. viminalis* y *E. camaldulensis* tendrían un nivel de vulnerabilidad mayor y de similar magnitud.

c) En *Eucalyptus*, la distribución de tamaño de vasos es determinante en la resistencia a la cavitación por frío. Las características de la distribución de tamaño de vasos, en tanto a su amplitud y forma, afectarían el desarrollo del proceso de congelamiento. Así, se puede predecir que aquellas distribuciones de vasos más estrechas y sesgadas hacia tamaños de vasos menores, como la observada en capítulos anteriores para *E. globulus*, comenzarán a congelarse más tarde y el proceso durará menos tiempo. Al contrario, aquellas distribuciones más amplias y con mayor frecuencia de vasos de mayor tamaño iniciarán el proceso de congelamiento con anterioridad y éste durará más tiempo.

d) La resistencia a los eventos de congelamiento/descongelamiento a nivel de rama no determina necesariamente la resistencia al frío a nivel de individuo en condiciones de campo. En base a los antecedentes expuestos, se esperaría que *E. globulus*, la especie con menor diámetro de vasos, fuera la especie más resistente al frío. Sin embargo, a nivel de campo ocurre todo lo contrario, siendo la más susceptible de las tres especies utilizadas para este trabajo. Esto indicaría que la respuesta de una especie frente al estrés por frío será resultado de la interacción entre los diferentes órganos involucrados en la estrategia del árbol para hacer frente al ambiente.

e) Luego de cavitar, cuando las condiciones son favorables, los vasos de estas especies pueden recuperar la capacidad de conducción y restablecer el flujo hacia las hojas. El hecho de poseer porosidad difusa y hábito siempreverde permite hipotetizar que, en caso de producirse una interrupción en la conducción de agua, las especies de este género cuentan con mecanismos que les permiten restablecer el funcionamiento de su sistema conductivo.

Materiales y métodos

Sitio y material vegetal

Este estudio se llevó a cabo utilizando material vegetal proveniente de 41 ejemplares adultos (15 a 25 metros de altura) de *E. camaldulensis* (n = 13), *E. viminalis* (n = 12) y *E. globulus* (n = 16) creciendo en condiciones de jardín común (Tandil, provincia de Buenos Aires, Argentina, 37° 20' S, 59° 08' O, 188 msnm) como parte de plantaciones no comerciales. El clima de esta región se define, de acuerdo con la clasificación climática de Köppen, como Templado oceánico (*Cfb*). A su vez, el clima de Tandil es clasificado por Díaz & Mormeneo (2002), en base a variables climáticas de temperatura y precipitación, dentro de la división climática Frío húmeda. La precipitación media aproximada es de 847 mm, la temperatura media anual ronda los 13,4 °C y la frecuencia anual de días con heladas fluctúa entre 30 y 60⁹.

Recolección y procesamiento de las muestras

La toma de muestras se realizó durante el mes de septiembre de 2016, por la mañana y durante un periodo con alta disponibilidad de agua en el suelo, con el objetivo de minimizar el estrés hídrico. Se colectaron ramas de la porción basal de la copa (entre 1,5 y 3 metros sobre el nivel del suelo) y en todos los casos se tuvo en cuenta que las mismas fueran de dimensiones similares (entre 3 y 6 mm de diámetro y mayores a 100 cm de largo). Una vez obtenidas las ramas, estas se volvieron a cortar bajo el agua y se almacenaron en bolsas de polietileno negro, envueltas en trozos de tela húmedos para evitar su deshidratación. En el laboratorio, las ramas fueron nuevamente recortadas /bajo el agua hasta alcanzar su dimensión final (aprox. 30 cm) y se almacenaron en agua destilada con un 1% de hipoclorito de sodio a 4 °C (Jinagool et al. 2015) para evitar el desarrollo de actividad microbiana durante el almacenaje (no más de dos semanas).

Determinación de conductividad hidráulica específica máxima (k_s max)

Para la determinación de la k_s max se tomó como referencia el protocolo establecido para la elaboración de las curvas de vulnerabilidad a la cavitación por sequía (Capítulos 3 y 4: Materiales y métodos - Elaboración de las curvas de vulnerabilidad a la cavitación). En este sentido, se trabajó solo con los pasos 1 y 2 del protocolo, aunque en este último paso se llevó a cabo una adaptación del método de medición de la conductividad máxima:

- 1) Perfusión durante 10 minutos a 1 bar de presión;
- 2) Medición de k_s máxima (k_s max) por el método a partir del cual se pone un reservorio de agua a una altura determinada por encima de la muestra (en este caso, 70 cm,

⁹ <https://es.climate-data.org/location/1922/>

equivalente a una presión de 0,007 MPa). El reservorio se conecta a la rama mediante mangueras y llaves de paso, y se deja el agua pasar por la misma por intervalos de tiempo fijos. El agua que pasa por la muestra se recoge en un tubo Eppendorf previamente pesado, y el volumen recogido, por diferencia de pesadas, es utilizado para el cálculo de la conductividad. Este método permitió medir de manera simultánea 9 muestras al mismo tiempo a partir de un conductímetro casero multicanal (Fernández & Gyenge 2010).

Medición de vulnerabilidad a la cavitación por frío

Una vez medida la conductividad máxima, las ramas se colocaron dentro de una batea cubiertas de agua. Debido a las características del sistema utilizado (perfusión y medición de ks_{max}), en cada ciclo de congelamiento/descongelamiento se trabajó, a lo sumo, con 9 segmentos de rama y se llevaron a cabo 6 ciclos en total, dos por cada especie. De las 9 ramas utilizadas en cada ciclo de congelamiento, a 6 de ellas se le colocaron termocuplas de cobre/constantan (tipo T) ubicadas entre la corteza y la parte externa del xilema por medio de una aguja hipodérmica, las cuales se conectaron a un colector de datos CR10X (Campbell Scientific Inc., Logan, EE. UU.). Además, por cada termocupla insertada en la rama, se utilizó una termocupla de referencia midiendo la temperatura del aire. Una vez listas las muestras, se colocaron dentro de una bolsa de polietileno, y se ubicaron dentro de un freezer que fue programado para llegar a -15 °C. Para cada ciclo, la tasa de descenso de temperatura del aire circundante a las muestras fue monitoreada a través de todo el experimento, a intervalos de 1 minuto, mediante un termómetro digital incluido en el freezer. Las diferencias de temperatura registradas entre los pares de termocuplas (de la rama y de referencia) fue medida a intervalos de 5 segundos y se promediaron esas diferencias en intervalos de 1 minuto.

Cuando se llegó a la temperatura objetivo, las ramas se mantuvieron a esta temperatura durante 30 minutos, luego de lo cual se retiraron, se envolvieron en paños húmedos para evitar el desecamiento, y se dejaron descongelar naturalmente a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) durante 2 horas. Posteriormente se procedió a reconectarlas con el sistema previamente utilizado para medir ks_{max} y se dejó correr agua durante 30 minutos. Concluido ese período de tiempo (T1) se midió conductividad (ks_1). Se dejaron las ramas conectadas al sistema y se repitió la medición entre 18 y 21 horas luego del término del período de congelamiento (T2; ks_2). El porcentaje de pérdida de conductividad hidráulica (PPC) se calculó en ambas instancias de la siguiente manera:

$$PPC_i = (ks_{max} - ks_i) / ks_{max}$$

donde ks_i es la conductividad hidráulica específica medida en el tiempo i (T1 o T2) luego del congelamiento de las ramas.

Variables anatómicas analizadas

Una vez medida la vulnerabilidad a la cavitación por frío, bajo las condiciones consideradas (1 solo ciclo de congelamiento-descongelamiento por rama, temperatura mínima de -15 °C para asegurar la formación de hielo dentro del xilema), las ramas fueron acondicionadas adecuadamente a fin de obtener los cortes histológicos para las mediciones anatómicas. Se obtuvieron preparados de la totalidad de la sección transversal (20-25 µm de espesor) mediante el uso de un micrótopo de deslizamiento. A los cortes histológicos obtenidos no se les aplicó tinción y fueron montados en forma transitoria en agua. Las imágenes de la sección transversal y de macerados fueron capturadas con una cámara digital (Infinity1-2CB, Lumenera Corporation, Ottawa, Canadá) montada a un microscopio óptico de investigación (CX31, Olympus, Tokio, Japón) usando el objetivo de 4X (20-25 imágenes para tomar el total del segmento de rama) y de 20X (20 imágenes para tomar dos radios completos de médula a corteza por rama). Estas imágenes luego fueron procesadas a través de un software específico para el análisis de imágenes (ImagePro Plus 6.0, Media Cybernetics, Carlsbad, EE. UU.). Las siguientes variables se midieron en sección transversal: diámetro de vasos (DV , µm), área de vasos (AV , µm²), frecuencia de vasos (FV , mm⁻²), fracción de lúmenes (F , adimensional), área del halo (Ha , µm²; variable definida en el Capítulo 3), y número de radios por milímetro lineal (Rmm , mm⁻¹).

La densidad básica de la madera (DB , g cm⁻³) a nivel de rama se calculó como el cociente entre el peso de la muestra seca al horno (peso anhidro) y el volumen totalmente saturado (o volumen verde).

El diámetro hidráulico de los vasos (Dh , µm) fue estimado a partir del diámetro individual de vasos mediante la siguiente ecuación:

$$Dh = \frac{\sum DV^5}{\sum DV^4}$$

Por otro lado, se utilizó la función de densidad de probabilidad de la distribución de Weibull (PDFV) para ajustar el porcentaje de vasos en cada clase diamétrica:

$$\text{PDFV}(x;b,c) = \frac{c}{b} \left(\frac{x}{b}\right)^{(c-1)} \exp\left[-\left(\frac{x}{b}\right)^c\right]$$

donde: b y c son parámetros y x es la categoría diamétrica. Los parámetros b y c describen, respectivamente, la amplitud y la forma (más o menos simétrica) de la distribución de vasos.

Análisis estadístico

La existencia de diferencias estadísticamente significativas entre especies ($\alpha = 5\%$) para las variables anatómicas, hidráulicas y densidad de la madera fue evaluada mediante un

análisis de la varianza (ANOVA), seguido por la prueba de comparaciones múltiples LSD de Fisher. Para establecer diferencias en la distribución de tamaño de vasos se utilizó la metodología de tablas de contingencia. Las relaciones entre pares de variables a nivel de especie fueron analizadas con el test de correlación de Pearson. Estos análisis se llevaron a cabo con el software estadístico InfoStat (versión 2015 - Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

Resultados

Tasa de descenso de temperatura

Las tasas de descenso de temperatura utilizadas en cada ciclo se encuentran graficadas en la Figura 5.3. Allí se observa que las condiciones tanto al inicio como durante el transcurso del proceso de congelamiento fueron similares. El diferencial de temperatura, entre el comienzo y el fin del congelamiento, se situó entre 26,5 y 29,8 °C, y las tasas de descenso variaron entre 5,47 y 6,22 °C/h. Esta variable fue computada debido a que se ha descrito que esta tasa puede influir en los patrones de cavitación observados, por lo que se reporta a los fines de futuras comparaciones con otros estudios (no hay antecedentes para estas especies). En todos los ciclos se alcanzó la temperatura objetivo (-15 °C).

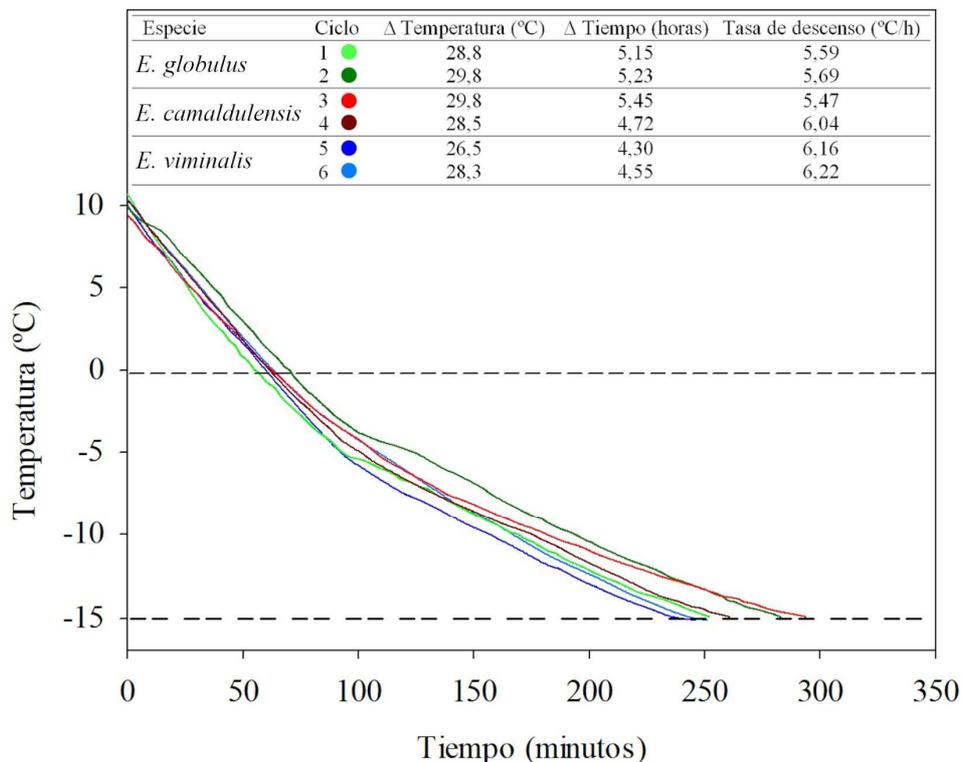


Figura 5.3. Tasa de disminución de temperatura utilizada en los seis ciclos de congelamiento llevados a cabo para la determinación de la vulnerabilidad a la cavitación de tres especies de *Eucalyptus* creciendo bajo condiciones de jardín común en Tandil, Argentina. En la parte superior de la figura puede observarse la diferencia de temperatura y el tiempo empleado para ese descenso, así como la tasa promedio.

Exotermas

El congelamiento de las ramas se verificó mediante exotermas de congelamiento. Esto se debe a que la nucleación de cristales de hielo disipa calor latente y genera una diferencia de temperaturas entre los pares de termocuplas que queda evidenciada a través de las exotermas de congelamiento, es decir una diferencia entre la temperatura del xilema y la del aire debida a la energía liberada por el congelamiento (Figura 5.4). La duración de la exoterma indica el tiempo requerido para que la rama se congele. A pesar de que gráficamente resulta dificultoso establecer el momento de inicio y finalización de la exoterma, a través del análisis estadístico de los datos se comprobó que no existen diferencias significativas entre especies para la temperatura de inicio de la exoterma de congelamiento, pero sí se registraron diferencias en la temperatura de finalización de la misma y, por consiguiente, en su duración (Tabla 5.1). En este sentido, *E. globulus* fue la especie en donde el proceso de nucleación de hielo presentó la menor duración, concluyendo a una temperatura más alta. Por el contrario, *E. viminalis* fue la especie de mayor duración de su exoterma de congelamiento, terminando de congelarse a una temperatura menor. *E. camaldulensis* se ubicó en una situación intermedia entre las dos anteriores.

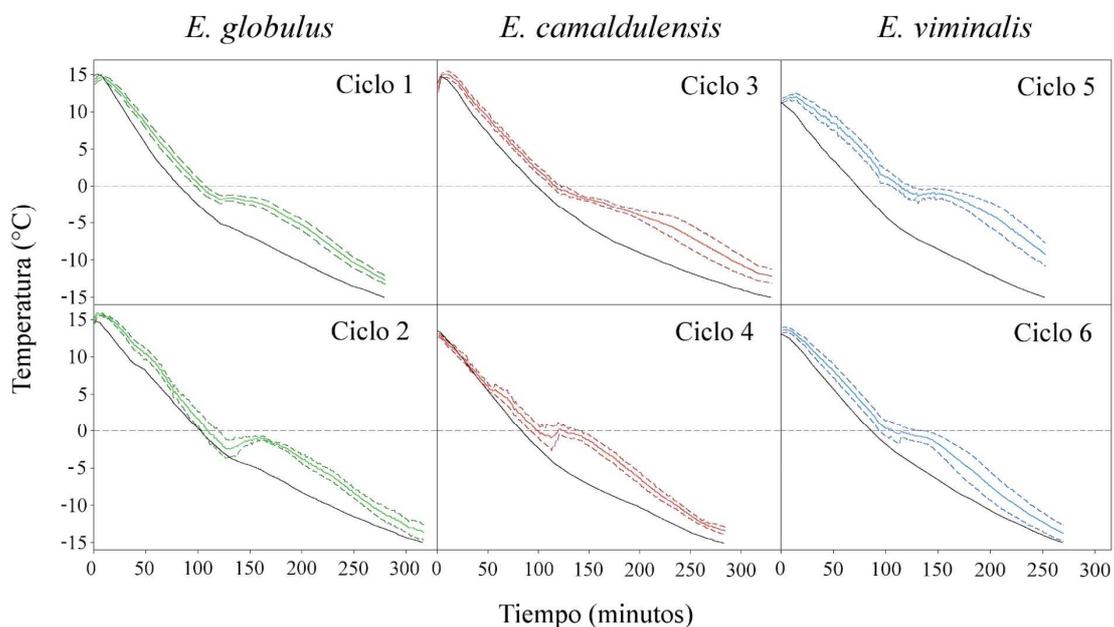


Figura 5.4. Representación gráfica de las exotermas de congelamiento registradas en los seis ciclos de congelamiento llevados a cabo para la determinación de la vulnerabilidad a la cavitación de tres especies de *Eucalyptus* creciendo bajo condiciones de jardín común en Tandil, Argentina. La línea negra representa la temperatura del freezer, la línea sólida de color la temperatura media de las ramas utilizadas en la determinación y las líneas punteadas de color representan los límites del intervalo de confianza para el 95%.

Tabla 5.1. Media \pm desvío estándar de la temperatura de comienzo y finalización promedio de las exotermas de congelamiento y de la duración media de las mismas, registradas durante la determinación de la vulnerabilidad a la cavitación de tres especies de *Eucalyptus* creciendo bajo condiciones de jardín común en Tandil, Argentina. Letras diferentes indican diferencias significativas entre especies.

Especie	Comienzo exoterma (°C)	Fin exoterma (°C)	Duración (minutos)
<i>E. globulus</i>	-3,70 \pm 0,70 a	-6,86 \pm 1,21 b	44,4 \pm 8,82 a
<i>E. camaldulensis</i>	-2,83 \pm 1,00 a	-8,37 \pm 1,75 ab	68,1 \pm 36,02 ab
<i>E. viminalis</i>	-3,23 \pm 1,47 a	-9,78 \pm 2,54 a	76,0 \pm 24,48 b

Conductividad máxima y porcentaje de pérdida de conductividad (PPC)

Eucalyptus globulus presentó el menor nivel de conductividad, diferenciándose estadísticamente de *E. camaldulensis* y *E. viminalis* (Tabla 5.2). Si bien no se observaron diferencias en el porcentaje de pérdida de conductividad en la primera medición (PPC 1), sí se registraron en la segunda medición (PPC 2). Allí *E. globulus* mostró el menor PPC respecto de la conductividad máxima, no observándose diferencias significativas entre las otras dos especies. Consecuentemente, el nivel de recarga de vasos experimentado entre estos dos momentos (T1 => T2) fue mayor para *E. globulus* (Figura 5.5).

Tabla 5.2. Media \pm desvío estándar de la conductividad hidráulica específica máxima (*ks max*), porcentaje de pérdida de conductividad en el tiempo 1 (PPC 1) y 2 (PPC 2), y nivel de recarga medidos en ramas utilizadas para la determinación de la vulnerabilidad a la cavitación de tres especies de *Eucalyptus* creciendo bajo condiciones de jardín común en Tandil, Argentina. Letras diferentes indican diferencias significativas entre especies.

Especie	<i>ks max</i> (kg m ⁻¹ MPa ⁻¹ s ⁻¹)	PPC 1 (%)	PPC 2 (%)	Recarga (%)
<i>E. globulus</i>	0,40 \pm 0,17 a	52,1 \pm 0,18 a	31,5 \pm 0,19 a	20,6 \pm 0,12 b
<i>E. camaldulensis</i>	0,54 \pm 0,12 b	67,9 \pm 0,07 a	62,7 \pm 0,13 b	5,2 \pm 0,05 a
<i>E. viminalis</i>	0,54 \pm 0,19 b	59,7 \pm 0,18 a	49,4 \pm 0,18 b	10,3 \pm 0,06 a

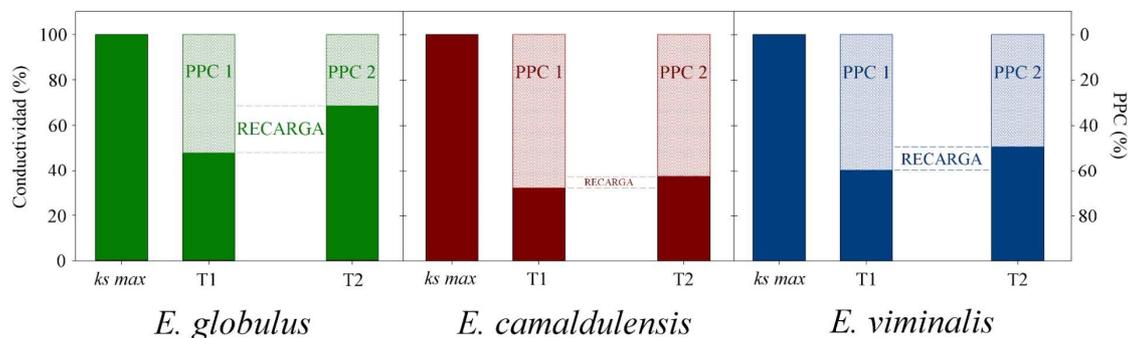


Figura 5.5. Representación gráfica del nivel de pérdida de conductividad y de recarga medido en ramas durante la determinación de la vulnerabilidad a la cavitación de tres especies de *Eucalyptus* creciendo bajo condiciones de jardín común en Tandil, Argentina.

Anatomía

La totalidad de variables anatómicas analizadas presentaron diferencias entre especies, salvo la frecuencia de vasos y la fracción de lúmenes (Tabla 5.3). *Eucalyptus globulus* presentó el menor diámetro y área de vasos, diámetro hidráulico y área de halo mientras que, junto a *E. camaldulensis*, exhibió la menor densidad básica. A su vez, *E. camaldulensis* fue la especie que menor cantidad de radios por milímetro presentó, exhibiendo junto a *E. viminalis* el mayor diámetro y área de vasos, y mayor área de halo, con un diámetro hidráulico intermedio. Esta última variable fue mayor en *E. viminalis*, especie que además mostró la mayor cantidad de radios por milímetro y mayor densidad básica entre las tres especies.

Tabla 5.3. Media \pm desvío estándar de las diferentes variables anatómicas medidas sobre ramas utilizadas durante la determinación de la vulnerabilidad a la cavitación de tres especies de *Eucalyptus* creciendo bajo condiciones de jardín común en Tandil, Argentina. Letras diferentes indican diferencias significativas entre especies.

Variable	<i>E. globulus</i>	<i>E. camaldulensis</i>	<i>E. viminalis</i>
Frecuencia de vasos (<i>FV</i>), mm ⁻²	59,37 \pm 16,81 a	49,26 \pm 11,33 a	49,16 \pm 9,78 a
Diámetro de vasos (<i>DV</i>), μ m	28,89 \pm 2,06 a	31,97 \pm 3,71 b	32,40 \pm 2,51 b
Área de vasos (<i>AV</i>), μ m ²	760,31 \pm 116,77 a	932,25 \pm 214,09 b	960,82 \pm 158,74 b
Diámetro hidráulico (<i>Dh</i>), μ m	41,12 \pm 3,86 a	43,85 \pm 5,46 ab	45,19 \pm 4,73 b
Fracción de lúmenes (<i>F</i>), adim.	44581 \pm 11756 a	44943 \pm 11811 a	47004 \pm 11417 a
Área de halo (<i>Ha</i>), μ m ²	2849,73 \pm 344,99 a	3410,08 \pm 560,38 b	3472,16 \pm 384,94 b
Radios por mm lineal (<i>Rmm</i>), mm ⁻¹	23,30 \pm 1,91 ab	22,48 \pm 1,92 a	24,38 \pm 2,86 b
Densidad básica (<i>DB</i>), g cm ⁻³	0,60 \pm 0,04 a	0,60 \pm 0,03 a	0,64 \pm 0,02 b

Distribución de vasos

Al analizar la distribución de tamaño de vasos en intervalos diamétricos definidos (Figura 5.6) se observa que existen diferencias entre especies. En este sentido, *E. globulus* se diferenció de las otras dos especies, presentando una mayor cantidad relativa de vasos de menor tamaño ($< 35 \mu$ m). Por otro lado, y en coincidencia con el mayor tamaño medio de las variables relacionadas con las dimensiones de los vasos, *E. viminalis* y *E. camaldulensis* presentaron mayor proporción de éstos en las categorías superiores ($> 35 \mu$ m). A pesar de ello, la categoría de 20 a 35 μ m fue la que presentó mayor cantidad de vasos en las tres especies. Sin embargo, y a pesar de las diferencias observadas tanto en la distribución como en el tamaño medio de vasos, el análisis de tablas de contingencia no mostró diferencias significativas en la distribución de vasos de las especies ($\chi^2 = 7,23$, $p = 0,51$). Además, el análisis de los parámetros de la distribución de Weibull utilizada para ajustar los datos indica que, si bien la amplitud de la distribución (parámetro *b*) es menor en el caso de *E. globulus*, la forma de las curvas (parámetro *c*) es similar en las tres especies.

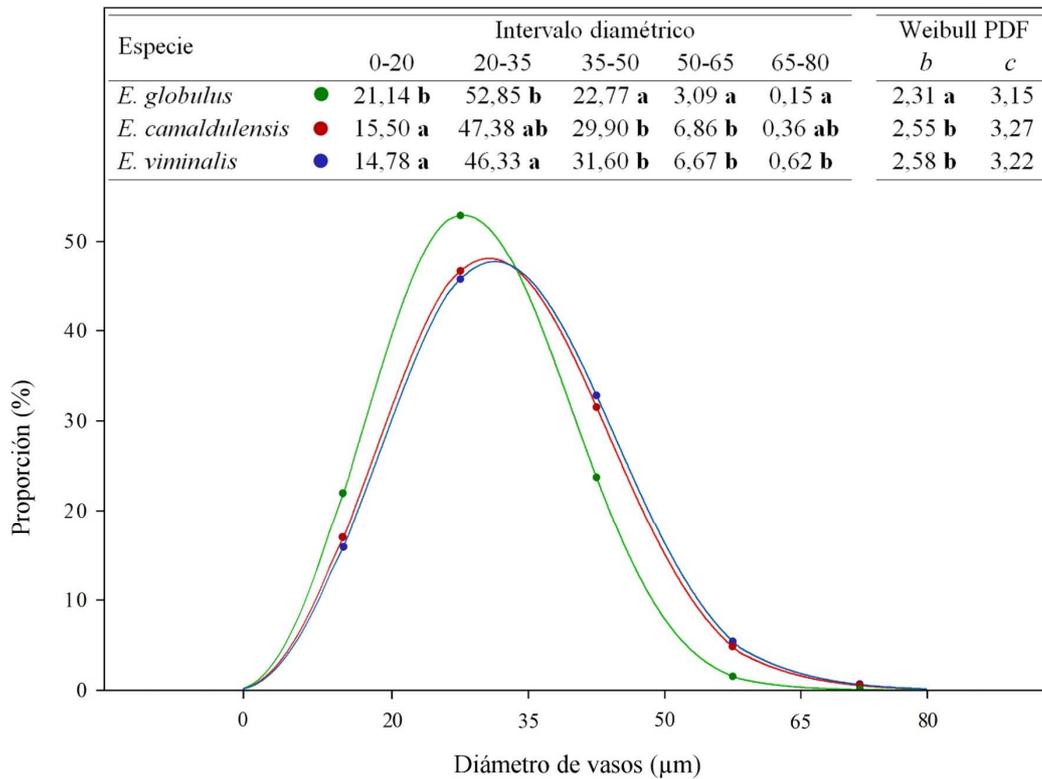


Figura 5.6. Modelización de la distribución de tamaño de vasos ajustada a través del modelo de Weibull en base a la distribución de tamaños observados en ramas utilizadas en la determinación de la vulnerabilidad a la cavitación de tres especies de *Eucalyptus* creciendo bajo condiciones de jardín común en Tandil, Argentina. Los puntos en las curvas indican la proporción de vasos promedio para cada especie en el punto medio de la categoría diamétrica. Las letras diferentes en la tabla superior indican diferencias significativas entre especies.

Relaciones entre variables

A pesar de no haberse registrado diferencias en la temperatura de inicio de la exoterma de congelamiento, que estuvo en torno a los $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ en las tres especies, se observó una relación negativa y marginalmente significativa ($r = -0,36$, $p = 0,065$) entre esta temperatura y la proporción de vasos menores a $20\text{ }\mu\text{m}$. En este sentido, el parámetro de forma de la distribución de Weibull (c) se relacionó a esta temperatura en similar magnitud, aunque diferente signo ($r = 0,37$, $p = 0,056$).

La temperatura de inicio de nucleación también se correlacionó de manera significativa y negativa ($r = -0,41$, $p = 0,032$) con la cantidad de radios por milímetro lineal. Por otro lado, la duración de la exoterma se relacionó de manera significativa con la distribución de vasos: se relacionó negativamente con la proporción de vasos menores a $35\text{ }\mu\text{m}$ ($r = -0,44$, $p = 0,021$), pero sobre todo con aquellos vasos comprendidos entre 20 y $35\text{ }\mu\text{m}$ ($r = -0,47$, $p = 0,013$). En contraste, esta correlación fue positiva con la proporción de vasos mayor a $35\text{ }\mu\text{m}$, con el mayor nivel de correlación en el segmento ubicado entre los 50 y $80\text{ }\mu\text{m}$ ($r = 0,46$, $p = 0,017$; Figura 5.7 *a*). Además, la duración de la exoterma se correlacionó de manera negativa y altamente significativa con la frecuencia de vasos ($r = -0,55$, $p = 0,003$; Figura 5.7 *b*).

La frecuencia de vasos se correlacionó de manera negativa con todas las variables de tamaño de vasos (*DV*: $r = -0,43$, $p = 0,006$; *AV*: $r = -0,41$, $p = 0,007$; *Dh*: $r = -0,36$, $p = 0,019$). A su vez, la conductividad máxima medida se correlacionó positiva y significativamente con el diámetro de vasos ($r = 0,4$, $p = 0,009$) y el área de halo ($r = 0,45$, $p = 0,003$), mientras que marginalmente con el diámetro hidráulico ($r = 0,3$, $p = 0,06$). Además, la conductividad máxima se correlacionó de manera positiva con los segmentos de la distribución diamétrica correspondientes a los vasos más grandes (*DV* 35-50 μm : $r = 0,36$, $p = 0,019$; *DV* 50-65 μm : $r = 0,32$, $p = 0,044$) y de manera negativa con los de menor tamaño (*DV* < 20 μm : $r = -0,42$, $p = 0,006$).

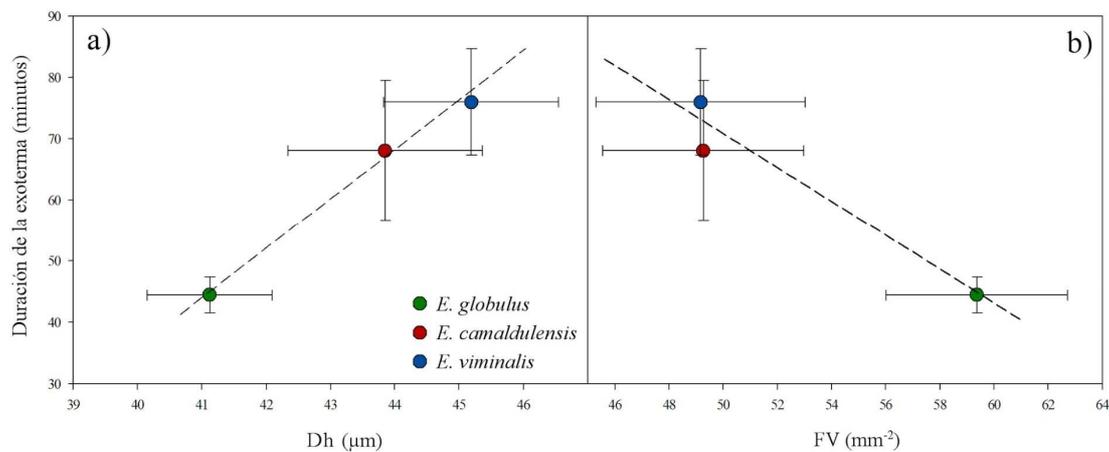


Figura 5.7. Relación entre la duración de las exotermas de congelamiento y a) diámetro hidráulico (*Dh*) y b) frecuencia de vasos (*FV*) para tres especies de *Eucalyptus* creciendo bajo condiciones de jardín común en Tandil, Argentina. Los puntos graficados indican el valor medio de la variable y las barras representan el error estándar asociado a la medición.

Por último, la conductividad hidráulica máxima se correlacionó de manera positiva con la proporción de pérdida de conductividad, en el sentido de una mayor vulnerabilidad a medida que aumenta *ks max* ($r = 0,34$, $p = 0,037$). Si bien no se encontraron correlaciones significativas entre el nivel de pérdida de conductividad y las variables anatómicas estudiadas, se observaron tendencias al analizar valores medios por especie. En este sentido, se observó una relación positiva entre la proporción de vasos mayores a 50 μm y el nivel de caída de conductividad experimentado en el T2 (*PPC* 2), el cual fue máximo para aquellos valores entre 50 y 65 μm (Figura 5.8 a). Paralelamente, el número relativo de vasos menores a 35 μm se asoció positivamente con el nivel de recarga experimentado (Figura 5.8 b).

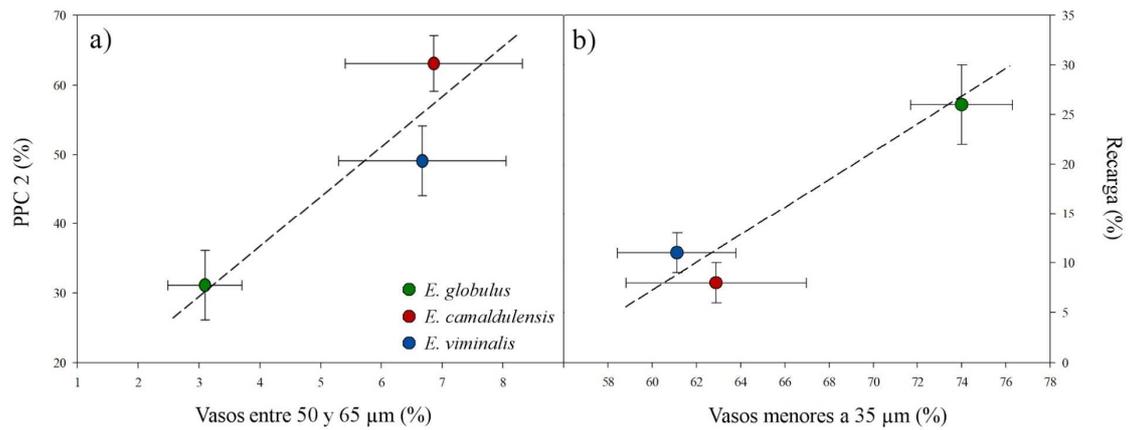


Figura 5.8. Tendencias observadas entre los niveles medios de distintas variables medidas durante la determinación de la vulnerabilidad a la cavitación de tres especies de *Eucalyptus* creciendo bajo condiciones de jardín común en Tandil, Argentina. a) Relación entre la proporción de vasos mayores a 50 μm y la pérdida de conductividad en el tiempo 2. b) Relación entre la proporción de vasos menores a 35 μm y la recarga de vasos expresada en porcentaje.

Discusión

Considerando los aspectos metodológicos, las tasas de congelamiento utilizadas en este estudio fueron menores a las utilizadas por Feild & Brodribb (2001) y Lintunen et al. (2013). Por otro lado, la temperatura a la cual se registraron las exotermas rondó los valores encontrados por Davis et al. (1999) y Feild & Brodribb (2001) al trabajar con conjuntos de especies gimnospermas y angiospermas. Si bien no se encontraron antecedentes publicados de exotermas correspondientes a madera de especies de *Eucalyptus*, valores de temperatura de nucleación obtenidos en hojas de dos especies de este género (Choat et al. 2011) se encuentran en el mismo orden de magnitud a los observados en este trabajo. De acuerdo con Lintunen et al. (2013), el hecho de que las exotermas de congelamiento hayan comenzado a una temperatura que ronda los $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ indica que el agua dentro del xilema se encontraba súper-enfriada. La temperatura seleccionada como objetivo ($-15\text{ }^{\circ}\text{C}$) aseguró que todos los elementos conductivos llegaran a congelarse mientras que evitó el daño a los tejidos vivos del sistema vascular (Feild & Brodribb 2001).

La correlación observada entre el tamaño de vasos y la duración de la exoterma no resulta, necesariamente, contraria a lo sugerido por Lo Gullo y Salleo (1993), quienes proponen que existirían efectos de interfase que provocarían la disminución del punto de congelamiento de la savia a medida que el diámetro de los elementos conductivos decrece. Concordantemente, Lintunen et al. (2013) encontraron que el aumento en el radio de los elementos conductivos incrementó la temperatura de congelamiento (la hizo más positiva) de manera altamente significativa. En nuestro trabajo, si bien la temperatura de comienzo de las exotermas no varió significativamente, las especies con mayor tamaño de vasos tardaron más tiempo en completar el proceso de congelamiento, alcanzando ese punto a menor temperatura (*E. camaldulensis* y *E. viminalis*). En concordancia, el tiempo

de duración de la exoterma se asoció de manera positiva con las categorías diamétricas superiores. Esta relación estaría sustentada en el hecho de que un aumento en el diámetro de los vasos, al ser elementos de geometría más o menos cilíndrica, produce un aumento considerable en el volumen de agua contenido dentro de ellos, lo cual traería aparejado un aumento del tiempo necesario para nuclear la formación de hielo. A su vez, el hecho de que la temperatura de inicio de la exoterma se haya correlacionado de manera negativa con la proporción de vasos de menor tamaño (en el sentido de que un aumento en la proporción de éstos se asoció a una disminución de la temperatura de inicio) indicaría que el congelamiento comienza por aquellos elementos de mayor diámetro, progresando a través de los de tamaño medio y finaliza en aquellos de menores dimensiones. Esto produciría, de acuerdo con Pockman & Sperry (1997), un congelamiento gradual del xilema a medida que las temperaturas descienden. La correlación observada entre la duración del proceso de congelamiento y la frecuencia de vasos probablemente esté mediada por la correlación negativa observada entre esta última variable y el diámetro de vasos. Esta relación, que ha sido ampliamente reportada en trabajos multiespecíficos (p.ej. Poorter et al. 2010, Zanne et al. 2010, Carlquist 2012), indica que existe una variación inversa entre el número y el tamaño de los elementos conductivos.

En cuanto a la anatomía de estas especies, las características asociadas al sistema conductivo mostraron similitudes entre *E. viminalis* y *E. camaldulensis*, diferenciándose de *E. globulus*. Esto puede observarse tanto en las variables relacionadas a tamaño medio de los elementos conductivos, como en la distribución de tamaños de los mismos. Estos resultados están en concordancia con aquellos reportados en el Capítulo 3 donde, además de presentar un tamaño medio mayor, *E. viminalis* y *E. camaldulensis* presentaron una distribución de vasos similar entre ellos y que resulta semejante a la reportada aquí. Por otro lado, *E. globulus* presentó una distribución de tamaños más sesgada hacia aquellos vasos de menor diámetro, aunque sin diferenciarse significativamente de las otras dos especies, lo cual sí había ocurrido con las muestras utilizadas en el Capítulo 3. Debido a la relación directa existente entre el tamaño de vasos y la conductividad, relacionadas entre sí a través de la ley de Hagen-Poiseuille (Tyree & Zimmermann, 2002), las diferencias registradas en las características de los elementos conductivos entre especies trajeron aparejada una diferencia en ks_{max} , la cual fue significativamente menor en la especie de menor tamaño medio de vasos: *E. globulus*. Esta correlación no fue tan alta como la reportada en muchos estudios multiespecíficos (p.ej. Poorter et al. 2010, Choat et al. 2011, Fortunel et al. 2014) e incluso en capítulos previos de esta tesis donde se analizó esta relación a nivel de género, realizando comparaciones inter e intraespecíficas (Capítulos 3 y 4, respectivamente). Esto podría deberse, en parte, al poco rango de variación observado en el tamaño de vasos. Otra causa posible es que, debido a la época en la cual fue realizado el muestreo, haya existido alguna merma en la conductividad debido a la inactividad de los vasos más grandes, la cual no habría sido revertida completamente a través del proceso de desembolización llevado a cabo. Esto resultaría en una subestimación de la conductividad en las especies de mayor tamaño medio de vasos, que traería como consecuencia una disminución en el parámetro de correlación entre ambas variables. En relación a esto, durante la semana previa al muestreo se

registraron cuatro días donde la temperatura mínima de la localidad de Tandil se ubicó por debajo de los 0 °C¹⁰. La temperatura mínima en ese período no descendió por debajo de los -4,2 °C, siendo la mínima media de las cuatro jornadas -2,6 °C. Estas bajas temperaturas pueden haber provocado la pérdida de conductividad de los vasos de mayor tamaño, la cual no se recuperó posteriormente. La falta de correlación observada entre la proporción de vasos en la categoría superior de la distribución diamétrica y *ks max* confirmaría esta hipótesis. Aun así, el máximo nivel de conductividad medido se correlacionó con el resto de las categorías de la distribución de tamaños de vasos.

Por otro lado, la baja relación entre el diámetro de los elementos conductivos y la *ks max* puede haber sido la causante de la falta de asociación entre el tamaño de los elementos conductivos y el nivel de pérdida de conductividad. Esta relación, sobre la cual existe un amplio consenso (p.ej. Sperry & Sullivan 1992, Sperry et al. 1994, Davis et al. 1999, Choat et al. 2011), establece que el mayor tamaño de vasos está asociado a una mayor vulnerabilidad a la cavitación durante eventos de congelamiento/descongelamiento. En un estudio, Cavender-Bares & Holbrook (2001) tampoco encontraron relación entre el tamaño de vasos (expresado como diámetro hidráulico) y la pérdida de conductividad. Estos autores atribuyeron esa falta de asociación al hecho de que el tamaño de vasos se hallaba por debajo del valor crítico de 44 µm establecido por Davis et al. (1999), por encima del cual existiría una alta probabilidad de cavitación luego del congelamiento. En este sentido, los valores de *Dh* medidos en este trabajo (41-45 µm) fueron muy cercanos a ese valor crítico, lo cual explicaría la falta de correlación observada a nivel de rama. A pesar de ello, a nivel de especie se observó una asociación relativamente fuerte entre la proporción de vasos de mayor tamaño y la pérdida de conductividad. Esta asociación, además, fue máxima cuando se tomó la categoría diamétrica de 50-65 µm, lo cual avala la hipótesis de que los vasos de mayor tamaño no habrían estado completamente conductivos al momento de realizar la experimentación. A pesar de la pobre asociación entre características de vasos y pérdida de conductividad post-congelamiento, se observó una asociación positiva entre esta última y la conductividad máxima. Esta relación se encuentra extensamente reportada en la bibliografía (p.ej. Sperry et al. 1994, Davis et al. 1999, Feild & Brodribb 2001, Choat et al. 2011) y se desprende, como se expuso anteriormente, de la alta correlación y dependencia de *ks max* respecto del tamaño de los elementos conductivos. Esto indicaría, como se expone en Sperry & Sullivan (1992), que existe un compromiso entre eficiencia conductiva y vulnerabilidad a la cavitación causada por frío: a mayor eficiencia conductiva, mayor es la probabilidad de cavitación por procesos de congelamiento/descongelamiento.

Al comparar los resultados de vulnerabilidad a la cavitación por frío obtenidos en este trabajo en relación con estudios similares, se advierte que existe un amplio rango de variación en el nivel de resistencia experimentado por distintas especies. En un estudio multiespecífico, que involucró especies gimnospermas y angiospermas, Feild & Brodribb (2001) encontraron una gran amplitud en el *PPC*: en las especies coníferas, éste no difirió significativamente de 0%, mientras que en las especies angiospermas siempreverdes,

¹⁰ <http://www.ogimet.com/cgi-bin/gsynres?ind=87645&ano=2016&mes=9&day=15&hora=12&min=0&ndays=30>

fluctuó entre 18% y 83%. Tomando este rango de variación, las especies aquí evaluadas se ubicarían en una posición intermedia de vulnerabilidad a la cavitación por frío. A pesar de los prácticamente nulos antecedentes para el género, Choat et al. (2011), en un trabajo multiespecífico compuesto por 11 especies angiospermas siempreverdes, dos de las cuales eran especies del género *Eucalyptus*, hallaron valores de PPC entre 0% y 56%. Vale destacar que, en este último trabajo, una de las especies de *Eucalyptus* (*E. sieberi*) fue la más vulnerable. Los autores atribuyeron esa mayor susceptibilidad al mayor tamaño de vasos de esta especie. La otra especie analizada en ese estudio (*E. burgessiana*) rondó el 20% de PPC luego de un ciclo de congelamiento/descongelamiento. Tomando estos resultados, y dadas las diferencias interespecíficas encontradas, se puede inferir que la vulnerabilidad a la cavitación por frío es una propiedad relativamente variable, incluso dentro de un mismo género, y que dependerá de las características anatómico/hidráulicas de la especie en cuestión. De cualquier forma, bajo la hipótesis de que los vasos de mayor tamaño no se hallaban en su totalidad conductivos, se puede inferir que el PPC medido en las especies de *Eucalyptus* utilizadas en este ensayo se encuentra (en cierto grado) subestimado, al menos en las especies de mayor tamaño medio de vasos (*E. camaldulensis* y *E. viminalis*).

Es necesario remarcar que las diferencias observadas en vulnerabilidad a la cavitación luego de un evento de congelamiento/descongelamiento, así como las relaciones entre la pérdida de conductividad y las variables anatómicas e hidráulicas previamente citadas, se registraron solamente considerando la segunda medición de k_s post-congelamiento (en T2), aproximadamente entre 18 y 21 hs luego de finalizar el período de congelamiento. Es probable que, durante ese período de tiempo, los vasos de menor tamaño se hayan descongelado completamente, disolviéndose las burbujas de aire en el agua y recuperando su capacidad conductiva, mientras que una proporción variable de los vasos de mayor tamaño probablemente cavitaron debido a la expansión de las burbujas formadas durante el congelamiento. Esto es consistente con lo encontrado por Lo Gullo & Salleo (1993), respecto a la recuperación de los embolismos y su relación con el diámetro de los elementos conductivos. Estos autores encontraron que cuanto más grandes eran los vasos, menor era la probabilidad de que se vuelvan a llenar después de la recuperación térmica. En este sentido, el mayor nivel de recarga, entendida como la disminución de PPC entre T1 y T2 ($PPC_1 - PPC_2$) fue significativamente mayor en la especie con menor tamaño medio de vasos (*E. globulus*). Además, a nivel de especie, se registró una asociación entre el valor medio del nivel de recarga y la proporción de vasos en las categorías diamétricas menores. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que conductos vasculares con mayores diámetros tienen mayor probabilidad de cavitar en eventos de congelamiento/descongelamiento, debido a que las burbujas más grandes se expanden con mayor facilidad bajo tensión. Por otro lado, el hecho de registrarse una recuperación en la capacidad conductiva es consistente con la estrategia de reversión definida para especies de porosidad difusa, como es el caso de *Eucalyptus*. En estas especies, el rellenado de vasos sería el mecanismo utilizado para recuperarse una vez producida la cavitación de los mismos y, de esta forma, restablecer cierto nivel de conductividad que le permita continuar creciendo. A diferencia de los procesos activos, mediados por la

acción de células vivas del parénquima, que se producen en los elementos conductivos de ramas conectadas al sistema hidráulico del árbol, se plantea que aquí la recuperación post-embolismo de debió principalmente a un proceso pasivo como consecuencia de la presión positiva ejercida por la columna de agua conectada a la rama. Para poder dilucidar qué tan cercano a la realidad resulta este artificio es necesario llevar adelante mediciones *in-vivo*, lo cual representa un gran desafío ya que las limitaciones técnicas son importantes.

En sintonía con los antecedentes más relevantes sobre el tema, los resultados obtenidos en este trabajo permiten inferir que, dentro del amplio universo formado por los distintos tipos de especies arbóreas, aquellas que presentan un sistema de conducción compuesto por elementos conductivos de pequeño tamaño, si bien son menos eficientes desde el punto de vista hidráulico, son intrínsecamente más resistentes a la cavitación por frío. De acuerdo con Sperry & Sullivan (1992), este menor tamaño representaría una adaptación para minimizar la ocurrencia de embolismos por ciclos de congelamiento/descongelamiento y permitiría explicar la tendencia hacia un decrecimiento en el tamaño de los elementos conductivos a medida que aumenta la latitud. En este sentido, las especies coníferas son las más resistentes a este tipo de estrés, presentando poca o nula pérdida de conductividad frente a eventos de congelamiento debido a que poseen traqueidas de muy pequeño volumen (Pockman & Sperry 1997) y baja eficiencia hidráulica, todo lo cual conforma una estrategia de evitación del congelamiento por parte este tipo de especies (Sperry et al. 1994). En el otro extremo se encuentran las especies dicotiledóneas. Estas presentan vasos de mayor tamaño que las traqueidas, lo cual les permite alcanzar una mayor eficiencia conductiva, pero a costa de sacrificar el mecanismo de evitación. De acuerdo con Sperry et al. (1994), esto podría haber dirigido la evolución hacia la fenología decidua y el desarrollo de mecanismos de reversión (en especies de porosidad difusa) y de tolerancia (especies de porosidad circular). Dentro de estos dos extremos, aparecen las especies angiospermas siempreverdes, dentro de las cuales se ubica el género *Eucalyptus*. Según exponen Cavender-Bares & Holbrook (2001), estas especies serían más resistentes que las de hoja caduca. No obstante, como se ha observado en este trabajo, existe una amplia variación en el nivel de pérdida de conductividad frente a un evento de frío. Además, la resistencia al frío no depende únicamente de las características de la madera. Si así fuera, en base a los resultados obtenidos en este trabajo, se esperaría que *E. globulus* fuera la especie más resistente. Sin embargo, en condiciones de campo, esta especie presenta alta sensibilidad a las bajas temperaturas (p.ej. Moschini et al. 2000). Por otro lado, tanto *E. viminalis* como *E. camaldulensis*, las especies con mayor vulnerabilidad de su madera al frío, son altamente resistentes a bajas temperaturas (Moschini et al. 2000, Pathauer 2005), aunque algunas observaciones indicarían que *E. camaldulensis* lo es en menor medida que *E. viminalis*. Como se observa aquí, la vulnerabilidad del xilema a nivel de rama, por sí sola, no determina la aptitud climática de las especies frente al frío. Este hecho nos indicaría que, más allá de la resistencia particular de un órgano, los mecanismos y estrategias utilizados por un árbol para hacer frente a cualquier tipo de estrés, y al estrés por frío en particular, dependerán de la interacción entre las características anatómicas, morfológicas y fisiológicas de los diferentes órganos que lo componen, existiendo diferentes niveles de regulación. Esto es

concordante con lo reportado por Fernández-Perez et al. (2018) quienes encontraron que la distribución de los pinos en la península ibérica se correlaciona con la resistencia de las hojas al frío y no con la vulnerabilidad a cavitación del xilema. En este mismo sentido, algunos estudios han demostrado que el principal factor que afecta la resistencia al frío (y supervivencia) en las especies de *Eucalyptus* es la formación de hielo en las hojas (Fernández et al. 2006, Moraga et al. 2006). Este proceso estaría regulado por la presencia de diferentes compuestos de diversas vías metabólicas (principalmente azúcares solubles) que, a través de un aumento en la presión osmótica, protegerían a las membranas celulares del daño causado por la formación de hielo extracelular (Almeida et al. 1994, Fernández et al. 2006, Moraga et al. 2006). La presencia de estos compuestos depende, en gran medida, del material genético y la etapa de desarrollo de la planta, aunque puede ser incrementada a través del proceso de aclimatación al frío (o rustificación). Este proceso logra, a través de cambios fisiológicos y bioquímicos, una disminución de la temperatura necesaria para causar daño en los tejidos (Almeida et al. 1994, Moraga et al. 2006). Otra manera de incrementar la resistencia a heladas es mediante la hibridación con especies de mayor tolerancia (Almeida et al. 1994). En este sentido, estos autores probaron la resistencia diferencial de *E. globulus* frente a diferentes híbridos interespecíficos entre esta especie y otras más resistentes, incluida *E. viminalis*, y obtuvieron un aumento en la tolerancia a heladas en todos los híbridos probados. Todo lo expuesto previamente indicaría que *E. globulus*, la especie más vulnerable a las heladas, pero la de mayor resistencia a la cavitación por frío a nivel de xilema de ramas (además de ser la de mayor potencial de crecimiento y calidad de madera), presenta potencialidad para incrementar su superficie de implantación, expandiéndose hacia zonas con un régimen de temperaturas más desfavorables. Más allá de la mencionada hibridación con especies más tolerantes a frío y la selección -dentro de la misma especie- en base a resistencia a heladas, también se ha propuesto que la selección de individuos con alta tasa de crecimiento en la fase inicial del desarrollo puede ser clave para escapar del riesgo del heladas que es más intenso cuanto más pequeño es el plantín.

Conclusiones

Los resultados previamente expuestos revelan que, en líneas generales, existe una asociación a nivel de especie entre *E. viminalis* y *E. camaldulensis*, las cuales se diferencian de *E. globulus*. En acuerdo con hipótesis *a*, el nivel de vulnerabilidad a la cavitación por frío alcanzado por las especies seleccionadas para este estudio se ubicó en una situación intermedia entre las especies gimnospermas y las especies deciduas de porosidad circular. Por otro lado, y en concordancia con la segunda hipótesis (*b*), *E. globulus* fue la especie que presentó menor vulnerabilidad a la cavitación por frío, mientras que las otras dos especies presentaron niveles de vulnerabilidad mayores y similares en magnitud. El nivel de vulnerabilidad observado, así como el desarrollo del proceso de nucleación, se relacionó principalmente con las características de los vasos, siendo determinante la distribución de tamaños de vasos. Estos resultados confirmarían la hipótesis *c*. Por consiguiente, la cuarta hipótesis de trabajo (*d*) también se acepta, ya

que los resultados obtenidos experimentalmente en ramas terminales no se condicen con el nivel de resistencia experimentado por estas especies a nivel de campo, probablemente más relacionado con las características foliares. Finalmente, y de acuerdo con la hipótesis *e*, el nivel de recarga registrado nos permite inferir que estas especies tienen la capacidad de recuperar (aunque en baja proporción) su capacidad conductiva, potencialmente restableciendo el flujo de agua hacia las hojas. Sin embargo, este último aspecto debe ser evaluado en el futuro con experimentos específicos que impliquen tinciones y/o mediciones en árboles vivos.



Capítulo 6: Estimación de propiedades físicas e hidráulicas y características anatómicas de la madera de Eucalyptus a través del uso de espectroscopía en el rango del infrarrojo cercano¹¹

Introducción

La región del espectro electromagnético correspondiente al infrarrojo cercano fue descubierta en el 1800 por William Herschel (Siesler 2007, Schwanninger et al. 2011), aunque no se le encontró aplicación práctica hasta 1881, cuando Abney & Festing lograron medir fotográficamente el primer espectro infrarrojo de un compuesto orgánico (Wheeler 1959). A pesar de la relativa antigüedad de esta técnica su uso regular comenzó recién a principios de la década de 1950 en el campo de la agricultura (Siesler 2007), expandiéndose rápidamente a la industria farmacéutica, el control de procesos, la industria alimenticia y, más recientemente, la teledetección (Schwanninger et al. 2011).

Esta región del espectro abarca el rango de frecuencias entre 12.820 y 4.000 ondas/cm (cm^{-1}) que corresponde a las longitudes de onda de 780 a 2.500 nm (Figura 6.1) (Schwanninger et al. 2011, Hein 2012, Luss et al. 2015). Este rango de ondas se ubica entre el espectro visible (VIS; 380 a 780 nm) y el infrarrojo medio (MIR: Mid-infrared; 2.500 a 25.000 nm) (Bokobza 1998; Pasquini et al. 2003). La espectroscopía del infrarrojo cercano (*NIRS* por sus siglas en inglés: *Near InfraRed Spectroscopy*) es un tipo particular de espectroscopía vibracional, junto con la espectroscopía del infrarrojo (IR) y la espectroscopía Raman (Ona et al. 1999), que se basa en el estudio de las transiciones electrónicas de baja energía y, aún más importante en el contexto del estudio de la madera, de sobretonos y bandas de combinación de las vibraciones fundamentales que se producen en las moléculas (Schwanninger et al. 2011). Esta metodología permite obtener información cualitativa y cuantitativa de los constituyentes de una muestra a partir de su interacción con las ondas electromagnéticas (Pasquini 2003).

La vibración de un enlace molecular posee niveles de energía discretos, especificados por el número cuántico vibracional ν . Usualmente la transición entre el estado fundamental ($\nu = 0$) y el primer estado vibracional excitado ($\nu = 1$) ocurre con absorción de energía en el rango del infrarrojo y es llamada vibración fundamental. Esta se produce a una cierta frecuencia, determinando lo que se conoce como banda de absorción fundamental. Por

¹¹ Agradezco particularmente al Dr. Alejandro Martínez-Meier por su colaboración a lo largo de todo el trayecto de esta tesis, el cual fue fundamental para hacer posible mi estadía en Orleans, Francia, donde estuve capacitándome para realizar los análisis implementados en este capítulo. Asimismo, quiero agradecer a los Drs. Philippe Rozenberg, Jean-Paul Charpentier, Vincent Segura y al técnico Frédéric Millier, por su amabilidad y ayuda durante el tiempo que estuve trabajando en su laboratorio.

cada banda de absorción fundamental existe una serie de sobretonos cuya intensidad de absorción decrece a medida que aumenta su número (Shenk et al. 2007; Tabla 6.1).

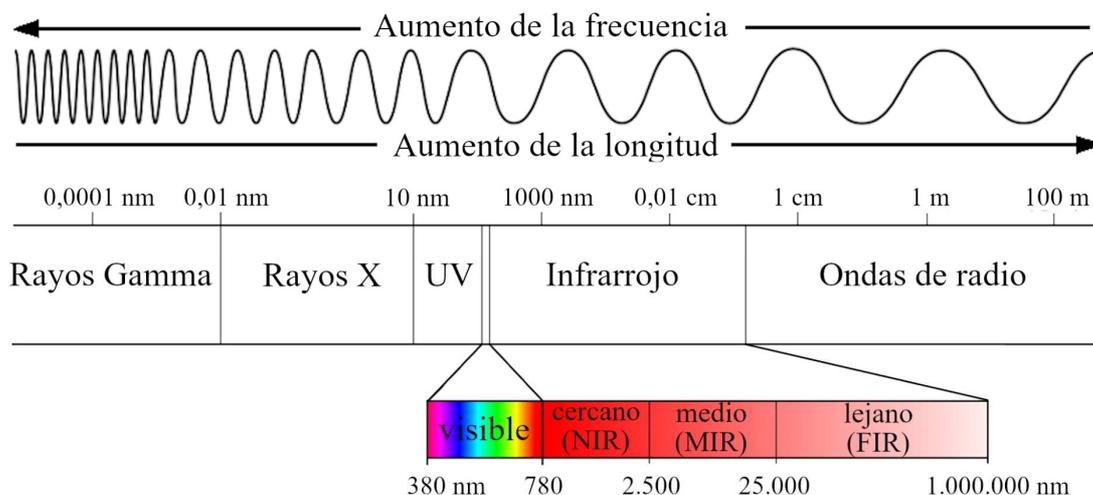


Figura 6.1. Espectro electromagnético (versión modificada a partir de imagen obtenida en www.cyberphysics.co.uk/topics/radioact/Radio/EMSPpectrumcolor.jpg).

Tabla 6.1. Intensidad de bandas para MIR y NIR (modificada de Schwanninger et al. 2011).

Banda	Rango	Intensidad media ($\text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$)	Intensidad relativa (%)
Fundamental	MIR	10.000	100
1 ^{er} sobretono	MIR-NIR	100	1
2 ^{do} sobretono	NIR	10	0,1
3 ^{er} sobretono	NIR	1	0,01
4 ^{to} sobretono	NIR	0,05	0,005

Los sobretonos corresponden a las transiciones entre $\nu = 0$ y $\nu = 2, 3, 4, \dots$, mientras que las bandas de combinación son transiciones entre el estado fundamental y el estado vibracional excitado que involucran dos o más vibraciones (de tensión *-stretching-* y de flexión *-bending-*) en una molécula poliatómica (Tasumi 2015; Figura 6.2). En teoría, la vibración molecular involucra todos los átomos de una molécula. Sin embargo, en algunos casos, la contribución localizada en un grupo particular de átomos dentro de una molécula predomina sobre el resto. La frecuencia vibracional del enlace entre un grupo particular de átomos es muy sensible y está restringida a un rango estrecho. Si la absorción en ese rango presenta alta intensidad se la denomina banda de absorción e indica la presencia de ese grupo (Tasumi 2015). A su vez, en la región NIR, la radiación es absorbida de acuerdo con la concentración en que se hallan presentes los diferentes tipos de enlace. En consecuencia, el espectro NIR contiene información cualitativa y cuantitativa de la composición química de una muestra (Viana et al. 2009, Luss et al. 2015). En la madera, particularmente, la absorción es debida principalmente a sobretonos y bandas de combinación de las vibraciones fundamentales entre átomos de hidrógeno – H– y otros más grandes (carbono –C–, oxígeno –O–, nitrógeno –N–, azufre –S–) (Schimleck et al. 1999; Luss et al. 2015; Figura 6.2).

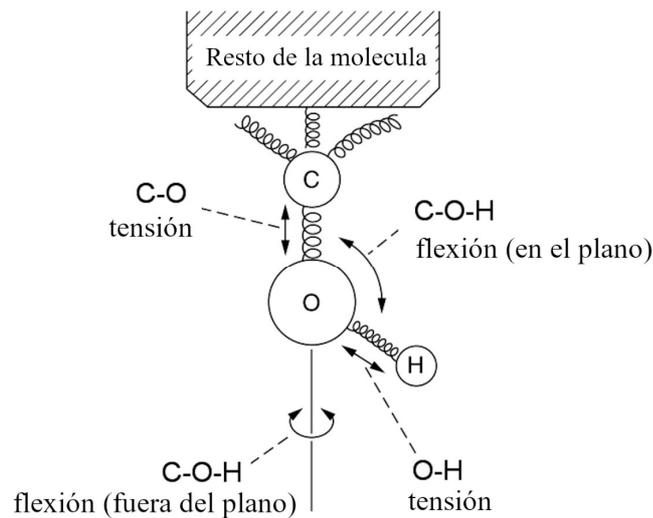


Figura 6.2. Modos de vibración del grupo hidroxilo alcohólico (modificado de Burns & Ciurzak 2007).

Como consecuencia del diferente peso molecular, estas vibraciones son más inarmónicas que aquellas entre átomos de tamaño similar y tienen mayores sobretonos, pero debido a su menor masa, las vibraciones de tensión fundamentales de estas uniones C–H, O–H y N–H ocurren en el límite de menor longitud de onda (alta frecuencia) de la región MIR. La proximidad de estas vibraciones fundamentales con la región NIR hace que los primeros sobretonos ocurran en esta región (Schwanninger et al. 2011; Figura 6.3).

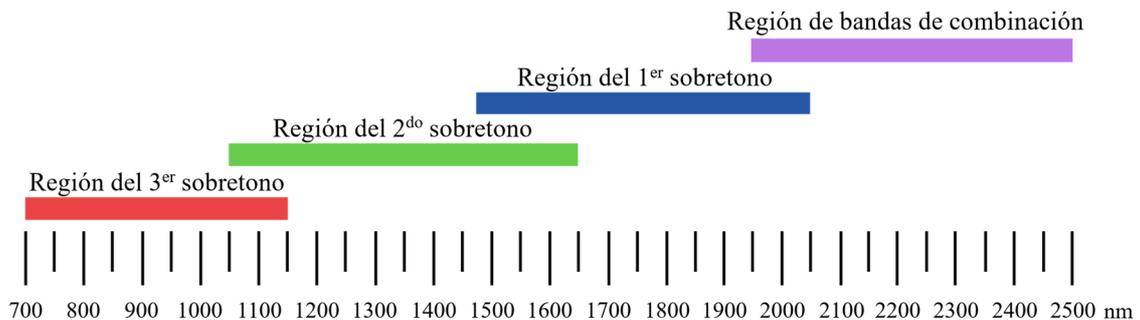


Figura 6.3. Zonas del espectro electromagnético en la región NIR correspondientes a bandas de combinación y sobretonos.

Debido a que la madera es un material heterogéneo, se deben tener en cuenta algunos factores importantes que influyen en la reproducibilidad espectral, especialmente en los análisis de espectroscopía cuantitativa, siendo dos de los más importantes la consistencia en la preparación de las muestras y el espesor de las mismas (Schwanninger et al. 2011). En este sentido, debido a que los sobretonos y las bandas de combinación son mucho más débiles que las bandas de absorción fundamental, la espectroscopía NIR permite el análisis de muestras de hasta varios milímetros de espesor (Bokobza 1998). En el caso de

la madera, los espectros NIR son generalmente recolectados a través de dos modos: transmisión y reflexión difusa (Figura 6.4 a). Debido a que las medidas de transmisión requieren un cierto nivel de preparación de la muestra, como el molido para incorporarla dentro de pellets o la preparación de secciones delgadas con micrótopo, esta técnica normalmente está limitada a aplicaciones específicas. En la espectroscopía de reflexión difusa, la radiación electromagnética es reflejada por la superficie de la muestra, absorbida o transmitida a través de ella, antes de que una parte de la radiación sea reflejada en forma difusa de vuelta al detector. Los cambios en la morfología y/o propiedades fisicoquímicas de la muestra producirán cambios espectrales en la radiación difusa reflejada. Es por ello que usualmente se utiliza una esfera de integración, que es un implemento que evita la pérdida de radiación reflejada y produce resultados más precisos (Schwanninger et al. 2011; Figura 6.4 b).

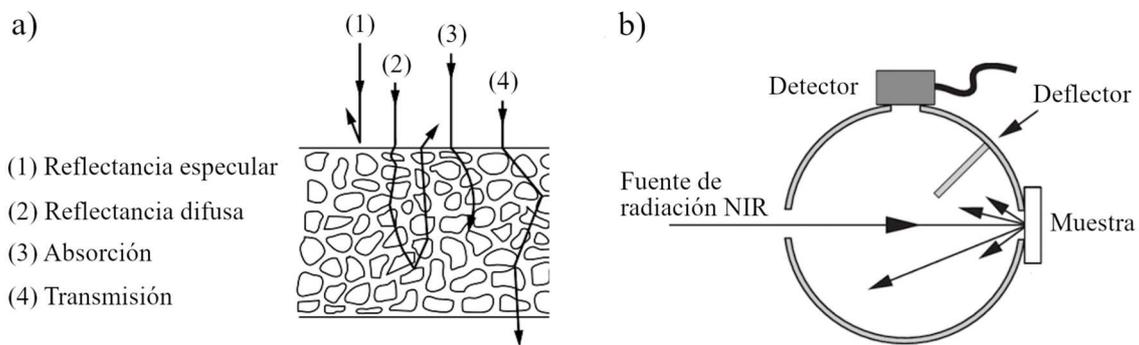


Figura 6.4. a) Formas de interacción de la radiación electromagnética con la madera b) Diagrama de una esfera de integración y sus partes constituyentes (imágenes modificadas de Burns & Czurak 2007 y <https://www.newport.com/t/integrating-sphere-fundamentals-and-applications>, respectivamente).

Los espectros NIR no solo contienen información de las propiedades químicas (absorbancia molecular) sino también de las propiedades físicas del material (Luss et al. 2015). Así, durante la exposición a radiación NIR, existen dos efectos que compiten dentro de un material heterogéneo: absorción y dispersión. Cuando la radiación penetra una capa de la muestra, su dirección cambia en cada límite de partícula que encuentra en su recorrido. Los cambios de dirección son el resultado de la reflexión, refracción y difracción aleatoria en las superficies de las partículas. En general, se puede afirmar que la radiación se propaga a través de un material que refleja difusamente por medio de la dispersión. A medida que la radiación dispersada encuentra diferentes límites de partículas, la dispersión ocurre en todas las direcciones. Debido a que una parte de esa radiación es absorbida, su intensidad decrece. Por ello, la dispersión y la absorción ocurren simultáneamente en cada capa hasta que, finalmente, la radiación atenuada remanente re-emerge desde la superficie de entrada. A este fenómeno es al que se denomina reflectancia difusa. Estos dos efectos actúan en diferente sentido según la longitud de onda considerada: la absorción tiende a incrementarse con longitudes de onda largas, mientras que la dispersión disminuye (Schwanninger et al. 2011; Figura 6.5). Para análisis cuantitativos, las medidas de reflectancia (R) son típicamente transformadas a $\log_{10}(1/R)$, a menudo denominada “absorbancia” o “absorbancia aparente”

(Schwanninger et al. 2011, Leblon et al. 2013, Luss et al. 2015). Actualmente los espectrofotómetros del infrarrojo cercano de transformada de Fourier (FT-NIR), basados en el uso de un interferómetro, han reemplazado a los espectrofotómetros tradicionales, basados en el uso de prismas y/o rejillas. Esto se debe a que su uso supone una serie de ventajas: 1) una alta eficiencia en la recolección de fotones; 2) una alta eficiencia en la detección de señales, y 3) una alta resolución debido a una gran precisión en el establecimiento del número de ondas (Kawata 2002).

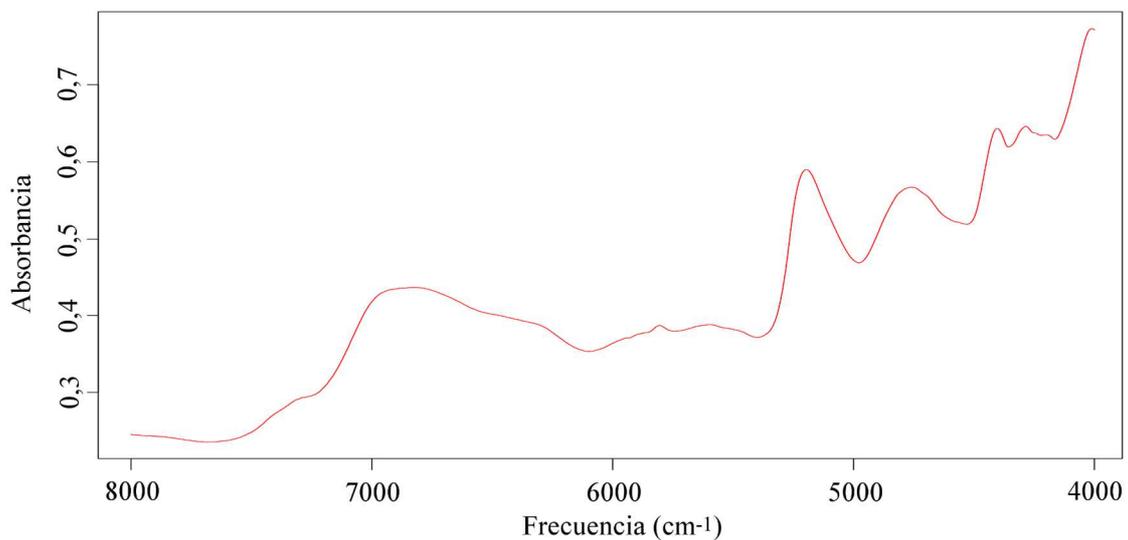


Figura 6.5. Espectro de absorción NIR típico de la madera.

Dadas las características particulares de esta metodología, los parámetros que definen una banda (ubicación, alto y ancho) no pueden ser estimados de forma precisa en un espectro NIR. Entre picos de absorción existen valles con diferente forma debido al solapamiento de bandas adyacentes que presentan diferentes altos y anchos. Un espectro NIR está conformado por muchas bandas altamente solapadas y que frecuentemente presentan baja absorción (Schwanninger et al. 2011). Como consecuencia, la información obtenida por este método no puede ser interpretada directamente (Luss et al. 2015). Por este motivo, para alcanzar un aumento en la resolución de los espectros obtenidos y extraer esa información, se vuelve necesario el procesamiento de los mismos a través del uso de software específico (Schwanninger et al. 2011). Mediante técnicas de análisis estadístico multivariado, como los modelos de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS-R), es posible desarrollar calibraciones que relacionen los espectros NIR obtenidos con propiedades físicas, químicas y mecánicas, evaluadas mediante métodos de referencia (Viana et al. 2009, Hein 2012, Leblon et al. 2013, Luss et al. 2015). Posteriormente, esa calibración puede ser utilizada para predecir esas propiedades en otras muestras, basándose en el espectro NIR de las mismas (Hein 2012).

Tradicionalmente, las técnicas destinadas a evaluar las propiedades de la madera han demostrado ser precisas, pero también laboriosas, consumidoras de tiempo y costosas. Debido a esto, por lo general, solo se llevan a cabo sobre un número limitado de muestras, lo cual muchas veces impide la correcta caracterización de este material (Viana et al.

2009). En este sentido, en los campos de la investigación aplicada en programas de mejoramiento genético y en la industria existe una demanda de metodologías sencillas, confiables y eficientes en tiempo y costos para poder manipular la gran cantidad de muestras necesarias para realizar una adecuada caracterización de las propiedades de la madera (Viana et al. 2009, Alves et al. 2012, Luss et al. 2015, Tsuchikawa & Kobori 2015). A su vez, considerando la aplicación de estas técnicas en programas de mejoramiento genético, el muestreo no-destructivo resulta deseable, ya que permite la conservación de los genotipos para futuras investigaciones (Schimleck et al. 1999). Comparada con otros métodos de fenotipado de madera, la espectroscopía NIR tiene dos grandes ventajas: primero, la alta velocidad de toma de espectros que facilita la recolección de datos descriptivos, y segundo, que los espectros pueden ser tomados a partir de un rango diverso de materiales, con una mínima o nula preparación. Así, esta metodología ofrece una combinación única de velocidad, simplicidad en la preparación de las muestras, facilidad de uso y el hecho de ser una técnica no destructiva (Schwanninger et al. 2011). Es por ello que, en las últimas décadas, ha sido reconocida como una de las técnicas más poderosas para el análisis de la madera (Alves et al. 2012, Inagaki et al. 2012), capaz de complementar o incluso reemplazar los métodos analíticos convencionales (Luss et al. 2015). Actualmente es la herramienta más usada para el fenotipado de alto rendimiento en los programas de mejoramiento genético forestal (PMGF), donde el desarrollo de calibraciones NIR para caracteres de interés constituye el primer paso de estos programas (Hein 2012). Tradicionalmente, estos programas se han centrado en aspectos tecnológicos-industriales de la madera, como la densidad y el ángulo microfibrilar. Sin embargo, frente al desafío del cambio climático global, que afecta particularmente a los ecosistemas boscosos y a las especies forestales cultivadas en todo el mundo (Allen et al. 2010), los PMGF requieren el desarrollo de criterios de selección basados en caracteres adaptativos relacionados con la resistencia al estrés ambiental (Booth 2013, Lachenbruch & McCulloh 2014). A este respecto, estudios previos han demostrado que un número importante de propiedades anatómicas, físicas, químicas y mecánicas de la madera pueden ser estimadas a través de espectroscopía NIR, tanto para especies angiospermas como gimnospermas (p.ej. Schimleck & Evans 2004, Viana et al. 2009, Alves et al. 2012, Luss et al. 2015, Tsuchikawa & Kobori 2015). Sabiendo que la anatomía y estructura de la madera son las que determinan en última instancia su funcionalidad, es que se asume que las técnicas NIRS pueden ser igualmente aplicables para evaluar caracteres adaptativos.

Entre las propiedades de la madera que pueden estimarse mediante espectroscopía NIR, una de las más importantes es la densidad de la madera, la cual es un componente integral de los programas de mejoramiento genético forestal (Schimleck et al. 1999, Alves et al. 2012, Inagaki et al. 2012). Esta puede determinarse a través de diversos métodos, directos e indirectos, siendo alguno de ellos la relación entre el peso seco de la madera y su volumen verde, a través del uso de Pilodyn, o mediante rayos X (Alves et al. 2012). Tal como se vio en los capítulos precedentes, esta característica, que resulta de suma importancia para la industria maderera y celulósica (Alves et al. 2012, Inagaki et al. 2012), se relaciona íntimamente con las propiedades hidráulicas de la madera (Capítulo

3 y 4) y, consecuentemente, con la aptitud ecológica de las especies, siendo una característica integradora de los diferentes tipos celulares que están involucrados en el proceso de transporte de agua a través del xilema (Capítulo 2). Trabajos previos han logrado calibrar exitosamente modelos que predicen ciertas características anatómicas a partir de espectros NIR tomados a nivel de fuste, existiendo antecedentes para el género *Eucalyptus* (Hein 2012, Inagaki et al. 2012). En cuanto a las propiedades hidráulicas, solo existen dos antecedentes donde se relaciona la vulnerabilidad a la cavitación con el espectro de absorción NIR, ambos en especies gimnospermas: uno de ellos fue llevado a cabo en *Picea abies*, a nivel de fuste (Luss et al. 2015), y el otro en *Austrocedrus chilensis*, a nivel de ramas (Sergent et al. 2019). Cabe destacar que, hasta donde llega mi conocimiento, no existen trabajos donde se analicen estas relaciones para especies angiospermas, aunque existe un antecedente reciente donde la vulnerabilidad a la cavitación es relacionada con espectros MIR (Savi et al. 2019). La determinación de las variables anatómicas e hidráulicas son actividades muy laboriosas y consumidoras de tiempo, por lo que sería deseable contar con estimadores rápidos y precisos de estas características.

Objetivos

En base a estos antecedentes, el objetivo general de este capítulo fue establecer calibraciones para características anatómicas, y propiedades físicas e hidráulicas, a nivel de fuste y ramas, en dos especies del género *Eucalyptus* que son parte del PMGF del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA): *E. globulus* y *E. viminalis*.

Los objetivos particulares del mismo son:

- Establecer calibraciones entre espectros NIR y características anatómicas, físicas e hidráulicas a nivel de rama.
- Establecer calibraciones entre espectros NIR y densidad de la madera a nivel de fuste determinada por microdensitometría de rayos X.
- Determinar qué porciones del espectro de absorción NIR resultan de importancia para la estimación de las características analizadas.

Materiales y métodos

Sitio y material vegetal

Este estudio se llevó a cabo utilizando material vegetal proveniente de 3 ensayos de progenies de dos especies del género *Eucalyptus* que forman parte de la red de ensayos del PMGF de INTA: *E. globulus* y *E. viminalis*.

a) *Eucalyptus globulus*

Los individuos analizados son los mismos a los cuales se les determinó vulnerabilidad a la cavitación, descritos en el capítulo 4, provenientes de un ensayo ubicado en la localidad de Balcarce, provincia de Buenos Aires. Las características del ensayo, así como el criterio utilizado para el muestreo, se detallan en el mencionado capítulo. Durante el muestreo de ramas para la determinación de vulnerabilidad a la cavitación se tomaron, además, muestras de barreno a la altura del pecho (1,3 m sobre el nivel del suelo). Estas muestras fueron utilizadas para las calibraciones a nivel de fuste de microdensidad de la madera.

b) *Eucalyptus viminalis*

Los individuos utilizados corresponden a dos ensayos diferentes, que forman parte de la misma red de ensayos de progenies para esta especie. Esta red de ensayos consta de 148 familias nativas de Australia (además de procedencias locales desarrolladas por polinización abierta), con 5 réplicas a lo largo de la provincia de Buenos Aires: Castelar, 25 de Mayo, Coronel Pringles, Del Valle y Guaminí. Para las calibraciones de parámetros hidráulicos a nivel de rama se utilizaron los árboles descritos muestreados en el capítulo 4, provenientes del ensayo ubicado en la localidad de Del Valle. Las características del ensayo así como el criterio utilizado para el muestreo se detallan en el mencionado capítulo. Por otro lado, para las calibraciones a nivel de fuste de microdensidad de la madera se utilizaron individuos provenientes del ensayo ubicado en la localidad de Guaminí (37°6' S, 62°26' O, 95 msnm). Este ensayo está integrado por 94 familias y fue plantado en diciembre de 1998, con un diseño de bloques completos al azar, con 15 repeticiones y a un espaciamiento de 3 x 3 (Cappa et al. 2010). En cuanto a la caracterización climática, de acuerdo con la clasificación de Köppen, el clima de esta región se define como Cfa: clima subtropical húmedo sin estación seca o clima pampeano, con una temperatura media anual de 13,8 °C y una precipitación media anual que ronda los 780 mm.

Recolección y procesamiento de las muestras

a) Ramas

La descripción del proceso de muestreo para ambas especies se encuentra detallado en el capítulo 4.

b) Fuste

Para las calibraciones a nivel de este órgano se procedió a la toma de muestras de barreno. En el caso de *E. globulus*, las muestras fueron tomadas en el mes de agosto de 2013 y se muestrearon 10 árboles de 18 años correspondientes a 4 familias, 2 de alta densidad y dos

de baja densidad. Las muestras de barreno fueron almacenadas en sobres de papel madera y trasladadas a La Plata, donde se dejaron secar al aire.

El muestreo de *E. viminalis* fue llevado a cabo durante el mes de mayo del año 2015 y se muestrearon un total de 196 individuos de 16 años, correspondientes a 47 familias. Se extrajo una muestra por árbol, a la altura del pecho, y la misma fue realizada mediante el uso de una herramienta motorizada. Los sistemas motorizados son ampliamente utilizados por los mejoradores ya que permiten facilitar la toma de muestras y controlar la velocidad de penetración, aumentando la eficiencia del proceso y obteniendo muestras de calidad homogénea. Al momento de barrenar se prestó atención a la geometría del fuste, tratando de incluir en la muestra la sección correspondiente a la médula. Las muestras obtenidas fueron colectadas en placas de policarbonato alveolar de 6 mm, con una longitud superior al radio del árbol más ancho (>30 cm), cerrado en uno de los extremos. Las muestras se fijaron dentro de la placa para evitar la rotura y el curvado, se rotularon, y posteriormente se completó el cerrado. Estas placas se trasladaron al INTA Concordia, donde se abrieron en sus extremos para permitir el secado de las muestras hasta humedad ambiente.

Las muestras de barreno de ambas especies se empaquetaron adecuadamente y fueron trasladadas a la unidad de investigación *Biología integrada para valorizar la diversidad de árboles y bosques* (BioForA), del centro *Val de Loire* del INRA (*Institut National de la Recherche Agronomique*, Instituto Nacional de Investigación Agronómica en español) ubicado en Orleans, Francia. Allí se procedió al acondicionamiento de las muestras de barreno para los estudios de microdensitometría de rayos X y espectroscopía NIR. Para ello, estas muestras fueron cortadas con una sierra circular de doble hoja en tiras con un espesor de aproximadamente 2,4 mm (Figura 6.6), lo que permitió obtener una superficie de calidad excelente y constante entre muestras, como lo requieren estas mediciones.

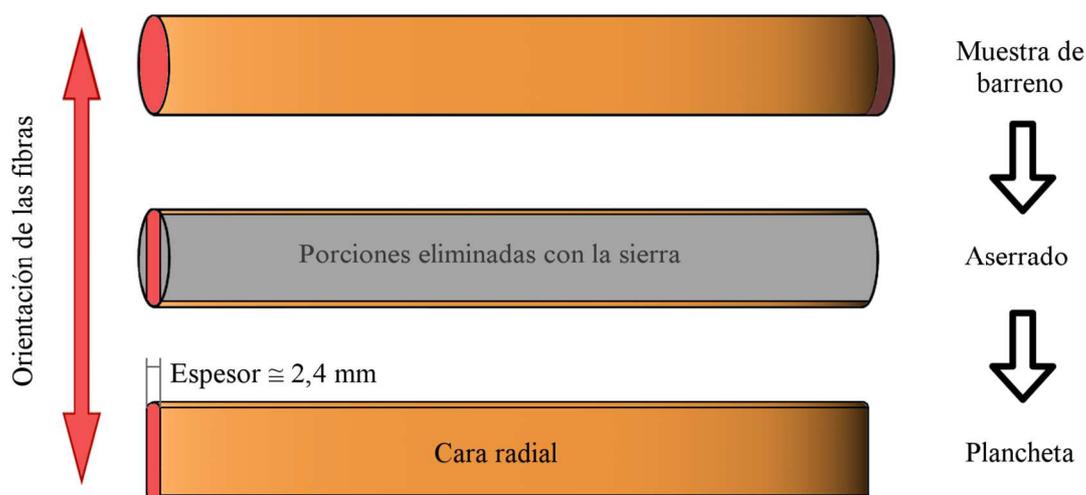


Figura 6.6. Procedimiento realizado para obtener planchetas a partir de muestras de barreno.

El corte con sierra se realizó de manera automatizada, colocando la muestra en un carrete que se desplaza y atraviesa la sierra, volviendo luego a su posición de origen. La muestra se fijó en el carrete con sus fibras orientadas en sentido vertical, de manera de dejar la sección radial expuesta y lista para la microdensitometría y el análisis directo con espectroscopía NIR. Debido a que la corteza se desprende durante el aserrado, se marcó la porción más cercana a la médula con un rotulador de color. Para diferenciarlas de las muestras de barreno, a estas muestras se las denominó “planchetas”.

Determinación de las propiedades de referencia a nivel de rama

La metodología para la determinación de las características físicas, anatómicas e hidráulicas llevadas a cabo a nivel de rama se encuentra ampliamente detallada en el capítulo 4. En la tabla 6.2 se muestra un resumen de las diferentes determinaciones realizadas, así como el método empleado.

Tabla 6.2. Cuadro resumen de las diferentes determinaciones llevadas a cabo en ramas y fuste.

Órgano	Características	Variable	Método
Rama	Físicas	Densidad básica, DB (g cm^{-3})	Desplazamiento de fluidos y pesada (capítulo 4)
	Anatómicas	Diámetro de vasos, DV (μm)	Microscopía óptica (capítulo 4)
		Frecuencia de vasos, FV (mm^{-2})	
		Diámetro hidráulico, Dh (μm)	
		Área de halo/área de vasos, RHV (adim.)	
		Tamaño del halo, Ha (μm^2)	
	Hidráulicas	Fracción de pared de fibras, FPF (%)	Método de la pipeta (capítulo 4)
		Radio por milímetro lineal, Rmm (mm^{-1})	
	Espectrales	Conductividad hidráulica específica máxima, ks_{max} ($\text{kg m}^{-1}\text{MPa}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Inyección de aire (capítulo 4)
		P_{50} (MPa)	
P_{12} (MPa)			
P_{88} (MPa)			
Pendiente de la curva, $pendiente$ (% MPa^{-1})			
Fuste	Espectros NIR (10.000 a 4.000 cm^{-1})	FT-NIR por reflectancia difusa (presente capítulo)	
	Físicas	Microdensidad de la madera, DX_{minima} , DX_{media} y DX_{maxima} (g cm^{-3})	Densitometría de rayos X (presente capítulo)
	Espectrales	Espectroscopía NIR (8.000 a 4.000 cm^{-1})	FT-NIR por reflectancia difusa (presente capítulo)

Determinación de microdensidad de la madera por rayos X

La densidad de la madera de las planchetas secas al aire se midió usando la lectura indirecta de la densitometría de rayos X, de acuerdo con el procedimiento desarrollado por Polge (1966), lo cual implica que ni el volumen ni el peso de las muestras fue determinado. Los estudios de Polge (1966, 1978) han demostrado que, en las

determinaciones con rayos X, la variación en el contenido de agua entre muestras es muy bajo (menos del 0,2%). Además, este método no es afectado por los niveles de variación en el contenido de agua dentro del rango de condiciones de la habitación (Alves et al. 2012). Se tomaron radiografías de las muestras, agrupadas en conjuntos de aproximadamente 19 planchetas, que se dispusieron en placas preparadas para tal fin. Debido a que no es posible identificar fácilmente las muestras en la radiografía, se realizaron esquemas de la ubicación de las muestras dentro de la placa para identificarlas posteriormente. Las radiografías obtenidas fueron escaneadas con una resolución de 1.000 ppp (puntos por pixel) y fueron procesadas con el software WinDENDRO (Regent Instruments Inc., Canadá) (Guay et al. 1992; Figura 6.7).

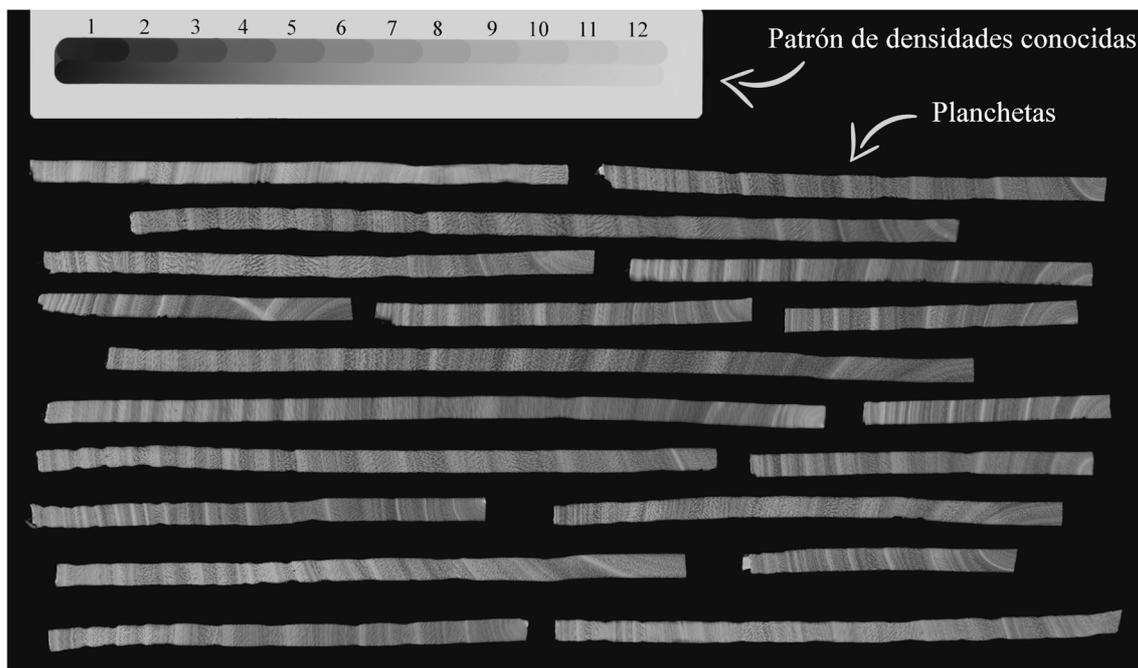


Figura 6.7. Radiografía obtenida en laboratorio de planchetas de *Eucalyptus viminalis* y *E. globulus*.

De esta forma se obtuvieron los perfiles de densidad radiales con una resolución espacial de 25 μm (es decir, una medida de densidad cada 25 μm a lo largo del radio), los cuales fueron calibrados contra un patrón de densidad conocida (12 niveles de densidad) que también se pasó por rayos X junto con las muestras (Figura 6.7). Los perfiles de microdensidad fueron procesados y analizados mediante el uso del software de análisis de datos R versión 3.5.1 (R Development Core Team, 2008) (Figura 6.8).

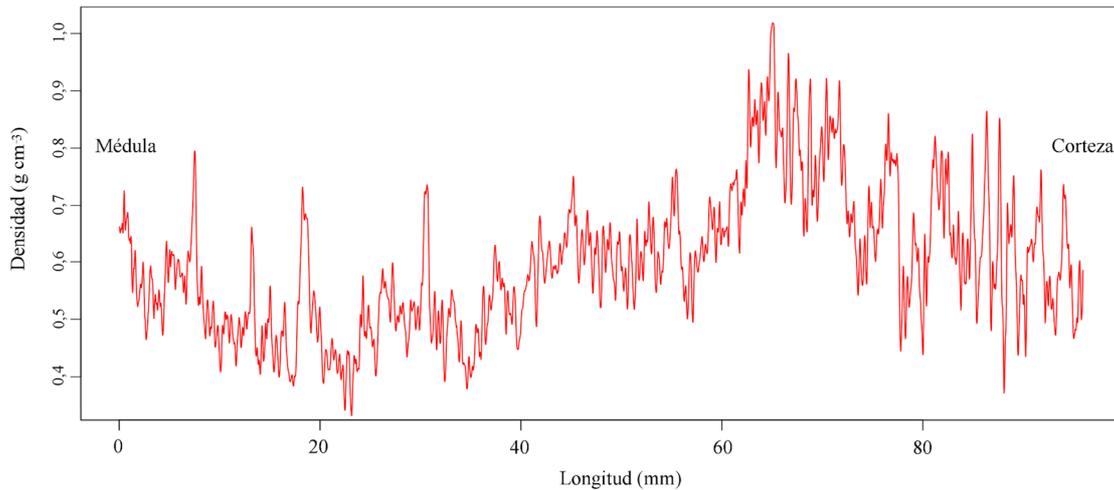


Figura 6.8. Perfil de microdensidad típico obtenido de una plancheta de *Eucalyptus* spp.

Adquisición de espectros NIR

Las muestras de ramas y de fuste (planchetas) fueron almacenadas dentro de una cámara bajo condiciones controladas de temperatura y humedad (21 °C y 60%, respectivamente) hasta el momento de realizar la determinación, para así garantizar un contenido de humedad uniforme en la muestra. La toma de espectros se realizó con un espectrofotómetro de transformada de Fourier con capacidad de trabajo en el rango del infrarrojo y del infrarrojo cercano (FT-IR y FT-NIR, respectivamente) PerkinElmer modelo Spectrum 400 (Waltham, EE. UU.), utilizando el módulo NIRA (esfera de integración). Los espectros NIR fueron colectados en modo de reflectancia difusa, dentro del rango de 10.000-4.000 cm^{-1} , con una resolución espectral de 8 cm^{-1} (en longitudes de onda: 1.000-2.500 nm, 2 nm de resolución espectral). Se promediaron 64 escaneos por cada espectro, y se utilizó como estándar de comparación la resina termoplástica Spectralon® (usado como fondo o *background*). Estos espectros fueron tomados a lo largo de un mes bajo condiciones de laboratorio que, en promedio, correspondieron a 36,2% de humedad relativa y 24 °C de temperatura. Debido a las características particulares de las muestras correspondientes a cada órgano, se ajustaron protocolos específicos:

a) Ramas

Dado que la porción central de las ramas fue removida luego de la determinación de las propiedades hidráulicas para determinar las características anatómicas de la madera, por cada rama existían dos segmentos: el segmento 1, correspondiente a la porción de la rama más cercana a la inserción de la misma (extremo proximal), y el segmento 2, correspondiente a la porción más cercana al final de la misma (extremo distal). El protocolo específico para la toma de espectros en ramas consistió en:

1. En primer lugar, se cortó una sección de los extremos de cada segmento de rama para eliminar la parte que pudiera haber estado expuesta a oxidación de sus constituyentes (Figura 6.9, sección de color azul).
2. Dentro de cada segmento, el espectro **1** se tomó en la sección transversal más alejada del centro de la rama y el espectro **2** en la cara transversal más cercana al centro (Figura 6.9). Para la toma de estos espectros se utilizaron reductores de rayo para ajustar la salida de la esfera de integración al diámetro de la rama, a fin de minimizar la cantidad de radiación no interceptada por la muestra.
3. Los espectros sobre el lateral de la rama se tomaron partiendo desde la porción más cercana al centro de la rama, tomándose primero los espectros **3** y **5** sobre la parte expuesta a tensión (parte superior de la rama) y luego en la parte opuesta, los espectros **4** y **6**. Los espectros **3** y **4** fueron aquellos más cercanos al centro de la rama. La distancia entre los espectros tomados en los laterales fue de 1 cm (Figura 6.9).
4. Para la correcta identificación de los espectros tomados se utilizó la siguiente convención: especie - rama - segmento - espectro. Ejemplo: eg-1A-1-001; especie: *Eucalyptus globulus*, rama: 1A, segmento: 1, espectro: 1.

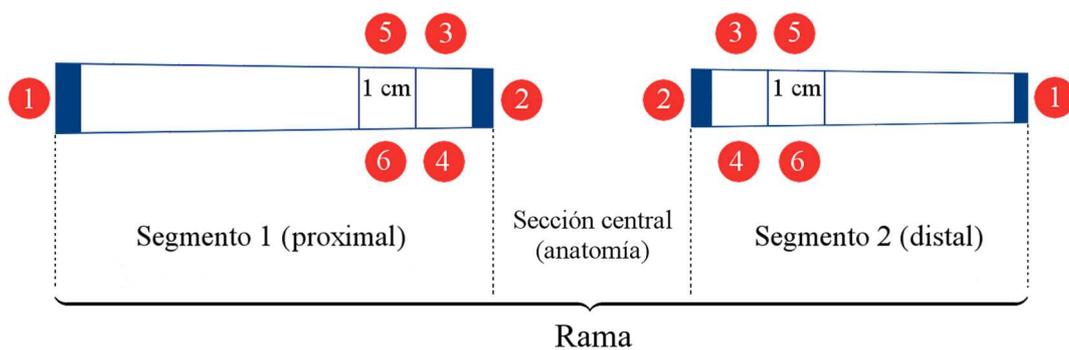


Figura 6.9. Diagrama de la toma de espectros en las ramas

b) Fuste

Para la toma de espectros en este compartimento se utilizaron las mismas planchetas utilizadas para la obtención de perfiles de microdensidad.

1. A cada plancheta se le midió la longitud y se dividió en segmentos de 1 cm. En caso de que la longitud no coincidiera exactamente con un múltiplo, se consideró como número de segmentos al múltiplo mayor más cercano. Ejemplo: longitud de la muestra = 10,7 cm => número de segmentos = 11.
2. Se tomó un espectro NIR por cada segmento sobre una de las caras radiales de la plancheta, con preferencia por aquella que presentara mejor estado (se prestó especial atención a que no presentara marcas de quemadura por la sierra).
3. Se comenzó por el extremo más cercano a la corteza donde se tomó el primer espectro. Una vez obtenido, la plancheta se corrió 1 cm para llegar al siguiente

segmento y tomar el espectro, continuando de la misma forma hasta terminar en el extremo opuesto de la muestra (el más cercano al centro del árbol; Figura 6.10).

4. Para la correcta identificación de los espectros se utilizó la siguiente convención: especie + id de la muestra + espectro. Ejemplo: ev216013; especie: *Eucalyptus viminalis*, id de la muestra: 216, espectro: 13.

El número total de espectros NIR obtenidos corresponde a la sumatoria de los segmentos de cada muestra.

$$\sum_{i=1}^n x = x_i + \dots + x_n$$

Donde x es el número de segmentos de 1 cm de longitud sobre los cuales se obtuvieron los espectros (Figura 6.10).

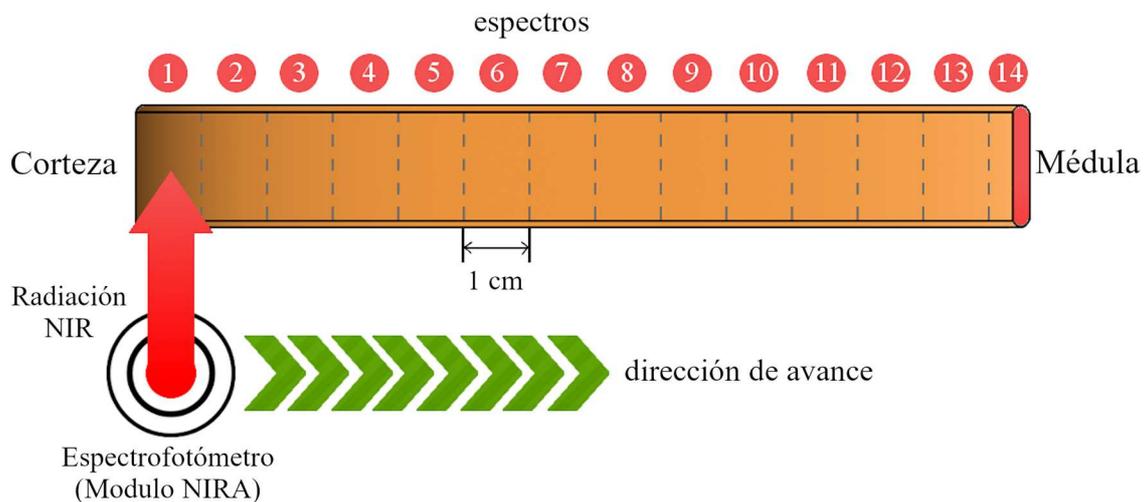


Figura 6.10. Diagrama de la toma de espectros en planchetas obtenidas a partir de muestras de barreno de *Eucalyptus* spp.

Procesamiento de los datos

a) Perfiles de microdensidad

Los perfiles de microdensidad obtenidos por densitometría de rayos X fueron procesados a través del software de análisis de datos R. De acuerdo con la longitud de las muestras, y teniendo en cuenta que la adquisición de espectros fue llevada a cabo con un centímetro de espaciamiento, se tomaron estos segmentos como referencia y se agruparon los puntos de microdensidad, obtenidos cada 25 μm , para que coincidan con esa división. Es decir, a cada segmento completo de 1 cm (10.000 μm) le correspondieron 400 datos de microdensidad. La división de los segmentos se realizó de manera que los segmentos menores a 1 cm (debido a la no coincidencia del largo de rama con un múltiplo completo) correspondieran a la porción más cercana a la médula, de manera de tener una mejor

representación de la porción de fuste correspondiente al área de conducción activa (Figura 6.11). Sobre cada segmento se determinó la densidad mínima ($DX_{\text{mínima}}$), media (DX_{media}) y máxima ($DX_{\text{máxima}}$).

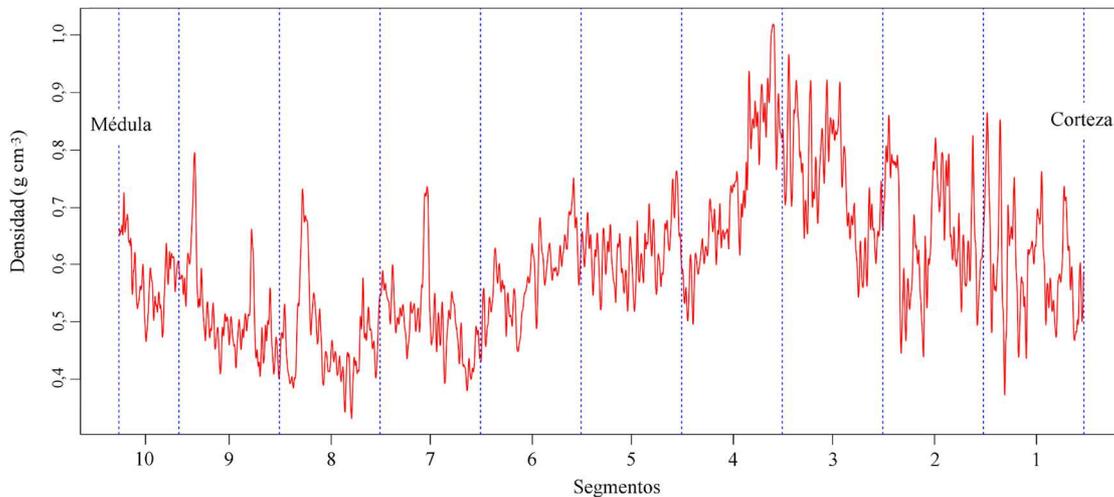


Figura 6.11. Delimitación de segmentos en un perfil de microdensidad obtenido por la técnica de rayos X a partir de una plancheta de *Eucalyptus* spp.

b) Espectros NIR

De acuerdo con el órgano considerado (fuste o rama), el procesamiento de los espectros tuvo particularidades:

- *Fuste*: consistió en el recorte de los espectros a las frecuencias de ondas comprendidas entre los 8.000 y los 4.000 cm^{-1} , debido a que, por lo general, el rango entre 10.000 y 8.000 cm^{-1} no es muy informativo para la calibración de microdensidad y contiene una proporción de ruido/señal alta (Segura 2014).
- *Ramas*: a diferencia de los espectros de fuste, aquí se realizaron calibraciones considerando no solo el rango utilizado para esas calibraciones sino toda la longitud de los espectros obtenidos (10.000 a 4.000 cm^{-1}). Esto fue así porque en un trabajo previo (Luss et al. 2015), se encontró que el rango entre 9.403 y 6.071 cm^{-1} resultaba significativo para explicar la variación en la vulnerabilidad a la cavitación. En base a este antecedente se decidió analizar todo el rango del espectro.

Luego de este procesamiento previo, y a efectos de reducir o eliminar el ruido de la información, minimizar la información irrelevante y mejorar las calibraciones, los espectros obtenidos en cada órgano fueron transformados matemáticamente mediante diferentes pre-tratamientos:

- *Sin transformación (RAW)*
- *Normalización (N)*: consiste en el escalado de cada espectro por su media y desvío estándar a lo largo del rango seleccionado con el objetivo de minimizar las variaciones.

- *Destendenciado (DT)*: consiste en una normalización del espectro que, además, le quita la tendencia de aumento de la absorbancia a medida que la frecuencia disminuye.
- *Primera derivada (D 1)*: las derivaciones son utilizadas para capturar variaciones útiles que no están disponibles directamente en los espectros crudos o normalizados. Estas eliminan o disminuyen la señal de fondo y mejoran la resolución visual. Esta derivación en particular fue realizada mediante el algoritmo de “Savitsky-Golay” con una ventana de 37 puntos (74 cm^{-1}).
- *Segunda derivada (D 2)*: Se utilizó el mismo algoritmo que para la primera derivada, pero con una ventana de 61 puntos (122 cm^{-1}).
- *Primera derivada de datos normalizados (ND 1)*.
- *Segunda derivada de datos normalizados (ND 2)*.

Una vez transformados, las diferentes versiones de los espectros fueron calibrados independientemente frente a las propiedades analizadas (Tabla 6.2). Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) de los espectros obtenidos a efectos de investigar los patrones de variación de los mismos, tanto entre especies como (en el caso de las muestras de rama) entre secciones de estudio.

Calibración de los modelos

Para el análisis a nivel de fuste se calibraron los diferentes pre-tratamientos de espectros NIR de cada segmento contra los valores de microdensidad máxima, media y mínima promedio para ese segmento (obtenidos a través de densitometría de rayos X). Para el análisis a nivel de rama se calibraron los pre-tratamientos de los espectros NIR obtenidos en la sección longitudinal y transversal de la rama individualmente, y de ambos en conjunto, frente a las variables determinadas por métodos de referencia a nivel de rama (densidad de madera, vulnerabilidad a la cavitación, conductividad y características anatómicas, Tabla 6.2).

Las calibraciones fueron desarrolladas utilizando regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS-R), mediante el uso del paquete *pls* del software R. Se utilizó un conjunto de funciones desarrolladas para este tipo de análisis bajo un esquema de validación cruzada con 4 segmentos, 40 iteraciones y un máximo de 10 factores. Esto implicó dividir aleatoriamente el set de calibración en 4 grupos, donde 3 de ellos fueron utilizados para desarrollar el modelo PLS, el cual se validó contra el cuarto grupo. Este proceso se repitió 4 veces hasta que todos los grupos fueron predichos al menos una vez, a lo largo de un proceso iterativo compuesto de 40 ciclos (Figura 6.12 a). Complementariamente, se realizó una validación cruzada dejando uno afuera (método *leave-one-out*, también llamada validación cruzada completa), consistente en quitar una muestra del total y utilizar el resto para desarrollar el modelo PLS, el cual se valida contra la muestra que se quitó. En este caso, el proceso se repite tantas veces como muestras existan (Figura 6.12 b). Estos procesos fueron llevados a cabo para cada pre-tratamiento evaluado.

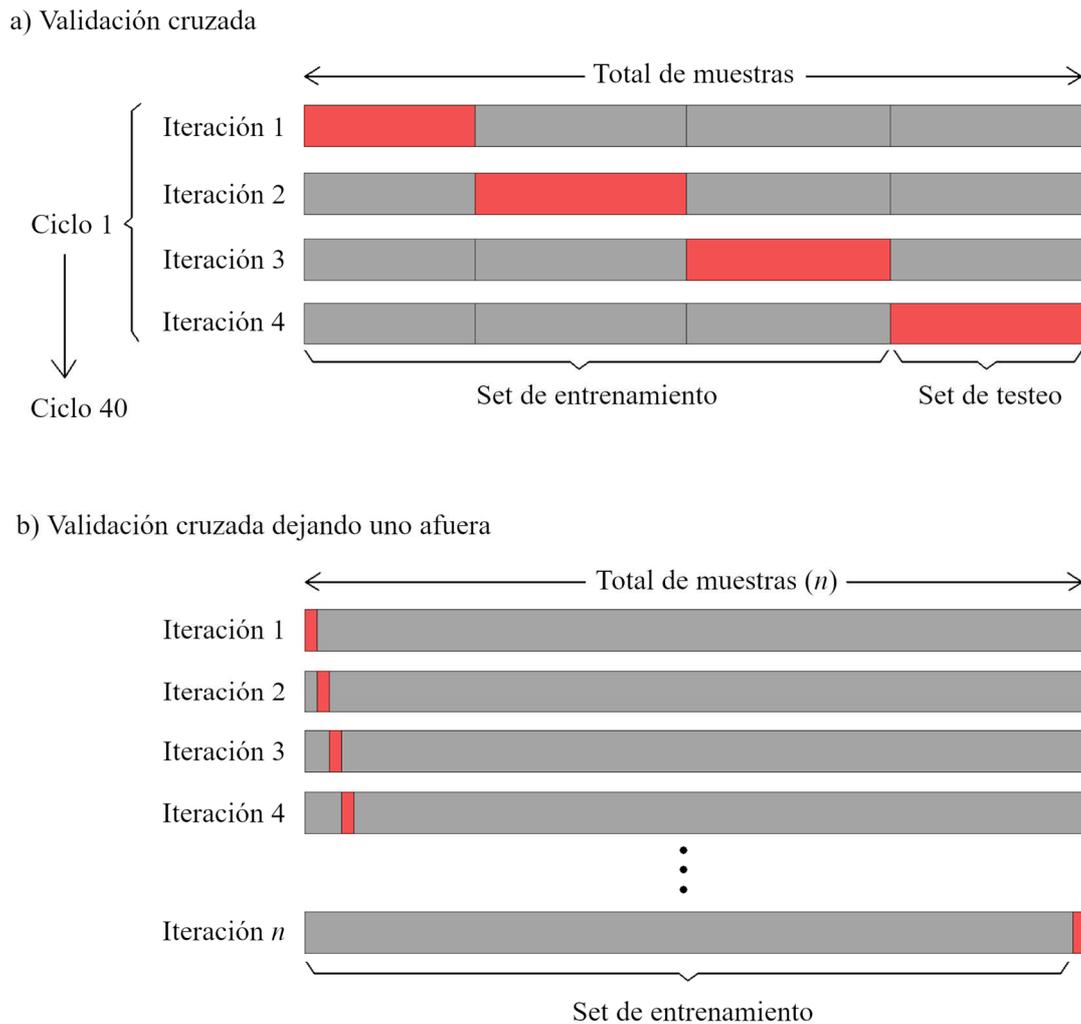


Figura 6.12. Métodos utilizados para calibrar los modelos de regresión PLS entre los espectros NIR y las distintas variables medidas en la madera. a) Validación cruzada. b) Validación cruzada completa.

El ajuste de los modelos se realizó en tres etapas:

1. Ajuste de un modelo para el conjunto de muestras sin detección de *outliers*. En esta etapa se seleccionó el tipo de espectros (en el caso de ramas) y la transformación que mejor describieron la variabilidad de cada característica analizada.
2. Ajuste del modelo anterior con detección de *outliers*. Aquí se determinó el número de muestras para cada variable analizada. La identificación y remoción de *outliers*, ya sean debidos a inconsistencias en la toma de espectros o en la medición de las propiedades de referencia frente a las cuales se calibraron, se realizó mediante el establecimiento de límites de p-valor (mientras más alto, mayor cantidad de *outliers* identificados y eliminados).
3. Ajuste del modelo con detección de *outliers* y selección de números de onda con coeficientes de regresión significativos para ser incluidos en los modelos PLS de las características analizadas. La identificación de números de onda se realizó de forma

automática a través del algoritmo CARS, tal como lo sugieren Li et al. (2009), utilizándose como límite 500 iteraciones por pre-tratamiento.

A fin de establecer un análisis comparativo, en el caso de la calibración a nivel de fuste, el pre-tratamiento que presentó el mejor desempeño general en la última etapa (selección de bandas) fue utilizado en una etapa adicional en la cual se realizó una comparación de bandas entre especies, por variable (densidad mínima, media y máxima por segmento). Las ondas que presentaron coeficientes significativos para ambas especies fueron conservadas y se calibraron frente al conjunto de datos depurados (sin *outliers*), por especie y en conjunto.

Estadísticos de la calibración

Para caracterizar cómo las diferentes calibraciones se ajustaron a los datos, se utilizaron diferentes estadísticos: el coeficiente de determinación de la validación cruzada (R^2), la raíz del error cuadrático medio de la validación cruzada (RECM), la relación entre desempeño y desvío (RPD), el número de *outliers* detectados y eliminados, y el número de factores utilizados por el modelo. El estadístico RPD fue introducido por Williams y Norris (1987) y fue calculado en este trabajo como la proporción entre el desvío estándar de los datos de referencia y el error estándar de predicción de la validación cruzada:

$$RPD = \frac{D.E. \text{ datos}}{E.E. VC}$$

El cálculo de RPD permite la comparación de calibraciones que tienen diferente rango de datos. A mayor RPD, más precisa es la descripción de los datos por el modelo. Un RPD mayor a 2,5 es considerado satisfactorio para la selección en programas de mejora, a pesar de que se ha mostrado que con un RPD de aproximadamente 1,5, la espectroscopía NIR puede ser usada como una herramienta de muestreo inicial (Schimleck et al. 2003).

En cada etapa de ajuste, la selección de los mejores modelos se realizó a través de un indicador (*IAM: Indicador de Aptitud del Modelo*) elaborado a tal fin, a partir del número de factores utilizados por el modelo (nf), el coeficiente de determinación de la validación cruzada (R^2) y la proporción de *outliers* (out) respecto del número total de muestras (n):

$$IAM = \left[\frac{(11 - nf)}{10} \right] \cdot R^2 \cdot \left[1 - \left(\frac{out}{n} \right) \right]$$

Respecto del número de factores del modelo (primer componente de la ecuación), éste es de suma importancia ya que la selección de muchos factores producirá un sobreajuste de los datos y dará lugar a un modelo que probablemente solo sea adecuado para los datos de los cuales se derivó (especificidad). Para este trabajo, el número óptimo de factores de regresión se determinó automáticamente utilizando el criterio R de Wold (Wold 1978), el cual consiste en seleccionar el modelo con el primer mínimo local del error de validación

cruzada. En este sentido, el primer componente de la ecuación busca penalizar aquellos modelos que presenten mayor cantidad de factores. Al delimitar un máximo de 10 factores este componente puede variar entre 0,1 y 1, correspondiéndoles el valor de 1 a aquellos modelos que utilizan un solo factor. En cuanto a la cantidad de *outliers* (tercer componente de la ecuación), se buscó penalizar a los modelos que quitaran mayor cantidad de muestras. Así, a los modelos que utilizaron todas las muestras les correspondió un valor de 1 para este componente, mientras que aquellos que descartaron la mitad de las muestras, por ejemplo, presentaron un valor de 0,5. Como se desprende de su forma de cálculo, el valor de IAM varió entre 0 y 1, donde los valores más cercanos a 1 indican una mayor aptitud del modelo para describir la variabilidad de las muestras analizadas. El uso de este indicador no solo permitió la comparación y selección de modelos en cada etapa, sino también la ponderación de los modelos obtenidos en cada etapa respecto de una misma variable, así como la comparación del ajuste entre las diferentes variables.

Resultados

Espectros NIR

En la figura 6.13 se grafican los espectros NIR obtenidos a partir de ramas y fuste, para ambas especies, con los respectivos pre-tratamientos aplicados a los mismos. Gráficamente se observa que los espectros provenientes de los diferentes órganos presentan características diferenciales. En este sentido, los espectros obtenidos en ramas, aunque menores en cantidad, presentan un mayor nivel de variación respecto a aquellos obtenidos en las muestras de barreno. Esta variación diferencial en los espectros obtenidos (Figura 6.13 *a*), si bien no afectó la morfología de los espectros, se reprodujo en las subsiguientes transformaciones de los espectros (Figura 6.13 *b-g*). Estas transformaciones produjeron cambios espectrales, con la correspondiente aparición de picos y valles a diferentes longitudes de onda (o frecuencias), que aumentaron o disminuyeron la variabilidad en determinadas porciones del espectro. El análisis de componentes principales (ACP) realizado con los espectros originales y transformados a nivel de rama para cada especie en ambas secciones de estudio (longitudinal y transversal) indica, por un lado, que los espectros de ambas especies poseen un patrón de variación similar, ya que no es posible realizar una separación de los datos por especie (Figura 6.14, *columna izquierda*). En contraste, el análisis a nivel de sección de estudio evidencia que ciertas transformaciones producen cambios en los patrones de variación de los espectros obtenidos en cada sección, siendo posible discernirlas (Figura 6.14, *columna derecha*). Esto indicaría que los espectros presentan características particulares en función de la sección de la rama en la cual fueron tomados.

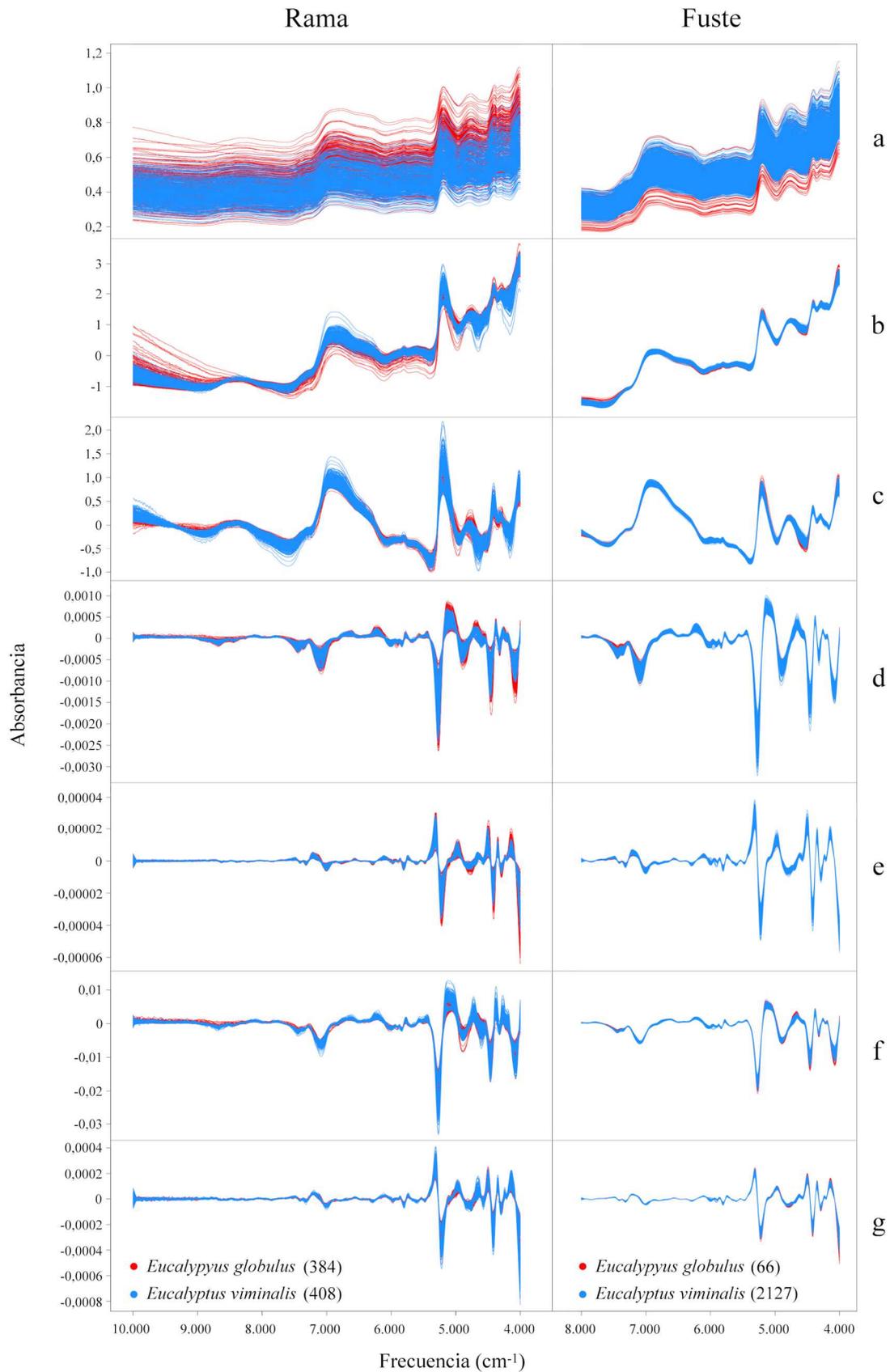


Figura 6.13. Espectros de absorción NIR obtenidos a nivel de rama y fuste (n = 792 y 2193, respectivamente). a) Sin transformación. b) Normalización. c) Destendenciado. d) Primera derivada. e) Segunda derivada. f) Primera derivada de datos normalizados. g) Segunda derivada de datos normalizados.

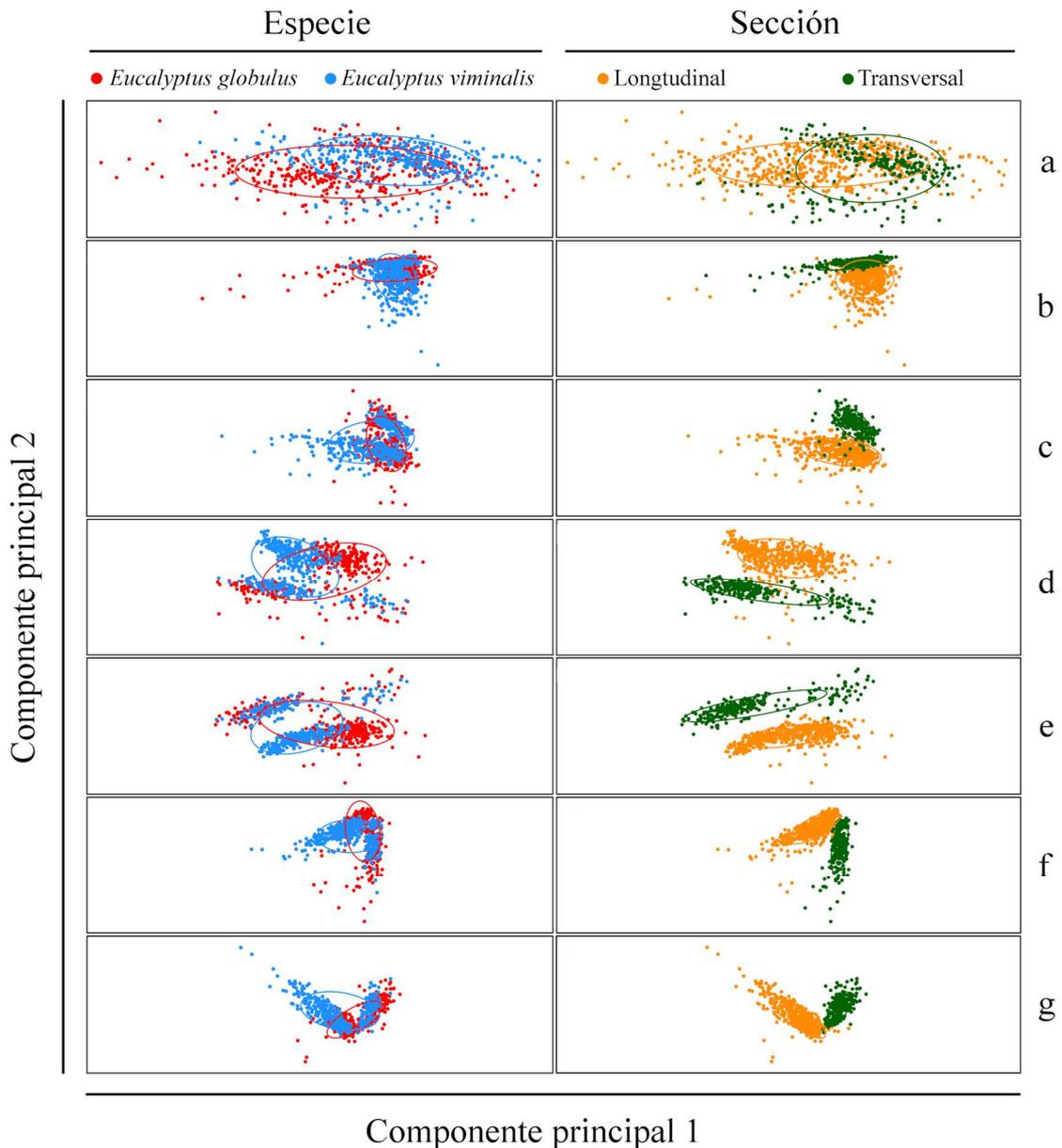


Figura 6.14. Análisis de componentes principales (ACP) de los espectros obtenidos a nivel de rama, discriminado por especie y sección de toma de espectros -longitudinal o transversal-. a) Sin transformación. b) Normalización. c) Destendenciado. d) Primera derivada. e) Segunda derivada. f) Primera derivada de datos normalizados. g) Segunda derivada de datos normalizados.

Calibración a nivel de rama

En consonancia con los resultados previamente expuestos se procedió a realizar la calibración de los modelos predictivos de las propiedades anatómicas, físicas e hidráulicas tomando a las especies en conjunto, frente a los espectros obtenidos en cada sección individualmente y en conjunto (Tabla 6.3). Allí se observa, por un lado, que no existe un único tipo de espectro y transformación que presente el mejor ajuste para todas las variables evaluadas, si no que éstos dependen de la variable considerada.

Tabla 6.3. Resumen de las calibraciones a nivel de rama para los modelos de cada variable, obtenidas a través de tres etapas sucesivas.

Variable	Espectros	Transf.	Etapas	nf	R ²	RECM	RPD	n	Outliers	Ondas	IAM
DB	L + T	ND 2	1	2	0,54	0,042	1,48	66			0,482
			2	2	0,71	0,034	1,89	59	7		0,574
			3	2	0,73	0,033	1,93	59	7	283	0,585
ks max	T	ND 2	1	1	0,02	0,885	1,02	66			0,023
			2	4	0,51	0,441	1,45	55	11		0,299
			3	4	0,52	0,437	1,46	55	11	124	0,304
P ₅₀	L	RAW	1	1	0,01	0,987	1,01	64			0,010
			2	2	0,28	0,425	1,20	44	20		0,175
			3	2	0,39	0,393	1,29	44	20	23	0,239
P ₁₂	L + T	D 1	1	1	0,04	0,740	1,03	64			0,042
			2	4	0,57	0,349	1,55	49	15		0,306
			3	4	0,75	0,283	2,02	50	14	11	0,409
P ₈₈	L + T	ND 2	1	2	0,05	2,682	1,04	64			0,047
			2	2	0,59	0,859	1,58	45	19		0,373
			3	3	0,80	0,630	2,24	46	18	9	0,457
pendiente	L	D 1	1	2	0,18	11,700	1,11	64			0,161
			2	2	0,57	4,103	1,56	46	18		0,372
			3	2	0,83	3,108	2,47	45	19	5	0,526
DV	T	D 2	1	1	0,02	4,684	1,02	54			0,019
			2	4	0,46	3,126	1,38	51	3		0,304
			3	4	0,74	2,164	2,01	51	3	409	0,492
FV	L	D 2	1	1	0,46	13,050	1,37	54			0,459
			2	1	0,70	8,398	1,87	46	8		0,602
			3	1	0,71	8,294	1,89	46	8	380	0,608
Dh	L + T	D 1	1	1	0,11	5,661	0,96	54			0,114
			2	2	0,51	2,056	1,45	37	17		0,313
			3	2	0,78	1,282	2,18	29	25	473	0,377
RHV	L + T	D 2	1	2	0,26	0,449	1,18	54			0,236
			2	2	0,79	0,205	2,19	43	11		0,563
			3	1	0,81	0,195	2,30	43	11	13	0,642
Ha	L	D 2	1	1	0,68	615,85	1,79	54			0,681
			2	1	0,81	381,16	2,34	46	8		0,692
			3	1	0,82	377,82	2,36	46	8	25	0,695
FPF	T	ND 2	1	2	0,25	0,060	1,17	54			0,223
			2	3	0,54	0,045	1,49	50	4		0,398
			3	3	0,75	0,033	2,02	48	6	69	0,533
Rmm	T	RAW	1	2	0,01	3,324	1,01	54			0,010
			2	1	0,33	1,780	1,24	37	17		0,228
			3	1	0,40	1,665	1,31	36	18	3	0,267

Referencias: Variables. DB: densidad básica; P₅₀: potencial agua al 50% de pérdida de conductividad; P₁₂: potencial agua al 12% de pérdida de conductividad; P₈₈: potencial agua al 88% de pérdida de conductividad; pendiente: pendiente de la curva de vulnerabilidad a la cavitación; DV: diámetro de vasos; FV: frecuencia de vasos; Dh: diámetro hidráulico; RHV: relación entre el tamaño de halo y el tamaño del vasos; Ha: tamaño del halo; FPF: fracción de pared de fibras; Rmm: radios por milímetro lineal. **Espectros.** L: longitudinales; T: transversales; L + T: longitudinales y transversales (juntos). **Transformaciones.** RAW: sin transformación; D 1: primera derivada; D 2: segunda derivada; ND 2: segunda derivada de datos normalizados. **Etapas.** 1: sin detección de outliers; 2: con detección de outliers; 3: con detección de outliers y números de onda con coeficientes significativos. **Abreviaturas y siglas.** Transf: transformaciones; nf: número de factores; R²: coeficiente de determinación de la validación cruzada; RECM: raíz del error cuadrático medio; RPD: relación entre desempeño y desvío; n: número de muestras usadas para la calibración; Outliers: número de muestras descartadas; Ondas: números de onda con coeficientes de regresión significativos; IAM: indicador de aptitud del modelo.

En este sentido, 4 de las variables están mejor representadas por los espectros transversales, 4 por los longitudinales y los 5 restantes por la combinación de ambos. A su vez, 2 de ellas presentan un mejor ajuste para los datos sin transformación, 3 con la primera derivada de estos datos, 4 con la segunda derivada de los mismos y 4 con la segunda derivada de los datos normalizados. Debido a la penalización impuesta, ninguno de los modelos presentó más de 4 factores. El indicador de aptitud de los modelos presentó, para todas las variables analizadas, una mejora progresiva a través de las sucesivas etapas, lo cual fue resultado de una evolución favorable de los indicadores de bondad de ajuste analizados, particularmente del coeficiente de determinación (R^2) utilizado para su cálculo. Si comparamos las calibraciones realizadas en la tercera etapa de análisis (Tabla 6.4) se observa que las variables mejor modeladas fueron aquellas correspondientes a las características del halo (conjunto de tipos celulares que acompañan al vaso, compuesto por traqueidas vasicéntricas y por parénquima axial) y la frecuencia de vasos, seguidas por la densidad básica, la fracción de pared de fibras y la *pendiente* de la curva de vulnerabilidad a la cavitación. En el otro extremo, las variables que presentaron el menor nivel de ajuste fueron P_{50} y el número de radios por milímetro lineal, cuyas calibraciones se realizaron sobre los espectros sin transformación. En esta etapa, el porcentaje de *outliers* detectados y eliminados del modelo varió entre el 5,6% para diámetro de vasos y el 46,3% para diámetro hidráulico. La detección de números de onda con coeficientes significativos presentó mayor especificidad para algunas de las variables consideradas, y osciló entre el 0,1% y 15,8% del total de longitudes de onda de los espectros.

Tabla 6.4. Comparación de la calibración de los modelos para las diferentes variables realizadas en la tercera etapa del análisis.

Variable	nf	R ²	RECM	RPD	n	Outliers	Ondas	IAM	Orden
<i>Ha</i>	1	0,82	377,82	2,36	46	8 14,8%	25 0,8%	0,695	1
<i>RHV</i>	1	0,81	0,1952	2,30	43	11 20,4%	13 0,4%	0,642	2
<i>FV</i>	1	0,71	8,2944	1,89	46	8 14,8%	380 12,7%	0,608	3
<i>DB</i>	2	0,73	0,0330	1,93	59	7 10,6%	283 9,4%	0,585	4
<i>FPF</i>	3	0,75	0,0329	2,02	48	6 11,1%	69 2,3%	0,533	5
<i>pendiente</i>	2	0,83	3,1076	2,47	45	19 29,7%	5 0,2%	0,526	6
<i>DV</i>	4	0,74	2,1636	2,01	51	3 5,6%	409 13,6%	0,492	7
P_{88}	3	0,80	0,6298	2,24	46	18 28,1%	9 0,3%	0,457	8
P_{12}	4	0,75	0,2830	2,02	50	14 21,9%	11 0,4%	0,409	9
<i>Dh</i>	2	0,78	1,2816	2,18	29	25 46,3%	473 15,8%	0,377	10
<i>ks max</i>	4	0,52	0,4369	1,46	55	11 16,7%	124 4,1%	0,304	11
<i>Rmm</i>	1	0,40	1,6652	1,31	36	18 33,3%	3 0,1%	0,267	12
P_{50}	2	0,39	0,3927	1,29	44	20 31,3%	23 0,8%	0,239	13

Al analizar la gráfica de valores observados y esperados para las variables bajo análisis (Figura 6.15), es posible observar que las calibraciones de los modelos que presentaron mayor grado de ajuste fueron aquellas en las que la característica analizada presentó un mayor nivel de variabilidad interespecífica.

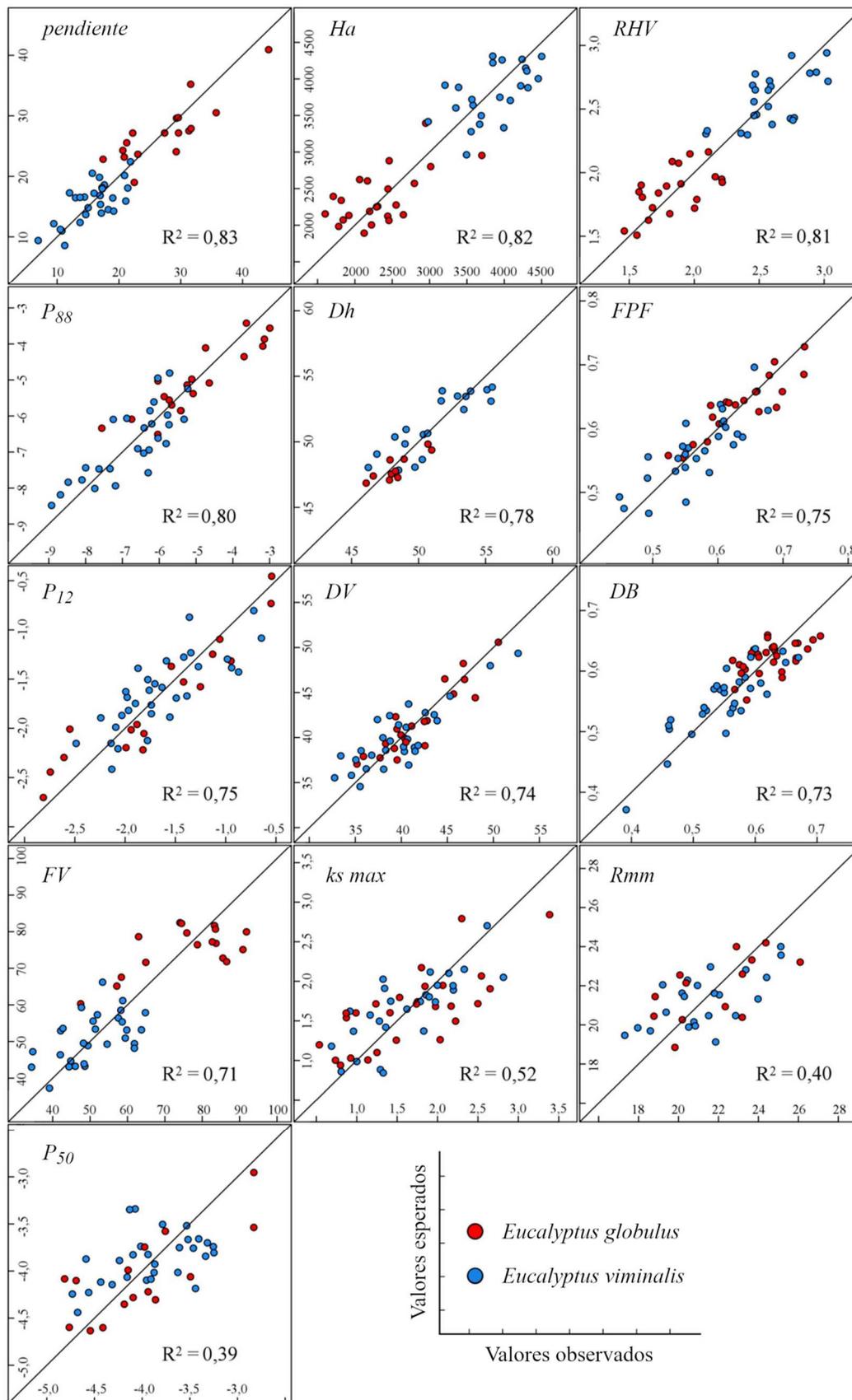


Figura 6.15. Valores observados versus valores esperados a partir de la calibración de modelos predictivos para las variables analizadas a nivel de rama, ordenadas en función del coeficiente de determinación (R^2). Las abreviaturas y unidades correspondientes a cada variable se encuentran en la tabla 6.2.

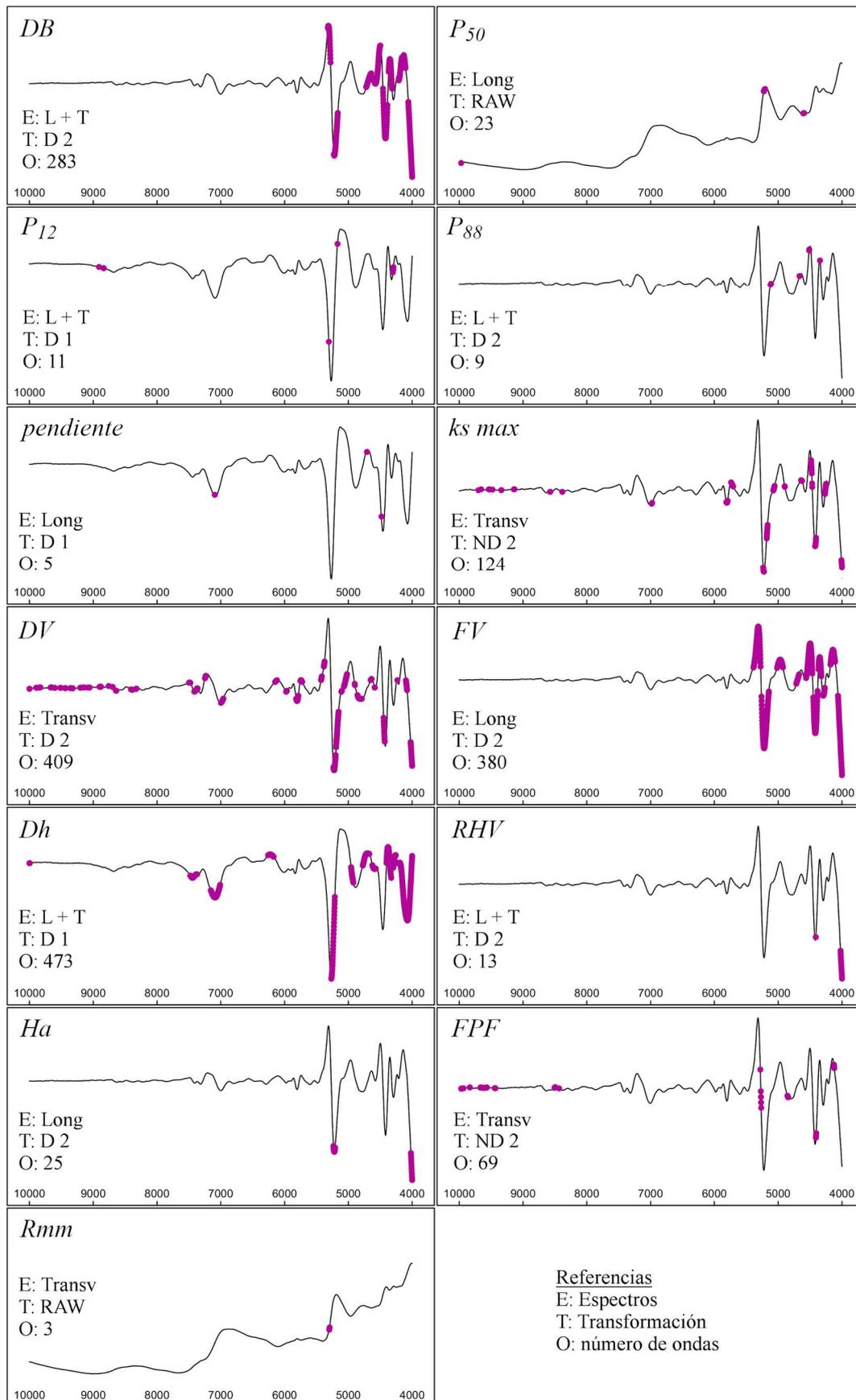


Figura 6.16. Números de onda con coeficientes de regresión significativos para las variables analizadas a nivel de rama, seleccionados a través del algoritmo CARS. Las abreviaturas y unidades correspondientes a cada variable se encuentran en la tabla 6.2.

Por el contrario, en aquellas variables donde se presentó el menor nivel de ajuste (P_{50} , R_{mm} y ks_{max}) las dos especies presentaron un alto nivel de superposición, con escasa variación interespecífica para esas características. Entre estas situaciones extremas existe un rango de situaciones con mayor o menor grado de solapamiento de las características analizadas (Fig. 6.15).

El análisis de las porciones del espectro seleccionadas por el algoritmo CARS para el modelado de las variables analizadas (Figura 6.16) muestra que, además del diferente número de ondas con coeficientes de regresión significativos, existen diferencias en la ubicación de esas ondas a lo largo del espectro. La comparación de estos sectores del espectro (Figura 6.17) permite observar que, mientras algunas de estas porciones son significativas para estimar más de una variable, existen otras zonas del espectro que no proveen información para ninguno de los caracteres analizados. En este sentido, la porción comprendida entre los 4.000 y 5.500 cm^{-1} fue la zona que presentó mayor cantidad de ondas con coeficientes de regresión significativos. Así, en este sector existe por lo menos una longitud de onda que contribuye de manera significativa en la estimación de las variables analizadas. A su vez, algunas de estas longitudes de onda contribuyen con la estimación de más de una variable al mismo tiempo, con ciertas porciones que son significativas para el modelado de hasta siete variables (4.000-4.008 cm^{-1}). Por otro lado, la porción entre 5.500 y 10.000 cm^{-1} presenta números de onda que resultan significativas para estimar 7 de las 13 variables analizadas (Figura 6.17).

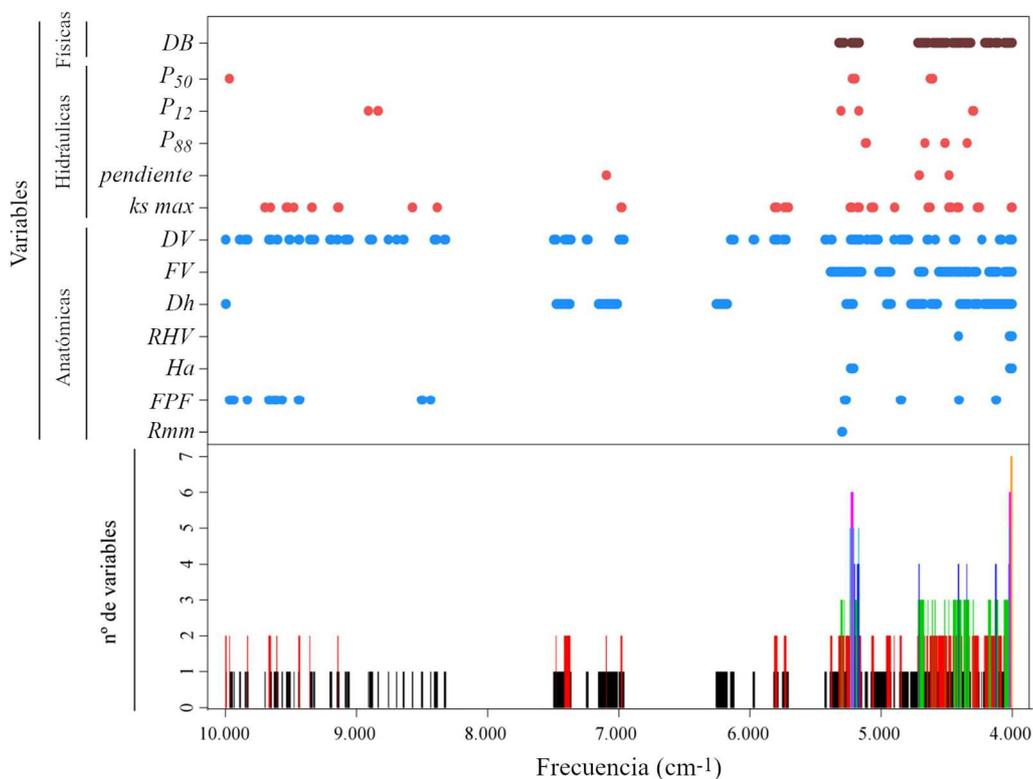


Figura 6.17. Comparación gráfica de las porciones del espectro con coeficientes de regresión significativos para el modelado de las variables analizadas a nivel de rama. *Parte superior:* zonas del espectro que son significativas para explicar las variables seleccionadas. *Parte inferior:* número de variables explicadas por cada sector del espectro. Las abreviaturas correspondientes a cada variable se encuentran en la tabla 6.2.

La densidad básica (*DB*) y la fracción de pared de fibras (*FPF*), dos variables relacionadas (entre otras cosas) con la proporción de paredes celulares presentes en la muestra, evidenciaron un nivel de ajuste (Figura 6.16) y un índice de aptitud (Tabla 6.4) similares, aunque fueron definidas por un número de ondas diferentes, si bien coincidieron en algunas de ellas (7 ondas en 3 zonas del espectro). Las variables hidráulicas presentaron un bajo número de ondas con coeficientes significativos, variando entre 5 y 23, para *pendiente* y P_{50} , respectivamente. A pesar de que estas ondas se ubicaron mayoritariamente entre las 4.000 y los 5.500 cm^{-1} no hubo coincidencias entre ellas. La conductividad hidráulica máxima evidenció un nivel de ajuste relativamente bajo. Comparada con las otras variables hidráulicas, esta presentó un mayor número de ondas seleccionadas, compartiendo pocas con ellas (una con P_{50} , una con P_{12} y otra con la *pendiente*, Figura 6.17), si bien hay que tener en cuenta que estas fueron estimadas a partir de diferentes transformaciones. Estrechamente relacionado con las variables hidráulicas, el diámetro de vasos fue una de las variables que, por el contrario, mostró menor especificidad en cuanto a la cantidad de ondas que resultaron significativas para su estimación (Figura 6.17). Esta característica fue calibrada con un elevado nivel de ajuste por medio de 409 ondas, las cuales estuvieron repartidas de manera relativamente homogénea a lo largo de todo el espectro, de manera análoga a la conductividad máxima, compartiendo con esta última un número considerable de ondas (54), en varias zonas (11) a lo largo del espectro. Relacionada con esta variable, el diámetro hidráulico fue la variable menos específica en este aspecto, siendo determinada por 473 ondas. Si bien presentó un nivel de ajuste similar al logrado para diámetro de vasos utilizando 2 factores (Tabla 6.4), debido a la cantidad de *outliers* descartados, su IAM fue relativamente bajo. Como era de esperarse, en base a su significado funcional que relaciona el tamaño de los elementos conductivos con el nivel de capacidad conductiva potencial, *Dh* compartió con *ks max* 3 zonas del espectro y 19 ondas con coeficientes significativos. Ambas variables indicadoras del tamaño de vasos (*Dh* y *DV*) compartieron 59 ondas entre sí, correspondientes a 7 porciones del espectro. Relacionada con ambas medidas de tamaño, la frecuencia de los elementos conductivos (es decir, la cantidad de vasos por unidad de superficie de xilema), fue la tercera variable con mayor cantidad de ondas detectadas y representó la tercera mejor calibración (de acuerdo con el IAM del modelo generado), con un coeficiente de determinación de 0,71, a partir de un solo factor. Esta variable presentó una gran cantidad de ondas en común tanto con *Dh* (181 ondas en 8 zonas del espectro) como con *DV* (67 ondas y 4 zonas), en la porción del espectro entre 4.000 y 5.500 cm^{-1} . Muy relacionado con las características de los vasos, el conjunto de sus células acompañantes, que aquí se ha denominado halo y que ha sido cuantificado a partir de dos variables (*Ha*: tamaño, y *RHV*: proporción de superficie respecto a los vasos), presentaron el mayor nivel de ajuste de todas las variables ensayadas, ubicándose en los dos primeros lugares del ranking elaborado según el IAM (Tabla 6.4). Estas presentaron, por un lado, un coeficiente de determinación elevado y, por el otro, solo fueron definidas a partir de un único factor PLS, con una baja proporción de *outliers*. La totalidad de segmentos del espectro que definieron ambas variables coincidieron, a su vez, con aquellas ondas que fueron significativas para determinar el diámetro de vasos. Por otro lado, a pesar del desempeño relativamente bajo de la calibración realizada para la cantidad

de radios por milímetro lineal, esta fue la que mayor especificidad mostró respecto de la porción del espectro utilizada para su estimación, siendo significativas solo 3 ondas, las cuales fueron compartidas con la frecuencia de vasos observada.

Calibración a nivel de fuste

Las diferentes modalidades y objetivos de muestreo perseguidos en la toma de las muestras de barreno influyeron en la longitud de las mismas, obteniéndose muestras de casi el doble de la longitud en el caso de *E. viminalis* (Tabla 6.5). Esto repercutió en el número medio y total de segmentos de 1 cm establecidos en las muestras de barreno de cada especie y, por lo tanto, en el número de espectros NIR disponibles para realizar la calibración de las variables analizadas. El análisis de la varianza de los datos de microdensidad mínima ($DX_{\text{mínima}}$), media (DX_{media}) y máxima ($DX_{\text{máxima}}$) obtenidos a partir del análisis y procesamiento de la información de microdensidad a nivel de segmentos muestra diferencias significativas entre especies para todas ellas. En este sentido, *E. globulus* presentó una densidad mayor que *E. viminalis* a nivel de fuste.

Tabla 6.5. Tabla resumen con el número de muestras de barreno utilizadas, longitud y cantidad de segmentos promedio para las dos especies analizadas, y resultados del análisis de la varianza y test *post hoc* de comparaciones múltiples de Tukey para microdensidad mínima, media y máxima promedio.

Especie	Muestras de barreno (n)	Longitud promedio (mm)	Segmentos promedio (n)	Segmentos totales (n)	$DX_{\text{mínima}}$ (g cm^{-3})	DX_{media} (g cm^{-3})	$DX_{\text{máxima}}$ (g cm^{-3})
<i>Eucalyptus globulus</i>	11	61,63	6	66	0,49 a	0,66 a	0,85 a
<i>Eucalyptus viminalis</i>	197	109,11	11	2127	0,42 b	0,56 b	0,74 b

A partir de los datos de densidad mínima, media y máxima obtenidos por análisis de microdensitometría de rayos X y de los espectros de absorción NIR se procedió a la calibración de los modelos (Tabla 6.6). Debido a la gran disparidad entre especies en cuanto al número de muestras de barreno, longitud y, consecuentemente, número de segmentos en cada una se optó por realizar calibraciones intraespecíficas. De esta manera se pretendió que la depuración del *set* de datos para la elaboración de los modelos respondiera a las características particulares del propio *set* y no a diferencias provenientes del desbalance en la representación de cada especie. De forma similar a lo observado en el caso de ramas, no existió un único pre-tratamiento de los espectros de absorción que capte la variabilidad observada en las características analizadas. En este sentido, los pre-tratamientos ND 1 (primera derivada de los datos normalizados) y DT (destendenciado) resultaron los más adecuados para 3 y 2 variables, respectivamente. Debido a la penalización impuesta en el cálculo del indicador de aptitud utilizado (IAM) ninguno de los modelos presentó más de 3 factores y, al finalizar la tercera etapa, solo uno de ellos ($DX_{\text{mínima}}$ para *E. globulus*) presentó 3 factores, mientras que el resto de las variables pudo ser modelada a partir de solamente 2 factores (Tabla 6.6).

Tabla 6.6. Resumen de las calibraciones de microdensidad para la elaboración de modelos predictivos de estas variables a nivel fuste, discriminados por especie, obtenidas a través de tres etapas sucesivas.

Especie	Variable	Transf.	Etapa	nf	R ²	RECM	RPD	N	Outliers	Ondas	IAM
<i>Eucalyptus globulus</i>	DX mínima	DT	1	2	0,3170	0,0895	1,2218	66	0		0,285
			2	3	0,7479	0,0506	2,0166	55	11		0,499
			3	3	0,7645	0,0489	2,0824	55	11	300	0,510
	DX media	ND 1	1	2	0,3974	0,0780	1,2989	66	0		0,358
			2	2	0,6597	0,0452	1,7339	52	14		0,468
			3	2	0,6749	0,0442	1,7729	52	14	345	0,479
	DX máxima	ND 1	1	1	0,0196	0,1060	1,0180	66	0		0,020
			2	2	0,6805	0,0448	1,7893	49	17		0,455
			3	2	0,6845	0,0445	1,8010	49	17	848	0,457
<i>Eucalyptus viminalis</i>	DX mínima	D 1	1	2	0,4444	0,0586	1,3419	2127	0		0,400
			2	2	0,6418	0,0385	1,6712	1749	378		0,475
			3	2	0,6416	0,0385	1,6709	1749	378	1842	0,475
	DX media	ND 1	1	2	0,5608	0,0610	1,5093	2127	0		0,505
			2	2	0,7015	0,0460	1,8308	1839	288		0,546
			3	2	0,7611	0,0411	2,0467	1839	288	42	0,592
	DX máxima	DT	1	2	0,4102	0,0893	1,3024	2127	0		0,369
			2	2	0,6845	0,0587	1,7810	1657	470		0,480
			3	2	0,7152	0,0558	1,8743	1657	470	1030	0,501

Referencias: Abreviaturas y siglas. Transf: transformaciones; nf: número de factores; R²: coeficiente de determinación de la validación cruzada; RECM: raíz del error cuadrático medio; RPD: relación entre desempeño y desvío; n: número de muestras usadas para la calibración; *Outliers*: número de muestras descartadas; Ondas: números de onda con coeficientes de regresión significativos; IAM: indicador de aptitud del modelo. **Variables.** DX mínima: microdensidad mínima del segmento determinada por rayos X; DX media: microdensidad media del segmento determinada por rayos X; DX máxima: microdensidad máxima del segmento determinada por rayos X; **Transformaciones.** DT: destendenciado; D 1: primera derivada; ND 1: segunda derivada de datos normalizados. **Etapas.** 1: Sin detección de *outliers*; 2: con detección de *outliers*; 3: con detección de *outliers* y números de onda con coeficientes significativos.

El indicador de aptitud de los modelos presentó, para todas las variables analizadas, una mejora considerable a través de las sucesivas etapas, lo cual es consecuente con la evolución favorable de los indicadores de bondad de ajuste analizados, y particularmente del coeficiente de determinación (R²) utilizado para su cálculo. En este sentido, este indicador alcanzó en la tercera etapa de análisis valores que rondaron entre 0,64 y 0,76, dependiendo de la especie y variable considerada. Pese a la variación observada en los indicadores de bondad de ajuste, la comparación entre especies da cuenta de un nivel de aptitud similar, con valores de IAM en la tercera etapa que rondaron 0,5 para ambas. La comparación dentro de cada especie indica que la variable mejor modelada en el caso de *E. globulus* fue la densidad mínima, mientras que en *E. viminalis* el mejor ajuste lo presentó la densidad media de los segmentos. Dentro de cada especie, el número de *outliers* seleccionados y eliminados no fue constante para todas las variables. Por otro lado, el número de ondas seleccionado fluctuó considerablemente dependiendo de la variable analizada, lo cual a su vez tuvo un efecto en el diferencial de R² y, por consiguiente, del IAM experimentado entre la segunda y tercera etapa. Así, la selección de pocas ondas produjo un aumento mayor de este indicador (respecto a la calibración sin detección de ondas) que la selección de un gran número de ellas.

El análisis de las porciones del espectro de absorción seleccionadas por el algoritmo CARS (Figura 6.18) permitió observar que, más allá de las diferencias en el número de longitudes de onda seleccionadas, no existe una zona específica del espectro de absorción que determine estas características, sino que su ubicación depende de la variable considerada y de la especie. A pesar de ello, este análisis nos permitió identificar zonas del espectro comunes para la determinación de DX_{media} , que fue la única variable estimada a través de la misma transformación en ambas especies. A fin de extender este análisis y hacer comparable entre especies la ubicación de las bandas de absorción con coeficientes significativos para la estimación de cada característica en particular, se seleccionó un mismo pre-tratamiento de los espectros como base de comparación. Así, se seleccionó la transformación ND 1 por ser aquella que resultó más adecuada para la mayor cantidad de variables. La calibración de los modelos mediante la transformación seleccionada (Tabla 6.7) produjo cambios, respecto a los modelos previos, tanto en el nivel de ajuste como en la cantidad de *outliers* y longitudes de ondas seleccionadas.

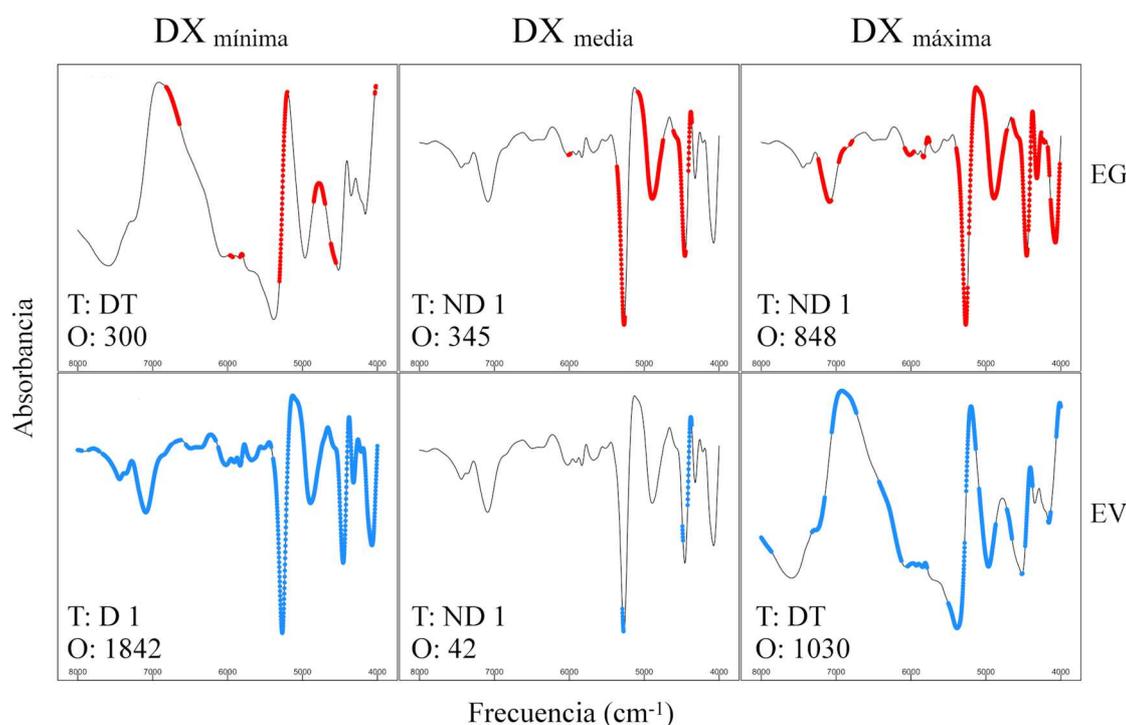


Figura 6.18. Números de onda con coeficientes de regresión significativos para las variables de microdensidad a nivel de fuste, seleccionados a través del algoritmo CARS. Referencias: EG: *Eucalyptus globulus*; EV: *Eucalyptus viminalis*; T: Transformación; O: número de ondas con coeficientes de regresión significativos; DT: destendenciado; D 1: primera derivada; ND 1: segunda derivada de datos normalizados.

Tabla 6.7. Calibración de las variables de microdensidad a nivel de fuste mediante la transformación ND 1. Solo se muestran aquellas variables que debieron ser re-calibradas.

Especie	Variable	nf	R ²	RECM	RPD	n	Outliers	Ondas	IAM
<i>Eucalyptus globulus</i>	DX mínima	3	0,8131	0,0444	2,3414	53	13	142	0,522
<i>Eucalyptus viminalis</i>	DX mínima	2	0,7145	0,0328	1,8722	1597	530	114	0,483
	DX máxima	2	0,6933	0,0517	1,8064	1511	616	974	0,443

En comparación con las calibraciones iniciales, el IAM presentó una mejora relativa en la estimación de la densidad mínima, para ambas especies. Esto se debió a un aumento en el nivel de ajuste evidenciado en el coeficiente de determinación, el cual compensó el aumento en la proporción de *outliers* seleccionados y eliminados por el modelo. En el caso de la densidad máxima de *Eucalyptus viminalis*, la disminución de ambos componentes (frente a la estabilidad en el número de factores) produjo un decrecimiento en IAM respecto a la calibración inicial. Por otro lado, el número de ondas seleccionadas en estas nuevas calibraciones también fluctuó, disminuyendo su número respecto de aquellas bajo otros pre-tratamientos. La comparación entre especies de los sectores del espectro significativos para la estimación de las variables analizadas (Figura 6.19) muestra que, si bien no existe una coincidencia absoluta en número y posición, existe un cierto grado de solapamiento entre las bandas que resultan significativas para la estimación de las características en ambas especies. En este sentido, existe un solapamiento parcial de 26 longitudes de onda para $DX_{\text{mínima}}$, 37 para DX_{media} y 478 para $DX_{\text{máxima}}$. Estas porciones se encuentran ubicadas principalmente en el rango de frecuencias de 4.000 a 5.500, si bien para densidad máxima existen porciones significativas por fuera de esta región. La calibración de modelos a nivel intraespecífico a partir del subconjunto de longitudes de onda significativas para ambas especies (Tabla 6.8) produjo un nivel de ajuste similar entre especies para densidad mínima y máxima, observándose una diferencia más marcada en densidad media.

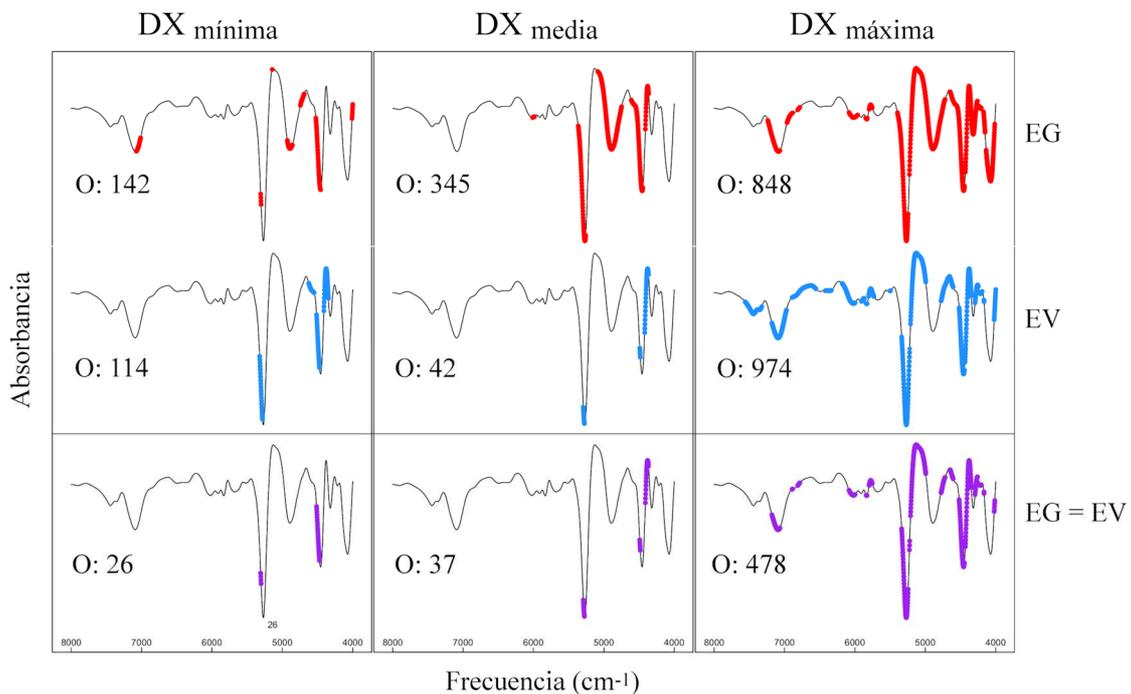


Figura 6.19. Números de onda con coeficientes de regresión significativos para las variables de microdensidad a nivel de fuste, seleccionados a través del algoritmo CARS, para la primera derivada de los espectros normalizados (pre-tratamiento ND 1). A fines comparativos, la zona central de la figura presenta la ubicación relativa de las bandas. EG: *Eucalyptus globulus*; EV: *Eucalyptus viminalis*; EG = EV: ondas significativas para ambas especies; O: número de ondas seleccionadas en cada caso.

Tabla 6.8. Calibración de las variables de microdensidad de fuste a nivel de especie, realizada a partir del subconjunto de ondas significativas para ambas especies según el pre-tratamiento ND 1.

Variable	Ondas	Especie	nf	R ²	RECM	RPD	n	Outliers	IAM
DX _{mínima}	26	<i>E. globulus</i> (EG)	3	0,6726	0,0588	1,7685	53	13	0,432
		<i>E. viminalis</i> (EV)	2	0,6403	0,0368	1,6679	1597	530	0,433
DX _{media}	37	<i>E. globulus</i> (EG)	2	0,6000	0,0490	1,5995	52	14	0,425
		<i>E. viminalis</i> (EV)	2	0,7551	0,0416	2,0215	1839	288	0,588
DX _{máxima}	478	<i>E. globulus</i> (EG)	2	0,6897	0,0441	1,8174	49	17	0,461
		<i>E. viminalis</i> (EV)	2	0,6886	0,0521	1,7925	1511	616	0,440

Con excepción del caso de densidad máxima para *E. globulus*, la calibración de las variables analizadas a partir de las bandas significativas para ambas especies produjo un menor ajuste general, respecto de las calibraciones a partir de los subconjuntos de bandas particulares para cada especie y variable.

En la tabla 6.9 se resumen los resultados de las calibraciones realizadas a nivel de especie. Es posible observar que, en general, la selección de la transformación de los espectros por la derivada de sus datos normalizados resulta en un mejor ajuste de los modelos. En este sentido, cinco de las seis variables analizadas presentan el mayor IAM bajo este pre-tratamiento. Por otro lado, en aquellas variables que debieron recalibrarse, la selección de esta transformación involucró la detección de un menor número de ondas. A su vez, el número de ondas significativas para explicar las variables en cada modelo resultó, en promedio, menor para densidad mínima y mayor para densidad máxima. La densidad media presentó en este aspecto una mayor variabilidad, aunque ubicándose en una situación intermedia a la de las otras dos variables. Esta tendencia también se registró en la determinación de las porciones del espectro significativas para ambas especies. La única variable que presentó mejor ajuste a partir de una transformación de los espectros diferente a ND 1 fue densidad máxima para *E. viminalis*.

Tabla 6.9. Cuadro resumen de las calibraciones llevadas a cabo para las tres variables analizadas a nivel de fuste en ambas especies. Se destacan en negrita las mejores calibraciones para cada caso.

Variable	Especie	Calibración original			Calibración ND 1		Calibración Bandas	
		Transf.	IAM	Ondas	IAM	Ondas	IAM	Ondas
DX _{mínima}	<i>E. globulus</i>	DT	0,510	300	0,522	142	0,432	26
	<i>E. viminalis</i>	D 1	0,475	1842	0,483	114	0,433	
DX _{media}	<i>E. globulus</i>	ND 1	0,479	345	-	-	0,425	37
	<i>E. viminalis</i>	ND 1	0,592	42	-	-	0,588	
DX _{máxima}	<i>E. globulus</i>	ND 1	0,457	848	-	-	0,461	478
	<i>E. viminalis</i>	DT	0,501	1030	0,443	974	0,440	

El análisis de los valores observados y esperados, es decir aquellos valores medidos a través de densitometría de rayos X en las muestras de barreno y los estimados a partir de la calibración de modelos utilizando los espectros NIR obtenidos en esas regiones, muestra que los modelos generados lograron reproducir adecuadamente la variabilidad observada en el *set* de datos depurado (Figura 6.20).

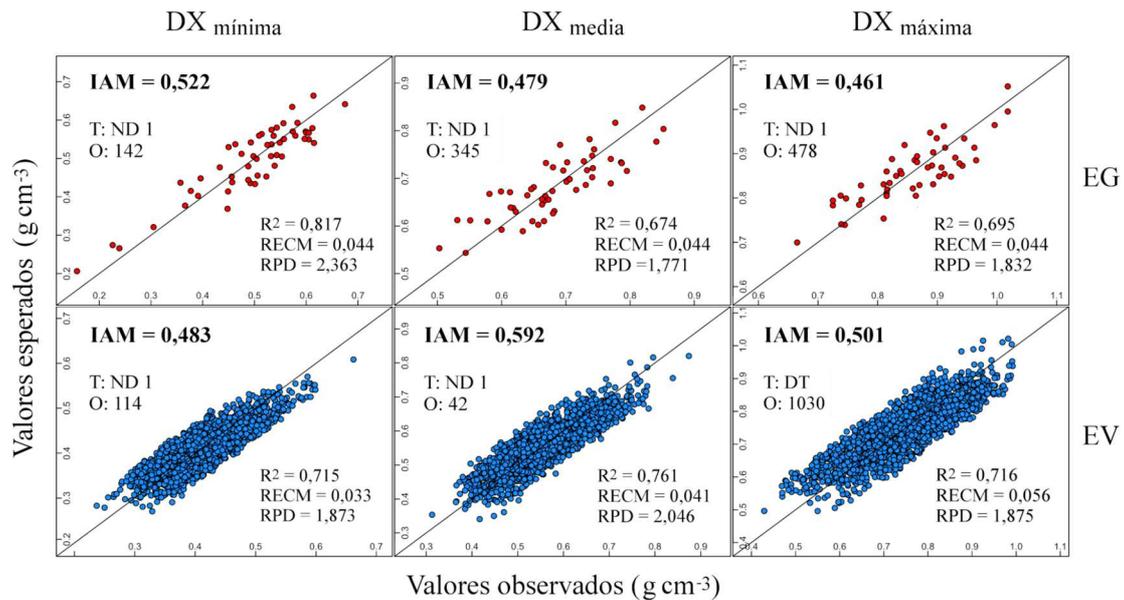


Figura 6.20. Gráfica de valores observados y esperados para las calibraciones de microdensidad de la madera seleccionadas en función de mayor IAM, discriminados por especie: *E. globulus* (EG) y *E. viminalis* (EV). Se detallan las transformaciones realizadas sobre los espectros y el número de ondas seleccionados en cada caso, así como los indicadores de bondad de ajuste utilizados para evaluar el ajuste.

Por último, y a fin de realizar una calibración a nivel interespecífico, se tomó el *set* de datos depurado (es decir, con remoción de *outliers*) de ambas especies y se realizó una única calibración en conjunto para cada variable, utilizando los espectros NIR bajo la transformación ND 1 y a partir del número de ondas significativas detectadas en el análisis previo (Tabla 6.10). Esta dio como resultado, en general, un menor ajuste respecto de la calibración a nivel individual dentro de cada especie. La excepción pareciera estar representada por DX_{media}, que presenta un mayor nivel de ajuste general respecto de la calibración individual para *E. globulus*.

Tabla 6.10. Calibración de las variables a nivel interespecífico realizada a partir del conjunto de datos depurado y del subconjunto de ondas significativas para ambas especies, según el pre-tratamiento ND 1 de los espectros.

Especie	nf	R ²	RECM	RPD	N	Outliers	Ondas	IAM
DX _{mínima}	2	0,6153	0,0403	1,6127	1650	543	26	0,417
DX _{media}	2	0,7254	0,0453	1,9087	1891	302	37	0,563
DX _{máxima}	2	0,6295	0,0578	1,6434	1560	633	478	0,403

Al analizar la relación entre valores observados y esperados a partir de esta calibración (Figura 6.21) se observa un ajuste diferencial entre especies. En este sentido, si se comparan los indicadores de aptitud y de bondad de ajuste entre ambas especies, el modelado de los datos de *E. globulus* resulta levemente superior para densidad mínima, pero marcadamente inferior en las otras dos variables analizadas.

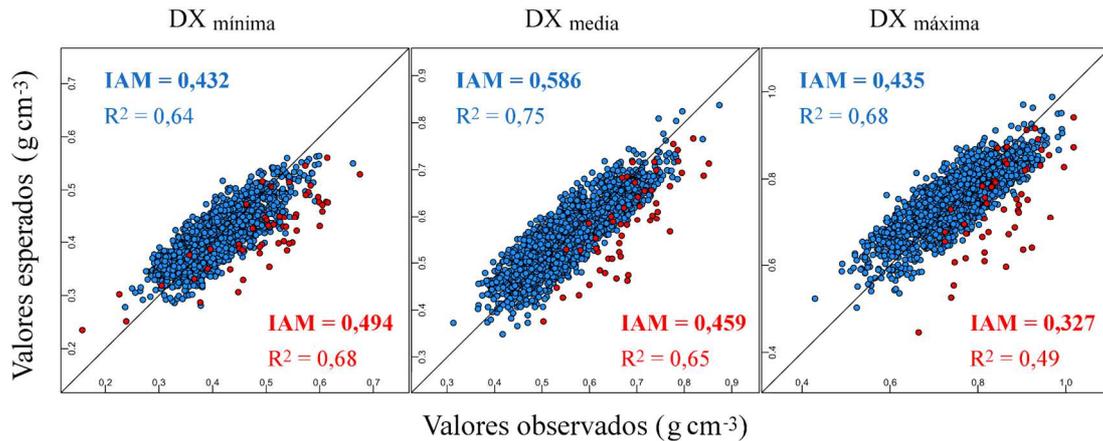


Figura 6.21. Valores observados y esperados a partir de la calibración en conjunto de las dos especies, a partir de longitudes de onda significativas para ambas, a través de la transformación de los espectros por la primera derivada de los datos normalizados (pre-tratamiento ND 1). Referencias: ● *E. viminalis*, ● *E. globulus*.

Si se comparan estos indicadores con los obtenidos a partir de la calibración de los modelos a nivel de especie a partir del subconjunto de ondas significativas para ambas (Tabla 6.9: Calibración bandas), *E. globulus* presenta una mejora general, salvo para densidad máxima. Por otro lado, los indicadores de *E. viminalis* disminuyen levemente. Si la comparación la realizamos contra los modelos a nivel de especie que presentan el mejor ajuste para cada variable (Figura 6.20), los resultados de esta modelización resultan inferiores en todos los casos.

Discusión

La mayor variabilidad observada en los espectros obtenidos en ramas puede deberse, en parte, a las propias características de las ramas que, a pesar de poseer tamaños similares, presentaron una variabilidad mayor respecto de la relativa homogeneidad de las muestras de barreno en cuanto a sus características superficiales y espesor. Por otro lado, el hecho de que los espectros obtenidos en ramas hayan sido tomados tanto en sección longitudinal como transversal agrega un factor más de variabilidad. En este sentido, las calibraciones realizadas a nivel de rama no presentaron una única sección ideal para la estimación de todas las características. Más aún, las variables anatómicas medidas en la sección transversal de la porción de la rama que fue removida fueron estimadas a través de espectros transversales, longitudinales y mediante el uso conjunto de ambos tipos. En otro sentido, las características físicas y las hidráulicas, que integran en un solo valor las propiedades de la rama también pudieron estimarse a partir de diferentes fuentes espectrales. Esto indicaría que es posible estimar propiedades y características de la madera a partir de porciones que no necesariamente son aquellas donde se llevó a cabo la determinación de referencia contra la cual se realiza la calibración. Esto podría permitir la generación de modelos para la estimación de propiedades en ciertos órganos a partir de

espectros obtenidos en otros. En este sentido, Cieszewski et al. (2013) lograron estimar características (densidad, ángulo microfibrilar y módulo de elasticidad) a nivel de fuste de un árbol de la especie *Betula pendula*, a partir de ramas del mismo árbol.

En general se observó que el sector del espectro con mayor cantidad de ondas con coeficientes de regresión significativos fue el comprendido entre 4.000 y 5.500 cm^{-1} . Esta región es muy característica y sensible a diferencias estructurales (Beć et al. 2018), y representa la porción del espectro correspondiente a las bandas de combinación de las vibraciones fundamentales (Figura 6.3). Esta zona presenta una firma espectral particular que asemeja una “huella digital” (Beć et al. 2018) y es muy utilizada para un gran número de aplicaciones (Ozaki 2012). Probablemente, el aumento de la absorbancia en esta porción (Figura 6.5) y la aparición de picos y valles más marcados que en el resto del espectro hayan reflejado de mejor manera los cambios producidos en las diferentes variables analizadas.

Antes de pasar a la discusión particular de los resultados, vale una última aclaración: si bien la calibración de los modelos fue realizada mediante dos métodos, se optó por considerar solo los resultados provenientes de la validación cruzada. De acuerdo con Inagaki et al. (2012), al usar el método de validación cruzada dejando uno afuera (*leave-one-out*), la perturbación del modelo en cada paso es baja. Este procedimiento tiende a sobreajustar los modelos, lo que generalmente conlleva a modelos muy optimistas. En este sentido, los niveles de ajuste evidenciados por la calibración bajo este método fueron consistentemente mayores que los reportados a continuación.

Calibraciones a nivel de rama

Existen escasos antecedentes donde se analice la relación entre propiedades físicas, hidráulicas y anatómicas y los espectros de absorción NIR obtenidos a nivel de rama. Una extensa búsqueda bibliográfica solo arrojó resultados para cinco de las variables analizadas en este trabajo: densidad básica de la madera, P_{12} , P_{50} , P_{88} y la *pendiente* de la curva de VC. Con respecto a los resultados obtenidos para la calibración de densidad, Costa et al. (2018) desarrollaron una calibración para 432 especies y 1066 muestras, utilizando 27 factores, sin procesamiento de los espectros, que dio como resultado el ajuste de un modelo con un coeficiente de determinación de 0,76. El nivel de ajuste obtenido en el presente trabajo es algo menor ($R^2 = 0,73$), pero fue obtenido a partir de solo 2 especies, 59 muestras y utilizando 2 factores. Por otro lado, Sergent et al. (2019) realizaron dos calibraciones para esta característica a partir de 50 muestras de ramas de *Austrocedrus chilensis*. Ambas presentaron un nivel de ajuste inferior a los encontrados en este capítulo (R^2 de 0,59 y 0,63, utilizando 2 y 7 factores respectivamente).

La calibración de espectros NIR y P_{50} encuentra solo dos antecedentes, correspondientes a Luss et al. (2015) y Sergent et al. (2019). Los primeros autores trabajaron con madera de fustes de *Picea abies* y emplearon un número de muestras similar al utilizado en este capítulo, logrando ajustar varios modelos con diferentes restricciones de número de

ondas, y utilizando espectros obtenidos sobre las superficies axiales y radiales. El modelo que presentó mejor ajuste ($R^2 = 0,65$) utilizó la primera derivada de los espectros obtenidos en la superficie axial con una corrección de dispersión multiplicativa (MSC por sus siglas en inglés) y 3 factores. La calibración con la primera derivada de los espectros obtenidos en la superficie radial presentó un ajuste algo menor ($R^2 = 0,53$). Ambas calibraciones presentaron un ajuste mayor al obtenido en este capítulo, el cual fue logrado a partir de los espectros longitudinales de ramas sin transformación. A diferencia del trabajo citado, los espectros aquí analizados fueron obtenidos sobre la superficie de las ramas descortezadas sin ninguna clase de tratamiento superficial tendiente a aplanar la superficie. Esto puede haber afectado la calidad de los espectros obtenidos y, por lo tanto, el nivel de ajuste alcanzado. En el caso de Sergent et al. (2019), estos autores trabajaron con ramas descortezadas de *Austrocedrus chilensis*, sobre las que tomaron 4 espectros longitudinales en la zona de la rama donde se aplicó tensión a través de la cámara de cavitación. Estos autores obtuvieron dos ajustes, uno a partir del espectro normalizado y otro con la segunda derivada, con un R^2 de 0,6 y 0,54, utilizando 3 y 7 factores, y con una proporción de *outliers* del 20 y 10%, respectivamente. Si bien, el número de factores utilizado por estos autores es mayor al utilizado en este trabajo, el nivel de ajuste general obtenido resulta superior, destacándose la baja proporción de *outliers* eliminados. Por otro lado, es importante remarcar que los antecedentes citados corresponden a especies gimnospermas, grupo de plantas que poseen una madera más homogénea en su anatomía que las angiospermas en general, y que los *Eucalyptus* en particular. Existe un antecedente reciente (Savi et al. 2019) donde se analiza la relación entre P_{50} y espectros MIR (infrarrojo medio) en un estudio interespecífico de 23 especies angiospermas, que no incluía a especies del género *Eucalyptus*. Estos autores trabajaron con 90 muestras de ramas y tomaron los espectros en sección transversal, obteniendo un ajuste con un R^2 de 0,49. Si bien este ajuste resulta superior al encontrado en este capítulo, estos autores trabajaron con un rango de variación en vulnerabilidad más amplio (-1,19 a -5.36 MPa) y utilizaron un mayor número de muestras. Así, hasta donde se tiene conocimiento, los resultados presentados en este capítulo son los primeros donde se ha analizado la relación entre vulnerabilidad a la cavitación y espectros NIR considerando la variación acotada que aportan dos especies de un mismo género de angiospermas. Tal como se ha concluido en capítulos anteriores, la relación entre P_{50} y los componentes anatómicos de la madera de especies de *Eucalyptus*, especialmente con aquellos que determinan la eficiencia conductiva, reviste cierta complejidad. Tal es así que las relaciones ampliamente citadas en la bibliografía para especies gimnospermas y angiospermas de vasos agrupados, entre el tamaño de los elementos conductivos y la vulnerabilidad a la cavitación (por ejemplo, Gleason et al. 2016), no se verifican en las especies analizadas de este género. Si los espectros NIR reflejan en parte las características de la constitución de la madera, la baja correlación observada en capítulos previos entre P_{50} y las variables anatómicas, sumada a la nula preparación superficial de las ramas, puede ser la responsable del escaso nivel de ajuste mostrado por el modelo para la predicción de esta variable funcional.

De modo contrario a lo observado en el caso de P_{50} , los parámetros P_{12} y P_{88} mostraron un elevado nivel de ajuste, con un coeficiente de determinación de 0,75 y 0,8,

respectivamente. Estos resultados presentan un ajuste superior al reportado por Sergent et al. (2019) para ciprés de la cordillera (P_{12} : $R^2 = 0,6$, primera derivada, 7 factores, 16% de *outliers*; P_{88} : $R^2 = 0,37$, datos sin transformar, 3 factores, 10% de *outliers*). Estas variables, en capítulos previos, se han relacionado de manera significativa con determinados componentes anatómicos y características físicas de la madera. Por un lado, P_{12} se ha relacionado con características hidráulicas como diámetro de vasos, diámetro hidráulico, tamaño de halo, frecuencia de vasos y conductividad máxima. Por el otro, P_{88} ha mostrado correlaciones significativas con características de la pared de fibras y con la densidad de la madera. El hecho de haber encontrado calibraciones con un nivel de ajuste elevado para estas variables funcionales es consistente con las relaciones establecidas en capítulos anteriores entre estas y las variables anatómicas. Asimismo, el alto valor funcional (es decir, el grado de impacto sobre caracteres de desempeño de la planta -Violle et al. 2007-) de estas variables se reflejaría en el hecho de que las plantas, en condiciones de adecuada oferta de agua, regulan su potencial hídrico mínimo diario en torno al P_{12} (Meinzer et al. 2009), mientras que P_{88} es el nivel de tensión a partir del cual el proceso de cavitación es completamente irreversible y conducente a la muerte de los individuos (Domec & Gartner 2001, Barigah et al. 2013). Por otro lado, estos parámetros definen la *pendiente* de la curva de vulnerabilidad, la cual explica la velocidad a la cual se produce la pérdida de conductividad, en función de la tensión. Así, P_{50} pareciera ser un parámetro artificial, en términos de su significado funcional para la planta, el cual quedaría definido por el punto en el cual comienza la entrada de aire y la velocidad a la cual se desarrolla el evento. Cabe destacar que, si bien este parámetro es relativamente arbitrario, es el más ampliamente utilizado para establecer comparaciones entre curvas de vulnerabilidad a la cavitación (Jacobsen et al. 2005). El nivel de ajuste observado para la calibración de los datos de la *pendiente* de la curva de vulnerabilidad a la cavitación parece confirmar esta presunción, siendo este modelo el que presentó el mayor valor de coeficiente de determinación ($R^2 = 0,83$) respecto al resto de las variables. El ajuste obtenido para esta variable resulta muy superior al reportado por Sergent et al. (2019) ($R^2 = 0,26$, datos sin transformar, 2 factores y 16,5% de *outliers*). Para todas las variables mencionadas, éste es el primer trabajo del que se tiene registro en el cual se realizan calibraciones con espectros NIR, en especies angiospermas. Los resultados obtenidos indican que sería posible estimar variables de la arquitectura hidráulica, con diferente grado de ajuste, a partir de espectros NIR obtenidos a nivel de rama. Estas variables presentaron una gran especificidad respecto a las zonas del espectro que las determinan, siendo estimadas a partir de relativamente pocos números de onda.

Por otro lado, los únicos antecedentes que relacionan alguna característica anatómica de los elementos conductivos de la madera a través de espectroscopía NIR, fueron desarrollados para especies gimnospermas por Schimleck & Evans 2004, Schimleck et al. 2004 y Jones et al. 2005. A su vez, Ona et al. (1999) lograron estimar el diámetro de vasos de muestras de fuste de dos especies de *Eucalyptus* (*E. globulus* y *E. camaldulensis*) a través de espectroscopía Raman (otro tipo de espectroscopía vibracional), utilizando 2 factores y obteniendo un nivel de ajuste inferior al obtenido en este estudio. El trabajo aquí presentado es el primero en estudiar la relación entre espectros NIR y las

características de elementos conductivos en especies angiospermas. Por otro lado, este trabajo también es el primero en tratar de investigar la relación existente entre la espectrografía NIR y las células acompañantes de los vasos de la madera de especies arbóreas angiospermas, en particular del género *Eucalyptus*. Estas están conformadas por cantidades variables de parénquima axial, fibrotraqueidas y traqueidas vasicéntricas, con una función no del todo dilucidada (Capítulo 3), pero que incluiría el aumento de la eficiencia de conducción de agua (al incrementar la conectividad del sistema vascular) y el aumento de la resistencia a la cavitación (posiblemente mediada por la limitación de la propagación de embolismos). El único antecedente donde se aborda la relación entre elementos conductivos y cantidad de parénquima a través de espectroscopía NIR corresponde a Abe et al. (2013) quienes evaluaron la relación en la proporción de haces vasculares y parénquima, entre 0 y 100%, en *Elaeis guinensis* (Palma aceitera) a partir de muestras molidas, obteniendo un nivel de ajuste elevado. Los resultados obtenidos en el presente capítulo demuestran que es posible estimar el tamaño y la frecuencia de vasos, así como también de sus elementos acompañantes, con un nivel considerable de ajuste. Estas variables presentaron cierto nivel de relación entre ellas, compartiendo porciones del espectro de longitud variable. Esto indicaría que los espectros NIR pueden ser utilizados para estimar componentes de la arquitectura hidráulica de la madera, ya que éstos reflejan adecuadamente los patrones de variación de los elementos conductivos y de aquellos elementos cuya función se halla íntimamente relacionada a estos. Con respecto a la frecuencia del parénquima radial, esta tampoco ha sido analizada por trabajos anteriores, para cualquier órgano y especie. Los resultados obtenidos aquí permiten inferir que el número de radios parenquimáticos es definido por un número pequeño de ondas, las cuales son significativas para estimar parte de la variabilidad exhibida por esta característica. El hecho de que el número de radios haya sido determinado por ondas que a su vez determinan la frecuencia de vasos está en consonancia con los resultados obtenidos en el capítulo 3 (Tabla 3.2), donde se observó para estas especies una correlación altamente significativa y positiva entre estas variables.

En cuanto al porcentaje de pared ocupada, esta es una medida indirecta y relativa del espesor de pared secundaria de las células, que integra en ella al lumen celular (Capítulo 4). Esta mostró (Figura 4.5) una correlación significativa y positiva con la densidad básica, debido a que la densidad no solo refleja la proporción de pared dentro del xilema, sino también la fracción de lúmenes (Ziemińska et al. 2013). Estas dos variables compartieron algunos números de onda significativos, aunque no la mayoría de ellos. Esto indicaría que, si bien están relacionadas, estas variables están definidas por componentes específicos del espectro, que reflejan características diferentes de la composición física y química de la madera. Si bien no hay antecedentes que aborden la relación entre la fracción de pared de fibras y los espectros NIR, existen antecedentes que analizan la relación entre estos últimos y el espesor de pared, tanto de fibras como de vasos, a nivel de fuste. En este sentido, Viana et al. (2009) establecieron calibraciones para predecir espesor de pared de fibras a partir de madera proveniente del fuste de 6 clones de *Eucalyptus*. Estos autores encontraron una gran heterogeneidad en los resultados, con coeficientes de correlación que variaron entre 0,1 y 0,86, dependiendo del

clon considerado. Por otro lado, Schimleck et al. (2004) establecieron regresiones para predecir el espesor de pared de traqueidas provenientes de madera de fuste de *Pinus taeda*, tanto en la superficie radial como transversal, encontrando niveles de ajuste similares con un coeficiente de determinación que varió entre 0,90 y 0,91. Por último, Schimleck & Evans (2004) estimaron el espesor de pared de fibras de *Pinus radiata* a partir de muestras de fuste con resultados similares, obteniendo calibraciones con un nivel de ajuste (R^2) entre 0,88 y 0,91. Si bien estos resultados no son directamente comparables, permiten dar cuenta de que la estimación de las características dimensionales de las paredes de las células que conforman la estructura de la madera, tales como su espesor o proporción relativa, pueden ser estimadas de manera adecuada a través de esta metodología.

Calibraciones a nivel de fuste

En relación con el análisis de microdensidad a nivel de fuste, los valores de microdensidad media obtenidos en este trabajo para las dos especies analizadas están dentro del rango de valores reportados para estas especies a nivel general, aunque son inversos a los reportados en el Cap. 2 y 4 (ver datos de Pylodin en este último), en los cuales *E. viminalis* presentó una densidad de madera mayor que *E. globulus* a nivel de fuste.

Si se comparan las calibraciones seleccionadas para microdensidad media a nivel de fuste (Figura 6.20) con otros antecedentes que relacionan espectros NIR con densidad básica en especies de *Eucalyptus*, los modelos obtenidos para *E. globulus* y *E. viminalis* presentan un grado de ajuste superior al obtenido por Schimleck et al. (1999) trabajando con muestras de *E. globulus* molidas, mediante la calibración de los datos por la segunda derivada y trabajando con 4 factores. Por otro lado, éstos presentan un grado de ajuste inferior a los encontrados por Hein (2012) utilizando muestras de madera sólidas de clones de *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla*, a través de la misma transformación que la seleccionada en este trabajo (ND 1) y utilizando 3 factores para la calibración, y a los obtenidos por Hein et al. (2009) mediante calibraciones conjuntas para *E. grandis* y *E. urophylla*, a través del uso del mismo pre-tratamiento y la utilización de 7 factores. La comparación de las calibraciones obtenidas en este capítulo con antecedentes que relacionan espectros NIR con microdensidad de la madera muestra resultados disímiles. Así, los resultados de este capítulo presentan un mayor ajuste que los encontrados por Baettig et al. (2017), quienes trabajaron con *Pinus radiata* y obtuvieron valores de R^2 cercanos a 0,6 utilizando espectros normalizados y 2 factores. Por otra parte, el ajuste resulta inferior si se lo compara con los resultados reportados por Alves et al. (2012), quienes trabajaron con *Pinus pinaster* y *Larix x eurolepis*, a través de diversas transformaciones y utilizando entre 3 y 6 factores, a los obtenidos por Schimleck et al. (2002), analizando *Pinus radiata* y transformando los espectros mediante la segunda derivada de los mismos y 7 factores, o a los encontrados por Rodrigues et al. (2013), en muestras de *Larix kaempferi* sin transformación de los espectros. Cabe destacar que, respecto a las calibraciones de espectros NIR frente a datos de microdensidad provenientes de densitometría de rayos X, todos los antecedentes citados corresponden a

especies gimnospermas. Como se mencionó previamente, esta división de especies presenta, en comparación a las especies angiospermas y particularmente frente a *Eucalyptus*, una composición anatómica más simple, conformada por un menor número de tipos celulares, relativamente homogéneos en cuanto a sus características y funciones. Es probable que la mayor heterogeneidad en la constitución anatómica de las especies del género *Eucalyptus* influya sobre los patrones de variación de la densidad a lo largo del fuste y sobre los patrones de absorción de radiación NIR, afectando la calidad del ajuste obtenido. Hasta donde se tiene conocimiento, éste es el primer trabajo donde se establecen calibraciones entre la microdensidad de la madera y los espectros de absorción NIR para especies de este género. Vale la pena resaltar, además, que el número de factores usados en este trabajo es menor que el reportado en los trabajos citados, lo cual puede explicar parcialmente los menores ajustes. En este sentido, Baettig et al. (2017) señalan que al aumentar el número de factores de 2 a 20, obtuvieron un R^2 de 0,87. Si bien los procedimientos tendientes a establecer el número de componentes o factores a ser incorporados en un modelo PLS se encuentran bajo debate permanentemente (Kvalheim et al. 2018), la decisión de incluir en el indicador de aptitud del modelo (IAM) al número de factores pretendió quitarles especificidad a los modelos seleccionados y dotarlos de capacidad predictiva, a expensas de un menor ajuste (Wiklund et al. 2007).

Por otro lado, este trabajo avanzó no sólo en la exploración de la capacidad predictiva de la densidad media –a partir de datos de microdensidad– sino que también es el primero del que se tiene registro en establecer calibraciones entre espectros NIR y datos de la microdensidad mínima y máxima de la madera, tópico del que no se han encontrado antecedentes publicados para ninguna especie. La densidad es una característica que suele variar reflejando las diferencias entre proporción, tamaño y composición química de los diferentes elementos constitutivos de la madera. En este sentido, su variación radial en el fuste puede relacionarse con diferencias en las condiciones de crecimiento que influyen sobre la formación de los tejidos. Estas variaciones, que suelen analizarse a nivel de anillos de crecimiento, pueden asociarse con variables de crecimiento (edad cambial, ancho de anillos) que reflejan características del ambiente en el cual se desarrollan (dominancia y condiciones climáticas, entre otras; Xiang et al. 2014). Generalmente, la asociación entre variables climáticas y los componentes de la densidad de la madera es más fuerte para densidad máxima que para densidad mínima o media. Como consecuencia, las series de densidad máxima son frecuentemente usadas en estudios dendroclimáticos (Xiang et al. 2014). *Eucalyptus* es un género que presenta porosidad difusa, sin demarcación de anillos, por lo que no es posible establecer, de manera sencilla, patrones de variación de la densidad a lo largo de la temporada de crecimiento. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo permitieron estimar ambas variables, con un grado de ajuste similar al obtenido para densidad media, a partir de secciones radiales del fuste de un largo predefinido (1 cm). Probablemente estos patrones respondan a las características particulares de los ambientes en el que se desarrollaron ambas especies y durante el período en el cual se formó esa porción de madera, lo cual produjo variaciones en su anatomía que pudieron ser capturadas por los espectros de absorción NIR.

En las calibraciones realizadas con microdensidad mínima, se produjo un aumento en el indicador de aptitud del modelo entre las calibraciones iniciales y aquellas realizadas a través de la transformación por medio de la primera derivada de los datos normalizados, la cual fue utilizada como base de comparación de las diferentes variables entre especies. Es posible que, debido a las características particulares del *set* de datos con el que se llevó a cabo la primera etapa del análisis, esa información haya sido mejor descrita por la transformación inicial (DT en *E. globulus* y D1 en *E. viminalis*). Luego, al continuar con las siguientes etapas, el ajuste quedó limitado a la detección de *outliers* y la selección de longitudes de onda dentro del pre-tratamiento seleccionado previamente. Al realizar la calibración con otro pre-tratamiento, el conjunto de datos depurados cambió, modificándose el número de *outliers* detectados y eliminados, así como el número y ubicación de ondas del espectro que mejor representó al subconjunto de datos, obteniéndose un mejor ajuste. Estos resultados indicarían que la selección de un determinado pre-tratamiento guarda estrecha relación con las características del conjunto de datos que se utilizará para elaborar la calibración, afectando el resultado final. En este sentido, en la calibración para microdensidad máxima con los espectros ND 1, esta presentó un menor ajuste respecto de la inicial, lo que indicaría además que no existe una única transformación que sea la más adecuada para el modelado de una variable en particular. Esto concuerda con el hecho de que los antecedentes citados previamente no presentan coincidencia en cuanto al mejor pre-tratamiento (Schimleck et al. 1999, Hein 2012, Hein et al. 2009, Baettig et al. 2017, Schimleck et al. 2002, Rodrigues et al. 2013). Así, los algoritmos utilizados para el procesamiento de los espectros pueden mejorar la información contenida en ellos, pero es necesario analizar particularmente el desempeño frente a una variable dada (Smith 2011). En este sentido, la calibración de densidad básica en ramas presentó el mejor ajuste utilizando la segunda derivada de los espectros, transformación que no resultó la mejor en ninguna de las calibraciones para las variables de microdensidad en fuste.

En cuanto a las diferencias resultantes de la selección de número de ondas entre diferentes pre-tratamientos, las cuales quedaron evidenciadas al realizar la segunda calibración de los espectros bajo la transformación ND 1, estas ponen en evidencia que la ubicación de las bandas con coeficientes de regresión significativos depende en gran medida de la transformación a la cual se someten los datos. A este respecto, Schwanninger et al. (2011) establecen que pueden existir diferencias en la ubicación de las bandas de hasta 20 cm^{-1} entre los espectros sin transformación (RAW) y la segunda derivada de los mismos (D 2), y que estas diferencias dependen básicamente de la forma del espectro y del algoritmo utilizado para su transformación. Estas transformaciones producen cambios en los espectros, creando zonas de picos y valles en sectores específicos que permiten captar la variabilidad observada en los datos de referencia. Estos cambios en la forma de los espectros pueden ser los responsables de las diferencias observadas (entre la primera y la segunda calibración) en el número y la ubicación de las ondas con coeficientes de regresión significativos para la estimación de las variables de microdensidad. Con relación al aumento de la cantidad de ondas seleccionadas a nivel general entre densidad mínima, media y máxima, esto puede deberse a que los diferentes constituyentes que

determinan los niveles de densidad puntuales en la madera estén relacionados con características anatómicas y químicas que son estimadas a partir de diferentes porciones del espectro. Así, si la microdensidad mínima de un determinado punto está descrita por un número determinado de ondas que representan ciertos compuestos y estructuras, la densidad media de ese segmento estaría determinada por esos componentes y otros que serán estimados a partir de otras porciones del espectro. De manera similar, la microdensidad máxima estará definida por un mayor número de ondas, respecto de la microdensidad media. Para el caso particular de la microdensidad media de *E. viminalis*, que fue estimada a partir de un menor número de ondas que las seleccionadas para microdensidad mínima, aquí probablemente se estén seleccionando solo aquellas bandas que presentaron los mayores coeficientes de regresión. Debido a que el algoritmo utilizado para la selección de ondas está determinado por un número de iteraciones definido *a priori*, el número de ondas delimitado responde a ese criterio y no a un umbral de significancia. Es probable que un número menor de iteraciones hubiera dado como resultado la selección de un mayor número de ondas. El hecho de haber seleccionado un bajo número de ondas puede haber sido responsable del alto nivel de ajuste observado para microdensidad media. Para una misma variable, si progresivamente seleccionamos números de ondas que presentan los mejores coeficientes de regresión (reduciendo de esta forma su número), el nivel de ajuste de los modelos irá aumentando.

Por otro lado, el hecho de que, al realizar las calibraciones para cada variable utilizando el subconjunto de ondas compartidas entre ambas especies, se haya producido (en general) una disminución en el nivel de ajuste podría deberse a la quita de ondas con coeficientes de regresión elevados. Esto indicaría que, si bien existen un número de ondas compartidas, la densidad de cada especie estaría definida por componentes particulares (pudiendo ser los mismos elementos constitutivos, pero con ciertas diferencias en su composición química) que son reflejados por diferentes porciones del espectro. En el caso de la microdensidad máxima de *E. globulus*, cuyo nivel de ajuste se incrementó al utilizar el subconjunto de ondas compartidas entre especies, probablemente la disminución en el número de ondas compensó la pérdida de ondas con coeficientes significativos, con un saldo positivo en términos de aptitud del modelo. La calibración del conjunto de datos a partir de un único modelo (Tabla 6.10) para ambas especies fue traccionado por la mayor cantidad de datos de *E. viminalis*, lo cual puede observarse claramente en la gráfica de valores observados vs esperados (Figura 6.21). Allí puede verse, además, que el ajuste individual bajo ese modelo para *E. globulus* es progresivamente menor, a medida que aumenta la densidad, ya que aumenta la diferencia observada entre ambas especies (Tabla 6.5).

Conclusiones

Los resultados de este trabajo permiten afirmar que es posible establecer calibraciones entre espectros de absorción NIR y las características anatómicas, físicas e hidráulicas de la madera de especies angiospermas. En este sentido, los modelos generados permitieron

predecir con diferente grado de ajuste las variables de referencia evaluadas. Las variables que mejor se predijeron (R^2 entre valores predichos y observados) fueron algunas funcionales (*pendiente* de la curva de cavitación y P_{88}) y otras anatómicas (referidas a las células acompañantes de los vasos), con R^2 entre 0,8 y 0,83. Con valores medios (R^2 entre 0,71 y 0,78) también hubo una mezcla de variables físicas (DB), funcionales (P_{12}) y anatómicas (DV , Dh , FPF , FV). Y con una menor capacidad de predicción (R^2 entre 0,39 y 0,52) se ubicaron variables funcionales, como ks_{max} y P_{50} , pero también anatómicas, como las que describen los radios (R_{mm}). Resulta importante resaltar que el nivel de ajuste en la predicción de P_{12} , P_{88} y la *pendiente* de la curva de vulnerabilidad a la cavitación fue mayor que para P_{50} , avalando la idea de que estos parámetros tienen un mayor valor funcional, al menos para estas especies, lo cual es respaldado por los resultados obtenidos en los capítulos previos.

Por otro lado, si tenemos en consideración a la relación entre los valores de densidad en ambos órganos, se observa que la capacidad de predicción fue similar entre ellos, considerando la densidad básica (en ramas, $R^2 = 0,73$) y los parámetros derivados de la microdensidad (en fuste, R^2 entre 0,67 y 0,82, dependiendo de la variable – $DX_{mínima}$, DX_{media} , $DX_{máxima}$ – y la especie). Las características de los espectros obtenidos en ramas permitieron la calibración de los datos en conjunto para ambas especies, mientras que la diferencia en la cantidad de muestras de fuste hizo conveniente un análisis particular para cada especie. Particularmente en fustes, la $DX_{mínima}$ fue la variable mejor predicha para *E. globulus*, mientras que la DX_{media} fue la mejor predicha en *E. viminalis*, si bien el nivel general de ajuste entre especies no difirió mucho a pesar de que en el caso de la primera especie el número de muestras con el que se realizó la calibración fue mucho menor que en la segunda.

Por último, los resultados expuestos indican que ciertas porciones del espectro permiten mejorar la estimación de determinadas características. Esta especificidad estaría dada por la interrelación existente entre las propiedades químicas de los diferentes componentes de la madera, agrupados en diversas estructuras anatómicas que, en diversa magnitud y proporción, modulan las características físicas y funcionales de los diversos órganos. Si bien los resultados son promisorios, resulta necesario analizar si las mismas porciones del espectro son igualmente válidas para otras especies, o si cada especie –o género– se comporta de manera particular.



*Capítulo 7: Relaciones generales entre anatomía y función para el género *Eucalyptus**

Este capítulo final se propone como objetivos integrar los principales resultados de esta tesis doctoral, los cuales fueron expuestos a lo largo del presente manuscrito, establecer relaciones generales para el género *Eucalyptus* a partir de las especies evaluadas, y proponer futuras líneas de investigación para cubrir los vacíos de conocimiento detectados. Para ello, y con el fin de hacer más representativas las conclusiones derivadas de este trabajo, se integrarán resultados de otros trabajos del equipo de investigación del cual formo parte, llevados a cabo de manera previa o paralelamente a esta investigación. Entre estos aportes vale la pena destacar la investigación llevada a cabo por la Dra. Natalia Tesón, en el marco de un proyecto nacional de INTA, en la cual analizó la resistencia a la cavitación por sequía en progenies de *E. grandis* de alta y baja densidad de madera.

Contrastación de Hipótesis

Teniendo en cuenta los objetivos planteados para este capítulo, a continuación, se intentará responder a las hipótesis de trabajo planteadas en el Capítulo 1.

Hipótesis I

*Las tasas máximas de **conductividad hidráulica** de la madera de *Eucalyptus* se relacionan con el **diámetro** medio y máximo **de los vasos**, mientras que la **seguridad hidráulica** del tejido se correlaciona con las características de los **elementos celulares asociados** a los vasos (traqueidas vasicéntricas, fibras, parénquima) que contribuyen a la reparación de embolismos y/o capacitancia. Debido a ello, es posible encontrar genotipos que **optimicen eficiencia y seguridad conductiva**, lo que podría resultar en altas tasas de crecimiento cuando las condiciones ambientales son favorables y un buen desempeño ante condiciones de sequía o heladas.*

Relaciones generales

Dadas las diferencias que subyacen a la determinación de la vulnerabilidad a la cavitación por sequía y frío, la única relación referente a esta hipótesis que es posible analizar para todo el conjunto de datos es aquella entre el tamaño de vasos y las características de las células acompañantes, con el nivel de conductividad hidráulica. A este respecto, en el capítulo 2 se demostró teóricamente la relación positiva entre el tamaño medio de los elementos conductivos y el nivel calculado de conductividad hidráulica máxima. Sin

embargo, y adicionalmente a esta relación que está ampliamente reportada en la literatura y se basa en la ley de Hagen-Poiseuille, se pudo comprobar que el nivel de conductividad depende en mayor medida del área conductiva total que de la distribución de tamaño de los elementos conductivos. En los capítulos 3, 4 y 5 se continuó estudiando esta relación, llevándose a cabo mediciones de conductividad que, si bien no presentaron la misma magnitud que las estimadas teóricamente, presentaron una relación positiva con el tamaño de los elementos de conducción, si bien esta evidenció diferente intensidad en cada caso (Figura 7.1 a). Si consideramos el conjunto de los datos, es posible ver que, a pesar de las diferencias en cuanto a época y lugar de muestreo, así como en el grado de selección genética de los individuos utilizados, el nivel de conductividad experimentado por las diferentes especies puede ser adecuadamente modelado a través de un modelo potencial basado en el diámetro medio de los elementos conductivos. Como se desprende del análisis de esta relación, en el modelo estimado la potencia calculada (3,6) resulta cercana a la establecida teóricamente por medio de la ley de Hagen-Poiseuille (4), produciéndose cierto solapamiento entre ambas curvas, al menos para el segmento bajo estudio en este trabajo. Cabe destacarse que es razonable que no exista una relación perfecta entre diámetro de vasos y conductividad hidráulica ya que, además de las resistencias ejercidas por las paredes, existen otras fuentes de resistencia, como en las membranas de las puntuaciones y en las uniones entre elementos de vaso, que afectan el flujo de agua.

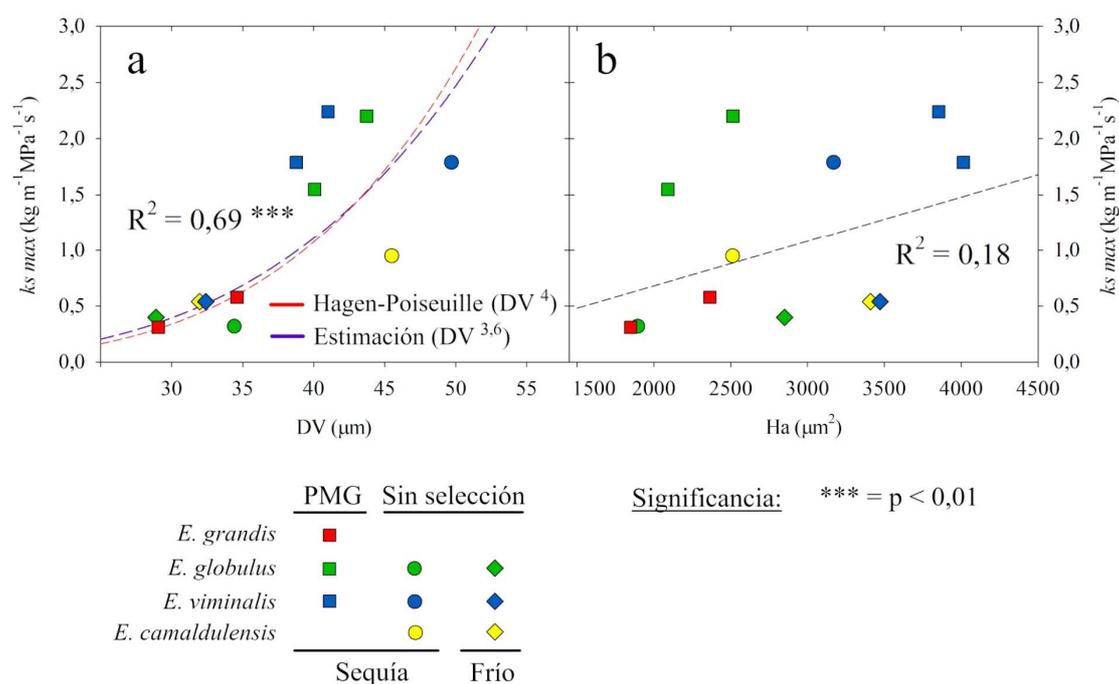


Figura 7.1. Relación entre el diámetro de vasos (DV) y el área de halo (Ha) con el nivel de conductividad hidráulica específica máxima (ks_{max}) en ramas de cuatro especies de *Eucalyptus*. Los valores correspondientes a material proveniente de Programas de Mejoramiento Genético (PMG) representan valores promedio de progenies de alta y baja densidad, mientras que aquellos provenientes de material sin selección corresponden a promedios por especie.

En cuanto al rol de las células acompañantes, en un primer momento no se planteó una relación entre estas y la conductividad hidráulica, sino con la vulnerabilidad a la cavitación. Sin embargo, a medida que se exploraron relaciones entre las variables funcionales medidas y anatomía, pudo verse una tendencia positiva, aunque no significativa estadísticamente, hacia un aumento de la capacidad conductiva a medida que se incrementa el área ocupada por los elementos celulares que acompañan a los vasos y que conforman la estructura denominada “halo” (Figura 7.1 b). Si bien en los diferentes capítulos donde se abordó esta relación se hallaron evidencias de la influencia significativa del área de halo sobre k_s (aunque menor a la de vasos y no siempre detectada), al considerar todo el conjunto de datos, estos presentan una dispersión relativamente alta, tanto dentro como entre especies. El nivel de comunicación entre los vasos y el conjunto de células que los rodean, a través de punteaduras grandes y numerosas, indicaría que las células que conforman el halo tienen una función relacionada con la conducción de agua. Sin embargo, la falta de relación general con el nivel de conductividad medido nos permite inferir que su relevancia en el transporte axial de agua a través del xilema sería poco significativa para la eficiencia total del sistema, pero podría ser de importancia para incrementar la conectividad entre vasos solitarios.

Cavitación por sequía (alta tensión en el xilema)

Si nos centramos en el proceso desencadenado por este tipo de estrés en particular, una de las funciones propuestas para las células acompañantes de los vasos, que incluyen traqueidas vasicéntricas, parénquima axial y fibrotraqueidas, sería, por un lado, la protección de los elementos conductivos frente al aumento de la tensión en el xilema. En el caso de *Eucalyptus*, estas serían particularmente importantes ya que la presencia de vasos solitarios, de gran tamaño y con paredes delgadas determina un factor de refuerzo por debajo del límite teórico de implosión (Capítulo 3). En este sentido, se encontró una relación significativa entre la superficie ocupada por el halo de células acompañantes y la tensión necesaria para reducir a la mitad la capacidad conductiva (P_{50} ; Figura 7.2 a).

El hecho de que este conjunto de células no exhiba relación significativa con P_{12} , podría indicar que su principal función frente al estrés por sequía estaría vinculada con la reducción de la propagación de los embolismos una vez producidos. Así, su disposición alrededor de los vasos podría actuar a manera de aislante para la diseminación del aire dentro del xilema, evitando que llegue a otros vasos que se encuentren funcionales. Un trabajo recientemente publicado (Johnson et al. 2020) analiza la dinámica de cavitación en plantines de 3 especies con vasos solitarios (una de ellas, *E. globulus*) con microtomografía de rayos-X (plantas vivas), y concluye que más del 80% de los eventos de cavitación se producen de manera discreta, en vasos individuales y únicos, y estos eventos están temporalmente separados unos de otros. Esto apoya nuestra hipótesis acerca del rol de las células acompañantes del xilema en aislar los embolismos una vez que éstos se han iniciado en un vaso.

Por otro lado, el tamaño de los vasos se relacionó con el proceso de cavitación de manera significativamente más importante que el área de células acompañantes (Figura 7.2 b y c), lo que indicaría que otras estructuras, fuertemente asociadas al tamaño de los elementos conductivos, serían las responsables de incrementar su resistencia. La mayor significancia de los vasos con P_{12} , a su vez, podría indicar que estas estructuras serían relativamente más importantes durante la fase inicial del proceso de entrada de aire en los elementos de conducción. En este sentido, la principal hipótesis es que las estructuras que estarían determinando esta relación serían las punteaduras, las cuales son consideradas como el principal punto por donde el aire ingresa a los vasos. Esto es concordante con los resultados obtenidos por el equipo de trabajo del cual formo parte, cuya investigación es retomada en el Capítulo 4, que reporta una relación inversa entre el diámetro de los vasos y las puntuaciones (Fernández et al. 2019), la cual determinaría, en última instancia, la correlación negativa entre tamaño de vasos y vulnerabilidad a la cavitación en estas especies. Existen escasos antecedentes donde se indague y cuantifique la magnitud de la relación entre el tamaño de los elementos conductivos a lo largo de toda la distribución de tamaños y sus punteaduras, sobre todo en especies de vasos solitarios, por lo que, de confirmarse la tendencia observada a través del estudio de otras especies, podría ser clave para entender la dinámica del proceso de cavitación dentro de este sistema particular.

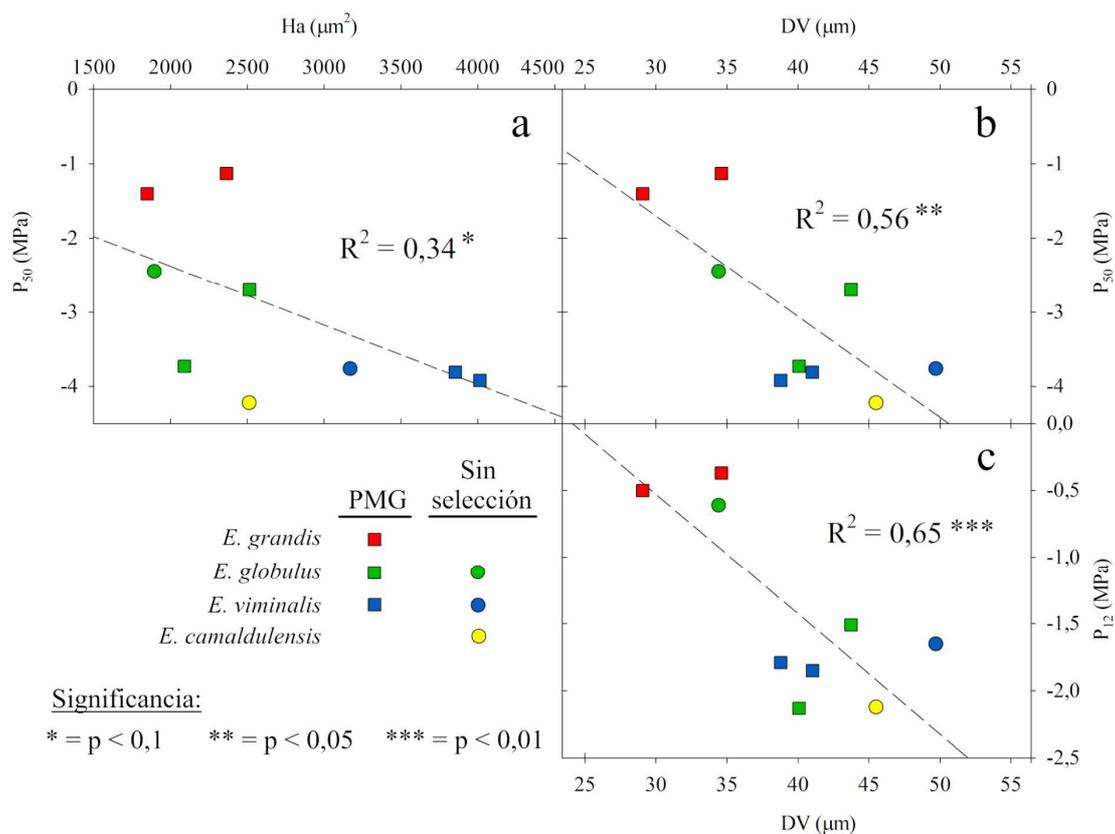


Figura 7.2. Relación entre el diámetro de vasos (DV) y el área de halo (Ha) con la tensión necesaria para producir el 12% y 50% de pérdida de conductividad hidráulica (P_{12} y P_{50} , respectivamente) en ramas de cuatro especies de *Eucalyptus*. Los valores correspondientes a material proveniente de Programas de Mejoramiento Genético (PMG) representan valores promedio de progenies de alta y baja densidad, mientras que aquellos provenientes de material sin selección corresponden a promedios por especie.

Los resultados expuestos con anterioridad permitirían inferir que, en este género, es posible desacoplar el compromiso entre eficiencia y seguridad conductiva, lo cual es confirmado por la relación general de signo negativo entre el nivel de conductividad máxima y la tensión necesaria para producir una reducción del 50% en la conductividad, el cual es el parámetro más ampliamente utilizado para comparaciones intra e interespecíficas en vulnerabilidad a la cavitación (Figura 7.3). Este resultado, que es contrario a la relación general establecida para especies gimnospermas y angiospermas por la gran mayoría de las publicaciones referentes al tema, sugiere que es posible seleccionar genotipos con mayor eficiencia en la conducción de agua sin afectar el nivel de vulnerabilidad a la cavitación bajo condiciones de estrés por sequía. Estos resultados generales son coincidentes con los hallados en el análisis interespecífico del capítulo 3 donde no se encontró evidencia de un compromiso neto entre eficiencia y seguridad conductiva, sino más bien lo contrario. A nivel intraespecífico (capítulo 4), si bien las relaciones halladas coincidieron en gran medida con aquellas observadas entre especies, en general se observó una falta de relación entre el tamaño de los elementos conductivos y la vulnerabilidad a la cavitación, lo cual sería también indicativo de ausencia de compromiso.

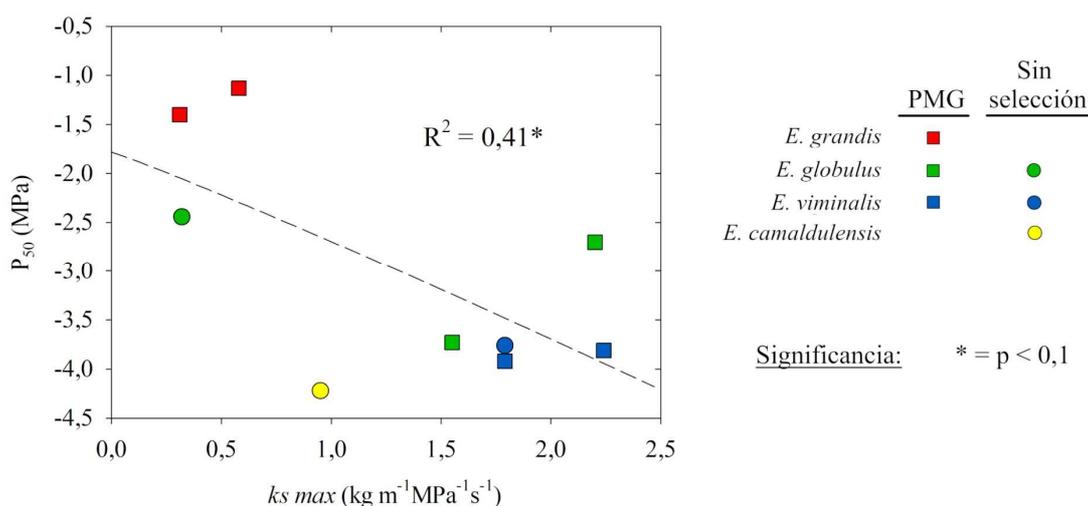


Figura 7.3. Relación entre el nivel de conductividad hidráulica específica máxima (ks_{max}) y la tensión necesaria para producir el 50% de pérdida de dicha conductividad (P_{50}) en ramas de cuatro especies de *Eucalyptus*. Los valores correspondientes a material proveniente de Programas de Mejoramiento Genético (PMG) representan valores promedio de progenies de alta y baja densidad, mientras que aquellos provenientes de material sin selección corresponden a promedios por especie.

Cavitación por frío (congelamiento/descongelamiento)

Para el caso de la vulnerabilidad a la cavitación por frío, esta se analizó en el capítulo 5, a nivel interespecífico, siendo estos los únicos datos disponibles para establecer relaciones generales. De acuerdo con los resultados obtenidos, el nivel de vulnerabilidad observado, así como el desarrollo del proceso de nucleación y la recuperación de la conductividad luego del evento de congelamiento, se encuentran íntimamente relacionados con las características de los vasos y, particularmente, con su distribución

de tamaños. En referencia a la hipótesis planteada, y si bien no se encontraron relaciones significativas a nivel de rama, se encontraron indicios acerca de la existencia de un compromiso entre eficiencia y seguridad conductiva a nivel de especie, a través de la relación positiva entre el nivel de pérdida de conductividad y el tamaño de los vasos (Figura 7.4 a), siendo esta máxima con aquellos elementos de mayor tamaño ($>50 \mu\text{m}$). En este mismo sentido se ubicó el efecto del halo sobre la resistencia a este tipo de estrés, el cual presentó una tendencia similar en signo y significancia a la del diámetro de vasos (Figura 7.4 b). El escaso nivel de variación de las características anatómicas evaluadas en estos individuos podría ser el responsable de la baja correlación observada con el nivel de pérdida de conductividad. Sin embargo, y a pesar de la falta de significancia general de las tendencias halladas, fue posible cuantificar un compromiso entre eficiencia y seguridad conductiva en relación con el proceso de congelamiento/descongelamiento (Figura 7.4 c), lo cual es concordante con la gran mayoría de la bibliografía referente al tema.

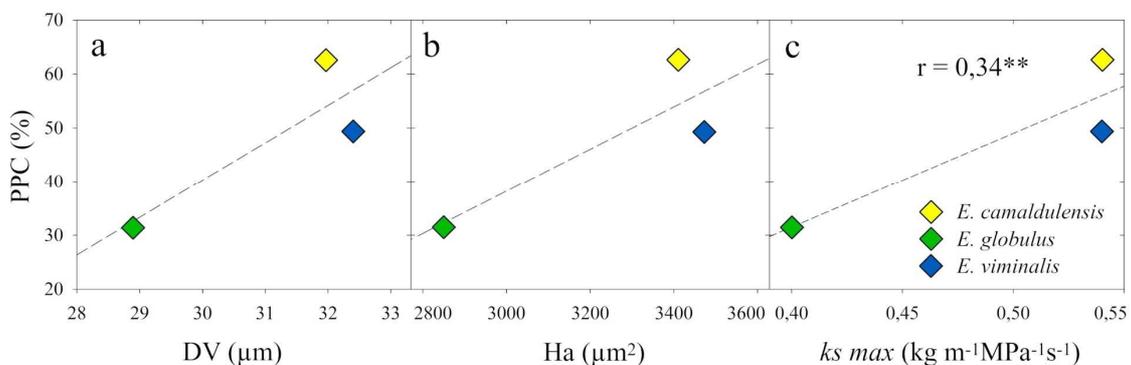


Figura 7.4. Relación entre el porcentaje de pérdida de conductividad (PPC) y el diámetro de vasos (DV), área de halo (Ha) y conductividad hidráulica específica máxima (ks_{max}) en ramas de tres especies de *Eucalyptus*. Los valores representados corresponden a promedios por especie.

Conclusión

Los resultados obtenidos permiten validar parcialmente la primera hipótesis. Si bien la contribución del tamaño de los elementos de conducción en el nivel de conductividad, ampliamente estudiada y reportada por numerosos trabajos, fue confirmada en los diferentes capítulos de esta tesis, el rol de los elementos acompañantes de los vasos en la seguridad conductiva del sistema fue parcialmente verificado. Así, en el caso de la cavitación por sequía, se encontró evidencia acerca del rol de estos elementos en la protección del sistema conductivo, contribuyendo con la disminución de la diseminación de embolismos entre elementos de conducción, los cuales se disponen de manera solitaria en la matriz del xilema. Por otro lado, la entrada de aire al sistema estaría más relacionada con el tamaño de las punteaduras, las cuales, a su vez, presentaron una asociación con el tamaño de vasos contraria a la esperada, la cual sería responsable de la relación negativa entre el tamaño de los elementos conductivos y la vulnerabilidad experimentada frente a este estrés. Para la cavitación por frío, los resultados indican que este proceso está íntimamente relacionado con el tamaño de los elementos conductivos, sin efectos

significativos por parte de las células acompañantes. Esto indicaría que la relación entre eficiencia y seguridad conductiva depende en gran medida de las características de los vasos y del estrés considerado. En este sentido, se encontraron evidencias de compromiso entre ambos procesos en el caso de la cavitación por frío, pero observándose lo opuesto al analizar la resistencia a sequía, donde la relación positiva entre conductividad y resistencia permitiría, dentro de ciertos límites, la selección de genotipos donde se optimicen ambos procesos.

El hecho de que ciertas relaciones hayan presentado diferentes niveles de significancia, e incluso signos opuestos a diferentes escalas de análisis, podría ser en parte consecuencia del rango de variación diferencial de las características evaluadas. Esto, a su vez, derivaría de la relativa homogeneidad en ciertas características de la madera entre especies, dentro de un área determinada, o entre genotipos de una misma especie. En este sentido, si consideramos la relación entre tamaño de vasos y conductividad, podemos observar que, pese a la baja significancia obtenida en el análisis interespecífico de los individuos seleccionados para evaluar la resistencia a la cavitación por frío, los valores allí obtenidos se ubican muy cercanos a los estimados por el modelo calculado en base al total de determinaciones (Figura 7.1 a). Si bien se especuló que el bajo nivel de conductividad medido sería consecuencia de un sistema de conducción parcialmente embolizado (relacionado esto último con la época en que se llevó a cabo la determinación), al considerar el conjunto de datos se destaca el escaso rango de variación entre los individuos de estas especies para las características evaluadas, el cual podría ser responsable del bajo nivel de correlación entre ellas. Esto también quedó evidenciado en el efecto sobre la vulnerabilidad a la cavitación por frío (Figura 7.4 a).

Por otro lado, existen ciertas relaciones que, a nivel intraespecífico, presentaron un signo dado y, al ampliar la escala, el mismo se invirtió. Así, si observamos la relación entre tamaño de vasos y vulnerabilidad a la cavitación por sequía (Fig. 7.2 b), al considerar los materiales provenientes de programas de mejoramiento genético (PMG), la tendencia para cada especie es hacia un aumento de la vulnerabilidad con el aumento del diámetro. Sin embargo, al considerar todas las especies y materiales muestreados, esta se invierte y los puntos se distribuyen de manera similar a lo observado en el análisis interespecífico (materiales sin selección). Esto podría indicar que, dentro del rango de variación relativamente acotado de los caracteres de una especie, la selección de genotipos en base a ciertas características da lugar a cambios en las proporciones y/o morfometría de los diferentes elementos celulares que componen la madera y, como consecuencia, de sus propiedades, las cuales influirán en el signo y/o la significancia de las relaciones halladas. De este hecho, además, se deduce que las punteaduras, si bien son estructuras cuyo tamaño se encuentra altamente relacionado con el tamaño de los vasos y resultarían de gran importancia para explicar el desarrollo del proceso de cavitación, por sí solas no definen el nivel de vulnerabilidad que presenta una especie o genotipo en particular, sino que dependerá de interrelaciones entre los diferentes elementos que forman parte de la anatomía intrincada de este género. Entre estos elementos, los más significativos serían aquellos que rodean a los vasos, particularmente las traqueidas vasicéntricas.

Hipótesis II

A nivel del género, existe **correlación en la resistencia a estrés por heladas y por sequía** (tolerancia general al estrés abiótico) en las distintas especies, que puede ser explicada por las **características diferenciales de su madera**, que a su vez determinan los **requerimientos ambientales de las diferentes especies**.

Si consideramos los valores medios de vulnerabilidad a la cavitación por sequía, obtenidos en los capítulos 3 y 4 (P_{50}), y por frío, determinados en el capítulo 5 (PPC), de las tres especies ensayadas bajo ambos tipos de estrés (*E. globulus*, *E. viminalis* y *E. camaldulensis*), existe una asociación lineal negativa casi perfecta (~ -1), si bien esta relación no resulta significativa debido al bajo número de datos (Figura 7.5).

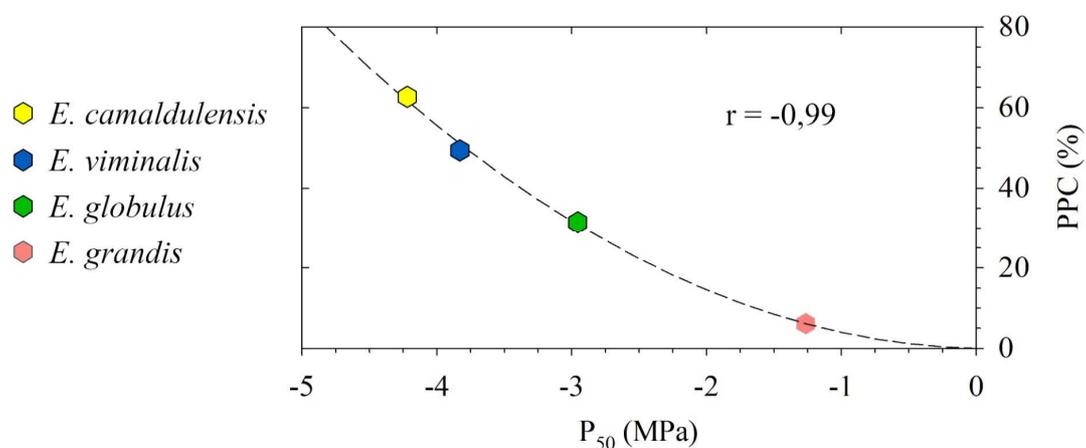


Figura 7.5. Relación entre el nivel de vulnerabilidad a la cavitación por sequía (P_{50}) y por frío (PPC) en ramas de cuatro especies de *Eucalyptus*. La línea punteada representa el ajuste de un modelo polinómico de 2^{do} grado que pasa por el origen, basado en los datos promedio por especie para *E. camaldulensis*, *E. viminalis* y *E. globulus*. Para el caso de *E. grandis*, el valor de PPC fue estimado utilizando este modelo, a partir del valor medio de P_{50} para esta especie.

Esto nos indicaría que la madera de estas especies presenta una resistencia diferencial frente a ambos tipos de estrés: a medida que aumenta la resistencia a la cavitación por sequía disminuye su resistencia al frío, y viceversa. Estos resultados implicarían que en *Eucalyptus*, a diferencia de otros géneros donde la resistencia a la cavitación por frío y sequía aumenta con el tamaño de los elementos conductivos y viceversa, existe un compromiso a nivel de ramas en la resistencia a los dos tipos de cavitación.

Como consecuencia, si se compara la vulnerabilidad a la cavitación por frío esperada (en función de la susceptibilidad a las heladas de estas especies) con la efectivamente determinada (o estimada), la dirección de la relación resulta inversa (Tabla 7.1; Figura 7.6). Por el contrario, la resistencia observada para la cavitación por sequía se condice con aquella esperada en función de la resistencia al estrés hídrico que son capaces de soportar estas especies, presentando una relación directa entre ambas (Figura 7.6).

Tabla 7.1. Resistencia a la cavitación esperada (a partir de requerimientos a campo) y observada (en laboratorio) para los dos tipos de estrés probados.

	Sequía		Frío	
	esperada	observada	esperada	observada
<i>E. camaldulensis</i>	++	++	+	--
<i>E. viminalis</i>	+	+	++	-
<i>E. globulus</i>	-	-	-	+
<i>E. grandis</i>	--	--	--	++*

Referencias: (+ +) muy resistente; (+) resistente; (-) vulnerable; (--) muy vulnerable. * resistencia estimada a partir de modelo (Figura 7.5).

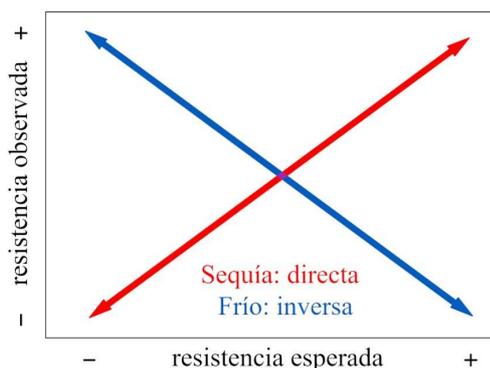


Figura 7.6. Esquema de la relación entre el nivel de resistencia esperada y observado.

Los resultados expuestos nos permiten **validar parcialmente la hipótesis planteada**. Por un lado, la relación directa entre la resistencia a la cavitación por sequía y al déficit hídrico indicaría que el desempeño a campo de las especies ensayadas estaría influenciado principalmente por las características anatómicas de la madera. En este sentido, es necesario remarcar que la resistencia a la cavitación está determinada significativamente por el tamaño de los vasos (Figura 7.2 c) pero en un sentido inverso al esperado, a través de su relación negativa con el tamaño de las punteaduras. Así tenemos que las especies de mayor tamaño de vasos –en las ramas– resultaron las más resistentes a la cavitación por sequía y las más resistentes a déficits hídricos a campo (Tabla 7.1). Por otro lado, la relación inversa entre resistencia a la cavitación por congelamiento/descongelamiento y la resistencia a las heladas de las especies consideradas, indicaría que estos procesos se encuentran determinados por características diferentes. Así, la resistencia a la cavitación estaría influenciada principalmente por el tamaño de vasos de las ramas (Figura 7.4 a), mientras que la resistencia a heladas sería controlada por las características de otros órganos, principalmente el contenido de azúcares solubles en las hojas. Este control independiente de ambos procesos sería el responsable de que la especie más vulnerable a heladas en condiciones de campo de las tres especies templadas ensayadas (*E. globulus*) presente, sin embargo, una resistencia a la cavitación superior a la de las especies más resistentes (*E. camaldulensis* y *E. viminalis*).

En el estudio presentado en el Capítulo 2, *E. grandis*, la especie subtropical de mayor sensibilidad a ambos tipos de estrés de todas las consideradas en este trabajo, presentó la mayor disminución en el tamaño de vasos entre el tronco y las ramas, mientras que *E. viminalis* presentó la menor variación entre órganos, con *E. globulus* en una situación intermedia. Estas variaciones en la arquitectura hidráulica podrían ser el reflejo de estrategias diferentes frente al estrés: por un lado, las especies más sensibles al estrés abiótico a campo, como *E. grandis*, presentarían una estrategia de evitación frente a la sequía, posiblemente con un mayor control estomático de los niveles de potencial hídrico, una alta conductancia y capacitancia hidráulica a nivel de fuste (lo que reduce tensiones) y la posibilidad de utilizar las ramas como “fusibles” frente a un aumento significativo de la tensión, evitando poner en riesgo el fuste principal. Esta mayor sensibilidad de las

ramas frente al aumento de tensión está determinada por un menor diámetro de vasos y un mayor tamaño de las punteaduras. Si bien estos vasos de menor tamaño conferirían a las ramas una ventaja frente a la cavitación por heladas, otros órganos de la planta serían los más importantes en explicar la alta susceptibilidad al frío en esta especie. Por otro lado, las especies menos susceptibles al estrés abiótico a campo tendrían una estrategia más tolerante frente al déficit hídrico, siendo capaces de tolerar mayores tensiones sin cavitarse. Estas especies, con vasos más grandes a nivel de ramas, tendrían una desventaja en relación con la cavitación por frío. Sin embargo, nuevamente, estrategias complementarias colaborarían en explicar su distribución en sitios con heladas, por ej. en el caso de *E. viminalis*. En este sentido, el potencial compromiso en la resistencia a ambos tipos de estrés, que derivaría de la relación inversa entre el diámetro de las punteaduras y el tamaño de los vasos, funcionalmente se evitaría mediante el control de la susceptibilidad al frío en otros órganos diferentes a las ramas. Esto tiene como consecuencia, por un lado, especies potencialmente resistentes al frío que son sensibles a campo (*E. grandis* y *E. globulus*) y, por el otro, especies potencialmente vulnerables (más vulnerables que las anteriores) pero que en el campo resultan muy resistentes (*E. camaldulensis* y *E. viminalis*). Sin embargo, esta separación espacial en el control de ambos tipos de estrés también abriría la posibilidad de mejorar las características de resistencia al frío en las especies sensibles sin alterar (demasiado) sus características hidráulicas. Esta mejora podría lograrse tanto a través de métodos reversibles, como la aclimatación al frío, o mediante procesos de selección y cruzamiento intra e interespecíficos con genotipos resistentes (por ejemplo: de alto contenido de azúcares solubles en las hojas).

Hipótesis III

*Existen patrones de variación en los perfiles de espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS) de la madera de Eucalyptus que pueden ser explicados por la variabilidad medida en los niveles de **conductividad hidráulica y vulnerabilidad** a la cavitación de distintos genotipos.*

En el capítulo 6 se llevó a cabo la recolección de espectros NIR a partir de las ramas utilizadas en el capítulo 4 para la evaluación de las relaciones entre anatomía y función, vinculadas específicamente con la resistencia a la cavitación por sequía, en dos especies de *Eucalyptus* que presentan niveles de productividad y susceptibilidad a estrés ambiental diferentes: *E. globulus* y *E. viminalis*. Los espectros obtenidos presentaron un amplio rango de variación producto, en parte, de la heterogeneidad en las características de las ramas, derivada de la nula preparación previa de las muestras. Sin embargo, estos patrones de variación también reflejaron –a partir de determinadas porciones del espectro, bajo ciertas transformaciones y con diferente grado de precisión– la variación de distintas propiedades físicas, hidráulicas y anatómicas de la madera. Entre las propiedades evaluadas, se encuentran aquellas relacionadas con la eficiencia en la conducción de agua ($k_s \max$) y la vulnerabilidad a la cavitación por sequía. En cuanto a esta última, no solo

se analizó el parámetro correspondiente a la tensión que produce la pérdida del 50% de conductividad (P_{50}), sino que se sumaron al análisis los demás parámetros de la curva de vulnerabilidad (P_{12} , P_{88} y la *pendiente* entre estos puntos). Esto se debió a la alta significancia de las relaciones halladas entre estos parámetros con determinados componentes anatómicos y características físicas de la madera, los cuales fueron expuestos a lo largo de esta tesis.

El análisis llevado a cabo, el primero de su tipo del que se tenga registro para especies Angiospermas, permitió **validar esta hipótesis**. En este sentido, fue posible establecer calibraciones entre espectros de absorción NIR y las características anatómicas, físicas e hidráulicas de la madera de *Eucalyptus* y generar modelos que permitieron predecirlas con diferente grado de ajuste. A su vez, fue posible comprobar que ciertas porciones del espectro presentan especificidad con determinadas características y permiten mejorar la estimación. Mas allá de estos resultados, satisfactorios a nivel general, es necesario tener en cuenta algunas consideraciones. Así, la calibración de modelos PLS-R (regresión por mínimos cuadrados parciales) permitió modelar con un adecuado nivel de ajuste las variables correspondientes a P_{50} y $ks\ max$, lo cual indicaría que, dentro del espectro de absorción NIR de la madera, es posible identificar porciones de este espectro que se relacionan con características de la madera que determinan, a su vez, estas propiedades hidráulicas. Sin embargo, estos modelos se ubicaron entre los 3 que menor grado de ajuste presentaron, de acuerdo con un indicador de aptitud, desarrollado *ad-hoc* y calculado a partir del coeficiente de determinación, el número de *outliers* y el número de factores utilizados para la construcción del modelo (Tabla 7.2).

Tabla 7.2. Comparación de la calibración de los modelos PLS-R entre los espectros NIR y las diferentes variables analizadas.

Variable	Cantidad de factores	Coefficiente de determinación R^2	Cantidad de Outliers	Indicador de Aptitud del Modelo (IAM)	Orden	
<i>Ha</i>	1	0,82	8	14,8%	0,695	1
<i>RHV</i>	1	0,81	11	20,4%	0,642	2
<i>FV</i>	1	0,71	8	14,8%	0,608	3
<i>DB</i>	2	0,73	7	10,6%	0,585	4
<i>FPF</i>	3	0,75	6	11,1%	0,533	5
<i>Pendiente</i>	2	0,83	19	29,7%	0,526	6
<i>DV</i>	4	0,74	3	5,6%	0,492	7
P_{88}	3	0,80	18	28,1%	0,457	8
P_{12}	4	0,75	14	21,9	0,409	9
<i>Dh</i>	2	0,78	25	46,3%	0,377	10
<i>ks max</i>	4	0,52	11	16,7%	0,304	11
<i>Rmm</i>	1	0,40	18	33,3%	0,267	12
P_{50}	2	0,39	20	31,3%	0,239	13

Referencias: *DB*: densidad básica; P_{50} : potencial agua al 50% de pérdida de conductividad; P_{12} : potencial agua al 12% de pérdida de conductividad; P_{88} : potencial agua al 88% de pérdida de conductividad; *pendiente*: pendiente de la curva de vulnerabilidad a la cavitación; *DV*: diámetro de vasos; *FV*: frecuencia de vasos; *Dh*: diámetro hidráulico; *RHV*: relación entre el tamaño de halo y el tamaño del vasos; *Ha*: tamaño del halo; *FPF*: fracción de pared de fibras; *Rmm*: radios por milímetro lineal.

Estas variables, junto con el número de radios por milímetro lineal, presentaron los menores valores de coeficiente de determinación, el cual resultó ser el factor determinante de la baja capacidad predictiva de los modelos desarrollados para estas características. Por otro lado, entre las variables mejor modeladas se destacaron variables anatómicas, como aquellas relacionadas con los elementos celulares acompañantes de los vasos (*RHV*, *Ha*) y la frecuencia de vasos (*FV*). El resto de las variables se ubicó entre estos extremos, destacándose la alta capacidad predictiva de los modelos desarrollados para densidad (*DB*), fracción de pared de fibras (*FPF*) y el resto de los parámetros de la curva de cavitación. Respecto a estos parámetros, los resultados expuestos indicarían que estos tienen un mayor valor funcional respecto de la capacidad de resistencia de una determinada especie frente al proceso de cavitación por sequía, al relacionarse con etapas del proceso tales como el punto de entrada de aire a los vasos (P_{12}) o el punto a partir del cual el proceso se torna irreversible (P_{88}), los cuales a su vez definen la velocidad del proceso (*pendiente*).

Por su parte, P_{50} representaría el valor medio de este proceso y, si bien carecería de valor explicativo en sí mismo, permitiría la comparación intra e interespecífica de la resistencia al estrés por sequía. Esto es consistente con los resultados hallados en los capítulos 3 y 4, donde se evidenció la complejidad de la relación entre las características anatómicas y este parámetro ampliamente utilizado, y explicaría la baja capacidad predictiva de los modelos desarrollados en el capítulo 6. Hipotéticamente, dos individuos con el mismo nivel medio de vulnerabilidad a la cavitación (P_{50}) podrían diferenciarse en el resto de los parámetros de la curva de vulnerabilidad. Este hecho fue comprobado durante el análisis de las curvas de cavitación a nivel de individuo para las diferentes especies (Figura 7.7).

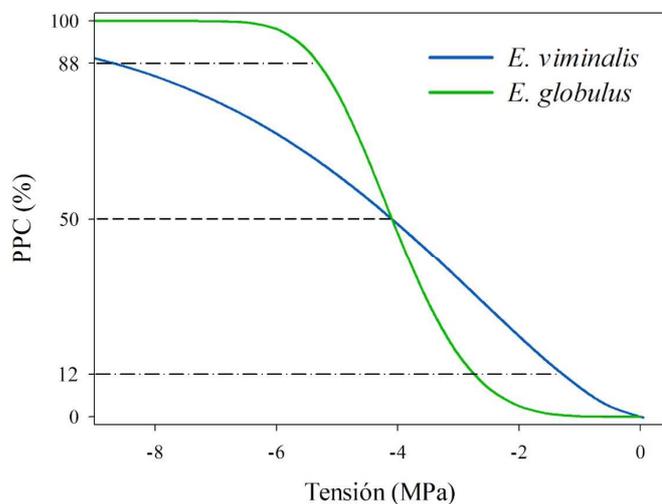


Figura 7.7. Representación de las curvas de vulnerabilidad a la cavitación de dos individuos con el mismo nivel de resistencia media, pero con diferencias significativas en el resto de los parámetros de la curva (P_{12} , P_{88} y *pendiente*).

En el ejemplo de la figura 7.7 se observan las curvas de vulnerabilidad a la cavitación de dos individuos, una de *E. globulus* y otra de *E. viminalis*, analizados en el capítulo 4, los cuales presentaron el mismo nivel de resistencia media ($P_{50} = -4,10$), pero diferencias marcadas en la pendiente y, por consiguiente, en P_{12} y P_{88} . Las diferencias en las curvas de vulnerabilidad observadas en estos dos individuos podrían indicar estrategias

contrastantes frente a la sequía, las cuales influirán en la resistencia a campo frente a este estrés y, por ende, en su desempeño ecológico y productivo. Así, a nivel general, una curva de vulnerabilidad similar a la verde (*E. globulus*) representaría un individuo (o una especie) con una estrategia de evitación del estrés, probablemente con fuerte control estomático de la tensión en el interior del xilema y una pérdida abrupta de la conductividad por encima de cierto límite (alta *pendiente*). En el otro extremo, la curva azul (*E. viminalis*) representaría una estrategia de tolerancia al estrés, con pérdidas de conductividad relativamente pequeñas y constantes a medida que aumenta la tensión en el xilema. Por otro lado, estas diferencias podrían indicar variaciones en las características hidráulicas referentes a la distribución de tamaños de los elementos conductivos y, por consiguiente, en las características de las punteaduras. Lo expuesto deja en claro que es necesaria cierta cautela cuando se realizan interpretaciones acerca de la resistencia al estrés por sequía a partir de comparaciones basadas solo en el parámetro P_{50} , ya que pueden derivar en conclusiones apresuradas, siendo recomendable incorporar en las comparaciones otros parámetros más representativos del proceso, como la pendiente de la curva de vulnerabilidad a la cavitación.

Consideraciones finales

Esta tesis se planteó como objetivo principal el tratar de conocer el valor funcional de la microestructura de la madera de *Eucalyptus* en relación con la resistencia a sequía y heladas. En este sentido, y a lo largo de todo el trabajo, se obtuvieron resultados tendientes al cumplimiento de este propósito. Así, a través de los diferentes capítulos se abordó el análisis de la estructura anatómica de la madera de diferentes especies de *Eucalyptus* con diversos requerimientos de hábitat y su relación con parámetros funcionales relacionados con la eficiencia y seguridad conductiva, así como también se avanzó en el desarrollo de herramientas de fenotipado a partir de métodos de estimación indirectos y de alta capacidad de procesamiento.

Como se ha visto en los capítulos precedentes, y como se deduce del análisis de las hipótesis iniciales llevado a cabo en la sección previa, la compleja estructura anatómica de la madera del género *Eucalyptus* determina, en gran medida, la existencia de complejas relaciones entre anatomía y función. En este sentido, el principal aporte de esta tesis al vacío de conocimiento existente en torno a este género (el segundo en importancia para la producción forestal en Argentina y a nivel mundial, después de *Pinus*) refiere a la falta de compromiso detectada entre conductividad y seguridad hidráulica a nivel de ramas frente al estrés por sequía. Esta relación inversa estaría mediada por las características de los vasos solitarios, principalmente el tamaño de las punteaduras y la presencia de un conjunto de células, compuesto fundamentalmente por traqueidas vasicéntricas y parénquima axial, que rodean los elementos conductivos formando un halo. Estas características harían posible, al menos para este órgano, el mejoramiento simultáneo de ambas propiedades hidráulicas, lo cual redundaría en individuos con mayor capacidad conductiva y resistencia a la cavitación por tensión. Sin embargo, esto requiere

comprender cómo varían estas propiedades a nivel de planta entera, como es la coordinación entre órganos y cuáles son los posibles compromisos entre ellos.

Por otro lado, durante el transcurso de este trabajo se encontraron fundamentos para afirmar que el grado en que la compleja relación entre anatomía y función de la madera de este género determinan la capacidad de adaptación al ambiente dependerá principalmente del estrés considerado. En el caso del estrés por sequía, por un lado, el nivel de resistencia experimentado en laboratorio es concordante con el desempeño ecológico evidenciado a campo por estas especies. Por otro lado, en cuanto al estrés por frío, los resultados experimentales reflejan una relación inversa con los valores esperados, lo cual indicaría que la capacidad de adaptación al frío no está determinada, en gran medida, por las características de la madera de las ramas. Esto abriría la posibilidad de desacoplar el mejoramiento para ambas características, al depender una (resistencia a la sequía) de las características de las ramas y la otra (resistencia al frío) de las características de otros órganos como, por ejemplo, el contenido de azúcares solubles en las hojas. Estos resultados remarcan la complejidad del proceso conductivo a través del árbol, el cual no está determinado por un solo componente, sino que depende de diferentes órganos, con una estructura anatómica definida, los cuales se integran en una determinada estructura hidráulica y cuya acción está coordinada dentro de una estrategia ecológica particular. A su vez, resaltan la necesidad de proceder con cierta cautela al extrapolar las relaciones halladas en un órgano al resto de la planta.

Antes de concluir este apartado resulta importante destacar dos cuestiones que no fueron abordadas hasta aquí, pero que fueron significativas a lo largo del trabajo. En primer lugar, al momento de plantear las hipótesis de trabajo, y en función de la experiencia de mis directoras y las numerosas referencias bibliográficas que utilizaban únicamente P_{50} como parámetro de comparación para la resistencia a la cavitación por sequía y, más aún, para la resistencia en general frente a este tipo de estrés, estas se plantearon teniendo en mente principalmente este parámetro. Sin embargo, al comenzar con la parte experimental y analizar los primeros resultados, resultó evidente que las relaciones comúnmente establecidas en trabajos similares entre este parámetro y las diversas características del xilema estudiadas, principalmente aquellas referidas a las dimensiones de los vasos, no se mantenían dentro de las especies seleccionadas de este género. Al profundizar el análisis en busca de las causas de esta falta de relación fue posible corroborar que los demás parámetros de la curva de cavitación (P_{12} , P_{88} y la *pendiente* de la curva) sí presentaban relaciones significativas con algunos rasgos anatómicos, más allá de que los signos de esas correspondencias fueran contrarios a los esperados. Esto sería producto de la complejidad del proceso de cavitación en esta especie y, en particular, su vinculación con el tamaño de los elementos conductivos con los cuales, como se vio en el capítulo 4, presenta una relación de dependencia al mismo tiempo positiva y negativa, posiblemente producto del efecto mediado por el tamaño de las punteaduras. De acuerdo con los resultados de esta tesis, estos parámetros tendrían un significado funcional más relacionado con características particulares del xilema, mientras que P_{50} resultaría una variable integradora del proceso, la cual resultaría de gran utilidad para comparaciones

donde existen grandes patrones de variación en las características evaluadas, pero presentaría algunas dificultades para su uso en escalas de análisis reducidas con patrones de variación acotados.

Finalmente, y relacionado con el punto anterior, durante la delimitación del sistema de estudio se prestó especial atención a una variable en particular, sobre la cual no se plantearon hipótesis explícitamente y motivo por el cual no se ha discutido en este capítulo. Esta variable es la densidad de la madera, la cual guio la selección de especies a evaluar, y de genotipos dentro de esas especies, buscando maximizar su rango de variación, ya que esta resulta una variable integradora de las características de la madera que representa la combinación de los diferentes elementos celulares que componen el xilema. Respecto de esta variable, los resultados de los capítulos 3 y 4 de esta tesis sugieren que, a pesar de la escasa significancia de las relaciones halladas (las cuales no siempre se mantuvieron en los diferentes análisis, probablemente debido al rango de variabilidad), la densidad de la madera de las ramas estaría involucrada en la resistencia a la cavitación, en consonancia con la tendencia general interespecífica de aumento de la resistencia con la densidad. Sin embargo, al tratarse de especies de vasos solitarios, el rol de la matriz fibrosa (en especial, de las paredes de las fibras) estaría vinculado a la disminución de la velocidad de propagación de los eventos de cavitación de vasos adyacentes, en lugar del refuerzo de los elementos conductivos.

Futuras líneas de investigación

A partir de los resultados obtenidos y expuestos a lo largo de esta tesis surgen una serie de interrogantes que podrían abordarse a partir de su integración en futuras líneas de investigación. Entre éstos, resulta clave la relación inversa entre el tamaño de los elementos conductivos y el de las punteaduras, en relación con las posibles implicancias en la resistencia a la cavitación por sequía que de ella se derivan. A este respecto, sería fundamental analizar si esta relación se mantiene al ampliar el análisis para incluir otras especies de *Eucalyptus*, así como también a otras especies de vasos solitarios. Estos estudios deberían complementarse con análisis de vulnerabilidad a la cavitación por sequía, con el objetivo de confirmar que esta relación es la que está gobernando la falta de compromiso entre eficiencia y seguridad hidráulica frente a este estrés.

Respecto a este punto, sería interesante abordar un estudio que indague en la arquitectura hidráulica de diferentes especies de *Eucalyptus*, con el fin de comprender cómo se integran funcionalmente las diferentes características anatómicas de los órganos involucrados en el transporte de agua dentro del árbol frente al estrés hídrico. Este estudio podría buscar explicar, entre otras cosas, por qué las especies con mayores tasas de crecimiento (en este trabajo, *E. grandis* y *E. globulus*) presentan los menores tamaños de vasos a nivel de rama y, por consiguiente, menor conductividad hidráulica específica máxima (ks_{max}).

Relacionado con la vulnerabilidad a la cavitación por frío, de esta tesis surge que la madera no jugaría un rol central en explicar la resistencia a esta fuente de estrés. Por otro lado, es sabido que el ajuste osmótico foliar es un proceso esencial en la tolerancia a estrés en las especies del género *Eucalyptus*. Por lo tanto, sería interesante comparar el desempeño y la vulnerabilidad frente al estrés por sequía y por heladas en conjunto, en genotipos y especies con diferente capacidad de ajuste osmótico y contenido de azúcares solubles en hojas.

Por último, y relacionado con el análisis de espectros NIR, puede señalarse la necesidad de profundizar el estudio llevado a cabo a través del establecimiento de relaciones entre las porciones del espectro significativas para la estimación de determinadas variables y los grupos químicos con los cuales se asocian, con el objeto de intentar dilucidar la forma en que ciertos procesos son regulados a nivel de la composición química de la madera. Para esto sería recomendable incorporar otras especies de *Eucalyptus*, con el objeto de obtener modelos más robustos y de mayor capacidad predictiva. Por otro lado, y de manera análoga a lo realizado para el caso de cavitación por sequía, podría llevarse a cabo la calibración de modelos para establecer la resistencia a la cavitación por frío. Finalmente, podría indagarse la posibilidad de desarrollar modelos predictivos que relacionen los espectros NIR obtenidos de muestras de tronco con la resistencia a la cavitación frente a ambos tipos de estrés en ramas, de manera de facilitar la selección de genotipos resistentes.



Referencias bibliográficas

Abe, H., Murat, Y., Kubo, S., Watanabe, K., Tanaka, R., Sulaiman, O., Hashim, R., Ramle, S.F.M., Zhang, C., Noshiro, S., Mori, Y. 2013. Estimation of the ratio of vascular bundles to parenchyma tissue in oil palm trunks using NIR spectroscopy. *BioResources*, 8 (2): 1573-1581. DOI: 10.15376/biores.8.2.1573-1581

Adams, H.D., Zeppel, M.J.B., Anderegg, W.R.L., Hartmann, H., Landhäusser, S.M., Tissue, D.T., Huxman, T.E., Hudson, P.J., Franz, T.E., Allen, C.D., Anderegg, L.D.L., Barron-Gafford, G.A., Beerling, D.J., Breshears, D.D., Brodribb, T.J., Bugmann, H., Cobb, R.C., Collins, A.D., Dickman, L.T., Duan, H., Ewers, B.E., Galiano, L., Galvez, D.A., Garcia-Forner, N., Gaylord, M.L., Germino, M.J., Gessler, A., Hacke, U.G., Hakamada, R., Hector, A., Jenkins, M.W., Kane, J.M., Kolb, T.E., Law, D.J., Lewis, J.D., Limousin, J.M., Love, D.M., Macalady, A.K., Martínez-Vilalta, J., Mencuccini, M., Mitchell, P.J., Muss, J.D., O'Brien, M.J., O'Grady, A.P., Pangle, R.E., Pinkard, E.A., Piper, F.I., Plaut, J.A., Pockman, W.T., Quirk, J., Reinhardt, K., Ripullone, F., Ryan, M.G., Sala, A., Sevanto, S., Sperry, J.S., Vargas, R., Vennetier, M., Way, D.A., Xu, Ch., Yopez, E.A., McDowell, N.G. 2017. A multi-species synthesis of physiological mechanisms in drought-induced tree mortality. *Nature Ecology & Evolution*, 1 (9): 1285-1291. DOI: 10.1038/s41559-017-0248-x

Alarcón, P., Fernández, M.E., Monteoliva, S., Martínez-Meier, A. 2016. Variación genética y plasticidad fenotípica de la microdensidad de la madera en dos especies de *Eucalyptus*: aportes para la selección de genotipos mejor adaptados al estrés ambiental. XXX Jornadas Forestales de Entre Ríos, 29-30 de septiembre, Concordia, Argentina.

Allen, C.D., Macalady, A.K., Chenchouni, H., Bachelet, D., McDowell, N., Vennetier, M., Kitzberger, T., Rigling, A., Breshears, D.D., Hogg, E.H.(T.), Gonzalez, P., Fensham, R., Zhang, Z., Castro, J., Demidova, N., Lim, J.-H., Allard, G., Running, S.W., Semerci, A., Cobb, N. 2010. A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology and Management*, 259 (4): 660-684. DOI: 10.1016/j.foreco.2009.09.001

Almeida, M.H., Chaves, M.M., Silva, J.C. 1994. Cold acclimation in eucalypt hybrids. *Tree Physiology*, 14 (7-9): 921-932. DOI: 10.1093/treephys/14.7-8-9.921

Alves, E.S., Angyalossy-Alfonso, V. 2002. Ecological trends in the wood anatomy of some Brazilian species. 2. Axial parenchyma, rays and fibres. *IAWA Journal*, 23 (4): 391-418. DOI: 10.1163/22941932-90000311

Alves, A., Santos, A., Rozenberg, P., Pâques, L.E., Charpentier, J-P., Schwanninger, M., Rodrigues, J. 2012. A common near infrared-based partial least squares regression

model for the prediction of wood density of *Pinus pinaster* and *Larix x eurolepis*. Wood Science and Technology, 46 (1-3): 157-175. DOI: 10.1007/s00226-010-0383-x

Anderegg, W.R.L., Meinzer, F.C. 2001. Wood Anatomy and Plant Hydraulics in a Changing Climate. En: Hacke, U. (ed.) *Functional and ecological xylem anatomy*. Springer. Cham, Suiza. pp 235-254. DOI: 10.1007/978-3-319-15783-2_7

Anderegg, W.R.L., Berry, J.A., Smith, D.D., Sperry, J.S., Anderegg, L.D.L., Field, C.B. 2012. The roles of hydraulic and carbon stress in a widespread climate-induced forest die-off. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109 (1): 233-237. DOI: 10.1073/pnas.1107891109

Anderegg, W.R.L., Klein, T., Bartlett, M., Sack, L., Pellegrini, A.F.A., Choat, B., Jansen, S. 2016. Meta-analysis reveals that hydraulic traits explain cross-species patterns of drought-induced tree mortality across the globe. Proceedings of the National Academy of Sciences, 113 (18): 5024-5029. DOI: 10.1073/pnas.1525678113

Arnold, R., Li, B., Luo, J., Bai, F., Baker, T. 2015. Selection of cold-tolerant *Eucalyptus* species and provenances for inland frost-susceptible, humid subtropical regions of southern China. Australian Forestry, 78 (3): 180-193. DOI: 10.1080/00049158.2015.1063471

Baas, P. 1982. Systematic, phylogenetic and ecological wood anatomy – History and perspectives. En: Baas, P. (ed.) *New Perspectives in Wood Anatomy*. Springer. Dordrecht, Países Bajos. pp 23-58. DOI: 10.1007/978-94-017-2418-0_2

Baettig, R., Cornejo, J., Guajardo, J. 2017. Evaluation of intra-ring wood density profiles using NIRS: comparison with the X-ray method. Annals of Forest Science, 74 (1): art. 13. DOI: 10.1007/s13595-016-0597-7

Barigah, T.S., Charrier, O., Douris, M., Bonhomme, M., Herbette, S., Améglio, T., Fichot, R., Brignolas, F., Cochard, H. 2013. Water stress-induced xylem hydraulic failure is a causal factor of tree mortality in beech and poplar. Annals of Botany, 112 (7): 1431-1437. DOI: 10.1093/aob/mct204

Barigah, T., Gyenge, J.E., Sergent, A.S., Varela, S., Cochard, H., Delzon, S., Dalla Salda, G., Martinez-Meier, A., Rozenberg, P., Martin-St Paul, N.K., Fernández, M.E. 2019. Application of pneumatic method to build vulnerability curves in solitary vesseled trees: assessment of vulnerability to cavitation of three *Eucalyptus* species. International Conference: Adapting Forests Ecosystems and Wood Products to Biotic and Abiotic Stress. 12-15 de marzo. Bariloche, Argentina.

Barotto, A.J., Monteoliva, S., Gyenge, J., Fernández, M.E. 2014. Relación entre vulnerabilidad a la cavitación y anatomía de la madera en tres especies del género *Eucalyptus*: resultados preliminares. Actas del XV Congreso Latinoamericano y XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, 21-24 de septiembre, Mar del Plata, Argentina.

- Barotto, A.J., Fernández, M.E., Gyenge, J., Meyra, A., Martínez-Meier, A., Monteoliva, S. 2016.** First insights into the functional role of vascentric tracheids and parenchyma in eucalyptus species with solitary vessels: Do they contribute to xylem efficiency or safety? *Tree Physiology*, 36 (12): 1485-1497. DOI: 10.1093/treephys/tpw072
- Barotto, A.J., Monteoliva, S., Gyenge, J., Martínez-Meier, A., Moreno, K., Tesón, N., Fernández, M.E. 2017.** Wood density and anatomy of three *Eucalyptus* species: Implications for hydraulic conductivity. *Forest Systems*, 26 (1): e010 1-11. DOI: 10.5424/fs/2017261-10446
- Barotto, A.J., Monteoliva, S., Gyenge, J., Martínez-Meier, A., Fernández, M.E. 2018.** Functional relationships between wood structure and vulnerability to xylem cavitation in races of *Eucalyptus globulus* differing in wood density. *Tree Physiology*, 38 (2): 243-251. DOI: 10.1093/treephys/tpx138
- Beć, K.B., Grabska, J., Czarnecki, M.A. 2018.** Spectra-structure correlations in NIR region: Spectroscopic and anharmonic DFT study of n-hexanol, cyclohexanol and phenol. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 197: 176-184. DOI: 10.1016/j.saa.2018.01.041
- Bedetti, F., Rimoldi, P., Sanabria, C. 2017.** *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. (Myrtaceae) como una especie casual en el sur de la provincia de Santa Fe. *Historia Natural*, 7 (2): 143 – 150. ISSN 0326-1778
- Bokobza, L. 1998.** Near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 6 (1-4): 3-17. DOI: 10.1255/jnirs.116
- Boland, D.J., Brooker, M.I.H., Chippendale, G.M., Hall, N., Hyland, B.P.M., Johnston, R.D., Kleinig, D.A., McDonald, M.W., Turner, J.D. 2006.** *Forest trees of Australia*. CSIRO. Collingwood, Australia.
- Booth, T.H. 2013.** Eucalypt plantations and climate change. *Forest Ecology and Management*, 301: 28-34. DOI: 10.1016/j.foreco.2012.04.004
- Bréda, N., Huc, R., Granier, A., Dreyer, E. 2006.** Temperate forest trees and stands under severe drought: A review of ecophysiological responses, adaptation processes and long-term consequences. *Annals of Forest Science*, 63 (6): 625-644. DOI: 10.1051/forest:2006042
- Brodersen, C.R., McElrone, A.J., Choat, B., Matthews, M.A., Shackel, K.A. 2010.** The dynamics of embolism repair in xylem: In vivo visualizations using high-resolution computed tomography. *Plant Physiology*, 154 (3): 1088-1095. DOI: 10.1104/pp.110.162396
- Brodersen, C.R., McElrone, A.J. 2013.** Maintenance of xylem network transport capacity: A review of embolism repair in vascular plants. *Frontiers in Plant Science*, 4 (APR) art 108: 1-11. DOI: 10.3389/fpls.2013.00108

Brodribb, T.J., Holbrook, N.M., Hill, R.S. 2005. Seedling growth in conifers and angiosperms: Impacts of contrasting xylem structure. *Australian Journal of Botany*, 53 (8): 749-755. DOI: 10.1071/BT05049

Bucci, S.J., Scholz, F.G., Goldstein, G., Meinzer, F.C., Sternberg, L.D.S.L. 2003. Dynamic changes in hydraulic conductivity in petioles of two savanna tree species: Factors and mechanisms contributing to the refilling of embolized vessels. *Plant, Cell and Environment*, 26 (10): 1633-1645. DOI: 10.1046/j.0140-7791.2003.01082.x

Burgess, S.S.O., Pittermann, J., Dawson, T.E. 2006. Hydraulic efficiency and safety of branch xylem increases with height in *Sequoia sempervirens* (D. Don) crowns. *Plant, Cell and Environment*, 29 (2): 229-239. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2005.01415.x

Cai, J., Tyree, M.T. 2010. The impact of vessel size on vulnerability curves: data and models for within-species variability in saplings of aspen, *Populus tremuloides* Michx. *Plant, Cell and Environment*, 33 (7): 1059-1069. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2010.02127.x

Cai, J., Li, S., Zhang, H., Zhang, S., Tyree, M.T. 2014. Recalcitrant vulnerability curves: methods of analysis and the concept of fibre bridges for enhanced cavitation resistance. *Plant, Cell and Environment*, 37 (1): 35-44. DOI: 10.1111/pce.12120

Cappa, E.P., Pathauer, P.S., Lopez, G.A. 2010. Provenance variation and genetic parameters of *Eucalyptus viminalis* in Argentina. *Tree Genetics and Genomes*, 6 (6): 981-994. DOI: 10.1007/s11295-010-0307-9

Carle, J., Vuorinen, P., Del Lungo, A. 2002. Status and trends in global forest plantation development. *Forest Products Journal*, 52 (7/8): 12-23

Carlquist, S. 1984. Vessel grouping in dicotyledon woods: significance and relationship to imperforate tracheary elements. *Aliso*, 10 (4): 505-525. DOI: 10.5642/aliso.19841004.03

Carlquist, S. 1985. Vasicentric tracheids as a drought survival mechanism in the woody flora of southern California and similar regions; review of vasicentric tracheids. *Aliso*, 11 (1): 37-68. DOI: 10.5642/aliso.19851101.05

Carlquist, S. 1987. Diagonal and tangential vessel aggregations in wood: function and relationship to vasicentric tracheids. *Aliso*, 11 (4): 451-462. DOI: 10.5642/aliso.19871104.04

Carlquist, S. 2012. How wood evolves: A new synthesis. *Botany*, 90 (10): 901-940. DOI: 10.1139/B2012-048

Carpineti, L.A., Dalla Tea, F., Glade, J.E., Marcó, M.A. 1995. *Manual para productores de eucaliptos de la Mesopotamia Argentina*. INTA-SAGyP. Concordia, Argentina.

- Carrillo, I., Aguayo, M.G., Valenzuela, S., Mendonça, R.T., Elissetche, J.P. 2015.** Variations in wood anatomy and fiber biometry of *Eucalyptus globulus* genotypes with different wood density. *Wood Research*, 60 (1): 1-10.
- Cavender-Bares, J., Holbrook, N.M. 2001.** Hydraulic properties and freezing-induced cavitation in sympatric evergreen and deciduous oaks with contrasting habitats. *Plant, Cell and Environment*, 24 (12): 1243-1256. DOI: 10.1046/j.1365-3040.2001.00797.x
- Charrier, G., Torres-Ruiz, J.M., Badel, E., Burlett, R., Choat, B., Cochard, H., Delmas, C.E.L., Domec, J.-C., Jansen, S., King, A., Lenoir, N., Martin-StPaul, N., Gambetta, G.A., Delzon, S. 2016.** Evidence for hydraulic vulnerability segmentation and lack of xylem refilling under tension. *Plant Physiology*, 172 (3): 1657-1668. DOI: 10.1104/pp.16.01079
- Chave, J., Coomes, D., Jansen, S., Lewis, S.L., Swenson, N.G., Zanne, A.E. 2009.** Towards a worldwide wood economics spectrum. *Ecology Letters*, 12 (4): 351-366. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2009.01285.x.
- Choat, B., Medek, D.E., Stuart, S.A., Pasquet-Kok, J., Egerton, J.J.G., Salari, H., Sack, L., Ball, M.C. 2011.** Xylem traits mediate a trade-off between resistance to freeze-thaw-induced embolism and photosynthetic capacity in overwintering evergreens. *New Phytologist*, 191 (4): 996-1005. DOI: 10.1111/j.14698137.2011.03772.x
- Choat, B., Brodribb, T.J., Brodersen, C.R., Duursma, R.A., López, R., Medlyn, B.E. 2018.** Triggers of tree mortality under drought. *Nature*, 558: 531-539. DOI: 10.1038/s41586-018-0240-x
- Christman, M.A., Sperry, J.S., Smith, D.D. 2012.** Rare pits, large vessels and extreme vulnerability to cavitation in a ring-porous tree species. *New Phytologist*, 193 (3): 713-720. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2011.03984.x
- Cieszewski, C.J., Strub, M., Antony, F., Bettinger, P., Dahlen, J., Lowe, R.C. 2013.** Wood quality assessment of tree trunk from the tree branch sample and auxiliary data based on NIR spectroscopy and Silviscan. *Mathematical and Computational Forestry & Natural-Resource Sciences*, 5 (1): 86-111. ISSN: 1946-7664
- Cochard, H., Ewers, F.W., Tyree, M.T. 1994.** Water relations of a tropical vine-like bamboo (*Rhipidocladum racemiflorum*): Root pressures, vulnerability to cavitation and seasonal changes in embolism. *Journal of Experimental Botany*, 45 (8): 1085-1089. DOI: 10.1093/jxb/45.8.1085
- Cochard, H. 2006.** Cavitation in trees. *Comptes Rendus Physique*, 7 (9-10): 1018-1026. DOI: 10.1016/j.crhy.2006.10.012
- Cochard, H., Delzon, S. 2013.** Hydraulic failure and repair are not routine in trees. *Annals of Forest Science*, 70: 659-661. DOI: 10.1007/s13595-013-0317-5

Cochard, H., Badel, E., Herbette, S., Delzon, S., Choat, B., Jansen, S. 2013. Methods for measuring plant vulnerability to cavitation: A critical review. *Journal of Experimental Botany*, 64 (15): 4779-4791. DOI: 10.1093/jxb/ert193

Corcuera, L., Cochard, H., Gil-Pelegrin, E., Notivol, E. 2011. Phenotypic plasticity in mesic populations of *Pinus pinaster* improves resistance to xylem embolism (P₅₀) under severe drought. *Trees - Structure and Function*, 25 (6): 1033-1042. DOI: 10.1007/s00468-011-0578-2

Costa, F.R.C., Lang, C., Almeida, D.R.A., Castilho, C.V., Poorter, L. 2018. Near-infrared spectrometry allows fast and extensive predictions of functional traits from dry leaves and branches. *Ecological Applications*, 28 (5): 1157-1167. DOI: 10.1002/eap.1728

Cozzo, D. 2007. *Silvicultura de plantaciones maderables*. Orientación Gráfica Editora. Buenos Aires, Argentina.

Cruziat, P., Cochard, H., Améglio, T. 2002. Hydraulic architecture of trees: main concepts and results. *Annals of Forest Science*, 59 (7): 723-752. DOI: 10.1051/forest:2002060

Dadswell, H.E. 1972. *The Anatomy of Eucalypt Woods*. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO). Melbourne, Australia.

Dai, A. 2013. Increasing drought under global warming in observations and models. *Nature Climate Change*, 3 (1): 52-58. DOI: 10.1038/nclimate1633

Dalla-Salda, G., Martínez-Meier, A., Cochard, H., Rozenberg, P. 2009. Variation of wood density and hydraulic properties of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) clones related to a heat and drought wave in France. *Forest Ecology and Management*, 257 (1): 182-189. DOI: 10.1016/j.foreco.2008.08.019

Dalla-Salda, G., Martínez-Meier, A., Cochard, H., Rozenberg, P. 2011. Genetic variation of xylem hydraulic properties shows that wood density is involved in adaptation to drought in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.)). *Annals of Forest Science*, 68 (4): 747-757. DOI: 10.1007/s13595-011-0091-1

Dalla-Salda, G., Fernández, M.E., Sargent, A.S., Rozenberg, P., Badel, E., Martínez-Meier, A. 2014. Dynamics of cavitation in a Douglas-fir tree-ring: transition-wood, the lord of the ring? *Journal of Plant Hydraulics*, 1: e-0005. DOI: 10.20870/jph.2014.e005

Davis, S.D., Sperry, J.S., Hacke, U.G. 1999. The relationship between xylem conduit diameter and cavitation caused by freezing. *American Journal of Botany*, 86 (10): 1367-1372. DOI: 10.2307/2656919

Debenedetti, P.G. 1996. *Metastable Liquids: Concepts and Principles*. Princeton University Press. Princeton, Estados Unidos.

Decourteix, M., Alves, G., Brunel, N., Améglio, T., Guillot, A., Lemoine, R., Pétel, G., Sakr, S. 2006. JrSUT1, a putative xylem sucrose transporter, could mediate sucrose influx into xylem parenchyma cells and be up-regulated by freeze-thaw cycles over the autumn-winter period in walnut tree (*Juglans regia* L.). *Plant, Cell and Environment*, 29 (1): 36-47. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2005.01398.x

Di Marco, E. 2015. Ficha técnica: *Eucalyptus globulus* sp. *globulus* Labill (Eucalipto blanco) Familia Myrtaceae. Dirección de Producción Forestal.

Diaz, R.A., Mormeneo, I. 2002. Zonificación del clima de la Región Pampeana mediante análisis de conglomerados con consenso. *Revista Argentina de Agrometeorología*, 2 (2): 125-131.

Dixon, H., Joly, J. 1894. On the ascent of sap. *Annals of Botany*, 8 (4): 468-470. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aob.a090723

Domec, J.-C., Gartner, B.L. 2001. Cavitation and water storage capacity in bole xylem segments of mature and young Douglas-fir trees. *Trees - Structure and Function*, 15 (4): 204-214. DOI: 10.1007/s004680100095

Domec, J.-C., Lachenbruch, B., Meinzer, F.C. 2006. Bordered pit structure and function determine spatial patterns of air-seeding thresholds in xylem of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*; Pinaceae) trees. *American Journal of Botany*, 93 (11): 1588-1600. DOI: 10.3732/ajb.93.11.1588

Drew, D.M., Pammenter, N.W. 2006. Vessel frequency, size and arrangement in two Eucalypt clones growing at sites differing in water availability. *New Zealand Journal of Forestry*, 51 (3): 23-28.

Drew, D.M., O'Grady, A.P., Downes, G.M., Read, J., Worledge, D. 2008. Daily patterns of stem size variation in irrigated and unirrigated *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiology*, 28 (10): 1573-1581. DOI: 10.1093/treephys/28.10.1573

Drew, D.M., Downes, G.M., O'Grady, A.P., Read, J., Worledge, D. 2009. High resolution temporal variation in wood properties in irrigated and non-irrigated *Eucalyptus globulus*. *Annals of Forest Science*, 66 (4): 406p1-406p10. DOI: 10.1051/forest/2009017

Elliot, S. 1959. Los eucaliptos en Argentina. *Unasyuva*, 13(3).

Evert, R.F. 2006. *Esau's Plant Anatomy: Meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development*. John Wiley & Sons. New Jersey, Estados Unidos.

Ewers, F.W., Cochard, H., Tyree, M.T. 1997. A survey of root pressures in vines of a tropical lowland forest. *Oecologia*, 110 (2): 191-196. DOI: 10.1007/s004420050149

FAO. 1981. *El eucalipto en la repoblación forestal*. FAO. Roma, Italia.

Feild, T.S., Brodribb, T. 2001. Stem water transport and freeze-thaw xylem embolism in conifers and angiosperms in a Tasmanian treeline heath. *Oecologia*, 127 (3): 314-320. DOI: 10.1007/s004420000603

Fernández, M., Valenzuela, S., Balocchi, C. 2006. RAPD and freezing resistance in *Eucalyptus globulus*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9 (3): 303-309. ISSN: 0717-3458.

Fernández, M.E., Gyenge, J. 2010. *Técnicas de medición en Ecofisiología Vegetal: Conceptos y procedimientos*. INTA. Buenos Aires, Argentina.

Fernández, M.E., Barotto, A.J., Martínez-Meier, A., Gyenge, J.E., Tesón, N., Barigah, T.S., Quiñones Martorello, A.S., Merlo, E., Dalla-Salda, G., Rozenberg, P., Monteoliva, S. 2019. New insights into wood anatomy and function relationships: how *Eucalyptus* challenges what we already know. *Forest Ecology and Management*, 454: 117638. DOI: 10.1016/j.foreco.2019.117638

Ferraz, S., Paula Lima, W., Rodrigues, C., Vrechi, A. 2018. Monitoring, processing, interpreting and communicating water use information by *Eucalyptus* plantations in Brazil. *Eucalyptus 2018: Managing Eucalyptus plantations under global changes*. 17 - 21 de septiembre. Montpellier, Francia. ISBN: 978-2-87614-743-0

Ferrere, P., Lupi, A.M., Boca, R., Nakama, V., Alfieri, A. 2008. Biomasa en plantaciones de *Eucalyptus viminalis* Labill. de la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Ciência Florestal*, 18 (3): 291-305. DOI: 10.5902/19805098440

Fortunel, C., Ruelle, J., Beauchêne, J., Fine, P.V.A., Baraloto, C. 2014. Wood specific gravity and anatomy of branches and roots in 113 Amazonian rainforest tree species across environmental gradients. *New Phytologist*, 202 (1): 79-94. DOI: 10.1111/nph.12632

Franklin, G.L. 1945. Preparation of thin sections of synthetic resins and wood-resin composites, and a new macerating method for wood. *Nature*, 155 (3924): 51. DOI: 10.1038/155051a0

Franks, F. 1985. *Biophysics and biochemistry at low temperatures*. Cambridge University Press. Cambridge, Inglaterra.

Franks, P.J., Gibson, A., Bachelard, E.P. 1995. Xylem permeability and embolism susceptibility in seedlings of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. from two different climatic zones. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22 (1):15-21. DOI: 10.1071/PP9950015

Fujiwara, S., Sameshima, K., Kuroda, K., Takamura, N. 1991. Anatomy and properties of Japanese hardwoods. I. Variation of fibre dimensions and tissue proportions and their relation to basic density. *IAWA Bulletin*, 12 (4): 419-424. DOI: 10.1163/22941932-90000544

Gartner BL, 1995. Patterns of xylem variation within a tree and their hydraulic and mechanical consequences. En: Gartner, B.L. (ed.), *Plant Stems: Physiological and Functional Morphology*. Academic Press. San Diego, Estados Unidos. pp 125-149. DOI: 10.1016/b978-012276460-8/50008-4

Gleason, S.M., Westoby, M., Jansen, S., Choat, B., Brodribb, T.J., Cochard, H., Delzon, S., Hacke, U.G., Jacobsen, A.L., Johnson, D.M., Lens, F., Maherali, H., Martínez-Vilalta, J., Mayr, S., McCulloh, K.A., Morris, H., Nardini, A., Plavcová, L., Pratt, R.B., Schreiber, S.G., Zanne, A.E. 2016. On research priorities to advance understanding of the safety–efficiency tradeoff in xylem. *New Phytologist*, 211 (4): 1156-1158. DOI: 10.1111/nph.14043

González, D., Moglia, J.G. 2017. Evaluación de propiedades relacionadas a la calidad de madera en *Eucalyptus camaldulensis*. En: Giménez, A.M. & Moglia, J.G. (eds.) *Los bosques actuales del chaco semiárido argentino. Ecoanatomía y biodiversidad. Una mirada propositiva*. FCF UNSE. Santiago del Estero, Argentina. ISBN: 978-987-4078-12-4

Gorzycki, R. 2019. Informes de Cadenas de Valor: Forestal, papel y muebles. Marzo 2019. Año 4 – N° 14. Ministerio de Hacienda. Argentina. ISSN 2525-0221

Greaves, B.L., Borralho, N.M.G., Raymond, C.A., Farrington, A. 1996. Use of a Pilodyn for the indirect selection of basic density in *Eucalyptus nitens*. *Canadian Journal of Forest Research*, 26 (9): 1643-1650. DOI: 10.1139/x26-185

Greenidge, K.N.H. 1952. An approach to the study of vessel length in hardwood species. *American Journal of Botany*, 39 (8): 570-574. DOI: 10.1002/j.1537-2197.1952.tb13070.x

Guay, R., Gagnon, R., Morin, H. 1992. A new automatic and interactive tree ring measurement system based on a line scan camera. *The Forestry Chronicle*, 68 (1): 138-141. DOI: 10.5558/tfc68138-1

Hacke, U.G., Sperry, J.S. 2001. Functional and ecological xylem anatomy. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 4 (2): 97-115. DOI: 10.1078/1433-8319-00017

Hacke, U.G., Sperry, J.S., Pockman, W.T., Davis, S.D., McCulloh, K.A. 2001. Trends in wood density and structure are linked to prevention of xylem implosion by negative pressure. *Oecologia*, 126 (4): 457-461. DOI: 10.1007/s004420100628

Hacke, U.G., Sperry, J.S. 2003. Limits to xylem refilling under negative pressure in *Laurus nobilis* and *Acer negundo*. *Plant, Cell and Environment*, 26 (2): 303-311. DOI: 10.1046/j.1365-3040.2003.00962.x

Hacke, U.G., Sperry, J.S., Wheeler, J.K., Castro, L. 2006. Scaling of angiosperm xylem structure with safety and efficiency. *Tree Physiology*, 26 (6): 689-701. DOI: 10.1093/treephys/26.6.689

- Hacke, U.G., Sperry, J.S., Feild, T.S., Sano, Y., Sikkema, E.H., Pittermann, J. 2007.** Water transport in vesselless angiosperms: Conducting efficiency and cavitation safety. *International Journal of Plant Sciences*, 168 (8): 1113-1126. DOI: 10.1086/520724
- Hacke, U.G., Jansen, S. 2009.** Embolism resistance of three boreal conifer species varies with pit structure. *New Phytologist*, 182 (3): 675-686. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.02783.x
- Hacke, U.G., Jacobsen, A.L., Pratt, R.B. 2009.** Xylem function of arid-land shrubs from California, USA: an ecological and evolutionary analysis. *Plant, Cell and Environment*, 32 (10): 1324-1333. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2009.02000.x
- Hein, P.R.G., Campos, A.C.M., Trugilho, P.F., Lima, J.T., Chaix, G. 2009.** Near infrared spectroscopy for estimating wood basic density in *Eucalyptus urophylla* and *Eucalyptus grandis*. *CERNE*, 15 (2): 133-141.
- Hein, P.R.G. 2012.** Estimating shrinkage, microfibril angle and density of *Eucalyptus* wood using near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 20 (4): 427-436. DOI: 10.1255/jnirs.1005
- Holbrook, N.M., Zwieniecki, M.A. 2005.** *Vascular transport in plants*. Elsevier Academic Press. Amsterdam, Países Bajos.
- Hölttä, T., Mencuccini, M., Nikinmaa, E. 2011.** A carbon cost-gain model explains the observed patterns of xylem safety and efficiency. *Plant, Cell and Environment*, 34 (11): 1819-1834. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2011.02377.x
- Hubbard, R.M., Ryan, M.G., Stiller, V., Sperry, J.S. 2001.** Stomatal conductance and photosynthesis vary linearly with plant hydraulic conductance in ponderosa pine. *Plant, Cell and Environment*, 24 (1): 113-121. DOI: 10.1046/j.1365-3040.2001.00660.x
- Igartúa, D., Monteoliva, S. 2010.** Basic wood density, fiber length and growth rate in two *Eucalyptus globulus* provenances from Argentina. *Bosque (Valdivia)*, 31 (2): 150-156. DOI: 10.4067/S0717-92002010000200008
- Iglesias-Trabado, G., Carballeira-Tenreiro, R., Folgueiro-Lozano, J. 2009.** *Eucalyptus universalis*: Global cultivated *Eucalyptus* forests. Map version 1.2. GIT Forestry Consulting's EUCALYPTOLOGICS: Information resources on *Eucalyptus* cultivation worldwide. Publicado en internet: <http://git-forestry-blog.blogspot.com/2009/10/global-eucalyptus-map-2009-in-buenos.html>. Último acceso: 01/09/2020.
- Inagaki, T., Schwanninger, M., Kato, R., Kurata, Y., Thanapase, W., Puthson, P., Tsuchikawa, S. 2012.** *Eucalyptus camaldulensis* density and fiber length estimated by near-infrared spectroscopy. *Wood Science and Technology*, 46 (1-3): 143-155. DOI 10.1007/s00226-010-0379-6
- InsideWood. 2004 – en adelante.** Publicado en internet. <http://insidewood.lib.ncsu.edu/search>. Último acceso: 01/09/2020.

Iwakiri, S., Monteiro de Matos, J.L., Prata, J.G., Trianoski, R., Soares da Silva, L. 2013. Evaluation of the use potential of nine species of genus *Eucalyptus* for production of veneers and plywood panels. CERNE, 19(2), 263-269. DOI: 0.1590/S0104-77602013000200010

Jacobsen, A.L., Ewers, F.W., Pratt, R.B., Paddock III, W.A., Davis, S.D. 2005. Do xylem fibers affect vessel cavitation resistance? Plant Physiology, 139 (1): 546-556. DOI: 10.1104/pp.104.058404

Jacobsen, A.L., Agenbag, L., Esler, K.J., Pratt, R.B., Ewers, F.W., Davis, S.D. 2007. Xylem density, biomechanics and anatomical traits correlate with water stress in 17 evergreen shrub species of the Mediterranean-type climate region of South Africa. Journal of Ecology, 95 (1): 171-183. DOI: 10.1111/j.1365-2745.2006.01186.x

Jakobsen, E. 2018. Unlocking the mechanisms of *Eucalyptus* plasticity and resistance. Eucalyptus 2018: Managing *Eucalyptus* plantations under global changes. 17 - 21 de septiembre. Montpellier, Francia. ISBN: 978-2-87614-743-0

Jansen, S., Choat, B., Pletsers, A. 2009. Morphological variation of intervessel pit membranes and implications to xylem function in angiosperms. American Journal of Botany, 96 (2): 409-419. DOI: 10.3732/ajb.0800248

Jansen, S., Schuldt, B., Choat, B. 2015. Current controversies and challenges in applying plant hydraulic techniques. New Phytologist, 205 (3): 961-964. DOI: 10.1111/nph.13229

Jinagool, W., Rattanawong, R., Sangsing, K., Barigah, T. S., Gay, F., Cochard, H., Kasemsap, P., Herbette, S. 2015. Clonal variability for vulnerability to cavitation and other drought-related traits in *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. Journal of Plant Hydraulics, 2: e001. DOI: 10.20870/jph.2015.e001

Johnson, D.M., McCulloh, K.A., Woodruff, D.R., Meinzer, F.C. 2012. Hydraulic safety margins and embolism reversal in stems and leaves: why are conifers and angiosperms so different? Plant Science, 195: 48-53. DOI: 10.1016/j.plantsci.2012.06.010

Johnson, K.M., Brodersen, C., Carins-Murphy, M.R., Choat, B., Brodrigg, T.J. 2020. Xylem embolism spreads by single-conduit events in three dry forest angiosperm stems. Plant Physiology: pp.00464.2020. DOI: 10.1104/pp.20.00464

Jones, P.D., Schimleck, L.R., Peter, G.F., Daniels, R.F., Clark III, A. 2005. Non-destructive estimation of *Pinus taeda* L tracheid morphological characteristics for samples from a wide range of sites in Georgia. Wood Science and Technology, 39 (7): 529-545. DOI: 10.1007/s00226-005-0021-1

Kallarackal, J., Otieno, D.O., Reineking, B., Jung, E.-Y., Schmidt, M.W.T., Granier, A., Tenhunen, J.D. 2013. Functional convergence in water use of trees from different

geographical regions: A meta-analysis. *Trees - Structure and Function*, 27 (3): 787-799. DOI: 10.1007/s00468-012-0834-0

Kawata, S. 2002. Instrumentation for Near-Infrared Spectroscopy. En: Siesler, H.W., Ozaki, Y., Kawata, S. & Heise, H.M. (eds.) *Near-infrared spectroscopy: Principles, instruments, applications*. Weinheim, Alemania. Wiley-VCH. pp 43-72.

Kiaei, M., Moya, R. 2015. Physical properties and fiber dimension in stem, branch and root of Alder Wood. *Fresenius Environmental Bulletin*, 24 (1B): 335-342.

Klein, T., Zeppel, M.J.B., Anderegg, W.R.L., Bloemen, J., De Kauwe, M.G., Hudson, P., Ruehr, K., Powell, T.L., von Arx, G., Nardini, A. 2018. Xylem embolism refilling and resilience against drought-induced mortality in woody plants: processes and trade-offs. *Ecological Research*, 33(5): 839-855. DOI: 10.1007/s11284-018-1588-y

Knipfer, T., Cuneo, I.F., Brodersen, C.R., McElrone, A.J. 2016. In situ visualization of the dynamics in xylem embolism formation and removal in the absence of root pressure: a study on excised grapevine stems. *Plant Physiology*, 171 (2): 1024-1036. DOI: 10.1104/pp.16.00136

Kondoh, S., Yahata, H., Nakashizuka, T., Kondoh, M. 2006. Interspecific variation in vessel size, growth and drought tolerance of broad-leaved trees in semi-arid regions of Kenya. *Tree Physiology*, 26 (7): 899-904. DOI: 10.1093/treephys/26.7.899

Kvalheim, O.M., Arneberg, R., Grung, B., Rajalahti, T. 2018. Determination of optimum number of components in partial least squares regression from distributions of the root-mean-squared error obtained by Monte Carlo resampling. *Journal of Chemometrics*, 32 (4): e2993. DOI: 10.1002/cem.2993

Lachenbruch, B., Mcculloh, K.A. 2014. Traits, properties, and performance: How woody plants combine hydraulic and mechanical functions in a cell, tissue, or whole plant. *New Phytologist*, 204 (4): 747-764. DOI: 10.1111/nph.13035

Ladiges, P.Y. 1974. Variation in drought tolerance in *Eucalyptus viminalis* Labill. *Australian Journal of Botany*, 22 (3): 489-500. DOI: 10.1071/BT9740489

Ladiges, P.Y., Ashton, D.H. 1974. Variation in some central Victoria populations of *Eucalyptus viminalis* Labill. *Australian Journal of Botany*, 22 (1): 81-102. DOI: 10.1071/BT9740081

Leblon, B., Adedipe, O., Hans, G., Haddadi, A., Tsuchikawa, S., Burger, J., Stirling, R., Pirouz, Z., Groves, K., Nader, J., LaRocque, A. 2013. A review of near-infrared spectroscopy for monitoring moisture content and density of solid wood. *Forestry Chronicle*, 89 (5): 595-606. DOI: 10.5558/tfc2013-111

Lemoine, D., Granier, A., Cochard, H. 1999. Mechanism of freeze-induced embolism in *Fagus sylvatica* L. *Trees - Structure and Function*, 13 (4): 206-210. DOI: 10.1007/s004680050234

- Lens, F., Sperry, J.S., Christman, M.A., Choat, B., Rabaey, D., Jansen, S. 2011.** Testing hypotheses that link wood anatomy to cavitation resistance and hydraulic conductivity in the genus *Acer*. *New Phytologist*, 190 (3): 709-723. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2010.03518.x
- Levitt J. 1980.** *Responses of plants to environmental stresses. Vol. II. Water, radiation, salt, and other stresses.* Academic Press. New York, Estados Unidos.
- Li, H., Liang, Y., Xu, Q., Cao, D. 2009.** Key wavelengths screening using competitive adaptive reweighted sampling method for multivariate calibration. *Analytica Chimica Acta*, 648 (1): 77-84. DOI: 10.1016/j.aca.2009.06.046
- Lintunen, A., Hölttä, T., Kulmala, M. 2013.** Anatomical regulation of ice nucleation and cavitation helps trees to survive freezing and drought stress. *Scientific Reports*, 3: 2031. DOI: 10.1038/srep02031
- Liu, J., Gu, L., Yu, Y., Huang, P., Wu, Z., Zhang, Q., Qian, Y., Wan, X., Sun, Z. 2019.** Corticular photosynthesis drives bark water uptake to refill embolized vessels in dehydrated branches of *Salix matsudana*. *Plant, Cell and Environment*, 42 (9): 2584-2596. DOI: 10.1111/pce.13578
- Loepfe, L., Martínez-Vilalta, J., Piñol, J., Mencuccini, M. 2007.** The relevance of xylem network structure for plant hydraulic efficiency and safety. *Journal of Theoretical Biology*, 247 (4): 788-803. DOI: 10.1016/j.jtbi.2007.03.036
- Lo Gullo, M.A., Salleo, S. 1993.** Different vulnerabilities of *Quercus ilex* L. to freeze- and summer drought-induced xylem embolism: an ecological interpretation. *Plant, Cell and Environment*, 16 (5): 511-519. DOI: 10.1111/j.1365-3040.1993.tb00898.x
- Lopez, G.A., Potts, B.M., Dutkowski, G.W., Rodriguez Traverso, J.M. 2001.** Quantitative genetics of *Eucalyptus globulus*: Affinities of land race and native stand localities. *Silvae Genetica*, 50 (5-6): 244-252.
- López, G.A. 2010.** Domesticación y cultivo del Eucalipto. Centro de Investigación Forestal ENCE. Boletín del CIDEU, 8-9: 89-95.
- López, J.A., Marcó, M.A., Harrand, L., Pathauer, P.S., García, M.N., López, A.J., Oberschelp, J., Vera Bravo, C., Cappa, E.P., Acuña, C.V., Villalba, P.V. 2015.** Subprograma *Eucalyptus* y otras Latifoliadas (*Corymbia* y *Grevillea*). En: *Domesticación y Mejoramiento de Especies Forestales*. UCAR – INTA. Buenos Aires, Argentina.
- Luss, S., Schwanninger, M., Rosner, S. 2015.** Hydraulic traits of norway spruce sapwood estimated by Fourier transform near-infrared spectroscopy (FT-NIR). *Canadian Journal of Forest Research*, 45 (6): 625-631. DOI: 10.1139/cjfr-2014-0452
- MAA-BA. 2010.** Revista Buenos Aires Forestal. Ministerio de Asuntos Agrarios de la provincia de Buenos Aires. 16 pp.

MAA-BA. 2011. Inventario de macizos forestales de *Eucalyptus Globulus* Labill. en el sudeste de la provincia de Buenos Aires. Ministerio de Asuntos Agrarios de la provincia de Buenos Aires. 30 pp.

Maherali, H., Pockman, W.T., Jackson, R.B. 2004. Adaptive variation in the vulnerability of woody plants to xylem cavitation. *Ecology*, 85 (8): 2184-2199. DOI: 10.1890/02-0538

Martínez-Cabrera, H.I., Jones, C.S., Espino, S., Jochen Schenk, H. 2009. Wood anatomy and wood density in shrubs: Responses to varying aridity along transcontinental transects. *American Journal of Botany*, 96 (8): 1388-1398. DOI: 10.3732/ajb.0800237

Martínez-Meier, A., Sanchez, L., Pastorino, M., Gallo, L., Rozenberg, P. 2008. What is hot in tree rings? The wood density of surviving Douglas-firs to the 2003 drought and heat wave. *Forest Ecology and Management*, 256 (4): 837-843. DOI: 10.1016/j.foreco.2008.05.041

Martínez-Meier, A., Sanchez, L., Dalla-Salda, G., Gallo, L., Pastorino, M., Rozenberg, P. 2009. Ring density record of phenotypic plasticity and adaptation to drought in Douglas-fir. *Forest Ecology and Management*, 258 (5): 860-867. DOI: 10.1016/j.foreco.2009.03.021

Martínez-Vilalta, J., Mencuccini, M., Álvarez, X., Camacho, J., Loepfe, L., Piñol, J. 2012. Spatial distribution and packing of xylem conduits. *American Journal of Botany*, 99 (7): 1189-1196. DOI: 10.3732/ajb.1100384

Martinuzzi, F. 2010. Fichas Técnicas de Maderas. INTI Madera y muebles.

McCulloh, K.A., Sperry, J.S., Adler, F.R. 2003. Water transport in plants obeys Murray's law. *Nature*, 421 (6926): 939-942. DOI: 10.1038/nature01444

McCulloh, K.A., Meinzer, F.C., Sperry, J.S., Lachenbruch, B., Voelker, S.L., Woodruff, D.R., Domec, J.-C. 2011. Comparative hydraulic architecture of tropical tree species representing a range of successional stages and wood density. *Oecologia*, 167 (1): 27-37. DOI: 10.1007/s00442-011-1973-5

Meinzer, F.C., James, S.A., Goldstein, G., Woodruff, D. 2003. Whole-tree water transport scales with sapwood capacitance in tropical forest canopy trees. *Plant, Cell and Environment*, 26 (7): 1147-1155. DOI: 10.1046/j.1365-3040.2003.01039.x

Meinzer, F.C., Johnson, D.M., Lachenbruch, B., McCulloh, K.A., Woodruff, D.R. 2009. Xylem hydraulic safety margins in woody plants: coordination of stomatal control of xylem tension with hydraulic capacitance. *Functional Ecology*, 23: 922-930. DOI: 10.1111/j.1365-2435.2009.01577.x

Meinzer, F.C., McCulloh, K.A. 2013. Xylem recovery from drought-induced embolism: Where is the hydraulic point of no return? *Tree Physiology*, 33 (4): 331-334. DOI: 10.1093/treephys/tpt022

Menzies, M.I., Holden, D.G., Rook, D.A. 1981. Seasonal frost-tolerance of *Eucalyptus saligna*, *E. regnans* and *E. fastigata*. New Zealand Journal of Forestry Science, 11 (3): 254-261.

Moraga, P., Escobar, R., Valenzuela, S. 2006. Resistance to freezing in three *Eucalyptus globulus* Labill subspecies. Electronic Journal of Biotechnology, 9 (3): 310-314. ISSN 0717-3458.

Moschini, R., Conti, H., Alonso, M., Rodríguez Traverso, J., Nakama, V., Alfieri, A. 2000. Delimitación de áreas de aptitud climática para el cultivo de eucaliptos en la región pampeana. SAGPyA Forestal N° 15

Murray, C.D. 1926. The Physiological Principle of Minimum Work: I. The Vascular System and the Cost of Blood Volume. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 12 (3): 207-214. DOI:10.1073/pnas.12.3.207

Naidoo, S., Zbonák, A., Ahmed, F. 2006. The effect of moisture availability on wood density and vessel characteristics of *Eucalyptus grandis* in the warm temperate region of South Africa. 5th International Symposium on Wood Structure and Properties. 3-6 de septiembre. Sliak, Eslovaquia.

Nardini, A., Lo Gullo, M.A., Salleo, S. 2011. Refilling embolized xylem conduits: Is it a matter of phloem unloading? Plant Science, 180 (4): 604-611. DOI: 10.1016/j.plantsci.2010.12.011

Norman, G.R., Streiner, D.L. 2003. Path Analysis and Structural Equation Modeling. En: Norman, G.R. & Streiner, D.L. (eds.) *PDQ statistics*. BC Decker Inc. Hamilton, Canada. pp 156-175.

O'Grady, A.P., Cook, P.G., Eamus, D., Duguid, A., Wischusen, J.D.H., Fass, T., Worldege, D. 2009. Convergence of tree water use within an arid-zone woodland. Oecologia, 160 (4): 643-655. DOI: 10.1007/s00442-009-1332-y

Oliva Carrasco, L., Bucci, S.J., Di Francescantonio, D., Lezcano, O.A., Campanello, P.I., Scholz, F.G., Rodríguez, S., Madanes, N., Cristiano, P.M., Hao, G.Y., Holbrook, N.M., Goldstein, G. 2014. Water storage dynamics in the main stem of subtropical tree species differing in wood density, growth rate and life history traits. Tree Physiology, 35 (4): 354-365. DOI: 10.1093/treephys/tpu087

Ona, T., Sonoda, T., Ito, K., Shibata, M., Ootake, Y., Ohshima, J., Yokota, S., Yoshizawa, N. 1999. Quantitative FT-Raman spectroscopy to measure wood cell dimensions. Analyst, 124 (10): 1477-1480. DOI: 10.1039/a905874e

Ozaki, Y. 2012. Near-infrared spectroscopy - Its versatility in analytical chemistry. Analytical Sciences, 28 (6): 545-563. DOI: 10.2116/analsci.28.545

- Pan, R., Tyree, M.T. 2019.** How does water flow from vessel to vessel? Further investigation of the tracheid bridge concept. *Tree Physiology*, 39 (6): 1019-1031. DOI: 10.1093/treephys/tpz015
- Pammenter, N.W., Vander Willigen. C. 1998.** A mathematical and statistical analysis of the curves illustrating vulnerability of xylem to cavitation. *Tree Physiology*, 18 (8-9): 589-593. DOI: 10.1093/treephys/18.8-9.589
- Pasquini, C. 2003.** Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14 (2): 198-219. DOI: 10.1590/S0103-50532003000200006
- Pathauer. P. 2005.** Subprograma eucaliptos y pinos en la región pampeana. En: Novertó, A.C. (ed.) *Mejores árboles para más forestadores. El programa de producción de material de propagación mejorado y el mejoramiento genético en el Proyecto Forestal de Desarrollo*. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Buenos Aires, Argentina. pp 73-94.
- Pearce, R.S. 2001.** Plant freezing and damage. *Annals of Botany*, 87 (4): 417-424. DOI: 10.1006/anbo.2000.1352
- Pérez, E., Medrano, L.A., Sánchez Rosas, J. 2013.** El Path Analysis: conceptos básicos y ejemplos de aplicación. *Revista Argentina de Ciencias del Comportamiento*, 5 (1): 52-66. DOI: 10.32348/1852.4206.v5.n1.5160
- Pfautsch, S., Renard, J., Tjoelker, M.G., Salih, A. 2015.** Phloem as capacitor: Radial transfer of water into xylem of tree stems occurs via symplastic transport in ray parenchyma. *Plant Physiology*, 167 (3): 963-971. DOI: 10.1104/pp.114.254581
- Pfautsch, S., Harbusch, M., Wesolowski, A., Smith, R., Macfarlane, C., Tjoelker, M.G., Reich, P.B., Adams, M.A. 2016.** Climate determines vascular traits in the ecologically diverse genus *Eucalyptus*. *Ecology Letters*, 19 (3): 240-248. DOI: 10.1111/ele.12559
- Pfautsch, S., Aspinwall, M.J., Drake, J.E., Chacon-Doria, L., Langelaan, R.J.A., Tissue, D.T., Tjoelker, M.G., Lens, F. 2018.** Traits and trade-offs in whole-tree hydraulic architecture along the vertical axis of *Eucalyptus grandis*. *Annals of Botany*, 121 (1): 129-141. DOI: 10.1093/aob/mcx137
- Pirralho, M., Flores, D., Sousa, V.B., Quilhó, T., Knapic, S., Pereira, H. 2014.** Evaluation on paper making potential of nine *Eucalyptus* species based on wood anatomical features. *Industrial Crops and Products*, 54: 327-334. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.01.040
- Pita, P., Gascó, A., Pardos, J.A. 2003.** Xylem cavitation, leaf growth and leaf water potential in *Eucalyptus globulus* clones under well-watered and drought conditions. *Functional Plant Biology*, 30 (8): 891-899. DOI: 10.1071/FP03055

Pittermann, J., Sperry, J.S., Hacke, U.G., Wheeler, J.K., Sikkema, E.H. 2006. Intertracheid pitting and the hydraulic efficiency of conifer wood: The role of tracheid allometry and cavitation protection. *American Journal of Botany*, 93 (9): 1265-1273. DOI: 10.3732/ajb.93.9.1265

Pockman, W.T., Sperry, J.S. 1997. Freezing-induced xylem cavitation and the northern limit of *Larrea tridentata*. *Oecologia*, 109 (1): 19-27. DOI: 10.1007/s004420050053

Pockman, W.T., Sperry, J.S. 2000. Vulnerability to xylem cavitation and the distribution of Sonoran desert vegetation. *American Journal of Botany*, 87 (9): 1287-1299. DOI: 10.2307/2656722

Polge, H. 1966. Hubert Polge. Établissement des courbes de variation de la densité du bois par exploration densitométrique de radiographies d'échantillons prélevés à la tarière sur des arbres vivants: applications dans les domaines Technologique et Physiologique. *Annales des sciences forestières, INRA/EDP Sciences*, 23 (1): I-206.

Polge, H. 1978. Fifteen years of wood radiation densitometry. *Wood Science and Technology*, 12 (3): 187-196. DOI: 10.1007/BF00372864

Poorter, L., McDonald, I., Alarcón, A., Fichtler, E., Licona, J.-C., Peña-Claros, M., Sterck, F., Villegas, Z., Sass-Klaassen, U. 2010. The importance of wood traits and hydraulic conductance for the performance and life history strategies of 42 rainforest tree species. *New Phytologist*, 185 (2): 481-492. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.03092.x

Poot, P., Veneklaas, E.J. 2013. Species distribution and crown decline are associated with contrasting water relations in four common sympatric eucalypt species in southwestern Australia. *Plant and Soil*, 364 (1-2): 409-423. DOI: 10.1007/s11104-012-1452-8

Pratt, R.B., Jacobsen, A.L., Ewers, F.W., Davis, S.D. 2007. Relationships among xylem transport, biomechanics and storage in stems and roots of nine *Rhamnaceae* species of the California chaparral. *New Phytologist*, 174 (4): 787-798. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2007.02061.x

Pratt, R.B., Percolla, M.I., Jacobsen, A.L. 2015. Integrative xylem analysis of Chaparral shrubs. En: Hacke, U. (ed.) *Functional and Ecological Xylem Anatomy*. Springer. Cham, Suiza. pp 189-207. DOI: 10.1007/978-3-319-15783-2_7

Pratt, R.B., Jacobsen, A.L. 2017. Conflicting demands on angiosperm xylem: Tradeoffs among storage, transport and biomechanics. *Plant Cell and Environment*, 40 (6): 897-913. DOI: 10.1111/pce.12862

Preston, K.A., Cornwell, W.K., DeNoyer, J.L. 2006. Wood density and vessel traits as distinct correlates of ecological strategy in 51 California coast range angiosperms. *New Phytologist*, 170 (4): 807-818. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2006.01712.x

Prior, L.D., Eamus, D. 2000. Seasonal changes in hydraulic conductance, xylem embolism and leaf area in *Eucalyptus tetrodonta* and *Eucalyptus miniata* saplings in a north Australian savanna. *Plant, Cell and Environment*, 23: 955-965. DOI: 10.1046/j.1365-3040.2000.00612.x

Rahman, M.M., Fujiwara, S., Kanagawa, Y. 2005. Variations in volume and dimensions of rays and their effect on wood properties of teak. *Wood and Fiber Science*, 37: 497-504.

Ramilo, D.I., Rodríguez Vagaría, A., Sandoval, M., Russo, F. 2018. Actualización y redefinición de cuencas industriales forestales en la provincia de buenos aires. Informe Final. Consejo Federal de Inversiones - Provincia de Buenos Aires.

Rice, K.J., Matzner, S.L., Byer, W., Brown, J.R. 2004. Patterns of tree dieback in Queensland, Australia: The importance of drought stress and the role of resistance to cavitation. *Oecologia*, 139 (2): 190-198. DOI: 10.1007/s00442-004-1503-9

Rockwell, F.E., Wheeler, J.K., Holbrook, N.M. 2014. Cavitation and its discontents: Opportunities for resolving current controversies. *Plant Physiology*, 164 (4): 1649-1660. DOI: 10.1104/pp.113.233817

Rodrigues, J.C., Fujimoto, T., Schwanninger, M., Tsuchikawa, S. 2013. Prediction of wood density using near infrared-based partial least squares regression models calibrated with X-ray microdensity. *NIR news*, 24 (2): 4-6. DOI: 10.1255/nirn.1352

Rosner, S. 2013. Hydraulic and biomechanical optimization in Norway spruce trunkwood - A review. *IAWA Journal*, 34 (4): 365-390. DOI: 10.1163/22941932-00000031

Salleo, S., Lo Gullo, M.A., Trifilò, P., Nardini, A. 2004. New evidence for a role of vessel-associated cells and phloem in the rapid xylem refilling of cavitated stems of *Laurus nobilis* L. *Plant, Cell and Environment*, 27 (8): 1065-1076. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2004.01211.x

Salleo, S., Trifilò, P., Lo Gullo, M.A. 2006. Phloem as a possible major determinant of rapid cavitation reversal in stems of *Laurus nobilis* (laurel). *Functional Plant Biology*, 33 (11): 1063-1074. DOI: 10.1071/FP06149

Samariha, A., Kiaei, M., Talaeipour, M., Nemati, M. 2011. Anatomical structural differences between branch and trunk in *Ailanthus altissima* wood. *Indian Journal of Science and Technology*, 4 (12): 1676-1678. DOI: 10.17485/ijst/2011/v4i12/30306

Sanchez Acosta, M. 1995. Experiencia Argentina en el uso de la madera de eucalipto. Seminario internacional de utilização da madeira de eucalipto para serraria. 5 - 6 de abril. São Paulo, Brasil.

Sanchez Acosta, M., Sepliarsky, F. 2005. Tecnología de la madera de eucaliptos colorados: Propiedades – usos – posibilidades. I Jornadas Forestales De Santiago Del Estero. 16 - 17 de junio. Santiago del Estero, Argentina.

Sano, Y., Morris, H., Shimada, H., Ronse De Craene, L.P., Jansen, S. 2011. Anatomical features associated with water transport in imperforate tracheary elements of vessel-bearing angiosperms. *Annals of Botany*, 107 (6): 953-964. DOI: 10.1093/aob/mcr042

Santiago, L.S., Goldstein, G., Meinzer, F.C., Fisher, J.B., Machado, K., Woodruff, D., Jones, T. 2004. Leaf photosynthetic traits scale with hydraulic conductivity and wood density in Panamanian forest canopy trees. *Oecologia*, 140 (4): 543-550. DOI: 10.1007/s00442-004-1624-1

Santiago, L.S., De Guzman, M.E., Baraloto, C., Vogenberg, J.E., Brodie, M., Héroult, B., Fortunel, C., Bonal, D. 2018. Coordination and trade-offs among hydraulic safety, efficiency and drought avoidance traits in Amazonian rainforest canopy tree species. *New Phytologist*, 218 (3): 1015-1024. DOI: 10.1111/nph.15058

Savi, T., Tintner, J., Sois, L.D., Grabner, M., Petit, G., Rosner, S. 2019. The potential of Mid-Infrared spectroscopy for prediction of wood density and vulnerability to embolism in woody angiosperms. *Tree Physiology*, 39 (3): 503-510. DOI: 10.1093/treephys/tpy112

Schimleck, L.R., Michell, A.J., Raymond, C.A., Muneri, A. 1999. Estimation of basic density of *Eucalyptus globulus* using near-infrared spectroscopy. *Canadian Journal of Forest Research*, 29 (2): 194-201. DOI: 10.1139/x98-204

Schimleck, L.R., Evans, R., Matheson, A.C. 2002. Estimation of *Pinus radiata* D. Don clear wood properties by near-infrared spectroscopy. *Journal of Wood Science*, 48 (2): 132-137. DOI: 10.1007/BF00767290

Schimleck, L.R., Doran, J.C., Rimbawanto, A. 2003. Near infrared spectroscopy for cost effective screening of foliar oil characteristics in a *Melaleuca cajuputi* breeding population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (9): 2433-2437. DOI: 10.1021/jf020981u

Schimleck, L.R., Mora, C., Daniels, R.F. 2004. Estimation of tracheid morphological characteristics of green *Pinus taeda* L. radial strips by near infrared spectroscopy. *Wood and Fiber Science*, 36 (4): 527-535.

Schimleck, L.R., Evans, R. 2004. Estimation of *Pinus radiata* D. Don tracheid morphological characteristics by near infrared spectroscopy. *Holzforchung*, 58 (1): 66-73. DOI:10.1515/HF.2004.009

Scholz, F.G., Bucci, S.J., Goldstein, G., Meinzer, F.C., Franco, A.C., Miralles-Wilhelm, F. 2007. Biophysical properties and functional significance of stem water

storage tissues in Neotropical savanna trees. *Plant, Cell and Environment*, 30 (2): 236-248. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2006.01623.x

Scholz, A., Rabaey, D., Stein, A., Cochard, H., Smets, E., Jansen, S. 2013. The evolution and function of vessel and pit characters with respect to cavitation resistance across 10 *Prunus* species. *Tree Physiology*, 33 (7): 684-694. DOI: 10.1093/treephys/tpt050

Schuldt, B., Leuschner, C., Brock, N., Horna, V. 2013. Changes in wood density, wood anatomy and hydraulic properties of the xylem along the root-to-shoot flow path in tropical rainforest trees. *Tree Physiology*, 33 (2): 161-174. DOI: 10.1093/treephys/tps122

Schwanninger, M., Rodrigues, J.C., Fackler, K. 2011. A review of band assignments in near infrared spectra of wood and wood components. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 19 (5): 287-308. DOI: 10.1255/jnirs.955

Searson, M.J., Thomas, D.S., Montagu, K.D., Conroy, J.P. 2004. Wood, density and anatomy of water-limited eucalypts. *Tree Physiology*, 24 (11): 1295-1302. DOI: 10.1093/treephys/24.11.1295

Segura, V. 2014. Tutorial on NIRS calibration using R. Publicado en internet: https://drive.google.com/file/d/1Kd5PPSksN_F4fQ1AAkuq3OmcqAUhfk8L/view?usp=sharing

Sergent, A.S., Segura, V., Charpentier, J.P., Dalla-Salda, G., Fernández, M.E., Rozenberg, P., Martínez-Meier, A. 2019. Assessment of resistance to cavitation in cordilleran cypress using near-infrared spectroscopy. Abstracts of International Conference: Adapting forest ecosystems and wood products to biotic and abiotic stress. 12 - 15 de marzo. Bariloche, Argentina.

Shenk, J.S., Workman Jr., J.J., Westerhaus, M.O. 2007. Application of NIR Spectroscopy to Agricultural Products. En: Burns, D.A. & Ciurzak, E.W. (eds.) *Handbook of Near-Infrared Analysis*. Taylor & Francis Ltd. Boca Raton, Estados Unidos. pp 347-386.

Siesler, H.W. 2007. Basic Principles of Near-Infrared Spectroscopy. En: Burns, D.A. & Ciurzak, E.W. (eds.) *Handbook of Near-Infrared Analysis*. Taylor & Francis Ltd. Boca Raton, Estados Unidos. pp 7-18.

Smith, B.C. 2011. *Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy*. CRC Press. Boca Raton, Estados Unidos.

Sparks, J.P., Black, R.A. 1999. Regulation of water loss in populations of *Populus trichocarpa*: the role of stomatal control in preventing xylem cavitation. *Tree Physiology*, 19 (7): 453-459. DOI: 10.1093/treephys/19.7.453

Sperry, J.S., Donnelly, J.R., Tyree, M.T. 1988. A method for measuring hydraulic conductivity and embolism in xylem. *Plant, Cell and Environment*, 11 (1): 35-40. DOI: 10.1111/j.1365-3040.1988.tb01774.x

- Sperry, J.S., Donnelly, J.R., Tyree, M.T. 1988.** Seasonal occurrence of xylem embolism in Sugar Maple (*Acer saccharum*). *American Journal of Botany*, 75 (8): 1212-1218. DOI: 10.1002/j.1537-2197.1988.tb08834.x
- Sperry, J.S., Sullivan, J.E.M. 1992.** Xylem embolism in response to freeze-thaw cycles and water stress in ring-porous, diffuse-porous, and conifer species. *Plant Physiology*, 100 (2): 605-613. DOI: 10.1104/pp.100.2.605
- Sperry, J.S., Pockman, W.T. 1993.** Limitation of transpiration by hydraulic conductance and xylem cavitation in *Betula occidentalis*. *Plant, Cell and Environment*, 16 (3): 279-287. DOI: 10.1111/j.1365-3040.1993.tb00870.x
- Sperry, J.S., Nichols, K.L., Sullivan, J.E.M., Eastlack, S.E. 1994.** Xylem embolism in ring-porous, diffuse-porous, and coniferous trees of northern Utah and interior Alaska. *Ecology*, 75 (6): 1736-1752. DOI: 10.2307/1939633
- Sperry, J.S. 1995.** Limitations on stem water transport and their consequences. En: Gartner, B.L. (ed.) *Plant Stems: Physiological and Functional Morphology*. Academic Press. San Diego, Estados Unidos. pp 105-124.
- Sperry, J.S., Hacke, U.G., Wheeler, J.K. 2005.** Comparative analysis of end wall resistivity in xylem conduits. *Plant, Cell and Environment*, 28 (4): 456-465. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2005.01287.x
- Sperry, J.S., Meinzer, F.C., McCulloh, K.A. 2008.** Safety and efficiency conflicts in hydraulic architecture: Scaling from tissues to trees. *Plant, Cell and Environment*, 31 (5): 632-645. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2007.01765.x
- Sperry, J.S., Christman, M.A., Torres-Ruiz, J.M., Taneda, H., Smith, D.D. 2012.** Vulnerability curves by centrifugation: is there an open vessel artefact, and are 'r' shaped curves necessarily invalid? *Plant, Cell and Environment*, 35 (3): 601-610. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2011.02439.x
- Spicer, R., Gartner, B.L. 2001.** The effects of cambial age and position within the stem on specific conductivity in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) sapwood. *Trees - Structure and Function*, 15 (4): 222-229. DOI: 10.1007/s004680100093
- Sterck, F.J., Martínez-Vilalta, J., Mencuccini, M., Cochard, H., Gerrits, P., Zweifel, R., Herrero, A., Korhonen, J.F., Llorens, P., Nikinmaa, E., Nolè, A., Poyatos, R., Ripullone, F., Sass-Klaassen, U. 2012.** Understanding trait interactions and their impacts on growth in Scots pine branches across Europe. *Functional Ecology*, 26 (2): 541-549. DOI: 10.1111/j.1365-2435.2012.01963.x
- TAPPI 401 om-93. 1993.** Fiber analysis of paper and paperboard. Technical Association of Pulp and Paper Industry.

Tasumi, M. 2015. Introduction to Infrared Spectroscopy. En: Tasumi, M. (ed.) *Introduction to experimental infrared spectroscopy*. John Wiley & Sons Inc. Hoboken, Estados Unidos. pp 3-13.

Taylor, F. 1969. The effect of ray tissue on the specific gravity of wood. *Wood and Fiber Science*, 1: 142-145.

Tesón, N., Monteoliva, S., Licata, J., Fernández, M.E. 2011. Ecophysiological processes and wood anatomy related to growth and drought resistance in genotypes of *Eucalyptus grandis*. En: Actas de IUFRO 2011 Eucalyptus: Improvement and culture of *Eucalyptus*. IUFRO Working Group 2.08.03. 14-18 de noviembre, Porto Seguro, Brasil.

Tesón, N., Fernández, M.E., Licata, J. 2012. Resultados preliminares sobre la variación en vulnerabilidad a la cavitación por sequía en clones de *Eucalyptus grandis*. Congreso IUFRO 2012: "Eucaliptos mejorados para aumentar la competitividad del sector forestal en América Latina". 22-23 de noviembre. Pucón, Chile.

Thomas, D.S., Montagu, K.D., Conroy, J.P. 2004. Changes in wood density of *Eucalyptus camaldulensis* due to temperature - The physiological link between water viscosity and wood anatomy. *Forest Ecology and Management*, 193 (1-2): 157-165. DOI: 10.1016/j.foreco.2004.01.028

Thomas, D.S., Montagu, K.D., Conroy, J.P. 2007. Temperature effects on wood anatomy, wood density, photosynthesis and biomass partitioning of *Eucalyptus grandis* seedlings. *Tree Physiology*, 27 (2): 251-260. DOI: 10.1093/treephys/27.2.251

Trifilò, P., Barbera, P.M., Raimondo, F., Nardini, A., Lo Gullo, M.A. 2014. Coping with drought-induced xylem cavitation: coordination of embolism repair and ionic effects in three Mediterranean evergreens. *Tree Physiology*, 35 (7): 109-122. DOI: 10.1093/treephys/tpt119

Trifilò, P., Nardini, A., Lo Gullo, M.A., Barbera, P.M., Savi, T., Raimondo, F. 2015. Diurnal changes in embolism rate in nine dry forest trees: relationships with species-specific xylem vulnerability, hydraulic strategy and wood traits. *Tree Physiology*, 35 (7): 694-705. DOI: 10.1093/treephys/tpv049

Tsuchikawa, S., Kobori, H. 2015. A review of recent application of near infrared spectroscopy to wood science and technology. *Journal of Wood Science*, 61 (3): 213-220. DOI: 10.1007/s10086-015-1467-x

Tyree, M.T., Sperry, J.S. 1989. Vulnerability of xylem to cavitation and embolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40: 19-36. DOI: 10.1146/annurev.pp.40.060189.000315

Tyree, M.T., Ewers, F.W. 1991. The hydraulic architecture of trees and other woody plants. *New Phytologist*, 119 (3): 345-360. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1991.tb00035.x

Tyree, M.T., Davis, S.D., Cochard, H. 1994. Biophysical perspectives of xylem evolution: Is there a tradeoff of hydraulic efficiency for vulnerability to dysfunction? *IAWA Journal*, 15 (4): 335-360. DOI: 10.1163/22941932-90001369

Tyree, M.T., Salleo, S., Nardini, A., Lo Gullo, M.A., Mosca, R. 1999. Refilling of embolized vessels in young stems of laurel. Do we need a new paradigm? *Plant Physiology*, 120 (1): 11-21. DOI: 10.1104/pp.120.1.11

Tyree, M.T. 1999. Water Relations and Hydraulic Architecture. En: Pugnaire, F. I., & Valladares, F. (eds.) *Handbook of functional plant ecology*. M. Dekker. New York, Estados Unidos. pp 221-268.

Tyree, M.T., Zimmermann, M.H. 2002. *Xylem Structure and the Ascent of Sap*. Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Alemania. DOI: 10.1007/978-3-662-04931-0

Ullman, J. B. 2001. Structural equation modeling. En: Tabachnick, B.G. & Fidell, L.S. (eds.) *Using multivariate statistics*. Allyn and Bacon. Boston, Estados Unidos. pp 653-771.

Vander Willigen, C., Pammenter, N.W. 1998. Relationship between growth and xylem hydraulic characteristics of clones of *Eucalyptus* spp. at contrasting sites. *Tree Physiology*, 18 (8-9): 595-600. DOI: 10.1093/treephys/18.8-9.595

Vander Willigen, C., Sherwin, H.W., Pammenter, N.W. 2000. Xylem hydraulic characteristics of subtropical trees from contrasting habitats grown under identical environmental conditions. *New Phytologist*, 145 (1): 51-59. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2000.00549.x

Viana, L.C., Trugilho, P.F., Hein, P.R.G., Lima, J.T., da Silva, J.R.M. 2009. Predicting the morphological characteristics and basic density of *Eucalyptus* wood using the NIRS technique. *CERNE*, 15 (4): 421-429.

Villegas, M.S., Rivera, S.M. 2002. Revisión xilológica de las principales especies del género *Eucalyptus* L'Herit. cultivadas en Argentina. *Revista Facultad Agronomía, La Plata*, 105 (1): 9-28.

Violle, C., Navas, M.-L., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I., Garnier, E. 2007. Let the concept of trait be functional!. *Oikos*, 116: 882-892. DOI: 10.1111/j.0030-1299.2007.15559.x

Wheeler, O.H. 1959. Near Infrared Spectra of Organic Compounds. *Chemical Reviews*, 59 (4): 629-666. DOI: 10.1021/cr50028a004

Wheeler, J.K., Sperry, J.S., Hacke, U.G., Hoang, N. 2005. Inter-vessel pitting and cavitation in woody *Rosaceae* and other vesselled plants: a basis for a safety versus efficiency trade-off in xylem transport. *Plant, Cell and Environment*, 28 (6): 800-812. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2005.01330.x

Wheeler, J.K., Holbrook, N.M. 2015. Cavitation and refilling. En: Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I.M., & Murphy, A.S. (eds.) *Plant Physiology and Development*. Sinauer. Sunderland, Estados Unidos.

Wiklund, S., Nilsson, D., Eriksson, L., Sjöström, M., Wold, S., Faber, K. 2007. A randomization test for PLS component selection. *Journal of Chemometrics*, 21 (10-11): 427-439. DOI: 10.1002/cem.1086

Williams, P., Norris, K. 1987. *Near-infrared technology in the agricultural and food industry*. American Association of cereal chemists. St. Paul, Estados Unidos.

Wold, S. 1978. Cross-Validatory Estimation of the Number of Components in Factor and Principal Components Models. *Technometrics*, 20 (4): 397-405. DOI: 10.1080/00401706.1978.10489693

Xiang, W., Auty, D., Franceschini, T., Leitch, M., Achim, A. 2014. Wood density-climate relationships are mediated by dominance class in black spruce (*Picea mariana* (Mill.) B.S.P.). *Forests*, 5 (6): 1163-1184. DOI: 10.3390/f5061163

Zanne, A.E., Lopez-Gonzalez, G., Coomes, D.A., Ilic, J., Jansen, S., Lewis, S.L., Miller, R.B., Swenson, N.G., Wiemann, M.C., Chave, J. 2009. Repositorio digital DRYAD. DOI: 10.5061/dryad.234

Zanne, A.E., Westoby, M., Falster, D.S., Ackerly, D.D., Loarie, S.R., Arnold, S.E.J., Coomes, D.A. 2010. Angiosperm wood structure: Global patterns in vessel anatomy and their relation to wood density and potential conductivity. *American Journal of Botany*, 97 (2): 207-215. DOI: 10.3732/ajb.0900178

Zheng, J., Martínez-Cabrera, H.I. 2013. Wood anatomical correlates with theoretical conductivity and wood density across China: Evolutionary evidence of the functional differentiation of axial and radial parenchyma. *Annals of Botany*, 112 (5): 927-935. DOI: 10.1093/aob/mct153

Ziemińska, K., Butler, D.W., Gleason, S.M., Wright, I.J., Westoby, M. 2013. Fibre wall and lumen fractions drive wood density variation across 24 Australian angiosperms. *AoB PLANTS*, 5: plt046 1-14. DOI: 10.1093/aobpla/plt046

Zobel, B.J., Jett, J.B. 1995. *Genetics of wood production*. Springer-Verlag. Berlin, Alemania.

Zwieniecki, M.A., Holbrook, N.M. 2009. Confronting Maxwell's demon: biophysics of xylem embolism repair. *Trends in Plant Science*, 14 (10): 530-534. DOI: 10.1016/j.tplants.2009.07.002