

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

**ESTUDIO DE LAS LIMITACIONES AMBIENTALES Y
FISIOLÓGICAS DEL CRECIMIENTO INICIAL DE PLÁNTULAS DE
“CIPRÉS DE LA CORDILLERA” (*AUSTROCEDRUS CHILENSIS*
(D. DON) PIC. SER. ET BIZZARRI).**



Por Ingeniero Forestal Diego Sebastián Massone

Directores: Dr. Carlos Bartoli y Dr. Mario Pastorino

Trabajo de Tesis para optar al título de

Doctor en Ciencias Naturales

2020

RESUMEN

En los últimos años, en Patagonia Argentina, se han ido perdiendo paulatinamente vastas superficies ocupadas por Ciprés de la Cordillera. Factores como la explotación maderera, los incendios, la acción de la ganadería y una enfermedad, conocida como “mal del ciprés”, son las principales causantes del deterioro actual de estos bosques. Uno de los requisitos para llevar a cabo una restauración activa de los cipresales degradados es contar con un sistema eficiente de producción masiva de plantines. Los métodos de viverización semi-controlados en contenedores ofrecen amplias oportunidades para manejar el crecimiento del plantín, tanto en su vigor como en su condición fisiológica. Puede decirse que posibilitan producir plantines “a medida” de las especificaciones que aseguren un exitoso comportamiento en el campo, el que estará regulado por los atributos morfológicos y fisiológicos de los plantines y por su interacción con el ambiente en el sitio de plantación. Sin embargo, la información disponible y las investigaciones realizadas hasta el momento en relación a los atributos morfo-funcionales y las prácticas culturales para obtenerlos, son muy escasas para el Ciprés de la Cordillera.

Esta tesis busca comprender el efecto de factores ambientales y fisiológicos potencialmente limitantes del crecimiento inicial del Ciprés de la Cordillera utilizando un sistema artificial de producción de plantas, lo que representaría además una primera aproximación hacia el entendimiento de la especie en sistemas naturales. Entre los factores ambientales se consideraron nutrientes minerales, agua y luz; y entre los fisiológicos, hormonas y micorrizas. Se analizó cómo estos factores controlan las arquitecturas morfológica e hidráulica de las plántulas de Ciprés de la Cordillera, y cómo ambas arquitecturas inciden sobre la dinámica de crecimiento en la etapa de vivero y la supervivencia y crecimiento inicial en el campo. Los estudios se estructuraron en una serie de ensayos que se desarrollaron sobre distintas etapas del ciclo de viverización y en campo en la etapa post-plantación.

La incidencia de los nutrientes minerales y el agua, se evaluó a partir de dos experimentos. En uno de ellos, se trabajó con distintos niveles de

concentración de nitrógeno en combinación con dos relaciones de proporción con el potasio durante la etapa de pleno crecimiento en vivero. Se evaluó el efecto sobre el crecimiento de la porción aérea, la asignación de biomasa, el potencial de crecimiento radical (PCRad) y la tasa de acumulación en hojas de nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio. Se estableció que las relaciones donde se equiparó el nitrógeno con el potasio mostraron una asignación de biomasa más equilibrada entre las porciones aérea y radical de la planta (BSA/BSR), y un mayor crecimiento. Además, se observó que concentraciones de nitrógeno del orden de los 50 a 100 mg L⁻¹ en proporciones equivalentes con el potasio generaron no sólo un mayor crecimiento, sino también mejores atributos morfológicos e indicadores de calidad usados para predecir el desempeño en el campo.

En el segundo ensayo se analizó la incidencia de distintos niveles de concentración de fósforo en dos niveles de contenido hídrico del sustrato de cultivo, durante la etapa de establecimiento en vivero. Se evaluó el efecto sobre la asignación de biomasa y la arquitectura hidráulica, determinando cómo cambios en las mismas afectan las relaciones hídricas y la dinámica de crecimiento de los plantines de ciprés. A excepción del potencial hídrico medido al mediodía (Ψ_{hm}), las variables hidráulicas evaluadas (conductancia radical, conductividad máxima del tallo y conductancia total del plantín), no se diferenciaron entre los tratamientos, por lo que probablemente la restricción hídrica que produjo los cambios en el Ψ_{hm} podrían estar asociados a modificaciones de la arquitectura hidráulica foliar. Se observó que los plantines que obtuvieron los mayores desarrollos de biomasa total fueron los que mostraron los mayores valores de Ψ_{hm} . Los resultados obtenidos en estas experiencias sugieren que ante desbalances hídricos leves, *A. chilensis* podría realizar un cierre estomático temprano, afectando la captación de CO₂, convirtiéndolo en limitante para el crecimiento.

A partir de estos resultados, se analizó la influencia del factor irradiancia, donde se trabajó en el marco de dos hipótesis específicas: (1) Altos niveles de irradiancia provocan daño en el fotosistema II produciendo una fotoinhibición de la actividad fotosintética; (2) La inhibición observada en la fotosíntesis a altas irradiancias es provocada indirectamente por el cierre estomático y la

concomitante disminución en la difusión de CO₂. Para contrastar dichas hipótesis se diseñó un ensayo donde se establecieron tres tratamientos: un testigo sin cobertura, una cobertura con media sombra al 60% y una cobertura en flecos de luz. Se analizaron variables morfológicas (altura de la parte aérea, diámetro al cuello y biomasa) y variables que caracterizan la respuesta de los plantines a los distintos ambientes de sombreo (asignación de biomasa entre la parte aérea y radical, distancia máxima entre hojas opuestas, área foliar específica y relación área foliar – xilema conductivo). Se midió la respuesta del déficit de presión de vapor (VPD) en cada cobertura. También se determinaron variables fotosintéticas (rendimiento cuántico máx. del fotosistema II, rendimiento cuántico efectivo del Fotosistema II; quenching no fotoquímico y tasa de transporte de electrones) y la actividad fotosintética (medida como emisión de O₂) en una atmósfera saturante de CO₂. Todas las variables morfológicas usadas para evaluar el crecimiento de los plantines de Ciprés de la Cordillera, mostraron una mejor respuesta al tratamiento de flecos de luz. También este tratamiento generó relaciones de asignaciones de biomasa y de área foliar-tejido conductivo menores, a la vez que mostró micro-ambientes con valores de déficit de presión de vapor moderados, en relación a los otros dos tratamientos evaluados. Por otro lado, las variables fotosintéticas evaluadas mostraron que el ciprés no presenta efectos de fotoinhibición ante las variaciones de irradiancia utilizadas en el ensayo. En conjunto, el sombreo en flecos integró las mejores condiciones para el crecimiento de los plantines de Ciprés de la Cordillera, generando plantines mejor balanceados estructuralmente y VPD moderados, condiciones que favorecerían la apertura estomática e irradiancias elevadas en los flecos de luz.

Para determinar la participación de las hormonas y otro tipo de reguladores en el crecimiento y estructura radical durante las primeras etapas de viverización, se realizó un ensayo de viverización en condiciones controladas en laboratorio donde se trabajó con distintas concentraciones exógenas de ácido indolbutírico (AIB) y nitroprusiato de sodio (como dador de óxido nítrico (NO), una molécula que participa en diferentes vías de señalización), aplicadas a la radícula de las plántulas. A estos tratamientos se los combinó con dos disponibilidades de fósforo, aplicadas durante la etapa de

establecimiento en vivero. Se evaluaron variables de crecimiento (altura de la parte aérea del plantín y biomasa) y la arquitectura radical, clasificándola en raíz principal y raíces laterales de primer y segundo orden. Los resultados obtenidos sugieren que los sistemas radicales de los plantines de Ciprés de la Cordillera cultivados bajo este método de viverización no fueron influenciados por la aplicación exógena de AIB y NO en las dosis ensayadas. Por otro lado la acción de estas hormonas parece no estar influenciada por la disponibilidad de fósforo, actuando estos dos factores en forma independiente. La falta de efecto de los tratamientos podría deberse al proceso de autopoda que sufre el sistema radical de las plantines bajo este método de cultivo en contenedores. El mismo generaría un proceso de redistribución hormonal, debido a la muerte apical tanto de la raíz principal como de las raíces laterales, lo que podría estar enmascarando el efecto de la aplicación exógena de las hormonas.

Bajo estos métodos de viverización, con altos niveles de fertilizante y condiciones hídricas adecuadas, la colonización micorrícica suele ser inhibida. Por otro lado, las micorrizas arbusculares que realizan la simbiosis con el ciprés pertenecen a especies de hongos cosmopolitas, por lo que se cree que los plantines serán micorrizados de forma natural una vez llevados a campo. Para contrastar lo mencionado se realizó un ensayo donde se determinó la influencia de distintas disponibilidades de fósforo y estados hídricos del sustrato sobre el nivel de colonización micorrícica durante la viverización. También se evaluó si se produce la colonización en vivero o si los plantines son micorrizados una vez que son llevados a campo, y se analizó la abundancia de la micorrización y su relación con la supervivencia y el crecimiento inicial post plantación. A lotes de plantines seleccionados al azar del cultivo del ensayo donde se evaluó disponibilidades de fósforo y agua, se los sometió a tres situaciones de análisis: (L1) se determinó el porcentaje de colonización con micorrizas arbusculares (%MA) inmediatamente después de finalizado su segundo ciclo de crecimiento en vivero; (L2) se envasaron plantas en sustrato esterilizado y se las mantuvo con agua de perforación en invernadero, transcurrido 13 meses se les determinó %MA; (L3) se llevaron a campo plantines a principios de la primavera, luego de 13 meses se relevó la supervivencia y el crecimiento inicial para luego descalzarlas y realizarles la

determinación de %MA. De los resultados obtenidos, se observó que el porcentaje de colonización micorrícica arbuscular (%MA) de plantines de Ciprés de la Cordillera cultivados en vivero es inversamente proporcional a los niveles de concentración de fósforo y el estado hídrico del sustrato durante la fase de establecimiento del cultivo. El %MA aumentó una vez que la planta fue llevada a campo independientemente del %MA con que el plantín llegó del vivero.

Concluyendo, el desarrollo de la tesis evidenció que la dinámica de crecimiento en vivero de los plantines de Ciprés de la Cordillera se encuentra altamente influenciado por el balance hídrico de la planta, posiblemente repercutiendo este último en la dinámica de intercambio gaseoso. De los factores ambientales y fisiológicos estudiados, el manejo de la luz, la nutrición y el agua fueron los que mostraron un mayor efecto sobre la arquitectura del plantín y sus relaciones hídricas. Un manejo adecuado de estas variables ambientales permite obtener un mayor crecimiento acompañado de un mejor balance entre las fracciones de transpiración y de absorción. Además, bajo la metodología de viverización utilizada, tanto las hormonas como las micorrizas estudiadas, no tuvieron efecto sobre el desarrollo del plantín en vivero.

ABSTRACT

In recent years, in Patagonia Argentina, vast areas occupied by the forest tree *Austrocedrus chilensis* have gradually been lost. Factors such as logging, forest fires, the action of livestock, and an disease, known as "mal del ciprés", are the main causes of the current deterioration of its forests. One of the basic requirements to carry out an active restoration of degraded forests is to have an efficient system of massive production of seedlings. Semi-controlled containerized nursery methods offer wide opportunities to manage seedling growth, both in its vigor and in its physiological condition. These methods make possible to produce "tailor-made" seedlings of the specifications that ensure a successful behavior in the field, which will be regulated by the morphological and physiological attributes of the seedlings and by their interaction with the environment at the plantation site. However, the information available and the research carried out until now in relation to the morpho-functional attributes and cultural practices to obtain them, are very scarce for *A. chilensis*.

This thesis seeks to understand the effect of some key environmental and physiological factors potentially limiting the initial growth of the *A. chilensis* through the use of an artificial system of plant production, which means a first approach towards the understanding of natural systems. Among the environmental factors, mineral nutrients, water and light were considered; and among the physiological, hormones and mycorrhizae. It was analyzed how these factors control the morphological and hydraulic architectures of the seedlings of *A. chilensis*, and how both architectures affect the growth dynamics in the nursery phase and the initial performance in the field. The studies were structured in a series of assays that were developed at different phases of the crop cycle in the nursery and also in the field, in the post-plantation stage.

The incidence of mineral nutrients and water was evaluated from two experiences. In one of them, I worked with different levels of nitrogen concentration in combination with potassium at two contrasting ratios during the stage of rapid growth in nursery. The effect on the growth of the aerial portion, the allocation of biomass, the potential radical growth (PCRad) and the rate of accumulation in leaves of nitrogen, phosphorus, potassium, calcium and

magnesium were evaluated in the sampled seedlings. It was established that the ratios where nitrogen was equated with potassium showed the highest growth and most equilibrated relationship between the overground and underground biomass (BSA/BSR) ratio. In addition, it was observed that nitrogen concentrations in the order of 50 to 100 mg L⁻¹ in proportions equivalent to potassium generated not only greater growth, but also better morphological attributes and quality indicators used to predict the performance in the field.

In the second trial, the incidence of different levels of phosphorus concentration at two levels of water content of the growing medium was analyzed during the establishment phase in the nursery. The effect on biomass allocation and hydraulic architecture was evaluated, determining how changes in them affect water relationships and the growth dynamics of *A. chilensis* seedlings. With the exception of the midday leaf water potential (Ψ_{hm}), the hydraulic variables evaluated (root conductance, maximum stem conductance and total conductance of the seedling) did not differentiate between treatments, so the water restriction that caused the changes in the Ψ_{hm} could probably be associated with modifications of the foliar hydraulic architecture. It was observed that the seedlings that obtained the highest total biomass developments were those that showed the highest values of Ψ_{hm} . The results obtained in these experiments suggest that under mild hydric imbalances, *A. chilensis* might display an early stomata closure, affecting the uptake of CO₂, becoming a limiting factor for growth.

From these results, the influence of the irradiance factor was analyzed, we worked under two specific hypotheses: (1) High levels of irradiance cause damage in photosystems producing a photoinhibition of photosynthetic activity; (2) The inhibition observed in photosynthesis at high irradiances is caused indirectly by the stomata closure. To test these hypotheses, an assay was designed where three treatments were established: AL (control-without coverage), MS (coverage with half shadow at 60%) and FL (coverage with sunflecks). The response of the vapor pressure deficit (VPD); morphological variables (overground height, collar diameter and dry biomass) and variables that characterize the response of the seedlings to the different shading

environments (allocation of biomass between the aerial and root parts, maximum distance between opposite leaves, leaf area specific and ratio leaf area - conductive xylem) were measured. Photosynthetic variables (quantum yield max. of photosystem II, effective quantum yield of photosystem II; non-photochemical quenching and electron transport rate) and photosynthetic activity (measured through the emission of O₂) in a CO₂ saturating atmosphere were also determined. All the morphological variables used to evaluate the growth of *A. chilensis* seedlings showed a better response to the treatment of sunflecks (FL). This treatment also generated BSA/BSR, ratio leaf area - conductive xylem (AF/Ax) more balanced and micro-environments with moderate DPV values, comparing with the two other treatments evaluated. On the other hand, the evaluated photosynthetic variables indicated that *A. chilensis* does not show any effects of photoinhibition in irradiances variations used in this assay. Taking as a whole, the sunflecks's coverage gave the best conditions for the growth for *A. chilensis* seedlings, generating structurally balanced seedlings and moderate DPV, conditions that would favor stomata opening and high irradiances in the sunflecks.

To determine the participation of hormones and another type of regulators in the growth and radical structure during the first phases of viverization, an assay was carried out under controlled conditions in the laboratory using different exogenous concentrations of indolebutyric acid (IBA) and sodium nitroprusside (as a nitric oxide (NO) donor, a molecule that participates in different signaling pathways), applied to the radicle of the seedlings. These treatments were combined with two phosphorus availabilities, applied during the establishment phase in nursery. Variables of growth (overground height of the seedling and anhydrous biomass) and the radical architecture were evaluated, classifying it into main root and lateral roots of first and second order. The results obtained suggest that the root systems of the *A. chilensis* seedlings cultivated under this viverization method, were not influenced by the exogenous application of AIB and NO in the doses tested. On the other hand, the action of these hormones seems not to be influenced by the availability of phosphorus, acting both factors independently. The lack of treatment effects could be due to the process of selfprunning that undergoes the radical system of the seedlings

under this method of cultivation in containers. It would generate a process of hormonal redistribution, due to the apical death of both principal as well as lateral roots, which could be masking the effect of the exogenous application of hormones.

Under these nursery methods, with high levels of fertilizer and adequate water conditions, mycorrhizal colonization is usually inhibited. On the other hand, the arbuscular mycorrhizae that perform the symbiosis with *A. chilensis* belongs to cosmopolitan fungi species, so it is expected that the seedlings will be mycorrhized naturally once they are planted in the field. In order to contrast the aforementioned, an essay was carried out where the influence of different available phosphorus and hydric states of the substrate on the level of mycorrhizal colonization during the nursery was determined. It was also evaluated if colonization occurs in the nursery or if the seedlings are mycorrhized once they are planted in the field. The abundance of mycorrhization and its relation to survival and initial post-plantation growth were also analyzed. Randomly selected batches of seedlings from the phosphorus and water availability trial were subjected to three analysis: (L1) determination of the percentage of arbuscular mycorrhizae colonization (% MA) immediately after the end of its second growth cycle in the nursery; (L2) determination of % MA in plants that were transplanted to pots in sterilized substrate and maintained with drilling water in greenhouse during 13 months; (L3) determination of the survival, initial growth and % MA in seedlings were taken to the field in early spring for 13 months. It was observed that % MA of *A. chilensis* seedlings cultivated in the nursery is inversely proportional to the levels of phosphorus concentration and the hydric state of the growth medium during the establishment phase. The % MA increased once the plant was taken to the field regardless of the % MA the seedling had when left the nursery.

During the development of the thesis it was evidenced that the growth dynamics in the nursery of the *A. chilensis* seedlings is highly influenced by the hydric balance of the plant, which might have an effect on the dynamics of gas exchange. Among the environmental and physiological factors studied, the manipulation of light, nutrition and water showed the greatest effect on the architecture of the seedling and its water relations. An adequate management

of these environmental variables allows for greater growth accompanied by a better balance between the transpirant and absorbent fractions. In addition, under the methodology of nursery used, both the hormones and mycorrhizae studied, had no effect on the development of seedlings in the nursery.

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

En estas líneas quiero dejar plasmado mi agradecimiento a los directores de tesis, Carlos Bartoli y Mario Pastorino por haberme acompañado en este camino y entender mi situación y motivaciones personales en relación al doctorado. También quiero expresar mi gratitud hacia la Universidad Nacional de la Patagonia SJB y el Instituto INBIES que me dio el lugar y financiamiento necesario para llevar adelante este proyecto. Al Instituto INFIVE que puso a disposición recursos e instalaciones para realizar una pasantía relacionada a los ensayos de sensibilidad a la fotoinhibición, agradeciendo especialmente a Eduardo Tambussi que me guio en las distintas técnicas de medición de fluorescencia modulada de la clorofila. No quiero dejar de mencionar a todo el equipo técnico del INBIES que contribuyo en el desarrollo de los distintos ensayos llevados a cabo, en especial a Angie Martucci por su tarea realizada sobre la ejecución, mantenimiento y relevamiento de datos. Quiero extender mi agradecimiento a Paula Campanello, Santiago Gyenge y Eduardo Tambussi, que en su función de jurados de esta tesis hicieron valiosos aportes para mejorar su comprensión y calidad científica. A Maria Eugenia Salgado Salomon y Oscar Troncoso por su contribución en temas específicos de micorrizas y técnicas de microscopia. A Juan Enricci mentor de mi desarrollo profesional y Rene Escobar ejemplo de dedicación y constante superación. Agradecer al Tolo y a su familia que hicieron posible y amenas mis estadías en La Plata durante los cursos de postgrado. Finalmente quiero agradecer a Camila, Catalina, Santiago y Juancito que son mi sustento y fuente de inspiración para esforzarme cada día y soñar con construir un mundo mejor para las generaciones futuras.

INDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL	20
CAPÍTULO 1. INFLUENCIA DE LA NUTRICIÓN MINERAL Y EL CONTENIDO HÍDRICO EN LA DINÁMICA DE CRECIMIENTO DE PLANTINES CULTIVADOS DE CIPRÉS DE LA CORDILLERA.....	26
1.1. INTRODUCCIÓN.....	26
Ensayo a. Disponibilidad de Nitrógeno y Potasio durante la etapa de pleno crecimiento.....	31
1.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
1.2.1. Material vegetal y ambiente de cultivo	31
1.2.2. Condiciones de cultivo.....	34
1.2.3. Método de cultivo	35
1.2.4. Tratamientos.....	38
1.2.5. Variables analizadas	39
1.2.6. Diseño experimental y análisis estadístico.....	42
1.3. RESULTADOS	43
1.4. DISCUSIÓN	47
Ensayo b. Disponibilidad de fósforo y agua durante la etapa de establecimiento.....	53
1.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
1.2.1. Material vegetal y ambiente de cultivo	53
1.2.2. Manejo de agua y fertirriego.....	54
1.2.3. Tratamientos.....	55
1.2.4. Variables analizadas	55
1.2.4.1. Biomasa	55
1.2.4.2. Conductividad radical	56
1.2.4.3. Conductividad máxima del tallo	57
1.2.4.4. Conductancia de la planta	58
1.2.4.5. Potencial hídrico foliar pre-alba (Ψ_{hpr}) y mediodía (Ψ_{hm}).....	60
1.2.5. Diseño experimental y análisis estadístico.....	60
1.3. RESULTADOS	61
1.4. DISCUSIÓN	66
CAPÍTULO 2. INFLUENCIA DE LA DINÁMICA DE SOMBREO SOBRE EL CRECIMIENTO DE PLANTINES DE CIPRÉS DE LA CORDILLERA DURANTE LA VIVERIZACIÓN.....	70
2.1. INTRODUCCIÓN.....	70
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	75
2.2.1. Ensayo de sombreado.....	75
2.2.1.1. Material vegetal y ambiente de cultivo.....	75
2.2.1.2. Manejo de agua y fertirriego.	76
2.2.1.3. Tratamientos	77

2.2.1.4. Variables analizadas	79
2.2.1.4.1. Variables morfológicas.....	79
2.2.1.4.2. Variables alométricas.....	80
2.2.2. Ensayo de sensibilidad a la fotoinhibición.....	83
2.2.2.1. Diseño experimental y analisis estadístico.....	88
2.3. RESULTADOS	88
2.3.1. Ensayo de sombreado.....	88
2.3.2. Ensayo de sensibilidad a la fotoinhibición.....	94
2.4. DISCUSIÓN	98
CAPÍTULO 3. PARTICIPACIÓN DE LAS HORMONAS EN EL DESARROLLO Y ESTRUCTURA RADICAL DURANTE LAS PRIMERAS ETAPAS DE VIVERIZACIÓN DE PLANTINES DE CIPRÉS DE LA CORDILLERA.....	105
3.1. INTRODUCCIÓN	105
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	108
3.2.1. Material vegetal y ambiente de cultivo	108
3.2.2. Manejo de agua y fertirriego.....	109
3.2.3. Tratamientos.....	110
3.2.4. Variables analizadas	114
3.2.5. Diseño experimental y análisis estadístico.....	114
3.3. RESULTADOS	115
3.3.1. Parámetros morfológicos.....	115
3.3.2. Arquitectura radical.....	117
3.4. DISCUSIÓN	120
CAPÍTULO 4. COLONIZACIÓN MICORRÍCICA DE LOS PLANTINES DE CIPRÉS DE LA CORDILLERA EN RELACIÓN A LA DISPONIBILIDAD DE AGUA Y NUTRIENTES	126
4.1. INTRODUCCIÓN	126
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	128
4.2.1. Material vegetal y ambiente de cultivo	128
4.2.2. Variables analizadas	131
4.2.3. Diseño experimental y análisis estadístico.....	137
4.3. RESULTADOS	137
4.3.1. Presencia de MA en el sustrato de cultivo	137
4.3.2. Porcentaje de colonización de MA (%MA).....	137
4.3.3. Supervivencia y crecimiento inicial a campo.....	140
4.5. DISCUSIÓN.....	141
CONCLUSIONES GENERALES.....	147
BIBLIOGRAFÍA.....	151

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Vista de los distintos tratamientos ubicados en la cámara aeropónica para efectuar el análisis de PCRad	41
Figura 2. Vista de los tratamientos ubicados en el invernadero de realización de los ensayos	42
Figura 3. Parámetros morfológicos de los plantines de <i>Austrocedrus chilensis</i> sometidos a los distintos tratamientos T1-T8.....	45
Figura 4. Concentración de nutrientes en la parte aérea de plantines de <i>Austrocedrus chilensis</i> sometidos a los distintos tratamientos T1-T8.	46
Figura 5. Vista del proceso de medición de la conductancia de la planta.	59
Figura 6. Vista del ensayo ubicado en las mesadas del invernadero, durante el segundo ciclo de crecimiento	61
Figura 7. Generación de biomasa aérea (BSA) de plantines de Ciprés de la Cordillera.....	62
Figura 8. Generación de biomasa radical (BSR) de plantines de Ciprés de la Cordillera.	63
Figura 9. Generación de biomasa total (BST) de plantines de Ciprés de la Cordillera.	64
Figura 10. Respuesta a la asignación de biomasa (BSA/BSR) de plantines de Ciprés de la Cordillera.....	64
Figura 11. Comportamiento del potencial hídrico al mediodía (ψ_{hm}) de plantines de Ciprés de la Cordillera.....	66
Figura 12. Esquema de la dinámica de crecimiento del cultivo de Ciprés de la Cordillera en relación a las distintas etapas de crecimiento.....	68
Figura 13. Vista de los cajones utilizados para generar las distintas dinámicas de sombreo. ...	77
Figura 14. Vista del tipo de sombreo en el interior de los cajones.....	78
Figura 15. Vista en microscopio del corte transversal del tallo de un plantín del tratamiento testigo.	82
Figura 16. (A) Medidor portátil de fluorescencia modulada de la clorofila; (B) Dispositivo utilizado para realizar las mediciones de producción de oxígeno (electrodo tipo Clark).	84
Figura 17. Plantines colocados a distintas irradiancias en mesadas de luz, en la cámara de cultivo del INFIVE.	84
Figura 18. Toma de datos en el invernadero del INFIVE utilizando el medidor de fluorescencia.	87
Figura 19. Déficits de presión de vapor (VPD) medidos durante la primera quincena de octubre, en los tres tratamientos ensayados.	89

Figura 20. Parámetros morfológicos de los plantines de <i>Austrocedrus chilensis</i> sometidos a los tratamientos de flecos de luz.....	90
Figura 21. Parámetros morfológicos de los plantines de <i>Austrocedrus chilensis</i> sometidos a los tratamientos de flecos de luz. (A) biomasa aérea (BSA). (B) biomasa radical (BSR). (C) biomasa total (BST).	91
Figura 22. Asignación de biomasa (BSA/BSR) de los plantines de <i>Austrocedrus chilensis</i> sometidos a los tratamientos de flecos de luz.	92
Figura 23. Valores medios de la distancia máxima entre hojas opuestas (DMHO) de los plantines de <i>Austrocedrus chilensis</i> sometidos a los tratamientos de flecos de luz.....	92
Figura 24. Valores medios del área foliar específica (AFE) de los plantines de <i>Austrocedrus chilensis</i> sometidos a los tratamientos de flecos de luz.	93
Figura 25. Relación área foliar y área xilemática (AF/Ax) de los plantines de <i>Austrocedrus chilensis</i> sometidos a los tratamientos de flecos de luz.	93
Figura 26. Vista de las bandejas utilizadas para la siembra. ...	108
Figura 27. Vista de la aplicación de los tratamientos de NPS en las plántulas de Ciprés de la Cordillera previas a ser repicadas.....	112
Figura 28. Vista de plántulas de Ciprés de la Cordillera donde se observa la aplicación del tratamiento con la auxina AIB mediante la inmersión de la radícula en la solución....	113
Figura 29. Vista de las bandejas portatubetes ubicadas en la mesada de luz.....	113
Figura 30. Biomasa aérea (BSA) de plantines de Ciprés de la Cordillera en relación a los distintos niveles de hormonas ensayados.	116
Figura 31. Porcentaje de raíz principal primaria viva (Rpv) de los plantines de Ciprés de la Cordillera en relación a los distintos niveles de concentración de fósforo.	117
Figura 32. Porcentaje de raíz principal primaria viva (Rpv) de los plantines de Ciprés de la Cordillera en relación a los distintos niveles aplicados del factor hormona.	118
Figura 33. Cantidad de raíces laterales de primer orden (LR) de los plantines de Ciprés de la Cordillera en relación a los distintos niveles de hormonas ensayados.	119
Figura 34. Cantidad de raíces laterales de segundo orden (LRs) de los plantines de Ciprés de la Cordillera en relación a los distintos niveles de hormonas ensayados.	119
Figura 35. Apariencias generales de las arquitecturas de los sistemas radicales de los plantines de Ciprés de la Cordillera.	124
Figura 36. Vista de la parcela donde se realizó la plantación del lote (I3) en la Reserva Provincial El Guadal.	130
Figura 37. Vista del proceso de lavado, seccionado y tinción de los sistemas radicales.	132

Figura 38. Vista de la caja de petri con la cuadrícula de fondo y las raíces distribuidas homogéneamente.	133
Figura 39. Vista de las estructuras encontradas en los tejidos radicales de plantines de Ciprés de la Cordillera.	135
Figura 40. Vista de un plantín de Ciprés de la Cordillera del lote L3 llevado a plantación.....	136
Figura 41. Porcentaje de colonización de MA de plantines de Ciprés de la Cordillera del lote (L1).	138
Figura 42. Porcentaje de colonización de MA de plantines de Ciprés de la Cordillera del lote (L2).	139
Figura 43. Porcentaje de colonización de MA de plantines de Ciprés de la Cordillera del lote (L3).	140
Tabla 1. Contenidos hídricos en las distintas fases de crecimiento.	37
Tabla 2. Clases y concentraciones de las sales fertilizantes de los ocho tratamientos utilizados en el ensayo.	39
Tabla 3. Parámetros morfológicos de los plantines de Ciprés de la Cordillera sometidos a los diferentes tratamientos.	43
Tabla 4. Participación porcentual de clases de PCRad según la clasificación de Burdett en los tratamientos ensayados.	46
Tabla 5. Potencial de crecimiento radical (PCRad) de plantines de <i>Austrocedrus chilensis</i> sometidos a los distintos tratamientos T1-T8.	47
Tabla 6. Concentraciones de las sales fertilizantes utilizadas en las tres soluciones nutricionales de los distintos niveles de fósforo (P).	55
Tabla 7. Variables hidráulicas de plantines de Ciprés de la Cordillera sometidos a diferentes niveles de concentraciones de fósforo y contenidos de agua aprovechable.....	65
Tabla 8. Rendimiento cuántico efectivo (Φ_{PSII}), rendimiento cuántico máximo ($\Phi_{PSII\text{máx}}$), tasa de transporte de electrones (ETR), atenuación no-fotoquímica (NPQ) y producción de Oxígeno (Prod O ₂).($\mu\text{L g}^{-1} \text{min}^{-1}$).....	94
Tabla 9. Rendimiento cuántico máximo ($\Phi_{PSII\text{máx}}$), obtenidos a partir de las mediciones de fluorescencia modulada de la clorofila. Tiempo de permanencia 30 min.	94
Tabla 10. Rendimiento cuántico máximo ($\Phi_{PSII\text{máx}}$), obtenidos a partir de las mediciones de fluorescencia modulada de la clorofila. Tiempo de permanencia 90 min.	95
Tabla 11. Atenuación no-fotoquímica (NPQ), obtenidos a partir de las mediciones de fluorescencia modulada de la clorofila. Tiempo de permanencia 30 min.	95

Tabla 12. Atenuación no-fotoquímica (NPQ), obtenidos a partir de las mediciones de fluorescencia modulada de la clorofila. Tiempo de permanencia 90 min.	96
Tabla 13. Tasa de transporte electrónico (ETR), obtenidos a partir de las mediciones de fluorescencia modulada de la clorofila. Tiempo de permanencia 30 min.	96
Tabla 14. Tasa de transporte electrónico (ETR), obtenidos a partir de las mediciones de fluorescencia modulada de la clorofila. Tiempo de permanencia 90 min.	97
Tabla 15. Producción de oxígeno expresados en $\mu\text{L g}^{-1} \text{min}^{-1}$. Tiempo de permanencia 30 min	97
Tabla 16. Concentraciones de ácido indolbutírico (AIB), nitroprusiato de sodio (NPS) y fósforo usados en los tratamientos aplicados en el ensayo.	111
Tabla 17. Altura promedio de plantines de Ciprés de la Cordillera sometidos a los diferentes niveles ensayados del factor concentración de fósforo	115
Tabla 18. Altura promedio de plantines de Ciprés de la Cordillera sometidos a los diferentes niveles ensayados del factor hormonas.	116
Tabla 19. Valor promedio de la cantidad total de raíces de plantines de Ciprés de la Cordillera sometidos a los diferentes niveles ensayados del factor concentración fósforo.	120
Tabla 20. Crecimiento inicial de los plantines de Ciprés de la Cordillera sometidos a diferentes niveles de concentración de fósforo, expresadas en (ppm).....	141
Tabla 21. Crecimiento inicial de los plantines de Ciprés de la Cordillera sometidos a diferentes niveles de contenido hídrico, expresados en porcentaje.	141

ABREVIATURAS

- AIB:** Ácido indol butírico.
- AFE:** Área foliar específica.
- AF:** Área foliar total.
- Ax:** Área del xilema activo.
- DMHO:** Distancia máxima entre hojas opuestas
- ETR:** Tasa de transporte de electrones.
- Fo:** Fluorescencia mínima.
- Fm:** Fluorescencia máxima en hojas a oscuridad.
- Fm´:** Máxima fluorescencia en hojas iluminadas.
- Fs:** Fluorescencia a estado estable a determinado nivel de irradiancia.
- Φ_{PSII} :** Rendimiento cuántico efectivo del fotosistema II.
- $\Phi_{PSII \text{ máx}}$:** Rendimiento cuántico máximo del fotosistema II.
- NO:** Oxido nítrico.
- NPQ:** Atenuación no fotoquímica (“Quenching” no fotoquímico).
- NPS:** Nitroprusiato de sodio (dador de óxido nítrico).
- PCRad:** Potencial de crecimiento radical.
- LR:** Ramificaciones radicales de primer orden.
- LRs:** Ramificaciones radicales de segundo orden.
- RPv:** Raíz primaria viva.
- VPD:** Déficit de presión de vapor.
- Ψ_h :** Potencial hídrico.
- Ψ_{hm} :** Potencial hídrico mediodía.
- Ψ_{hpr} :** Potencial hídrico pre-alba.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los bosques de “Ciprés de la Cordillera” (*Austrocedrus chilensis* (D.Don) Pic. Ser. et Bizzarri) se distribuyen en Argentina desde los 37° 7' S hasta los 43° 44' O. (Pastorino *et al.* 2006), en una franja de 750 km siguiendo las laderas de la Cordillera de los Andes en sentido norte-sur y de unos 10 a 50 km en el sentido este-oeste, ubicándose en las provincias de Neuquén, Río Negro y Chubut (Hueck 1978, Donoso Zegers 1993). La superficie ocupada por el Ciprés de la Cordillera es cercana a las 150.000 ha, 90.000 de las cuales se encuentran en jurisdicción de Parques Nacionales y las 60.000 restantes en Río Negro y Chubut, ya que en el centro y norte de Neuquén sólo constituye pequeños relictos (Dezzotti y Sancholuz 1991).

Durante el último siglo, se han ido perdiendo paulatinamente vastas superficies ocupadas por esta especie. Factores como la explotación maderera, los incendios, la acción de la ganadería y una enfermedad, conocida como “mal del ciprés”, son las principales causantes del deterioro actual de estos bosques (Loguercio *et al.* 1999). Los incendios catastróficos son eventos cada vez más frecuentes en los bosques andino-patagónicos. En el período comprendido entre 1993 y 1999, aproximadamente 57.930 hectáreas de bosque nativo fueron afectadas por incendios forestales en las Provincias de Río Negro y Chubut. En el año 2015 se quemaron 44.257 ha de bosque nativo en las provincias de Neuquén, Río Negro y Chubut, correspondiendo 27.101 ha a un solo incendio (Las Horquetas – Cholila) (Mohr Bell 2015). Actualmente, debido al escaso conocimiento de las técnicas de restauración apropiadas para estos ecosistemas y sus altos costos, el manejo de los sitios quemados se restringe a extraer la madera, contemplando en algunos casos el reemplazo del Ciprés de la Cordillera por especies exóticas de rápido crecimiento, o su destino al uso ganadero (Urretavizcaya 2001).

Dos leyes nacionales repercuten decisivamente en el interés de la producción industrial de plantas nativas para programas de forestación y restauración de ecosistemas degradados. En primer lugar debe mencionarse la ley nacional de Promoción de la Actividad Forestal N° 25.080, promulgada en 1999 (y sus prorrogantes N° 26.432 y N° 27.487), que a diferencia de sistemas

anteriores de promoción a la forestación, acepta planes de plantación con especies nativas, lo que constituye un verdadero hito en la historia forestal del país. En segundo lugar, la nueva Ley Nacional de Presupuestos Mínimos de Protección Ambiental de los Bosques Nativos (N° 26.331), promulgada en 2007 y reglamentada en 2009 tiene entre sus objetivos primarios “Fomentar las actividades de enriquecimiento, conservación, restauración, mejoramiento y manejo sostenible de los bosques nativos”. A través de estas dos leyes se genera una demanda incipiente pero con crecimiento sostenido de plantines forestales de especies nativas.

La región ocupada por esta especie, presenta una alta heterogeneidad ambiental, incluyendo un marcado gradiente pluviométrico oeste-este. En las zonas de precipitaciones superiores a 1.600 mm anuales *A. chilensis* forma bosques mixtos con el coihue (*Nothofagus dombeyi* (Mirb.) Oerst). Entre los 1.600 y 600 mm de precipitación media anual forma rodales puros de distinta densidad, y es la única especie arbórea presente en el ecotono bosque-estepa (Dezzoti y Sancholuz 1991). En esta misma línea, La Manna (2005) destaca la capacidad del Ciprés de la Cordillera para desarrollarse en diferentes condiciones edáficas, como ya fue mencionado por Veblen *et al.* (1995, 1996), señalando que la especie habita en suelos rocosos de la estepa, donde las precipitaciones no superan los 300 mm, pero también es capaz de desarrollarse en suelos arcillosos, donde las raíces están sometidas a un exceso de agua gran parte del año y a períodos de falta de agua en el verano. Esta característica del Ciprés de la Cordillera lo convierte en la especie de mayor proyección en el noroeste patagónico, debido a la amplitud de sitios potencialmente aptos para su forestación

Uno de los requisitos para llevar a cabo una restauración activa de los cipresales degradados es contar con un sistema eficiente de producción masiva de plantines. Procurando superar las tecnologías tradicionales de producción de baja intensidad, en las últimas décadas se han desarrollado tecnologías más intensivas para la producción de plantines forestales que se basan en el cultivo en contenedores sobre sustrato inerte con fertirriego, dentro de invernáculos. A la fecha existen escasos trabajos publicados sobre producción de plantines en viveros de la región andino-patagónica de la

Argentina, tanto para coníferas exóticas (e.g. Basil *et al.* 2002, Lavado y Mazzarino 2005), como para especies nativas (Azpilicueta *et al.* 2010, Schinelli Casares 2013) y *A. chilensis* en particular (Enricci *et al.* 2001). No obstante, se ha trabajado particularmente en la adaptación de esta tecnología intensiva para la viverización del *A. chilensis* logrando un protocolo de fertirriego aceptable (Enricci y Massone 2003) que es el habitualmente utilizado en los viveros de la región que hacen uso de esta tecnología. Sin embargo, el crecimiento inicial logrado es bajo en relación a otras especies cultivadas en la región, requiriendo 2 ciclos de crecimiento para lograr un plantín de tamaño apropiado para llevar al campo. Un rasgo visible en los plantines de *A. chilensis* es un menor crecimiento radical en sus primeros estadios, en relación con otras especies cultivadas (e.g. *Nothofagus pumilio*, *Nothofagus dombeyi*, *Pinus ponderosa*), presentando sistemas radicales fibrosos, poco ramificados y sin presencia de estructuras capilares. Donoso Zegers *et al.* (1995), señalan que *A. chilensis* presenta un sistema radical descompensado, con una raíz pivotante y escasas raíces finas, lo que indica la necesidad de realizar labores de acondicionamiento radical. Basil *et al.* (2009) mencionan la importancia de los primeros meses de crecimiento, y la baja capacidad de esta especie de recuperarse de un inicio deficiente.

La viverización de plantas es una actividad que tiene directa incidencia en las características ó atributos del material utilizado en el establecimiento de plantaciones. Dichos atributos están regulados por factores morfológicos y fisiológicos de las plantas, los cuales pueden ser mejorados por el viverista (Escobar y Sanchez 1992). En esta línea, varios autores mencionan que cambios en la asignación de biomasa podría conducir a modificaciones en el uso del agua (Haynes and Gower 1995, Albaugh *et al.* 1998, Ewers *et al.* 1999, 2000) y en los rasgos hidráulicos de las plantas (Bucci 2006). Faustino *et al.* (2013) señalan que la fertilización con nitrógeno en *Pinus taeda* alteró la asignación de biomasa (aerea/radical) y afectó la conductancia hidráulica, disminuyendo el abastecimiento de agua a las hojas, reduciendo el potencial hídrico foliar y provocando una menor conductancia estomática, resultando en un menor crecimiento. Por otro lado Pereyra y Chavez (1993) observaron que el déficit de agua en el suelo causa reducción de la biomasa, ramificación

lateral y tasas de expansión foliar, tanto en especies herbáceas como en forestales. Además estos autores también señalaron que muchas especies exhiben cambios en la asignación de biomasa en favor de las estructuras involucradas en la captación y transporte de agua.

El método de viverización en contenedores con fertirriego ofrece amplias oportunidades para controlar el crecimiento del plantín, a partir del manejo de los factores que inciden en el ciclo de viverización (i.e. nutrientes, agua, sustrato, temperatura). Este método permite producir plantines de vigor y condición fisiológica conocida, con fines específicos (i.e. “a medida”) que aseguren un exitoso comportamiento a campo (Romero *et al.* 1986). En este sentido Duryea y McClain (1984) resaltan que el éxito de una plantación forestal depende de la calidad de las plantas, la que está definida por su comportamiento final en terreno. Este último está regulado por los atributos morfológicos y fisiológicos de las plántulas y por su interacción con el ambiente en el sitio de plantación. Atributos morfológicos como diámetro del cuello, altura del plantín y potencial de crecimiento radical son buenos indicadores para predecir la supervivencia y crecimiento potencial a campo (Mason 2001, Ritchie y Tanaka 1990). Sin embargo, la información disponible y las investigaciones realizadas hasta el momento en relación a los atributos morfo-funcionales y las prácticas culturales para obtenerlos, son muy escasas para *A. chilensis*.

Otro importante factor para la eficiencia de los planes de reforestación, son las asociaciones micorrícicas. Más del 90 % de todas las plantas terrestres forman asociaciones con hongos micorrícicos (Smith y Read 1997). Martínez *et al.* (2007) mencionan que la asociación simbiótica entre las raíces de la planta y hongos micorrícicos, consiste en que los fotosintatos generados por la planta los comparte con los hongos, cubriendo su demanda de carbono, y a su vez los hongos contribuyen a incrementar la absorción de agua y minerales que pasan a la planta. Esta relación induce la ramificación radical, dando como resultado el mejoramiento de la tasa de crecimiento y supervivencia a campo (Gagnon *et al.* 1988, Stenström *et al.* 1997, Krasowski *et al.* 1999, Jumpponen 2001, Van Tichelen *et al.* 2001, Ortega *et al.* 2004). En esta misma línea Landis (1989) ha observado que la micorrización puede no afectar el crecimiento del plantín en el vivero, pero le otorgará mejores chances de supervivencia y mayores

crecimientos una vez plantado a campo. A pesar que el uso de fertirriego, que involucra altas dosis de nitrógeno y fósforo y medios de crecimiento artificiales, produce una disminución de la micorrización durante la viverización (Landis *et al.* 1989, Sánchez 2000, Martínez *et al.* 2007), se espera que los plantines de Ciprés de la Cordillera llevados a campo sean micorrizados rápidamente, debido a que esta especie genera simbiosis con hongos micorrízicos del tipo arbusculares (MA) (Fontenla 2001), los cuales forman parte de la biota autóctona de los sitios con aptitud forestal de toda la Patagonia (Martínez *et al.* 2007).

Esta tesis busca comprender el efecto de algunos factores ambientales y fisiológicos claves, potencialmente limitantes del crecimiento inicial del *A. chilensis* utilizando un sistema artificial de producción de plantas, lo que representaría además una primera aproximación hacia el entendimiento de la especie en sistemas naturales. Se trabajó sobre la hipótesis de que la optimización del crecimiento del plantín en su conjunto está determinada por los atributos de la arquitectura morfológica e hidráulica del mismo, las que son controladas por diversos factores ambientales y fisiológicos. Para verificar dicha hipótesis se planteó como objetivo general determinar los efectos de los factores ambientales tales como nutrientes minerales, agua y luz, y de los factores fisiológicos hormonas y micorrizas, todos los cuales controlan las arquitecturas morfológica e hidráulica de las plántulas de *A. chilensis* y cómo éstas inciden sobre la dinámica de crecimiento en la etapa de vivero y la supervivencia y crecimiento inicial a campo.

Se plantearon 4 objetivos específicos, trabajados sobre distintas etapas del ciclo de viverización y en campo en la etapa post-plantación, los cuales dan origen a los capítulos 1, 2, 3 y 4 de estas tesis. Los mismos son:

1. Influencia de la nutrición mineral y el contenido hídrico del sustrato en la dinámica de crecimiento de plantines cultivados de Ciprés de la Cordillera.
2. Influencia de la irradiancia, en particular la dinámica de sombreado sobre el crecimiento de los plantines de Ciprés de la Cordillera durante la viverización.

3. Efecto de las hormonas en el crecimiento y estructura radical durante las primeras etapas de viverización de plantines de Ciprés de la Cordillera.
4. Colonización micorrícica de los plantines de Ciprés de la Cordillera en relación a la disponibilidad de agua y nutrientes.

1

INFLUENCIA DE LA NUTRICIÓN MINERAL Y EL CONTENIDO HÍDRICO DEL SUSTRATO EN LA DINÁMICA DE CRECIMIENTO DE PLANTINES CULTIVADOS DE CIPRÉS DE LA CORDILLERA

1.1. INTRODUCCIÓN

El ajuste de los distintos factores intervinientes en el cultivo es de vital importancia para lograr plantines aptos para las condiciones edafo-climáticas del sitio a plantar. Dos de los factores de gran incidencia en el proceso de viverización de plantines forestales son la disponibilidad de agua y de nutrientes: estos regulan el crecimiento, los patrones de asignación de carbono y de la arquitectura hidráulica de las plantas (Faustino *et al.* 2013; Bucci *et al.* 2006; Osório *et al.* 1998).

La disponibilidad de agua está considerada como el principal factor limitativo del crecimiento en los ecosistemas naturales, y es uno de los factores más importantes promotores del crecimiento tanto en los ecosistemas naturales, como en los viveros. La relevancia ecológica del agua refleja su importancia fisiológica, y casi cualquier proceso vegetal está directa o indirectamente afectado por el agua. Los efectos del déficit hídrico sobre el crecimiento y el metabolismo de la planta son un tema ampliamente estudiado. Así, se ha observado que el déficit hídrico en suelos causa reducción en la biomasa total, producción de hojas, ramificaciones laterales y en las tasas de expansión foliar y del crecimiento vegetativo tanto de plantas herbáceas como leñosas (e.g.: Schulze 1986, Chaves 1991, Jones 1996). Por otro lado, en condiciones hídricas limitantes, los patrones de asignación de carbono de distintas especies a nivel individual resultan en el aumento de una función en particular a expensas de otra (Bucci *et al.* 2009). Muchas especies exhiben cambios en la asignación de biomasa hacia las estructuras involucradas en la captación y transporte de agua en respuesta a déficit hídricos (Pereira y Chaves 1993). Estos estudios resaltan la importancia del agua como

herramienta de manejo en el cultivo de plantas, ya que no sólo puede modificar la dinámica de crecimiento sino también los rasgos estructurales de las mismas.

Bucci *et al.* (2006) mencionan la importancia de la disponibilidad de nutrientes sobre la influencia de los patrones de asignación de carbono, pudiendo esto también afectar la arquitectura hidráulica y consecuentemente las relaciones hídricas de la planta. Por ejemplo, si el total de la superficie del área foliar aumenta con el incremento de disponibilidad de nutrientes a expensas de la disminución del crecimiento radical, entonces la conductividad hidráulica foliar específica podría decrecer afectando el crecimiento de la planta. En este sentido Herder (2010) menciona que un sistema radical con un rápido crecimiento de la raíz principal y un incremento en el número de raíces laterales y de pelos radicales es más eficiente para captar agua y nutrientes. Sin embargo, el correcto balance entre la biomasa de la raíz y la proporción de recursos asignados al sistema radical debe ser logrado para no afectar negativamente el crecimiento de la parte aérea. Por otro lado, aún pequeñas modificaciones en el ángulo de la raíces pueden afectar el sistema de la arquitectura radical y así tener enormes efectos sobre la exploración del suelo para la captación de agua y la productividad.

Entre los nutrientes, el nitrógeno es uno de los elementos que más influye sobre el crecimiento (Landis 1989; Wang *et al.* 2015; Razaq *et al.* 2017). Por otro lado, los valores absolutos de los niveles de cada nutriente determinados en el follaje, carecen de importancia si no se analiza la relación proporcional entre los principales elementos. Al respecto, una planta puede estar muy bien provista en los contenidos de nitrógeno pero si el contenido de potasio es bajo, la relación entre ambos elementos no permitirá que la planta exprese todo su potencial en aspectos tales como resistencia al frío, capacidad para producir nuevas raíces y crecimiento inicial (Escobar 2007).

El potasio ha sido sugerido como un importante regulador catiónico de las células vegetales para el mantenimiento del pH del citoplasma y el estroma de cloroplastos (Wu y Berkowitz 1992). La deficiencia en potasio provoca una disminución del pH del estroma, resultando en una caída de la actividad fotosintética (Werdan *et al.* 1975). Por otro lado en Marschner (2012), se

menciona que el potasio puede afectar a la fotosíntesis en varios niveles, por ejemplo a través de su función en la regulación de la apertura y cierre de los estomas, aumentando la resistencia estomática al CO₂ ante deficiencias nutricionales de K. Watanabe *et al.* (2011) sugieren que la deficiencia de otros nutrientes tales como el fósforo y potasio, en relación al uso eficiente del nitrógeno, limitaría la actividad fotosintética bajo elevadas concentraciones de CO₂ atmosférico.

En contraste con los efectos del exceso de nitrógeno, si se proporciona fósforo en exceso, el crecimiento de la raíz con frecuencia se incrementa más que el de la parte aérea, provocando bajas proporciones parte aérea/radical (Salisbury 1994). Por otro lado, si se compara con el desarrollo de la parte aérea, la parte radical es mucho menos afectada bajo condiciones de baja disponibilidad de fósforo, llevando al mismo síntoma de bajas relaciones parte aérea/radical. Esta reducción de la proporción biomasa aérea/radical es debida al incremento de la asignación de carbohidratos hacia las raíces, evidenciado por un fuerte incremento particularmente de la concentración de sacarosa en plantas con deficiencia de fósforo (Marschner 2012). En estudios realizados con deficiencia de fósforo en la herbácea *Stylosanthe hamate*, Smith *et al.* (1990) observaron que el crecimiento aéreo declinaba rápidamente, mientras que el radical no parecía afectarse, no solamente provocado por la reducción del transporte de fósforo a la parte aérea, sino también debido a la translocación neta de fósforo desde la parte aérea hacia las raíces.

Landis (1989) menciona a la fertilización y al manejo del agua en vivero como dos de los factores más influyentes tanto en la tasa como en el tipo de crecimiento en plantines. La viverización en ambientes semi-controlados ofrece amplias oportunidades para manejar este tipo de factores. Este método distingue distintas fases de crecimiento, caracterizadas no sólo por la etapa fenológica por la que transita el plantín sino también por un manejo determinado de distintos factores que tienen incidencia en el desarrollo del cultivo (i.e. disponibilidad de agua y nutrientes entre los principales), buscando objetivos específicos para cada etapa de desarrollo. Las fases de crecimiento que forman parte del ciclo de cultivo son: Establecimiento, cuyo objetivo principal es el desarrollo radical; Crecimiento rápido, donde se busca optimizar

el crecimiento de la parte aérea del plantín y finalmente la etapa de Rustificación, en la cual se trabaja sobre la lignificación de los tejidos, la traslocación de las reservas y el acondicionamiento del plantín para su salida final a plantación en el campo.

Por otro lado, la información disponible y las investigaciones realizadas hasta el momento en relación a las prácticas culturales para obtener plantines vigorosos y aptos para su trasplante en el campo, son muy escasas para *A. chilensis*. La generación de este conocimiento permitirá optimizar protocolos culturales para mejorar la producción de plantines.

A partir de lo mencionado, se plantearon las siguientes hipótesis:

Hipótesis I: *“La mayor tasa de crecimiento del A. chilensis en vivero se relaciona no sólo con la obtención de los niveles óptimos de nitrógeno y potasio, sino también con la relación de disponibilidad de los mismo (N:K) durante la fase de crecimiento rápido.*

Hipotesis II: *“Un mayor desarrollo radical mejora las tasas de crecimiento del A. chilensis en vivero. Por otro lado, la disponibilidad de fósforo y el contenido hídrico del sustrato durante la fase de establecimiento, influencia el crecimiento inicial del sistema radical”.*

Los objetivos planteados en este capítulo son determinar las disponibilidades y relaciones de N:K (durante la fase de crecimiento rápido) y la disponibilidad de P y condiciones hídricas del sustrato (durante la fase de establecimiento) que generan los mayores crecimientos y las mejores características morfofisiológicas en plantines de *A. chilensis*.

Se establecieron dos ensayos:

Ensayo a: Se estudió la incidencia de distintos niveles de concentración de nitrógeno en combinación con dos relaciones de proporción con el potasio durante la etapa de pleno crecimiento en vivero. Se evaluaron (i) el efecto sobre el crecimiento de la porción aérea, la asignación de biomasa, el potencial de crecimiento radical (PCRad) y la tasa de acumulación en hojas de nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio; y (ii) las relaciones nutricionales que generan los mayores crecimientos, las relaciones de biomasa más

balanceadas y los mayores valores de PCRad. Este estudio ha sido publicado recientemente (<http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002018000300375>).

Ensayo b: Se estudió la incidencia de distintos niveles de concentración de fósforo en dos niveles de contenido hídrico del medio de crecimiento, durante la etapa de establecimiento en vivero. Los objetivos específicos fueron (i) evaluar el efecto sobre la asignación de biomasa y la arquitectura hidráulica; y (ii) determinar de qué manera estos patrones afectan las relaciones hídricas y la dinámica de crecimiento de los plantines de *A. chilensis*.

Ensayo a

DISPONIBILIDAD DE NITRÓGENO Y POTASIO DURANTE LA ETAPA DE PLENO CRECIMIENTO

1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1. Material vegetal y ambiente de cultivo

Las semillas para la producción de las plantas utilizadas en este ensayo fueron cosechadas en un rodal de las cercanías de la localidad de Corcovado, Provincia de Chubut ($43^{\circ}32'36,5''$ S – $71^{\circ}29'14,6''$ O – 390 m snm). Se cosecharon los conos directamente de las ramas fructíferas, muestreando 16 árboles de polinización abierta separados por al menos 30 m de distancia, de tal modo de minimizar la probabilidad de muestrear árboles emparentados y asegurar una base genética amplia (Pastorino *et al.* 2013).

Una vez en vivero, se procedió a la mezcla de los conos de los diferentes árboles y su apertura por medio del secado a temperatura ambiente. La semilla se extrajo de los conos por agitación y zarandeo. La limpieza se realizó con tamices específicos para la especie, separando lotes de distinto calibre: menor a 2 mm, entre 2 mm y 3,5 mm, y mayor a 3,5 mm. A cada lote se le efectuó una extracción final de impurezas con la ayuda de una máquina de limpieza de semilla por columna de aire (INRA, Tripette & Renaud).

Para llevar a cabo el ensayo se utilizó el lote de semilla de calibre de 2 a 3,5 mm. Las semillas se pre-trataron remojándolas en agua por 48 horas, con posterior estratificación en arena fina y frío húmedo (3°C – 5°C) por 45 días. Al finalizar el proceso de estratificación, se lavó el lote de semillas con agua en distintos tamices para eliminar el sustrato utilizado. Por último se las dejó orear en paños de media sombra para facilitar el manejo al momento de la siembra.

La siembra se efectuó directamente en los contenedores de cultivo. Se realizó en forma manual, uniformando la profundidad de siembra a 0,5 cm en todas las celdas con la utilización de un hoyador. Para asegurar la totalidad de celdas llenas y evitar de esta manera el repique de plántulas, se determinó la cantidad de semillas a sembrar por contenedor a partir de las reglas

desarrolladas por Tinus y McDonald (1979), usando el valor de poder germinativo (PG) del lote de semillas, lo que determinó una siembra de 6 semillas por celda en este ensayo. Una vez realizada la siembra se cubrió las semillas con la misma mezcla del sustrato de cultivo y se regaron los contenedores a percolación.

En los casos que emergió más de una plántula por contenedor se procedió al raleo por corte con tijera, dejando sólo una plántula por tubete. El raleo se realizó una vez que la plántula presentó los cotiledones totalmente abiertos, tomando como criterio de elección en primer lugar el tamaño y luego la ubicación centrada del ejemplar en el contenedor.

Se utilizaron bandejas de cultivo con 30 cavidades troncocónicas de 160 cm³, de sección circular, con orificios de autopoda radical y nervaduras anti-enrulado (DASSPLASTIC®, modelo 30160). Las bandejas fueron suspendidas en el aire por un sistema de mesadas de alambre para generar las mejores condiciones de aireación entre las bandejas y el suelo, favoreciendo la autopoda radical.

Como sustrato se utilizó una mezcla de perlita y turba en proporción volumétrica de 1:2. La perlita es un producto comercial que se obtiene a partir de un mineral silíceo de origen volcánico, el que se hornea a 760 °C produciéndose pequeños granos esponjosos. Se caracteriza por un bajo peso específico (80 a 130 kg/m³), granulometría entre 1,6 a 3 mm, absorción de entre 3 y 4 veces su peso en agua, pH entre 6 y 8, carencia de CIC sin aportes de nutrientes minerales (Hartmann y Kester 1987). Se utilizó turba rubia de musgo Sphagnum proveniente de canteras de Tierra del Fuego. La turba de Sphagnum clara o rubia tiene una capacidad de retención de humedad de 15 veces su peso seco, una acidez elevada con pH de entre 3,2 y 4,5 y contiene pequeñas cantidades de nitrógeno, fósforo y potasio (Hartmann y Kester 1987). Landis (1990) reporta que estas turbas poseen un elevado volumen de poros internos, del cual una gran proporción (15 a 40 %) es clasificada como porosidad de aireación.

Para lograr un mezclado homogéneo se empleó una mezcladora para cemento con una capacidad de 80 dm³. En ésta se fueron agregando la perlita y la turba alternadamente y se adicionó agua para humectar y mejorar la

adherencia entre los sustratos intervinientes. El llenado de las bandejas con el medio de crecimiento, se realizó utilizando una máquina llenadora por vibración que permitió lograr una compactación uniforme en todas las cavidades, manteniéndose de esta manera similares valores de porosidad en todo el ensayo. Ambos sustratos que forman parte del medio de crecimiento son de alta pureza y esterilidad por lo que se asume que no contienen inóculo o esporas de micorrizas arbusculares (MA) responsables de la micorrización en *A. chilensis* en el medio natural.

Para caracterizar las propiedades del sustrato elaborado, se determinó la porosidad de 30 contenedores adaptando la metodología propuesta por Escobar (2007), mediante el siguiente procedimiento:

Se bloqueó por medio de tapones de volumen conocido, el fondo de los contenedores, y se llenaron con agua los mismos, obteniendo el volumen del sistema contenedor – tapón. Luego, al contenedor con mezcla y fondo tapado se le agregó agua por medio de una probeta y pipeta graduada hasta su afloramiento en la superficie del sustrato (superficie brillante). Con ese volumen de agua aplicada y el volumen total se determinó el porcentaje de porosidad total aplicando la siguiente ecuación:

$$P_t = (V_s / V_t) \times 100 \quad [1]$$

Siendo:

P_t: porosidad total expresada en porcentaje (%).

V_t: volumen total expresado en mililitros (ml).

V_s: volumen de saturación expresado en mililitros (ml).

Seguidamente, al contenedor saturado se le sacó el tapón recogiendo el agua de drenaje en un recipiente (se filtraron las partículas del sustrato arrastradas por el agua). Transcurrida 1 hora, se midió el volumen de agua drenada en una probeta graduada obteniendo la porosidad de aireación con la siguiente ecuación:

$$P_a = (V_d / V_t) \times 100 \quad [2]$$

Siendo:

Pa: porosidad de aireación expresada en porcentaje (%).

Vt: volumen total expresado en mililitros (ml).

Vd: volumen de drenado expresado en mililitros (ml).

La porosidad de retención (Pr) se calculó como la diferencia entre Pt y Pa.

Los valores de porosidad logrados con las proporciones y procedimientos descriptos resultaron muy convenientes (Landis 1990, Escobar 2007), midiéndose los siguientes parámetros: Pt= 57 %; Pa= 25 %; Pr= 32 %.

1.2.2. Condiciones de cultivo

El ensayo se desarrolló en la Unidad de Propagación Vegetal (UPV) del Instituto INBIES de la Universidad Nacional de la Patagonia (UNPSJB) (42° 55' 55,51" S, 71° 21' 50,17" W, 560 m snm), dentro del invernadero de investigación, el cual cuenta con ambiente semi-controlado, de estructura metálica de arco tipo gótico de 6 m de frente por 18 m de largo (108 m²).

Para generar las condiciones ideales de aireación entre celdas y provocar el efecto de la autopoda de raíces, las bandejas de cultivo se colocaron sobre mesadas construidas en caño estructural cuadrado de 2 x 2 cm, y un enrejado de alambre tipo balconero de 25 x 25 mm. La altura de las mesadas es de 50 cm sobre el piso del invernadero.

La refrigeración del invernadero en la época estival se llevó a cabo con un sistema de turbina de nebulización en combinación con la apertura y cierre de las ventanas laterales de la nave. Mediante el manejo de estas dos variables se mantuvo a las temperaturas máximas por debajo de los 30°C, manteniendo este control hasta la finalización del ciclo de cultivo. Según Montero (1999) la refrigeración por evaporación es mucho más efectiva en climas secos, y en combinación con la ventilación, a través de la apertura de las ventanas del invernadero, puede reducirse la temperatura interior hasta cerca de 10 °C por debajo de la exterior.

Para el control de las temperaturas mínimas se utilizó un generador de aire caliente con distribución de aire forzado por mangas de polietileno. El calefactor se controló por medio de un termostato asegurando que las temperaturas no fueran inferiores a los 10 °C. El control de las bajas temperaturas se realizó desde la siembra hasta el término de la fase de crecimiento rápido del protocolo de fertirrigación. Una vez iniciada la fase de rustificación las aberturas laterales del invernadero se programaron para que quedaran abiertas permanentemente.

Durante la fase de establecimiento y crecimiento rápido (descriptas a continuación) se colocó una malla de sombreo aluminizada del 50 % de transmitancia.

1.2.3. Método de cultivo

Se utilizó un método de viverización semi-controlado con manejo de “fertirrigación”, o sea la provisión de fertilizantes a través del agua de riego. Este método distingue distintas fases de crecimiento, caracterizadas no sólo por la etapa fenológica por la que transita el plantín sino también por un manejo determinado de distintos factores que tienen incidencia en el desarrollo del cultivo (i.e. disponibilidad de agua y nutrientes entre los principales), buscando objetivos específicos para cada etapa de desarrollo. Las fases de crecimiento que formaron parte del ciclo de cultivo de este ensayo fueron:

Establecimiento: Trascurrió desde la finalización del raleo hasta el comienzo del crecimiento del epicótilo, por un lapso de 6 semanas, extendiéndose desde el 15 de septiembre hasta el 30 de octubre.

Crecimiento rápido: Abarcó desde el final del establecimiento hasta lograr aproximadamente el 80 % del tamaño de planta buscado, extendiéndose por 8 semanas, abarcando noviembre y diciembre.

Rustificación: Se desarrolló desde el final del crecimiento rápido hasta el detenimiento del crecimiento radical (ausencia de puntas blancas), transcurriendo por aproximadamente 16 semanas, durante los meses de enero, febrero, marzo y abril.

La duración de cada fase de crecimiento fue similar a la utilizada por otros autores en el cultivo de *A. chilensis* bajo este método de viverización (Enricci y Massone 2003, Havrylenko 2005, Taccari 2012). El régimen de fertirrigación estuvo definido por la frecuencia de aplicación, la duración de aplicación y la solución nutritiva aplicada durante cada una de las fases de crecimiento descritas.

La frecuencia de aplicación para cada fase del crecimiento se determinó a partir del contenido de agua aprovechable (AA) del sistema plantín-contenedor (Tabla 1). Para manejar el estado hídrico de los contenedores se utilizó el método de pesadas, que toma en cuenta el mayor peso del agua en relación a otros componentes de los contenedores, por lo que el contenido de humedad del contenedor puede ser determinado mediante el peso de la misma. El peso del contenedor disminuye entre riegos conforme el agua de riego se pierde a través de la evaporación y la transpiración, regando el cultivo nuevamente cuando el peso del contenedor alcanza un nivel determinado (Landis *et al.* 1989). A partir de lo mencionado se definió el peso de AA (PAA) de la siguiente manera:

$$PAA = PCc - PPMI \quad [3]$$

Siendo:

PCc: Peso a capacidad de contenedor. Peso del contenedor que resulta luego de un riego a percolación y una vez que la misma cesa, expresado en gramos (g).

PPMI: Peso en punto de marchitez incipiente (PMI) que es el contenido hídrico del medio de crecimiento una vez que el plantín llega al punto de pérdida de turgor celular, expresado en gramos (g).

Los pesos mencionados en la ecuación 1 se establecieron a través de la siguiente metodología:

Se seleccionaron al azar 12 contenedores con plantas del lote en estudio, se regaron las mismas a percolación, dejándolas por 3 h para asegurar el drenado total del agua gravitacional. Pasadas las 3 hs se tomó el peso de las bandejas, denominando a este valor como peso de capacidad de contenedor (PCc). Para inferir el peso del punto de marchitez incipiente (PPMI), se

construyó una curva de presión-volumen (PV) utilizando el método de transpiración libre mencionado por Fernández y Gyenge (2010). A través de la curva se definió el contenido relativo de agua (CRA) al cual los plantines de *A. chilensis* llegaban a un estado hídrico celular de pérdida de turgencia (TLP), siendo el mismo de 0,82 (expresado como fracción 1). Una vez que se midió el PCc se dejó secar a los contenedores hasta que los plantines llegaron al valor de CRA obtenido en la curva de PV (0,82), y en este punto se tomó el peso de los contenedores, definiendo al mismo como PPMI. El CRA se determinó siguiendo la metodología utilizada por Tambussi *et al.* (2000). Se cortaron segmentos de ramitas de plantines de bandejas gemelas (utilizadas para la determinación del CRA) y se pesaron (Pf). Luego los segmentos fueron colocados dentro de vasos de precipitado en contacto con agua destilada a 4°C en oscuridad durante una noche, pesándolos al día siguiente (Psat), y finalmente se secaron en estufa a 80 °C hasta peso constante definiendo al mismo como peso seco (Ps). Finalmente el CRA fue calculado utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{CRA} = (P_f - P_s) (P_{\text{sat}} - P_s)^{-1} \cdot 100 \quad [4]$$

Tabla 1. Contenidos hídricos en las distintas fases de crecimiento.

	Fases de Crecimiento			
	Siembra y Germinación	Establecimiento	Crecimiento rápido	Rustificación
Contenidos hídricos	90 % del PCc	75 % del PAA	50 % del PAA	40 % del PAA

Los nutrientes necesarios para el desarrollo de los plantines fueron suministrados a través de soluciones nutritivas, conformadas a partir de la combinación de fertilizantes balanceados hidrosolubles y sales binarias hidrosolubles. Estas soluciones fueron ajustadas para cada fase de crecimiento, variando principalmente en sus proporciones de nitrógeno, fósforo y potasio (N:P:K). Tanto en la fase de establecimiento como en la de rustificación se utilizaron soluciones fertilizantes únicas para todos los tratamientos. En la fase de establecimiento se usó una solución nutritiva con una concentración de nitrógeno= 64 mg L⁻¹, fósforo= 152 mg L⁻¹ y potasio= 61

mg L⁻¹. Para llegar a estos valores se diluyó por litro de agua 0,15 g del fertilizante COMPO®HAKAPHOS violeta (13-40-13); 0,4 g de fosfato monoamónico; 0,125 g de fosfato monopotásico y 0,02 ml de ácido fosfórico al 85 %. Para la solución de aplicación utilizada en la fase de rustificación se diluyó en un litro de agua 0,34 g de fertilizante COMPO® HAKAPHOS base (7-12-40); 0,23 g de fosfato monoamónico; 0,1 g de fosfato monopotásico y 0,02 ml de ácido fosfórico al 85 %, alcanzándose una concentración de nitrógeno = 49 mg L⁻¹, de fósforo = 100 mg L⁻¹ y de potasio = 150 mg L⁻¹. En la fase de crecimiento rápido se usaron diferentes soluciones fertilizantes según los tratamientos aplicados.

1.2.4. Tratamientos

Los tratamientos a ensayar consistieron en la variación de las soluciones nutritivas durante la fase de crecimiento rápido. Se estableció un ensayo con ocho soluciones nutritivas, cuatro de ellas tuvieron una relación N:P:K de 3:2:1, diferenciándose por sus dosis crecientes de nitrógeno, siendo estas 50, 100, 150 y 200 mg L⁻¹. En las otras cuatro soluciones, se mantuvieron las mismas dosis crecientes de nitrógeno y se igualó la concentración de potasio a la de nitrógeno, llegándose a una relación N:P:K de 3:2:3. Los distintos tratamientos se generaron a través de la dilución de diferentes sales hidrosolubles en agua (Tabla 2). El agua de riego usada en los ensayos contenía 10 mg L⁻¹ de potasio, 4 mg L⁻¹ de magnesio, 19 mg L⁻¹ de sulfatos y 67 mg L⁻¹ de calcio. El aporte de estos iones fue tomado en cuenta al momento de diseñar las distintas soluciones nutritivas

Tabla 2. Clases y concentraciones de las sales fertilizantes de los ocho tratamientos utilizados en el ensayo.

Tratamiento	Soluciones nutritivas expresadas en gramos de sales fertilizantes hidrosolubles por litro de agua
T1 (3:2:1 – N:50)	0,046 COMPO® HAKAPHOS rojo (18-18-18); *0,02 H ₃ PO ₄ al 85 %; 0,086 NH ₄ H ₂ PO ₄ y 0,29 (NO ₃) ₂ Mg.
T2 (3:2:1 – N:100)	0,15 COMPO® HAKAPHOS rojo (18-18-18); *0,01 H ₃ PO ₄ al 85 %; 0,155 NH ₄ H ₂ PO ₄ ; 0,18 (NO ₃) ₂ Mg y 0,08 Urea.
T3 (3:2:1 – N:150)	0,26 COMPO® HAKAPHOS rojo (18-18-18); *0,01 H ₃ PO ₄ al 85 %; 0,35 NH ₄ H ₂ PO ₄ ; 0,18 (NO ₃) ₂ Mg y 0,1 Urea.
T4 (3:2:1 – N:200)	0,38 COMPO® HAKAPHOS rojo (18-18-18); *0,01 H ₃ PO ₄ al 85 %; 0,46 NH ₄ H ₂ PO ₄ ; 0,33 (NO ₃) ₂ Mg y 0,1 Urea.
T5 (3:2:3 – N:50)	0,265 COMPO® HAKAPHOS rojo (18-18-18); *0,02 H ₃ PO ₄ al 85 %.
T6 (3:2:3 – N:100)	0,55 COMPO® HAKAPHOS rojo (18-18-18); *0,02 H ₃ PO ₄ al 85 % y 0,043 KH ₂ PO ₄ .
T7 (3:2:3 – N:150)	0,83 COMPO® HAKAPHOS rojo (18-18-18); *0,02 H ₃ PO ₄ al 85 %; 0,057 KH ₂ PO ₄ y 0,35 NH ₄ H ₂ PO ₄ .
T8 (3:2:3 – N:200)	1,06 COMPO® HAKAPHOS rojo (18-18-18); *0,02 H ₃ PO ₄ al 85 %; 0,1 KH ₂ PO ₄ y 0,061 NH ₄ H ₂ PO ₄ .

*: mililitros (ml)

1.2.5. Variables analizadas

La respuesta a los distintos tratamientos se midió a través de variables de crecimiento en la parte aérea, potencial de crecimiento radical (PCRad) y contenido de nutrientes en la porción aérea, tomándose estas mediciones sobre plantines con el primer ciclo vegetativo completo (*i.e.* una vez concluida la fase de rustificación).

Se midió la altura del plantín (distancia desde la base del tallo hasta el ápice del eje primario de la planta), y el diámetro del cuello (diámetro del tallo medido a la altura de la superficie del sustrato). Estas variables morfológicas se midieron sobre cinco plantas por bloque elegidas al azar (25 plantas por tratamiento), con un calibre digital, con una precisión de 0,01 mm.

También se determinó la biomasa seleccionando cinco plantas por bloque elegidas al azar (25 plantas por tratamiento). Éstas se lavaron con agua corriente para eliminar restos de sustrato adherido y se secaron cuidadosamente. Posteriormente se seccionaron, separando la parte aérea de la radical, colocándolas en bolsas de papel rotuladas en forma independiente, y se llevaron a estufa a $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta peso constante. Para determinar los pesos se utilizó una balanza digital con una precisión de 0,01 g. La biomasa total se determinó mediante la suma de los pesos de la parte aérea y la radical.

Para caracterizar el estado nutricional de los plantines se midieron los contenidos de nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio en su parte aérea. Los análisis fueron realizados en el Laboratorio de Análisis de Suelos del CRUB Universidad Nacional del Comahue, San Carlos de Bariloche. El nitrógeno total (N_T) se determinó con un analizador de carbono-nitrógeno, combustión a $900\text{ }^{\circ}\text{C}$, Serie Thermo Electron Corporation, NC Soilanalyzer Flash EA 1112. El fósforo total (P_T) se determinó por mineralización de la muestra por digestión seca y cuantificación por colorimetría (método del ácido ascórbico). Para el potasio, calcio y magnesio (K_T , Ca_T y Mg_T) se utilizó el método de mineralización de la muestra por digestión seca y cuantificación por absorción atómica. Las muestras consistieron de un mínimo requerido de 2,5 g de materia seca, obtenidos de treinta plantines por bloque de cada tratamiento.

Por último, se determinó el PCRad, definido como la capacidad de una planta para iniciar y/o elongar sus raíces cuando éstas se mantienen en un medio favorable. Para esto, se utilizó una cámara aeropónica de fabricación propia. La misma está compuesta de una batea de acero inoxidable de 60 cm x 80 cm x 75 cm de alto, con una tapa formada por tablas de madera con burletes de goma en sus cantos que actúan como sistema de sujeción de los plantines, permitiendo que las raíces queden suspendidas en el aire dentro de la batea, y la parte aérea se ubique hacia el exterior de la misma. La cámara posee un sistema de iluminación formado por 3 tubos fluorescentes que generan sobre la porción aérea de las plantas una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD) de $40\text{ }\mu\text{mol s}^{-1}\text{ m}^{-2}$, y dentro de la batea un sistema de aspersión sobre las raíces por micro-difusores. Para el ensayo en la cámara aeropónica se eligieron al azar cinco plantas por bloque (veinticinco plantas por

tratamiento), extrayéndolas del ensayo de invernáculo la primera quincena de agosto, con el crecimiento radical completamente detenido (caracterizado por la desaparición de puntas blancas en las raíces). Se lavaron las raíces con agua corriente para eliminar restos de sustrato y en caso de existir raíces no suberizadas fueron eliminadas. Los plantines se colocaron en la cámara aeropónica por 28 días, humectando los sistemas radicales constantemente con pulsos de agua atomizada de 10 segundos de duración con intervalos de 6 min. La temperatura del agua se mantuvo a 20 °C, y se aplicó un fotoperiodo de 14/10 h de luz/oscuridad (figura 1).



Figura 1. Vista de los distintos tratamientos ubicados en la cámara aeropónica para efectuar el análisis de PCRad.

Una vez terminado el ensayo en la cámara aeropónica se procedió a determinar el potencial de crecimiento radical utilizando la clasificación propuesta por Burdett (1979). Esta se basa en una escala ordinal que toma en cuenta el número total de raíces nuevas y el número de raíces nuevas > 1 cm de largo, categorizando a las plantas en seis clases numeradas del 0 al 5 de la siguiente manera:

Clase 0: no se identifican raíces nuevas

Clase 1: se identifican raíces nuevas pero ninguna > 1 cm

Clase 2: 1 a 3 raíces nuevas > 1 cm

Clase 3: 4 a 10 raíces nuevas > 1 cm

Clase 4: 10 a 30 raíces nuevas > 1 cm

Clase 5: Más de 30 raíces nuevas > 1 cm

1.2.6. Diseño experimental y análisis estadístico

Las plantas se acomodaron en un diseño experimental de bloques completos al azar (DBCA), disponiendo los ocho tratamientos en cinco bloques (figura 2). Cada unidad muestral se conformó por cuatro bandejas de 30 plantas cada una, de modo que todo el ensayo estuvo compuesto por 160 bandejas, o sea 4800 plantines. Las plantas de la periferia de la bandeja no se midieron con el fin de evitar el efecto borde.

Para comprobar el efecto de los tratamientos se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) para cada una de las variables consideradas, excepto PCRad. En los casos en que se encontraron diferencias entre los tratamientos se utilizó el test de LSD Fisher ($\alpha= 0,05$) con corrección de Bonferroni. En el caso del PCRad, por tratarse de una variable ordinal, se utilizó el test no paramétrico de Friedman. El procesamiento de los datos se realizó con el programa estadístico InfoStat/ Profesional, versión 2016.



Figura 2. Vista de los tratamientos ubicados en el invernadero de realización de los ensayos.

1.3. RESULTADOS

La altura media de los plantines al concluir el primer ciclo de crecimiento fue de $58,33 \pm 9,39$ mm. Los plantines sometidos al T5 fueron los más altos, mostrando diferencias significativas ($P = 0,0009$) con respecto a los del T3 y el T4 que presentaron los menores crecimientos (la diferencia entre los mismos fue cercana al 28 %). El diámetro medio de los plantines de todo el ensayo fue de $1,11 \pm 0,14$ mm; el diámetro del T5 fue un 24 % mayor a los alcanzados por los tratamientos que presentaron los menores desarrollos (T2 y T3), diferenciándose significativamente ($P < 0,0001$) con el resto de los tratamientos, a excepción del T6. El comportamiento comparativo de los datos de la biomasa aérea (BSA) (media del ensayo: $0,23 \pm 0,09$ g) fue igual al reflejado por la variable diámetro, siendo T5 el tratamiento de mayor valor, diferenciándose significativamente ($P < 0,0001$) de todos los tratamientos, salvo de T6 (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros morfológicos de los plantines de Ciprés de la Cordillera sometidos a los diferentes tratamientos.

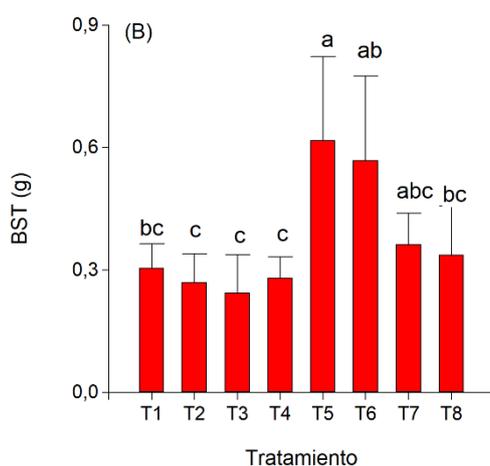
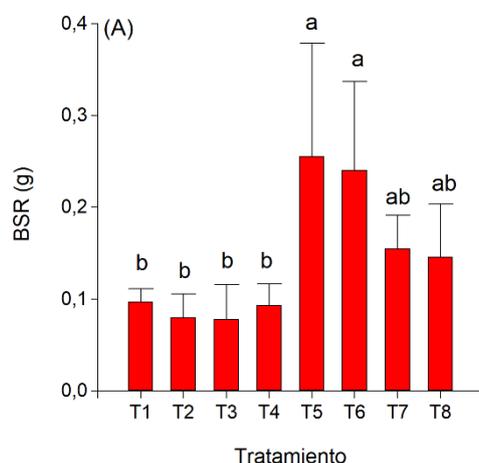
Tratamiento	Valor promedio \pm desviación estándar (n=5)		
	Altura (mm)	Diámetro (mm)	Biomasa aérea (g)
T1 (3:2:1 – N:50)	63,60 \pm 4,68 ab	1,07 \pm 0,09 bc	0,21 \pm 0,04 bc
T2 (3:2:1 – N:100)	55,21 \pm 1,82 ab	0,99 \pm 0,04 c	0,19 \pm 0,05 bc
T3 (3:2:1 – N:150)	50,44 \pm 6,12 b	0,98 \pm 0,08 c	0,17 \pm 0,06 c
T4 (3:2:1 – N:200)	50,05 \pm 3,52 b	1,07 \pm 0,06 bc	0,19 \pm 0,03 bc
T5 (3:2:3 – N:50)	69,39 \pm 12,01 a	1,30 \pm 0,14 a	0,36 \pm 0,09 a
T6 (3:2:3 – N:100)	65,06 \pm 11,54 ab	1,27 \pm 0,15 ab	0,33 \pm 0,11 ab
T7 (3:2:3 – N:150)	58,58 \pm 4,79 ab	1,10 \pm 0,03 bc	0,21 \pm 0,04 bc
T8 (3:2:3 – N:200)	54,37 \pm 6,65 ab	1,09 \pm 0,09 bc	0,19 \pm 0,06 bc

Letras diferentes indican diferencias significativas (Fisher, $P < 0,05$).

En la biomasa radical (BSR) (media del ensayo: $0,14 \pm 0,09$ g) los tratamientos T5 y T6 difirieron significativamente ($P < 0,0001$) con aquellos tratamientos en los cuales no se equiparó la concentración de nitrógeno con la de potasio (relación 3:2:1), siendo T5 el que presentó mayor desarrollo (68 % más que los tratamientos de menor desarrollo) (Figura 3 A). Si bien todos los

tratamientos donde se equiparó la concentración de nitrógeno y potasio (relación 3:2:3) el desarrollo en biomasa total fue mayor, sólo T5 y T6 mostraron diferencias significativas con los tratamientos con relaciones 3:2:1 (Figura 3 B).

Al analizar la relación entre la biomasa aérea y radical (BSA/BSR) se observó que los tratamientos T5 al T8 (relación 3:2:3), tuvieron una tendencia a mostrar asignaciones de biomasa más equilibradas, obteniéndose un valor promedio de 1,41; mientras que en los tratamientos T1 al T4 con relaciones N:P:K de 3:2:1, el valor de relación de biomazas fue en promedio 2,28, evidenciando una mayor asignación de biomasa a la porción aérea en detrimento de la radical (Figura 3 C).



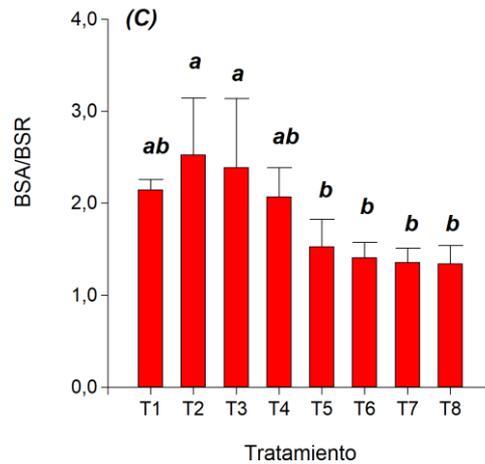


Figura 3. Parámetros morfológicos de los plantines de *Austrocedrus chilensis* sometidos a los distintos tratamientos T1-T8. (A) Biomasa radical (BSR). (B) Biomasa total (BST). (C) Relación biomasa aérea/biomasa radical (BSA/BSR). Los valores seguidos por la misma letra por tratamiento no presentan diferencias significativas (Fisher, $P < 0,05$).

El estado nutricional de las plantas mostró variaciones entre los tratamientos, para algunos de los elementos esenciales analizados. En el caso del nitrógeno los mayores valores de concentración en la porción aérea correspondieron al tratamiento T8, diferenciándose significativamente ($P < 0,0001$) del resto de los tratamientos, a excepción del T7. Los tratamientos T1 y T5 se diferenciaron de los tratamientos T4, T6, T7 y T8 (Figura 4 A). El fósforo no presentó diferencias significativas entre ningún tratamiento, mostrando un valor promedio de $0,28 \pm 0,08$ %. En el caso del potasio el T1 fue el que mostró mayor concentración y se diferenció significativamente ($P < 0,0001$) del resto de los tratamientos, adicionalmente el T7 se diferenció también de T4 y de T6 (Figura 4 B). El calcio no mostró diferencias significativas entre los tratamientos (valor promedio de $0,39 \pm 0,08$ %), en tanto que para el magnesio los tratamientos con relaciones 3:2:1 se diferenciaron significativamente ($P < 0,0001$) con los de relación 3:2:3, mostrando valores medios de $0,21 \pm 0,03$ % y $0,10 \pm 0,02$ % respectivamente.

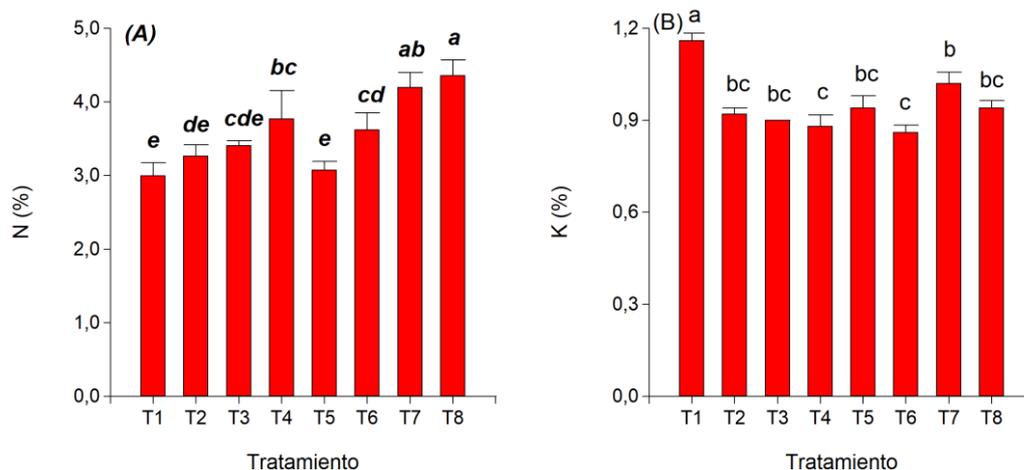


Figura 4. Concentración de nutrientes en la parte aérea de plantines de *Austrocedrus chilensis* sometidos a los distintos tratamientos T1-T8. (A) Concentración de nitrógeno (N) total en porcentaje de materia seca. (B) Concentración de potasio (K) en porcentaje de materia seca. Los valores seguidos por la misma letra por tratamiento no presentan diferencias significativas (Fisher, $P < 0,05$).

Al analizar el PCRad, observamos que ninguna planta alcanzó la clase 5 de potencial de crecimiento radical, y en general los valores observados resultaron bajos. Sin embargo, los tratamientos con relaciones 3:2:3 presentaron mayor crecimiento de raíces nuevas que aquéllos con relaciones 3:2:1, mostrando en general mayor porcentaje de plantines ubicados entre las clases 2, 3 y 4. En los tratamientos donde no se equiparó el nitrógeno con el potasio el mayor porcentaje de plantas se ubicó entre las clases 0 y 1 de PCRad (Tabla 4).

Tabla 4. Participación porcentual de clases de PCRad según la clasificación de Burdett en los tratamientos ensayados.

Clases	Tratamientos							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
0	20	20	20	40	0	0	40	20
1	20	60	40	20	0	0	20	20
2	60	20	20	20	80	60	40	40
3	0	0	20	0	20	20	0	20
4	0	0	0	0	0	20	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0

El tratamiento T6, que produjo los plantines de las clases más altas de PCRad, se diferenció significativamente de los tratamientos con relaciones 3:2:1 ($P = 0,0016$), mientras que el T2 y T4, que produjeron los plantines de clases más bajas de PCRad, se diferenciaron de los tratamientos de relaciones 3:2:3 (Tabla 5).

Tabla 5. Potencial de crecimiento radical (PCRad) de plantines de *Austrocedrus chilensis* sometidos a los distintos tratamientos T1-T8.

Tratamientos	PCRad	
	suma (Ranks)	media (Ranks)
T1	17,5	3,5 abc
T2	12	2,4 ab
T3	19,5	3,9 abcd
T4	12	2,4 a
T5	27	5,4 cde
T6	37	7,4 e
T7	26	5,2 cde
T8	29	5,8 cde

Análisis de la varianza no paramétrico de Friedman. Distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

1.4. DISCUSIÓN

Al analizar los resultados obtenidos en los parámetros morfológicos, observamos que los tratamientos que presentaron descompensaciones entre la biomasa aérea y biomasa radical (3:2:1), evidenciadas por índices de BSA/BSR más elevados, produjeron un menor desarrollo de la biomasa total, mostrando estas dos variables un coeficiente de correlación significativo ($r = -59$, $p = 0,006$) y de relación inversa entre las mismas. Si bien los tratamientos fueron aplicados durante la etapa de crecimiento rápido, en la que las condiciones de disponibilidad de agua y nutrientes no eran limitantes, las variables analizadas fueron determinadas al finalizar la etapa de rustificación, la que se caracteriza por someter al plantín durante tres meses a condiciones ambientales y de manejo adversas, modificando los contenidos hídricos del sustrato, la disponibilidad de nutrientes y las temperaturas. En este escenario, el

desbalance entre la parte de transpiración y de absorción pudo haber afectado el desarrollo de la biomasa total.

A pesar de que en este estudio no se midieron los potenciales hídricos en hoja al mediodía, y tomando en cuenta que los plantines de *A. chilensis* se caracterizan por poseer un fuerte control estomático (Gyenge *et al.* 2007), es probable que la falta de compensación en la relación parte aérea/parte radical en los tratamientos con relaciones 3:2:1, haya provocado una caída en el potencial hídrico foliar, generando una menor conductancia estomática con la subsecuente disminución en la captura de carbono, lo que pudo traducirse en un menor desarrollo de biomasa total. En esta línea, Scholz *et al.* (2014) mencionan que el control estomático observado en *A. chilensis* tiene el costo de reducir la captura de carbono, pero el beneficio de mantener potenciales hídricos relativamente elevados reduciendo la posibilidad de que la planta alcance umbrales de daños por sequía irreversibles. Grosfeld y Barthélémy 2004, demostraron experimentalmente que el crecimiento primario de plantines de *A. chilensis* podría continuar sin interrupciones durante el invierno si se lo proveía de niveles de radiación, luz y agua no limitantes. En base a este trabajo, estos investigadores mencionan que el crecimiento inicial de esta especie puede ser calificado como 'potencialmente continuo' y fuertemente modulado por el ambiente. Por otro lado, Faustino *et al.* (2013) demostraron en ensayos con fertilización de nitrógeno y fósforo realizados sobre plantines puestos a campo de *Pinus taeda* L., que el crecimiento de las plantas fertilizadas con nitrógeno se vió afectado, atribuyendo dicho efecto a cambios en la asignación de biomasa y en algunos rasgos de la arquitectura hidráulica que incidieron en un desbalance hídrico de las plantas afectando su tasa de crecimiento de las mismas.

Si bien los tratamientos 3:2:1 presentaron una relación BSA/BSR mayor que los tratamientos 3:2:3 y esta característica se correlacionó con una menor generación de BST, el mayor crecimiento en biomasa (BST) de los tratamientos 3:2:3 no se correlacionó ($r = -0,32$, $p = 0,167$) con el menor valor de BSA/BSR obtenido. Esto sugiere que el crecimiento en estos tratamientos (3:2:3) pudo haber estado controlado por algún otro mecanismo. En este sentido se observó que a pesar de que los datos del análisis foliar muestran que la concentración

de nitrógeno en hojas aumenta en forma directamente proporcional con la concentración del elemento en la solución nutritiva, esta mayor concentración no se tradujo en un mayor crecimiento de las variables morfológicas evaluadas, mostrando por el contrario, en los tratamientos de relación 3:2:3 un comportamiento inversamente proporcional al mismo. Algunos investigadores consideran que el “consumo de lujo” (aumento de la disponibilidad de un nutriente que no genera aumento en la tasa de crecimiento) no es perjudicial para la planta, sino meramente un desperdicio de fertilizante. Sin embargo, existen evidencias que muestran que elevados contenidos de nutrientes foliares (especialmente de nitrógeno) pueden ser deletéreos (Landis *et al.* 1989). Este comportamiento de *A. chilensis* coincide con lo observado por Ingestad (1979) en experimentos con *Pinus sylvestris* Baumg. y *Picea abies* (L.) H. Karst con 20 a 1200 mg L⁻¹ de nitrógeno. En ambas especies este autor encontró que el crecimiento declinaba cuando las concentraciones foliares estaban entre 2,7 y 3,4 %, recomendando concentraciones de nitrógeno de 20 a 50 mg L⁻¹ para *P. sylvestris* y de 60 a 100 mg L⁻¹ para *P. abies*. Wang *et al.* (2015) mencionan en su trabajo realizado sobre fertilización exponencial con nitrógeno en *Pinus tabuliformis* Carr., que una disminución abrupta de la biomasa del plantín indicaría niveles tóxicos del elemento nutriente. En esta misma línea, Razaq *et al.* (2017) demostraron en *Acer mono* Maxim. que la administración de suplementos de nitrógeno puede aumentar los parámetros de crecimiento hasta cierto punto, teniendo efecto negativo a niveles más elevados. La disminución en biomasa mostrada por los plantines de *A. chilensis* entre los tratamientos de la relación 3:2:3, podría estar indicando un efecto de toxicidad en relación a las concentraciones de nitrógeno.

Si bien el nivel de nitrógeno es el factor más importante para manipular el crecimiento de las plantas (Landis *et al.* 1989), nuestras observaciones muestran que el manejo del potasio tuvo gran influencia en el crecimiento de los plantines de *A. chilensis*, provocando un mayor crecimiento de las plantas que se cultivaron bajo las soluciones donde se equiparó el nitrógeno con el potasio.

Se observó que el aumento del potasio en las soluciones de los tratamientos de relación 3:2:3 aumentó la concentración de nitrógeno en la

parte aérea, acompañando el mayor crecimiento de la misma. Posiblemente este aumento fue provocado por la mayor asimilación de nitrógeno en forma de nitratos, debido a que los cationes potasio producen un efecto sinérgico en la absorción que realiza la planta de dicho anión (Marschner 2012, Johnston y Milford 2012, Coskun *et al.* 2016). De forma contraria, la tasa de captación del magnesio se ve fuertemente deprimida por la acción antagónica de otros cationes como el potasio, amonio, calcio y manganeso (Garcés San Martín 2002). Esto se vio reflejado en nuestro estudio, ya que los tratamientos donde se aumentó el potasio (relación 3:2:3) mostraron una menor concentración foliar de magnesio, a pesar de que en estas soluciones la concentración del mismo fue de dos a tres veces mayor que en las cuatro soluciones nutritivas de los tratamientos con relaciones 3:2:1, presentando contenidos foliares promedios de 0,2 % (relación 3:2:1) y 0,1 % (relación 3:2:3). Como función principal del magnesio se identifican: su rol como átomo central de la molécula de clorofila y su participación en muchos procesos esenciales para el desarrollo normal de la planta, destacándose su función como elemento puente en la agregación de subunidades ribosómicas (proceso necesario para la síntesis proteica), modulador de la actividad de Rubisco en el estroma y promotor de reacciones enzimáticas. La deficiencia de magnesio puede provocar la limitación del suministro de carbohidratos a las raíces deteriorando fuertemente el crecimiento radical e incrementando la relación peso seco vástago-raíz (Marschner 2012). En este estudio, si bien se observa una diferencia significativa en los contenidos foliares entre los tratamientos de proporciones 3:2:1 y 3:2:3, ésta no tuvo incidencia en términos de crecimiento, presentando mayores crecimientos las plantas con menores concentraciones de magnesio, poniendo en evidencia que su concentración no fue limitante para el crecimiento y se mantuvo por debajo de los niveles tóxicos.

Existen escasos trabajos que incluyen el análisis foliar de nutrientes minerales entre las variables a evaluar en la viverización de *A. chilensis*. Por otro lado, para hacer diagnósticos es necesario disponer de estados nutricionales de comparación que relacionen, por ejemplo, nutrición versus calidad y rendimiento. Uno de los pocos trabajos que realizó un análisis del estatus nutricional de plantines de *A. chilensis* cultivados en vivero fue el

realizado por Basil *et al.* (2009), que arrojó concentraciones foliares promedio de 1,19 % de nitrógeno; 0,46 % de fósforo; 1,03 % de potasio; 1 % de calcio y 0,24 % de magnesio en el tratamiento que produjo los mejores resultados. Estos valores difieren de los observados en el presente trabajo, sobre todo en el nitrógeno y el calcio. Estas diferencias podrían deberse al hecho de que en el trabajo de Basil *et al.* (2009) las plantas analizadas eran de tres años de edad y crecieron bajo un régimen de cultivo en el que se utilizó compost como insumo fertilizante, mientras que en el presente trabajo se analizaron plantas más jóvenes cultivadas bajo un método semi-controlado y bajo fertirriego, lo que posiblemente haya aumentado la disponibilidad de dichos elementos esenciales y mejorado las condiciones para su absorción.

Si bien los plantines de *A. chilensis* de los tratamientos con proporciones 3:2:3 mostraron valores de PCRad superiores a los de proporciones 3:2:1, en su conjunto presentaron valores bajos. Venegas Ibañez (2000) en un trabajo realizado en *Eucalyptus globulus* Labill y *Eucalyptus nitens* Maiden, donde evaluaron potencial de crecimiento radical en relación a distintos esquemas de fertilización, obtuvieron resultados opuestos entre estas dos especies. Mientras que *E. globulus* respondió mejor a altas concentraciones foliares de nitrógeno y bajas de potasio, *E. nitens* obtuvo mejores valores de PCRad en las menores concentraciones de nitrógeno y mayores de potasio, mostrando esta última especie un comportamiento similar al expresado por *A. chilensis* en el presente trabajo. Por otro lado, Donald (1988) encontró en ensayos realizados con plantines de *Pinus radiata* D. Don que el aumento de nitrógeno fomentaba la formación de nuevas raíces, mientras que el aumento del potasio lo disminuía. Los estudios mencionados ponen en evidencia que las respuestas del PCRad en relación a esquemas de fertilización parecen ser especie-específicas. Por último, Ritchie y Tanaka (1990) señalan que el PCRad parece estar regulado por factores fisiológicos internos como la intensidad de la dormancia aérea y la presión sobre las reservas de carbono en el desarrollo aéreo, señalando como puntos de máximo valor del mismo cuando la dormancia es débil y la parte aérea no se está expandiendo. En nuestro trabajo el PCRad fue medido en el mes de agosto, y consecuentemente es posible que los plantines de *A. chilensis* se encontraran en un estado de dormancia avanzada, lo que

explicaría los bajos valores generales de este parámetro. Sería necesario realizar el análisis de esta variable en las distintas etapas fenológicas del cultivo para poder determinar su secuencia cíclica y de esta manera fijar las etapas del cultivo más propicias para su medición transformándolo en un indicador de calidad confiable para la especie estudiada.

En resumen, las evidencias presentadas en este trabajo demuestran que el crecimiento de los plantines de *A. chilensis* durante la viverización es influenciado por la relación nitrógeno:potasio del esquema de fertilización, durante la etapa de pleno crecimiento. Para la misma proporción de nitrógeno y potasio, concentraciones mayores de 50 mg L⁻¹ de nitrógeno producen una inhibición del crecimiento. Las relaciones donde se equiparó el nitrógeno con el potasio mostraron una asignación de biomasa más equilibrada entre las porciones aérea y radical de la planta, y un mayor crecimiento con respecto a las relaciones donde no se equipararon estos elementos. Por otro lado, iguales proporciones de nitrógeno:potasio y bajas concentraciones de nitrógeno mejoraron el comportamiento del potencial de crecimiento radical. Este estudio pone en evidencia que concentraciones de nitrógeno del orden de los 50 a 100 mg L⁻¹ en proporciones equilibradas con el potasio, aplicados durante la etapa de pleno crecimiento, generan no sólo un mayor crecimiento de los plantines en vivero, sino que también mejoran atributos morfológicos e indicadores de calidad usados para predecir el desempeño a campo (e.g. relación BSA/BSR, PCRrad). Los resultados obtenidos en el presente ensayo ponen en evidencia la necesidad de incluir en futuros estudios el análisis de parámetros de la arquitectura hidráulica para analizar con mayor detalle la dinámica de crecimiento y su relación con el contenido foliar de nutrientes.

Ensayo b

DISPONIBILIDAD DE FÓSFORO Y AGUA DURANTE LA ETAPA DE ESTABLECIMIENTO

1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología utilizada en este ensayo fue similar a la empleada en el Ensayo a, de manera que, en las siguientes descripciones sólo se detallan las diferencias con respecto al mismo.

1.2.1 Material vegetal y ambiente de cultivo

Estos experimentos se llevaron a cabo con plantines de *A. chilensis* generadas a partir de semillas de un rodal natural ubicado en la cabecera sur del Lago Futalaufquen (42°54'31,6" S – 71°36'41,8" W – 570 m snm), Parque Nacional Los Alerces, Provincia del Chubut. Se cosecharon los conos directamente de las ramas fructíferas, muestreando 16 árboles de polinización abierta separados por al menos 30 m de distancia entre sí, de tal modo de minimizar la probabilidad de muestrear árboles emparentados y asegurar una base genética amplia. La cosecha se llevó a cabo en el momento de madurez de los conos. Para la siembra se utilizó semilla de la fracción de 2 a 3,5 mm de calibre, con una pureza de 81 %. Siguiendo las normas ISTA (2009), a través de la pesada de ocho muestras de 100 semillas limpias se determinó un peso de 1000 de $2,92 \pm 0,036$ g con un CV de 12,3 %.

Para la producción de las plantas (también conducida en el vivero de la UPV - INBIES – UNPSJB) se utilizaron tubetes individuales de 250 ml (140 mm de altura y 65 mm de diámetro superior del alvéolo), de sección tronco cónica, con 8 nervaduras interiores y 4 ventanas laterales en el extremo inferior para inducir la autopoda radical (DASSPLASTIC®, modelo R250). Los tubetes se ubicaron en bandejas porta-tubetes con capacidad para 56 unidades. Con la utilización de esta bandeja se obtiene una densidad de cultivo de 207 plantas por m².

En este ensayo b, el cultivo pasó por dos ciclos de crecimiento en vivero, separados por la etapa de dormancia, la cual transcurre desde el detenimiento del desarrollo radical hasta su reactivación, abarcando los meses invernales. Las fases de crecimiento se repitieron en el segundo ciclo de viverización con la misma duración que en el primer ciclo.

1.2.2. Manejo de agua y fertirriego.

Luego de la siembra se realizaron riegos frecuentes para mantener el contenido de humedad del sustrato lo más cercano posible a capacidad de contenedor en los primeros centímetros del mismo. Una vez producida la germinación la frecuencia de riego se estableció utilizando el método de las pesadas, usando en la fase de establecimiento como indicador para efectuar el riego el 20 % o el 80 % (según tratamiento), en pleno crecimiento el 50 % y en rustificación el 40 % del agua aprovechable (AA).

El riego se aplicó en forma manual mediante la utilización de un kit de riego formado por una bomba periférica y un aplicador en forma de roseta. Tanto en la fase de crecimiento rápido como en la de rustificación se utilizaron soluciones fertilizantes únicas para todos los tratamientos del ensayo. En la fase de crecimiento rápido se usó una solución nutritiva con una concentración de nitrógeno= 48 mg L⁻¹, fósforo= 34 mg L⁻¹ y potasio= 50 mg L⁻¹. Para llegar a estos valores se diluyó por litro de agua 0,265 g del fertilizante COMPO® HAKAPHOS rojo (18-18-18) y 0,02 ml de ácido fosfórico al 85 %. Para la solución de aplicación utilizada en la fase de rustificación se diluyó en un litro de agua 0,34 g de fertilizante COMPO® HAKAPHOS base (7-12-40); 0,23 g de fosfato monoamónico; 0,1 g de fosfato monopotásico y 0,02 ml de ácido fosfórico al 85 %, alcanzándose una concentración de nitrógeno = 49 mg L⁻¹, de fósforo = 100 mg L⁻¹ y de potasio = 150 mg L⁻¹. En la fase de establecimiento se usaron diferentes soluciones fertilizantes según los tratamientos aplicados.

1.2.3. Tratamientos

Los tratamientos consistieron en la combinación de distintos niveles de los dos factores estudiados, fósforo y agua, durante su aplicación en la fase de establecimiento. Se aplicaron tres niveles del factor concentración de fósforo (1, 10 y 100 mg L⁻¹) y dos niveles de contenido hídrico del medio de crecimiento (20 % y 80 % de la AA). De la combinación de los niveles de los factores se generaron seis tratamientos, los que se identificaron de la siguiente manera: T 20-1, T 20-10, T 20-100, T 80-1, T 80-10 y T 80-100. Para generar los tres niveles de concentración de fósforo, se diseñaron distintas soluciones nutritivas teniendo en cuenta los 10 mg L⁻¹ de potasio, 4 mg L⁻¹ de magnesio, 19 mg L⁻¹ de sulfatos y 67 mg L⁻¹ de calcio aportados por el agua de riego usada en el ensayo (Tabla 6), en tanto que los estados hídricos se determinaron mediante el método de las pesadas.

Tabla 6. Concentraciones de las sales fertilizantes utilizadas en las tres soluciones nutricionales de los distintos niveles de fósforo (P).

Nivel de concentración de P	Soluciones nutritivas expresadas en gramos de sales fertilizantes hidrosolubles por litro de agua
1 mg L ⁻¹	0,02 COMPO® HAKAPHOS violeta (7-12-40); 0,065 NO ₃ K; 0,19 (NO ₃) ₂ Mg.
10 mg L ⁻¹	0,02 COMPO® HAKAPHOS violeta (7-12-40); 0,065 NO ₃ K; 0,19 (NO ₃) ₂ Mg.; *0,02 H ₃ PO ₄ al 85 %.
100 mg L ⁻¹	0,26 KH ₂ PO ₄ ; 0,3 NH ₄ H ₂ PO ₄ ; *0,02 H ₃ PO ₄ al 85 %.

*: mililitros (ml)

1.2.4. Variables analizadas

1.2.4.1. Biomasa

Los plantines utilizados para la determinación de la biomasa se lavaron para eliminar restos de sustrato adherido y se secaron cuidadosamente. Posteriormente se seccionaron, separando la parte aérea de la radical, colocándolas en bolsas de papel rotuladas en forma independiente, y se

llevaron a estufa a $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta peso constante. Para determinar los pesos se utilizó una balanza digital con una precisión de 0,01 g. La biomasa total (BST) se determinó mediante la suma de los pesos de la parte aérea y la radical. También se calculó la razón entre la biomasa aérea y la radical (BSA/BSR).

Se muestrearon ocho plantas por tratamiento elegidas al azar. Las mediciones se realizaron al finalizar el segundo ciclo de crecimiento, una vez que el cultivo entró en el periodo de dormancia a partir de mediados del mes de mayo.

1.2.4.2. Conductividad radical

La conductividad radical (L_p) se determinó siguiendo la metodología usada por Kamaluddin y Zwiazek (2001), en la que se utiliza el método de presión hidrostática. Se descalzaron de los contenedores los plantines seleccionados para la medición, para luego seccionarlos en dos porciones: la inferior comprendiendo el sistema radical y el tallo hasta la inserción de la primera rama, y la superior con la mayor parte de la biomasa aérea. El sistema radical escindido se sumergió íntegramente en un recipiente que contenía solución Hoagland modificada (Taiz-Zeiger, 1998) diluida al 50 % con agua, colocando al mismo dentro del receptáculo de una cámara de presión tipo Scholander y dejando la parte de tallo seccionada fuera de la cámara, asomando a través del tapón de seguridad de la misma. Luego de asegurar el dispositivo se sometió a las raíces a presiones ascendentes de 0,1; 0,2; 0,3 y 0,4 MPa, calculando a la conductancia radical (K_r) como la pendiente de la regresión lineal entre el flujo de agua erogado y la presión de estabilización del flujo aplicada para cada presión, expresada en $\text{kg MPa}^{-1} \text{ s}^{-1}$. El flujo erogado para cada presión aplicada fue determinado colectándolo con un hisopo de algodón sobre el corte del tallo y pesando el mismo con 0,001 g de precisión cada 5 minutos hasta la estabilización de los pesos.

Para determinar la L_p cada sistema radical fue sumergido en agua dentro de una probeta de 0,1 ml de precisión, calculando su volumen por la cantidad de agua desplazada, quedando la L_p expresada como:

$$L_p = K_r / V_r$$

[5]

Siendo:

L_p : conductividad radical ($\text{Kg MPa}^{-1} \text{s}^{-1} \text{ml}^{-1}$).

K_r : conductancia radical ($\text{Kg MPa}^{-1} \text{s}^{-1}$).

V_r : Volumen del sistema radical expresado en mililitros (ml).

Las determinaciones de L_p se efectuaron sobre siete plantines por tratamiento elegidos al azar, durante la finalización del segundo ciclo de crecimiento, en la segunda quincena de febrero y la primera del mes de marzo. Se optó por este periodo con el propósito de realizar las mediciones sobre sistemas radicales activos.

1.2.4.3. Conductividad máxima del tallo

Para medir la conductividad máxima del tallo ($K_{\text{tmáx}}$) se utilizó una modificación del método mencionado por Fernández y Gyenge (2010). Se usaron secciones de tallo comprendidas entre el inicio del sistema radical y el inicio de las ramificaciones de la parte aérea. Los tallos se perfusionaron con un flujo presurizado a 0,2 MPa, para quitar los posibles embolismos presentes. Para ello se utilizó una cámara tipo Scholander a la que se le colocó un recipiente con agua con safranina al 5 %. El agua utilizada fue destilada y desgasificada haciéndola hervir por 30 min, verificando que no se produjeran burbujas nuevamente al ser sometida a la presión mencionada. Una vez realizados los cortes, se le extrajo la corteza al segmento de tallo donde se lo unía a la manguera de látex para conectarlo con el dispositivo de medición, a través de un capilar plástico que conectaba el recipiente con agua en la cámara con la manguera. Tanto los cortes como la conexión del tallo a la manguera se efectuaron bajo agua con el dispositivo purgado y libre de burbujas. Se tiñó el agua con safranina para observar con mayor facilidad la formación de burbujas en el sistema y teñir la sección del área del xilema conductor, para facilitar su posterior determinación. Una vez verificada la ausencia de burbujas, se aplicó presión al sistema provocando la salida de agua a través del extremo del tallo. El agua erogada por el extremo del tallo se colectó con un hisopo de algodón y

luego se pesó con una precisión de 0,001 g cada 1 ó 2 min según la cantidad de agua erogada. Se realizaron mediciones hasta observar la estabilización de los pesos. Para calcular la conductividad hidráulica específica máxima del tallo, se utilizó la siguiente ecuación:

$$K_{\text{máx}} = Q \cdot l / A_x \cdot \Delta P \quad [6]$$

Siendo:

$K_{\text{máx}}$: conductividad hidráulica específica máxima del tallo ($\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$)

Q: flujo de agua que pasa a través del segmento de tallo (kg).

l: longitud del segmento de tallo (m).

A_x : área del xilema activo (m^2).

ΔP : diferencia de potencial entre los extremos del segmento (MPa).

Esta variable se determinó sobre siete plantas por tratamiento al término del segundo ciclo de cultivo.

1.2.4.4. Conductancia de la planta

Para determinar la conductancia de la planta se calculó la relación entre la tasa de transpiración (E) y el diferencial entre el potencial hídrico del suelo y el de la hoja (Figura 5a, b, c y d). Para ello se regaron a percolación los contenedores con los plantines a evaluar, y se los llevó a un habitáculo a total oscuridad por 12 hs. con la parte aérea tapada con una bolsa de nylon. Al día siguiente, inmediatamente después de sacarlos de la cámara oscura se le midió el potencial hídrico a una ramita de cada plantín y se estableció al mismo como el potencial hídrico del suelo. Luego se colocaron los contenedores con la superficie de sustrato expuesta cubierta con papel aluminio, en una mesada de luz con una irradiancia de $230 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ a una temperatura ambiente de aproximadamente $20 \text{ }^\circ\text{C}$ sobre una balanza hasta que la tasa de transpiración, medida a partir del cambio de peso del sistema, se estabilizó. En ese momento se midió nuevamente el potencial sobre otra ramita de la copa, tomando a éste como el potencial de la hoja. El total del follaje de los plantines fue escaneado y

se utilizó el programa ImageJ para estimar el área foliar y así calcular la conductancia estandarizada de la planta, a través de la siguiente ecuación:

$$K_{pl} = E / \Delta\Psi \cdot AF \quad [7]$$

Siendo:

K_{pl} : conductancia planta estandarizada ($\text{kg s}^{-1}\text{m}^{-2}\text{MPa}^{-1}$).

E: tasa de transpiración expresada como volumen de agua por unidad de tiempo (kg s^{-1})

$\Delta\Psi$: diferencia de potencial entre el suelo y las hojas (MPa).

AF: área foliar de la planta (m^2).

Para realizar las mediciones de esta variable se necesitó que los plantines estuvieran en plena actividad, por lo que las mediciones se efectuaron en el segundo ciclo de crecimiento, durante la segunda quincena de enero y primera de febrero, sobre siete plantines por tratamiento.

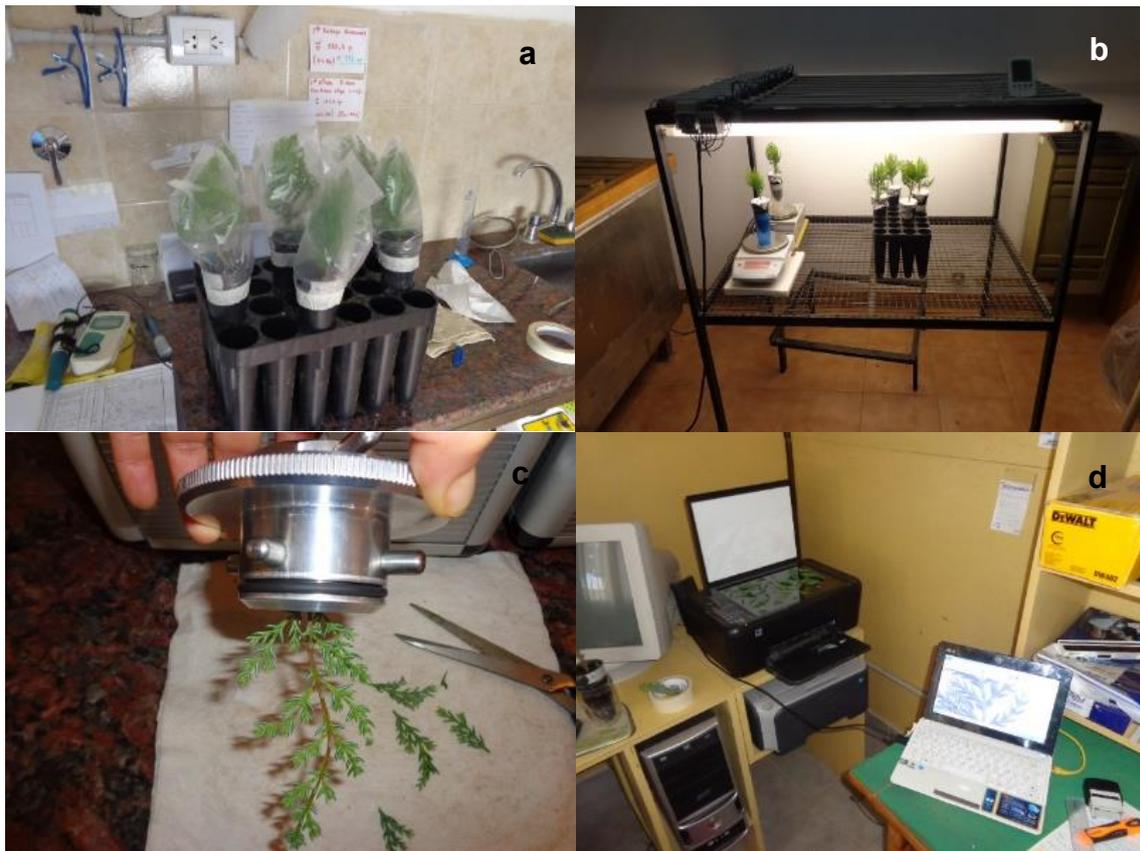


Figura 5. Vista del proceso de medición de la conductancia de la planta. a) acondicionamiento de los plantines para estabilizar el Ψ_h ; b) plantines puestos a transpirar en la mesa de luz; c) acondicionamiento de una ramita para efectuarle la medición de Ψ_h en la bomba de presión; d) digitalización del follaje del plantín para la determinación del área foliar.

1.2.4.5. Potencial hídrico foliar pre-alba (Ψ_{hpr}) y mediodía (Ψ_{hm})

A las plantas seleccionadas para realizarles las mediciones de L_p , se las utilizó en forma previa para determinar el Ψ_{hpr} y Ψ_{hm} . Los potenciales hídricos (Ψ_h) se determinaron utilizando una bomba de presión “tipo Scholander” (MCR, mod. ARIMAD 3000) en la que se colocó una ramita de la copa del plantín dentro de la cámara de la bomba, dejando la parte del corte hacia el exterior asegurándola con el O-ring de la tapa de la cámara. Una vez asegurado el dispositivo se aplicó presión creciente dentro de la cámara hasta observar la aparición de agua por el xilema del corte, registrando este valor de presión en MPa. Para la determinación del Ψ_{hpr} se regaron los plantines hasta percolación, luego se les cubrió todo el follaje con una bolsa de nylon y se los colocó en un habitáculo a oscuridad durante toda la noche, efectuando la evaluación del Ψ_{hpr} al día siguiente a las 8:00 am. Una vez efectuadas las mediciones de Ψ_{hpr} se sacaron las plantas al invernadero y se les volvió a tomar el Ψ_h a las 12:30 pm, identificando a estos valores como Ψ_{hm} . Las mediciones se realizaron durante la segunda quincena de febrero del segundo ciclo de cultivo.

1.2.5. Diseño experimental y análisis estadístico

Los 6 tratamientos resultantes del arreglo factorial de los niveles de los factores analizados, se pusieron a prueba con un dispositivo experimental con un diseño completamente aleatorizado (DCA) con 8 réplicas. Cada unidad muestral se conformó por 24 tubetes (Figura 6).



Figura 6. Vista del ensayo ubicado en las mesadas del invernadero, durante el segundo ciclo de crecimiento.

Para comprobar el efecto de los tratamientos se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) para cada una de las variables consideradas. En los casos en que se encontraron diferencias entre los tratamientos se utilizó el test de LSD Fisher ($\alpha= 0,05$) con corrección de Bonferroni. El procesamiento de los datos se realizó con el programa estadístico InfoStat/ Profesional, versión 2016.

1.3. RESULTADOS

La interacción de los factores no fue significativa ($P> 0,05$) para ninguna de las variables analizadas, o sea que los factores actuaron en forma independiente.

La biomasa aérea (BSA) presentó diferencias en los dos factores (Figura 7 A y B). Para la concentración de fósforo, la de 100 ppm fue la que presentó el

mayor crecimiento ($4,53 \text{ g} \pm 1,45$), diferenciándose de la de 10 ppm, que fue la de menor crecimiento ($3,46 \text{ g} \pm 0,85$) ($P= 0,047$). Mientras que para los contenidos hídricos, el de mayor desarrollo fue el de 80 % con una biomasa media de $4,52 \text{ g} \pm 1,32$, en tanto que el contenido de humedad del 20 % mostró una biomasa de $3,43 \text{ g} \pm 1,21$, siendo esta diferencia significativa ($P= 0,03$).

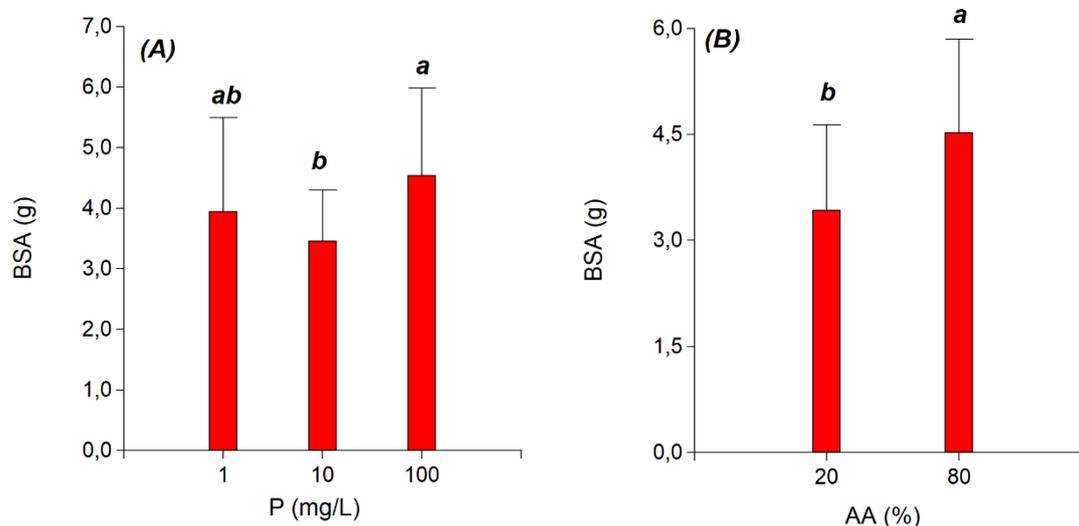


Figura 7. Generación de biomasa aérea (BSA) de plantines de *Austrocedrus chilensis*. (A) En relación a los tres niveles de concentración de fósforo ensayados. (B) En relación a los dos niveles de contenido hídrico. Los valores seguidos por la misma letra por tratamiento no presentan diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

Para el caso de la biomasa radical (BSR), el factor concentración de fósforo no presentó diferencias significativas. En cambio, los contenidos de humedad sí tuvieron un efecto diferencial ($P=0,014$), desarrollándose más la biomasa radical del nivel de humedad del 80 % ($2,48 \text{ g} \pm 0,82$) que del 20 % ($1,93 \text{ g} \pm 0,70$) (Figura 8 A y B).

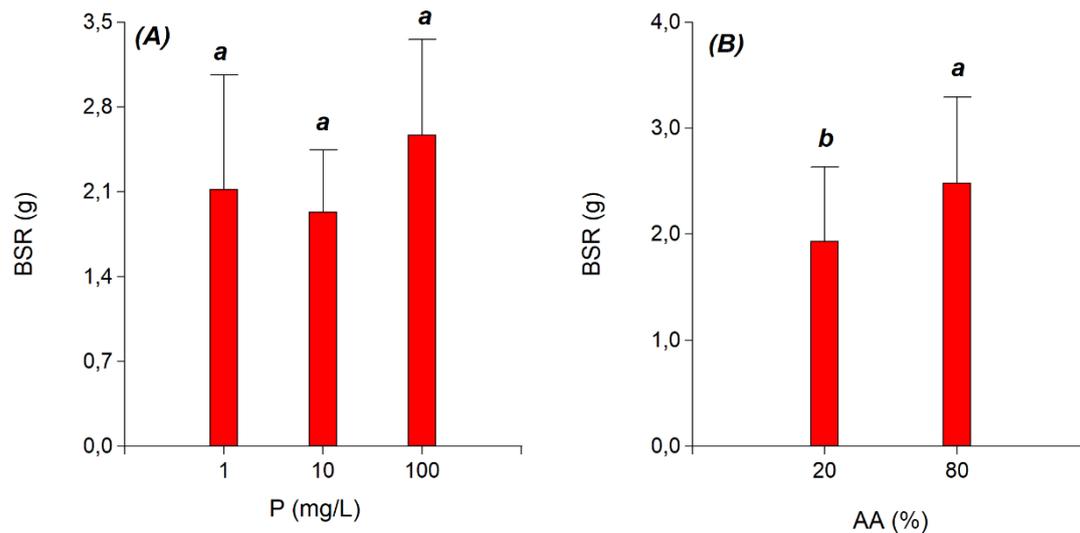


Figura 8. Generación de biomasa radical (BSR) de plantines de *Austrocedrus chilensis*. (A) En relación a los tres niveles de concentración de fósforo ensayados. (B) En relación a los dos niveles de contenido hídrico. Los valores seguidos por la misma letra por tratamiento no presentan diferencias significativas ($\alpha= 0,05$).

La biomasa total (BST) presentó valores promedios de 6,18 g \pm 2,13. Ambos factores tuvieron efectos significativos (Figura 9 A y B). El factor concentración de fósforo mostró diferencias ($P= 0,044$) entre la concentración de 100 ppm con valores de 7,1 g \pm 2,20 y la de 10 ppm con valores de 5,39 g \pm 1,28. El factor contenido hídrico también tuvo efectos diferenciales entre los niveles estudiados ($P= 0,004$), mostrando los mayores desarrollos (7,00 g \pm 2,08) el factor de 80 % de AA, mientras que el factor de 20 % de AA presentó valores de 5,36 g \pm 1,87.

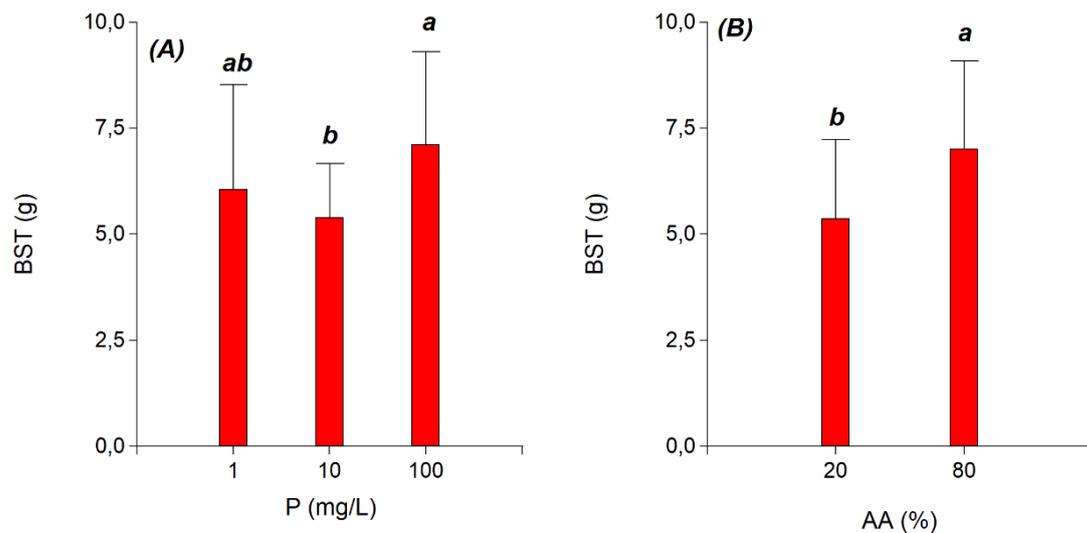


Figura 9. Generación de biomasa total (BST) de plantines de *Austrocedrus chilensis*. (A) En relación a los tres niveles de concentración de fósforo ensayados. (B) En relación a los dos niveles de contenido hídrico. Los valores seguidos por la misma letra por tratamiento no presentan diferencias significativas ($\alpha= 0,05$).

La asignación de biomasa (BSA/BSR) no presentó diferencias para ninguno de los factores analizados (Figura 10 A y B), expresando un valor promedio general de $1,83 \pm 0,25$.

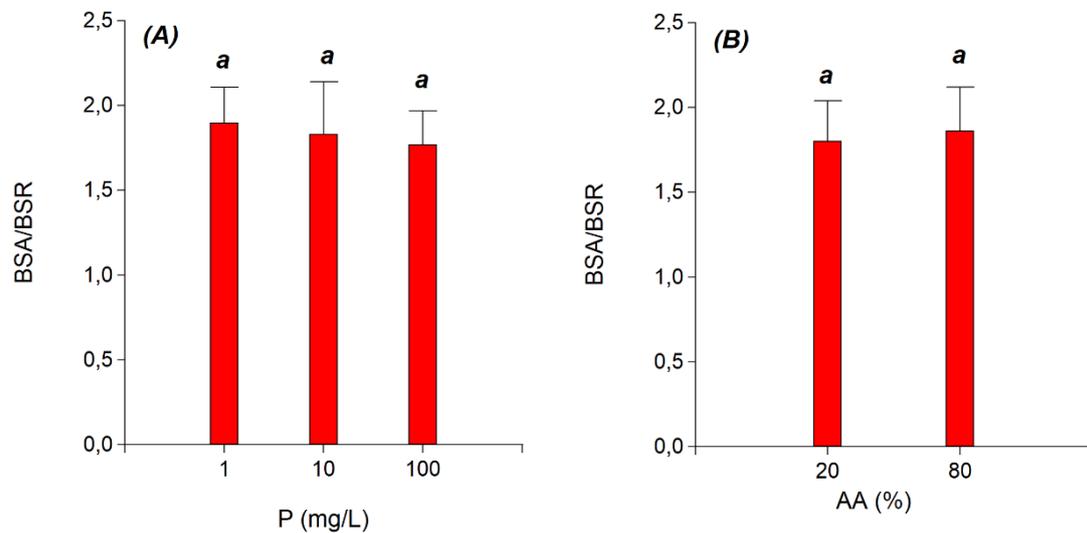


Figura 10. Respuesta a la asignación de biomasa (BSA/BSR) de plantines de *Austrocedrus chilensis*. (A) En relación a los tres niveles de concentración de fósforo ensayados. (B) En relación a los dos niveles de contenido hídrico. Los valores seguidos por la misma letra por tratamiento no presentan diferencias significativas ($\alpha= 0,05$).

No se encontraron diferencias significativas para la conductividad radical, ni en la conductividad específica del tallo o la conductancia total de la planta, para ninguno de los niveles de los dos factores estudiados (Tabla 7 A, B y C), mostrando valores promedios de $2,80 \pm 1,26$ ($\text{kg.MPa}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{cm}^{-3} \times 1,00 \text{ E}^{+08}$), $11,12 \pm 5,94$ ($\text{kg.Mpa}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{m}^{-2} \times 1,00 \text{ E}^{+04}$) y $7,81 \pm 3,18$ ($\text{kg.Mpa}^{-1}.\text{s}^{-1} \times 1,00 \text{ E}^{+05}$) para estas 3 variables respectivamente.

Tabla 7. Variables hidráulicas de plantines de *Austrocedrus chilensis* sometidos a diferentes niveles de concentraciones de fósforo (P) y contenidos de agua aprovechable (AA). (A) Conductividad radical (Lp) ($\text{kg.MPa}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{cm}^{-3} \times 1,00 \text{ E}^{+08}$). (B) Conductividad hidráulica específica máxima de tallo ($K_{\text{hmáx}}$) ($\text{kg.MPa}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{m}^{-2} \times 1,00 \text{ E}^{+04}$). (C) Conductancia total del plantín (K_{pl}) ($\text{Kg.Mpa}^{-1}.\text{s}^{-1} \times 1,00 \text{ E}^{+05}$). Los valores seguidos por la misma letra por nivel del factor no presentan diferencias significativas ($\alpha = 0,05$).

(A)

Lp			
Factor	Nivel	n	Promedio
P (ppm)	1	16	2,68 \pm 1,10 a
	10	16	2,58 \pm 0,68 a
	100	16	3,15 \pm 1,76 a
AA (%)	20	24	2,79 \pm 1,35 a
	80	24	2,82 \pm 1,18 a

(B)

$K_{\text{hmáx}}$			
Factor	Nivel	n	Promedio
P (ppm)	1	16	9,75 \pm 6,29 a
	10	16	11,53 \pm 6,20 a
	100	16	12,10 \pm 5,47 a
AA (%)	20	24	12,65 \pm 7,42 a
	80	24	9,59 \pm 3,51 a

(C)

K_{pl}			
Factor	Nivel	n	Promedio
P (ppm)	1	16	7,92 \pm 4,72 a
	10	16	8,17 \pm 3,94 a
	100	16	8,29 \pm 2,30 a
AA (%)	20	24	8,83 \pm 4,33 a
	80	24	7,42 \pm 2,88 a

Los valores de potencial hídrico pre-alba no presentaron diferencias significativas para ninguno de los factores evaluados, exhibiendo un valor medio de $-0,36 \pm 0,11$ Mpa. Mientras que los potenciales hídricos al mediodía mostraron diferencias para los factores estudiados (Figura 11 A y B). El factor concentración de fósforo tuvo un efecto diferencial ($P= 0,005$) entre la concentración de 1 ppm con un Ψ_{hm} de $-1,34 \pm 0,17$ MPa y la de 100 ppm con un Ψ_{hm} de $-1,06 \pm 0,33$ MPa. Con respecto al factor contenido hídrico ($P= 0,030$), el nivel con sustrato más húmedo (80 %) presentó un Ψ_{hm} de $-1,12 \pm 0,23$ MPa, mientras que el sustrato menos húmedo (20 %) mostró un valor de Ψ_{hm} de $-1,29 \pm 0,26$ MPa.

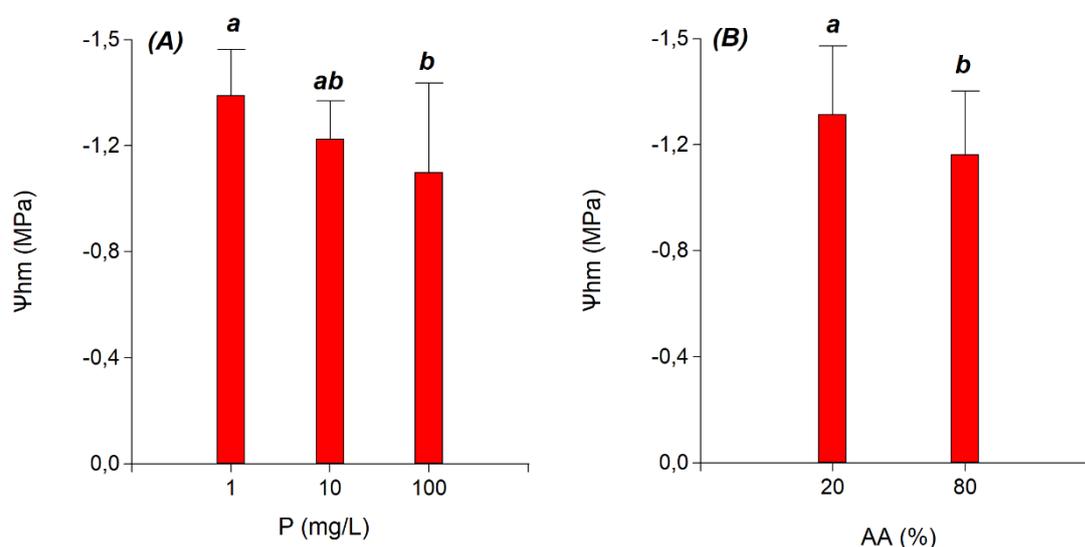


Figura 11. Comportamiento del potencial hídrico al mediodía (Ψ_{hm}) de plantines de *Austrocedrus chilensis*. (A) En relación a los tres niveles de concentración de fósforo ensayados. (B) En relación a los dos niveles de contenido hídrico. Los valores seguidos por la misma letra por tratamiento no presentan diferencias significativas ($\alpha= 0,05$).

1.4. DISCUSIÓN

Al analizar los resultados obtenidos puede observarse que mientras para las tres variables de la arquitectura hidráulica (L_p , $k_{tm\acute{a}x}$ y K_{pl}) evaluadas no se observaron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos, el Ψ_{hm} sí mostró variaciones. El Ψ_{hm} foliar puede modificarse en respuesta a cambios en el ambiente de corto plazo. Ellos pueden ser provocados por sucesos acotados en el tiempo de estrés hídrico, bajas temperaturas y salinidad. Algunas plantas tienen la habilidad de ajustar rasgos fisiológicos como el

potencial osmótico y la elasticidad de los tejidos en respuesta a cambios diarios o estacionales en la disponibilidad de agua. Estos mecanismos les permiten a las especies mantener los gradientes de potenciales hídricos entre el suelo y las hojas necesarios para conservar la integridad de los tejidos foliares (Bowman y Roberts 1985a; Dawson y Bliss 1989). También el Ψ_{hm} puede modificarse a partir de cambios en las relaciones hídricas de las plantas generados por modificaciones en los rasgos estructurales, que restringen el abastecimiento de agua a las hojas (*e.g.* asignación de biomasa, densidad del xilema conductor) y que pueden ser generados por procesos de aclimatación de más largo plazo.

En relación a lo mencionado, Gyenge *et. al.* (2005) observaron que el Ciprés de la Cordillera no posee la capacidad de efectuar procesos de ajuste osmótico o elástico ante eventos de sequia. Por otro lado, al momento de medir el Ψ_{hm} , el contenido hídrico de los contenedores era uniforme en todos los tratamientos y cercano a su capacidad de contenedor (C_c). Los tratamientos sólo fueron aplicados durante la etapa de establecimiento de los dos ciclos de cultivo, respetándose para las fases de crecimiento rápido y rustificación las mismas condiciones hídricas, de temperatura y salinidad utilizadas para todo el ensayo (Figura 12). Por lo expresado, la diferencia mostrada por el Ψ_{hm} entre los factores analizados no podría atribuirse a un proceso de ajuste osmótico en respuesta a sucesos de estrés de corto plazo.

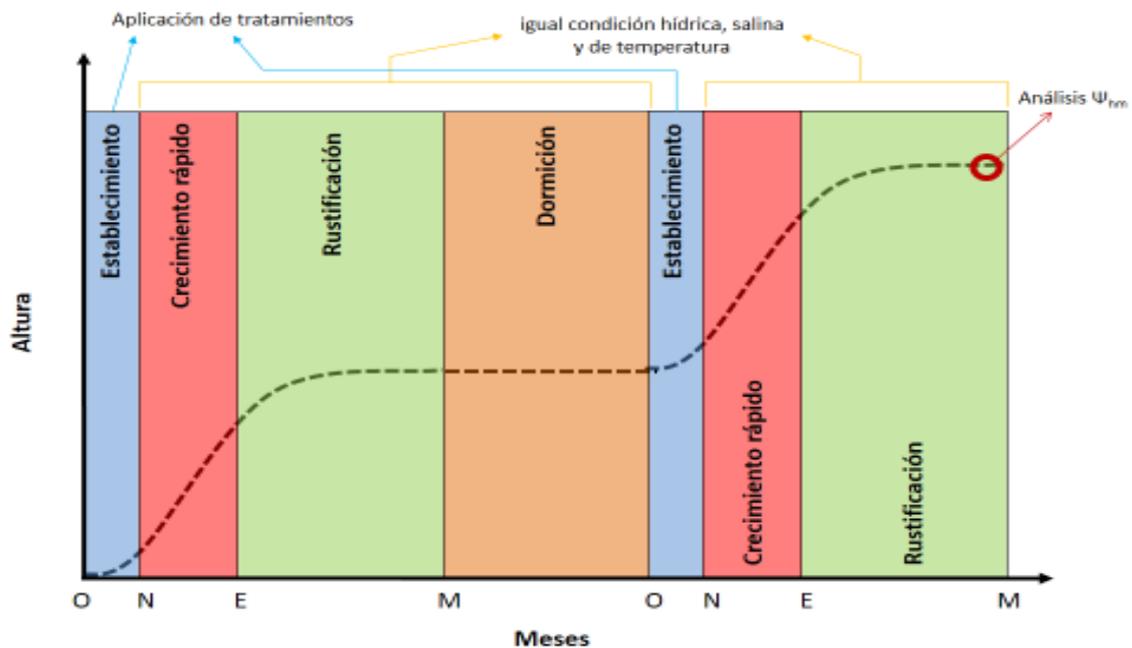


Figura 12. Esquema de la dinámica de crecimiento del cultivo de *Austrocedrus chilensis* en relación a las distintas etapas de crecimiento, donde se indican las etapas de aplicación de los tratamientos, condiciones de cultivo durante el resto de las etapas y el periodo en que se realizó el análisis de potencial hídrico al mediodía (Ψ_{hm}).

Bucci *et al.* (2006) señalan que la caída del potencial hídrico al mediodía podría deberse a que el aumento en la producción de raíces no se alcance en la misma proporción que la producción de la masa foliar. La caída del Ψ_{hm} en este trabajo tampoco se sostendría bajo esta última hipótesis ya que la asignación proporcional de biomasa hacia la parte aérea y radical fue similar y equilibrada para todos los tratamientos.

Del análisis realizado se pone en evidencia que las variaciones mostradas por el Ψ_{hm} no estarían relacionadas con respuestas de corto plazo asociadas a procesos de ajuste osmótico, ni con un desbalance en la asignación de biomasa entre la parte de absorción y de transpiración.

Los Ψ_{hm} bajos pueden ser una señal de restricciones de agua en las hojas, lo que probablemente esté relacionado con bajas capacidades de transporte de agua en el suelo o la planta (Faustino *et al.* 2013). Por otro lado Spicer y Gartner (2002) sugieren que cuando el continuo suelo-planta-atmósfera es considerado, aún una reducción severa de la conductividad en tallo, causada por compresión en la madera, tiene un leve impacto a nivel de procesos en la hoja. Gyenge *et al.* (2005) encontraron que más del 70 % de la

resistencia hidráulica en plantines de *Austrocedrus chilensis*, se producía a nivel de las hojas, variable hidráulica (conductancia hidráulica foliar) que no fue medida en este trabajo. Las tres variables de la arquitectura hidráulica analizadas en este ensayo (L_p , $K_{t\text{máx}}$ y K_{pl}) no mostraron diferencias significativas entre los niveles de los factores evaluados, por lo que probablemente la restricción hídrica que produjo los cambios en el Ψ_{hm} podrían estar asociados a modificaciones de la arquitectura hidráulica foliar.

En relación a estos cambios en el Ψ_{hm} , se observó que las plantas que mostraron los mayores valores de esta variable también presentaron los mayores desarrollos de BST, siendo estas diferencias significativas para las dos variables mencionadas. McDowell *et al.* (2008) proponen en su hipótesis sobre inanición de carbono que los mecanismos de cierre estomático usados por la planta para minimizar fallas hidráulicas, causa que la captación de CO_2 decline a niveles bajos, promoviendo así el hambre de carbono a medida que continúa la demanda de carbohidratos para el mantenimiento del metabolismo. Por otro lado, Gyenge *et al.* (2007) y Scholz *et al.* (2014) caracterizan al *A. chilensis* como una especie con un fuerte control estomático, cerrando tempranamente sus estomas en respuesta a un déficit de saturación de aire moderado, aún cuando el contenido hídrico del suelo no es limitante. En esta misma línea, Kitzberger *et al.* (2000), encontraron evidencias que sugieren que la protección directa a la radiación y los efectos de la sombra eran factores facilitadores de mayor importancia que el contenido hídrico del suelo, para el establecimiento de Ciprés de la Cordillera. Estos resultados apoyan la hipótesis planteada en la discusión del ensayo (a), donde se plantea que “probablemente la falta de compensación en la asignación de biomasa entre la parte aérea/parte radical (Figura 3), haya provocado una caída en el potencial hídrico foliar, generando una menor conductancia estomática con la subsecuente disminución en la captura de carbono, lo que pudo traducirse en un menor desarrollo de biomasa total”.

2

INFLUENCIA DE LA DINÁMICA DE SOMBREO SOBRE EL CRECIMIENTO DE PLANTINES DE CIPRÉS DE LA CORDILLERA DURANTE LA VIVERIZACIÓN

2.1. INTRODUCCIÓN

La radiación solar que alcanza la superficie del canopy de un bosque es influenciada por la absorción, transmisión y reflexión de la luz ocasionadas por el vapor de agua y las partículas en suspensión presentes en la atmósfera. A su vez, la cobertura nubosa puede afectar la intensidad y proporción de radiación directa y difusa que llega al dosel arbóreo (Dengel *et al.* 2015). De la misma forma, la vegetación reduce la irradiancia y modifica la calidad espectral que llega al piso del bosque, ya que las hojas y los tallos pueden absorber, reflejar e incluso dispersar la radiación lumínica (Jones 1996). Esta modificación del ambiente lumínico (principalmente reducción de la irradiancia, disminución de radiación azul y roja, con aumentos relativos de la relación Rojo/Rojo Lejano) induce cambios en las plantas que se manifiestan a nivel fisiológico, morfológico y/o anatómico de sus raíces, tallos y hojas (Waring y Schlesinger 1985; Ballaré *et al.* 1991; Fullbright *et al.* 1997; Bond *et al.* 1999; Uemura *et al.* 2000; Mizunaga y Umeki 2001; Drever y Lertzman 2001).

La radiación solar es uno de los factores más importantes que gobiernan el crecimiento de la vegetación del sotobosque en los ecosistemas forestales, incluyendo el establecimiento y crecimiento de las plántulas y plantines de los árboles. Así, el tipo y calidad con que la radiación llega a la planta es de vital importancia. Por ejemplo, mientras se cree que la radiación difusa mejora la fotosíntesis de la vegetación terrestre (Gu *et al.* 1999, 2002; Urban *et al.* 2007; Dengel y Grace, 2010), la radiación solar directa puede causar saturación de la fotosíntesis y posible fotoinhibición (Powles 1984; Krause 1988; Long *et al.* 1994). Por otro lado, muchas variables que inciden en la dinámica de crecimiento de los plantines son influenciadas por variaciones de la radiación.

Holmgren (2000) menciona que la sombra producida por el canopy arbóreo tiene efectos indirectos, tales como la reducción de la temperatura del aire y la hoja, del déficit de presión de vapor y del estrés oxidativo. Por otro lado Campanello *et al.* (2011) señalan que los cambios en radiación se correlacionan con cambios concomitantes en la temperatura, la humedad relativa y el contenido de agua del suelo.

El ambiente de luz dentro de un bosque es heterogéneo, debido no sólo a la sombra producida por el propio árbol, sino también al sombreado generado por los árboles vecinos (Wyka *et al.* 2012). La estructura del bosque, la composición florística y la dinámica de las aberturas del dosel afectan los niveles de radiación solar en el sotobosque, la cual muestra una amplia variabilidad espacial y temporal (Clark *et al.* 1995). Las aberturas del dosel (sumado a cambios en el ángulo solar y el viento) producen en el sotobosque la incidencia de radiación directa en forma de “flecós de luz”, o sea haces de luz que inciden brevemente sobre un punto del sotobosque de tal modo que cada punto recibe en forma alternada radiación directa y radiación difusa. El tamaño de las aberturas del dosel afecta no solamente la fracción de radiación solar que incide sobre las plantas sino también la frecuencia y duración de los flecos de luz incidentes (Brown 1993). Así, a lo largo de una distribución de flecos de luz, el cierre estomático o una virtual fotoinhibición en respuesta a procesos de estrés, pueden contribuir a una disminución de la actividad fotosintética en relación al nivel de radiación incidente (Percy 1990; Kanniah *et al.* 2012). La forma en que las plantas responden a los flecos de luz puede variar y en algunas plantas de sombra estas respuestas (saturación de la fotosíntesis, regulación estomática y hasta eventos de fotoinhibición) podrían ser cruciales para regular el intercambio gaseoso y en consecuencia la actividad fotosintética (Sellers 1985; Leakey *et al.* 2003).

Con respecto al requerimiento de luz, la tolerancia a la sombra esta asociada con un amplio número de rasgos. Especies con diferentes tolerancias a la sombra difieren en sus características tanto fisiológicas como estructurales (Valladares y Niinemets 2008). En relación a las características fisiológicas, plantas intolerantes a la sombra usualmente presentan tasas fotosintéticas máximas a saturación de luz (A_{sat}) y CO_2 ($A_{máx}$), tasas respiratorias

mitocondriales (R_n), punto de compensación de luz (PCL) y punto de saturación (PSL) más elevados (Lambers *et al.* 1998, Larcher 2003). A su vez, anatómica y estructuralmente, las plantas tolerantes a la sombra presentan densidad de estomas, grosor de lámina foliar y relación raíz/tallo menores; en tanto que sus áreas foliares específicas (SLA) y tamaño de lámina foliar son mayores que en especies intolerantes (Abrams y Kubiske 1990, Baltzer y Thomas 2007, Janse-ten Klooster *et al.* 2007).

Givnish (1988) señala que para entender la significancia adaptativa de las variaciones en la forma, fisiología y estructura foliar, se debe considerar la integración funcional de las hojas con otras partes de la planta, particularmente raíces y tejidos estructurales. El mismo autor menciona que muchos rasgos foliares y de la copa que mejoran la ganancia de carbono total de la planta, tienen costos asociados involucrando a la captación de agua y nutrientes, soporte mecánico e interacción con hervíboros. Por ejemplo una planta que crece a la sombra optimiza la captación de luz aumentando la superficie foliar, asignando una mayor proporción de sus recursos a la formación de tejido fotosintético. De esta forma se compensa la reducción de la intensidad lumínica, pero a costa de un menor desarrollo relativo del sistema radical (Waring y Schlesinger 1985). Por otro lado, Tyree *et al.* (1998) mencionan que las especies con requerimiento alto de luz son plantas pioneras, germinando preferentemente en aberturas del dosel, de rápido crecimiento y generalmente intolerantes a condiciones de baja irradiancia. En contraste, el mismo autor señala que las especies tolerantes a la sombra germinan, crecen y tienen altas tasas de sobrevivencia en ambientes donde la radiación solar es baja. Consistente con esta caracterización mencionan también que las plantas con requerimientos elevados de luz muestran tasas fotosintéticas y capacidades de transporte de agua más elevadas que las especies tolerantes a la sombra.

Con respecto a las condiciones de crecimiento del *A. chilensis*, Constantino (1949) resalta la presencia de individuos juveniles entre los arbustos nativos, atribuyendo esta condición a que los mismos ayudaban a mantener una capa de humedad en el suelo, haciendo posible su germinación y posterior crecimiento. Lebedeff (1942) lo describe como una especie heliófita en los bosques, pero que también se han encontrado renovales de los mismos

bajo la sombra intensa de árboles y arbustos. Experimentos de germinación realizados con esta especie sugieren que altas condiciones de luz parecen no afectar la germinación de las semillas, pero sí influir negativamente sobre la supervivencia de juveniles por efectos de la desecación (Rovere 1991). Kitzberger *et al.* (2000) observaron que el establecimiento de *A. chilensis* era favorecido por la sombra generada por los arbustos, proponiendo que las plantas nodrizas actúan como amortiguadores de las variaciones climáticas incrementando la oportunidad para el establecimiento de esta especie. Por otro lado, Letourneau *et al.* (2004) señalan que el balance entre competencia y facilitación con la planta nodriza parecen estar relacionados con el tamaño de la planta en concordancia con el ambiente lumínico, ya que es posible que los rasgos morfológicos y fisiológicos relacionados con la aclimatación a la intensidad de radiación influyan en el resultado del balance de la interacción. Algunos autores señalan que las plantas ajustan su aparato fotosintético a las irradiancias experimentadas a lo largo de su desarrollo (Krause *et al.* 2001; Larcher 2003), y es común encontrar transiciones de sombra a sol dentro de una misma especie a medida que avanza en sus estadios ontogénicos (Poorter *et al.* 2005). En general esta transición de ambientes de sombra a ambientes con mayores irradiancias ocurre durante los primeros estadios de desarrollo. Coopman *et al.* (2008) mencionan que los plantines de *Nothofagus nítida* tienen una respuesta a la fotosíntesis típica de plantas de sombra, mientras que los árboles adultos presentan respuestas a la fotosíntesis típicas de plantas de sol. En esta línea, Kira y Yoda (1989) señalan que a medida que las plantas crecen y cruzan las primeras capas del dosel compuesto de helechos y arbustos, están expuestas a irradiancias progresivamente más altas.

Gyenge *et al.* (2007) señalan que comparado con otras especies, *Austrocedrus chilensis* comparte algunas características fisiológicas con especies tolerantes a la sombra. Estos autores encontraron que los estomas de *A. chilensis* se abren totalmente en valores de irradiancia de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mientras que especies heliófitas alcanzan el máximo de apertura a valores de irradiancia de PFD de $280\text{-}400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Leverenz 1995, Le Roux *et al.* 1999). Los resultados obtenidos por Gyenge *et al.* (2007), indican que el comportamiento para evitar la sequía a través de un temprano cierre

estomático, podría ser el principal mecanismo usado por *A. chilensis* para sobrevivir bajo suelos con déficit hídrico asociados con elevadas demandas evaporativas. Sin embargo, estudios realizados en otras especies con la misma estrategia indican que el riesgo de fotoinhibición o daño celular debido a sobrecalentamiento se incrementa bajo esta situación.

A partir de lo expuesto, el objetivo general de este capítulo es determinar cómo influyen dinámicas de sombreado en flecos y en luz difusa sobre el desarrollo de plantines de *A. chilensis* durante su viverización. Se plantearon como objetivos específicos: (i) determinar si estas distintas dinámicas de sombreado inciden sobre el déficit de presión de vapor (VPD) del microambiente de cultivo sombreado; (ii) evaluar la incidencia del tipo de sombreado en el crecimiento, la asignación de biomasa, la morfología foliar y relaciones hídricas de la planta; (iii) determinar si la fotosíntesis es inhibida ante cambios abruptos de irradiancias, por un proceso de fotoinhibición o por cierre estomático.

La hipótesis central de este capítulo es que el crecimiento de los plantines de *A. chilensis* es afectado por la inhibición de la fotosíntesis a altas irradiancias, y que una dinámica de sombreado por flecos de luz (simulando lo que presumiblemente ocurre en la naturaleza) evita la fotoinhibición de la actividad fotosintética. En función de esta hipótesis central se plantean tres predicciones:

Predicción 1: Altos niveles de irradiancia provocan daño en los fotosistemas de *A. chilensis* produciendo una fotoinhibición (entendida como foto daño al FSII) de la actividad fotosintética.

Predicción 2: La inhibición observada en *A. chilensis* en la fotosíntesis a altas irradiancias es provocada por el cierre estomático.

Predicción 3: Una dinámica de sombreado por flecos de luz permite producir plantines de *A. chilensis* de mayor tamaño (mayor asimilación integrada) y con un mejor balance en la relación porción aérea / porción radical (condición que previene el cierre estomático ante bajas VPD típico de esta especie).

Para poner a prueba la hipótesis se llevaron a cabo dos experimentos manipulativos con plantines de *A. chilensis*. En el primero de ellos se contrastaron dos dinámicas de sombreado (con flecos y difusa) con la exposición

solar plena, midiendo el efecto de estos tratamientos sobre variables morfológicas y de relaciones alométricas. El segundo ensayo corresponde a un experimento de medición de fluorescencia modulada de la clorofila y actividad fotosintética en una atmósfera saturante de CO₂, en invernáculo y en condiciones controladas (en cámara de crecimiento).

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Ensayo de sombreo

2.2.1.1. Material vegetal y ambiente de cultivo

Las plantas utilizadas en este ensayo se generaron a partir de un lote de semillas de origen Lago Puelo (42° 5' 48,89" S, 71° 41' 2,20" W, 210 m snm), compuesto por la cosecha de 12 árboles en el año 2013. Tanto la limpieza del lote de semillas como el proceso de estratificación se realizaron bajo la misma metodología utilizada en el resto de los ensayos. Se utilizaron bandejas de cultivo con 24 cavidades troncocónicas de 250 ml, de sección circular, con orificios de autopoda radical y nervaduras anti-enrulado (DASSPLASTIC®, modelo 24250). Las que se llenaron con un sustrato formado por una mezcla de turba *Sphagnum* sp. (procedente de turberas de Tierra del Fuego) y perlita, en una proporción 2:1. La siembra se realizó los primeros días de octubre, directamente en la bandeja de cultivo a una densidad de 6 semillas por cavidad. En las cavidades que emergieron más de una plántula, luego del desarrollo completo de los cotiledones se realizó un raleo, dejando una sola por celda. El experimento se instaló en el invernadero de ensayos del vivero de la UPV – INBIES – UNPSJB.

Las temperaturas mínimas se controlaron durante la fase de establecimiento y pleno crecimiento manteniéndolas por encima de los 15 °C. Las temperaturas máximas se mantuvieron por debajo de los 30 °C durante todas las etapas del cultivo (establecimiento, crecimiento rápido y rustificación).

2.2.1.2. Manejo de agua y fertirriego.

Luego de la siembra se realizaron riegos frecuentes para mantener el contenido de humedad del sustrato lo más cercano posible a capacidad de contenedor en los primeros centímetros del mismo. Una vez producida la germinación, la frecuencia de riego se estableció usando el método de las pesadas. Utilizando como indicador para efectuar el riego: en la fase de establecimiento el 80 %, en pleno crecimiento el 80 % y en rustificación el 40 % del agua aprovechable (AA). El suministro de contenidos hídricos más elevados durante la etapa de establecimiento y sobre todo en crecimiento rápido con respecto al resto de los ensayos, tuvo como principal objetivo minimizar eventos de estrés hídrico que pudieran incidir en un eventual proceso de cierre estomático, durante la etapa de pleno crecimiento vegetativo.

El riego se aplicó en forma manual (i.e. no automatizada) mediante la utilización de un kit de riego formado por una bomba periférica y un aplicador en forma de roseta. El régimen de fertirriego comprendió una fase de establecimiento de seis semanas, las que trascurrieron desde la segunda quincena de noviembre y hasta fin de diciembre, una etapa de crecimiento rápido de 8 semanas, durante los meses de enero y febrero, y una fase de rustificación de 12 semanas, transcurriendo desde principios de marzo hasta finales de mayo. En el establecimiento se aplicó una solución nutritiva con una concentración de nitrógeno= 33 mg L⁻¹, fósforo= 98 mg L⁻¹ y potasio= 68 mg L⁻¹, obteniéndose estas concentraciones mediante la dilución en 1 litro de agua de 0,3 g de fosfato monoamónico; 0,26 g de fosfato monopotásico y 0,02 ml de ácido fosfórico al 85 %. En crecimiento rápido se usó una solución nutritiva con una concentración de nitrógeno = 99 mg L⁻¹, de fosforo = 66 mg L⁻¹ y de potasio = 104 mg L⁻¹; para llegar a estos valores se diluyó en un litro de agua 0,55 g de fertilizante COMPO® HAKAPHOS rojo (18-18-18), 0,043 g de fosfato monopotásico y 0,02 ml de ácido fosfórico al 85 %. Por último, para la solución de aplicación utilizada en la fase de rustificación se diluyó en un litro de agua 0,34 g de fertilizante COMPO® HAKAPHOS base (7-12-40); 0,23 g de fosfato monoamónico; 0,1 g de fosfato monopotásico y 0,02 ml de ácido fosfórico al 85 %, alcanzándose una concentración de nitrógeno = 49 mg L⁻¹, de fósforo = 100 mg L⁻¹ y de potasio = 150 mg L⁻¹.

2.2.1.3. Tratamientos

Los tratamientos analizados en este ensayo comprendieron la aplicación de dos dinámicas de sombreado, evaluándose una situación de plena exposición (testigo-sin cobertura), una situación de sombreado difuso homogéneo y continuo y, por último, un sombreado con dinámica de flecos de luz. Para lograr el efecto de los tipos de sombreados buscados se construyeron cajones de 120 cm de lado y 70 cm de altura. Para el caso del tratamiento de sombreado difuso se revistieron con una media sombra aluminizada de 60 % (porcentaje de sombra). Para el caso del sombreado en flecos, los cajones se revistieron con planchas de poliestireno expandido de baja densidad color blanco, realizándole a las planchas agujeros cuadrados de 5,5 cm de lado distribuidos uniformemente y calculando la cantidad de los mismos de tal manera que el porcentaje de cobertura fuera similar al de la media sombra utilizada en el tratamiento de sombreado difuso (Figura 13 a y b).

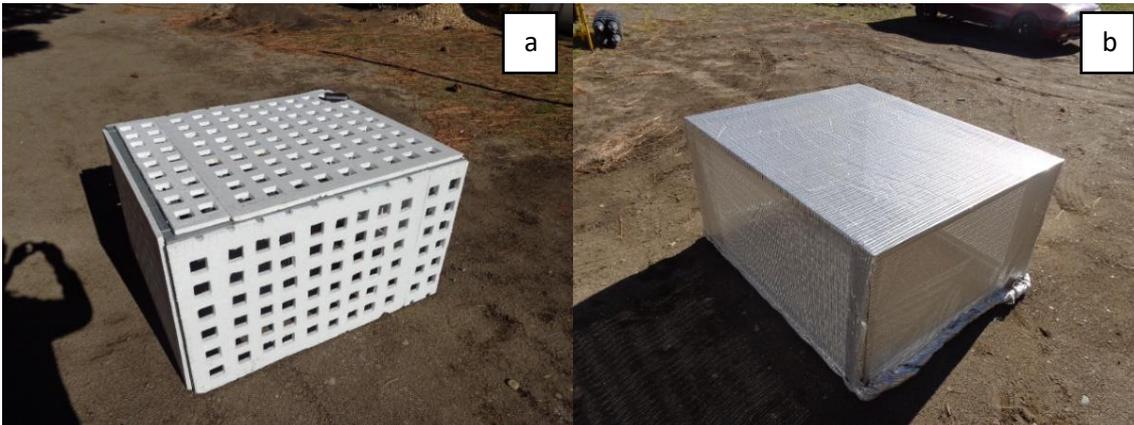


Figura 13. Vista de los cajones utilizados para generar las distintas dinámicas de sombreado. (a) cajón utilizado para la dinámica de sombreado en flecos. (b) cajón utilizado para la dinámica de sombreado difuso.

Las densidad de flujo fotónico fotosintéticamente activo (PPFD) fue medida dentro del invernadero donde se colocaron los tratamientos, con un medidor de PAR (Apogee – mod. MQ-200) para cada tratamiento a las 12:00 h de un día soleado de principios del mes de septiembre. El tratamiento testigo a plena luz (AL) arrojó un PPFD de $1008 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, en el tratamiento de sombreo difuso (MS) se midió un PPFD promedio de $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mientras que el tratamiento de flecos (FL) dio un PPFD de $1003 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en el parche de luz y $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en el parche de sombra (Figura 14 a y b).



Figura 14. Vista del tipo de sombreo en el interior de los cajones. (a) medición del PPFD con el sensor de PAR en el sector de luz en el tratamiento de flecos de luz. (b) medición del PPFD con el sensor de PAR en el tratamiento de sombreo difuso.

El ensayo se realizó durante un ciclo de viverización completo, aplicando las distintas coberturas a partir del nacimiento de las plántulas y hasta la finalización de la fase de rustificación. Durante todo el ciclo de cultivo se colocó en cada tratamiento un sensor data logger (Hobbo® mod. UX100 Temp/HR), el cual relevó la temperatura promedio y la humedad relativa promedio del aire cada 15 min. A partir de estos datos y asumiendo que la temperatura de las hojas se encontraba a la misma temperatura del aire circundante, se calculó el déficit de presión de vapor (VPD) a través de las siguientes ecuaciones (Allen *et al.* 2006).

$$e_s = 0,6108 * \text{EXP}[(17,27 * T_m) / (T_m + 237,3)] \quad [8]$$

$$e_a = \text{HR}_m * (e_s / 100) \quad [9]$$

$$\text{VPD} = e_s - e_a \quad [10]$$

Siendo:

e_s : Presión de saturación de vapor a la temperatura del aire (kpa).

e_a : Presión de vapor actual (Kpa).

EXP: 2,7183 (base del logaritmo natural) elevado a la potencia [...]

T_m : Temperatura del aire promedio ($^{\circ}\text{C}$)

HR_m : Humedad relativa promedio (%)

VPD: Déficit de presión de vapor (kpa)

2.2.1.4. Variables analizadas

Se midieron variables morfológicas que expresan crecimiento en la parte aérea y radical del plantín, tales como altura de la parte aérea, diámetro al cuello y biomasa. También se registraron variables que caracterizan la respuesta de los plantines a los distintos ambientes de sombreado: asignación de biomasa entre la parte aérea y radical, distancia máxima entre hojas opuestas, área foliar específica y relación área foliar – xilema conductivo. Estas variables se midieron sobre 15 plantines por tratamiento con el primer ciclo vegetativo completo (i.e. una vez concluida la fase de rustificación).

Paralelamente a este ensayo se llevó a cabo una serie de ensayos complementarios en el Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE, CCT CONICET La Plata - UNLP) de la Universidad Nacional de La Plata (FCAyF, FCNyM), donde se analizó la susceptibilidad a la fotoinhibición (mediciones de fluorescencia modulada de la clorofila) ante cambios abruptos de irradiancias, similares a las medidas en los parches de luz y sombra del tratamiento FL y actividad fotosintética en una atmósfera saturante de CO_2 .

2.2.1.4.1. Variables morfológicas

Se determinó la altura del plantín como la distancia desde la base del tallo (cuello) hasta el ápice del eje primario de la planta. El diámetro del cuello se estableció como el diámetro del tallo medido a la altura de la superficie del

sustrato. Ambas variables se midieron con un calibre digital, con una precisión de 0,01 mm.

Las biomásas foliar (BS_f), de tallo (BS_t) y radical (BS_r) se determinaron separando con tijera la fracción de hojas de los tallos y la parte aérea de la radical. Los sistemas radicales se lavaron para eliminar restos de sustrato adherido y se secaron cuidadosamente. Posteriormente se colocó cada fracción en bolsas de papel rotuladas en forma independiente, y se llevaron a estufa a $65\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ hasta peso constante. Para determinar los pesos se utilizó una balanza digital con una precisión de 0,01 g. La biomasa total (BS_T) se determinó mediante la suma de los pesos de cada una de las fracciones.

Una variable probadamente indicadora de aclimatación a bajas irradiancias para *A. chilensis* es la distancia máxima entre hojas opuestas (DMHO), que se define como la distancia máxima que hay entre los bordes exteriores de las hojas laterales opuestas de esta especie (Letourneau 2006). Su valor es mayor en hojas expandidas en ambiente con baja irradiancia. Las mediciones de DMHO se realizaron con un calibre digital con precisión de 0,01 mm. En esta variable las mediciones se efectuaron sobre 15 réplicas para el tratamiento de flecos de luz, sobre 14 réplicas para el tratamiento de sombreado difuso y sólo para 5 réplicas para el tratamiento testigo. Realizando una medición por réplica y tomando como criterio para su elección el par de hojas opuestas más desarrollado (el desbalance del muestreo entre los tratamientos, se debió a que varios plantines no presentaban ramitas laterales con hojas opuestas desarrolladas al momento de efectuar la medición).

2.2.1.4.2. Variables alométricas

Para evaluar la incidencia de los distintos tratamientos sobre las estrategias de los plantines en relación a la asignación de recursos a sus partes de transpiración y de absorción, se calculó la relación entre la biomasa aérea y la biomasa radical, expresada en la siguiente ecuación.

$$BSA/BSR = (BS_f + BS_t) / BS_r \quad [11]$$

Siendo:

BSA/BSR: el índice de asignación de biomasa entre la parte de transpiración y de absorción.

El área foliar específica aparente ($AFE_{aparente}$) se definió como el cociente entre el área de una ramita proyectada sobre el plano y su peso seco.

$$AFE_{aparente} = \text{área foliar proyectada} / \text{peso seco} \quad [12]$$

Siendo:

$AFE_{aparente}$: el área foliar específica expresada en milímetros cuadrados por gramo de materia seca ($\text{mm}^2 \text{g}^{-1}$).

Área foliar proyectada: es el área foliar proyectada en el plano expresada en milímetros cuadrados (mm^2).

Peso seco: es el peso seco de la correspondiente ramita expresada en gramos de peso seco (g).

Al finalizar la fase de rustificación se cortó y escaneó una ramita por plantín muestreado, con una resolución de 300 puntos por pulgada y junto a una escala patrón de dimensiones conocidas. Las imágenes se procesaron con el programa ImagenJ 1.51 ([https:// imagej.nih.gov/ij/index.html](https://imagej.nih.gov/ij/index.html)), el cual permite corregir las imágenes de tal manera de reducir las deformaciones introducidas durante el procedimiento de digitalización y determinar el área proyectada a partir del reconocimiento manual de los bordes de la ramita. Con posterioridad a la medición de área foliar proyectada se estableció el peso seco de cada ramita, siguiendo los mismos pasos utilizados en la determinación de la biomasa anteriormente descritos.

Para la determinación de la relación área foliar – xilema del tallo (AF/Ax) se procedió en una primer instancia a calcular el área foliar total de cada plantín analizado, relacionando su AFE y su biomasa foliar como lo indica la ecuación 12.

$$AF = AFE \times BS_f \quad [13]$$

Siendo:

AF: Área foliar total del plantín expresada en milímetros cuadrados (mm^2).

AFE: Área foliar específica ($\text{mm}^2 \text{g}^{-1}$).

BSr: biomasa foliar expresada en gramos de materia seca (g).

Las observaciones del xilema de los tallos de los plantines fueron realizadas con un microscopio óptico Leica DM500, con un objetivo 10x. Las microfotografías utilizadas para la determinación del área del xilema se obtuvieron mediante cámara digital Canon EOSRebel T3i (Figura 15).



Figura 15. Vista en microscopio del corte transversal del tallo de un plantín del tratamiento testigo, donde se observan las estructuras xilemáticas teñidas de rojo y las floemáticas en un celeste pálido.

Para la realización de los preparados, a cada tallo muestreado a la altura del cuello se le efectuaron cortes transversales de $10 \mu\text{m}$ de espesor con un micrótopo Leica Hn 40 y se los trató con una técnica de coloración combinada sucesiva doble: safranina-fast-green, aplicando técnicas convencionales (D'Ambrogio 1986) con las siguientes modificaciones en los tiempos de deshidratación y de tinciones (Troncoso y Greslebin 2018): 1) se decoloraron las muestras en hipoclorito de sodio durante 3 min y luego fueron lavadas tres veces con agua destilada; 2) se inició el proceso de deshidratación en alcohol

60° durante 5 min, posteriormente se tiñeron en solución saturada de safranina en alcohol 80°; 3) se continuó con una deshidratación en alcohol 96° durante 5 min y se tiñeron en fast-green durante 10 seg; inmediatamente se pasaron a alcohol etílico absoluto (100°) donde se dejaron durante 10 seg; 4) finalmente se terminó la deshidratación con xileno. Los cortes fueron montados con acrílico incoloro y secados durante 24 hs a temperatura ambiente.

El cálculo del área del xilema del tallo (A_x) se realizó a través del procesamiento de las imágenes de los distintos cortes, con el programa ImagenJ 1.51 ([https:// imagej.nih.gov/ij/index.html](https://imagej.nih.gov/ij/index.html)), el cual permite determinar el área a partir del reconocimiento manual de los bordes del xilema.

Finalmente el índice queda expresado como:

$$AF/A_x = (AFE \times BS_r) / (A_x) \quad [14]$$

Siendo:

AF/A_x el índice de la relación del área foliar y el área del xilema.

2.2.2. Ensayo de sensibilidad a la fotoinhibición

En este ensayo se analizó la susceptibilidad a la fotoinhibición (entendida como fotodaño al FSII) ante cambios abruptos de la irradiancia, realizando mediciones de fluorescencia modulada de la clorofila. Por otro lado se realizaron mediciones de la actividad fotosintética en una atmósfera saturante de CO_2 , evitando la limitación a la difusión del CO_2 impuesta por los estomas, de manera de analizar una posible inhibición de la fotosíntesis dependiente del cierre estomático y no por daño en fotosistemas.

Las mediciones de fluorescencia modulada de la clorofila se realizaron con un medidor portátil de fluorescencia de la clorofila (FMSII, Hansatech, UK) de acuerdo a Genty *et al.* (1989), utilizando el método del 'pulso saturante' (Maxwell y Johnson 2000). Las mediciones del comportamiento fotosintético en atmósfera saturante de CO_2 se efectuaron con un dispositivo equipado con un electrodo de O_2 tipo Clark (Hansatech, UK) dentro de una cámara hermética que permite cuantificar cambios en las concentraciones de oxígeno (Figura 16 a y b) de acuerdo a Walker (1987).



Figura 16. (a) Medidor portátil de fluorescencia modulada de la clorofila; (b) Dispositivo (electrodo tipo Clark) utilizado para realizar las mediciones de la actividad fotosintética a saturación de CO₂. Ensayos realizados en el INFIVE (CONICET-UNLP)

Para las mediciones se utilizaron plantines de *A. chilensis* cultivados en el vivero de la Unidad de Propagación Vegetal del Instituto INBIES de la Universidad Nacional de la Patagonia SJB. Los plantines pasaron por una temporada de cultivo (plug 0). Se viverizaron en bandejas con 30 cavidades troncocónicas de 160 cm³, utilizando como sustrato una mezcla de turba *Sphagnum* sp proveniente de turberas de Tierra del Fuego y perlita, en una proporción 2:1. Durante todo el ciclo de viverización el cultivo se desarrolló en invernaderos sin ningún tipo de cobertura de sombreado.

Se establecieron en una primera etapa dos lotes formados por quince plantas cada uno, ubicando uno de ellos en una cámara de crecimiento en la que se adecuaron mesadas de luz, de manera que este lote quedara expuesto a una densidad de flujo fotónico fotosintético (PPFD) de 180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Manteniendo a los plantines a esta PPFD durante cinco días, previo a la realización de las mediciones (Figura 17).

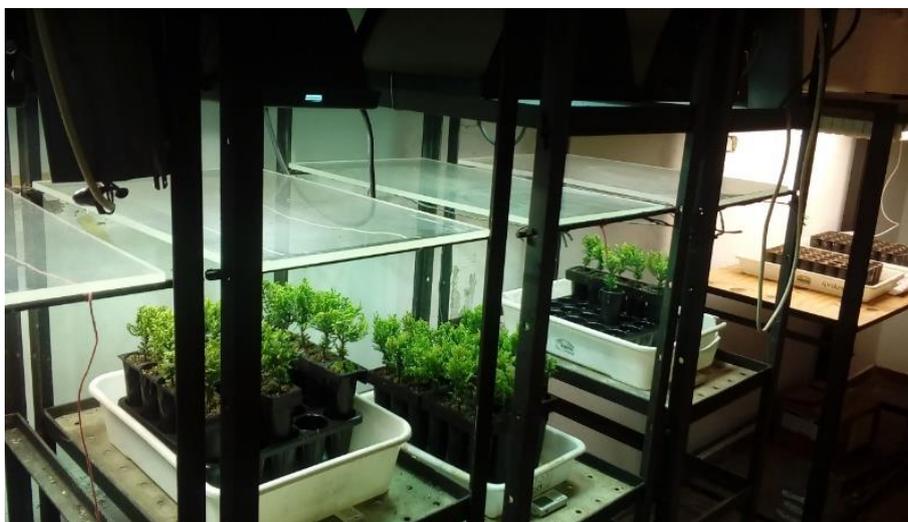


Figura 17. Plantines colocados a distintas irradiancias en las mesadas de luz adecuadas en la cámara de cultivo del INFIVE.

El segundo lote de plantines se ubicó en un invernadero durante el mismo lapso, en un sector con una PPFd media de 1000 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Trascurrido el periodo de aclimatación (cinco días) a las diferentes PPFd, se llevaron seis plantas elegidas al azar de cada tratamiento, a una PPFd de 1000 $\mu\text{mol} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (fuente de luz: LED) en la cámara de crecimiento.

Una vez que las plantas permanecieron 30 min en dicho PPFd se realizaron las mediciones de fluorescencia modulada de la clorofila siguiendo la siguiente secuencia:

1. Se midió la fluorescencia a estado estable (F_s) y la fluorescencia máxima en hojas iluminadas (F_m'), a la PPFd (1000 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) que fueron expuestas por 30 min.
2. Luego se oscureció el mismo sector de la hoja, mediante la utilización de unas pinzas (clips) especiales y se dejaron transcurrir 30 min en esta condición. Cumplido el tiempo se determinó la fluorescencia máxima (F_m) y la fluorescencia mínima (F_0) (Maxwell y Johnson 2000).

Con estos valores se procedió al cálculo de:

- Rendimiento cuántico efectivo (Φ_{PSII}): Este parámetro puede variar de 0 a 0,8 dependiendo de la PPFd a la que se encuentre expuesta la hoja y la condición fisiológica de la misma. Está definido por la siguiente ecuación:

$$\Phi_{\text{PSII}} = (F_m' - F_s) / F_m' \quad [15]$$

- Tasa de transporte electrónico (ETR): Es un indicador de la actividad fotosintética a nivel tilacoidal, y se calculó a partir del Φ_{PSII} , la PPFd incidente, la fracción de luz que es absorbida por la hoja (absortancia) que se estimó en 0,85 y 0,5 que es la fracción de luz absorbida por el FSII. Mediante la siguiente ecuación:

$$\text{ETR} = \Phi_{\text{PSII}} \times \text{PPFD} \times 0,85 \times 0,5 \quad [16]$$

- Rendimiento cuántico máximo ($\Phi_{\text{PSII máx}}$): este parámetro muestra una clara correlación con los centros funcionales del PSII. Por lo que su disminución se considera como un indicador de daño a nivel de aparato fotosintético. El $\Phi_{\text{PSII máx}}$ puede variar entre 0 y 0,85 y está definido por la ecuación:

$$\Phi_{PSII\text{máx}} = (F_m - F_0) / F_m \quad [17]$$

- Atenuación no fotoquímica (non-photochemical quenching: NPQ): es un indicador de la tasa de des-excitación por disipación térmica del PSII, presentando un valor de 0 en la oscuridad y elevándose a medida que la irradiancia aumenta. El NPQ se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$NPQ = (F_m - F_m') / F_m' \quad [18]$$

La secuencia de mediciones descritas se repitió a los 90 min de exposición.

Efectuadas las mediciones de fluorescencia se llevaron otras cinco plantas de cada tratamiento a las mesadas de luz de la cámara de crecimiento y se las expuso durante 30 min a un PPFD de 1000 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Transcurrido dicho tiempo se efectuaron las mediciones de actividad fotosintética a saturación de CO_2 . La metodología aplicada fue la siguiente:

- A cada planta de los tratamientos propuestos se los llevó a una PPFD de 1000 $\mu\text{mol} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la cámara durante 30 min.
- Una vez transcurridos los 30 min se cortó una ramita del plantín y se la colocó en la cámara del dispositivo medidor de concentración de O_2 .
- Con la cámara cerrada se efectuó la incorporación del gas CO_2 para crear la atmósfera saturante de dicho gas (proveniente de aire espirado, el cual garantiza una concentración saturante de CO_2).
- La cámara se colocó bajo una fuente de luz dicróica que entrega un PPFD de 1600 $\mu\text{mol} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con un baño de agua (filtro infrarojo) para evitar los aumentos excesivos de la temperatura.
- Una vez que las lecturas se estabilizaron, se comenzó con las mediciones tomando los valores cada 30 seg por un lapso de 5 min, de manera de obtener un delta de variación constante (cambio lineal).
- Finalmente se calculó la actividad fotosintética potencial a través de la cantidad de O_2 producido en función del peso fresco de la rama y por unidad de tiempo, a través de la siguiente ecuación:

$$\text{Prod. O}_2 = ((\Delta\mu\text{v} \cdot \text{Vol O}_2 \text{ en la cámara}) / \mu\text{vO}_2 V_{\text{cámara}}) / \text{PF}_{\text{rama}} \quad [19]$$

Siendo:

Prod.O₂: Producción de O₂ de la muestra ($\mu\text{L O}_2 \text{ g}^{-1}\text{PF min}^{-1}$).

$\Delta\mu\text{v}$: Promedio del delta de variación de microVoltios (por unidad de tiempo) una vez que se estabilizan las mediciones con la muestra en la cámara cerrada herméticamente.

$\mu\text{vO}_2\text{V}_{\text{cámara}}$: Valor en microVoltios luego de consumidos los 1500 μL del O₂ atmosférico contenido en la cámara.

PF_{rama}: Peso fresco de la rama de la muestra medida.

Una vez realizadas las mediciones mencionadas en la cámara de cultivo, se efectuó una segunda experiencia en la que se llevó a cabo el mismo procedimiento de medición explicado anteriormente, pero en el invernadero, de manera de contrastar los resultados de una irradiancia de 1000 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de PPFD entregado por luz artificial (panel LED) en cámara y el mismo PPFD entregado por la luz solar (Figura 18). En la experiencia de invernadero se evaluó una condición más, en la que se dejaron plantas del tratamiento de 180 PPFD por 30 min a 200 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de PPFD para luego tomarles los valores de fluorescencia de manera de contar con valores básicos del comportamiento de *A. chilensis* con respecto a esta variable.



Figura 18. Toma de datos en el invernadero del INFIVE utilizando el medidor de fluorescencia.

2.2.2.1 Diseño experimental y análisis estadístico

Los tratamientos de sombreado se trabajaron con un diseño completamente aleatorizado (DCA) con 15 réplicas. La unidad muestral la conformó el plantín.

Para comprobar el efecto de los tratamientos se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) para cada una de las variables consideradas. En los casos en que se encontraron diferencias entre los tratamientos se utilizó el test de LSD Fisher ($\alpha= 0,05$) con corrección de Bonferroni. El procesamiento de los datos se realizó con el programa estadístico InfoStat/ Profesional, versión 2016.

Para el análisis estadístico de las experiencias a distintas irradiancias, se utilizó un diseño completamente aleatorizado (DCA) con 6 y 3 réplicas para las experiencias de fluorescencia en cámara de cultivo e invernadero, respectivamente, y 5 réplicas para las mediciones de producción de O₂. La unidad muestral estuvo formada por 1 plantín.

Para comprobar el efecto de los tratamientos se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) para cada una de las variables consideradas. En los casos en que se encontraron diferencias entre los tratamientos se utilizó el test de Tukey ($\alpha= 0,05$). El procesamiento de los datos se realizó con el programa estadístico InfoStat/ Profesional, versión 2016.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Ensayo de sombreado

El déficit de presión de vapor (VPD) estuvo influenciado por los distintos tratamientos. Los tratamientos de sombreado MS (sombreado difuso) y FL (fleclos de luz) presentaron valores de VPD más moderados en comparación con el tratamiento testigo (AL) (Figura 19), mostrando, este último, valores que superaban los 2,5 KPa en una relación de 2,5 a 1 con respecto a los otros tratamientos.

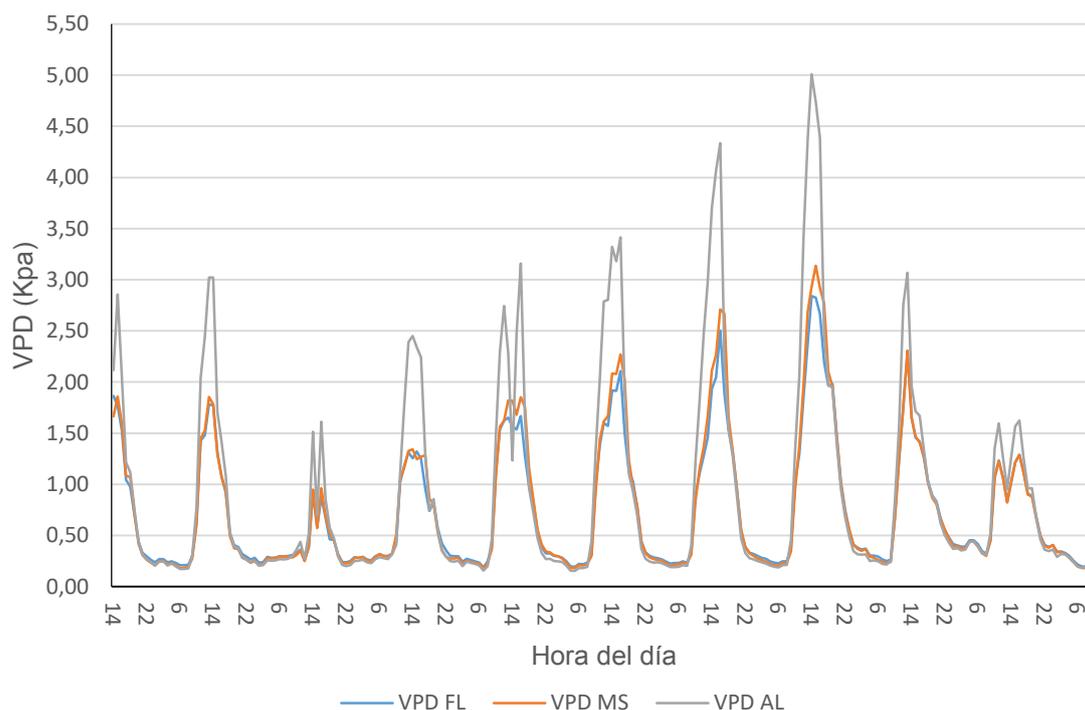


Figura 19. Déficits de presión de vapor (VPD) medidos durante la primera quincena de octubre, en los tres tratamientos ensayados. Tratamiento FL línea color celeste, tratamiento MS línea color naranja y tratamiento AL línea color gris.

La altura media de los plantines al concluir el ciclo de crecimiento fue de $57,85 \pm 13,46$ mm. Los tratamientos mostraron diferencias significativas ($P < 0,0001$) entre ellos, siendo el tratamiento FL el que mostró los mayores crecimientos ($69,26 \pm 11,77$ mm), mientras que el tratamiento que desarrolló menor altura fue el testigo con un valor de $46,12 \pm 9,25$ mm. El diámetro medio al cuello (DAC) de los plantines de todo el ensayo fue de $1,03 \pm 0,12$ mm. Sólo se probaron diferencias ($P= 0,013$) entre los tratamientos FL y MS, presentando valores de $1,08 \pm 0,11$ mm y $0,96 \pm 0,08$ mm respectivamente (Figura 20 A y B).

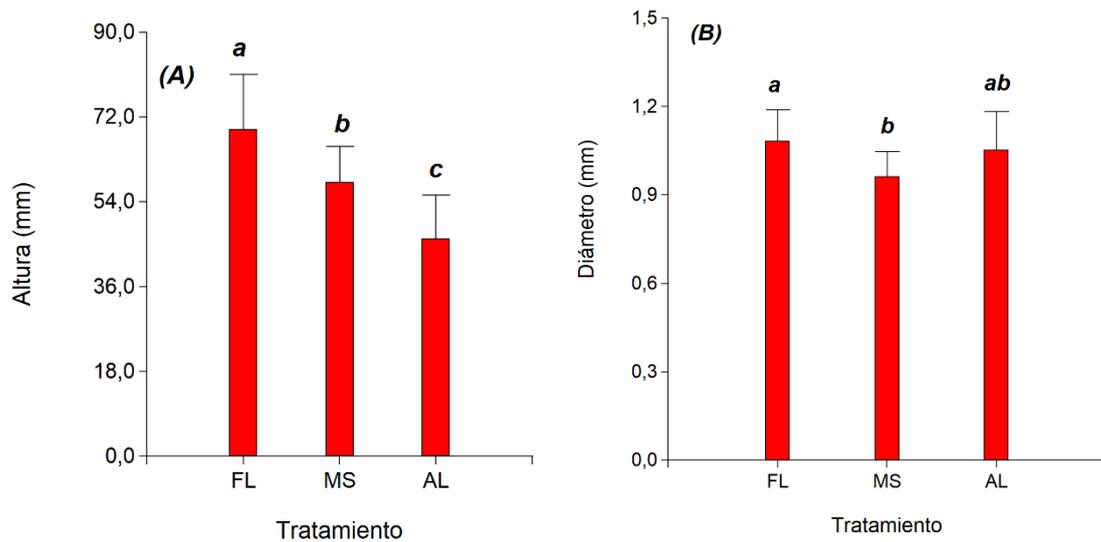
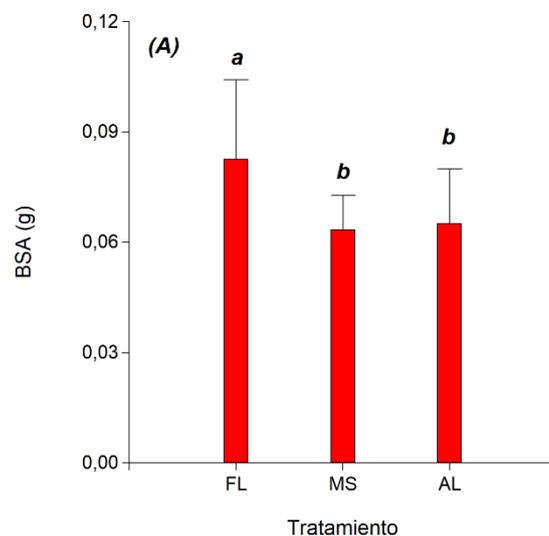


Figura 20. Parámetros morfológicos de los plantines de *Austrocedrus chilensis* sometidos a los tratamientos de flecos de luz (FL), media sombra (MS) y sin cobertura (AL). (A) Altura de la parte aérea del plantín. (B) diámetro al cuello del plantín. Los valores seguidos por la misma letra por tratamiento no presentan diferencias significativas (Fisher, $P < 0,05$).

Con respecto a la producción de biomasa, se obtuvo un valor promedio de BSA de todo el ensayo de $0,07 \pm 0,02$ g, la BSR presentó un valor medio de $0,07 \pm 0,02$ g, y por último la BST mostró un promedio de $0,21 \pm 0,06$ g. Al igual que en las variables anteriormente analizadas, el tratamiento FL mostró los mayores crecimientos tanto para la BSA, como para la BSR y la BST, diferenciándose de los tratamientos restantes (MS y AL) ($P = 0,0036$, $P < 0,0001$, $P = 0,0002$; respectivamente), los que no presentaron diferencias entre sí (Figura 21 A, B y C).



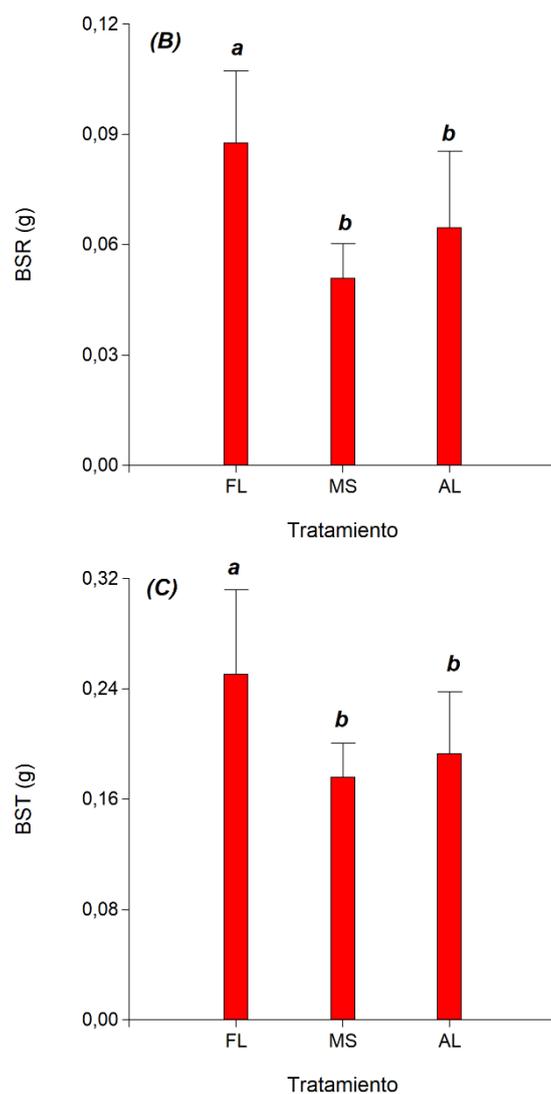


Figura 21. Parámetros morfológicos de los plantines de *Austrocedrus chilensis* sometidos a los tratamientos de flecos de luz (FL), media sombra (MS) y sin cobertura (AL). (A) Biomasa aérea (BSA). (B) Biomasa radical (BSR). (C) Biomasa total (BST). Los valores seguidos por la misma letra por tratamiento no presentan diferencias significativas (Fisher, $P < 0,05$).

En relación a la asignación de biomasa, el tratamiento FL se diferenció del MS ($P = 0,0041$), mientras que el tratamiento AL no se diferenció de ninguno de los anteriormente mencionados (Figura 22). El tratamiento FL mostró los valores de relación (BSA/BSR) menores ($0,94 \pm 0,10$), en tanto que los mayores valores fueron presentados por el tratamiento de sombreo difuso (MS) con un valor medio de $1,27 \pm 0,22$.

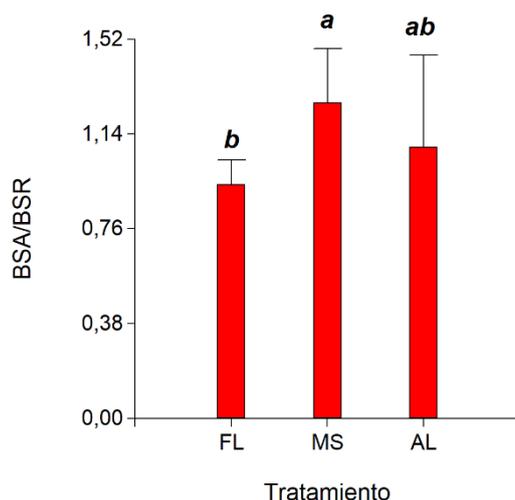


Figura 22. Asignación de biomasa (BSA/BSR) de los plantines de *Austrocedrus chilensis* sometidos a los tratamientos de flecos de luz (FL), media sombra (MS) y sin cobertura (AL). Los valores seguidos por la misma letra por tratamiento no presentan diferencias significativas (Fisher, $P < 0,05$).

La distancia máxima entre hojas opuestas (DMHO) presentó diferencias significativas entre los tratamientos ensayados ($P = 0,0041$) (Figura 23). El tratamiento FL fue el que mostró el mayor distanciamiento entre hojas opuestas, presentando un valor medio de $5,79 \pm 0,81$ mm, mientras que los tratamientos MS y AL presentaron valores promedio de $4,71 \pm 1,33$ mm y $4,10 \pm 0,50$ mm respectivamente.

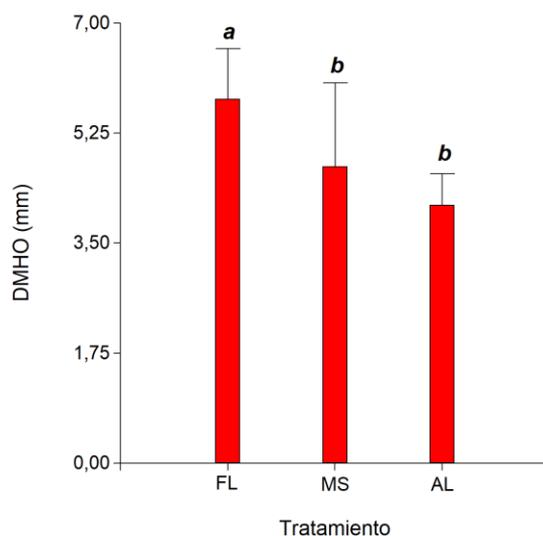


Figura 23. Valores medios de la distancia máxima entre hojas opuestas (DMHO) de los plantines de *Austrocedrus chilensis* sometidos a los tratamientos de flecos de luz (FL), media sombra (MS) y sin cobertura (AL). Los valores seguidos por la misma letra por tratamiento no presentan diferencias significativas (Fisher, $P < 0,05$).

El AFE presentó diferencias significativas entre los tratamientos ensayados ($P < 0,0001$) (Figura 24). Esta variable mostró una diferencia muy marcada entre el tratamiento testigo (AL) y los dos tratamientos con sombreado (FL y MS) que no se diferenciaron entre sí. El valor medio del tratamiento AL fue de $6833,08 \pm 2870,40 \text{ mm}^2/\text{g}$, mientras que FL y MS presentaron un valor promedio de $12095,20 \pm 2034,66 \text{ mm}^2/\text{g}$.

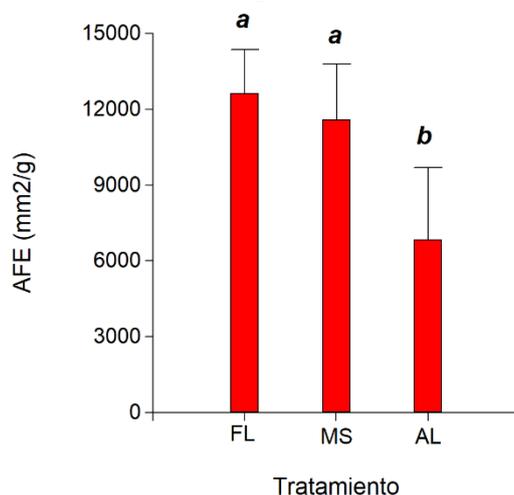


Figura 24. Valores medios del área foliar específica (AFE) de los plantines de *Austrocedrus chilensis* sometidos a los tratamientos de flecos de luz (FL), media sombra (MS) y sin cobertura (AL). Los valores seguidos por la misma letra por tratamiento no presentan diferencias significativas (Fisher, $P < 0,05$).

Con respecto a la relación AF/Ax sólo se probaron diferencias significativas entre el tratamiento MS y el AL ($P = 0,0043$) (Figura 25). El tratamiento MS fue el que mostró los valores más elevados del índice, presentando promedios de $1811,82 \pm 338,13$, mientras que el tratamiento AL presentó los menores valores ($1240,66 \pm 603,96$).

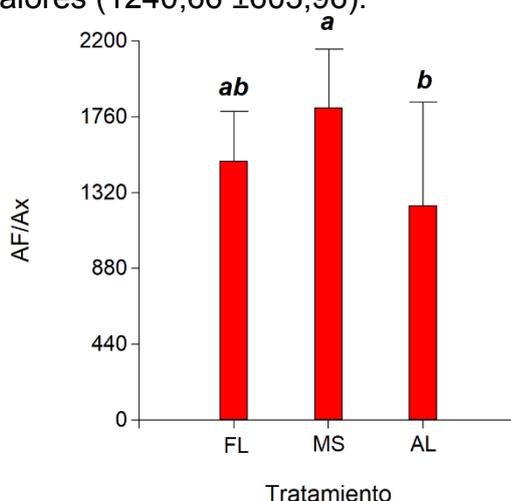


Figura 25. Relación área foliar y área xilemática (AF/Ax) de los plantines de *Austrocedrus chilensis* sometidos a los tratamientos de flecos de luz (FL), media sombra (MS) y sin cobertura (AL). Los valores seguidos por la misma letra por tratamiento no presentan diferencias significativas (Fisher, $P < 0,05$).

2.3.2. Ensayo de sensibilidad a la fotoinhibición

En relación al análisis de los resultados de la fluorescencia modulada de la clorofila, los plantines del tratamiento a 180 PPFD y llevados por 30 min a 200 PPFD en el invernadero presentaron los valores mostrados en la Tabla 8.

Tabla 8. Rendimiento cuántico máximo ($\Phi_{PSII\text{máx}}$), Tasa de transporte de electrones (ETR), Atenuación no-fotoquímica (NPQ) y producción de Oxígeno (Prod O₂) ($\mu\text{L g}^{-1} \text{min}^{-1}$), obtenidos a partir de las mediciones efectuadas sobre plantines de Ciprés de la Cordillera luego de permanecer 30 min a 200 PPFD en el invernadero. (Valores de fluorescencia adimensionales excepto ETR $\mu\text{mol electrones m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

Tratamiento	n	$\Phi_{PSII\text{máx}}$	ETR	NPQ	Prod O ₂
cámara (180 PPFD)	3	0,835 ±0,01	57,32 ±0,79	0	7,89 ±0,89

De los resultados obtenidos, en los tratamientos expuestos a 1000 PPFD, pudo observarse que el rendimiento cuántico máximo ($\Phi_{PSII\text{máx}}$) no presentó diferencias significativas entre tratamientos en ninguna de los experimentos (cámara e invernadero), tanto para las mediciones tomadas a los 30 min (Tabla 9 A y B), como para las tomadas a los 90 min (Tabla 10 A y B), presentando un valor general promedio de 0,75.

Tabla 9. Rendimiento cuántico máximo ($\Phi_{PSII\text{máx}}$), obtenidos a partir de las mediciones de fluorescencia modulada de la clorofila efectuadas sobre plantines de Ciprés de la Cordillera. (A) Determinación en Cámara de cultivo luego de permanecer 30 min a 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PPFD. (B) Determinación en Invernadero luego de permanecer 30 min a 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PPFD. Los valores seguidos por la misma letra por tratamiento no presentan diferencias significativas (Tukey, $P < 0,05$). Se muestran valores promedio, desvío estándar, máximos y mínimos

Cámara de cultivo (exposición 30 min)					A
Tratamiento	n	$\Phi_{PSII\text{máx}}$	Mín	Máx	
Cámara (180 PPFD)	6	0,77 ±0,04 a	0,69	0,79	
Inver. (1000 PPFD)	6	0,79 ±0,03 a	0,74	0,83	

Invernadero (exposición 30 min)					B
Tratamiento	n	$\Phi_{PSII\text{máx}}$	Mín	Máx	
Cámara (180 PPFD)	3	0,72 ±0,02 a	0,70	0,75	
Inver. (1000 PPFD)	3	0,72 ±0,08 a	0,63	0,78	

Tabla 10. Rendimiento cuántico máximo ($\Phi_{PSII\text{máx}}$), obtenidos a partir de las mediciones de fluorescencia modulada de la clorofila efectuadas sobre plantines de Ciprés de la Cordillera. (A) Determinación en Cámara de cultivo luego de permanecer 90 min a $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPFD, (B) Determinación en invernadero luego de permanecer 90 min a $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPFD. Los valores seguidos por la misma letra por tratamiento no presentan diferencias significativas (Tukey, $P < 0,05$). Se muestran valores promedio, desvío estándar, máximos y mínimos.

Cámara de cultivo (exposición 90 min) A				
Tratamiento	n	$\Phi_{PSII\text{máx}}$	Mín	Máx
Cámara (180PPFD)	6	0,77 \pm 0,03 a	0,73	0,80
Inver. (1000 PPFD)	6	0,76 \pm 0,03 a	0,71	0,80

Invernadero (exposición 90 min) B				
Tratamiento	n	$\Phi_{PSII\text{máx}}$	Mín	Máx
Cámara (180 PPFD)	3	0,74 \pm 0,02 a	0,73	0,76
Inver. (1000 PPFD)	3	0,71 \pm 0,08 a	0,63	0,79

La disipación térmica de energía a nivel del FSII o atenuación no fotoquímica (NPQ) al igual que lo mostrado por el $\Phi_{PSII\text{máx}}$ no presentó diferencias significativas entre los tratamientos, en ninguna de los experimentos para ambos tiempos de exposición (Tabla 11 A y B; 12 A y B). Todos los valores tomados fueron bajos, variando entre 0 y 0,5.

Tabla 11. Atenuación no-fotoquímica (NPQ), obtenidos a partir de las mediciones de fluorescencia modulada de la clorofila efectuadas sobre plantines de Ciprés de la Cordillera. (A) Determinación en Cámara de cultivo luego de permanecer 30 min a $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPFD. (B) Determinación en Invernadero luego de permanecer 30 min a $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPFD. Los valores seguidos por la misma letra por tratamiento no presentan diferencias significativas (Tukey, $P < 0,05$). Se muestran valores promedio, desvío estándar, máximos y mínimos.

Cámara de cultivo (exposición 30 min) A				
Tratamiento	n	NPQ	Mín	Máx
Cámara (180 PPFD)	6	0,18 \pm 0,42 a	0	0,68
Inver. (1000 PPFD)	6	0,44 \pm 0,42 a	0	1,23

Invernadero (exposición 30 min) B					
Tratamiento	Variable	n	NPQ	Mín	Máx
Camara (180 PPFD)		3	0,03 \pm 0,05 a	0	0,03
Inver. (1000 PPFD)		3	0,22 \pm 0,29 a	0	0,43

Tabla 12. Atenuación no-fotoquímica (NPQ), obtenidos a partir de las mediciones de fluorescencia modulada de la clorofila efectuadas sobre plantines de Ciprés de la Cordillera. (A) Determinación en Cámara de cultivo luego de permanecer 90 min a 1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPFD, (B) Determinación en invernadero luego de permanecer 90 min a 1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPFD. Los valores seguidos por la misma letra por tratamiento no presentan diferencias significativas (Tukey, $P < 0,05$). Se muestran valores promedio, desvío estándar, máximos y mínimos.

Cámara de cultivo (exposición 90 min) A				
Tratamiento	n	NPQ	Mín	Máx
Cámara (180 PPFD)	6	0,33 \pm 0,41 a	0	1,07
Inver. (1000 PPFD)	6	0,48 \pm 0,92 a	0	2,22

Invernadero (exposición 90 min) B				
Tratamiento	n	NPQ	Mín	Máx
Cámara (180 PPFD)	3	0,32 \pm 0,33 a	0	0,62
Inver. (1000 PPFD)	3	0,23 \pm 0,65 a	0	0,98

El ETR se diferenció con respecto a los tiempos de exposición (30 y 90 min), mostrando sólo diferencias significativas para las exposiciones de 30 min entre las medidas hechas en invernadero y cámara ($p < 0,0065$) (Tabla 13 A y B), mientras que en las exposiciones de 90 min no se presentaron diferencias (tabla 14 A y B).

Tabla 13. Tasa de transporte electrónico (ETR), obtenidos a partir de las mediciones de fluorescencia modulada de la clorofila efectuadas sobre plantines de Ciprés de la Cordillera. (A) Determinación en Cámara de cultivo luego de permanecer 30 min a 1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPFD. (B) Determinación en Invernadero luego de permanecer 30 min a 1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPFD. Los valores seguidos por la misma letra por tratamiento no presentan diferencias significativas (Tukey, $P < 0,05$). Se muestran valores promedio, desvío estándar, máximos y mínimos.

Experiencia en cámara de cultivo (exposición 30 min) A				
Tratamiento	n	ETR	Mín	Máx
Cámara (180 PPFD)	6	183,39 \pm 36,83 ab	147,9	246,9
Inver. (1000 PPFD)	6	199,11 \pm 34,39 a	155,55	256,3

Experiencia en invernadero (exposición 30 min) B				
Tratamiento	n	ETR	Mín	Máx
Cámara (180 PPFD)	3	112,2 \pm 26,26 c	92,23	142
Inver. (1000 PPFD)	3	123,96 \pm 36,44 bc	82,03	147,9

Tabla 14. Tasa de transporte electrónico (ETR), obtenidos a partir de las mediciones de fluorescencia modulada de la clorofila efectuadas sobre plantines de Ciprés de la Cordillera. (A) Determinación en Cámara de cultivo luego de permanecer 90 min a 1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPFD, (B) Determinación en invernadero luego de permanecer 90 min a 1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPFD. Los valores seguidos por la misma letra por tratamiento no presentan diferencias significativas (Tukey, $P < 0,05$). Se muestran valores promedio, desvío estándar, máximos y mínimos.

Experiencia en cámara de cultivo (exposición 90 min) A				
Tratamiento	n	ETR	Mín	Máy
Cámara (180 PPFD)	6	184,59 \pm 41,98 a	133,88	244
Inver. (1000 PPFD)	6	207,83 \pm 55,48 a	119,43	276,7

Experiencia en invernadero (exposición 90 min) B				
Tratamiento	n	ETR	Mín	Máy
Cámara (180 PPFD)	3	137,42 \pm 51,12 a	81,18	181,1
Inver. (1000 PPFD)	3	160,51 \pm 60,59 a	95,2	215,9

Los resultados de las mediciones de producción de oxígeno mostraron un comportamiento similar a los valores de fluorescencia, no presentando diferencias entre los tratamientos (Tabla 15).

Tabla 15. Producción de oxígeno expresados en $\mu\text{L g}^{-1} \text{min}^{-1}$, obtenidos a partir de las mediciones efectuadas sobre plantines de Ciprés de la Cordillera. (A) Determinación en Cámara de cultivo luego de permanecer 30 min a 1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPFD. (B) Determinación en Invernadero luego de permanecer 30 min a 1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPFD. Los valores seguidos por la misma letra por tratamiento no presentan diferencias significativas (Tukey, $P < 0,05$). Se muestran valores promedio, desvío estándar, máximos y mínimos.

Cámara de cultivo (exposición 30 min) A				
Tratamiento	n	Media	Mín	Máy
Cámara (180 PPFD)	5	68,92 \pm 23,22 a	54,81	110,06
Inver. (1000 PPFD)	5	79,67 \pm 18,32 a	61,91	100,89

Invernadero (exposición 30 min) B				
Tratamiento	n	Media	Mín	Máy
Cámara (180 PPFD)	3	64,75 \pm 8,82 a	55,03	72,23
Inver. (1000 PPFD)	3	66,26 \pm 11,63 a	53,13	75,24

Por último, con respecto a los tiempos de exposición ninguno de los tratamientos aplicados se diferenció significativamente entre los valores obtenidos a los 30 min y a los 90 min, para ninguna de las variables analizadas de la fluorescencia modulada de la clorofila ($\Phi_{\text{PSII máx}}$, NPQ, Φ_{PSII} y ETR).

2.4. DISCUSIÓN

Todas las variables morfológicas usadas para evaluar el desarrollo de los plantines de Ciprés de la Cordillera, mostraron una mejor respuesta con el tratamiento FL, presentando mayores valores de altura, diámetro de tallo y biomasa (BSA, BSR y BST) que los plantines tratados a plena luz y con sombreo difuso. Con respecto a la altura, el tratamiento MS generó mayores crecimientos que el tratamiento AL, comportamiento que concuerda con los resultados obtenidos por Letourneau (2006), donde el desarrollo en altura de plantines de Ciprés de la Cordillera sometidos a distintas intensidades de sombreo de luz difusa (generados por malla media sombra), fue directamente proporcional a la intensidad de sombreo de la misma.

Si bien existe abundante información en relación a la influencia de distintas irradiancias sobre la dinámica de crecimiento de las plantas (Quero *et al.* 2006, Letourneau 2006, Coopman *et al.* 2008, Campanello *et al.* 2011, Dengel *et al.* 2015, Collin *et al.* 2017), estudios que permitan contrastar los resultados obtenidos por las distintas dinámicas de sombreo en vivero (e.g. sombra difusa –sombra en flecos de luz) son escasos. Algunos autores señalan que las especies de árboles tropicales tolerantes a la sombra requieren de un estrecho rango de tamaños de flecos de luz para crecer, asociado con ciertos niveles de radiación solar (Denslow 1980, Tuomela *et al.* 1996, Myers *et al.* 2000). En tanto que para flecos o abertura de mayor tamaño, las especies pioneras, con mayores tasas de crecimiento y plasticidad ecofisiológica presentan mayores ventajas competitivas (Denslow 1980). Por otro lado, se ha observado que las plantas ajustan sus aparatos fotosintéticos a las irradiancias experimentadas durante su crecimiento (Krause *et al.* 2001, Larcher 2003). Coopman (2008) menciona que la transición desde los ambientes sombreados hacia los de sol ocurre durante las primeras etapas del desarrollo y señala que en investigaciones previas fue encontrado que plantines de *Nothofagus nitida* muestran respuestas fotosintéticas típicas de plantas de sombra, mientras que en árboles adultos esta especie muestra respuestas fotosintéticas características de plantas de sol. Poorter *et al.* (2005) señalan que es común encontrar transiciones dentro de una especie de sombra a sol a lo largo de su

desarrollo. Este comportamiento concuerda con el descrito para Ciprés de la Cordillera (Constantino 1949, Lebedeff 1942, Rovere 1991, Kitzberger *et al.* 2000, Letourneau *et al.* 2004). En esta línea, Gyenge *et al.* (2007) trabajando con plantines de *A. chilensis*, señalan que si bien el ciprés comparte algunas características fisiológicas con especies tolerantes a la sombra, también muestra características, como por ejemplo bajos valores de rendimiento cuántico aparente ($0,023 \mu\text{mol CO}_2 \mu\text{mol fotones}^{-1}$), donde la tasa fotosintética neta (A_n) esta limitada por la luz, que pueden ser perjudiciales en microambientes sombreados, mencionando que los microambientes con sombreados intermedios pueden ser los más adecuados para el crecimiento de plantines de esta especie. Los resultados de crecimiento obtenidos en este trabajo están en concordancia con la expectativa mencionada.

Los tratamientos ensayados tuvieron efecto sobre las características morfológicas de los plantines. Se sabe que las hojas reflejan su aclimatación a la irradiación en su anatomía interna (Tucker y Emmingham 1977 en Waring y Schlesinger 1985; Sharew *et al.* 1996; Uemura *et al.* 2000), resultando en que el área foliar por unidad de biomasa invertida en ellas o área foliar específica (AFE) aumenta a valores decrecientes de luz (Bond *et al.* 1999; James y Bell 2000; Evans y Poorter 2001). Este comportamiento también fue observado por Letourneau *et al.* (2004), ellos obtuvieron mayores valores de AFE en plantas crecidas bajo sombra. Ambos tratamientos de sombreado (FL y MS) presentaron mayores valores de AFE diferenciándose del tratamiento AL, el cual mostró valores menores. Es interesante observar que esta variable no se vio influenciada por los tipos de cobertura ensayados, presentando para ambos casos la respuesta típica de plantas de sombra. Wika *et al.* (2012) señalan especialmente al AFE, como un índice integrador de la estructura foliar particularmente sensible a la condición de luz, pero que en las especies de coníferas mostró menor sensibilidad que en las especies deciduas de hoja ancha.

En el presente estudio la variable para caracterizar la morfología de las hojas (DMHO) diferenció los plantines tratados con coberturas de flecos de luz (FL) de los plantines de los otros dos tratamientos, presentando un DMHO un 23 % mayor al de los plantines cultivados bajo tela media sombra (MS) y un 41

% mayor al de los del tratamiento sin cobertura (AL). En su trabajo con plantines de Ciprés de la Cordillera, Letourneau (2006) observó que el DMHO de las plantas crecidas bajo cobertura alta (8 % de fracción de la intensidad lumínica) fue un 106 % mayor que las hojas de sol, mientras que los tratamientos de cobertura media (41 % de la fracción de la irradiancia) presentaron valores un 32 % mayores, obteniendo similares resultados en las experiencias realizadas en renovales naturales, los que redujeron el tamaño de las hojas a medida que aumentó la irradiancia. Sorprendentemente en este estudio, los plantines del tratamiento de flecos de luz (FL) se comportaron como individuos sometidos a altas coberturas de sombreado, en lo que respecta a la respuesta de esta variable, superando en sus valores de DMHO a las hojas del tratamiento bajo media sombra (MS). Otra diferencia encontrada con respecto a lo obtenido por Letourneau (2006) fue que el tratamiento MS no mostró diferencias con respecto al AL. Esto pudo deberse al escaso tiempo de desarrollo del ensayo y el estado ontogénico de las plantas (sólo una temporada de crecimiento) el cual fue insuficiente para que la arquitectura morfológica foliar de los individuos del tratamiento AL pudiera desarrollarse en plenitud, lo que se vio evidenciado en la falta de formación de hojas opuestas, sólo pudiéndose evaluar para esta variable 5 plantines, mientras que se evaluaron 14 y 15 en los tratamientos de MS y FL respectivamente.

En relación a la asignación de biomasa (BSA/BSR), variable utilizada para evaluar la incidencia de los distintos tratamientos sobre las estrategias de los plantines en relación a la designación de recursos a sus partes de transpiración y de absorción. Autores como Waring y Schlesinger (1985) y Fullbright *et al.* (1997) mencionan que a nivel de planta, los bajos niveles de luz fotosintéticamente activa (PAR, 400-700 nm de longitud de onda) pueden alterar la proporción de biomasa total que ésta invierte en hojas a costa de reducir el crecimiento de sus raíces, resultando en una compensación de la reducción lumínica a través de un aumento del área fotosintética. Si bien los valores de AFE y DMHO mostrados por los plantines tratados bajo la cobertura de flecos, es típica de plantas aclimatadas a la sombra, las respuestas mostradas por los plantines de este mismo tratamiento (FL) en relación a la asignación de biomasa (BSA/BSR) las ubica como plantas típicas de sol,

presentando valores de asignación más balanceados ($0,94 \pm 0,10$) que los mostrados por los plantines de los tratamientos MS ($1,27 \pm 0,22$), los que expresaron el desbalance típico de las plantas aclimatadas a la sombra. Letourneau (2006) observó que al cabo de tres años, plantines de *A. chilensis* criados sin cobertura asignaron una menor proporción de la biomasa producida a la parte aérea en relación a los tratamientos de cobertura media y alta, con cocientes tallo / raíz de $1,6 \pm 0,7$; $2,5 \pm 0,8$ y $3,8 \pm 0,7$ para valores de sombreado crecientes.

Las condiciones de luz durante el crecimiento pueden modificar la capacidad de las plantas de transportar agua a las hojas, principalmente a través de cambios en el área xilemática y/o cambios del área foliar. Esto da como resultado variaciones de la razón AF/Ax (Campanello 2011). Letourneau *et al.* (2004) observaron sobre regeneración de Ciprés de la Cordillera, mayores valores en las proporciones de asignación entre la parte aérea y radical, y entre área foliar y área del tejido conductivo en lugares sombreados que en los no sombreados. Concordando con este comportamiento, los resultados de este ensayo muestran que los plantines del tratamiento MS fueron los que produjeron los mayores valores de AF/Ax, diferenciándose con el tratamiento AL que presentó los menores valores de este índice. Nuevamente, para esta variable, los plantines que recibieron el tratamiento de flecos (FL) no se comportaron como una planta característica de sombra, mostrando valores intermedios de AF/Ax y sin diferenciarse de los tratamientos MS y AL.

Al analizar los datos obtenidos en las mediciones de fluorescencia modulada de la clorofila sobre plantines de *A. chilensis* de 1 temporada de cultivo, observamos que los valores de las variables funcionales $\Phi_{PSII\text{máx}}$, NPQ y ETR no se diferenciaron entre las distintas exposiciones ensayadas (180 y 1000 PPFd). Solamente se presentó una diferencia significativa entre las mediciones de ETR tomadas a los 30 min de exposición entre las medidas hechas en invernadero y cámara.

En un sentido general, la fotoinhibición es simplemente la disminución de la tasa fotosintética que se produce como consecuencia del daño al aparato fotosintético cuando la hoja recibe una excesiva radiación (Greer 1998). La

caída de la eficiencia máxima del PSII ($\Phi_{PSII\text{máx}}$) acompañada del incremento de F_0 (fluorescencia basal en oscuridad) puede estar indicando procesos de fotoinhibición en respuesta a estrés por altas o bajas temperaturas, estrés hídrico o altas irradiancias (Gamon y Pearcy 1989, Ögren y Sjöström 1990, Groom y Baker 1992, Epron *et al.* 1992). Este índice muestra una clara correlación con el porcentaje de centros funcionales del fotosistema II (Anderson *et al.* 1997), por lo que su disminución es considerada un indicador de pérdida de función (daño) a nivel del aparato fotosintético (Bilger *et al.* 1995).

Los plantines de *A. chilensis* expuestos a diferentes intensidades de luz, no mostraron diferencias con respecto al $\Phi_{PSII\text{máx}}$, evidenciando la ausencia de procesos fotoinhibitorios entre las irradiancias ensayadas (180 y 1000 PPF/D). Por otro lado, los valores de $\Phi_{PSII\text{máx}}$ obtenidos en las distintas experiencias de los tratamientos expuestos a 1000 PPF/D fueron en promedio de $0,76 \pm 0,05$, mientras que las plantas aclimatadas a 180 PPF/D y luego expuestas a 200 PPF/D (tomados como valores de comportamiento básico) presentaron valores de $0,84 \pm 0,01$ en promedio. Esta reducción del $\Phi_{PSII\text{máx}}$ podría estar indicando posibles procesos de fotoinhibición ante exposiciones de elevadas irradiancias. En este sentido los datos mostrados por la variable funcional ETR, aumentando proporcionalmente en los tratamientos expuestos a mayores irradiancias, indicarían que la actividad a nivel tilacoidal no parecería haber sido afectada. Por otro lado, un comportamiento que cabe resaltar en relación a esta variable (ETR), es la reducción de la misma en las mediciones realizadas en invernadero en comparación con las efectuadas en la cámara de crecimiento. Este comportamiento pudo deberse a un proceso de cierre estomático efectuado por el plantín de Ciprés de la Cordillera en situación de invernadero, generando una regulación a la baja de ETR por la disminución de CO_2 intercelular. En relación a lo mencionado, Meyer y Genty 1998 mediante el uso de la fluorescencia de la clorofila, han sugerido que el principal efecto del estrés por sequía es el cierre estomático, resultando en un decrecimiento de la concentración interna de CO_2 , lo cual puede limitar la carboxilación y la actividad fotoquímica.

De la misma manera, ante procesos fotoinhibitorios, también aumentaría la atenuación no fotoquímica (NPQ). De esta forma, la fotoprotección puede ser capaz de prevenir la fotoinactivación, disminuyendo la presión de excitación en el centro de reacción del PSII (Tambussi 2005). En esta experiencia, todos los valores de NPQ expresados por los plantines fueron cercanos a 0, demostrando que en ningún caso se produjeron procesos severos de atenuación no-fotoquímica

Finalmente al evaluar los resultados de las mediciones de actividad fotosintética (medida por la producción de oxígeno), se observó un comportamiento similar a los valores de fluorescencia, no presentándose diferencias entre los tratamientos, a excepción de las mediciones de ETR en invernadero, donde las mismas se vieron reducidas. Como ya se mencionó, las mediciones de producción de O₂ se realizaron en una atmósfera saturada de CO₂, lo que descartaría que el proceso fotosintético pueda ser afectado por una situación de CO₂ limitante provocada por un eventual cierre estomático. En su conjunto los valores obtenidos, tanto en las mediciones de fluorescencia de la clorofila como en la de actividad fotosintética a saturación de CO₂, nos muestran que los plantines de *A. chilensis* no presentan procesos de fotoinhibición ante los cambios de irradiancia planteados en estos experimentos, pero que el proceso fotosintético podría verse afectado por un eventual cierre estomático provocado posiblemente por cambios en las demandas evaporativas del ambiente.

Los resultados obtenidos en este ensayo, mostraron que en relación a la plena exposición al sol y a la incidencia de luz difusa, los ambientes con dinámicas de sombreado en flecos de luz (como los producidos por el tratamiento FL) generaron asignaciones de biomasa (BSA/BSR) y relaciones de área foliar-tejido conductivo (AF/Ax) más balanceadas, como así también micro-ambientes con valores de VPD más moderados (lo que probablemente prevendría el cierre estomático). Por otro lado, esta dinámica de sombreado plantea condiciones de irradiancias alternadas entre los flecos de luz con elevados PPFd y los flecos de sombra con bajos PPFd. En conjunto estas características compondrían las mejores condiciones para el crecimiento de los plantines de *A. chilensis*, moderando los valores de VPD y proveyendo

irradiancias elevadas en los flecos de luz, que pueden ser traducidos por esta especie en crecimiento, ya que no presenta efectos de fotoinhibición ante dichas variaciones de irradiancias.

3

PARTICIPACIÓN DE LAS HORMONAS EN EL DESARROLLO Y ESTRUCTURA RADICAL DURANTE LAS PRIMERAS ETAPAS DE VIVERIZACIÓN DE PLANTINES DE CIPRÉS DE LA CORDILLERA

3.1. INTRODUCCIÓN

Es ampliamente conocido el rol crucial que juegan las fitohormonas en la regulación del crecimiento radical (Moubayidin *et al.* 2009; Ubeda-Tomás *et al.* 2008). Las seis fitohormonas clásicas que muestran estar involucradas en el crecimiento y desarrollo de las plantas incluyen a las auxinas, el ácido abscísico (ABA), brasinoesteroides (BRs), etileno y giberelinas (GA) (Ubeda-Tomás *et al.* 2012). En la actualidad, las auxinas son las hormonas más estudiadas como reguladoras del crecimiento y ramificación radical. Al respecto se ha observado que aumentos en los niveles de auxinas resultan en un mayor desarrollo de raíces laterales, pero también en un restringido crecimiento de la raíz principal, generando así una abultada cabellera radical pero sistemas radicales superficiales (Boerjan *et al.* 1995; Benkova *et al.* 2003). Por otro lado, una disminución en la acumulación de auxinas causa una significativa reducción de la ramificación radical y consecuentemente un pobre desarrollo de la parte aérea (Herder *et al.* 2010). Yang *et al.* (2010) reportaron que el crecimiento de pelos radicales fue estimulado por la aplicación exógena de ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB) o ácido naftalenacético (ANA), puntualizando al AIB en una dosis específica como el que produjo los niveles más elevados de crecimiento.

Otra compuesto químico que es citado como reguladora de crecimiento radical es el óxido nítrico (NO), una molécula multifuncional difundible involucrada en numerosos procesos fisiológicos en especies filogénicamente distantes (Gow y Ischiropoulos 2001). Lamattina *et al.* 2003 mencionan que el NO esta asociado a procesos de crecimiento de las plantas, desarrollo, respuestas fotomorfogénicas y crecimiento de hojas y raíces. Varios

investigadores reportaron la presencia de NO en plantas, actuando como una señal de estrés sobre respuestas adaptativas y mediando procesos de regulación del crecimiento (Gouvea *et al.* 1997, Huang y Knopp 1998 Laxalt *et al.* 1997, Durner *et al.* 1998, Leshem *et al.* 1998, Beligni y Lamattina 2000, 2001a, 2001b). Más recientemente Pagnussat *et al.* (2002) describieron al NO como mediador en los procesos de enraizamiento inducidos por auxinas, proponiendo un modelo para el control de la formación de raíces adventicias en el pepino, en el que el AIA es sintetizado en el brote apical y basipetamente transportado a la base del hipocótilo. Allí, el AIA desencadena una acumulación transitoria de NO, que activa una vía dependiente del guanosin monofato cíclico (GMPc) que conduce a la formación de raíces adventicias (Pagnussat *et al.* 2003). Este mecanismo pone en evidencia la importancia del NO en los procesos de formación radical. En este estudio (Pagnussat *et al.* 2003), los autores también observaron que explantes de pepino tratados con NO fueron capaces de inducir raíces adventicias, del mismo modo que los explantes tratados con AIA. Por otro lado, varios autores confirmaron que el NO estimula el crecimiento radical y el desarrollo de raíces adventicias en especies forestales siempre verdes (Correa Aragunde *et al.* 2007; Fernandez-Marcos *et al.* 2011).

La interacción de las auxinas y el NO en las vías de señalización durante el crecimiento y desarrollo radical fue documentada por varios autores. Kolbert *et al.* (2008) trabajando con *Arabidopsis thaliana* observaron que ante las aplicaciones exógenas de AIB se inducía la iniciación de las raíces laterales y el aumento de los niveles de NO en el primordio de las mismas. En esta misma línea, Yadav *et al.* (2011) mencionan que cuando el transporte polar de auxinas es bloqueado mediante la utilización de un inhibidor específico, la acumulación de NO en células interfasciculares era completamente evitada. Chen *et al.* (2012) probó que la aplicación de nitroprusiato de sodio (NPS)(un dador de NO) imitaba los efectos de las auxinas. A su vez, Gergoff Grozeff *et al.* (2017), observaron que la combinación de NPS y AIB mostró un claro efecto en la formación de raíces secundarias en los estadios tempranos de desarrollo, señalando que el NPS podría ayudar al crecimiento radical, en conjunto con el AIB, sobre los primeros estadios en plantaciones de árboles.

Otro aspecto importante es el mencionado por Jones y Ljung (2012), en el que establecen claramente la influencia de los niveles de concentración en el suelo de NO_3^- , NH_4^+ y fósforo inorgánico (Pi) sobre el transporte y la acumulación de auxinas en distintos órganos de la planta y su efecto sobre la arquitectura del sistema radical. Resaltan también que las auxinas tienen una clara influencia en la actividad del meristema apical radical, el desarrollo de raíces laterales y las adaptaciones al medio, para comprender mejor el funcionamiento de este complejo sistema es necesario considerar la interacción con otros factores de regulación. Lopez Bucio *et al.* (2002) mencionan que el estrés por nutrientes puede afectar la síntesis, transporte o sensibilidad hormonal y en este camino alterar la arquitectura radical. Estos investigadores observaron que el efecto de las auxinas sobre la longitud de la raíz primaria y la densidad de raíces secundarias se incrementaba en plantas crecidas con baja disponibilidad de P en comparación con aquellas crecidas en altas disponibilidades.

Experimentos preliminares realizados en nuestro laboratorio mostraron que el suplemento exógeno de auxinas (AIB en rangos de concentraciones de 0,04 y 0,4 mM) estimula el crecimiento de raíces primarias y la formación de raíces laterales en plántulas de *A. chilensis* de dos meses de edad (datos no publicados). Estos resultados preliminares sugieren que un aumento en el contenido de auxinas podría mejorar el desarrollo temprano de las raíces de las plántulas y consecuentemente afectar su crecimiento inicial general. Sin embargo, las respuestas de la planta en su conjunto al agregado exógeno de auxinas deben ser estudiadas aún.

Por lo expuesto, se plantea la hipótesis de que la aplicación exógena de auxinas en combinación con NO, induce un desarrollo más temprano de las raíces de plántulas de *A. chilensis* y consecuentemente promueve el crecimiento inicial de esta especie. Por otro lado, la técnica de viverización utilizada incorpora al medio de crecimiento elevadas concentraciones de fósforo durante la primera fase de crecimiento, pudiendo esto influir en el efecto de las auxinas sobre la arquitectura y desarrollo radical. Para contrastar esta hipótesis, se estudió la incidencia de distintas concentraciones exógenas de ácido indolbutírico (AIB) y NO en dos disponibilidades de fósforo sobre el

desarrollo del sistema radical de plántulas de *A. chilensis*. Los objetivos específicos fueron (i) evaluar el efecto de tratamientos exógenos con auxinas y NO sobre el desarrollo y la arquitectura del sistema radical, (ii) determinar si cambios en la arquitectura radical influyen en el desarrollo general del plantín, (iii) evaluar si distintas disponibilidades de fósforo influyen en el efecto de las auxinas y el NO.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Material vegetal y ambiente de cultivo

Los experimentos se llevaron a cabo con plántulas de *A. chilensis* generadas a partir de un lote de semillas formado por una mezcla de la cosecha de 16 árboles de un rodal natural de la especie ubicado en la cabecera sur del Lago Futalaufquen, en el Parque Nacional Los Alerces, Provincia de Chubut (42° 54' 32" S, 71° 36' 43" W, 560 m snm). Tanto la limpieza del lote de semilla como el proceso de estratificación de la semilla se realizaron bajo la misma metodología utilizada en los ensayos anteriores.

La siembra se efectuó en bandejas plásticas rellenas con 250 g de arena volcánica esterilizada en estufa a 105 °C durante 24 hs. La arena se humedeció con 100 ml de agua de perforación, se revolvió para homogeneizar la humedad y finalmente se sembró en hilera, colocando alrededor de 100 semillas por bandeja. Realizada la siembra, las bandejas se cubrieron con una bolsa de nylon para evitar la evaporación y se las llevó a una cámara de cultivo a una temperatura constante de 17 ± 1 °C, donde permanecieron por 25 días, tiempo necesario para que se produjera el porcentaje máximo de germinación (Figura 26).



Figura 26. Vista de las bandejas utilizadas para la siembra. Bandeja sin la bolsa de nylon donde se ven los surcos de siembra y otra bandeja con la bolsa colocada, lista para ser llevada a la cámara de germinación.

Una vez producida su emergencia, las plántulas se extrajeron de la arena y les fueron aplicados los distintos tratamientos con hormonas, sumergiendo las radículas en las correspondientes soluciones por un lapso determinado (se detalla más abajo). Luego se repicaron a tubetes de cultivo de 250 ml (DASSPLASTIC®) del mismo tipo que los utilizados en el Ensayo b. Como sustrato se usó una mezcla de turba rubia *Sphagnum* sp. y perlita, en una proporción 2:1. Una vez efectuado el repique de las plántulas a los tubetes, los mismos fueron regados a percolación y colocados sobre una mesada de luz con una irradiancia de $230 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ generada a partir de una batería de tubos fluorescentes, a un fotoperiodo de 14 hs luz / 10 hs oscuridad. La temperatura ambiente estuvo en un rango comprendido entre los 17 y 21 °C durante todo el ensayo.

3.2.2. Manejo de agua y fertirriego.

Luego del riego a percolación con agua realizado posteriormente al repique, las aplicaciones de fertirriego se llevaron a cabo usando el método de las pesadas, fijando tanto para la fase de establecimiento como para la fase de crecimiento rápido el 50 % del peso de agua aprovechable (AA) como indicador para efectuar las aplicaciones. Se eligió utilizar esta condición hídrica debido a

que en el laboratorio la pérdida de agua por evaporación resultó muy baja, y contenidos hídricos elevados podían generar problemas de colonización de musgos en la superficie de los contenedores dificultando las aplicaciones de fertirriego.

Las aplicaciones se efectuaron en forma manual mediante la utilización de una probeta, y la cantidad de solución que se aplicaba a cada contenedor se estableció teniendo en cuenta que la diferencia entre las conductividades eléctricas (CE) de la solución nutritiva de aplicación y la solución colectada del drenado fuera menor a 400 μS . Si esta diferencia aumentaba se incrementaba el volumen de la solución nutritiva a aplicar. En la fase de establecimiento, que se extendió por un lapso de 6 semanas, se usaron las soluciones nutritivas en relación a los tratamientos aplicados. Mientras que para la solución nutritiva utilizada en la fase de crecimiento rápido (8 semanas) se diluyó en un litro de agua 0,265 g de fertilizante COMPO® HAKAPHOS rojo (18-18-18) y 0,02 ml de ácido fosfórico al 85 %, alcanzándose una concentración de nitrógeno = 48 mg L^{-1} , de fósforo = 34 mg L^{-1} y de potasio = 50 mg L^{-1} .

3.2.3. Tratamientos

Los tratamientos se formaron por la combinación de siete niveles del factor hormonas con dos niveles del factor fósforo. Los niveles del factor hormona estuvieron dados por dos concentraciones de ácido indolbutírico (AIB), nitroprusiato de sodio (NPS) (como dador de óxido nítrico (NO)) en una concentración, la combinación de ellos, NPS foto-inactivado (\odot NPS) y un testigo con agua destilada. Mientras que los dos niveles de disponibilidad del fósforo estuvieron dados por: 1) solución nutritiva P1, con concentraciones de nitrógeno= 31 mg L^{-1} , fósforo= 1 mg L^{-1} y potasio= 41 mg L^{-1} , llegando a estos valores a través de la dilución de 0,065 g de nitrato de potasio; 0,19 g de nitrato de magnesio y 0,02 ml de ácido fosfórico al 85 % por litro de agua; y 2) solución nutritiva P100, con una concentración de nitrógeno= 33 mg L^{-1} , fósforo= 98 mg L^{-1} y potasio= 68 mg L^{-1} , obteniéndose estas concentraciones mediante la dilución en 1 litro de agua de 0,3 g de fosfato monoamónico; 0,26 g de fosfato monopotásico y 0,02 ml de ácido fosfórico al 85 %. Mediante un arreglo factorial se obtuvieron 14 tratamientos (Tabla 16).

Debido a que la dilución del AIB se debió hacer en 5 ml de etanol, este mismo volumen fue agregado en todos los tratamientos, contemplándolo en la fase líquida de las distintas diluciones. Para producir la inactivación del NPS se dejó la solución expuesta a la luz solar, tomando como indicador de la foto-inactivación el viraje de un color rojizo traslucido (NPS activado) a un verde azulado (NPS inactivado), proceso que se dio en un lapso de 4 a 6 hs de exposición (Figura 27 a y b).

Tabla 16. Concentraciones de ácido indolbutírico (AIB), nitroprusiato de sodio (NPS) y fósforo usados en los tratamientos aplicados en el ensayo de *A. chilensis* con hormonas.

Tratamiento	Concentraciones de AIB y/o NPS (Molaridad)	Concentración de fósforo expresada en mg L ⁻¹
(t-P1)	Agua destilada	1
(↑AIB-P1)	0,4 mM de AIB	1
(↓AIB-P1)	0,04 mM de AIB	1
(NPS-P1)	1 mM de NPS	1
(☼NPS-P1)	1 de NPS mM foto-inactivado	1
(↑AIB+NPS-P1)	0,4 mM de AIB + 1 mM de NPS	1
(↓AIB+NPS-P1)	0,04 mM de AIB + 1 mM de NPS	1
(t-P100)	Agua destilada	98
(↑AIB-P100)	0,4 mM de AIB	98
(↓AIB-P100)	0,04 mM de AIB	98
(NPS-P100)	1 mM de NPS	98
(☼NPS-P100)	1 de NPS mM foto-inactivado	98
(↑AIB+NPS-P100)	0,4 mM de AIB + 1 mM de NPS	98
(↓AIB+NPS-P100)	0,04 mM de AIB + 1 mM de NPS	98

La aplicación de los tratamientos de AIB se efectuó embebiendo las radículas de las plántulas en las distintas soluciones por un lapso de 5 min (Figura 28). Para el caso de los tratamientos con NPS las radículas de las plántulas se dejaron en contacto con la solución durante toda la noche. Mientras que en los tratamientos que combinaban AIB + NPS, luego de pasar la noche embebidas en la solución de NPS, se las sumergió por 5 min en la solución de AIB. Finalmente para el tratamiento testigo se dejaron las radículas

en contacto con el agua destilada durante 5 min. Una vez aplicados los distintos tratamientos, las plántulas se repicaron a los contenedores para ser llevados a la mesada de luz (Figura 29).



Figura 27. Vista de la aplicación de los tratamientos de nitroprusiato de sodio (NPS) en las plántulas de Ciprés de la Cordillera previamente a ser repicadas. (a) Tratamiento de NPS. (b) Tratamiento de NPS foto-inactivado, donde se observa el viraje de color.

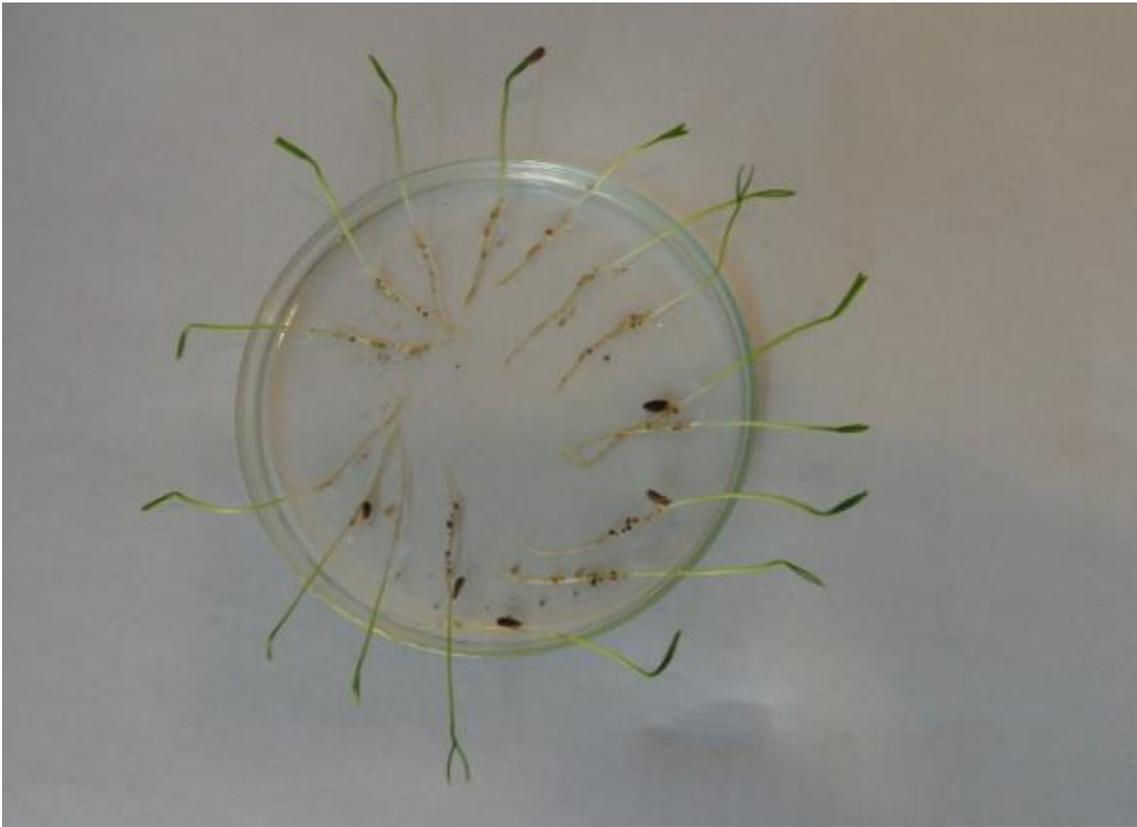


Figura 28. Vista de plántulas de Ciprés de la Cordillera donde se observa la aplicación del tratamiento con AIB mediante la inmersión de la radícula en la solución.

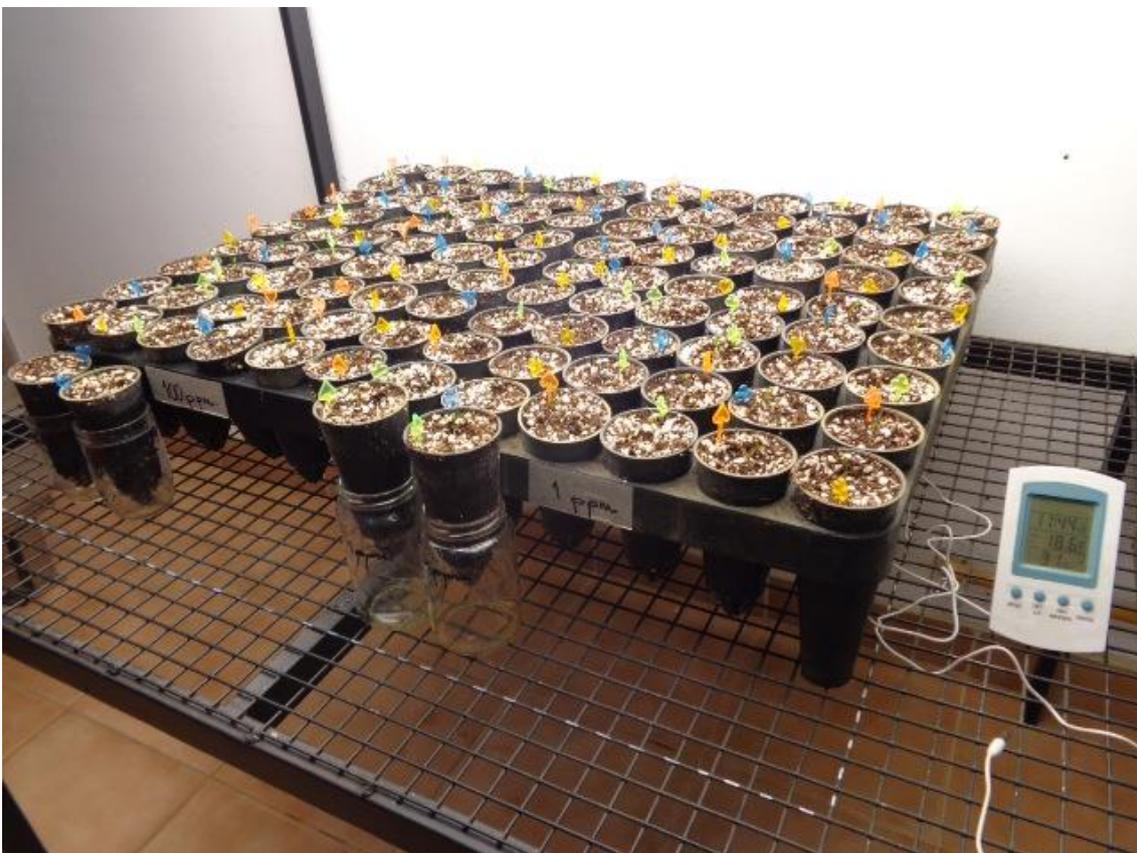


Figura 29. Vista de las bandejas portatubetes ubicadas en la mesada de luz. La línea punteada sobre la malla metálica delimita la zona de irradiancia homogénea.

3.2.4. Variables analizadas

Se midieron variables morfológicas de crecimiento en la parte aérea y radical de los plantines, al finalizar la fase de crecimiento rápido del primer ciclo vegetativo. Todas las variables fueron analizadas sobre 8 réplicas por tratamiento.

Se determinó la altura del plantín como la distancia desde la base del tallo (cuello) hasta el ápice del eje primario de la planta. Esta variable se midió con un calibre digital, con una precisión de 0,01 mm.

Para la determinación de la biomasa, a los plantines seleccionados se les lavaron los sistemas radicales para eliminarles restos de sustrato adherido y se secaron cuidadosamente. Posteriormente se seccionaron, separando la parte aérea de la radical, colocándolas en bolsas de papel rotuladas en forma independiente, y se llevaron a estufa a 70 ± 2 °C hasta peso constante. Para determinar los pesos se utilizó una balanza digital con una precisión de 0,01 g. La biomasa total (BST) se determinó mediante la suma de los pesos de la parte aérea (BSA) y la radical (BSR).

La arquitectura radical se definió mediante la clasificación de la raíz primaria (RPv), identificándola como viva o muerta y realizando el conteo de las ramificaciones laterales de primer orden (LR) y de segundo orden (LRs). Para ello, luego de efectuar la limpieza de las raíces con agua para despojar a la misma de cualquier resto de sustrato, el sistema radical se extendió en un plano sobre un vidrio con fondo blanco, para facilitar su análisis y conteo de las raíces.

3.2.5. Diseño experimental y análisis estadístico

El ensayo descrito se repitió dos veces en el tiempo, iniciando en ambos casos desde la siembra de la semilla, tomando para el análisis a dichas repeticiones como bloques temporales. Los 14 tratamientos obtenidos del arreglo factorial, con 8 réplicas por tratamiento, se trabajaron dentro de cada bloque totalmente aleatorizados. La unidad muestral la conformó el plantín, analizándose por bloque 112 plantines y un total de 224 en todo el ensayo.

Para comprobar el efecto de los tratamientos se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) para cada una de las variables, considerando un modelo lineal en cada caso, a excepción de la variable RPv que se analizó mediante un modelo lineal generalizado por tratarse de una variable binaria (viva-muerta). En los casos en que se encontraron diferencias entre los tratamientos se utilizó el test de LSD Fisher ($\alpha = 0,05$, con corrección de Bonferroni) para identificar los tratamientos diferenciales. El procesamiento de los datos se realizó con el programa estadístico InfoStat/ Profesional, versión 2016.

3.3. RESULTADOS

El análisis de la interacción de los factores no fue significativo ($P > 0,05$) para todas las variables analizadas, por lo que los mismos actuaron en forma independiente.

3.3.1. Parámetros morfológicos

La altura media de todas las plántulas del ensayo al término de la fase de crecimiento rápido fue de $50,08 \pm 10,54$ mm. Los niveles del factor concentración de fósforo se diferenciaron ($p = 0,009$), presentando mayor altura las plantas tratadas con la menor concentración (Tabla 17). El factor hormonas también presentó diferencias significativas ($p = 0,0001$), expresándose estas particularmente entre las plantas tratadas con NPS (que presentó los menores crecimientos) y el resto de los niveles del factor (Tabla 18).

Tabla 17. Altura promedio de plantines de Ciprés de la Cordillera sometidos a los diferentes niveles del factor concentración fósforo ensayados. Los valores seguidos por la misma letra por nivel del factor no presentan diferencias significativas ($\alpha = 0,05$). Se muestran valores promedio \pm desvío estándar.

Fósforo	Altura (mm)
P1	$51,8 \pm 9,45$ a
P100	$48,33 \pm 10,94$ b

Tabla 18. Altura promedio de plantines de Ciprés de la Cordillera sometidos a los diferentes niveles del factor hormonas ensayados. Los valores seguidos por la misma letra por nivel del factor no presentan diferencias significativas ($\alpha= 0,05$).

Valores promedio \pm desvío estándar	
Hormona	Altura (mm)
\uparrow AIB+NPS	53,89 \pm 9,58 a
NPS	51,95 \pm 6,96 a
\downarrow AIB	51,24 \pm 9,55 a
agua	51,18 \pm 6,19 a
\uparrow AIB	50,08 \pm 8,73 a
\downarrow AIB+NPS	49,76 \pm 11,86 a
\odot NPS	41,44 \pm 14,25 b

La BSA presentó un valor promedio para todo el ensayo de $0,06 \pm 0,03$ g. El factor concentración de P no presentó diferencias ($p= 0,066$), mientras que en el factor hormona el nivel que mostró mayor crecimiento (\uparrow AIB+NPS) se diferenció ($p= 0,034$) del nivel que menos creció (\odot NPS), presentando valores de $0,06 \pm 0,03$ g y $0,04 \pm 0,03$ g respectivamente (Figura 30). Tanto la BSR como la BST no presentaron diferencias entre los niveles de los factores analizados, mostrando valores promedio de $0,02 \pm 0,01$ g y $0,08 \pm 0,03$ g respectivamente.

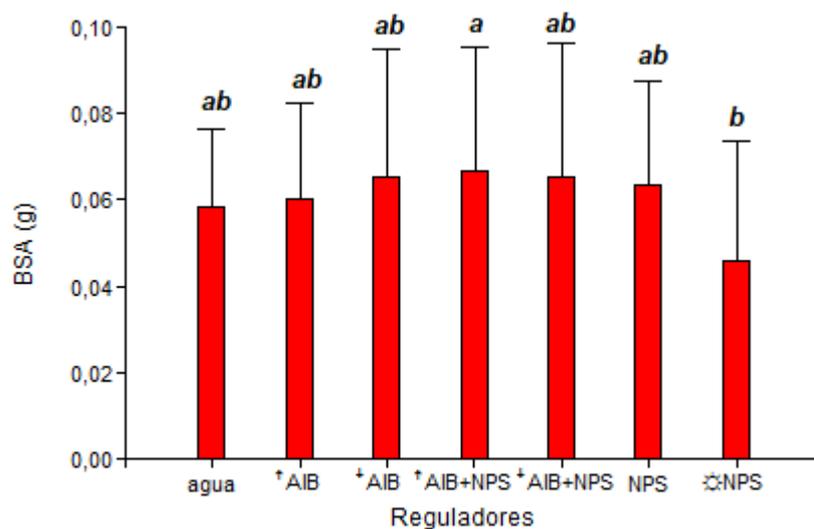


Figura 30. Biomasa aérea (BSA) de plantines de Ciprés de la Cordillera en relación a los distintos niveles de hormonas ensayados. Los valores seguidos por la misma letra por tratamiento no presentan diferencias significativas ($\alpha= 0,05$).

3.3.2. Arquitectura radical

La RPv presentó diferencias entre los niveles de ambos factores. En el caso del fósforo ($p= 0,0003$) el P1 presentó la mayor cantidad de RPv (Figura 31). Mientras que para el caso de las hormonas ($P< 0,0001$), el NPS fue el que mostró la menor cantidad de RPv, diferenciándose del resto de los tratamientos (Figura 32).

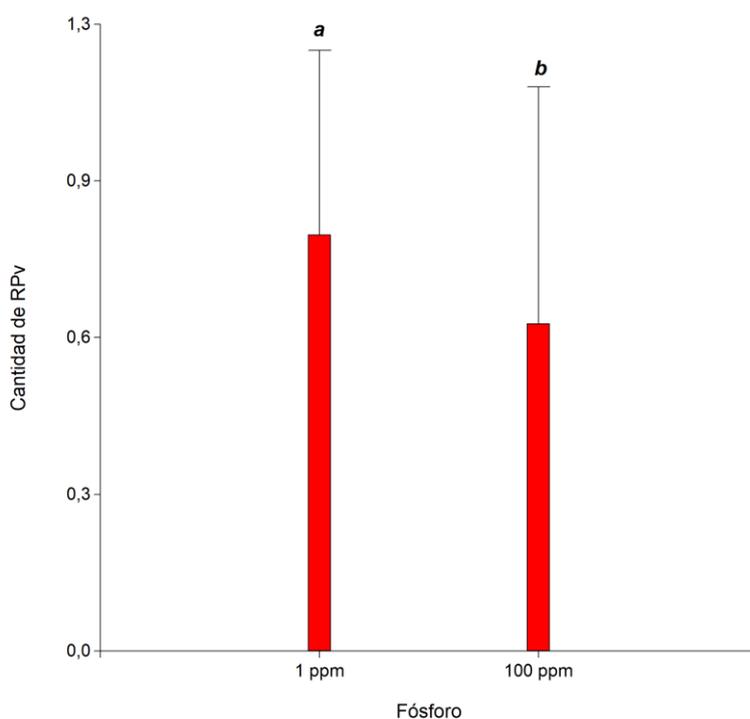


Figura 31. Cantidad de raíz primaria viva (RPv) de los plantines de Ciprés de la Cordillera en relación a los distintos niveles de concentración de fósforo. Los valores seguidos por la misma letra por tratamiento no presentan diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

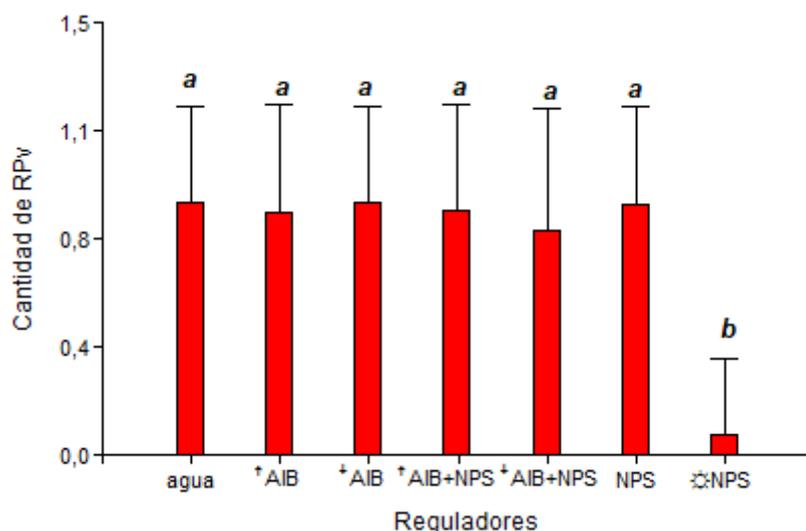


Figura 32. Cantidad de raíz primaria viva (RPv) de los plantines de Ciprés de la Cordillera en relación a los distintos niveles aplicados del factor hormona. Los valores seguidos por la misma letra por tratamiento no presentan diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

La cantidad promedio para todo el ensayo de raíces laterales de primer orden (LR) fue de $9,11 \pm 4,39$. Sólo presentó diferencias significativas el factor hormona ($p < 0,0001$), mostrando la menor cantidad de raíces el nivel ☼NPS con una media de $2,86 \pm 1,35$, diferenciándose del resto de los niveles (Figura 33).

En el caso de las raíces de segundo orden (LRs), la cantidad promedio para el ensayo fue de $8,53 \pm 8,17$. Tanto el factor concentración de fósforo como el de hormonas presentaron diferencias significativas ($p = 0,016$ y $p = 0,033$ respectivamente). En el caso del factor fósforo la mayor generación de ramificación terciaria la presentó el nivel de menor concentración (1 mg L^{-1}) presentando valores medios de $9,82 \pm 8,34$, en tanto que el nivel de mayor concentración (98 mg L^{-1}) mostró valores medios de $7,16 \pm 7,81$. Mientras que para el factor hormona, sólo se diferenciaron entre el testigo y el ☼NPS (Figura 34), siendo este último el de mayor desarrollo de estructura radical terciaria mostrando un valor promedio de $13,36 \pm 10,46$.

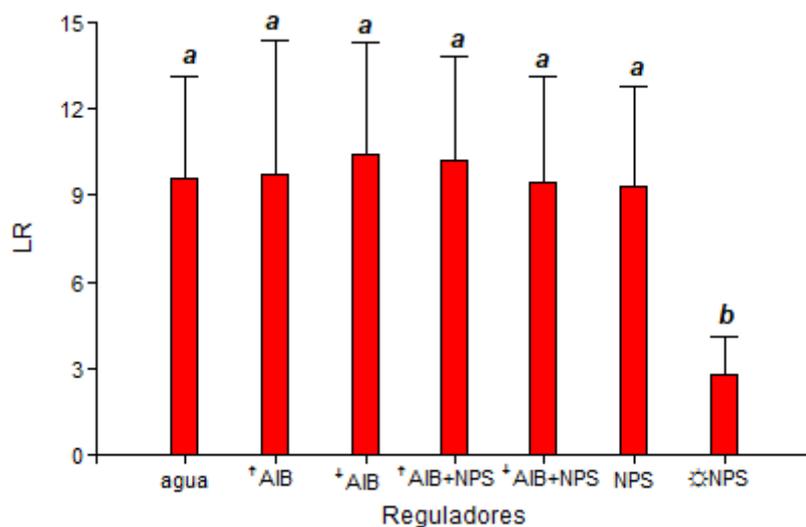


Figura 33. Cantidad de raíces laterales de primer orden (LR) de los plantines de Ciprés de la Cordillera en relación a los distintos niveles de hormonas ensayados. Los valores seguidos por la misma letra por tratamiento no presentan diferencias significativas ($\alpha = 0,05$).

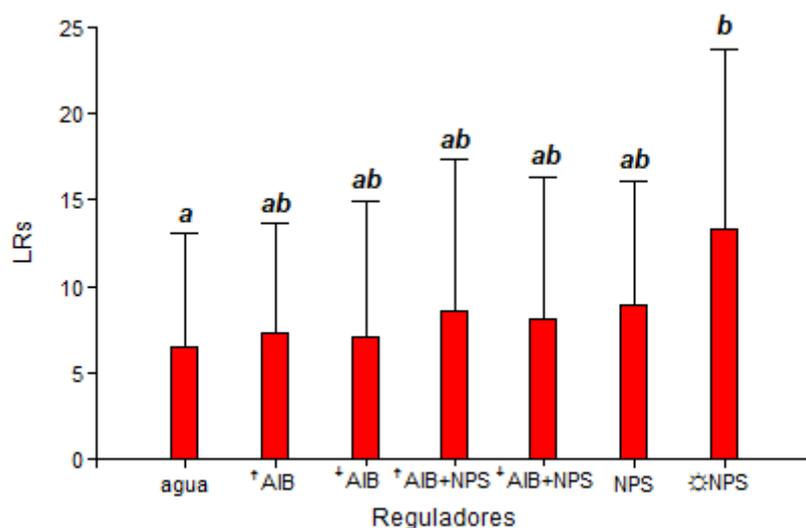


Figura 34. Cantidad de raíces laterales de segundo orden (LRs) de los plantines de Ciprés de la Cordillera en relación a los distintos niveles de hormonas ensayados. Los valores seguidos por la misma letra por tratamiento no presentan diferencias significativas ($\alpha = 0,05$).

Por último, al analizar la estructura radical total se observó que el factor fósforo presentó diferencias ($p = 0,023$) desarrollando mayor cantidad de raíces el nivel de menor concentración (1 mg L^{-1}), en contraste con el nivel de mayor concentración (98 mg L^{-1}) (Tabla 19). El factor hormona no presentó diferencias significativas entre sus niveles ensayados, mostrando valores medios de $17,22 \pm 1,08$.

Tabla 19. Valor promedio de la cantidad total de raíces de plantines de Ciprés de la Cordillera sometidos a los diferentes niveles ensayados del factor concentración fósforo. Los valores seguidos por distintas letras representan diferencias significativas ($\alpha= 0,05$) entre los niveles del factor.

Concentración de P (mg L ⁻¹)	Cantidad total de raíces
1	18,53 ±8,51a
98	15,94 ±8,02b

3.4. DISCUSIÓN

Existen marcadas discrepancias entre las conclusiones de varias experiencias que apuntaron a determinar el rol de las hormonas en las respuestas adaptativas de la arquitectura radical en condiciones de inanición de fósforo. Algunos autores han sugerido, en experiencias realizadas sobre *Arabidopsis thaliana*, que las auxinas no tienen una participación crucial en las modificaciones de la longitud total o la ramificación lateral del sistema radical en plantas crecidas en condiciones de bajo fósforo (Trull *et al.*, 1997; Williamson *et al.*, 2001). López-Bucio (2005) propone que solamente algunos aspectos de la respuesta de la arquitectura radical a la disponibilidad de fósforo (e.g. el desarrollo de ramificación lateral) están bajo el control de las auxinas, mientras que otros (e.g. la inhibición del crecimiento de la raíz principal) son independientes del control por auxinas. En forma contraria, una fuerte participación de la señalización de auxinas se ha propuesto a partir de estudios que indicaron que la disponibilidad de fósforo altera significativamente la longitud total, la densidad de raíces laterales y la tasa de elongación, sobre plantas mutantes para la síntesis o transporte de auxinas y plantas salvajes tratadas con auxinas de *Arabidopsis thaliana* (López-Bucio *et al.*, 2002; Al-Ghazi *et al.*, 2003, Nacry *et al.*, 2005). En esta misma línea, Jones y Ljung (2012) señalan que en condiciones de bajo fósforo inorgánico (Pi) la elongación de la raíz primaria es inhibida y el desarrollo de raíces laterales aumenta, produciéndose también una redistribución de las auxinas a través del sistema radical, proponiendo que es la proteína SIZ1 la involucrada en la redistribución

de auxinas que ocurre en respuesta a bajas disponibilidades de Pi, regulando de esta manera la arquitectura radical.

En este ensayo no se observó una interacción entre las disponibilidades de fósforo y los distintos tratamientos de hormonas ensayados: ambos factores actuaron en forma independiente. Esta respuesta pudo haber estado influenciada por el modelo de estudio utilizado, en el que las plántulas fueron crecidas en contenedores con autopoda basal lo cual produjo un evento de deshidratación del meristema apical radical, tanto de la raíz principal en un primer término como de las laterales posteriormente, pudiendo este efecto desencadenar disparadores a nivel hormonal, impactando finalmente sobre el desarrollo de la arquitectura radical y enmascarando una posible interacción entre los factores estudiados. En relación a lo mencionado, Poorter *et al.* (2012) en un meta-análisis realizado sobre el efecto del tamaño del contenedor en el crecimiento de las plantas mencionan que no solamente la relación del tamaño de la planta con respecto al volumen del contenedor puede reducir el crecimiento, sino que también acarrea el riesgo de influir en las diferencias relativas entre tratamientos. Estos autores recomiendan relaciones biomasa de planta (g) / volumen de contenedor (L) menores a 1, en nuestro ensayo esta relación fue en promedio de 0,32 g/L, por lo que si bien el tamaño fue adecuado, posiblemente se tendrían que haber utilizado contenedores de mayor profundidad, para de esa forma evitar el efecto de la autopoda. Por otro lado, Nacry *et al.* (2005) señalan en su trabajo que la baja disponibilidad de fósforo induce una respuesta bifásica, con una primera etapa de crecimiento de la raíces laterales y luego un efecto negativo general sobre el crecimiento de todo el sistema radical, y menciona que tal variación temporal podría perderse en estudios realizados a término, que generalmente carecen de mediciones en el transcurso del tiempo, como es el caso de nuestro trabajo, donde todas las variables se midieron al finalizar la fase de crecimiento rápido y el efecto de la autopoda ya se había dado.

Los cambios en la arquitectura del sistema radical en relación a bajas disponibilidades de fósforo son disímiles y contradictorios. Ola *et al.* (2015) señalan que en suelos pobres en nutriente, la elevada disponibilidad de nitrógeno o fósforo puede resultar en una proliferación de raíces laterales, pero

la respuesta dependerá de la especie. Ya en años anteriores, Robinson (1994) mencionó que las estrategias de las plantas para localizar nutrientes disponibles varía entre diferentes especies y genotipos. En esta experiencia, el fósforo modificó el desarrollo de la arquitectura del sistema radical, con diferencias en el desarrollo de las raíces laterales de segundo orden y totales, siendo las plantas crecidas en disponibilidades de fósforo bajas (1 mg L^{-1}) las que presentaron sistemas radicales más densos. Varios autores concuerdan con que bajas disponibilidades de fósforo favorecen el crecimiento de las raíces laterales, produciendo sistemas radicales más densos (Williamson *et al.* 2001; López-Busio *et al.* 2002, 2005; Jones y Ljung 2012). Consecuentemente con su sistema radical más denso los tratamientos de baja disponibilidad de fósforo también mostraron un mayor desarrollo en altura de la parte aérea, en congruencia con lo señalado por Razaq *et al.* (2015). A excepción del \odot NPS, los tratamientos de hormonas no produjeron diferencias entre ellos y el tratamiento testigo sobre el desarrollo del sistema radical. El \odot NPS tuvo un efecto contrario en relación a la formación de raíces laterales de primer (LR) y segundo orden (LRs), siendo el que generó el menor desarrollo de LR y el mayor de LRs entre los tratamientos. Este comportamiento disímil pudo deberse a que las plántulas tratadas con \odot NPS sufrieron, en la mayoría de los casos, la atrofia de la raíz principal, generando un desarrollo temprano de raíces laterales, las cuales por el tipo de sistema de cultivo en contenedores, se auto podaron, gatillando las vías de señalización para la generación de LRs. En el resto de los tratamientos la raíz principal tuvo que llegar al fondo del contenedor para que se produjera la muerte del ápice por deshidratación y a partir de este punto se desencadenara la generación de raíces laterales, independientemente de los tratamientos aplicados. Bajo este criterio, comparativamente, en las plantas tratadas con \odot NPS una mayor cantidad de LR lograron alcanzar el fondo del contenedor, generando de esta manera, una mayor cantidad de LRs (Figura 35 a, b, c, d). Si bien los tratamientos de \odot NPS presentaron mayor cantidad de LRs, suponiendo un sistema radical más ramificado que el resto de los tratamientos, esta diferencia no se vio reflejada en la cantidad total de raíces laterales (LR + LRs) donde ninguno de los tratamientos ensayados se diferenció.

En relación a esta respuesta a nivel radical, los plantines tratados con ☀NPS presentaron las menores alturas y los menores valores de biomasa aérea, diferenciándose para esta última variable con el tratamiento [↑]AIB+NPS. Este menor crecimiento pudo deberse a una mayor utilización de energía, en relación al resto de los tratamientos, para la formación de raíces en desmedro de la parte aérea, a causa de la muerte prematura de la raíz principal. En este sentido, Brunners *et al.* (2015) mencionan que el desechado de raíces viejas y la construcción de nuevas implican la inversión de una considerable cantidad de energía en el proceso de reconstrucción. Por otro lado señalan que el beneficio, sin embargo, es que las raíces nuevas son capaces de captar agua más eficientemente que las raíces viejas, así, esta mecánica de desechado y regeneración de raíces representa una buena estrategia de aclimatación de las plantas que crecen en ambientes con reducido suministro de agua. En este trabajo las condiciones hídricas fueron igual para todos los tratamientos, no siendo el agua un factor limitante, por lo que la mayor cantidad de LRs generadas por el tratamiento de ☀NPS no habría podido compensar el gasto energético utilizado en la construcción de las mismas, bajo estas condiciones de cultivo.

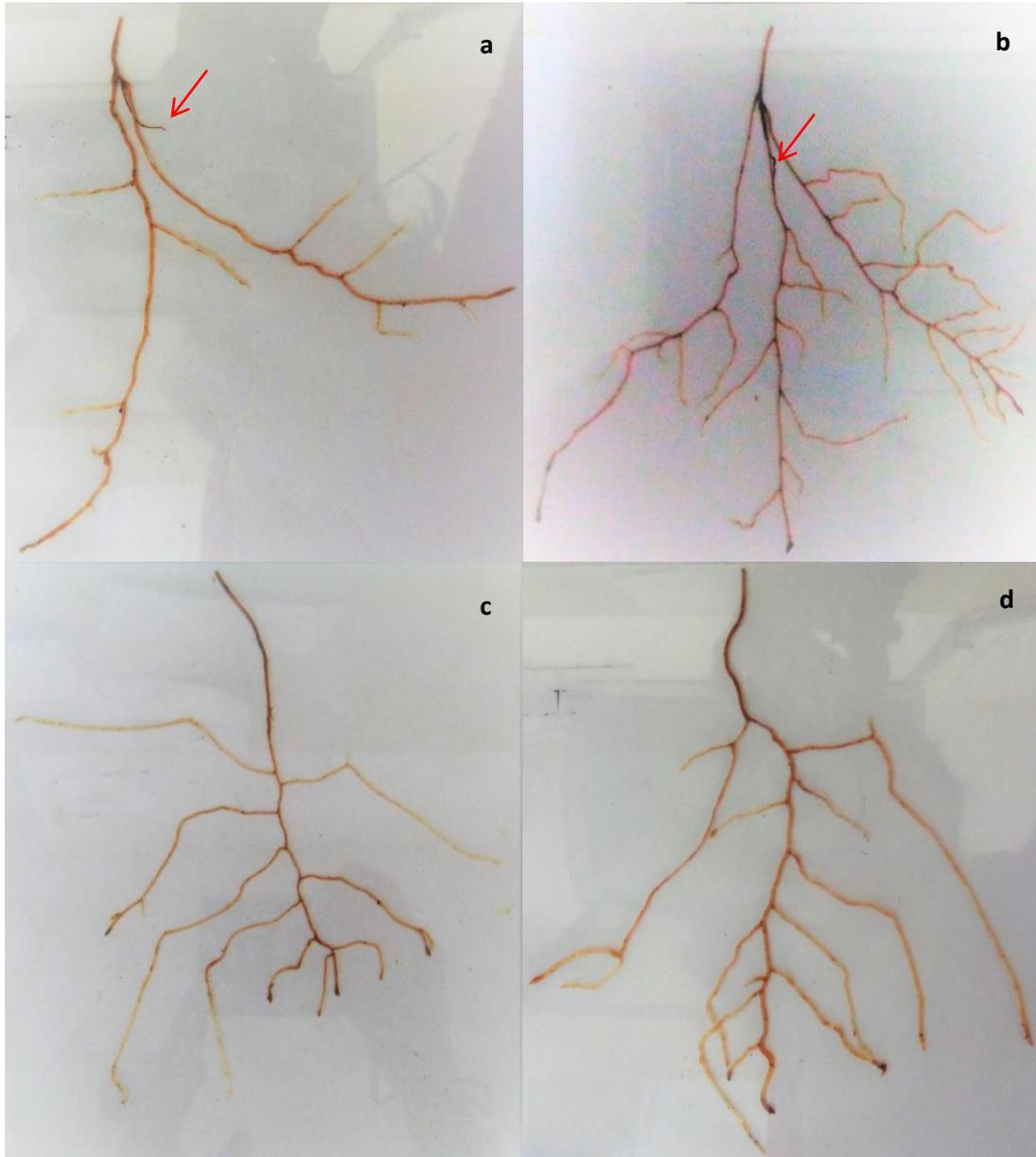


Figura 35. Apariencias generales de las arquitecturas de los sistemas radicales de los plantines de *Austrocedrus chilensis*. a y b). Arquitectura de los sistemas radicales de los plantines, donde se observa la muerte de la raíz principal (flecha roja). c y d) Arquitectura de los sistemas radicales con desarrollo de raíz principal.

Por lo expuesto puede concluirse que los sistemas radicales de los plantines de *A. chilensis* cultivados bajo este método de viverización no fueron influenciados por la aplicación exógena de AIB y NO en las dosis ensayadas. El NPS produjo la muerte temprana de la raíz principal provocando un cambio en la arquitectura radical, el cual fue en desmedro del crecimiento de la parte aérea del plantín. Por otro lado la acción de estas hormonas parece no estar influenciada por la disponibilidad de fósforo, actuando estos dos factores en

forma independiente. Finalmente tanto la falta de interacción entre los factores ensayados, como la falta de efecto concreto en relación a los tratamientos, podría deberse al proceso de autopoda que sufre el sistema radical de las plantines bajo este método de cultivo en contenedores. La autopoda generaría un proceso de redistribución hormonal, debido a la muerte apical tanto de la raíz principal como de las raíces laterales, lo que podría estar enmascarando el efecto buscado con la aplicación exógena de las hormonas. En futuras investigaciones en las que el interés se enfoque en la descripción del proceso natural prescindiendo del interés productivo, sería aconsejable planificar los ensayos con mediciones periódicas de la arquitectura radical a lo largo del periodo de crecimiento y utilizar contenedores de mayor altura, de forma tal que se evite el efecto de la autopoda durante la duración del mismo.

4

COLONIZACIÓN MICORRÍCICA DE LOS PLANTINES DE CIPRÉS DE LA CORDILLERA EN RELACIÓN A LA DISPONIBILIDAD DE AGUA Y NUTRIENTES

4.1. INTRODUCCIÓN

El potencial de manipular la inoculación de las plantas con hongos micorrícicos para aumentar la productividad en plantaciones forestales o el establecimiento durante la restauración de ecosistemas después de una severa perturbación, es foco de una gran cantidad de investigaciones (Brundrett *et al.* 1996). Los hongos micorrícicos forman asociaciones con las raíces de más del 90% de las plantas superiores, incluyendo árboles forestales, pastos salvajes y muchos cultivos (Bonfante y Genre 2010). Ambas partes de esta relación mutualista se benefician: el hongo micorrícico mejora el estado nutricional de la planta, contribuyendo a su nutrición mineral, absorción de agua, crecimiento y resistencia a las enfermedades, mientras que la planta es esencial para el hongo al proveerlo de los fotosintatos necesarios para su crecimiento y reproducción (Smith y Read 1997). Esta simbiosis promueve el crecimiento de las plantas, incrementa su resistencia a la sequía y a diversos estreses bióticos, y mejora la estabilidad del suelo y su retención de agua (Gianinazzi *et al.* 2010).

Muy pocas especies de plantas estudiadas no forman alguna clase de asociación micorrícica. La mayoría de ellas exhiben simbiosis con hongos endo-micorrícicos vesículo-arbusculares (MA), mientras que los bosques templados predominantemente son micorrizados por ecto-micorrizas (Smith y Read, 1997). Los hongos que forman MA se caracterizan por presentar un crecimiento intra e intercelular en la corteza de la raíz y por formar dos tipos de estructuras: arbusculos y vesículas (Quilambo 2003). Las ecto-micorrizas se caracterizan por la presencia de un manto, el cual se adhiere a la superficie de la raíz, y que está formado por un agregado de hifas. Este micelio se vincula a

hifas extra matriciales que son las encargadas de explorar el sustrato. Desde la zona interior del manto, algunas hifas penetran entre las células de la raíz para formar una interfase llamada red de Hartig, donde los metabolitos son intercambiados (Barker *et al.* 1998).

Si bien en general las coníferas son asociadas con simbiosis del tipo ecto-micorrícicas (Meyer 1973, Read *et al.* 1992), las raíces del Ciprés de la Cordillera se asocian naturalmente con hongos del suelo formando micorrizas del tipo arbusculares (MA) (Fontenla *et al.* 2001). En Chile, Godoy y Mayr (1989) mencionan que la mayoría de las especies de coníferas poseen una extraordinaria capacidad de adaptación, sobreviviendo frecuentemente bajo condiciones extremas, rasgo que estaría muy relacionado al papel que cumplen las asociaciones micorrícicas en estas especies. Los estudios realizados por estos autores indican relaciones endo-micorrícicas para Ciprés de la Cordillera, Pehuén (*Araucaria araucana* (Mol.) K. Koch), Alerce (*Fitzroya cupressoides* I.M. Johnst.), Ciprés de las Guaitecas (*Pilgerodendron uviferum* (D. Don) Florin), Ciprés enano (*Dacrydium fonckii* (Phill.) Florin), Mañío de hojas punzantes (*Podocarpus nubigena* Lindl.), Mañío de hojas largas (*P. salignus* Lindl.), Lleuque (*Prumnopitys andina* (P. et E.) de Laub.) y Mañío de hojas cortas (*Saxegothaea conspicua* Lindl.). Fontenla *et al.* (1998) determinaron la presencia de MA en poblaciones naturales de Ciprés de la Cordillera en el Parque Nacional Nahuel Huapi, y además encontraron MA en la mayoría de las especies acompañantes (*Maytenus boaria* Mol., *Aristotelia chilensis*(Mol.) Stuntz, *Mutisia decurrens*, *Mutisia* sp. y pinos).

En general el uso de fertirriego, que conlleva altas dosis de nitrógeno y fósforo, usado en medios de crecimiento artificiales provoca una disminución de la micorrización (Landis *et al.* 1989, Martínez *et al.* 2007). Marchelli *et al.* (2013) indican que al disminuir las dosis de nutrientes que se aplican en los invernaderos, las micorrizas comienzan a aparecer y desarrollarse en las raíces de las plantas. Landis (1989) menciona que la micorrización puede no afectar el crecimiento del plantín en el vivero, pero le otorgará mejores chances de supervivencia y mayores crecimientos una vez plantado a campo. Por otro lado, Jumpponen *et al.* (2005) señalan que los resultados y conclusiones de experiencias hechas a campo y en invernaderos, varían ampliamente e indican

que el enriquecimiento con nitrógeno puede aumentar, disminuir o no tener efecto sobre la colonización de las raíces por MA. En esta misma línea, Salgado Salomón *et al.* (2009) sugirieron que el manejo de la micorrización bajo sistemas que reciben fertilización requiere un estudio detallado para cada caso, dado que existen reportes contradictorios sobre el efecto inhibitorio de la fertilización sobre la micorrización, dependiendo de las especies arbóreas y fúngicas involucradas.

Por lo expuesto, se plantea como hipótesis que en plantines de *A. chilensis* obtenidos mediante métodos de viverización con altos niveles de fertilizante y condiciones hídricas adecuadas, la micorrización será inhibida. Por otra parte, se espera que los plantines, carentes de inoculación exógena (es decir, que no se emplea inoculante de MA en ninguna de las etapas del cultivo), sean micorrizados de forma natural una vez llevados a campo dado que las especies de hongos micorrícicos son cosmopolitas.

Bajo estas hipótesis se plantean como objetivos: (i) evaluar la influencia de distintas disponibilidades de fósforo y estados hídricos del sustrato en el nivel de colonización micorrícica durante la viverización, (ii) evaluar si se produce la colonización en vivero o si los plantines son micorrizados una vez que son llevados a campo, y (iii) analizar la abundancia de la micorrización y su relación con la supervivencia y el crecimiento inicial post plantación.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Material vegetal y ambiente de cultivo

Los plantines utilizados para los distintos ensayos planteados en este estudio procedieron del ensayo (b), debido a que el mismo llevó dos años de desarrollo en vivero, logrando plantines aptos para su salida a campo y permitiendo de esta manera evaluar todos los objetivos planteados en el estudio de las micorrizas. Repasando brevemente, los plantines se produjeron con semillas provenientes de 16 árboles del bosque de la cabecera sur del Lago Futralufquen, sembradas directamente en tubetes troncocónicos de 250 cm³, rellenos con un sustrato mezcla de perlita y turba en relación 1:2. Se

criaron por dos ciclos vegetativos con el régimen de fertirriego ya descrito y con las variantes propias del ensayo (b).

El análisis de colonización micorrícica se efectuó sobre tres lotes formados cada uno por 8 plantines elegidos al azar por cada tratamiento realizado en dicho ensayo, los cuales consistían en la combinación de tres niveles del factor concentración de fósforo (1, 10 y 100 mg L⁻¹) y dos niveles de contenido hídrico del medio de crecimiento (20 % y 80 % de la AA), aplicados durante la fase de establecimiento. De la combinación de los niveles de los factores se generaron seis tratamientos, los que se identificaron de la siguiente manera: T 20-1, T 20-10, T 20-100, T 80-1, T 80-10 y T 80-100. Cada lote, por lo tanto, constó de 48 plantines, y los tres lotes totalizaron 144 plantines.

Para alcanzar los objetivos planteados los lotes fueron sometidos a tres procesos diferentes. A un primer lote de plantas (L1) se le efectuó la determinación de micorrizas inmediatamente después de finalizado su segundo ciclo de crecimiento en vivero en los tubetes de 250 cm³.

A las plantas de un segundo lote (L2) se las repicó a envases de nylon negro de 1000 cm³ (20 cm de alto por 12 cm de diámetro) con 4 orificios basales para el drenado del agua, una vez concluido su segundo ciclo vegetativo en vivero. Como sustrato para los envases se utilizó una mezcla formada por una proporción 1:1 de tierra esterilizada mediante tres tindalizaciones de una hora de duración, según metodología seguida por Salgado Salomón (2009), y turba rubia de *Sphagnum* esterilizada en estufa a 105 °C durante 72 hs. Las plantas envasadas se mantuvieron durante una temporada de crecimiento en invernadero, interviniéndolas solamente con dos aplicaciones semanales de agua de perforación. La elección del sustrato y de la fuente de agua de riego procuró evitar cualquier fuente de contaminación externa que pudiera aportar MA. Las plantas fueron envasadas en el mes de septiembre y permanecieron en los envases durante 13 meses, extrayéndolas para realizarles los análisis de micorrizas en el mes de octubre del año siguiente.

Finalmente un tercer lote de plantines (L3) fue llevado a campo a principios de la primavera, una vez concluido su segundo ciclo de crecimiento. La plantación se realizó en el mes de septiembre en un bosque puro de Ciprés

de la Cordillera ($41^{\circ} 52' 08''$ S, $71^{\circ} 29' 15''$ W, 564 m snm). El sitio presentaba baja densidad de sotobosque, una pendiente del 5% con exposición noroeste y un suelo con textura franco arenosa formada por 2,3% de arcilla, 12,4 de limo y 85,4 de arena. El mismo se encontraba dentro la Reserva el Guadal ubicada en la zona de Mallín Ahogado en la Ciudad de El Bolsón, Provincia de Río Negro (Figura 36). Debido a que el terreno presentaba una ligera pendiente se decidió realizar la plantación con un diseño en bloques, colocando a las repeticiones en forma perpendicular a la pendiente.



Figura 36. Vista de la parcela donde se realizó la plantación del lote (L3) en la Reserva Provincial El Guadal.

Las plantas fueron muestreadas, luego de efectuarles las mediciones de supervivencia y crecimiento inicial, en el mes de octubre del año siguiente, permaneciendo en campo durante 13 meses. La extracción de las plantas se efectuó con pala, teniendo los recaudos necesarios para romper la menor cantidad posible de raíces. Una vez descalzada la planta se colocó rápidamente el cepellón en una bolsa de *nylon* para evitar la pérdida de humedad en las raíces hasta el momento de realizarle el análisis.

Antes de medir la colonización micorrícica de las raíces de los plantines de los distintos tratamientos, y con el propósito de descartar posibles aportes de inóculo por parte del sustrato utilizado en cultivo, se realizó un análisis de presencia de MA sobre 10 muestras de sustrato, utilizando una adaptación de la técnica de extracción de esporas MA de muestra de suelo usada por Lanson y Allen (1986).

Para esto se pesaron 50 g de sustrato formado por 2 partes de turba rubia *Sphagnum* y 1 parte de perlita, se diluyeron en 500 ml de agua destilada y se homogeneizaron, dejando reposar durante una noche. Luego se tamizó el preparado con tamices de suelo N° 25. Al sustrato residual se lo lavó con 300 ml de agua destilada, nuevamente en el tamiz y luego se descartó la fracción mayor al tamiz N° 25. La fracción tamizada se centrifugó durante 5 min a 2000 rpm, descartando el sobrenadante. El sólido se resuspendió en 50 ml de solución de sacarosa al 50 % y se centrifugó nuevamente por 5 min a 2000 rpm. Por último se filtró el sobrenadante en papel filtro N° 4 y se procedió a observar y clasificar en una lupa binocular estereoscópica 10X (Bausch & Lomb).

4.2.2. Variables analizadas

Se midió el porcentaje de colonización de raíces por micorrizas arbusculares (%MA). Para realizar esto, los sistemas radicales de los plantines de todos los lotes a evaluar fueron lavados y teñidos (Figura 37 a y b), según la siguiente metodología (Cázares y Trappe 1993).

Se lavaron los sistemas radicales profusamente con agua corriente (mínimo 10 minutos). De cada sistema radical se seccionaron raíces por un total de 150 cm, en porciones de aproximadamente 2,5 cm de largo y se colocaron en celdas plásticas Tissue-Tek (Fisher Scientific Co. Pittsburgh, PA) para la decoloración.

Se colocaron las celdas con las raicillas (raíces laterales sanas y homogéneas en tamaño) en KOH al 10 % (100 ml de H₂O destilada – 10 g de KOH), llevándolas a 100 °C en baño maría durante 10 min, a partir de la ebullición. Luego se enjuagaron con agua corriente 5 veces, escurriendo el

excedente de agua en papel absorbente. A temperatura ambiente se decoloraron en H₂O₂ 30 vol. al 15 % durante no menos de 3 hs y se lavaron nuevamente en agua corriente 5 veces, escurriéndolas luego en papel absorbente. Se tiñeron en azul de tripano en lactoglicerol al 0,05 % (proporción 3:1:1 glicerina: Ác. Láctico: H₂O) durante 30 min a 4 °C. Finalmente se almacenaron perfectamente identificadas en lactoglicerol a 4 °C hasta el examen microscópico.



Figura 37. Vista del proceso de lavado, seccionado y tinción de los sistemas radicales. (a) raíces seccionadas y colocadas en las celdas para su tinción. (b) raíces teñidas listas para su almacenamiento en recipientes identificados.

El porcentaje de colonización con MA se estimó mediante el técnica usada por Salgado Salomon (2014) basado en el método de intersección (Brundrett *et al.* 1996), expresado en la siguiente ecuación.

$$\%AM = (IM / IT) \times 100 \quad [20]$$

Siendo:

%AM: porcentaje de colonización del sistema radical con hongos del tipo arbusculares, expresado en porcentaje (%)

IM: intersecciones con raíz micorrizada.

IT: intersecciones totales.

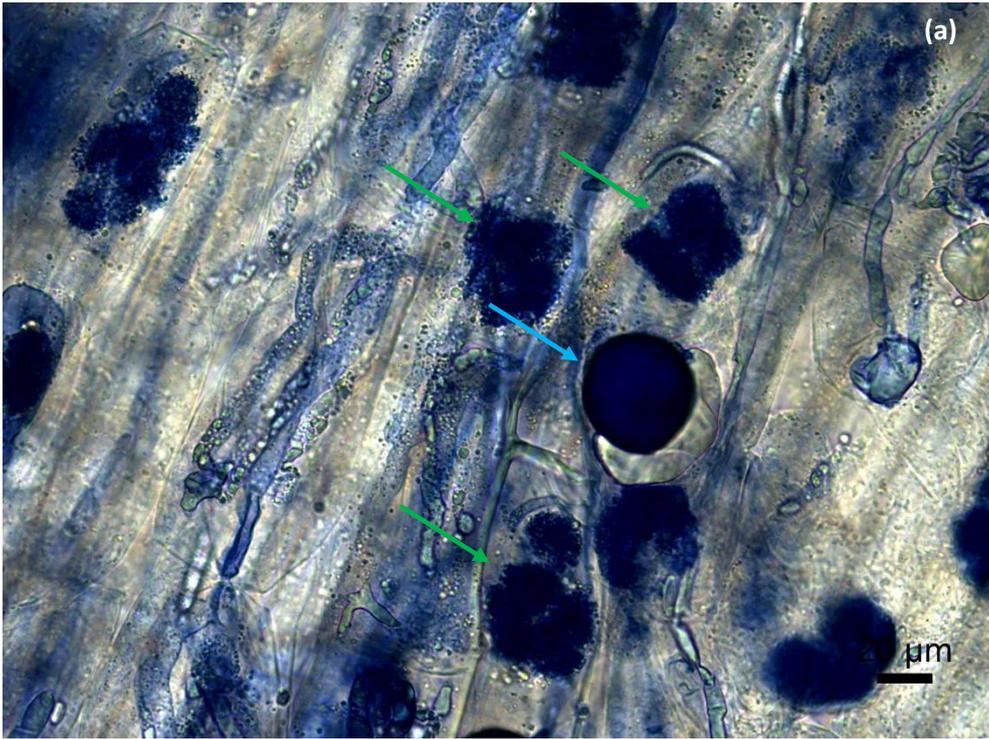
El conteo de la cantidad de intersecciones de cada sistema radical analizado se efectuó sobre una caja de Petri a la que se le diseñó un fondo con una grilla cuadrada de 1 cm x 1 cm. Sobre esta grilla se distribuyeron homogéneamente las muestras de raíces y se efectuaron los conteos de las

intersecciones de las raíces con las líneas de la grilla, identificando como **SI** a las intersecciones con raíces micorrizadas (teñidas de azul) y como **NO** las intersecciones con raíces no micorrizadas (no teñidas), contabilizando en un primer término los cruces en las líneas horizontales y luego en las verticales (Figura 38). Las observaciones se realizaron con una lupa binocular estereoscópica 10X (Bausch & Lomb).



Figura 38. Vista de la caja de Petri con la cuadrícula de fondo y las raíces distribuidas homogéneamente. La flecha de color rojo señala la intersección considerada 'SI', y la flecha de color amarillo la intersección considerada 'NO'.

De los casos **SI** se realizó una sub-muestra de alrededor del 10 % del material para verificar que la tinción efectivamente se debía a estructuras pertenecientes a las MA (*i.e.* vesículas, arbusculos, coils e hifas inter-intracelulares). Estas observaciones se realizaron con un microscopio óptico Leica DM500 (Figura 39 a, b, c y d). Por último la cantidad de intersecciones **SI** y la cantidad de intersecciones totales (**SI + NO**) se utilizaron en la ecuación 17 para obtener el porcentaje de micorrización del sistema radical.



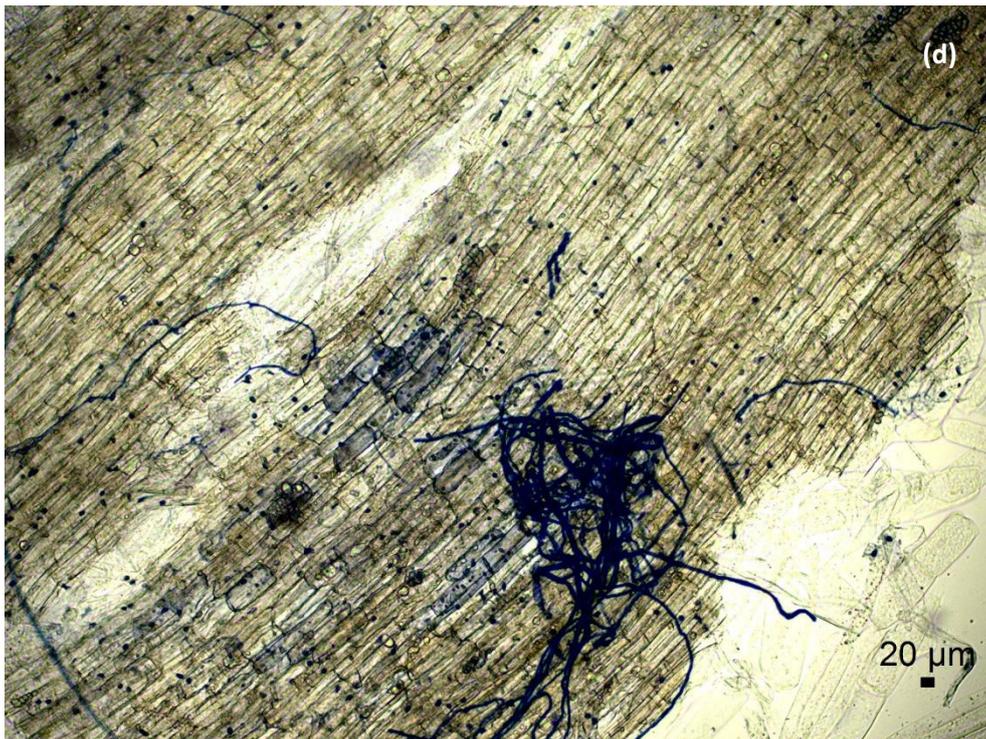
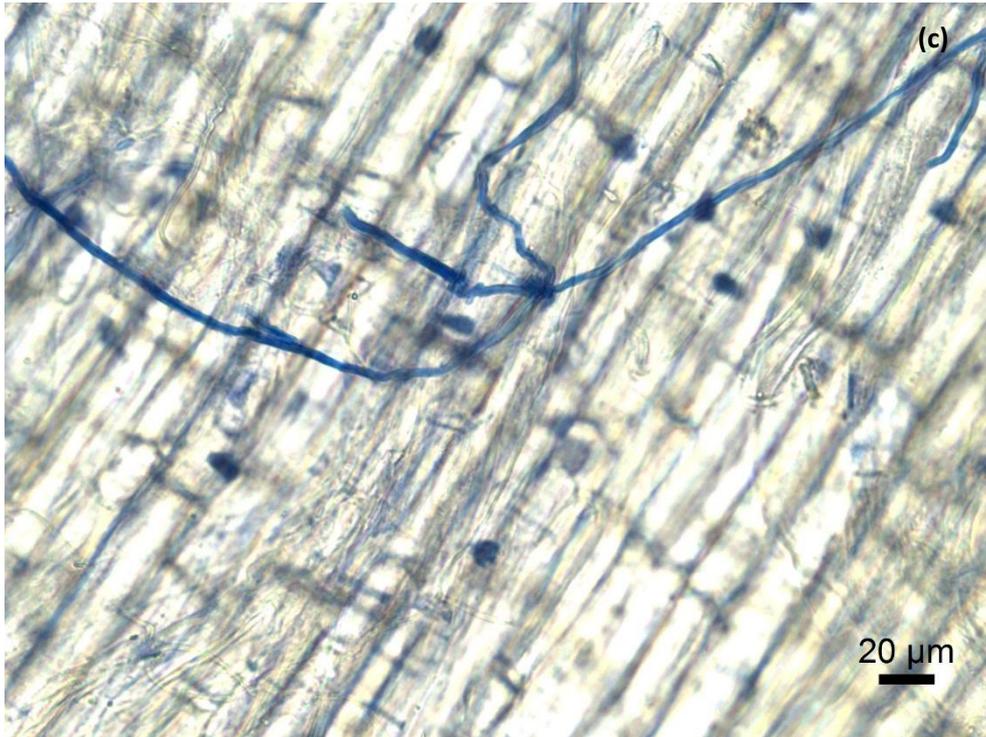


Figura 39. Vista de las estructuras encontradas en los tejidos radicales de plantines de Ciprés de la Cordillera que se identificaron con el método de intersección como positivos (SI). (a) Presencia de arbusculos (flecha verde) y vesículas (flecha celeste); (b) presencia de coils; (c) presencia de hifas inter-intracelulares; (d) vista ampliada de las diferentes estructuras formada por las micorrizas arbusculares, diseminadas en las células radicales.

También se registró la supervivencia y se midió el crecimiento en el ensayo de campo. La supervivencia se determinó en forma visual, identificando como planta viva a los ejemplares con el follaje verde y planta muerta a las que mostraban el follaje totalmente seco o con signos de deterioro irreversibles, los que podían estar representados por follajes con signos de falta de turgencia severos o copas con un porcentaje mayor al 80 % del follaje seco.

El crecimiento inicial se determinó midiendo el crecimiento del año representado por la longitud de tejido nuevo medido en el ápice de la copa del plantín. El tejido nuevo era fácilmente identificable por su cambio de color con respecto al crecimiento del año anterior, siendo estos verde claro y verde oscuro respectivamente (Figura 40). Para su medición se utilizó un calibre tipo Vernier digital, con una precisión de 0,01 mm.



Figura 40. Vista de un plantín de Ciprés de la Cordillera del lote L3 llevado a plantación, donde se puede observar el crecimiento inicial del mismo, a partir del cambio de color del tejido del año.

4.2.3. Diseño experimental y análisis estadístico

Los ensayos de los lotes de plantas 1 y 2 se trabajaron con un diseño completamente aleatorizado (DCA), mientras que para el ensayo del lote 3 se utilizó un diseño en bloques completamente aleatorizado (DBCA). En los tres casos se trabajó con 8 réplicas por tratamiento y la unidad muestral la conformó el plantín.

Para comprobar el efecto de los tratamientos se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) para las variables %MA y crecimiento inicial. En el caso de la primera variable los porcentajes se transformaron a arco seno con el fin de cumplir el supuesto de normalidad de los datos. Para el análisis de la variable supervivencia se utilizó un modelo lineal generalizado debido a que la misma se trataba de una variable binaria (viva-muerta). En los casos en que se encontraron diferencias entre los tratamientos se utilizó el test de LSD Fisher ($\alpha = 0,05$) con corrección de Bonferroni. El procesamiento de los datos se realizó con el programa estadístico InfoStat/ Profesional, versión 2016.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Presencia de MA en el sustrato de cultivo

En ninguna de las 10 muestras analizadas se observó presencia de estructuras pertenecientes a las MA (*i.e.* vesículas, arbusculos, coils e hifas inter-intracelulares).

4.3.2. Porcentaje de colonización de MA (%MA)

En los tres lotes de plantas (L1, L2 y L3) se comprobó presencia de MA al momento del análisis de %MA. La interacción de los factores concentración de fósforo y contenido hídrico no fue significativa ($P > 0,05$) para ninguno de los tres lotes analizados, o sea que los factores actuaron en forma independiente.

El lote L1 (vivero) mostró un %MA general del 24 %. Este presentó diferencias significativas entre los niveles ensayados, tanto para el factor contenidos hídricos (%AA) ($P < 0,0001$) como para el factor concentración de

fósforo ($P= 0,003$) (Figura 41 a y b). En el caso del factor AA%, las plantas tratadas con menor AA (20%) fueron las que mostraron mayor %MA, con porcentajes cercanos al 32 %, en tanto que los de mayor AA (80%) rondaron el 16 % de colonización micorrícica. El factor fósforo mostró mayores %MA en el nivel de menor concentración de fósforo (1 ppm), presentando porcentajes de 30 %, en tanto que los niveles de 10 y 100 ppm de fósforo no se diferenciaron entre ellos, arrojando porcentajes de colonización de MA, del orden del 22 % y 20 % respectivamente.

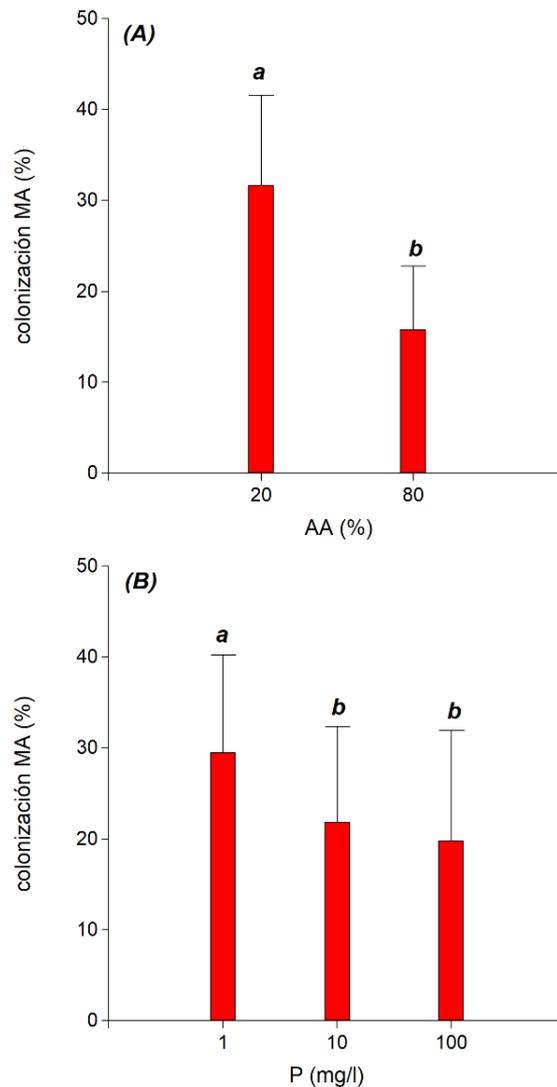


Figura 41. Porcentaje de colonización de MA de plantines de Ciprés de la Cordillera del lote (L1) (plantines analizados directamente del vivero). (A) En relación a los dos niveles de contenido hídrico. (B) En relación a los tres niveles de concentración de fósforo ensayados. Los valores seguidos por la misma letra por tratamiento no presentan diferencias significativas (Fisher, $P < 0,05$).

El %MA del lote L2 (envase) fue del orden del 81 %, y sólo se comprobaron diferencias significativas entre los niveles del factor concentración de fósforo ($P= 0,0063$) (Figura 42). El nivel de 100 ppm de fósforo presentó los mayores %MA, rondando valores del 94 %, diferenciándose de los plantines tratados con 10 ppm de fósforo, que fueron los que exhibieron los menores %MA (64 %). En tanto que las plantas tratadas con 1 ppm de fósforo no se diferenciaron del resto, mostrando porcentajes intermedios del orden del 85 %. El factor contenido hídrico presentó porcentajes que rondaron el 81 % de %MA.

El %MA del lote L3 (campo) fue del orden del 93 %, y sólo se comprobaron diferencias significativas entre los niveles del factor AA% ($P< 0,0001$) (Figura 43). Las plantas manejadas con el nivel de menor contenido hídrico (20 %) presentaron los mayores %MA, mostrando porcentajes del orden del 98 %, en tanto que las plantas tratadas con un contenido hídrico mayor (80 %) exhibieron los menores porcentajes de MA (87 %). El factor fósforo mostró porcentajes del orden del 92 %.

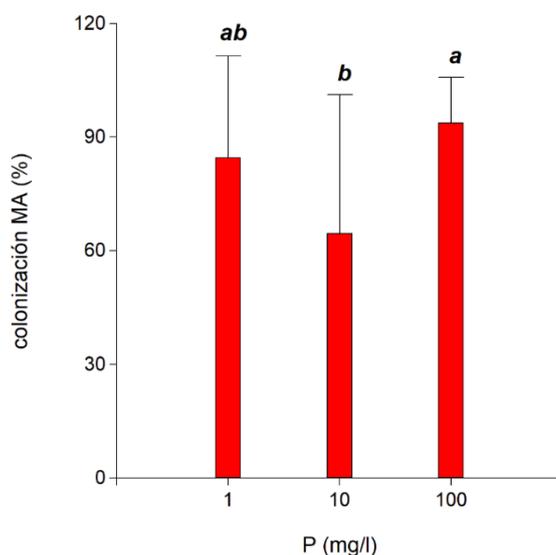


Figura 42. Porcentaje de colonización de MA de plantines de Ciprés de la Cordillera del lote (L2) (plantines analizados luego de 1 año de permanencia en envase con suelo esterilizado), en relación a los dos niveles de contenido hídrico ensayados. Los valores seguidos por la misma letra por tratamiento no presentan diferencias significativas (Fisher, $P< 0,05$).

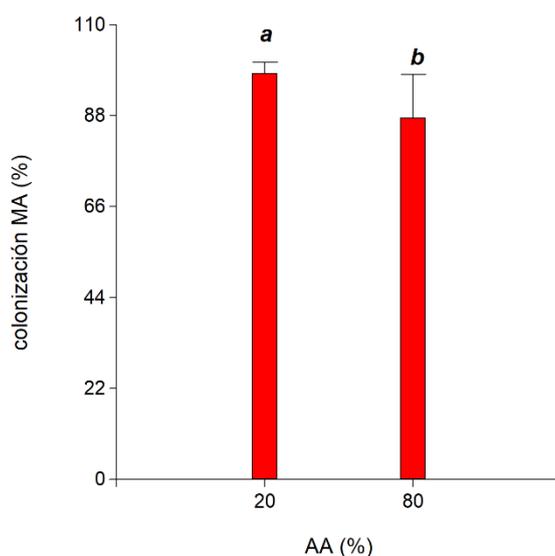


Figura 43. Porcentaje de colonización de MA de plantines de Ciprés de la Cordillera del lote (L3) (plantines analizados luego de 1 año de permanencia en campo), en relación a los dos niveles de contenido hídrico. Los valores seguidos por la misma letra por tratamiento no presentan diferencias significativas (Fisher, $P < 0,05$).

4.3.3. Supervivencia y crecimiento inicial a campo

En el registro de supervivencia, la interacción de los factores no fue significativa ($P > 0,05$) para ninguno de los tratamientos analizados indicando que los factores actuaron en forma independiente. Tanto el factor concentración de fósforo como el factor de contenido hídrico, no presentaron diferencias significativas para ninguno de los niveles ensayados ($P = 0,5530$ y $P = 0,9938$ respectivamente). La supervivencia fue alta en todos los tratamientos, promediando un 96 % en el total del ensayo a campo (ningún tratamiento bajó del 87 % de supervivencia).

Para el crecimiento inicial a campo, la interacción de los factores tampoco fue significativa ($P > 0,05$) para ninguno de los tratamientos analizados, los factores actuaron en forma independiente. El crecimiento inicial mostró un valor promedio de 86,56 mm $\pm 32,25$. El factor concentración de fósforo mostró diferencias significativas entre los niveles ensayados ($P = 0,0413$), y los mayores crecimientos los presentó el nivel de 10 ppm, diferenciándose del nivel de 1 ppm que mostró el menor crecimiento. En tanto que el factor contenido hídrico no presentó diferencias significativas ($P = 0,1507$) (Tablas 20 y 21).

Tabla 20. Crecimiento inicial de los plantines de Ciprés de la Cordillera sometidos a diferentes niveles de concentración de fósforo, expresadas en ppm. Letras diferentes indican diferencias significativas (Fisher, $P < 0,05$). Valores promedio y desvío estándar.

Factor	Nivel	Variable	n	Crecimiento inicial (mm)
P (ppm)	1	Crecimiento inicial	15	71,08±32,14 b
	10	Crecimiento inicial	16	97,30 ±36,18 a
	100	Crecimiento inicial	15	90,57±22,41 ab

Tabla 21. Crecimiento inicial de los plantines de Ciprés de la Cordillera sometidos a diferentes niveles de contenido hídrico, expresados en porcentaje. Letras diferentes indican diferencias significativas (Fisher, $P < 0,05$). Valores promedio y desvío estándar.

Factor	Nivel	Variable	n	Crecimiento inicial (mm)
AA (%)	20	Crecimiento inicial	22	80,15 ±31,57 a
	80	Crecimiento inicial	24	92,43±32,41 a

4.5. DISCUSIÓN

A pesar de que los análisis realizados en el sustrato determinaron la ausencia de MA, el análisis de porcentaje de colonización de MA (%MA) realizado al lote L1 de plantas, inmediatamente después de concluir el segundo ciclo de cultivo, dio como resultado presencia de MA.

Referente a este resultado, Salgado Salomon *et al.* (2009) en un estudio realizado sobre el estado micorrícico de plántulas de *Pinus ponderosa*, observaron presencia de micorrizas en plantines salidos de vivero producidos bajo un método similar al implementado en este ensayo, asociando dicha colonización a 4 fuentes posibles de inóculos: 1) el sustrato (arena volcánica), que no fue esterilizado antes de la siembra y que se almacenó debajo de ejemplares de pino ponderosa presentes en el predio del vivero, donde se observaron ocasionalmente fructificaciones de hongos micorrícicos; 2) aporte aéreo de esporas provenientes de un vivero de coníferas a raíz desnuda ubicado a escasos 200 m del invernáculo y de una pequeña plantación de pino ponderosa cercana; 3) el agua utilizada para el fertirriego, que se almacenaba

en un tanque australiano sin protección alguna, ubicado a metros de la citada plantación y dentro del vivero a raíz desnuda, que también podría recibir y concentrar el inóculo, y 4) la cobertura seminal, que no es esterilizada al momento de la siembra.

En relación a lo mencionado, en nuestro estudio la fuente de inóculo no provino del sustrato utilizado, pero las otras tres fuentes mencionadas en el trabajo de Salgado Salomón pudieron ser causales de la provisión de inóculo. Se sabe que los hongos de las micorrizas arbusculares MA están comúnmente presentes en el suelo y que crean asociaciones micorrícicas con la mayoría de las plantas vasculares terrestres (Wang y Qiu 2006, Davinson *et al.* 2015). Por otro lado, Fontenla *et al.* (1998) señalan que la mayoría de las plantas vasculares asociadas a los bosques de Ciprés de la Cordillera tiene micorrizas del tipo arbusculares. El vivero donde se realizó el ensayo se encuentra en una zona donde, si bien no hay presencia de rodales de *A. chilensis*, sí están presentes otras plantas vasculares que se asocian con MA, las cuales pueden ser fuente de un aporte aéreo de esporas. Por otro lado, la fuente de agua utilizada para el cultivo, si bien era de perforación, la misma se almacena en un tanque australiano, el que podría recibir inóculo del medio circundante. Y por último, la semilla no fue esterilizada al momento de la siembra.

Al analizar el estado de colonización (%MA) del lote L1 observamos que el mismo fue mayor en los tratamientos con menor contenido hídrico (20 % de AA) y en los de menor disponibilidad de fósforo (1 ppm). Con respecto a la influencia del contenido hídrico sobre la colonización por MA, los resultados concuerdan con lo observado en varios estudios. Stevens y Peterson (1996), en su trabajo realizado sobre el status micorrícico de MA en *Lythrum salicaria* L., indicaron que los niveles de colonización son inversamente proporcionales al contenido hídrico del suelo o a algún factor que varíe con la disponibilidad de agua. Lekberg y Koide (2008) en su trabajo sobre la respuesta de MA a distintas condiciones hídricas y temperaturas de suelo, mencionan que el suelo húmedo disminuyó la viabilidad hifal en comparación al suelo seco, independientemente de la temperatura del mismo, en tanto que la colonización micorrícica fue menor en el suelo húmedo sólo cuando estaba caliente. En esta misma línea, García *et al.* (2008) observaron que bajo condiciones de exceso

de agua en el suelo los hongos MA disminuyeron sus estructuras arbusculares, número de esporas y densidad hifal, pero incrementaron las estructuras de resistencia (vesículas), mientras que en déficit de agua, los hongos de MA redujeron las hifas y arbusculos externos en cierta medida, invirtiendo más en mantener una proporción similar de vesículas en las raíces y esporas en el suelo, en comparación con el tratamiento de control.

En lo referente al comportamiento de %MA en relación a la disponibilidad de fósforo, Gosling *et al.* (2013) mencionan que un factor ambiental que mostró tener impacto negativo sobre la colonización de MA es la alta concentración de fósforo disponible en el suelo. Por su parte Smith y Smith (2011) señalan que la asimilación de fósforo por parte de plantas colonizadas con MA refleja la sumatoria de la captación de P directamente vía células de la planta más la proveniente indirectamente vía hongo MA, con la importancia de la vía MA disminuyendo cuando la disponibilidad de fósforo es elevada, lo cual está usualmente asociado con una declinación del nivel de %MA. Por otro lado, Gosling *et al.* (2013) señalan que si bien existe una respuesta a la disponibilidad de fósforo en el suelo, ésta solamente se hace evidente a elevadas concentraciones y más fuertemente en relación a la especie de la planta hospedante. Ellos obtuvieron una disminución significativa en la colonización de MA en respuesta a la disponibilidad de fósforo en el suelo en plantas de maíz (*Zea mays*); en tanto que no tuvieron decrecimientos del %MA significativos en soja (*Glycine max*) y viola (*Viola arvensis*), aun en altas concentraciones de fósforo. Por lo mencionado, *A. chilensis* se comportaría como una especie sensible a la disponibilidad de fósforo en lo que respecta al nivel de colonización de MA, ya que mostró un crecimiento del %MA sólo en el tratamiento de menor concentración de fósforo, mientras que en los tratamientos de media y alta concentración (10 y 100 ppm) el %MA decreció y no se diferenció entre los mismos (Figura 41).

Un hipotético resultado en este ensayo hubiera sido que no se produjera la simbiosis entre las MA y los plantines del lote L1, pero sí en los plantines del lote L2 se obtuvieran %MA. Esta situación habría evidenciado la presencia del hongo micorrízico en el medio de crecimiento en vivero, pero con la simbiosis inhibida por el nivel de fertilización (Le Tacon *et al.* 1997, Martínez *et al.* 2007,

Salgado Salomón *et al.* 2009, Gosling *et al.* 2013). Los resultados observados en este ensayo, en los plantines del lote L1, muestran que si bien existe un efecto inhibitorio moderado del P y el nivel hídrico del sustrato sobre el %MA, en todos los tratamientos el proceso de la simbiosis entre la planta y el hongo se produjo. Estos resultados hacen que el análisis de los plantines del lote L2 pierda algo de significancia, ya que la micorrización se produjo en la plantas durante el proceso de viverización inicial (con los plantines en los tubetes rellenos con perlita y turba y bajo fertirriego), por lo que en el manejo habitual de 2 ciclos vegetativos en vivero, los plantines saldrían ya micorrizados a la plantación a campo.

Por otro lado, los comportamientos mostrados por las plantas del L2 y L3 presentando un mayor %MA y una dinámica del %MA diferente a la mostrada por las plantas del L1, pudo haber estado relacionado con el hecho de que al desaparecer todo tipo de manejo de fertilización y agua, el nivel de %MA se habría expresado en relación a las fuentes de inóculo que en estos procesos incidían. Estas fuentes de inóculo micorrícico serían las heredadas del vivero y de aportes aéreos de esporas provenientes del entorno en el caso de L2, e inóculo heredado del vivero, inóculo aéreo e inóculo presente en el suelo en el caso de L3. Salgado Salomón *et al.* (2009) mencionan en su trabajo sobre el estado micorrícico de plántulas de *Pinus ponderosa* producidas bajo fertirriego sin manejo de la micorrización, que al comparar los porcentajes de micorrización total entre las plantas salidas de vivero (T1) y las envasadas en suelo estéril (T2), se observó un valor significativamente inferior en el T1, señalando que la dieta de fertilizante aplicada en el vivero de producción acelerada estaría inhibiendo el proceso de formación de las micorrizas. Por otro lado, observaron que el inóculo micorrícico adquirido en el vivero de producción acelerada permaneció viable y al terminar el efecto inhibitorio del fertirriego se manifestó abundantemente.

El análisis estadístico de % MA presentó una diferencia significativa (aumento) entre los plantines tratados con un 20 % de AA y los de 80 % de AA en el lote L3. Este comportamiento podría estar marcando un efecto de predisposición o “priming” que estimule la micorrización de las plantas crecidas con menor disponibilidad de agua en vivero una vez que son llevadas a campo.

Por otro lado, la diferencia mencionada no se vio reflejada en la respuesta de supervivencia ni en la de crecimiento inicial presentadas por el lote. La supervivencia no presentó diferencias entre los tratamientos, promediando un 96 % de supervivencia del lote plantado. Mientras que para el caso del crecimiento inicial, sólo se observó una pequeña diferencia en el crecimiento ($P= 0,0413$) entre los niveles de concentración de fósforo. Esto pudo deberse al hecho que en todos los casos los porcentajes de colonización MA fueron elevados (no menor al 87 %), mejorando y uniformando la capacidad de los plantines de captación de nutrientes y agua, repercutiendo en el crecimiento y en las altas tasas de supervivencia. Rhodes y Gerdeman (1975) observaron que la fase extra-radical de los hongos se extendía a una distancia mucho mayor de la raíz, siendo esta de 8 cm o más, en comparación al milímetro de extensión generado por los pelos radicales. Esta red de hifas actúa como una extensión del sistema radical de la planta, explorando un mayor volumen de suelo en busca de nutrientes inmóviles como el fósforo (Li *et al.* 2006). En esta misma línea, Kumar *et al.* (2017) mostraron que todos los tratamientos con MA (inoculación combinada *Acaulospora scrobiculata* y *Rhizophagus irregularis* juntas o individualmente usando las mismas especies por separado) incrementaron el crecimiento de las especies de árboles testeados en comparación con los tratamientos no inoculados. Los autores mencionan que esta diferencia pudo deberse al mayor volumen de suelo explorado en busca de disponibilidad de nutrientes y agua, por parte de las plantas micorrizadas.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el porcentaje de colonización micorrícica arbuscular (%MA) de plantines de *A. chilensis* cultivados en vivero es influenciado por los niveles de concentración de fósforo y el estado hídrico de medio de crecimiento durante la fase de establecimiento del cultivo. El proceso de colonización micorrícica se produce en el vivero, a pesar de que la misma se encuentre inhibida parcialmente por el manejo de fertirrigación y agua llevado adelante durante la viverización. El %MA aumenta una vez que la planta es llevada a campo independientemente del %MA con que el plantín llega del vivero. En este ensayo, al trabajar con un solo sitio de plantación y no presentarse diferencias marcadas en los %MA, no fue factible analizar su relación con la supervivencia y el crecimiento inicial. Sería

interesante en futuros estudios realizar experiencias en distintas situaciones de sitios de plantación, con plantas con distintos %MA y no micorrizadas, de manera de poder evaluar la relación entre el %MA y diferentes parámetros ecofisiológicos que inciden en el establecimiento y desarrollo inicial del plantín.

CONCLUSIONES GENERALES

En relación a la nutrición se observó que durante la fase de pleno crecimiento los esquemas de fertilización donde se mantienen proporciones iguales de nitrógeno y potasio (3:2:3) se generan asignaciones de biomasa más equilibradas entre las porciones aérea y radical de la planta y mayores crecimientos con respecto a las relaciones donde no se equipararon estos elementos (3:2:1). Por otro lado, en relación a la disponibilidad del elemento nutriente, a pesar de que los datos del análisis foliar muestran que la concentración de nitrógeno en hojas aumenta en forma directamente proporcional con la concentración del elemento en la solución nutritiva, esta mayor concentración no conduce a un mayor crecimiento. Por el contrario los tratamientos de relación 3:2:3 muestran un comportamiento inversamente proporcional al mismo, lo que sugiere un posible efecto de toxicidad por parte del elemento. De forma contraria en las relaciones 3:2:1 el crecimiento no se correlaciona con la concentración en hoja de N, por lo que posiblemente la falta de crecimiento general en estos tratamientos, se relaciona con un desbalance entre la parte de transpiración y de absorción (BSA/BSR). Este último comportamiento sugiere que este desbalance provoca una menor conductancia estomática, a raíz del fuerte control estomático característico de esta especie, generando una menor captación de CO₂ y transformando a este elemento en limitante para el desarrollo.

Los resultados obtenidos por el manejo de la disponibilidad de fósforo y la condición hídrica del sustrato, dos factores que influyen el desarrollo radical durante la fase de establecimiento, muestran cambios en el potencial hídrico de los plantines medido al mediodía (Ψ_{hm}). La falta de variación del resto de las variables hidráulicas medidas, sugiere una restricción hídrica a nivel foliar. Los mayores Ψ_{hm} los presentan los tratamientos con mayor contenido hídrico y mayor disponibilidad de P, siendo también los tratamientos que presentaron los mayores desarrollos de biomasa total.

A partir de los resultados obtenidos en estos ensayos, se evaluaron distintas dinámicas de sombreado, como una herramienta para manejar los niveles de radiación en los microambientes de cultivo. Los resultados

obtenidos, muestran que los ambientes con dinámicas de sombreo en flecos de luz generaron asignaciones de biomasa (BSA/BSR) y relaciones de área foliar-tejido conductivo (AF/Ax) más balanceadas, como así también micro-ambientes con valores de VPD moderados. Por otro lado, este tipo de sombreo plantea condiciones de irradiancias alternadas entre los flecos de luz con elevados PPFd y los flecos de sombra con bajos PPFd. En conjunto estas características componen las mejores condiciones para el crecimiento de los plantines de Ciprés de la Cordillera, ya que por un lado favorecen la apertura estomática y por otro provee de irradiancias elevadas en los flecos de luz, que son traducidos por *A. chilensis* en crecimiento, ya que no presenta efectos de fotoinhibición ante dichas variaciones de intensidad de luz.

El conjunto de respuestas mostradas por los plantines de Ciprés de la Cordillera en las tres experiencias anteriormente descritas, sugiere que el comportamiento isohídrico a partir de un fuerte control estomático característico de esta especie, sería la principal causante de la baja tasa de crecimiento mostrada por el mismo en vivero, sugiriendo que la restricción a la incorporación de carbono actuaría como factor limitante. En este sentido, los resultados obtenidos en el ensayo de dinámicas de sombreo aportaron datos de alto impacto en la producción industrial de plantines de esta especie, debiéndose considerar el inicio de líneas de investigación tecnológica que permitan prescribir las dimensiones de flecos de luz más convenientes, entre otras consideraciones relativas al manejo de la luz en el vivero. También la dinámica del intercambio gaseoso debería ser considerada en nuevas aproximaciones al problema del bajo crecimiento inicial de la especie, como por ejemplo la respuesta de los plantines a ambientes de viverización con distintas presiones de dióxido de carbono.

El ensayo realizado en esta tesis en relación al uso de hormonas, pone en evidencia que bajo este método de cultivo, las aplicaciones exógenas de auxinas y NO no tienen efectos en el desarrollo del sistema radical de los plantines. La falta de efecto concreto en relación a los tratamientos podría deberse al proceso de autopoda que sufre el sistema radical de los plantines al cultivarse en contenedores, el cual generaría un proceso de redistribución hormonal, debido a la muerte apical tanto de la raíz principal como de las

raíces laterales, lo que podría estar enmascarando el efecto buscado con la aplicación exógena de las hormonas, haciendo su uso poco efectivo para los objetivos buscados.

Finalmente en relación a la micorrización de los plantines con respecto al método de cultivo, se observó que el proceso de colonización micorrícica se produce en el vivero a pesar de que la misma se encuentre inhibida parcialmente por el manejo de fertirrigación y agua llevado adelante durante la viverización. El %MA aumenta una vez que la planta es llevada a campo independientemente del %MA con que el plantín sale del vivero, por lo que no se considera necesario realizar tratamientos de inoculación durante la viverización.

Durante el desarrollo de la presente Tesis se puso en evidencia que la dinámica de crecimiento en vivero de los plantines de Ciprés de la Cordillera se encuentra altamente influenciada por las tensiones hídricas generadas en el plantín a partir de cambios en su arquitectura o en el microambiente de cultivo (e.g. relación BSA/BSR, AF/Ax, DPV), los cuales repercuten en la dinámica de intercambio gaseoso. De los factores ambientales y fisiológicos estudiados, el manejo de la luz, la nutrición y el agua fueron los que mostraron un mayor efecto sobre la arquitectura del plantín. Evidenciándose a partir de su manejo, un mayor crecimiento acompañado de un mejor balance entre las fracciones de transpiración y de absorción. Por otro lado, bajo la metodología de viverización utilizada, tanto las hormonas como las micorrizas estudiadas, no tuvieron efecto sobre el crecimiento del plantín en vivero.

El estudio conjunto de los factores analizados, entregó resultados de inmediata aplicación, estableciendo pautas claras sobre el manejo de factores que inciden en la dinámica de crecimiento del cultivo, como el contenido hídrico del sustrato y disponibilidad de P durante la fase de establecimiento; la nutrición durante la fase de crecimiento rápido en relación a la disponibilidad de N y su relación con el K; y el comportamiento de las micorrizas tanto en el vivero como en su establecimiento a campo. Por otro lado, las respuestas observadas en varios de los ensayos realizados dejan abiertas líneas de investigación en relación al manejo, tanto de los microambientes de cultivo como de la arquitectura del plantín, buscando disminuir las tensiones hídricas

con el objetivo de mejorar la dinámica del intercambio gaseoso. En relación a lo mencionado por un lado sería interesante profundizar los estudios comenzados en esta Tesis sobre distintas estructuras de sombreo en flecos y también comenzar otra línea de investigación en relación a la respuesta del cultivo de Ciprés de la Cordillera bajo atmósferas controladas de CO₂. Finalmente es importante resaltar que esta capacidad de respuesta mostrada por los plantines de *A. chilensis* pone en valor la potencialidad que tiene el manejo de la viverización, persiguiendo como objetivo final la generación de protocolos de cultivo específicos para cada especie, como un primer eslabón hacia la generación de programas de restauración y/o reforestación más efectivos y eficientes.

BIBLIOGRAFÍA

- Abrams MD, ME Kubiske. 1990. Leaf structural characteristics of 31 hardwood and conifer tree species in central Wisconsin: Influence of light regime and shade tolerance rank. *For. Ecol. Manag.* 31:245–53.
- Albaugh TJ, HL Allen, PM Dougherty, LW Kress, JS King. 1998. Leaf area and above- and belowground growth responses of loblolly pine to nutrient and water additions. *For Sci* 44: 317–328.
- Al-Ghazi Y, B Muller, S Pinloche, TJ Tranbarger, P Nacry, M Rossignol, F Tardieu, P Doumas. 2003. Temporal response of Arabidopsis root architecture to phosphate starvation: evidence for the involvement of auxin signalling. *Plant Cell Environ.* 26: 1053–1066.
- Allen RG, LS Pereira, DR Katholieke, M Smith. 2006. Evapotranspiración del cultivo. Guías para la determinación de los requerimientos de agua de los cultivos. Estudio FAO Riego y Drenajes 56. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. 277p.
- Anderson JM, Y Park, WS Chow. 1997. Photoinactivation and photoprotection of photosystem II in nature. *Physiol. Plant.* 100: 214–223.
- Azpilicueta MM, S Varela, A Martinez, L Gallo. 2010. Manual de viverización, cultivo y plantación de roble pellin en el norte de la Región Andino Patagónico. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires. 74 p.
- Ballare CL, AL Scopel, RA Sánchez. 1991. Photocontrol os stem elongation in plant neighbourhoods: effects of photon fluence rate under natural conditions of radiation. *Plant Cell Environ.* 14: 57-65.
- Baltzer JL, SC Thomas. 2007. Determinants of whole-plant light requirements in Bornean rain forest tree saplings. *J. Ecol.* 95:1208–21.
- Barker SJ, D Tagu, G Delp. 1998. Regulation of Root and Fungal Morphogenesis in Mycorrhizal Symbioses. *Plant Physiol.* 116: 1201–1207.

- Barroetaveña C, M Rajchenberg. 2003. Las micorrizas y la producción de plántulas de *Pinus ponderosa* Dougl. ex Laws. en la Patagonia, Argentina. *Bosque*, Vol. 24 N°1, 17-33.
- Basil G, M Leanza, MJ Mazzarino, L Roselli, L Lugano, L Tejera. 2002. Nutrición de plantines de coníferas en viveros del NO de la Patagonia argentina. *Infor. Agronómicas Cono Sur*. 15: 12-15.
- Basil G, MJ Mazzarino, L Roselli, F Letourneau. 2009. Efecto del compost de biosólidos en la producción de plantines de *Austrocedrus chilensis* (Ciprés de la Cordillera). *Ciencia del Suelo*. 27: 49-55.
- Bilger W, U Schreiber, M Bock. 1995. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. *Oecologia*. 102: 425-432.
- Begham JM. 1996. Methods of soil analysis. Part 3. Chemical Methods. SSSA Book Series N° 5. Nelson and Sommers: Total Carbon, Organic Carbon and Organic Matter. 34: 961-1010.
- Beligni MV, L Lamattina. 2000. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta*. 210: 215–221.
- Beligni MV, L Lamattina. 2001a. Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant Cell Environ*. 24: 267–278.
- Beligni MV, L Lamattina. 2001b. Nitric oxide: a non-traditional regulator of plant growth. *Trends Plant Sci*. 6: 508–509.
- Benkova E, M Michniewicz, M Sauer, T Teichmann, D Seifertova, G Jürgens, J Friml. 2003. Local, Efflux-Dependent Auxin Gradients as a Common Module for Plant Organ Formation. *Cell*. 115: 591–602.
- Boerjan W, MT Cervera, M Delarue, T Beeckman, W Dewitte, C Bellini, M Caboche, H Van Onckelen, M Van Montagu, D Inzé. 1995. Superroot, a Recessive Mutation in *Arabidopsis*, Confers Auxin Overproduction. *The Plant Cell*. 7: 1405-1419.

- Bond BJ, BT Farnsworth, RA Coulombe, WE Winner. 1999. Foliage physiology and biochemistry in response to light gradients in conifers with varying shade tolerance. *Oecologia*, 120: 183-192.
- Bonfante P, A Genre. 2010. Mechanisms underlying beneficial plant – fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *NATURE COMMUNICATIONS*. 1:48. DOI: 10.1038
- Bowman WD, SW Roberts. 1985. Seasonal changes in tissue elasticity in chaparral shrubs. *Physiologia plantarum*. Vol 65, issue 3, pp 233-236. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1985.tb02388.x>,
- Bucci SJ, FJ Scholz, G Goldstein, FC Meinzer, AC Franco, PI Campanello, R Villalobos-Vega, M Bustamante, F Miralles-Wilhelm. 2006. Nutrient availability constrains the hydraulic architecture and water relations of savannah trees. *Plant Cell Environ*. 29: 2153–2167.
- Bucci SJ, FG Scholz, G Goldstein, FC Meinzer, ME Arce. 2009. Soil water availability and rooting depth as determinants of hydraulic architecture of Patagonian woody species. *Physiological Ecology*. *Oecologia*. 160: 631–641.
- Burdett A. 1979. New methods for measuring root growth capacity: their value in assessing lodge pole pine stock quality. *Canadian Journal of Forest Research* 9(1): 63-67. DOI:10.1139/x79-011
- Bray RH, LT Kurtz. 1945. Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soils. *Soil Sci.* Brown N. 1993. The implications of climate and gap microclimate for seedling growth conditions in Bornean Lowland rainforest. *J. Trop. Ecol*. 9: 153–168.
- Brundrett M, N Bougher, T Grove, N Malajczuk. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Australian Center for International Agricultural Research, Monograph 32. Canberra, Australia. 374p.
- Brunner I, C Herzog, MA Dawes, M Arend, C Sperisen. 2015. How tree roots respond to drought. *Front. Plant Sci.*. 6: 547.

- Campanello PI, MG Gatti, L Montti, M Villagra, G Goldstein. 2011. Ser o no ser tolerante a la sombra: economía de agua y carbono en especies arbóreas del Bosque Atlántico (Misiones, Argentina). *Ecología Austral*. 21: 285-300.
- Carter MR. 1993. Soil Sampling and Methods of Analysis. Canadian Society of Soil Science. J.E. Richards. Chemical Characterization of Plant Tissue. 15: 115-139.
- Cázares E, Trappe JM. 1993. Vesicular endophytes in roots of Pinaceae. *Mycorrhiza*. 2: 153-156.
- Collin A, C Messier, SW. Kembel, N Bélanger. 2017. Low Light Availability Associated with American Beech Is the Main Factor for Reduced Sugar Maple Seedling Survival and Growth Rates in a Hardwood Forest of Southern Quebec. *Forests*. 8: 413. doi:10.3390/f8110413
- Constantino IN. 1949. Parcelas experimentales permanentes. *Libocedrus chilensis* (Don) Endl. Min. Agric. y Ganadería, Publ. Técn. N° 13, Buenos Aires.
- Coopman RE, M Reyes-Díaz, VF Briceño, L Corcuera, HM Cabrera, LA Bravo. 2008. Changes during early development in photosynthetic light acclimation capacity explain the shade to sun transition in *Nothofagus nítida*. *Tree Physiol.*. 28: 1561–1571.
- Correa-Aragunde NM, ML Graziano, L Lamattina. 2004. Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta*. 218: 900–905. doi:10.1007/s00425-003-1172-7
- Coskun D, DT Britto, HJ Kronzucker. 2016. The nitrogen–potassium intersection: membranes, metabolism, and mechanism. *Plant Cell Environ*. 13 p. doi: 10.1111/pce.12671
- Chaves MM. 1991. Effects of Water Deficits on Carbon Assimilation. *Journal of Experimental Botany*. 42(1): 1–16. <https://doi.org/10.1093/jxb/42.1.1>

- Chen YH, YY Chao, YY Hsu, CY Hong, CH Kao. 2012. Heme oxygenase is involved in nitric oxide- and auxin-induced lateral root formation in rice. *Plant Cell Rep.* 31: 1085–1091. doi:10.1007/s00299-012-1228-x.
- Clark DB, DA Clark, PM Rich, S Weiss, SF Oberbauer. 1995. Landscape scale evaluation of understory light and canopy structure: methods and application in a neotropical lowland rain forest. *Can. J. For. Res.* 26: 747–757.
- D'Ambrosio de Argüeso A. 1986. *Manual de técnicas en histología vegetal*. 1ra ed. Buenos Aires: Ed. Hemisferio Sur S.A.
- Dawson TE, LC Bliss. 1989. Patterns of water use and the tissue water relations in the dioecious shrub, *Salix arctica*: the physiological basis for habitat partitioning between the sexes. *Oecologia.* 79 (3): 332–343.
- Davison J, M Moora, M Öpik, A Adholeya, L Ainsaar, A Bâ, M Zobel. 2015. Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science.* 349: 970-973.
- Dezzotti A, L Sancholuz. 1991. "Los bosques de *Austrocedrus chilensis* en Argentina ubicación, estructura y crecimiento". *Bosque* 12 (2): 43-52.
- Dengel S, J Grace. 2010. Carbon dioxide exchange and canopy conductance of two coniferous forests under various sky conditions. *Oecologia.* 164: 797–808.
- Dengel S, J Grace, A MacArthur. 2015. Transmissivity of solar radiation within a *Picea sitchensis* stand under various sky conditions. *Biogeosciences.* 12: 4195–4207.
- Denslow JS. 1980. Gap partitioning among rainforest trees. *Biotropica.* 12: 47–55.
- Donald D. 1988. The application of inorganic fertilizers to conditioned *Pinus radiata* to lifting as a means of improving root growth capacity. *South. Afr. For. J.* 146: 23-25. DOI: 10.1080/00382167.1988.9630354
- Donoso Zegers C. 1993. *Bosques templados de Chile y Argentina*. Colección nueva técnica, Conaf. Ed. Universitaria. Santiago de Chile. 484 p.

- Donoso Zegers C, B Escobar Rodriguez, M Gonzalez Cangas. 1995. Técnicas de vivero y plantación para Ciprés de la Cordillera (*Austrocedrus chilensis*). Chile Forestal, CONAF, documento técnico 88. 11 p.
- Durbak A, H Yao, P McSteen. 2012. Hormone signaling in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*. 15: 92–96.
- Durner J, D Wendehenne, DF Klessig. 1998. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci* 95:10328–10333.
- Duryea, M.L. y Landis, T.D., 1984. Nursery Manual. Production of bareroot seedlings. MartinusNijhoff/ Dr W Junk Publishers. 185 p.
- Duryea ML, KM McClain. 1984. Altering seedling physiology to improve reforestation success. En: Duryea, M.L.; Brown, G.N., eds. *Seedling physiology and reforestation success*. Boston: MartinusNijhoff/Dr W Junk Publishers: 77-114.
- Drever CR, KP Lertzman. 2001. Light-growth responses of coastal Douglas-fir and western redcedar saplings under different regimes of soil moisture and nutrients. *Can. J. For. Res.* 31: 2124-2133.
- Enricci JA, G Alday, DS Massone. 2001. Producción de plantines en contenedores. VI Jornadas Técnicas de Viveristas Forestales de la Patagonia. Esquel, Chubut. INTA-CIEFAP-UNPat-Municipalidad de Esquel.
- Enricci JA, DS Massone, 2003. Producción de plantines plug+0 de *Austrocedrus chilensis* en Patagonia Argentina. XII Congreso Forestal Mundial. Canada.
- Epron D, E Dreyer, N Bréda. 1992. Photosynthesis of oak trees (*Quercus petraea* (Matt) Liebl.) during drought stress under field conditions: diurnal course of net CO₂ assimilation and photochemical efficiency of photosystem II. *Plant Cell Environ.* 15: 809–820.
- Escobar R. 2007. MANUAL DE VIVERIZACIÓN, *Eucalyptus globulus* a raíz cubierta. Proyecto “Desarrollo de estándares de origen de la semilla y

calidad de la planta para el aumento de la productividad en plantaciones y bosques naturales”. INNOVA. CHILE – CORFO. 230 p.

- Evans JR, H Poorter. 2001. Photosynthetic acclimation of plants to growth irradiance: the relative importance of specific leaf area and nitrogen partitioning in maximizing carbon gain. *Plant Cell Environ.* 24: 755-767.
- Ewers BE, R Oren, TJ Albaugh, PM Dougherty. 1999. Carry-over effects of water and nutrient supply on water use of *Pinus taeda*. *Ecol Appl* 9: 513–525.
- Ewers BE, R Oren, JS Sperry. 2000. Influence of nutrient versus water supply on hydraulic architecture and water balance in *Pinus taeda*. *Plant Cell Environ.* 23: 1055–1066.
- Faustino LI, NML Bulfe, MA Pinazo, SE Monteoliva, C Graciano. 2013. Dry weight partitioning and hydraulic traits in young *Pinus taeda* trees fertilized with nitrogen and phosphorus in a subtropical area. *Tree Physiol.* 33(3): 241-251. DOI: 10.1093/treephys/tps129.
- Fernandez ME, J Gyenge. 2010. Técnicas de medición en ecofisiología vegetal: conceptos y procedimientos. Proyecto Específico “Bases ecofisiológicas para la vii silvicultura de implantación y conducción”. INTA. 154 p.
- Fernandez-Marcos M, L Sanz, DR Lewis, GK Muday, O Lorenzo. 2011. Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PIN-FORMED 1(PIN1)-dependent acropetal auxin transport. *PNAS.* 108: 18506–18511. doi:10.1073/pnas.1108644108
- Fontenla S, R Godoy, M Havrylenko, P Rosso. 1998. Root associations in *Austrocedrus chilensis* forests and seasonal dynamics of arbuscular mychorryza. *Mychorryza.* 8: 29-33.
- Fontenla S, N Baccala, M Havrylenko. 2001. Dinamica de las micorrizas arbusculares en dos bosques de *Austrocedrus chilensis* con diferente estado sanitario. *Ecología.* 15: 37-44.
- Fullbright TE, JO Kuti, AR Tipton. 1997. Effect of nurse-plant canopy light intensity on shrub seedling growth. *J. Range Manag.* 50(6): 607-610.

- Gagnon J, CG Langlois, JA Fortin. 1988. Growth and ectomycorrhiza formation of containerized black spruce seedlings as affected by nitrogen fertilization, inoculum type, and symbiont. *Can. J. For. Res.* 18: 922-929.
- Gamon JA, RW Pearcy. 1989. Leaf movement, stress avoidance and photosynthesis in *Vitis californica*. *Oecologia* 79: 475–481.
- Garcés San Martín MA. 2002. Aportes de N, P, K y su combinacional incremento en biomasa en plantas de *Eucalyptus globulus* Labill. ssp. *globulus*. Tesis Ingeniero Forestal. Concepción, Chile. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción. 41 p.
- García I, R Mendoza, MC Pomar. 2008. Deficit and excess of soil water impact on plant growth of *Lotus tenuis* by affecting nutrient uptake and arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Soil.* 304: 117.
- Genty B, LM Briantais, NR Baker. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990- 87:92
- Gianinazzi S, A Golotte, M-N Binet, D Tuinen, D Redecker, D Wipf. 2010. Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza.* 20: 519-530.
- Givnish TJ. 1988. Adaptation to sun and shade: a whole-plant perspective. *Aust. J. Plant Phys.* 15: 63–92.
- Gosling P, A Mead, M Proctor, JP Hammond, GD Bending. 2013. Contrasting arbuscular mycorrhizal communities colonizing different host plants show a similar response to a soil phosphorus concentration gradient. *New Phytol.* 198: 546–556.
- Gouvea CMCP, JF Souza, ACN Magalhaes, IS Martins. 1997. NO releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Reg.* 21:183–187.
- Gow AJ, HJ Ischiropoulos, 2001. Nitric oxide chemistry and cellular signaling. *J Cell Physiol.* 187: 277–282.

- Gergoff Grozeff GE, M De Los Á. Romero, M Aubone Videla. 2017. Nitric oxide in combination with indole-3-butyric acid improves root growth in 'Ferdor Julior' hardwood cuttings (*Prunus insistitia* (L.) × *Prunus domestica* (L.)), *J Horti Sci Biotech*. DOI: 10.1080/14620316.2017.1358592.
- Gu L, JD Fuentes, HH Shugart, RM Staebler, TA Black. 1999. Responses of net ecosystem exchanges of carbon dioxide to changes in cloudiness: Results from two North American deciduous forests, *J. Geophys. Res.* 104: 31421–31434.
- Gu L, D Baldocchi, SB Verma, TA Black, T Vesala, EM Falge, PR Dowty. 2002. Advantages of diffuse radiation for terrestrial ecosystem productivity, *J. Geophys. Res.* 107: 2–23.
- Gyenge JE, ME Fernández, G Dalla Salda, T Schlichter. 2005. Leaf and whole-plant water relations of the Patagonian conifer *Austrocedrus chilensis* (D. Don) Pic. Ser. et Bizzari: implications on its drought resistance capacity. *Ann. For. Sci.* 62: 297-302.
- Gyenge JE, ME Fernández, T Schlichter. 2007. Influence of radiation and drought on gas exchange of *Austrocedrus chilensis* seedlings. *Bosque*, Vol. 28, Núm. 3, Universidad Austral de Chile. pp. 220-225.
- Greer DH. 1998. Photoinhibition of photosynthesis in dwarf bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves: effect of sink-limitations induced by changes in daily photon receipt. *Planta*. 205: 189-196.
- Groom QJ, NR Baker. 1992. Analysis of light-induced depressions of photosynthesis in leaves of a wheat crop during the winter. *Plant Physiol.* 100: 1217 –1223.
- Grosfeld J, D Barthélémy. 2004. Primary growth and morphological markers of interannual growth limits in Cupressaceae from Patagonia. *Bot. J. Linn. Soc.* 146(3): 285–293. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2004.00331.x>
- Hartmann HT, DE Kester. 1987. Propagación de plantas. CECSA. 760p.
- Havrylenko SB. 2005. Efectos de distintos programas de fertirrigación en *Austrocedrus chilensis* (D. Don) Pic. Ser. et Bizzari. Seminario Final

presentado al Departamento de Ingeniería Forestal, Facultad de Ingeniería, UNPSJB. Esquel. Argentina. 40 p.

- Haynes BE, ST Gower. 1995. Belowground carbon allocation in unfertilized and fertilized red pine plantations in northern Wisconsin. *Tree Physiol.* 15: 317–325.
- Herder GD, GV Isterdael, T Beeckman, I De Smet. 2010. The roots of a new green revolution. *Trends Plant Sci.* Vol15 N°11.
- Holmgren M. 2000. Combined effects of shade and drought on tulip poplar seedlings: trade-off in tolerance or facilitation?. *Oikos.* 90: 67–78.
- Howell K, T Harrington. 2004. Nursery practices influence seedling morphology, field performance, and cost efficiency of containerized cherrybark oak. *South J Appl For.* 28: 152-162.
- Huang JS, JA Knopp. 1998. Involvement of nitric oxide in *Ralstonia solanacearum*-induced hypersensitive reaction in tobacco. In P Prior, J Elphinstone, C Allen, eds, *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects.* Institut National de la Recherche Agronomique and Springer Editions, Berlin. 218–224.
- Hueck K. 1978. Los bosques de Sudamérica: ecología, composición e importancia económica. Eschborn. Ed. Sociedad Alemana de Cooperación Técnica (GTZ). 476 p.
- Lamattina L., C García-Mata, M Graziano, & G Pagnussat. 2003. Nitric oxide: The versatility of an extensive signal molecule. *Annual Review of Plant Biology* 54: 109–136. doi:10.1146/annurev.arplant.54.031902.134752.
- López-Bucio J, E Hernández-Abreu, L Sánchez-Calderón, MF Nieto-Jacobo, J Simpson, L Herrera-Estrella. 2002. Phosphate Availability Alters Architecture and Causes Changes in Hormone Sensitivity in the *Arabidopsis* Root System. *Plant Physiol.* 129(1): 244-256. DOI: 10.1104/pp.010934.

- Ianson DC, MF Allen. 1986. The effects of soil texture on extraction of vesicular-Arbuscular Mycorrhizal fungal spores from arid sites. *Mycologia* 78(2): 164-168.
- Ingestad T. 1979. Mineral nutrient requirement of *Pinus silvestris* and *Picea abies* seedlings. *Physiol. Plant.* 45(4): 373-380. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1979.tb02599.x
- ISTA, 2009. International Seed Testing Association. Handbook on Seedling Evaluation. Third Edition. (Ed.) R. Don. Zürich.
- James SA, DT Bell. 2000. Influence of light availability on leaf structure and growth of two *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* provenances. *Tree Physiol.* 20: 1007-1018.
- Janse-ten Klooster SH, EJP Thomas, FJ Sterck. 2007. Explaining interspecific differences in sapling growth and shade tolerance in temperate forests. *J. Ecol.* 95: 1250–60.
- Johnston AE, GFJ Milford. 2012. Potassium and nitrogen interactions in crops. Potash Development Association. Rothamsted Research, Harpenden, Hertfordshire AL5 2JG. 16 p. Jones HG. 1996. *Plants and Microclimate. A quantitative approach to environmental plant physiology.* Second Edition. Cambridge University Press. 413 p.
- Jones B, K Ljung. 2012. Subterranean space exploration: the development of root system architecture. *Current Opinion in Plant Biology.* 15: 97–102.
- Jumpponen A. 2001. Dark septate endophytes-are they mycorrhizal? *Mycorrhiza* 11: 207–211.
- Jumpponen A, J Trowbridge, K Mandyam y L Johnson. 2005. Nitrogen enrichment causes minimal changes in arbuscular mycorrhizal colonization but shifts community composition – evidence from rDNA data. *Biol Fertil Soils.* 41: 217–224.
- Kamaluddin M, JJ Zwiazek. 2001. Metabolic inhibition of root water flow in red-osier dogwood (*Cornus stolonifera*) seedlings. *J. Exp. Bot.* 52: 739-745.

- Kanniah KD, J Beringer, P North, L Hutley. 2012. Control of atmospheric particles on diffuse radiation and terrestrial plant productivity A review, Prog. Phys. Geogr. 36: 209–237.
- Kira T, K Yoda. 1989. Vertical stratification in microclimate. In Ecosystems of the World 14: Tropical Rain Forest Ecosystems. Eds. H. Leith and M.J.A.Werger. Elsevier, Amsterdam. 55–71.
- Kitzberger T, DF Steinaker, TT Veblen. 2000. Effects of climatic variability on facilitation of tree establishment in northern Patagonia. Ecology. 81: 1914–1924.
- Kolbert Z, B Bartha, L Erdei. 2008. Exogenous auxin-induced NO synthesis is nitrate reductase-associated in *Arabidopsis thaliana* root primordia. J Plant Physiol. 165: 967–975.
- Kumar N, A Kumar, A Shukla, S Kumar, AR Uthappa, OP Chaturvedi. 2017. Effect of Arbuscular Mycorrhiza Fungi (AMF) on Early Seedling Growth of Some Multipurpose Tree Species. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci. 6(7): 3885-3892. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.607.400>
- Krasowski M, J Owens, L Tackaberry, H Massicotte. 1999. Above- and below-ground growth of white spruce seedlings with roots divided into different substrates with or without controlled release fertilizer. Plant Soil 217: 131-143.
- Krause GH. 1988. Photoinhibition of photosynthesis, An evaluation of damaging and protective mechanisms, Physiol. Plantarum. 74: 566–574.
- Krause GH, OY Koroleva, JW Dalling, K Winter. 2001. Acclimation of tropical tree seedlings to excessive light in simulated tree-fall gaps. Plant Cell Environ. 24: 1345–1352.
- Lambers H, FS Chapin III, TL Pons. 1998. Plant physiological ecology. Springer-Verlag, New York, 540 p.
- La Manna L. 2005. Caracterización de los suelos bajo bosque de *Austrocedrus chilensis* a través de un gradiente climático y topográfico en Chubut, Argentina. Bosque, 26(2): 137-153

- Landis T. 1985. Mineral nutrition as an index of seedling quality. En Duryea, M. (Ed): Evaluating seedling quality: principles, procedures and predictive abilities of mayor test. Forest Research Lab. Oregon State University Corvallis. 29-48.
- Landis T, RW Tinus, SE McDonald, JP Barnett. 1989. Seedling Nutrition and Irrigation, Volume 4. The Container Tree Nursery Manual.Agric.Handbk. 674. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, Forest Service. 41-89.
- Landis T, RW Tinus, SE McDonald, JP Barnett. 1989. The Biological Component: Nursery Pests and Micorrhizae. The Container Tree Nursery Manual, Volume 5.. Agric.Handbk. 674. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, Forest Service. 101-167.
- Landis TD. 1990. Containers and growing media.. The Container Tree Nursery Manual, Volume 2. Agric.Handbk. 674. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, Forest Service. 41-85.
- Larcher W. 2003. Physiological plant ecology. Springer-Verlag, Berlin. 513 p.
- Lavado R, MJ Mazzarino. 2005. Fertilización de Forestales. 445-454. En: HE Echeverría & FO García (eds.). Fertilidad de Suelos y Fertilización de Cultivos. INPOFOS-INTA, Argentina.
- Laxalt AM, MV Beligni, L Lamattina. 1997. Nitric oxide preserves the level of chlorophyll in potato leaves infected by *Phytophthora infestans*. Eur J Plant Pathol. 73: 643–651.
- Le Roux X, S Grand, E Dreyer, F-A Daudet. 1999. Parametrization and testing of a biochemically based photosynthesis model for walnut (*Juglans regia*) trees and seedlings. Tree Physiol. 19: 481-492.
- Le Tacon F, D Mousain, J Garbaye, D Bouchard, JL Churin, C Argillier, JM Amirault, B Genere. 1997. Mycorhizes, pépinières et plantations forestières en France. Rev. For. Fr. 49: 131-154.

- Leakey ADB, MC Press, JD Scholes. 2003. High-temperature inhibition of photosynthesis is greater under sunflecks than uniform irradiance in a tropical rain forest tree seedling, *Plant Cell Environ.* 26: 1681–1690.
- Lebedeff N. 1942. Rejuvenecimiento del ciprés e influencia de la ganadería. Dir. Gral. Parques Nacionales. Buenos Aires. Bol. For. 1938-1940.
- Lekberg Y, RT Koide. 2008. Effect of soil moisture and temperature during fallow on survival of contrasting isolates of arbuscular mycorrhizal fungi. *Botany.* 86: 1117-1124.
- Letourneau FJ, E Andenmatten, T Schlichter. 2004. Effect of climatic conditions and tree size on *Austrocedrus chilensis*–shrub interactions in northern Patagonia. *For. Ecol. Manage.* 191: 29-38.
- Letourneau FJ. 2006. Estudio de las interacciones positivas y negativas sobre el crecimiento de *Austrocedrus chilensis* durante una etapa inicial de desarrollo, en un matorral sucesional méxico. Tesis doctoral. Centro Universitarios Regional Bariloche. Universidad Nacional del Comahue. 182 p.
- Leshem YY, RBH Wills, KuV Veng-Va. 1998. Evidence for the function of the free radical gas-nitric oxide (NO) as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiol Biochem.* 36: 825–833.
- Leverenz JW. 1995. Shade shoot structure of conifers and the photosynthetic response to light at two CO₂ partial pressures. *Func. Ecol.* 9: 413-421.
- Li HY, SE Smith, RE Holloway, Y Zhu, FA Smith. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi contribute to phosphorus uptake by wheat grown in aphosphorus-fixing soil even in the absence of positive growth responses. *New Phytol.* 172: 536–543.
- Loguercio GA, P Burschel, M Rey. 1999. El bosque de Ciprés de la Cordillera: su conservación y uso. Guía práctica. Folleto de divulgación N° 14. CIEFAP. Chubut. Argentina. 21p.

- Long SP, S Humphries, PG Falkowski. 1994. Photoinhibition of Photosynthesis in Nature, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molecul. Biol.* 45: 633–662.
- López-Bucio J, E Hernandez-Abreu, L Sanchez-Calderon, MF Nieto-Jacobo, J Simpson, L Herrera-Estrella. 2002. Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the Arabidopsis root system. *Plant Physiol.* 129: 244–256.
- López-Bucio J, E Hernandez-Abreu, L Sanchez-Calderon, A Perez-Torres, RA Rampey, B Bartel, L Herrera-Estrella. 2005. An auxin transport independent pathway is involved in phosphate stress-induced root architectural alterations in Arabidopsis. Identification of BIG as a mediator of auxin in pericycle cell activation. *Plant Physiol.* 137: 681–691.
- McDowell N, WT Pockman, CD Allen, DD Breshears, N Cobb, T Kolb, J Plaut, J Sperry, A West, DG Williams. 2008. Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? *New Phytol* 178: 719–739
- Marchelli P, N Fernández, S Fontela. 2013. Hongos estratégicos que ayudan en la reforestación. *Revista de Investigaciones Agropecuarias (RIA)*. Centro Regional Universitario Bariloche (CRUB). Conicet. INTA Bariloche.
- Marschner H. 2012. Mineral nutrition of higher plants. Third Edition. London, UK. Academic Press. 651 p.
- Martinez DB, C Barroetaveña, M. Rajchenberg, 2007. Influencia del régimen de fertilización y del momento de inoculación en la micorrización de *Pinus ponderosa* en la etapa de vivero. *Bosque* 28(3): 226-233.
- Mason EG. 2001. A model of the juvenile growth and survival of *Pinus radiata* D. Don-Adding the effects of initial seedling diameter and plant handling. *New Forests.* 22(1): 133-158.
- Maxwell K, Johnson GN. 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51(345): 659–668, <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>
- Mendoza Quintana AC. 1997. Influencia de la temperatura en el potencial de crecimiento radical en plantas de: *Pinus radiata*, *Eucalyptus nitens* y

Eucalyptusglobulus. Tesis presentada para optar al Título Profesional de Ingeniero Forestal. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Concepción. 49 p.

Meyer FH. 1973. Distribution of ectomycorrhiza in native and man made forest. In Marks GC, TT Kozlowsky eds. Ectomycorrhizae, their ecology and physiology. New York, USA. Academic Press. 87-105.

Meyer S, B Genty. 1998. Mapping intercellular CO₂ mole fraction (C_i) in *Rosa rubiginosa* leaves fed with abscisic acid by using chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiol.* 116: 947 –957.

Mizunaga H, T Umeki. 2001. The relationships between tree size and spatial distribution of foliage mass within crowns of Japanese cedars (*Cryptomeria japonica*) in young plantation. *For. Ecol. Manag.* 149(1-3): 129-140.

Mohr-Bell FD. 2015. Superficies afectadas por incendios en la región bosque Andino Patagónico (BAP) durante los veranos de 2013-2014 y 2014-2015. *Patagonia forestall. Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico. Argentina. vol 21(1): 34-41.*

Montero JI. 2009. “Manejo del clima en el invernadero Mediterráneo”. Capítulo VI: tendencias tecnológicas en los invernaderos mediterráneos. IFAPA.

Moubayidin L, R Di Mambro, S Sabatini. 2009. Cytokinin–auxin crosstalk. *Trends Plant Sci.* 14: 557-562.

Myers GP, AC Newton, O Melgarejo. 2000. The influence of canopy gap size on natural regeneration of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) in Bolivia. *For. Ecol. Manage.* 127: 119–128.

Narcy Ph, G Canivenc, B Muller, A Azmi, H Van Onckelen, M Rossignol, P Doumas. 2005. A Role for Auxin Redistribution in the Responses of the Root System Architecture to Phosphate Starvation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 138: 2061–2074.

Ola A, IC Dodd, JN Quinton. 2015. Can we manipulate root system architecture to control soil erosion?. *SOIL.* 1: 603–612.

- Ortega U, M Dunabeitia, S Menéndez, C González-Murúa, J Majada. 2004. Effectiveness of mycorrhizal inoculation in the nursery on growth and water relations of *Pinus radiata* in different water regimes. *Tree Physiol.* 24: 65-73.
- Osório A, ML Osório, MM Chaves, JS Pereira. 1998. Water deficits are more important in delaying growth than in changing patterns of carbon allocation in *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiol.* 18: 363-373.
- Ögren E, M Sjöström. 1990. Estimation of the effect of photoinhibition on the carbon gain in leaves of a willow canopy. *Planta.* 181: 560–567.
- Pagnussat GC, M Simontacchi, S Puntarulo, L Lamattina. 2002. Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiol* 129: 954–956
- Pagnussat GC, ML Lanteri, S Puntarulo, L Lamattina. 2003. Nitric Oxide and Cyclic GMP Are Messengers in the Indole Acetic Acid-Induced Adventitious Rooting Process. *Plant Physiol* 132: 1241–1248
- Pastorino MJ, MM Fariña, D Bran, LA Gallo. 2006. Extremos geográficos de la distribución natural del “Ciprés de la Cordillera”. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 41: 307-311.
- Pastorino MJ, SS Mercedes, AG Aparicio, LA Gallo. 2013. Variability in seedling emergence traits of Patagonian Cypress marginal steppe populations. *New Forests.* DOI 10.1007/s11056-013-9395-3
- Pearcy RW. 1990. Sunflecks and Photosynthesis in Plant Canopies, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 41: 421–453.
- Pellegrini V, M Fariña. 2001. Supervivencia y crecimiento de tres tipos de plantines de pino ponderosa. VI Jornadas Técnicas de Viveristas Forestales de la Patagonia. Esquel, Chubut. INTA-CIEFAP-UNPat-Municipalidad de Esquel.
- Pereira JS, MM Chavez. 1993. Plant water deficits in Mediterranean ecosystems. En: Smith JAC & H Griffiths H (eds) *Water deficits plant responses from cell to community:* 221-236. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford.

- Poorter L, F Bongers, FJ Sterck, H Woll. 2005. Beyond the regeneration phase: differentiation of height-light trajectories among tropical tree species. *J. Ecol.* 93: 256–267.
- Poorter H, J Bühler, D van Dusschoten, J Climentand, JA Postma. 2012. Pot size matters: a meta-analysis of the effects of rooting volume on plant growth. *Funct Plant Biol.* 39: 839–850
- Powles SB. 1984. Photoinhibition of Photosynthesis Induced by Visible Light, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 15–44.
- Quero JL, R Villar, T Marañon, R Zamora. 2006. Interactions of drought and shade effects on seedlings of four *Quercus* species: physiological and structural leaf responses. *New Phytol.* 170: 819–833.
- Quilambo O. 2003. The vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Afr. J. Biotechnol.* 2(12): 539-546.
- Razaq M, P Zhang, HI Shen, Salahuddin. 2017. Influence of nitrogen and phosphorous on the growth and root morphology of *Acer mono*. *PLOS*
- Read DJ, DH Lewis, AH Fitter, IJ Alexander eds. 1992. *Mycorrhizas in ecosystems*. Oxford, U.K. CAB International. 448 p.
- Rhodes LH, JW Gerdemann. 1975. Phosphate uptake zones of mycorrhizal and non-mycorrhizal onions. *New Phytol.* 75: 555–561.
- Ritchie A, Y Tanaka. 1990. Root growth potential and the target seedling. In: *Target Seedling Symposium: Proc., Combined Meeting Western Forest Nursery Associations*. Rose R, S Campbell, T Landis eds. Oregon, EE.UU. United States Department of Agriculture, Forest Service. 37-52.
- Robinson D. 1994. The response of plants to non-uniform supplies of nutrients. *New Phytol.* 127: 635–674.
- Romero AE, J Ryder, JT Fisher, JG Mexal. 1986. Root system modification of container stock for arid land plantings. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam. *For. Ecol. Manag.* 16: 281-290.

- Rovere A. 1991. Estudio experimental de la germinación y el desarrollo temprano del Ciprés de la Cordillera *Austrocedrus chilensis*. Tesis en Ciencias Biológicas. Bariloche, Universidad Nacional del Comahue. 79 p.
- Rhodes LH, JW Gerdemann. 1975. Phosphate uptake zones of mycorrhizal and non-mycorrhizal onions. *New Phytol.* 75: 555–561.
- Sadzawka A, R Carrasco, F Demanet, P Flores, Z Grez, M Mora, A Neaman. (2007). Métodos de análisis de tejidos vegetales. Segunda Edición. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Series Actas INIA N° 40. Santiago. Chile.
- Salgado Salomón ME, M Rajchenberg, C Barroetaveña. 2009. Evaluación del estado micorrícico de plántulas de *Pinus ponderosa* producidas bajo fertirriego, sin manejo de la micorrización. *Bosque* 30(3): 127-134.
- Salgado Salomón ME, C Barroetaveña, M Rajchenberg. 2014. Co-occurrence of Paris- and Arum-type endomycorrhiza in invasive *Pseudotsuga menziesii* seedlings in Patagonia, Argentina. *Nova Hedwigia.* 99(1-2): 1-12. <https://doi.org/10.1127/0029-5035/2014/0176>
- Salisbury FB, CW Ross. 1994. Fisiología Vegetal. Grupo editorial Iberoamericana. 759 p.
- Sanchez CC. 2000. Técnicas de micorrización en vivero con hongos ectomicorríticos. Experiencias realizadas en el Centro Nacional de Mejora Forestal “El Serranillo”. Ministerio de Medio Ambiente, Apdo. 249, 19080. Guadalajara. España.
- Schinelli Casares T. 2013. Producción de *Nothofagus* bajo condiciones controladas. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Bariloche. 56p.
- Scholz FG, SJ Bucci, G Goldstein. 2014. Strong hydraulic segmentation and leaf senescence due to dehydration may trigger die-back in *Nothofagus dombeyi* under severe droughts: a comparison with the co-occurring *Austrocedrus chilensis*. *Trees.* 28: 1475–1487.

- Schulze ED. 1986. Whole-Plant Responses to Drought. *Australian Journal of Plant Physiol.* 13(1): 127–141. <https://doi.org/10.1071/PP9860127>.
- Sellers PJ. 1985. Canopy reflectance, photosynthesis and transpiration, *Internat. J. Remote Sens.* 6: 1335–1372.
- Sharew H, J Grace, C Legg. 1996. Response of two Afromontane coniferous tree species to light and nutrient supply. *Tree Physiol.* 16: 617-626.
- Smith FW, WA Jackson, PJV Berg. 1990. Internal Phosphorus Flows During Development of Phosphorus Stress in *Stylosanthes hamate*. *Aust. J. Plant Physiol.* 17(4): 451 – 464.
- Smith SE, DJ Read. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. Ed 2. Academic Press, London.
- Smith SE, FA Smith. 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual Review of Plant Biology.* 62: 227-250.
- Spicer R, BL Gartner. 2002. Compression wood has little impact on the water relations of Dougla-fir (*Pseudotsugamenziesii*) seedlings despite a large effect on shoot hydraulic properties. *New Phytol.* 154: 633-640.
- Stenström E, E Damm, T Unestam. 1997. Le role des mycorhizes dans la protection des arbres forestiers contre les agents pathogenes du sol. *Rev. For. Fr.* 49: 121-128.
- Stevens KJ, RL Peterson. 1996. The effect of a water gradient on the vesicular-arbuscular mycorrhizal status of *Lythrum salicaria* L. (purple loosestrife). *Mycorrhiza.* 6: 99–104.
- Taccari LE. 2012. Influencia de diferentes duraciones de la fase de establecimiento en el desarrollo de plantines de Ciprés de la Cordillera cultivados bajo cubierta. Seminario Final presentado al Departamento de Ingeniería Forestal, Facultad de Ingeniería, UNPSJB. Esquel. Argentina. 25 p.
- Taiz L, E Zeiger. 1998. *Plant Physiology*. 2^{da} edición. Sinauer Associates Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA.

- Tambussi EA, CG Bartoli, JJ Guiamet, J Beltrano, JL Araus. 2000. Oxidative damage to thylakoid proteins in water-stressed leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Physiol. Plant.* 108: 398-404.
- Tambussi EA. 2005. Fotosíntesis, Fotoprotección, Productividad y Estrés Abiótico: Algunos Casos de Estudio. Tesis Doctoral. Departamento de Biología Vegetal. Universidad de Barcelona. 203 p.
- Tinus RW, McDonald SE. 1979. How to grow seedlings in containers in greenhouses. Gen. Tech. Rep. RM-60. Fort Collins, CO: USDA Forest Service Rocky Mountain Forest and Range Experiment Station. 256 p.
- Tuomela K, J Kuusipalo, L Vesa, K Nuryanto, APS Sagala, A Adjers. 1996. Growth of dipterocarp seedlings in artificial gaps: an experiment in a logged-over rainforest in south Kalimantan. Indonesia For. Ecol. Manage. 81: 95–100.
- Troncoso O, A Greslebin. 2018. Trabeculae in Patagonian mountain cypress (*Austrocedrus chilensis*) associated with *Phytophthora austrocedri* infection. *IAWA Journal* 39(2): 1-12.
- Trull MC, Guiltinan MJ, Lynch JP, Deikman J. 1997. The responses of wild-type and ABA mutant *Arabidopsis thaliana* plants to phosphorus starvation. *Plant Cell Environ.* 20: 85–92.
- Tyree MT, V Velez, JW Dalling. 1998. Growth dynamics of root and shoot hydraulic conductance in seedlings of five neotropical tree species: scaling to show possible adaptation to differing light regimes. *Oecologia.* 114: 293–298.
- Uemura A, A Ishida, T Nakano, I Terashima, H Tanabe, Y Matsumoto. 2000. Acclimation of leaf characteristics of *Fagus* species to previous-year and current-year solar irradiances. *Tree Physiol.* 20: 945-951.
- Ubeda-Tomás S, R Swarup, J Coates, K Swarup, L Laplaze, GTS Beemster, P Hedden, R Bhalerao, MJ Bennett. 2008. - Root growth in *Arabidopsis* requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. *Nat. Cell Biol.* 10: 625-628.

- Ubeda-Tomás S, GT Beemster, MJ Bennett. 2012. Hormonal regulation of root growth: integrating local activities into global behaviour. *Trends Plant Sci.* 1-6. doi:10.1016/j.tplants.2012.02.002
- Urban O, D Janous, M Acosta, R Czerny, I Markova, M Navrátil, M Pavelka, R Pokorný, M Šprtová, R Zhang, V Špunda, J Grace, M Marek. 2007. Ecophysiological controls over the net ecosystem exchange of mountain spruce stand, Comparison of the response in direct vs. diffuse solar radiation, *Glob. Change Biol.* 13: 157–168.
- Urretavizcaya MF. 2001. Restauración de bosques quemados de Ciprés de la Cordillera en las provincias de Rio Negro y Chubut. Informe final Proyecto PAN (INTA-GTZ) 2001. CIEFAP, Esquel, Chubut, Argentina. 11p.
- Valladares F, Ü Niinemets. 2008. Shade Tolerance, a Key Plant Feature of Complex Nature and Consequences. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 39: 237–57.
- Van Tichelen KK, JV Colpaert, J Vangronsveld. 2001. Ectomycorrhizal protection of *Pinus sylvestris* against copper toxicity. *New Phytol.* 150: 203-213.
- Veblen TT, BR Burns, T Kitzberger, A Lara, R Villalba. 1995. The ecology of the conifers of southern South America. In: ENRIGHT, N.S, R.S. HILL. *Ecology of the southern conifers.* Melbourne: Ed. Melbourne University Press. 120-155.
- Veblen TT, T Kitzberger, BR Burns, AJ Rebertus. 1996. Perturbaciones y dinámica de regeneración en bosques andinos del sur de Chile y Argentina. In: Armesto, J. J., C. Villagran, M.K. Arroyo. *Ecología de los bosques nativos de Chile.* Santiago de Chile: Ed. Universitaria. 169-198.
- Venegas Ibañez GA. 2000. Efecto de la fertilización de pre cosecha sobre el potencial de crecimiento radical de plantas de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus nitens*. Tesis Ingeniero Forestal. Santiago, Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas. 61 p.

- Walker D. 1987. The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis. Oxygraphics Limited, University of Sheffield Print Unit, Sheffield, UK 203 p.
- Wang B, Y-L Qiu. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*. 16: 299-363.
- Wang J, G Li, JR Pinto, J Liu, W Shi, Y Liu. 2015. Both nursery and field performance determine suitable nitrogen supply of nursery-grown, exponentially fertilized Chinese pine. *Silva Fennica* vol. 49 no. 3 article 1295. 13 p.
- Waring RH, WH Schlesinger. 1985. *Forest Ecosystems. Concepts and Management*. Academic Press, New York, 340 p.
- Watanabe M, Y Watanabe, S Kitaoka, H Utsugi, K Kita, T Koike. 2011. Growth and photosynthetic traits of hybrid larch F1 (*Larix gmelinii* var. *japonica* × *L. kaempferi*) under elevated CO₂ concentration with low nutrient availability. *Tree Physiol.* 31(9): 965-975. DOI: 10.1093/treephys/tpr059
- Wenny DL, Dumroese RK. 1990. A growing regimen for container-grown Western Redcedar seedlings. University of Idaho. College of Forestry, Wildlife and Range Sciences. Bulletin. N° 46.
- Werdan K, HW Heldt, M Milovancev. 1975. The role of pH in the regulation of carbon fixation in the chloroplast stroma. *Studies on CO₂ fixation in the light and dark*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 396(2): 276–292. DOI: 10.1016/0005-2728(75)90041-9
- Williamson LC, Ribrioux SP, Fitter AH, Leyser HM. 2001. Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126: 875–882.
- Wu W, GA Berkowitz. 1992. Stromal pH and photosynthesis are affected by electroneutral K⁺ and H⁺ exchange through chloroplast envelope ion channels. *Plant Physiol.* 98(2): 666-672. DOI: 10.1104/pp.98.2.666

- Wyka TP, J Oleksyn, R Zytkowski, P Karolewski, AM Jagodzinski, PB Reich. 2012. Responses of leaf structure and photosynthetic properties to intracanalopy light gradients: a common garden test with four broadleaf deciduous angiosperm and seven evergreen conifer tree species. *Oecologia*. 170: 11–24.
- Yang YK, SY Lee, WT Park, N II Park, SU Park. 2010. Exogenous Auxins and Polyamines Enhance Growth and Rosmarinic Acid Production in Hairy Root Cultures of 'Nepeta cataria' L. *Plant Omics*. 3(6): 190-193.
- Yadav S, A David, SC Bhatla. 2011. Nitric oxide accumulation and actin distribution during auxin-induced adventitious root development in sunflower. *Sci Hortic*. 129: 159–166.