



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

TESINA PRESENTADA PARA OBTENER
EL GRADO ACADÉMICO DE
LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

“PLASTICIDAD FENOTÍPICA Y ADAPTATIVA EN RESPUESTA A LA SEQUÍA DE
PLÁNTULAS DE *PROSOPIS CALDENIA* BURKART DE DOS POBLACIONES DEL
BOSQUE SEMIÁRIDO DEL CENTRO DE ARGENTINA”

AUTOR: MARÍA CELESTE GALLIA
DIRECTOR: MSC. PAMELA DIANA LERNER

SANTA ROSA (LA PAMPA)
ARGENTINA

2014

PREFACIO

Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Licenciada en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en la cátedra “Fisiología II”, dependiente del Departamento de Ciencias Biológicas, durante el período comprendido entre el 11 de Octubre de 2013 y el 30 de Mayo de 2014, bajo la dirección de Lerner, Pamela Diana.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mi Directora, por su ayuda durante todas las etapas de la tesina, la predisposición y el entusiasmo con que acompañó mis ideas, el agradable clima de trabajo creado y la gran formación académica que me ha brindado durante estos cuatro años.

También deseo agradecer a:

- A la Universidad Nacional de La Pampa, y en especial, a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por la formación académica otorgada y por el espacio cedido para llevar a cabo la tesina.
- A los evaluadores, por las correcciones y opiniones constructivas.
- A Claudio Fassione, por permitir el acceso a sus campos para colectar el material vegetal y su predisposición durante la tarea.
- A Pablo Dornes, por el traslado y su ayuda en la campaña.
- Al Departamento de Química, por cederme un espacio en el invernadero para el ensayo.
- A Luisina Carbonell, por su gran ayuda en las tareas de laboratorio e invernadero, y por la compañía durante tantos años de trabajo en conjunto.
- A mi familia, por darme la posibilidad de estudiar y permitir mi dedicación completa a lo que siempre me gustó, y también, por apoyarme durante toda la carrera.
- A mi novio, por su agradable compañía y gran apoyo durante mi carrera y el desarrollo de la tesina.
- A mis amigas y amigos, por su grata compañía y los lindos momentos compartidos.

7 DE JULIO DE 2014

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

RESUMEN

Las especies distribuidas a lo largo de gradientes de condiciones ambientales están influenciadas por diferentes presiones de selección y para enfrentar dicha variabilidad pueden producir diferentes fenotipos en rasgos que respondan a estas condiciones, capacidad conocida como plasticidad fenotípica. En ecosistemas áridos y semiáridos, las plantas pueden desarrollar mecanismos para evitar o tolerar el déficit hídrico. El bosque semiárido de Caldén se extiende en la provincia de La Pampa a lo largo de un gradiente de precipitaciones primaverales y estivales de Noreste a Sudoeste, y de temperaturas y período libre de heladas de Norte a Sur. Mediante un ensayo de jardín común en invernadero bajo tres niveles de disponibilidad hídrica, se analizaron respuestas plásticas y adaptativas de rasgos ecofisiológicos en plántulas de *Prosopis caldenia* generadas de semillas provenientes de poblaciones distantes a lo largo del gradiente. Las plántulas de sitios con mayores precipitaciones y temperaturas (Población Norte) presentaron rasgos con mayor plasticidad que plántulas de sitios más desfavorables (Población Sur). La Población Norte mostró mayor crecimiento y producción de biomasa en condiciones de humedad que de sequía, y la Población Sur exhibió una respuesta constante a los tres tratamientos, mostrando mayor tolerancia en ambientes con limitaciones hídricas. No se encontraron interacciones significativas población x sequía en rasgos foliares pero sí en radicales, aunque sólo el diámetro radical mostró ser adaptativo. La mayor plasticidad de la Población Norte sería adaptativa en ambientes con mayores precipitaciones, mientras que la Población Sur toleraría condiciones de estrés hídrico.

ABSTRACT

Species living across environmental gradients are affected by different selection pressures; one way to face this variability is through production different trait phenotypes that respond to these conditions, aptitude known as phenotypic plasticity. In arid and semiarid environments, plants have evolved developing mechanisms to avoid or tolerate the water stress and survive, grow and develop under these conditions. The dry forest of central Argentina extends in La Pampa province along summer and spring precipitation gradient from Northeast to Southwest, and temperature and frost-free period gradient from North to South. Using a common garden experiment with three drought levels, we analyzed plastic and adaptive responses of ecophysiological traits in *Prosopis caldenia* seedlings from two distant populations along the gradient. Seedlings from wet and warm sites (North Population) showed more plastic traits than seedlings from dry and cold sites (South Population). In wet conditions, North Population displayed higher growth and biomass production than South Population, but these amounts decreased under drought conditions, whereas South Population showed constant values along the gradient. No significant populations x drought interactions were found in leaf traits, but in root traits were significant, although only root diameter showed an adaptive response. North Population plasticity would be adaptive under wet environments, whereas South Population would tolerate water stress conditions.

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	3
2.1. Hipótesis	3
2.1.1. Hipótesis 1	3
2.1.2. Hipótesis 2	3
2.1.3. Hipótesis 3	3
2.2. Objetivos	3
2.2.1. Objetivo general	3
2.2.2. Objetivos específicos	3
3. MATERIALES Y MÉTODOS	4
3.1. Descripción de la especie	4
3.2. Sitios y colección de frutos	4
3.3. Tratamiento de sequía	6
3.4. Diseño experimental	7
3.5. Ensayo de jardín común y mediciones	8
3.6. Análisis de datos	10
4. RESULTADOS	12
4.1. Peso de semillas	12
4.2. Rasgos foliares	12
4.3. Rasgos caulinares	17
4.4. Rasgos radicales	19
4.5. Rasgos de crecimiento	23
4.6. Plasticidad adaptativa	25
4.7. Índice de plasticidad	28
5. DISCUSIÓN	30
6. CONCLUSIONES	34
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
8. APÉNDICE	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.2.1: Ubicación de los sitios de colección de frutos.	5
Figura 3.4.1: Dispositivo de subirrigación utilizado para imponer sequía.	7
Figura 3.4.2: Esquema de los tres niveles de sequía utilizados en el ensayo.	8
Figura 4.2.1: Evolución temporal del porcentaje de plántulas con cotiledones senescentes.	12
Figura 4.2.2: Porcentaje de plántulas con folíolos senescentes en respuesta a tres tratamientos de sequía.	13
Figura 4.2.3: Normas de reacción de biomasa seca foliar, área foliar y área foliar específica.	15
Figura 4.2.4: Normas de reacción de coeficiente de peso foliar y peso foliar específico.	16
Figura 4.2.5: Normas de reacción de densidad estomática por campo y foliar.	17
Figura 4.3.1: Normas de reacción de longitud y diámetro de tallo medidos en Tiempo 1.	18
Figura 4.3.2: Normas de reacción de longitud y diámetro de tallo medidos en Tiempo 2.	19
Figura 4.4.1: Normas de reacción de diámetro, longitud y biomasa radical.	21
Figura 4.4.2: Normas de reacción de longitud radical específica, relación biomasa subterránea/aérea y relación longitud raíz/tallo.	22
Figura 4.5.1: Normas de reacción de tasa de crecimiento relativo en términos de diámetro y longitud de tallo.	23
Figura 4.5.2: Normas de reacción de biomasa seca aérea y total.	24
Figura 4.6.1: Normas de reacción de diámetro radical y biomasa total de plántulas de la Población Norte.	25
Figura 4.6.2: Correlación entre diámetro radical y biomasa total de plántulas de la Población Norte en respuesta a tres tratamientos de sequía.	26
Figura 4.6.3: Normas de reacción de los rasgos: relación longitud raíz/tallo y biomasa seca total de plántulas de la Población Norte.	26
Figura 4.6.4: Correlación entre relación longitud raíz/tallo y biomasa total de plántulas de la Población Norte en respuesta a tres tratamientos de sequía.	27
Figura 4.6.5: Normas de reacción de los rasgos: longitud radical específica y biomasa seca total de plántulas de la Población Norte.	27

Figura 4.6.6: Correlación entre longitud radical específica y biomasa seca total de plántulas de la Población Norte en respuesta a tres tratamientos de sequía.	28
Figura 4.7.1: Índice de Plasticidad de rasgos funcionales, de crecimiento y en conjunto de las Poblaciones Norte y Sur.	29
Figura 4.7.2: Índice de Plasticidad de rasgos foliares, radicales y de fitness de las Poblaciones Norte y Sur.	29
Figura 8.1.: Experimento de jardín común a los 49 días del comienzo del ensayo.	41
Figura 8.2.: Cosecha y medición de longitud y diámetro de tallo y raíz principal de plántulas de 49 días de edad.	41

INDICE DE TABLAS

Tabla 3.2.1.: Ubicación y caracterización climática de las poblaciones estudiadas.	6
Tabla 4.2.2: Tabla de resultados de los ANOVAs de rasgos foliares, caulinares, radicales y de planta completa de las Poblaciones Norte y Sur en respuesta a 3 niveles de sequía y su interacción.	14

1. INTRODUCCIÓN

Las especies distribuidas a lo largo de un gradiente de condiciones ambientales se ven influenciadas por diferentes presiones de selección. La selección a largo plazo puede producir el desarrollo de adaptaciones de rasgos morfológicos y fisiológicos al ambiente, lo que se conoce como adaptación local (Kawecki and Ebert, 2004; Savolainen *et al*, 2007), generando divergencia entre poblaciones (Galloway, 1995; Ackerly *et al*, 2000). Por otra parte, las especies pueden enfrentar dicha variabilidad ambiental produciendo fenotipos diferentes en rasgos que respondan a estas condiciones, capacidad conocida como plasticidad fenotípica (Schmalhausen, 1949; Bradshaw, 1965). Entonces, si un rasgo es adaptativo para un organismo, población o especie, es esperable que muestre ecotipos diferentes debido a distintas presiones de selección o gran plasticidad fenotípica para enfrentar la variabilidad ambiental o ambas respuestas (Valladares *et al*, 2007).

En especies vegetales, algunas teorías predicen que la plasticidad puede ser ventajosa en ambientes cuya disponibilidad de recursos es alta, ya que las plantas pueden tener una alta tasa de crecimiento, y esto podría generar respuestas más rápidas ante cambios en el ambiente, revirtiendo respuestas irreversibles a través de la producción de nuevos módulos (Chapin, 1980; Alpert y Simms, 2002; Valladares *et al*, 2005). Numerosos trabajos demuestran que plántulas provenientes de ambientes que presentan condiciones propicias para el crecimiento, muestran mayor plasticidad en rasgos morfológicos y fisiológicos que aquellas expuestas a ambientes más estresantes (Galloway, 1995; Premoli y Brewer, 2007; Ramírez-Valiente *et al*, 2010; Danquah, 2010; Premoli y Mathiasen, 2011).

En ecosistemas áridos y semiáridos, las plantas han evolucionado hacia el desarrollo de mecanismos que evitan o toleran el déficit hídrico, lo que les permitiría sobrevivir al estrés y continuar creciendo y desarrollándose en condiciones limitantes de agua (Stearns, 1989; Chapin *et al*, 1993; Yordanov, 2003; Valladares *et al*, 2004; Valladares *et al*, 2007; Gianoli y Valladares, 2012). Una especie es definida como tolerante cuando el estrés no afecta su actividad fotosintética y su fitness (eficacia o aptitud biológica) (Valladares y Sánchez-Gómez, 2006; Couso y Fernández, 2012). Esta ausencia de efecto sobre el fitness podría ser explicada por cambios en otros rasgos, menos visibles, llamados rasgos funcionales (Violle *et al*, 2007; Couso y Fernández, 2012). En conclusión, existe un compromiso entre la habilidad de tolerar el estrés y la capacidad de crecer con recursos limitados (Stearns, 1989; Yordanov *et al*, 2003; Lambers *et al*, 2008; Premoli y Mathiasen, 2011).

Por ejemplo, rasgos foliares como el área foliar específica, peso foliar específico y densidad estomática han mostrado diferencias plásticas en respuesta a la sequía (Antúnez *et al*, 2001; Villar y Merino, 2001; Cornelissen *et al*, 2003; Franco *et al*, 2004; Gianoli y Gonzalez-Teuber, 2005; Valladares y Sánchez-Gómez, 2006; Poorter *et al*, 2009; Ramírez-Valiente *et al*, 2010). Dichos rasgos han sido correlacionados con mayor fitness (Poorter *et al*, 2009; Nicotra *et al*, 2010; Ramírez-Valiente *et al*, 2010).

Otros rasgos que también han mostrado plasticidad son los relacionados con la raíz; plántulas de diferentes especies han aumentado su biomasa radical, relación raíz/tallo y longitud radical específica en respuesta a la sequía (Reynolds *et al*, 1999; Villalobos *et al*, 2001; Cornelissen *et al*, 2003; Ansley *et al*, 2007; Fang Lan *et al*, 2010; Couso y Fernández, 2012). Estos rasgos han sido ligados a la tolerancia al estrés hídrico (Chapin, 1993; Gianoli, 2004; Valladares *et al*, 2004; Gianoli y Gonzalez-Teuber, 2005; Ansley *et al*, 2007).

El bosque semiárido de Caldén se extiende en la provincia de La Pampa a lo largo de un gradiente de precipitaciones, fundamentalmente de primavera y otoño, de Noreste a Sudoeste y de temperaturas y período libre de heladas de Norte a Sur (Casagrande *et al*, 2006; Buss *et al*, 2011). El bosque está dominado por la especie arbórea caducifolia *Prosopis caldenia* Burkart, cuya germinación y establecimiento de plántulas ocurre normalmente en primavera (Villalobos y Peláez, 2001; Lerner, 2004) y tiene un ciclo anual de crecimiento y desarrollo desde octubre hasta abril (Peinetti *et al*, 1991). Si bien es ésta la época de mayores precipitaciones, la acción de la elevada temperatura en los meses de verano hace que la evapotranspiración sea muy grande y por lo tanto las deficiencias hídricas aumentan notablemente en este período (Cano *et al*, 1980), lo cual podría afectar diferencialmente a las poblaciones ubicadas a lo largo del gradiente. Para enfrentar dicho estrés hídrico, las plántulas de caldén deberían desarrollar mecanismos que les permitan establecerse y crecer bajo esas condiciones.

El estudio de las respuestas plásticas adaptativas a la sequía a nivel de plántula de diferentes poblaciones es importante para comprender cambios en la regeneración del caldén en escenarios ambientales actuales y futuros. Por este motivo, conocer los rasgos fenotípicos que les confieren a las plántulas de caldén la capacidad de crecer y tolerar el estrés hídrico en estos ambientes, es importante para evaluar cuáles poblaciones podrían adaptarse a cambios futuros en el ambiente y por ello, podrían ser consideradas potenciales recursos para su conservación.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

HIPÓTESIS 2.1.1: Las plántulas de poblaciones que se desarrollan en sitios con mayores precipitaciones y temperaturas presentan mayor plasticidad a la sequía que plántulas obtenidas de poblaciones que desarrollan en sitios con menores precipitaciones y temperaturas.

HIPÓTESIS 2.1.2: Las plántulas de sitios más favorables para el crecimiento presentan mayor plasticidad en rasgos foliares que otorgan mayor fitness y las plántulas de sitios más desfavorables, mayor plasticidad en rasgos funcionales radicales ligados a tolerar el estrés hídrico.

HIPÓTESIS 2.1.3: Aquellas plántulas originarias de sitios con condiciones más propicias para el crecimiento tienen un mayor fitness en condiciones de alta disponibilidad hídrica que aquellas de sitios más estresantes.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. OBJETIVO GENERAL

- Analizar las respuestas plásticas y adaptativas a la sequía de rasgos ecofisiológicos en plántulas de *Prosopis caldenia* de poblaciones distribuidas a lo largo de un gradiente hídrico y térmico en el bosque de Caldén.

2.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En particular, se propone:

- Evaluar los mecanismos de ajuste fenotípico ante cambios en la disponibilidad de agua de plántulas de dos poblaciones de caldén, en un ensayo de jardín común bajo condiciones controladas.
- Analizar posibles respuestas adaptativas en aquellos rasgos que muestren plasticidad a la sequía.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE

Prosopis caldenia es una especie caducifolia dominante del bosque semiárido del centro de Argentina, cuyo ciclo anual de crecimiento y desarrollo coincide con la estación cálida y con mayor disponibilidad de agua, aproximadamente octubre-abril (Distel y Peláez, 1985; Cano, 1988; Peinetti *et al*, 1991). Las hojas son compuestas, con foliolulos pequeños (de ± 4 mm) y aproximados (Steibel y Troiani, 1999). Se conoce que en plántulas de caldén, ciertos rasgos como longitud radical, biomasa aérea y biomasa subterránea han sido afectados por el estrés hídrico (Villalobos y Peláez, 2001). Por otro lado, en el género *Prosopis*, se han observado características foliares, tales como pubescencia, valores altos de área foliar, cutícula foliar gruesa, alto control estomático, entre otras, que pueden considerarse como adaptaciones a la sequía (Vilela y Palacios, 1996; Villagra *et al*, 2010). Además, la preferencia de la especie por suelos profundos (Cano *et al*, 1980) podría indicar capacidad de sus sistemas de raíces para explorar y obtener agua subterránea y así, evitar el estrés hídrico como ha sido encontrado en otras especies de *Prosopis* (Jobágyy *et al*, 2008; Alvarez y Villagra, 2009).

3.2. SITIOS Y COLECCIÓN DE FRUTOS

Se eligieron dos poblaciones de caldén de las cuales se colectaron semillas: una cercana a las localidades de Ingeniero Foster y La Maruja, ubicadas en el noroeste de la provincia de La Pampa (Población Norte, 35° 48' S; 65° 06' O) y la otra en la Reserva Provincial Parque Luro, al sureste de la provincia (Población Sur, 36° 55' S, 64° 01' O) (Fig. 3.2.1).

La Población Norte se desarrolla en un bosque abierto de caldén, formado por grandes árboles aislados con cobertura gramínea densa y arbustiva variable. Está ubicado en un relieve de llanos y depresiones amplias y posee un suelo franco arenoso (Equivalente de humedad: 12,4 %) del tipo haplustol torriorténtico con un perfil débilmente desarrollado (Cano *et al*, 1980; Lerner, 2004). Por su parte, la Población Sur se desarrolla en un bosque abierto con pastizal, dominado por caldén y acompañado por piquillín y molle, ubicado sobre bajas y medias pendientes y cuyo suelo es franco arenoso (Equivalente de humedad: 15,6%) de tipo haplustol éntico con desarrollo de perfil incipiente a débil. (Cano *et al*, 1980; Lerner, 2004).

En cuanto a la caracterización climática, las poblaciones fueron elegidas por sus diferencias en precipitaciones medias anuales y estacionales, temperatura media anual y período libre de heladas (Tabla 3.2.1).

Figura 3.2.1.: Mapa del Distrito del Caldén y ubicación de los sitios donde se colectaron los frutos: Ingeniero Foster-La Maruja (1) y Reserva Provincial Parque Luro (2). Reproducido de Primer Inventario Nacional de Bosques Nativos (SAyDS, 2007).

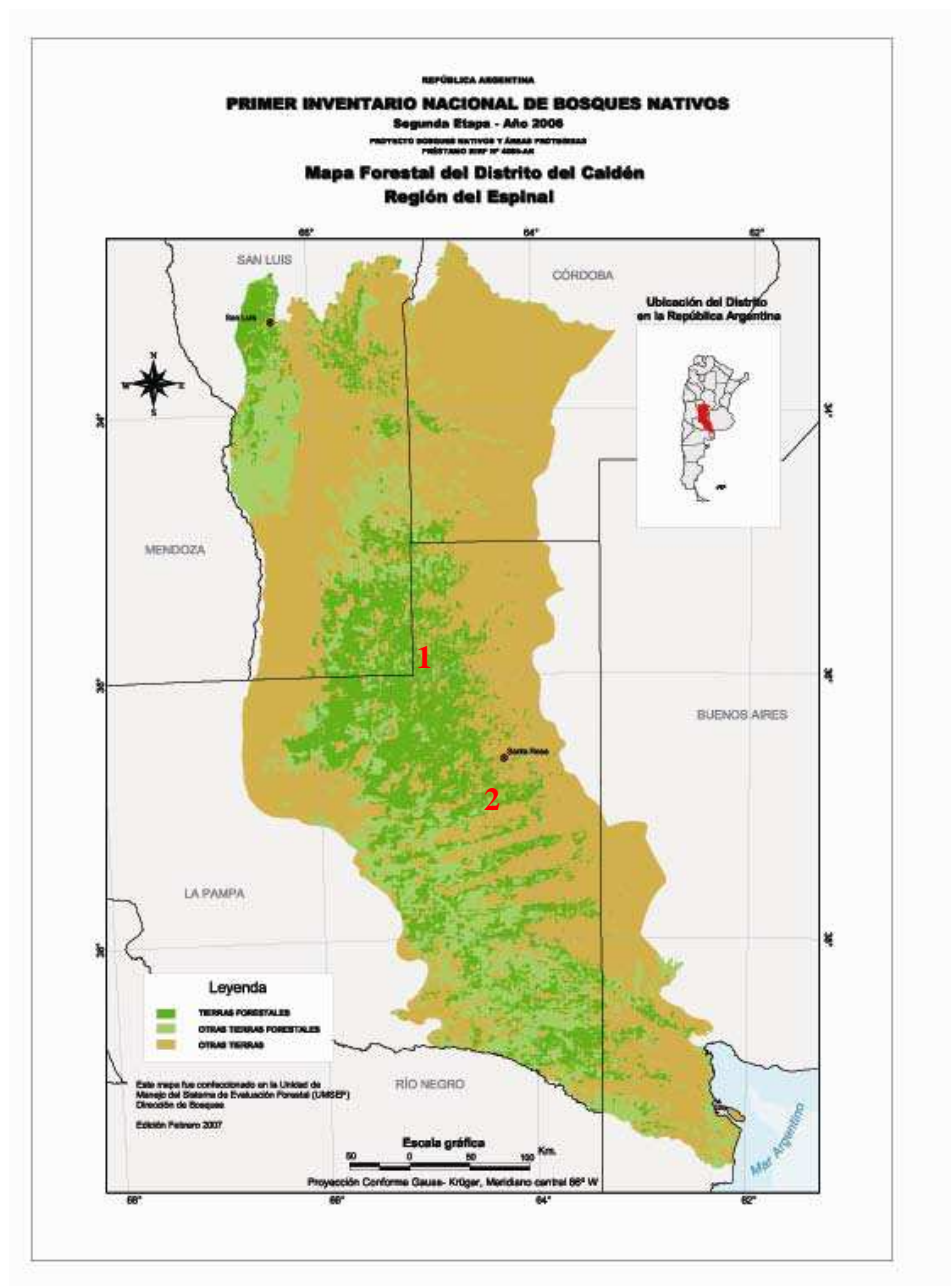


Tabla 3.2.1.: Ubicación, precipitación media anual (PMA; Período 1962-2009), estival (PME; Período 1980-2009) y primaveral (PMP; Período 1980-2009), temperatura media anual (TMA, Período 1971-2000) y fecha media de la primera (FMPH, Período 1964-2000) y última helada (FMUH, Período 1964-2000) para los Sitios Norte y Sur. Los valores corresponden a las isohietas e isotermas entre las cuales se ubican los sitios (Casagrande *et al*, 2006; Buss *et al*, 2011).

Sitio	Ubicación	PMA (mm)	PME (mm)	PMP (mm)	TMA (°C)	FMPH	FMUH
Norte	35° 48' S 65° 06' O	700-800	100-110	70-80	16-16.5	20-30 Abril	10 Oct.
Sur	36° 55' S 64° 01' O	600-700	90-100	60-70	15-15.5	10-20 Abril	30 Oct.

Se colectaron frutos de 20 caldenes adultos distantes entre sí y de tres distintas áreas de cada una de las poblaciones para obtener una mayor variabilidad genética de cada una. Se colocaron en sobres identificados por N° de planta, sitio y fecha, y luego, fueron llevados a freezer a -18°C para evitar la depredación de las semillas por parte de larvas de brúquidos.

3.3. TRATAMIENTO DE SEQUÍA

Las plántulas de cada sitio se sometieron a diferentes niveles de sequía (control, moderada y extrema). Para ello se utilizó una técnica de subirrigación que aseguró la disponibilidad constante de cierto volumen de agua durante todo el experimento a cada tubo, independientemente del tamaño de la planta y de su tasa de consumo. Esta técnica fue propuesta en 1971 por Haan y Barfield y utilizada posteriormente con modificaciones en diversos ensayos (Snow y Tingey, 1985; Fernández y Reynolds, 2000; Couso y Fernández, 2012). El dispositivo estuvo formado por una columna de material sólido poroso comercial (Espuma Floral Deluxe, Smithers-Oasis) colocada dentro de un contenedor plástico. El agua del contenedor ascendió a través del material poroso por capilaridad hasta la base de los tubos cubierta por una tela permeable al agua (tipo acetato

de polyester). La distancia entre el nivel de agua y la base de la maceta (Z) determinó el nivel de disponibilidad de agua para las plantas (Figura 3.4.1). Los 3 niveles de sequía que se utilizaron fueron: control (6 cm), moderado (13 cm) y extremo (20 cm) (Figura 3.4.2).

3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

El ensayo se realizó con un diseño Split plot cuyo factor principal fue la sequía (3 niveles: 6, 13 y 20 cm) y factor secundario la población (Población Norte y Población Sur). En total se trabajó con 10 repeticiones. Para instalar el sistema de subirrigación se utilizaron contenedores plásticos ($14 \times 15 \times 26$ cm), a los cuales se les asignó uno de los 3 niveles de sequía. En cada contenedor se colocó una columna de espuma floral y sobre ella se colocaron 2 tubos (macetas): cada uno con una plántula de cada población. Se marcó con una fibra en cada contenedor el nivel de agua correspondiente a cada tratamiento y se colocó agua hasta llegar a dicho nivel. El número total de plántulas utilizadas en el ensayo fue de 60, correspondientes a 3 niveles de sequía \times 2 poblaciones \times 10 repeticiones.

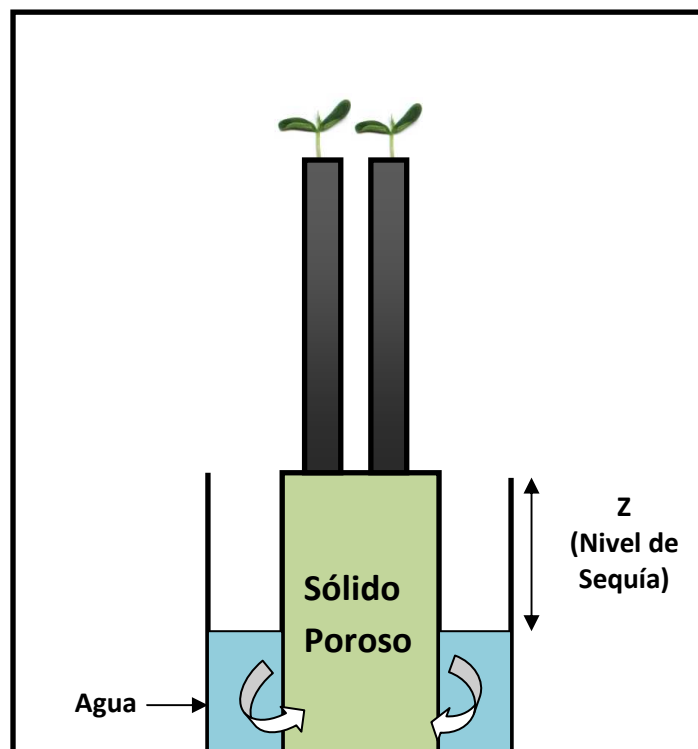


Figura 3.4.1.: Esquema del dispositivo de subirrigación utilizado para imponer sequía. La altura del pelo de agua determina la disponibilidad de agua para las plantas, la cual asciende por capilaridad a través del sólido poroso. Sobre él, se ubican las macetas con fondo permeable que permite el pasaje de agua. Adaptado de Fernández y Reynolds (2000) y Couso y Fernández (2012).

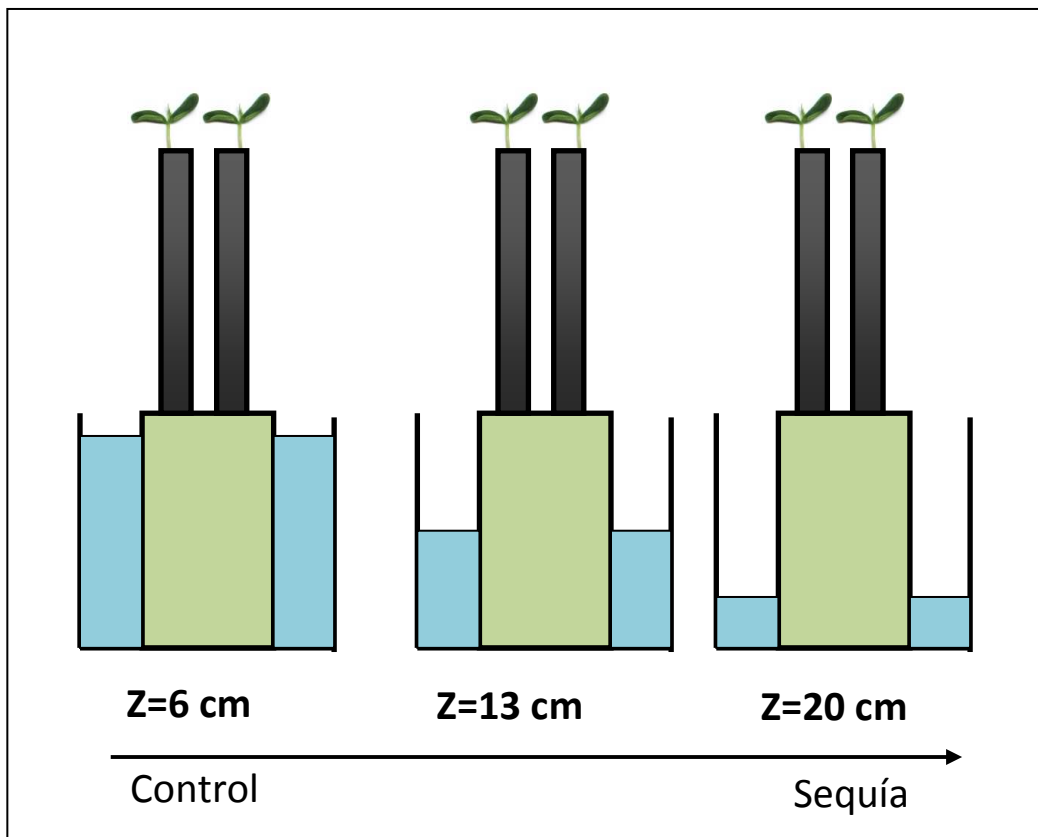


Figura 3.4.2.: Esquema de los tres niveles de sequía utilizados: control ($Z=6$ cm), sequía moderada ($Z=13$ cm) y sequía extrema ($Z=20$ cm). Adaptado de Couso (2004).

3.5. ENSAYO DE JARDÍN COMÚN Y MEDICIONES

Se obtuvo un pool de semillas en buen estado de cada población y se pesaron 60 semillas por población, elegidas aleatoriamente, para evaluar posibles efectos maternos del sitio de origen sobre el fenotipo expresados a través del tamaño de las semillas. Las semillas de Foster-La Maruja (Población Norte) se etiquetaron como: N 1-60 y las de Parque Luro (Población Sur) como S 1-60. Las semillas se escarificaron físicamente con papel de lija y se pusieron a germinar a 1 cm de profundidad en almácigos con sustrato formado por 50% de suelo de bosque tamizado (Capacidad de campo: 21,75 % según Secco, 2013) y 50% de arena. Los almácigos fueron colocados en el sector suroeste de un invernadero bajo condiciones controladas y regados diariamente durante 10 días. Las 30 primeras plántulas en buen estado de cada sitio fueron asignadas aleatoriamente a cada tratamiento y trasplantadas a tubos de PVC (5 cm de diámetro x 50 cm de alto) que contenían el mismo sustrato que los almácigos. Dos plántulas, una de cada población,

fueron colocadas en cada contenedor y éstos fueron ubicados al azar en el invernáculo. Durante la primera semana, las plántulas fueron regadas debido al tiempo que llevó el ascenso de la columna de agua por el tubo y a que las plántulas aún no tenían un sistema radicular muy desarrollado. Once plántulas murieron por deshidratación los primeros días después del trasplante, de las cuales cuatro fueron reemplazadas inmediatamente y las otras siete, 15 días después. Durante el ensayo se mantuvieron diariamente los niveles agua de cada tratamiento y los contenedores fueron rotados periódicamente y además, se registró la senescencia de cotiledones y folíolos. La duración del ensayo fue de 56 días, desde el 16 de octubre hasta el 10 de diciembre de 2013 (ver Apéndice, Figura 8.1).

A los 24 y 49 días del inicio del ensayo, se midieron la longitud y diámetro de la base del tallo principal de las plántulas que sobrevivieron a la primera semana de tratamiento; y a los 26 y 41 días se midieron aquellas que comenzaron el tratamiento 15 días después. Estos datos fueron utilizados para calcular la Tasa de Crecimiento Relativo (TCR, cm día^{-1}) de cada plántula, como $(\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1)$, siendo X_1 y X_2 longitud o diámetro del tallo en el tiempo t_1 (24 o 26 días) y en el t_2 (49 o 41 días), respectivamente.

Por otro lado, para la variable densidad estomática, se eligieron aleatoriamente 4 foliolulos verdes ubicados en la porción media de cada plántula y se los colocó en tubos eppendorfs, rotulados con N° de planta y tratamiento. Para realizar los preparados se utilizó la técnica propuesta por Luomala *et al* (2005). En un portaobjeto se colocó una lámina de pegamento cianocrilato y sobre ella se ubicaron los 4 foliolulos con la superficie abaxial sobre el pegamento. Se dejaron secar aproximadamente 3 minutos y con aguja y cinta se extrajo la lámina y restos de tejido. De esta forma, en el portaobjeto quedó un molde de la superficie abaxial del foliolulo. Se observaron en microscopio óptico 400 aumentos, se eligieron aleatoriamente 2 campos por foliolulo y se obtuvo el número de estomas por área enfocada ($0,1590 \text{ mm}^2$). Luego, con la determinación de área foliar promedio por plántula, se obtuvo el número de estomas por hoja.

Para calcular las variables Área Foliar (AF, cm^2), Área Foliar Específica (AFE, $\text{cm}^2 \text{ g}^{-1}$) y su inversa, peso foliar específico (PFE, g cm^{-2}), se eligieron al azar, y se cortaron 4 hojas compuestas por dos folíolos y se colocaron en bolsas plásticas con un papel de filtro húmedo. Las hojas fueron colocadas sobre un escáner (HP Scanjet G3010) sin que se superpusieran los foliolulos, escaneadas y archivadas en formato imagen TIFF. Se utilizó el software ImageJ (Rasband, 2007) para obtener el valor de área foliar por planta, que luego fue dividido por 4 para obtener un promedio de área foliar por hoja. Las hojas fueron

colocadas en bolsas de papel rotuladas, llevadas a estufa a 56 °C durante 72 hs y pesadas en una balanza de precisión (OHAUS PA214).

Al final del ensayo, cada plántula fue removida del tubo y se la dividió en raíces, tallos y hojas (ver Apéndice, Figura 8.2). Se midió la longitud y diámetro de la base de la raíz principal. Se colocaron en bolsas de papel rotuladas, se llevaron a estufa a 56 °C durante 72 hs. y por último, se pesaron en la balanza de precisión.

Con los datos obtenidos anteriormente se calcularon los siguientes índices: coeficiente de peso foliar (CPF, g g^{-1}): relación biomasa seca foliar/biomasa seca total de la plántula; longitud radical específica (LRE, m g^{-1}): relación longitud/biomasa seca de raíz principal; relación biomasa subterránea/aérea por plántula (BS/BA, g/g); relación longitud raíz/tallo (LR/LT, cm/cm); biomasa aérea por plántula (BA, g) y biomasa seca total de la plántula (B total, g), utilizada como medida proxy de fitness.

3.6. ANÁLISIS DE DATOS

Los resultados fueron analizados mediante el paquete estadístico InfoStat (Departamento de Estadística Aplicada, Universidad Nacional de Córdoba) mediante ANOVAs univariados (factores principales: Población [P] y Nivel de sequía [Z]; usando peso de semilla como covariable). En el modelo se incluyeron los términos Z>Repetición (Error para evaluar el efecto de la sequía) y la interacción PxZ. Se utilizó transformación de raíz cuadrada para los rasgos: densidad estomática, AF, AFE y PFE para que cumplieran con los supuestos de ANOVA.

Las respuestas plásticas de los rasgos fueron visualizadas gráficamente a través de la norma de reacción: característica fenotípica (eje Y: variable respuesta) en función del gradiente ambiental (eje X: nivel de estrés hídrico= Z) (Nicotra *et al*, 2010). Para hacer comparaciones de la magnitud de la plasticidad fenotípica de cada rasgo fue evaluada gráficamente la pendiente de su norma de reacción.

La naturaleza adaptativa de la plasticidad fenotípica de aquellos rasgos funcionales que mostraron interacción Población x Sequía fue estimada usando análisis de regresión entre cada rasgo y biomasa total como medida proxy de fitness.

Por último, se calculó para cada población, un índice de plasticidad (IP) (Valladares *et al*, 2000) que integra diversos rasgos. Se calcularon tres IP: uno incluyendo todos los rasgos relacionados con fitness, otro incluyendo todos los rasgos funcionales y por último, un IP total que incluye todos los rasgos estudiados.

$$\mathbf{IP = (Mm\acute{a}x - Mm\acute{i}n) / Mm\acute{a}x}$$

Siendo Mm\acute{a}x la media del tratamiento con los valores m\acute{a}s altos en su respuesta (control) y Mm\acute{i}n la media del tratamiento en donde las respuestas fueron las mas bajas (sequ\acute{a} extrema).

4. RESULTADOS

4.1. PESO DE SEMILLAS

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la Población Norte y la Población Sur en el peso de las semillas: la primera, presentó semillas más pesadas que la segunda (Población Norte: $0,0278 \pm 0,0067$ g; Población Sur = $0,0170 \pm 0,005$ g). Dada esta diferencia, el peso de la semilla fue introducido como covariable en todos los análisis.

4.2. RASGOS FOLIARES

La senescencia de los cotiledones comenzó a producirse aproximadamente 12 días después del inicio del ensayo; la abscisión de éstos en plántulas de la Población Norte ocurrió más rápidamente y alcanzó un valor mayor a los 40 días del inicio del ensayo que en aquellas de la Población Sur (Fig. 4.2.1).

Por su parte, los folíolos comenzaron a senescer cuando las plántulas tenían 40 días, aproximadamente. Se halló un bajo porcentaje de plántulas de la Población Sur con folíolos caídos, mientras que la Población Norte alcanzó valores mayores bajo los tres tratamientos (Fig. 4.2.2).

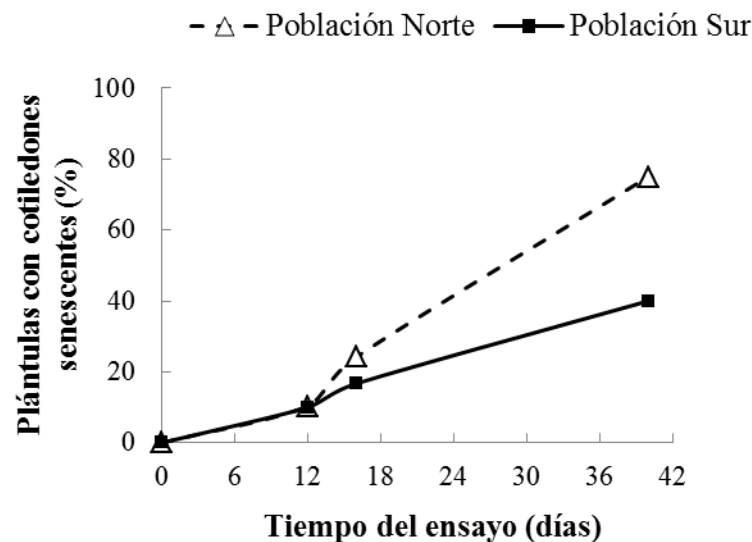


Figura 4.2.1.: Porcentaje de plántulas con cotiledones senescentes a lo largo del tiempo para las poblaciones Norte (símbolos blancos) y Sur (símbolos negros).

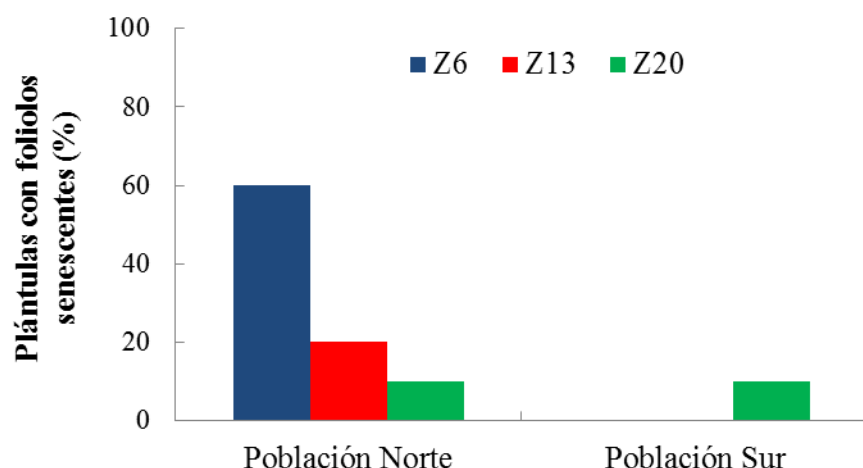


Figura 4.2.2.: Porcentaje de plántulas con folíolos senescentes de las Poblaciones Norte y Sur, en respuesta a tres tratamientos de sequía: Control (barras azules, 6 cm de altura del nivel de agua), Sequía moderada (barras rojas, 13 cm) y Sequía extrema (barras verdes, 20 cm).

A escala de nomófilo, la variable biomasa foliar mostró diferencias significativas entre tratamientos para la Población Norte, cuyos valores disminuyen hacia mayores niveles de sequía; mientras que la Población Sur no se vio afectada por la sequía. Bajo el tratamiento control, la Población Norte mostró valores significativamente mayores que la Población Sur y además, dicho rasgo presentó interacción población x sequía (Fig. 4.2.3). No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos y poblaciones en los demás rasgos foliares estimados: AF, AFE, PFE, CPF y densidad estomática foliar (Fig. 4.2.3, 4.2.4 y 4.2.5; Tabla 4.2.2).

Tabla 4.2.2.: Tabla de resultados de los ANOVAs. Se evaluó la respuesta de rasgos foliares, caulinares, radicales y de planta completa de dos poblaciones de *P. caldenia* (Factor 1: Población) ante 3 niveles de sequía (Factor 2: Sequía) y su interacción (Población x Sequía). Se utilizó como covariable el peso de la semilla. Se resaltan en negrita las diferencias significativas con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

		Efecto Sequía		Efecto Población		Sequía x Población	
		F	p	F	p	F	P
Hoja	Biomasa foliar	5,04	0,0138	2,90	0,1032	4,49	0,0238
	AF	0,30	0,7450	0,38	0,5409	0,64	0,5353
	AFE	0,66	0,5235	2,75	0,1103	0,12	0,8831
	CPF	0,35	0,7073	2,55	0,1260	2,13	0,1449
	PFE	0,60	0,5575	2,15	0,1552	0,26	0,7726
	Densidad estomática/campo	1,88	0,1723	1,60	0,2206	0,20	0,8175
	Densidad estomática foliar	0,18	0,8391	0,59	0,4511	0,05	0,9471
Tallo	Longitud T1	4,18	0,0261	3,83	0,0627	2,43	0,1100
	Diámetro T1	0,94	0,4012	11,39	0,0026	1,71	0,2032
	Longitud T2	0,76	0,4786	1,63	0,2174	2,43	0,1148
	Diámetro T2	0,72	0,4965	0,96	0,3365	4,85	0,0175
Raíz	Diámetro	5,65	0,0089	1,07	0,3111	1,33	0,2855
	Longitud	1,06	0,3592	2,74	0,1112	0,46	0,6353
	Biomasa	3,59	0,0416	3,07	0,0949	6,98	0,0050
	LRE	4,51	0,0212	0,09	0,7657	3,30	0,0576
	Longitud raíz/tallo	3,70	0,0391	0,19	0,6655	4,24	0,0285
	Biomasa subterránea/aérea	0,59	0,5621	0,23	0,6382	0,40	0,6776
Planta completa	TCR (longitud)	0,66	0,5263	1,79	0,1963	3,12	0,0660
	TCR (diámetro)	4,26	0,0251	2,97	0,0993	5,50	0,0120
	Biomasa aérea	5,36	0,0110	6,82	0,0167	6,55	0,0065
	Biomasa total	5,93	0,0073	5,73	0,0266	7,27	0,0042

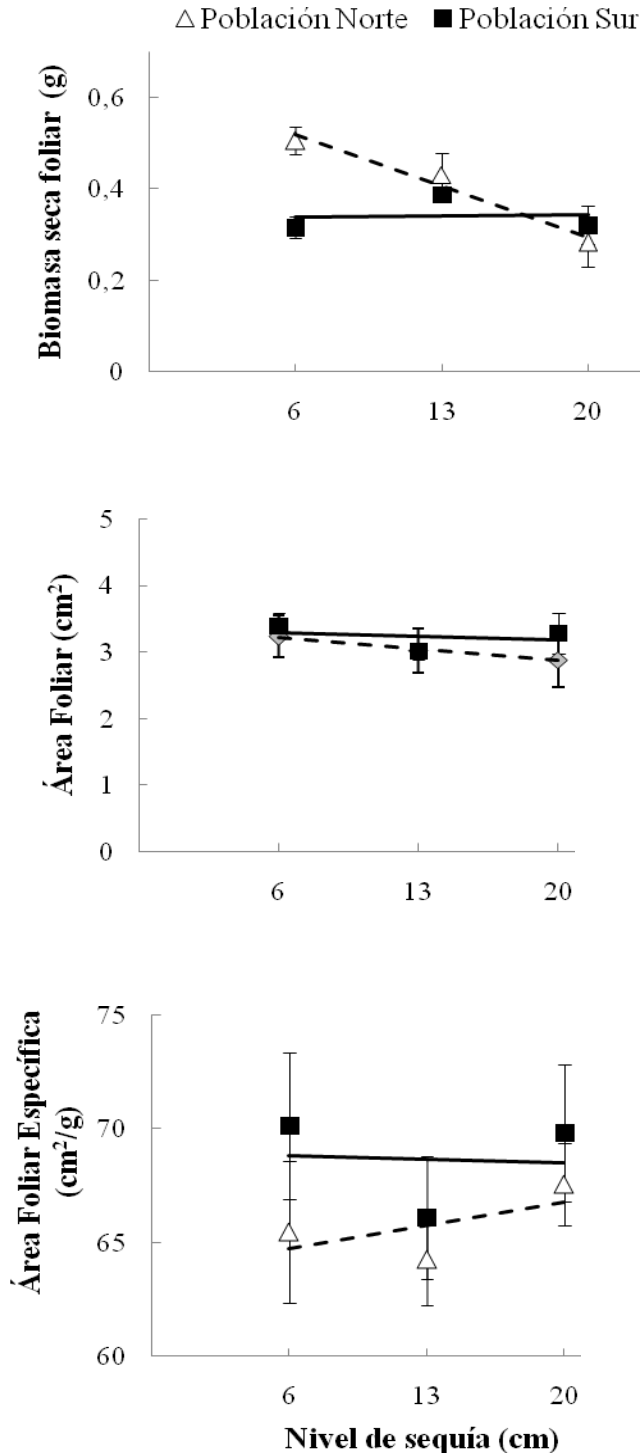


Figura 4.2.3.: Normas de reacción de la Población Norte (símbolos claros) y la Población Sur (símbolos negros) para los rasgos foliares (Media \pm Error Estándar): Biomasa seca foliar (g), Área Foliar (cm²) y Área Foliar Específica (cm²/g), en respuesta a tres tratamientos de sequía: Control (6 cm de altura del nivel de agua), Sequía moderada (13 cm) y Sequía extrema (20 cm).

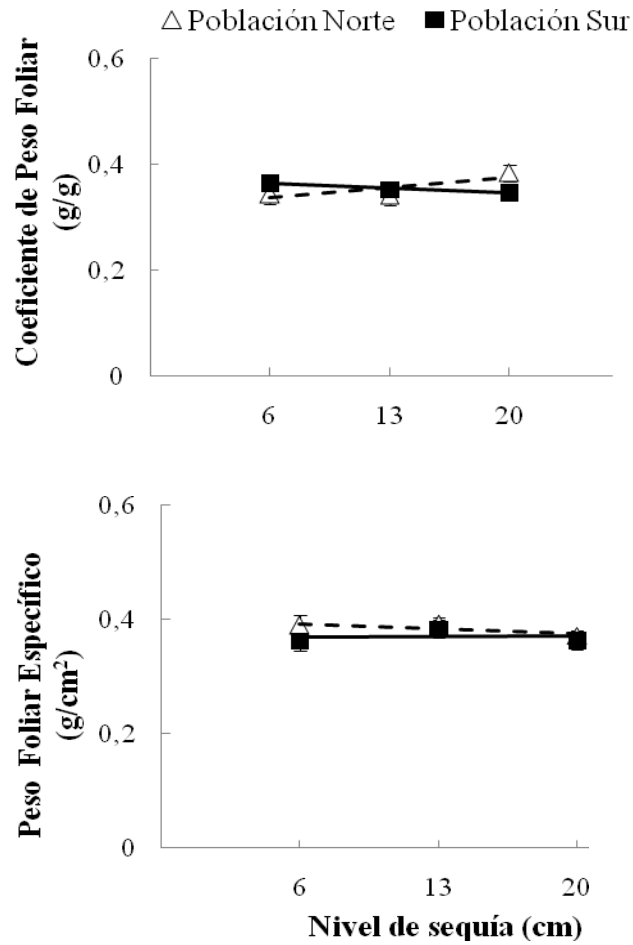


Figura 4.2.4.: Normas de reacción de la Población Norte (símbolos claros) y la Población Sur (símbolos negros) para los rasgos foliares (Media \pm Error Estándar): Coeficiente de Peso Foliar (g/g) y Peso Foliar Específico (g/cm²) en respuesta a tres tratamientos de sequía: Control (6 cm de altura del nivel de agua), Sequía moderada (13 cm) y Sequía extrema (20 cm).

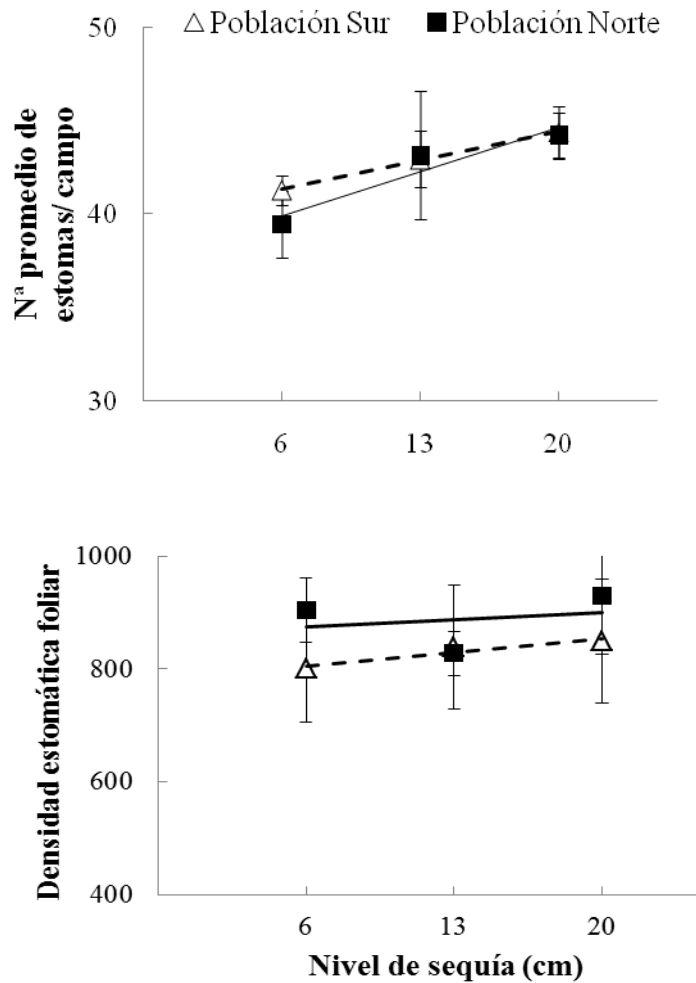


Figura 4.2.5.: Normas de reacción de la Población Norte (símbolos claros) y la Población Sur (símbolos negros) para los rasgos foliares (Media \pm Error Estándar): densidad estomática por campo y densidad estomática foliar en respuesta a tres tratamientos de sequía: Control (6 cm de altura del nivel de agua), Sequía moderada (13 cm) y Sequía extrema (20 cm).

4.3. RASGOS CAULINARES

En el caso de los rasgos a escala de tallo, la longitud medida a los 20 días del inicio del ensayo (T1) mostró diferencias significativas entre tratamientos y marginalmente entre poblaciones, Aunque no se encontró interacción significativa, la Población Norte tuvo valores más altos en el tratamiento control, disminuyendo en los tratamientos de sequía; por su parte, la Población Sur no mostró diferencias a lo largo del gradiente (Fig. 4.3.1). Otro de los rasgos medidos en dicha fecha fue el diámetro del tallo, el cual tomó valores

significativamente mayores en las plántulas de la Población Norte que en las de la Población Sur para los tres niveles de sequía. Para dicho rasgo, no se encontraron diferencias entre tratamientos (Fig. 4.3.1).

La longitud del tallo medida en el tiempo 2 (Fig. 4.3.2) no mostró diferencias significativas entre tratamientos y poblaciones, ni interacción P \times Z. Por su parte, el diámetro presentó interacción significativa: la Población Norte tomó valores significativamente mayores en el tratamiento control que la Población Sur, pero no hubo diferencias en los tratamientos de sequía.

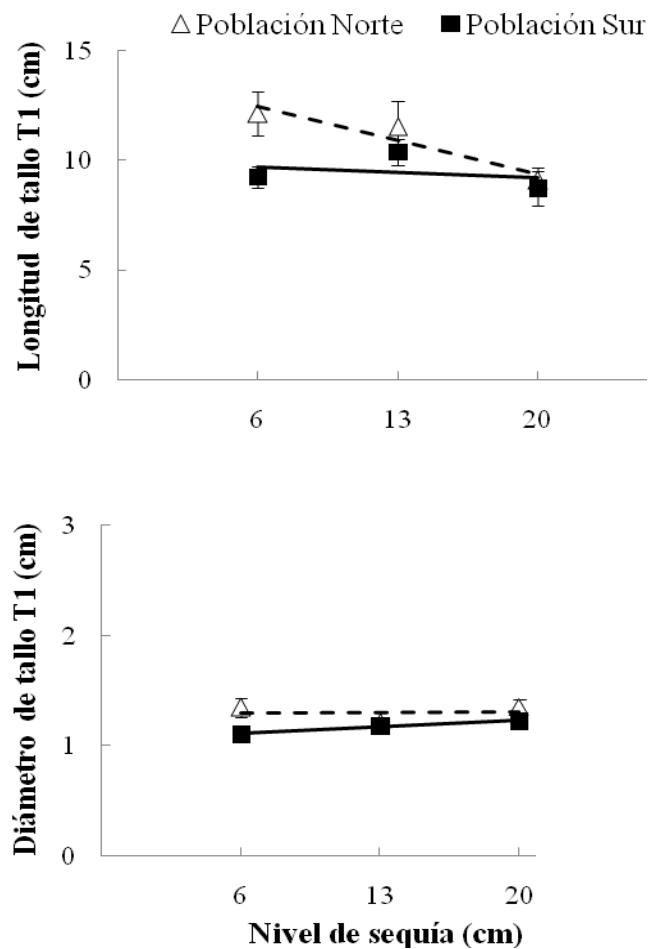


Figura 4.3.1.: Normas de reacción de la Población Norte (símbolos claros) y la Población Sur (símbolos negros) para los rasgos (Media \pm Error Estándar): longitud y diámetro de tallo (cm) medidos en el Tiempo 1 en respuesta a tres tratamientos de sequía: Control (6 cm de altura del nivel de agua), Sequía moderada (13 cm) y Sequía extrema (20 cm).

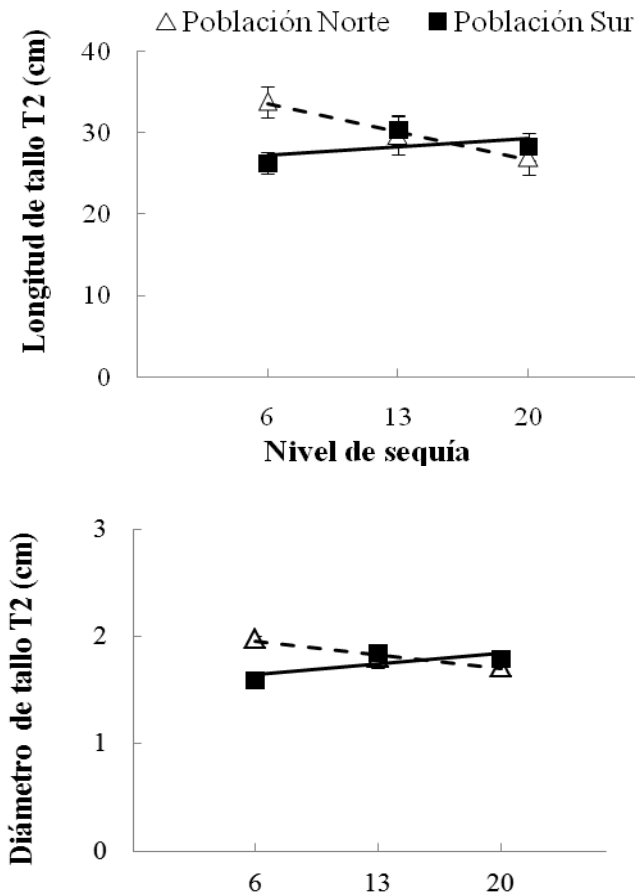


Figura 4.3.2.: Normas de reacción de la Población Norte (símbolos claros) y la Población Sur (símbolos negros) para los rasgos (Media \pm Error Estándar): longitud y diámetro de tallo (cm) medidos en el Tiempo 2 y biomasa seca de tallo (g) en respuesta a tres tratamientos de sequía: Control (6 cm de altura del nivel de agua), Sequía moderada (13 cm) y Sequía extrema (20 cm).

4.4. RASGOS RADICALES

En cuanto a la raíz, la población Norte fue afectada por el tratamiento de sequía extrema en 4 de los 6 rasgos medidos; por su parte, para la Población Sur no se vieron diferencias entre tratamientos para ninguno de los 6 rasgos. La longitud de la raíz y la relación biomasa subterránea/aérea fueron dos rasgos que no mostraron diferencias bajo ningún efecto (Tabla 4.2.2).

El diámetro de la raíz de la Población Norte fue significativamente mayor en el tratamiento control que en el de sequía extrema; aunque no se vieron diferencias entre

poblaciones. La biomasa de la raíz también exhibió valores mayores para la Población Norte en el tratamiento control, pero a diferencia del diámetro, mostró interacción PxZ: la sequía mostró un marcado efecto negativo sobre la biomasa de raíces de la Población Norte (Fig. 4.4.1).

Como se expresó anteriormente, la longitud radical fue uno de los rasgos que no mostró variación significativa entre tratamientos ni poblaciones y además, no mostró interacción (Fig. 4.4.1). Sin embargo, cuando tuvimos en cuenta la longitud radical específica, se encontró una marginal interacción PxZ ($p = 0.057$), lo cual probablemente esté relacionado con que la población Norte alcanzó valores mayores a medida que aumentaba la sequía, mientras que los valores de la Población Sur se mantuvieron constantes (Fig. 4.4.2). Por otra parte, se encontró interacción significativa en la relación longitud raíz/longitud tallo y similarmente, se observaron para dicho rasgo que la Población Norte asumió valores mayores en la Población Norte hacia el extremo seco del gradiente (Fig. 4.4.2).

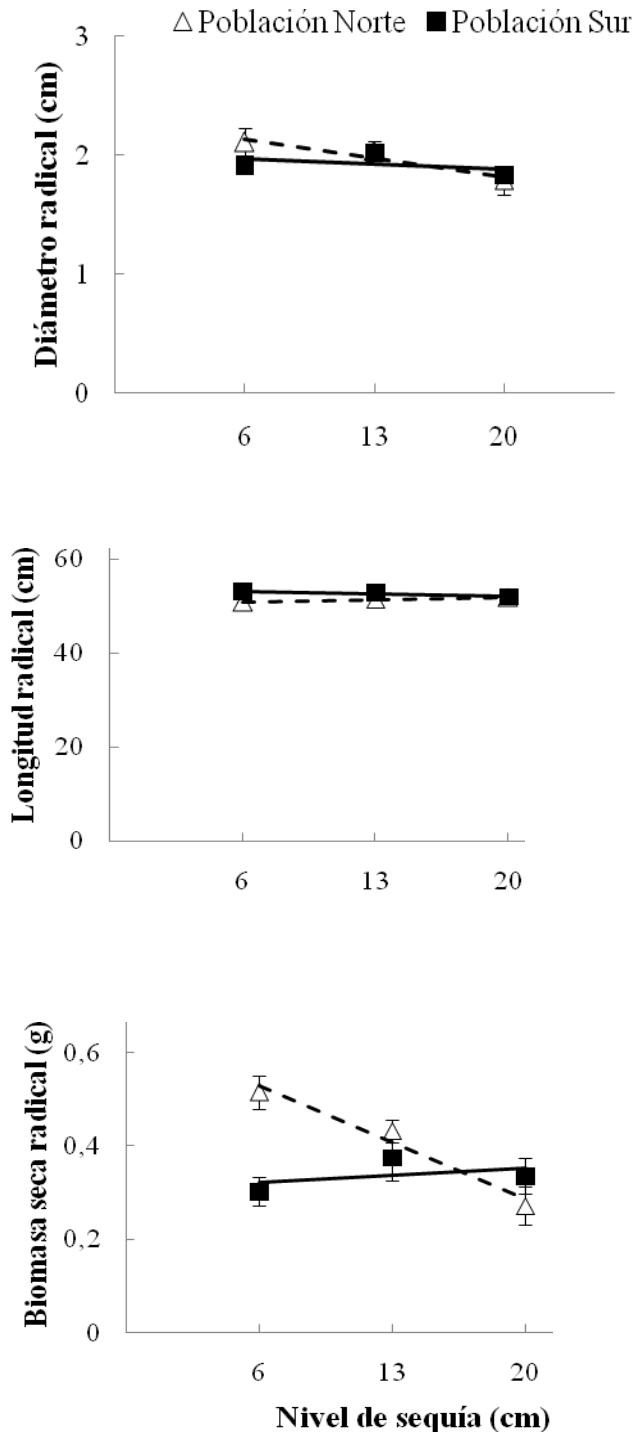


Figura 4.4.1.: Normas de reacción de la Población Norte (símbolos claros) y la Población Sur (símbolos negros) para los rasgos (Media \pm Error Estándar): diámetro (cm), longitud (cm) y biomasa radical en respuesta a tres tratamientos de sequía: Control (6 cm de altura del nivel de agua), Sequía moderada (13 cm) y Sequía extrema (20 cm).

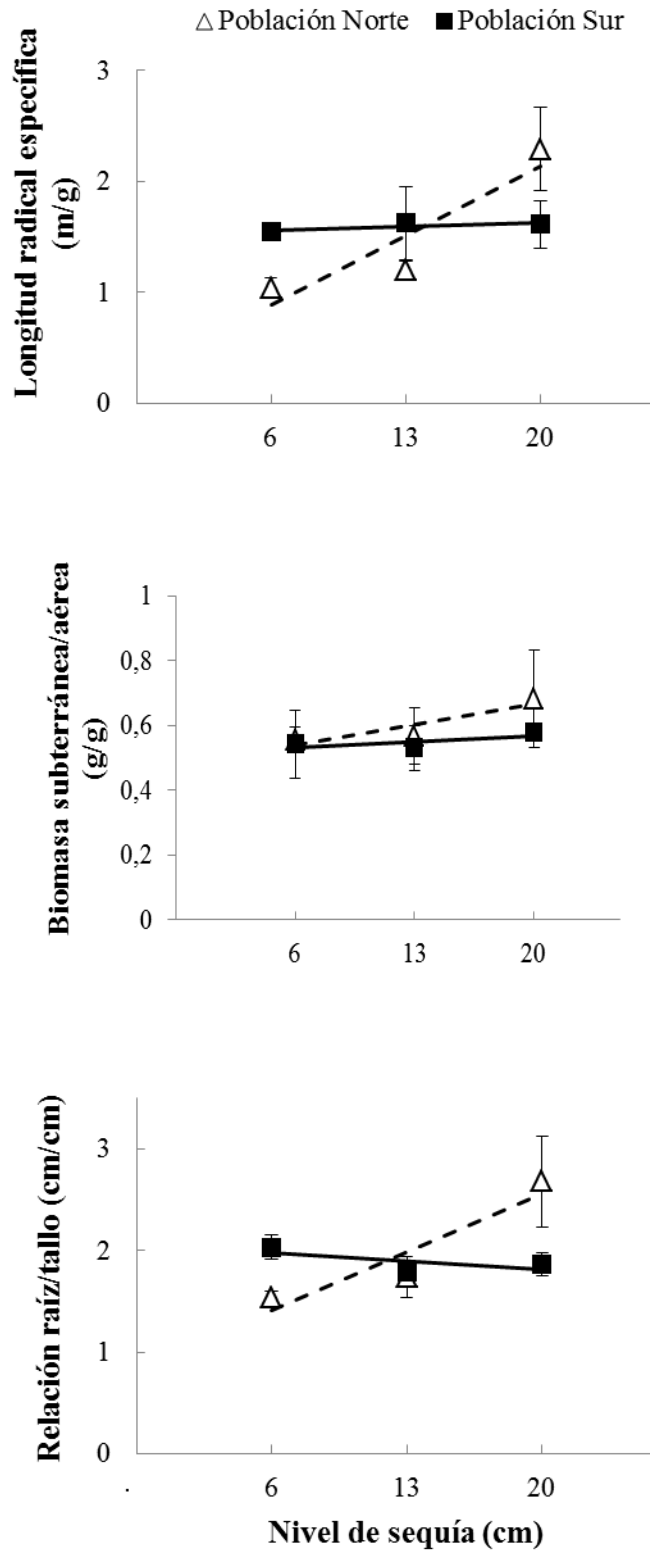


Figura 4.4.2.: Normas de reacción de la Población Norte (símbolos claros) y la Población Sur (símbolos negros) para los rasgos (Media \pm Error Estándar): longitud radical específica (m/g), relación biomasa subterránea/aérea (g/g) y relación longitud raíz/longitud tallo (cm/cm) en respuesta a tres tratamientos de sequía: Control (6 cm de altura del nivel de agua), Sequía moderada (13 cm) y Sequía extrema (20 cm).

4.5. RASGOS DE CRECIMIENTO

A nivel de planta completa, la tasa de crecimiento relativo, medida en términos de longitud de tallo, no fue un rasgo que varió significativamente bajo ningún efecto; aunque dicha variable en términos de diámetro de tallo mostró interacción población x sequía significativa. En la Figura 4.5.1, se observa que bajo tratamiento control, la Población Norte alcanzó valores de crecimiento significativamente mayores comparados con los de la Población Sur.

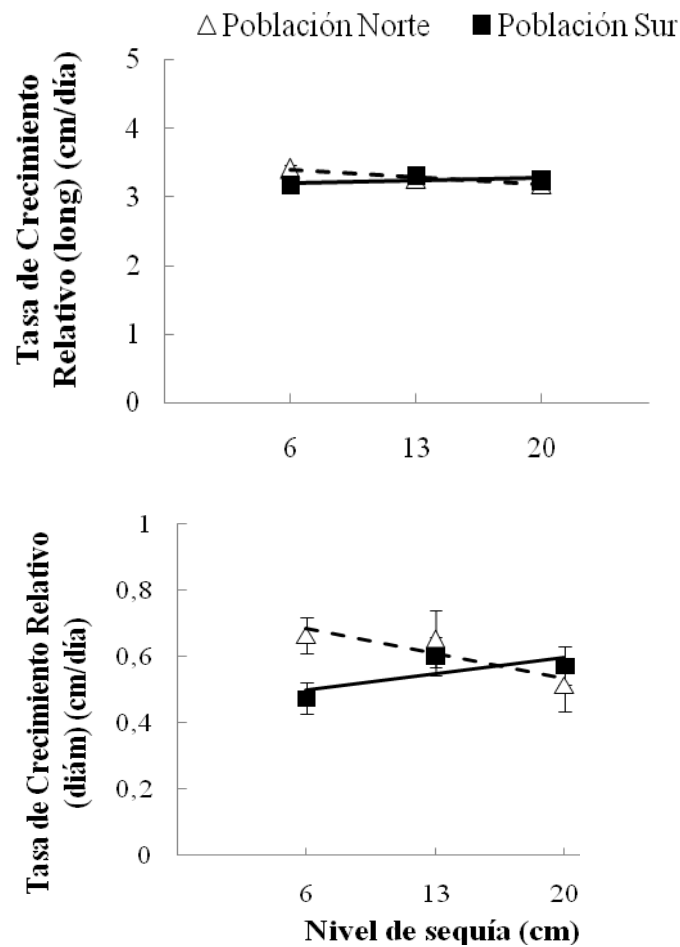


Figura 4.5.1.: Normas de reacción de la Población Norte (símbolos claros) y la Población Sur (símbolos negros) para el rasgo (Media \pm Error Estándar): Tasa de Crecimiento Relativo (TCR: cm/día) medido en términos de longitud (arriba) y diámetro (abajo) de tallo en respuesta a tres tratamientos de sequía: Control (6 cm de altura del nivel de agua), Sequía moderada (13 cm) y Sequía extrema (20 cm).

Las variables biomasa aérea y biomasa total presentaron interacción significativa PxZ, mostrando valores mayores la Población Norte en el tratamiento control. Se observó un notable efecto negativo de la sequía para la Población Norte pero no ocurrió lo mismo para la Población Sur. En los tratamientos de sequía extrema, no se observan diferencias significativas entre poblaciones (Tabla 4.2.2; Fig. 4.5.2).

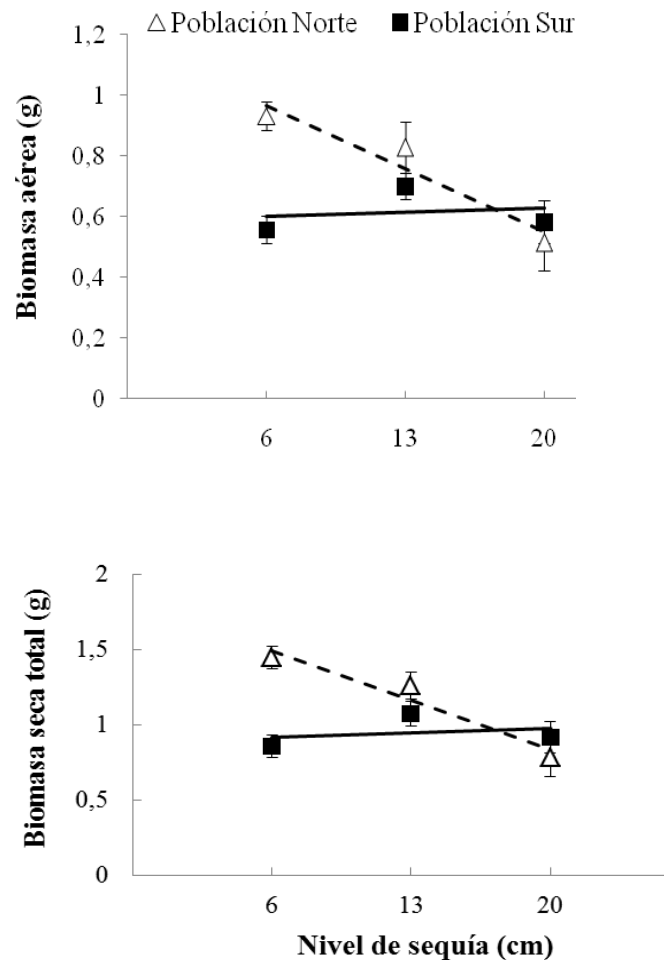


Figura 4.5.2.: Normas de reacción de la Población Norte (símbolos claros) y de la Población Sur (símbolos negros) para los rasgos (Media \pm Error Estándar): biomasa aérea y total de la planta (g) en respuesta a tres tratamientos de sequía: Control (6 cm de altura del nivel de agua), Sequía moderada (13 cm) y Sequía extrema (20 cm).

4.6. PLASTICIDAD ADAPTATIVA

Los rasgos funcionales: diámetro radical, LRE y longitud raíz/longitud tallo de la Población Norte mostraron plasticidad fenotípica a la sequía. Aunque el diámetro radical disminuye en respuesta a la sequía, se encontró una relación con la variable biomasa seca total, utilizada como medida Proxy de fitness (Fig. 4.6.1). Los análisis mostraron una correlación positiva significativa entre este rasgo y la biomasa total para los tratamientos

de sequía moderada y extrema (Fig. 4.6.2); en ambos tratamientos la pendiente de la línea de tendencia es pronunciada, lo que significa que un pequeño aumento del diámetro radical, aumenta notablemente el fitness de la plántula. Esta respuesta sería adaptativa en condiciones de sequía.

En cuanto a la relación longitud raíz/longitud tallo, en la Figura 4.6.3, se observa que a medida que aumentan los valores de longitud de la raíz sobre la longitud del tallo disminuye la biomasa total de la planta, lo que indica que dicho rasgo no es adaptativo para la Población Norte. Los análisis mostraron una correlación negativa para los tres tratamientos y se observó una pendiente más pronunciada para el tratamiento control (Fig. 4.6.4).

Por último, el rasgo LRE también mostró ser no adaptativo ya que al disminuir su valor, disminuyó la biomasa seca total (Fig. 4.6.5). Los análisis mostraron una correlación negativa significativa con la biomasa total para los tratamientos control y sequía extrema, lo que demuestra que no es un rasgo adaptativo. El tratamiento control presentó una pendiente más pronunciada que el de sequía extrema, indicando que un pequeño aumento en el rasgo disminuye notablemente el fitness bajo buenas condiciones hídricas (Fig. 4.6.6).

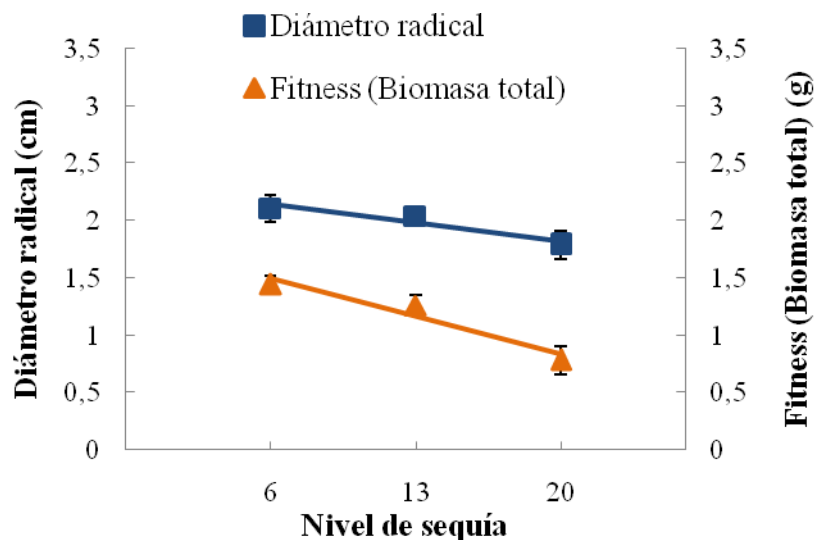


Figura 4.6.1.: Normas de reacción de los rasgos (Media \pm Error Estándar): diámetro radical (cm; eje Y primario) y biomasa seca total de la planta (g, eje Y secundario) para la Población Norte en respuesta a tres tratamientos de sequía: Control (6 cm de altura del nivel de agua), Sequía moderada (13 cm) y Sequía extrema (20 cm). Se muestran valores promedios y errores estándar para cada rasgo.

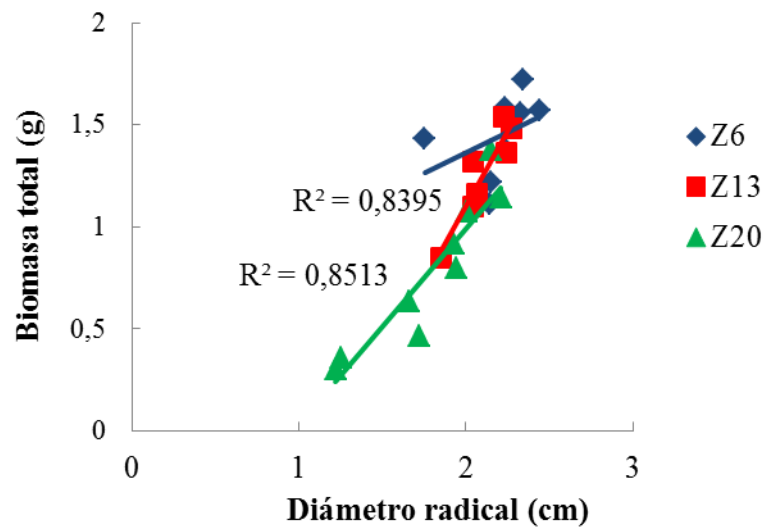


Figura 4.6.2.: Gráfico de correlación entre el rasgo diámetro radical (cm; eje X) y el rasgo biomasa seca total (g; eje Y) para la Población Norte en respuesta a tres tratamientos de sequía: Control (6 cm de altura del nivel de agua), Sequía moderada (13 cm) y Sequía extrema (20 cm). Se indican los valores de R^2 , con un nivel de significancia de $p < 0,01$.

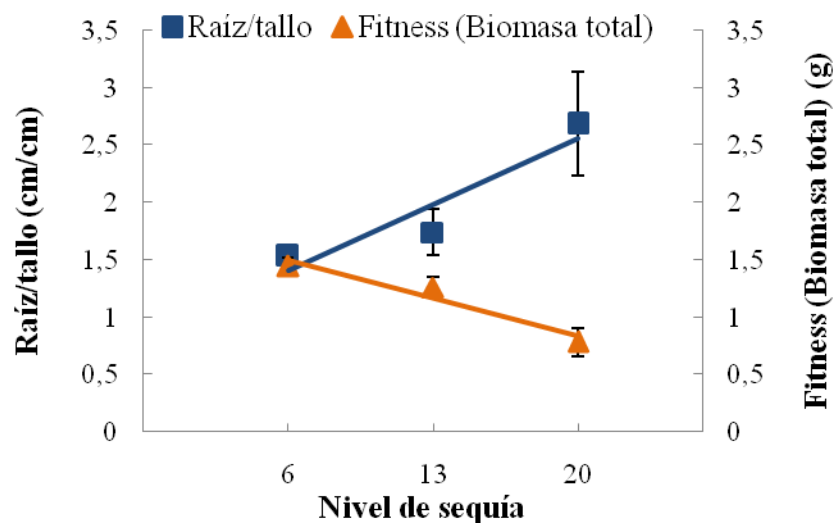


Figura 4.6.3.: Normas de reacción de los rasgos (Media \pm Error Estándar): relación longitud raíz/longitud tallo (cm/cm; eje Y primario) y biomasa seca total de la planta (g, eje Y secundario) para la Población Norte en respuesta a tres tratamientos de sequía: Control (6 cm de altura del nivel de agua), Sequía moderada (13 cm) y Sequía extrema (20 cm). Se muestran valores promedios y errores estándar para cada rasgo.

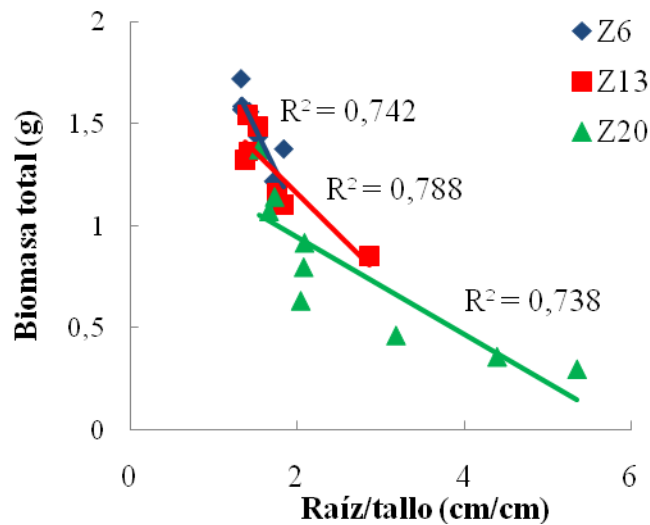


Figura 4.6.4.: Gráfico de correlación entre el rasgo longitud raíz/longitud tallo (cm/cm; eje X) y el rasgo biomasa seca total (g; eje Y) para la Población Norte en respuesta a tres tratamientos de sequía: Control (6 cm de altura del nivel de agua), Sequía moderada (13 cm) y Sequía extrema (20 cm). Se indican los valores de R^2 , con un nivel de significancia de $p < 0,01$.

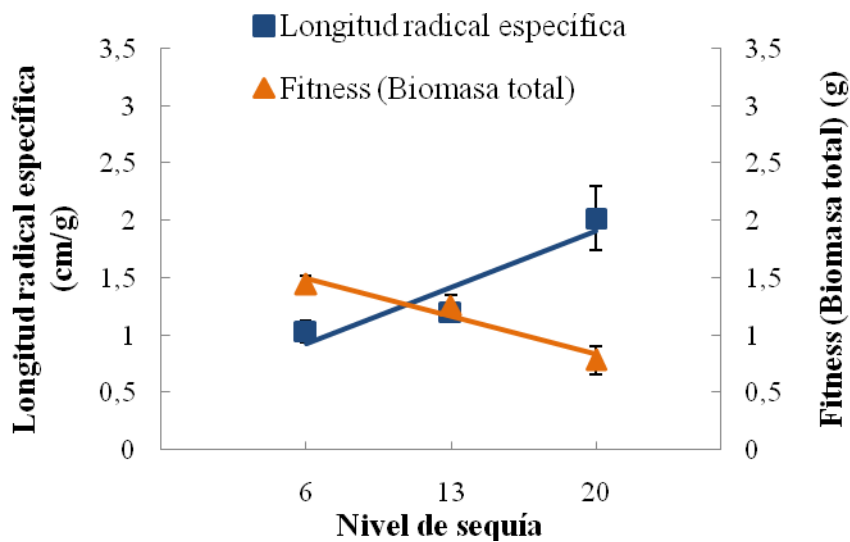


Figura 4.6.5.: Normas de reacción de los rasgos (Media \pm Error Estándar): relación longitud raíz/longitud tallo (cm/cm; eje Y primario) y biomasa seca total de la planta (g; eje Y secundario) para la Población Norte en respuesta a tres tratamientos de sequía: Control (6 cm de altura del nivel de agua), Sequía moderada (13 cm) y Sequía extrema (20 cm). Se muestran valores promedios y errores estándar para cada rasgo.

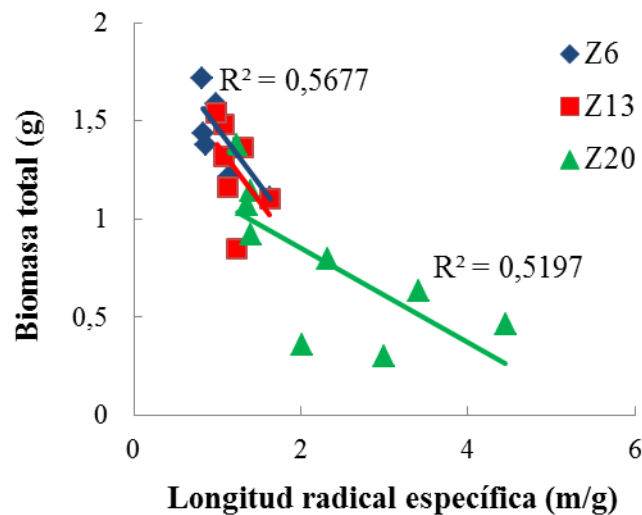


Figura 4.6.6.: Gráfico de correlación entre el rasgo longitud radical específica (m/g; eje X) y el rasgo biomasa seca total (g; eje Y) para la Población Norte en respuesta a tres tratamientos de sequía: Control (6 cm de altura del nivel de agua), Sequía moderada (13 cm) y Sequía extrema (20 cm). Se indican los valores de R^2 , con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

4.7. INDICE DE PLASTICIDAD

Por último, el Índice de Plasticidad mostró que la Población Norte es más plástica en rasgos relacionados a fitness, rasgos funcionales y en el total de los rasgos, comparada con la Población Sur. En particular, los rasgos relacionados al fitness fueron notoriamente más plásticos que los rasgos funcionales en la Población Norte (Fig. 4.7.1.).

El análisis de los índices de plasticidad de todos los rasgos por separado (Fig. 4.7.2.), mostró que los rasgos radicales (en particular, LRE y LR/LT) y de fitness (BF, BA, BR y B total) de la Población Norte son más plásticos que los de la Población Sur, excepto para las dos medidas de TCR en las que no se observan diferencias entre las poblaciones. Por otro lado, se observan bajos índices de plasticidad en rasgos foliares para ambas poblaciones.

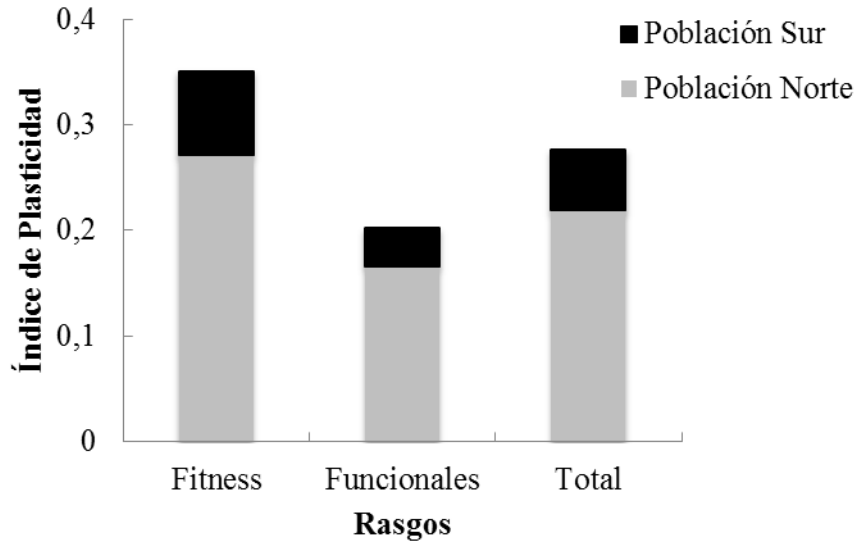


Figura 4.7.1.: Índice de plasticidad propuesto por Valladares *et al.* (2000). Se representan los promedios para la Población Norte (barras grises) y la Población Sur (barras negras) para rasgos funcionales y asociados a fitness por separado y en conjunto (total).

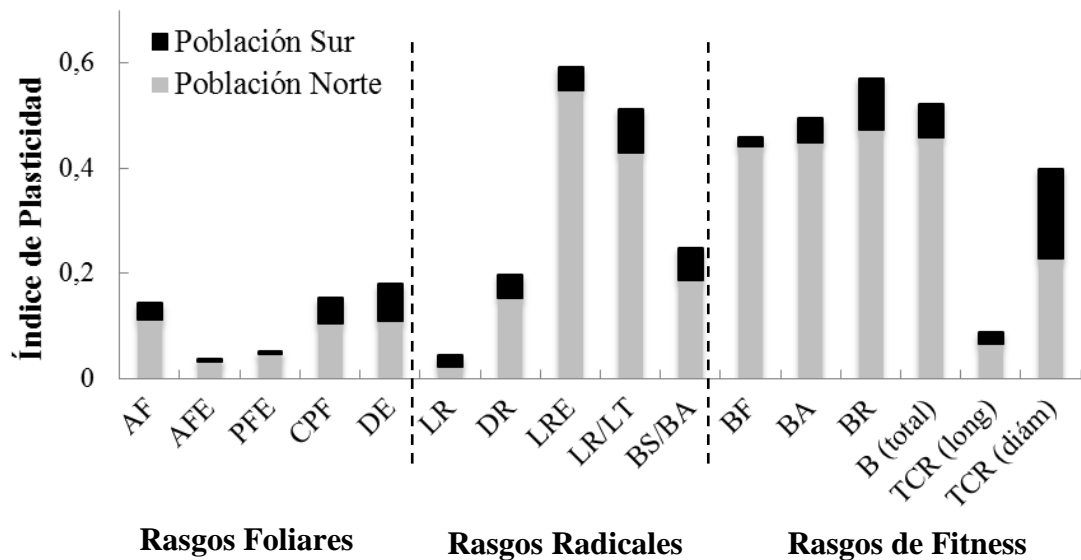


Figura 4.7.2.: Índice de plasticidad propuesto por Valladares *et al.* (2000). Se representan los promedios para la Población Norte (barras grises) y la Población Sur (barras negras) para rasgos funcionales foliares: AF (Área Foliar) , AFE (Área Foliar Específica), PFE (Peso Foliar Específico), CPF (Coeficiente de Peso Foliar) y DE (densidad estomática por campo), radicales: LR (longitud radical), DR (diámetro radical), LRE, LR/LT (longitud raíz/longitud tallo) y BS/BA (biomasa subterránea/aérea), y de fitness (BF: biomasa foliar, BA: biomasa aérea, BR: biomasa radical, B total: biomasa total, TCR (long) y TCR (diám)).

5. DISCUSIÓN

Las poblaciones estudiadas presentaron diferencias en la plasticidad a la sequía. Las diferencias entre las pendientes de las normas de reacción y los índices de plasticidad muestran que en la mayor parte de los rasgos estudiados, la Población Norte fue la más plástica y por ende, la más afectada por la sequía (mayor pendiente); mientras que la Población Sur mostró baja o nula plasticidad (pendientes menos pronunciadas y en algunos casos, no diferente de cero) en todos los rasgos estudiados excepto en la tasa de crecimiento del diámetro del tallo y en densidad estomática. Estos resultados apoyan nuestra hipótesis de que plántulas provenientes de ambientes que presentan condiciones propicias para el crecimiento, muestran mayor plasticidad en rasgos morfológicos y fisiológicos que aquellas expuestas a ambientes más estresantes, como ha sido planteado por Chapin (1980), Alpert y Simms (2002) y Valladares *et al* (2005). La posible causa de que las plántulas de la Población Norte no hayan desarrollado la capacidad de responder positivamente a la reducción de la disponibilidad de agua, podría ser explicada en términos de adaptación local a un ambiente en el cual las precipitaciones son abundantes durante el período de crecimiento. La respuesta constante de los rasgos funcionales y de fitness de la Población Sur a lo largo del gradiente demuestra la gran tolerancia de esta población a ambientes con limitación hídrica.

En general, la Población Norte mostró una respuesta favorable en rasgos funcionales y de fitness bajo condiciones hídricas óptimas (tratamiento control), a diferencia de la Población Sur, lo cual indica que las plántulas obtenidas de la Población Norte exhiben mayor fitness en ambientes con alta disponibilidad hídrica en concordancia con la tercera hipótesis planteada en este estudio. Por su parte, la Población Sur no respondió positivamente al pulso extra de recurso en rasgos relacionados al fitness.

En cuanto al crecimiento, las plántulas originarias de sitios más cálidos y con mayores precipitaciones (Población Norte) tuvieron mayor crecimiento (biomasa tallo, TCR diámetro y biomasa total) bajo buenas condiciones hídricas que las originarias de sitios más secos (Población Sur), como se ha encontrado en otros trabajos (Galloway, 1995; Ramírez-Valiente *et al*, 2010; Premoli y Mathiasen, 2011). Ésto, en parte, también puede deberse a que presentó semillas significativamente más pesadas que la Población Sur y mayor contenido de reservas destinadas al crecimiento durante los primeros estadios de la plántula (Chapin *et al*, 1993). En cambio, bajo condiciones limitantes de agua, el crecimiento de la Población Norte se vio negativamente afectado, pero no así el de la Población Sur que se mantuvo constante a lo largo del gradiente. Posiblemente, el

mantenimiento de la tasa de crecimiento y de producción de biomasa bajo condiciones de sequía podría deberse a que una característica de baja demanda de agua por parte de las plántulas de esta población no produce limitaciones del recurso hídrico.

Los patrones de cambios en alocaación a biomasa aérea y subterránea de las plántulas de la Población Norte, indican que no han evolucionado en un ambiente bajo limitaciones hídricas, por la respuesta no favorable ante condiciones de sequía. Por su parte, la Población Sur parece haber evolucionado en otro tipo de ambientes ya que no muestra una respuesta adaptativa en condiciones favorables y además, porque bajo condiciones de estrés hídrico el fitness (eficacia biológica) de las plántulas no se ve afectado, lo que las define como tolerantes (Valladares y Sánchez-Gómez, 2006; Couso y Fernández, 2012). Esta variación intraespecífica en las respuestas al mismo ambiente, ha sido observada en otras especies distribuidas a lo largo de diferentes gradientes ambientales (Duddley, 1996; Gianoli y González Teuber, 2005; Valladares y Sánchez-Gómez, 2006; Yousfi *et al*, 2010; Premoli y Mathiasen, 2011).

Villalobos *et al* (2001) observó una disminución en la biomasa aérea y subterránea en plántulas de una población de caldén (ubicada en un sitio cuya precipitación media anual es de 344 ± 98 mm) sometidas a un tratamiento de sequía, caracterizado por 2,5 % de agua en el suelo. Estas diferencias con las respuestas encontradas en la Población Sur de nuestro estudio (ambas ubicadas en ambientes bajo limitaciones hídricas) podrían deberse a que el tratamiento de sequía utilizado por Villalobos *et al* (2001) fue más severo. Mientras que nuestro tratamiento de sequía no afectó la producción de biomasa aérea y subterránea de la Población Sur, fue relevante para la Población Norte.

En referencia a la producción de biomasa foliar bajo buenas condiciones hídricas, la Población Norte tomó valores altos a pesar de la alta senescencia de folíolos. Esto muestra que las plántulas de la Población Norte en condiciones de alta disponibilidad del recurso, compensan la senescencia con una mayor producción de hojas nuevas. Sin embargo, en la Población Sur se observó un bajo porcentaje de senescencia y el mantenimiento de la biomasa foliar a lo largo del gradiente, lo que indica una baja producción de hojas nuevas.

En cuanto a rasgos radicales, si bien no se encontraron diferencias significativas entre poblaciones, se observó una tendencia de la Población Sur a tomar valores mayores en ciertos rasgos (tales como LRE, relación longitud raíz/tallo y biomasa subterránea/aérea) bajo buenas condiciones hídricas, comparada con las de la Población Norte. Esto podría reflejar una adaptación local de las plántulas de la Población Sur a un ambiente con bajo régimen de precipitaciones que estimula prioritariamente el crecimiento

de las raíces. Por el contrario, las plántulas de la Población Norte, adaptadas a un ambiente sin limitaciones hídricas, no particionarían asimilados para el desarrollo de raíces, sino que invertirían en crecimiento. En contraposición a nuestra hipótesis, las plántulas de la Población Sur no mostraron plasticidad en rasgos radicales a la sequía; pero sí lo hicieron las de la Población Norte. Estas últimas, mostrarían una respuesta tendiente a evitar el estrés hídrico, invirtiendo biomasa en rasgos como LRE y longitud raíz/longitud tallo y diámetro radical, maximizando la absorción de agua (Valladares *et al*, 2004). Si bien esta respuesta plástica podría ayudar a las plántulas de la Población Norte a sobrevivir bajo condiciones estresantes, sólo el diámetro radical se correlacionó positivamente con la producción de biomasa, demostrando ser un rasgo adaptativo a la sequía.

En este trabajo, la respuesta plástica de rasgos funcionales foliares que ha sido considerada por numerosos autores (Antúñez *et al*, 2001; Villar y Merino, 2001; Cornelissen *et al*, 2003; Franco *et al*, 2004; Gianoli y Gonzalez-Teuber, 2005; Valladares y Sánchez-Gómez, 2006; Poorter *et al*, 2009; Ramirez-Valiente *et al*, 2010) como posible estrategia para evitar o tolerar la sequía y correlacionados positivamente al fitness, no ha sido relevante para ninguna de las dos poblaciones, por lo que se rechazaría por completo nuestra segunda hipótesis. A pesar de estos resultados, el escaso efecto de la sequía en el crecimiento de las plántulas de la Población Sur, podría estar influenciado por cambios en otros rasgos foliares no estudiados en este trabajo (tales como tasas de transpiración, regulación de cierre estomático, potencial hídrico bajo, resistencia de tejidos a la deshidratación, entre otros (Valladares *et al*, 2004).

Aunque la Población Norte fue la más afectada por la sequía, el crecimiento de las plántulas en términos de biomasa de tallo y total, resultó superior al de la Población Sur en los tratamientos control y sequía moderada. La mayor plasticidad de la Población Norte sería adaptativa en el rango de disponibilidades hídricas estudiadas a partir de sequía moderada y hacia el extremo húmedo del gradiente, ya que aprovecharía la disponibilidad del recurso invirtiendo en biomasa. Sin embargo, en sequía extrema se ve notoriamente afectada por el estrés en la mayoría de los rasgos, tanto funcionales como relacionados al fitness. De este modo, las plántulas de la Población Norte estarían pagando en pérdida de biomasa el costo de la plasticidad hacia el extremo seco del gradiente.

Por su parte, la Población Sur sería menos sensible ante la alta disponibilidad del recurso, ya que no responde con un incremento del crecimiento. Sin embargo, el mantenimiento de la tasa de crecimiento bajo condiciones estresantes, la caracteriza como

tolerante. De este modo, estaría pagando el costo de tolerar la sequía con un bajo fitness en óptimas condiciones hídricas.

Estas diferencias en tolerancia a la sequía podrían ser utilizadas como un criterio de selección de genotipos en diferentes regiones climáticas. Nuestros resultados indican que existe una variabilidad intraespecífica en la tolerancia a la sequía de plántulas de *P. caldenia* y que, por lo tanto, las poblaciones estudiadas serían ecotipos localmente adaptados a hábitats que se distinguen por diferencias climáticas (Gianoli, 2004).

En base a los resultados obtenidos, el caldenal de la Reserva Provincial Parque Luro posee un reservorio de recursos genéticos tolerantes a la sequía. Futuros estudios sobre la diversidad genética y fenotípica de plántulas de la población de la reserva, serían relevantes para conocer la tolerancia y vulnerabilidad de la regeneración del bosque, frente a futuros escenarios de cambio global.

El estudio ecofisiológico de plántulas de leñosas nos permite conocer cómo responden las plantas en las etapas iniciales del desarrollo al ambiente y realizar predicciones sobre su impacto en la composición y dinámica del bosque (Valladares y Sánchez-Gómez, 2006); y sobre posibles respuestas de las plantas a condiciones estresantes asociadas al cambio global (Valladares *et al*, 2004; 2005). El conocimiento de la variabilidad intraespecífica de los mecanismos de tolerancia al estrés de plántulas de caldén, puede ser aplicado en programas de reforestación, restauración de áreas degradadas y de mejoramiento en la selección de variedades que se ajusten a ciertos requerimientos ambientales, como se ha sugerido con otras especies del género (Villagra *et al*, 2010).

6. CONCLUSIONES

Las poblaciones estudiadas presentaron diferencias en la plasticidad a la sequía. Plántulas provenientes de ambientes que presentan condiciones propicias para el crecimiento (Población Norte) fueron más plásticas y por ende, las más afectadas por la sequía; mientras que plántulas provenientes de ambientes menos favorables (Población Sur) mostraron baja o nula plasticidad en la mayor parte de los rasgos estudiados. La posible causa de que las plántulas de la Población Norte no hayan desarrollado la capacidad de responder positivamente a la reducción de la disponibilidad de agua, podría ser explicada en términos de adaptación local a un ambiente en el cual las precipitaciones son abundantes durante el período de crecimiento. La respuesta constante de los rasgos funcionales y de fitness de la Población Sur a lo largo del gradiente demuestra la gran tolerancia de esta población a ambientes con limitación hídrica. En conclusión, la mayor plasticidad de la Población Norte sería adaptativa en el rango de disponibilidades hídricas estudiadas a partir de sequía moderada y hacia el extremo húmedo del gradiente, mientras que la Población Sur tendría la capacidad de tolerar condiciones de estrés hídrico.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackerly, D. D., Dudley, S. A., Sultan, S. E., Schmitt, J., Coleman, J. S. Linder, C. R., Sandquist, D. R., Geber, M. A., Evans, A. S., Dawson, T. E. and M. J. Lechowicz. (2000). The Evolution of Plant Ecophysiological Traits: Recent Advances and Future Directions. *BioScience*. 50: 979-995.
- Alpert, P. and E. L. Simms. (2002). The relative advantages of plasticity and fixity in different environments: when is it good for a plant to adjust? *Evolutionary Ecology*. 16: 285–297.
- Alvarez, J.A. and P. E. Villagra. (2009) *Prosopis flexuosa* D C. (Fabaceae, Mimosoideae). *Kurtziana* (Argentina). 35(1): 49-63.
- Ansley, R.J., Boutton, T. W. and P.W. Jacoby. (2007). Mesquite root distribution and water use efficiency in response to long-term soil moisture manipulations. In: Sosebee, R.E., Wester, D.B., Britton, C.M., McArthur, E.D. and S.G. Kitchen (Eds.), *Proceedings 13th Wildland Shrub Symposium – Shrubland Dynamics: Fire and Water*. (pp. 96-103). USDA Forest Service Rocky Mountain Research Station. Fort Collins, USA.
- Antúnez, I. C., Retamosa, E. C. and R. Villar. (2001). Relative growth rate in phylogenetically related deciduous and evergreen woody species. *Oecología*. 128: 172–180.
- Bradshaw, A. D. (1965). Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advances in Genetics*. 13: 115-55.
- Buss, R.G., Secco, N. D. y P.F. Dornes. (2011). Análisis de la distribución espacial de las precipitaciones en la provincia de La Pampa. XXIII Congreso Nacional del Agua (CONAGUA 2011). (pp. 333-343). 22-24 de junio. Resistencia, Chaco.
- Cano, E., Fernández, B. y D. M. Montes. (1980). *Inventario Integrado de los Recursos Naturales de La Provincia de La Pampa*. Eds. INTA, Provincia de La Pampa, Universidad Nacional de La Pampa. Buenos Aires.
- Cano, E. (1988). *Pastizales Naturales de La Pampa. Descripción de las especies más importantes*. Convenio AACREA-Provincia de La Pampa. Capital Federal, Buenos Aires, Argentina.

- Casagrande, G. A., Vergara, G. T. y Y. Belliniet. (2006). Cartas agroclimáticas actuales de temperaturas, heladas y lluvia de la provincia de La Pampa (Argentina). *Revista Facultad de Agronomía, UNLPam.* 17: 15-22.
- Chapin, F. S. (1980). The mineral nutrition of wild plants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics.* 11: 233-60.
- Chapin, F. S.; Keller, A. and F. Pugnaire. (1993). Evolution of suites of traits in response to environmental stress. *Supplement The American Naturalist.* 142: 78-92.
- Cornelissen, J.H.C., Lavorel, S., Garnier, E., Díaz, S., Buchmann, N., Gurvich, D. E., Reich, P.B., ter Steege, H., Morgan, H.D., van der Heijden, M. G. A., Pausas, J. G. and H. Poorter. (2003). A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany.* 51: 335–380.
- Couso, L. L. (2004). Mecanismos de tolerancia a sequía y sus efectos sobre la habilidad competitiva de pastos de la estepa patagónica. Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires, Área Ciencias Agropecuarias. Buenos Aires, Argentina.
- Couso, L. L. and R. J. Fernández (2012). Phenotypic plasticity as an index of drought tolerance in three Patagonian steppe grasses. *Annals of Botany.* 110: 849-857.
- Danquah, J. A. (2010). Phenotypic plasticity of leaf length to an environmental gradient in *Khaya ivorensis* (Meliaceae) populations in Ghana. *African Journal of Environmental Science and Technology.* 4: 860-865.
- Distel, R. A. y D. V. Peláez. (1985). Fenología de algunas especies del Distrito del Caldén (*Prosopis caldenia* Burk). *IDIA.* 441-444: 35-40.
- Dudley, S. A. (1996). Differing selection on plant physiological traits in response to environmental water availability: a test of adaptive hypotheses. *Evolution,* 50: 92-102.
- Fang-Lan, L., Wei-Kai, B. and N. Wu. (2011). Morphological, anatomical and physiological responses of *Campylotropis polyantha* (Franch.) Schindl. seedlings to progressive water stress. *Scientia Horticulturae.* 127: 436–443.
- Fernández, R. J. and J. F. Reynolds. (2000). Potential growth and drought tolerance of eight desert grasses: lack of a trade-off? *Oecologia.* 123: 90–98.

- Franco, A. C., Bustamante, M., Caldas, L. S., Goldstein, G., Meinzer, F. C., Kozovits, A. R., Rundel, P. and V. T. R. Coradin. (2004). Leaf functional traits of Neotropical savanna trees in relation to seasonal water deficit. *Trees*. 19: 326-335.
- Galloway, L. (1995). Response to natural environmental heterogeneity: maternal effects and selection on life-history characters and plasticities in *Mimulus guttatus*. *Evolution* 49: 1095-1107.
- Gianoli, E. (2004). Plasticidad fenotípica adaptativa en plantas. En: H. Cabrera (Ed), *Fisiología ecológica de plantas*. (13-25). Valparaíso, Chile.
- Gianoli, E. and M. González-Teuber. (2005). Environmental heterogeneity and population differentiation in plasticity to drought in *Convolvulus chilensis* (Convolvulaceae). *Evolutionary Ecology*. 19: 603–613.
- Gianoli, E. and F. Valladares. (2012). Studying phenotypic plasticity: the advantages of a broad approach. *Biological Journal of the Linnean Society*. 105: 1-7.
- Jobbágy, E.G., Noretto, M. D.; Santoni, C. S. y G. Baldi. (2008). El desafío ecohidrológico de las transiciones entre sistemas leñosos y herbáceos en la llanura chaco-pampeana. *Ecología Austral*. 18: 305-322.
- Haan, C.T. and B. J. Barfield. (1971) Controlling the soil moisture environment of transpiring plants. *Plant and Soil*. 35: 439–443.
- Kawecki, T. J. and D. Ebert. (2004). Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters*. 7: 1225–1241.
- Lambers, H., Chapin, F. S. and J.L. Pons. (2008). *Plant Physiological Ecology*. Second Edition. Springer-Verlag, New York.
- Lerner, P. 2004. El Caldenar: dinámica de poblaciones de caldén y procesos de expansión de leñosas en pastizales. En *Ecología y manejo de los bosques de Argentina*. Ed. UNLPam, CD-Rom
- Luomala, M. E.; Laitinen, K.; Sutinen, S.; Kellomaki, S. and E. Vapaavuori. (2005). Stomatal density, anatomy and nutrient concentrations of Scots pine needles are affected by elevated CO² and temperature. *Plant, Cell and Environment*. 28: 733–749.
- Nicotra, A. B., Atkin, O.K., Bonser, S.P., Davidson, A.M., Finnegan, E.J., Mathesius, U., Poot, P., Purugganan, M. D., Richards, C.L., Valladares, F. and M. vanKleunen (2010). Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends in Plant Science*. 15: 684–92.

- Peinetti, R.; Martinez, O. y O. Balboa. (1991). Intraespecific variability in vegetative and reproductive growth of a *Prosopis caldenia* Burkart population in Argentina. *Journal of Arid Environment* 21: 37-44.
- Poorter, H., Niinemets, Ü., Poorter, L., Wright, I. J. and R. Villar. (2009). Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): a meta-analysis. *New Phytologist*. 182: 565–588.
- Premoli, A. C. and C. A. Brewer. (2007). Environmental vs. genetically driven variation in ecophysiological traits of *Nothofagus pumilio* from contrasting elevations. *Australian Journal of Botany*, 55: 585–591.
- Premoli, A. C. y P. Mathiasen. (2011). Respuestas ecofisiológicas adaptativas y plásticas en ambientes secos de montaña: *Nothofagus pumilio*, el árbol que acaparó los Andes australes. *Ecología Austral*. 21: 251-269.
- Ramírez-Valiente, J. A., Sánchez-Gómez, D., Aranda, I. and F. Valladares. (2010). Phenotypic plasticity and local adaptation in leaf ecophysiological traits of 13 contrasting cork oak populations under different water availabilities. *Tree Physiology*. 30(5): 618-627.
- Reynolds, J. F., Virginia, R. A., Kemp, P. R., De Soyza, A. G. and D. C. Tremmel. (1999). Impact of drought on desert shrubs: Effects of seasonality and degree of resource island development. *Ecological Monographs*. 69: 69-106.
- Savolainen, O., Pyhäjärvi, T. and T. Knürr. (2007). Gene Flow and Local Adaptation in Trees. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 38: 595–619.
- SAyDS (Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de La Nación). (2007). Primer inventario nacional de bosques nativos, Informe regional espinal, Segunda etapa. Buenos Aires.
- Schmalhausen, I. I., Dordick, I. and T. Dobzhansky. (1951). Factors of Evolution: The Theory of Stabilizing Selection. *Quarterly Review of Biology*. 26: 384-385.
- Secco, N. D. (2013). “Análisis de la respuesta hidrológica bajo distintos manejos de suelo en una zona agrícola de la provincia de La Pampa”. Tesis presentada para optar al título de Ingeniero en Recursos Naturales y Medio Ambiente de la Universidad Nacional de La Pampa. La Pampa, Argentina.

- Snow, M. D. and D. T. Tingey. (1985). Evaluation of a System for the Imposition of Plant Water Stress. *Plant Physiology*. 77: 602-607.
- Stearns, S. C. (1989). Trade-Offs in Life-History Evolution. *Functional Ecology*, 13: 259-268.
- Steibel, P. E. y H. O. Troiani. (1999). El género *Prosopis* (Leguminosae) en la Provincia de La Pampa (República Argentina). *Revista Facultad Agronomía (UNLPam)*. 10: 25-48.
- Valladares, F.; Martínez-Ferri, E.; Balaguer, L.; Pérez-corona, E. y E. Manrique (2000) Low leaf-level response to light and nutrients in Mediterranean evergreen oaks: a conservative resource-use strategy? *New Phytologist* 148: 79-91
- Valladares, F., Vilagrosa, A., Peñuelas, J., Ogaya, R., Camarero, J. J., Corcuera, L., Sisó, S y E. Gil-Pelegrín Valladares. (2004). Estrés hídrico: ecofisiología y escalas de la sequía. En: Ministerio de Medio Ambiente, EGRAF S.A. (Eds.). En: *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante*. 163-190. Madrid, España.
- Valladares, F., I. Dobarro, D. Sánchez-Gómez and R.W. Percy. (2005). Photonhibition and drought in Mediterranean woody saplings: scaling effects and interactions in sun and shade phenotypes. *J. Exp. Bot.* 56:483–494.
- Valladares, F. and D. Sánchez-Gómez. (2006). Ecophysiological Traits Associated with Drought in Mediterranean Tree Seedlings: Individual Responses versus Interspecific Trends in Eleven Species. *Plant Biology*. 8: 688–697.
- Valladares, F., Gianoli, E. and J. M. Gómez. (2007). Ecological limits to plant phenotypic plasticity. *New Phytologist*. 176: 749–763.
- Vilela, A. E. and R. A. Palacios. 1997. Adaptive features in leaves of South American species of the genus *Prosopis* (Leguminosae: Mimosoideae). *Bull Int Group Study Mimosoideae*. 20: 62-70.
- Villalobos, A. E. y D.V. Peláez. (2001). Influences of temperature and water stress on germination and establishment of *Prosopis caldenia* Burkart. *Journal of Arid Environments*. 49: 321–328.
- Villagra, P.; Vilela, A.; Giordano, C. and J. Álvarez. (2010). Ecophysiology of *Prosopis* species from the arid lands of Argentina: What do we know about adaptation to stressful environments? *Desert Plants*. 3:321-340.

- Villar, R. and Merino, J. (2001). Comparison of leaf construction costs in woody species with differing leaf life-spans in contrasting ecosystem. *New Phytologist*. 151: 213–226.
- Violle C., Navas M.-L., Vile D., Kazakou E., Fortunel C., Hummel I. and E. Garnier (2007). Let the concept of plant trait be functional! *Oikos*, 116: 882-892.
- Yordanov I.; Velikova, V. and T. Tsonev. (2003). Plant responses to drought and stress tolerance. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*. 187–206.
- Yousfi, N.; Slama, I.; Ghnaya, T.; Sayoure, A. and C. Abdelly (2010). Effects of water deficit stress on growth, water relations and osmolyte accumulation in *Medicago truncatula* and *M. laciniata* populations. *Comptes Rendus Biologies*. 333: 205–213.

7. APÉNDICE



Figura 8.1.: Experimento de jardín común desarrollado en el invernadero perteneciente al Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, a los 49 días del comienzo del ensayo. Se ubican 30 dispositivos (cada uno con una plántula de cada población) correspondientes a 3 tratamientos con 10 repeticiones.

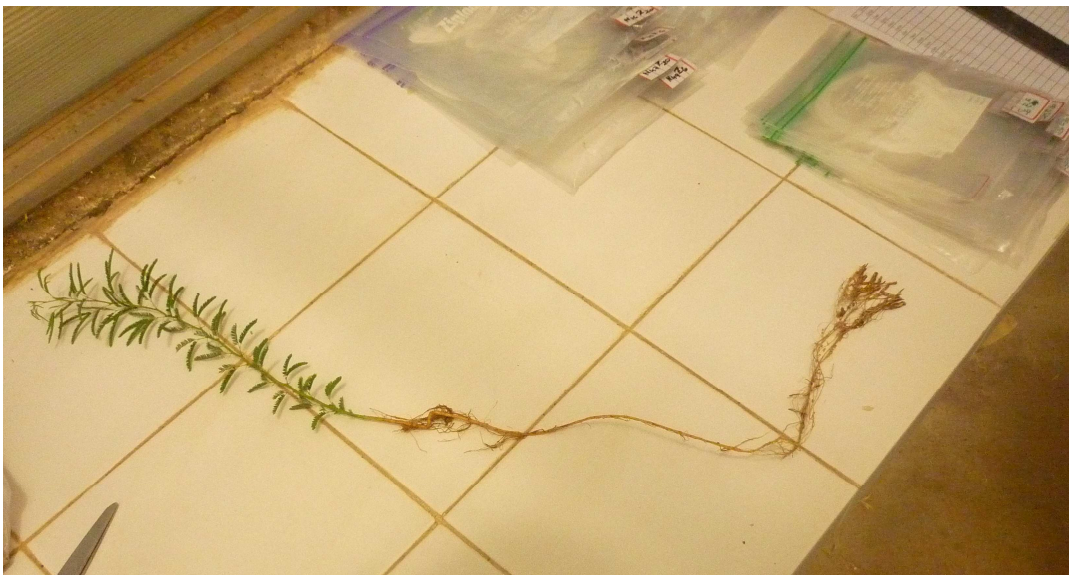


Figura 8.2.: Cosecha y medición de longitud y diámetro de tallo y raíz principal de plántulas de 49 días de edad.