



Efectos del incremento experimental a campo de agua y nutrientes sobre procesos ecológicos y fisiológicos de la vegetación de la estepa patagónica

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

Tesista: Luisina M. Carbonell Silletta

Licenciada en Ciencias Biológicas – Universidad Nacional de la Pampa – 2014

Directores:

Dra. Sandra J. Bucci

Dr. Fabián G. Scholz

Lugar de trabajo

Grupo de Estudios Biofísicos y Ecofisiológicos (GEBEF) Departamento de Biología y Ambiente, Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.

Instituto de Biociencias de la Patagonia (INBIOP, UNPSJB – CONICET)

Declaración

“Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.”

Agradecimientos

Agradezco en primer lugar a mis directores, Sandra y Fabián, quienes me abrieron las puertas del GEBEF y me orientaron y apoyaron a lo largo de todo este tiempo. Su dedicación por la ciencia y la investigación es inspiradora. Agradezco su predisposición para guiarme en todo momento, tanto en el trabajo de campo como en el de oficina. A través de esta experiencia, he llegado a admirarlos y respetarlos enormemente.

A Guillermo Goldstein por su colaboración constante, sus ideas y consejos.

A mis compañeros de laboratorio con quienes compartí estos años, Agustín, Javi, Nadia, Anto, Mari, Mariana, Dani, José, Ana. Muchas gracias por la ayuda, las charlas, el incentivo... Y especialmente a quienes me ayudaron en el trabajo de campo.

Quiero agradecer también al INTA, por brindarnos un espacio en la Estación Experimental Río Mayo para llevar a cabo el estudio, y especialmente a quienes están cada día en el campo (Omar, Luis, Pablo, Héctor, Vera, Javier) por su buena onda y por brindarnos su valiosa ayuda cada vez que necesitamos una mano...o varias.

A la Universidad Nacional de La Pampa, por permitirme formarme como Licenciada en Ciencias Biológicas. Especialmente a una profe, Pamela Lerner, por orientarme hacia la fisiología vegetal y por ayudarme a seguir mi camino en esta disciplina.

A la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco por brindarme todo lo necesario para poder llevar a cabo mi formación de doctorado.

Al FONCyT y al CONICET por el financiamiento que ha permitido llevar a cabo este estudio.

Finalmente, agradezco a mi familia por su incondicional amor, apoyo y aguante durante todo este proceso, a pesar de la distancia.

A todos, muchas gracias!

Capítulo I.....	2
Introducción general.....	2
1.1. MARCO CONCEPTUAL.....	2
1.2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	7
1.3. SITIO DE ESTUDIO	9
1.3.1. Área de estudio.....	9
1.3.2. Descripción del sistema y especies seleccionadas.....	12
1.3.3. Diseño experimental.....	16
1.4. ORGANIZACIÓN DE LA TESIS	25
Capítulo II	28
Emisión de CO ₂ desde el suelo en la estepa patagónica.....	28
2.1. INTRODUCCIÓN	28
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	30
2.2.1. Variables ambientales	30
2.2.2. Propiedades físico-químicas del suelo	30
2.2.3. Flujo de CO ₂ , temperatura y contenido de humedad del suelo	31
2.2.4. Respuestas del flujo de CO ₂ del suelo a un pulso de lluvia.....	32
2.2.5. Densidad de raíces y recuento de bacterias del suelo.....	33
2.2.6. Análisis estadístico.....	33
2.3. RESULTADOS.....	35
2.4. DISCUSIÓN	43
2.4.1. Dinámica estacional de la respiración del suelo.....	43
2.4.2. Características de los parches y variabilidad espacial del flujo de CO ₂ del suelo.....	45
2.4.3. Respuestas del flujo de CO ₂ del suelo a los pulsos de lluvia	47
2.5. CONCLUSIONES	48
Capítulo III.....	51
Efectos de la irrigación y fertilización sobre las emisiones de CO ₂ desde el suelo en la estepa patagónica	51
3.1. INTRODUCCIÓN	51
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	54
3.2.1. Propiedades químicas del suelo.....	54

3.2.2. Flujo de CO ₂ , temperatura, contenido de humedad, densidad de raíces y recuento de bacterias del suelo	55
3.2.3. Dinámica del Nitrógeno del suelo	55
3.2.4. Análisis estadístico	56
3.3. RESULTADOS	57
3.3.1. Propiedades fisicoquímicas del suelo	57
3.3.2. Densidad de raíces, densidad de bacterias heterotróficas y flujo de CO ₂ del suelo ..	59
3.3.3. Dinámica del nitrógeno del suelo	65
3.4. DISCUSIÓN	69
3.4.1. Efectos de la irrigación y fertilización sobre las propiedades fisicoquímicas del suelo	69
3.4.2. Efectos de la adición de agua y nitrógeno sobre la respiración del suelo	71
3.4.3. Dinámica del nitrógeno del suelo	73
3.5. CONCLUSIONES	74
Capítulo IV	77
Efectos del aumento experimental de las precipitaciones y de la adición de N sobre las relaciones hídricas y la arquitectura hidráulica de arbustos y pastos	77
4.1. INTRODUCCIÓN	77
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	81
4.2.1. Potencial hídrico foliar y relaciones presión-volumen	81
4.2.2. Conductancia hidráulica foliar y márgenes de seguridad	82
4.2.3. Densidad de la madera y contenido de agua	83
4.2.4. Conductividad hidráulica de tallos	84
4.2.5. Transpiración	85
4.2.6. Análisis estadístico	87
4.3. RESULTADOS	89
4.3.1. El potencial hídrico foliar y relaciones de presión-volumen	89
4.3.2. Conductancia hidráulica foliar y márgenes de seguridad	94
4.3.3. Densidad y contenido de agua de la madera	97
4.3.4. Conductividad hidráulica de tallos y valor Huber (A_L/A_S)	99
4.3.5. Transpiración	104
4.4. DISCUSIÓN	105
4.4.1. Efectos del aumento de las precipitaciones y de la disponibilidad de N sobre el estado hídrico	106
4.4.2. Plasticidad de la arquitectura hidráulica a la adición de agua y nutrientes	109

4.5. CONCLUSIONES	112
Capítulo V	114
Efectos de la irrigación y de la fertilización sobre las tasas fotosintéticas y la eficiencia en el uso de recursos de arbustos y pastos.....	114
5.1. INTRODUCCIÓN	114
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS	117
5.2.1. Área foliar, área foliar específica y clorofila.....	117
5.2.2. Intercambio de gases y eficiencia de uso de agua instantánea	118
5.2.3. Eficiencia en el uso de agua integrada (EUA _{int}) y eficiencia fotosintética de uso de Nitrógeno.....	118
5.2.4. Análisis estadístico.....	119
5.3. RESULTADOS.....	120
5.3. DISCUSIÓN	133
5.3.1. Nitrógeno foliar e intercambio de gases.....	133
5.3.2. Eficiencia de uso de agua y del Nitrógeno	136
5.4. CONCLUSIONES	139
Capítulo VI.....	142
Efectos de la irrigación y de la fertilización sobre la resistencia a bajas temperaturas de arbustos y pastos.....	142
6.1. INTRODUCCIÓN	142
6.2. MATERIALES Y MÉTODOS	144
6.2.1. Contenido relativo de agua.....	144
6.2.2. Análisis térmico.....	145
6.2.3. Daño celular	146
6.2.4. Análisis estadístico.....	147
6.3. RESULTADOS.....	148
6.3.1. Contenido relativo de agua.....	149
6.3.2. Análisis térmico.....	150
6.3.3. Daño celular	151
6.4. DISCUSIÓN	155
6.5. CONCLUSIONES	158
Capítulo VII	160
Efecto de la irrigación y de la fertilización sobre el crecimiento aéreo y subterráneo de arbustos y pastos.....	160
7.1. INTRODUCCIÓN	160

7.2. MATERIALES Y MÉTODOS	162
7.2.1. Crecimiento aéreo y PPNA	162
7.2.2. Crecimiento subterráneo.....	164
7.2.3. Cobertura vegetal e índices de biodiversidad.....	166
7.2.4. Análisis estadístico.....	167
7.3. RESULTADOS.....	168
7.3.1. Crecimiento aéreo y PPNA	168
7.3.2. Crecimiento subterráneo.....	172
7.3.3. Cobertura vegetal e índices de biodiversidad.....	173
7.4. DISCUSIÓN	176
7.4.1. Efectos de los tratamientos sobre el crecimiento y la PPNA	176
7.4.2. Efectos de los tratamientos sobre la biomasa subterránea.....	179
7.4.3. Efectos sobre la biodiversidad.....	181
7.5. CONCLUSIONES	182
Capítulo VIII.....	185
Discusión general	185
8.1. MOTIVACIÓN	185
8.2. RESULTADOS PRINCIPALES.....	186
8.3. PERSPECTIVAS FUTURAS	192
Referencias bibliográficas	194

Tabla 1.1. Materia Orgánica (MO, %), Nitrógeno total (N, %), Fósforo (P, mg kg ⁻¹), Calcio (Ca ⁺² , mg kg ⁻¹), Magnesio (Mg ⁺² , mg kg ⁻¹), Potasio (K ⁺¹ , mg kg ⁻¹) y Sodio (Na ⁺¹ , mg kg ⁻¹) del suelo a 5, 10, 20 y 40 cm de profundidad en una estepa patagónica en 2012 (condiciones iniciales del experimento). Cada valor representa la media + EE (n = 5).	11
Tabla 1.2. Formas de vida, fenología foliar, altura de las plantas (cm) y profundidad máxima de los sistemas radicales (cm) de los especies estudiadas en la estepa patagónica. Los valores representan la media ± EE (n = 15). La profundidad de los sistemas radicales fue extraída de Bucci et al. (2011).	14
Tabla 1.3. pH, conductividad eléctrica (CE, dS m ⁻¹), materia orgánica (MO, %), Nitrógeno total (N, %), Fósforo disponible (P, ppm), amonio (mg Kg ⁻¹) y nitrato (mg Kg ⁻¹) en los primeros ~5 cm del suelo en una estepa Patagónica, en parches de suelo desnudo y en parches con vegetación en cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F). Cada valor representa la media + IC (n = 3). Los datos corresponden a muestras colectadas en noviembre de 2015, luego de dos años del inicio de los tratamientos. Para mayor detalle sobre la metodología de muestro y los análisis estadísticos aplicados ver Capítulo VII.	21
Tabla 2.1. pH, conductividad eléctrica (dS m ⁻¹), materia orgánica (%), Nitrógeno total (%), Fósforo disponible (ppm), densidad de raíces media anual (mg cm ⁻³), flujo de CO ₂ medio anual (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹) y bacterias heterótrofas totales (UFC x 10 ⁵ g ⁻¹ suelo) del suelo en parches de suelo desnudo y con vegetación. Cada valor representa la media + IC (n = 3). Se muestran el valor estadístico F, los grados de libertad (Df) y el valor de probabilidad <i>p</i>	36
Tabla 3.1. pH, conductividad eléctrica (dS m ⁻¹), materia orgánica (%), nitrógeno total (%), Relación C/N, fósforo disponible (ppm), densidad de raíces media anual (mg cm ⁻³), flujo de CO ₂ medio anual (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹) y bacterias heterótrofas totales (UFC x 10 ⁵ g ⁻¹ suelo) del suelo en parches de suelo desnudo y con vegetación. Cada valor representa la media + IC (n = 3). Se muestran el valor estadístico F, los grados de libertad (Df) y el valor de probabilidad <i>p</i> , para tipo de parche (P) y tratamiento (T).	60
Tabla 4.1. Resultados de los test-F para potencial hídrico foliar para cada especie. Se muestran el valor estadístico F, los grados de libertad (df) y el valor de probabilidad <i>p</i> , para tratamiento (T), momento del día (M) y estación del año (E).	91
Tabla 4.2. P ₅₀ (-MPa) y sus intervalos de confianza estimados a partir del método Bootstrap (2,5 y 97,5%), para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) y especie: <i>A. prolifera</i> , <i>A. volckmannii</i> , <i>B. microphylla</i> y <i>S. filaginoides</i> en una estepa patagónica. Los valores en negrita indican que son significativamente diferentes del control.	96
Tabla 4.3. Potencial hídrico foliar de mediodía promedio durante la primavera (Ψ _{f mín}), potencial hídrico foliar en que se pierde el 50% de la conductancia hidráulica foliar (P ₅₀), potencial hídrico foliar en que se pierde el 88% de la conductancia hidráulica foliar (P ₈₈) y márgenes de seguridad hidráulico (diferencia entre Ψ _{f mín} y P ₅₀ , y entre Ψ _{f mín} y P ₈₈), para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e	

irrigación-fertilización (I+F) y especie: <i>A. prolifera</i> , <i>A. volckmannii</i> , <i>B. microphylla</i> y <i>S. filaginoides</i> en una estepa patagónica. Los valores en negrita indican los márgenes de seguridad positivos.	97
Tabla 4.4. Resultados de los test-F de la conductividad hidráulica específica (K_s) para cada especie. Se muestran el valor estadístico F, los grados de libertad (df) y el valor de probabilidad p , para tratamiento (T), momento del día (M) y estación del año (E).	100
Tabla 4.5. Resultados de los test-F de la conductividad hidráulica foliar específica (K_i) para cada especie. Se muestran el valor estadístico F, los grados de libertad (df) y el valor de probabilidad p , para tratamiento (T), momento del día (M) y estación del año (E).	102
Tabla 5.1. Resultados de los test-F del contenido de clorofilas a y b en las hojas de cada especie. Se muestran el valor estadístico F, los grados de libertad (df) y el valor de probabilidad p , para tratamiento (T) y estación del año (E).	122
Tabla 5.2. Resultados de los test-F de la tasa fotosintética (A), la conductancia estomática (g_s) y la transpiración (E) por unida de área para cada especie. Se muestran el valor estadístico F, los grados de libertad (df) y el valor de probabilidad p , para tratamiento (T) y estación del año (E).	124
Tabla 5.3. Resultados de los test-F de la eficiencia en el uso del agua intrínseca (EUA_i) para cada especie. Se muestran el valor estadístico F, los grados de libertad (df) y el valor de probabilidad p , para tratamiento (T) y estación del año (E).	126
Tabla 7.1. Resultados de los test-F para el efecto del tratamiento sobre la cobertura vegetal en 2018 para cada tipo de cobertura. Se muestran el valor estadístico F, los grados de libertad (df) y el valor de probabilidad p	174
Tabla 7.2. Índices de biodiversidad: índice de Margalef (D_{Mg}), índice de Simpson (D_{Si}), índice de Shannon-Wiener (H) e índice de Pielou (J'), para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F), en una estepa patagónica. Cada valor representa la media + IC ($n = 5$). Se muestran los resultados de los test estadísticos para el efecto del tratamiento sobre cada índice de biodiversidad. Se muestra el valor estadístico F, los grados de libertad entre paréntesis y el valor de probabilidad p	176

Índice de figuras

Figura 1.1. A-B) Mapa con la ubicación de la Campo Experimental Rio Mayo (CERM) perteneciente al INTA, Chubut. C) Ubicación de la clausura delimitada para la realización de la tesis.	10
Figura 1.2. Temperatura mensual mínima, media y máxima del aire y lluvias mensuales históricas (1982-2018) en el Campo Experimental Rio Mayo (INTA). (Fuente: http://sipas.inta.gob.ar/).	11
Figura 1.3. Imágenes de las especies dominantes de la estepa patagónica estudiada. Se muestran las especies arbustivas <i>Azorella prolifera</i> , <i>Adesmia volckmannii</i> , <i>Berberis microphylla</i> y <i>Senecio filaginoides</i> , y las especies de gramíneas <i>Poa ligularis</i> , <i>Pappostipa speciosa</i> y <i>Pappostipa humilis</i> (solo presente en las parcelas fertilizadas).	13
Figura 1.4. Imagen del sistema radical de <i>Berberis microphylla</i> en el sitio de estudio.	14
Figura 1.5. Imagen del sistema radical de <i>Adesmia volckmannii</i> en el sitio de estudio.	15
Figura 1.6. Imagen del sistema radical de <i>Azorella prolifera</i> en el sitio de estudio.	15
Figura 1.7. Imagen del sistema radical de <i>Senecio filaginoides</i> en el sitio de estudio.	16
Figura 1.8. Imagen del sistema radical de <i>Poa ligularis</i> en el sitio de estudio.	16
Figura 1.9. Esquema del experimento instalado en el campo.	18
Figura 1.10. Imagen de una parcela fertilizada en el sitio de estudio en octubre de 2017.	19
Figura 1.11. Imagen de una parcela irrigada y fertilizada en el sitio de estudio en octubre de 2017.	19
Figura 1.12. Imagen del sitio de estudio con los aspersores del sistema de irrigación durante un evento de riego en marzo de 2016.	20
Figura 1.13. Detalle de uno de los aspersores del sistema de irrigación.	20
Figura 1.14. Imagen de una de las excavaciones realizadas en el sitio de estudio con los sensores ECHO que se instalaron a 10, 40, 100 y 200 cm de profundidad en 2013 para determinación del contenido volumétrico de agua del suelo.	22
Figura 1.15. Contenido volumétrico de agua del suelo (%) a (A) 10 cm, (B) 40 cm, (C) 100 cm y (D) 200 cm de profundidad de 01/01/2015 a 10/05/2019, para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F), en una estepa patagónica. Las líneas representan la media diaria de cada tratamiento (n= 5). En (A) se indican también las precipitaciones diarias (barras negras), obtenidas de una estación meteorológica localizada a 2 km. del sitio del estudio (Fuente: http://sipas.inta.gob.ar/).	24
Figura 1.16. Contenido volumétrico de agua del suelo (%) a (A) 10 cm y (B) 40 cm de profundidad de 01/01/2015 a 10/05/2019, para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F), en una estepa patagónica. Cada línea corresponde a los valores diarios de una parcela en particular.	25
Figura 2.1. Sistema de intercambio de gases (LI-6400, LI-COR) conectado a una cámara cerrada portátil para la determinación de la respiración del suelo (6400-09, LI-COR).	32
Figura 2.2. (A) Precipitaciones mensuales (mm) y (B) temperatura del aire media mensual (°C) durante el período de estudio (junio de 2015 a mayo de 2016) en una estepa patagónica. Los datos fueron	

obtenidos de una estación meteorológica localizada a 600 m. del sitio del estudio (Fuente: http://sipas.inta.gob.ar/).	35
Figura 2.3. (A) Dinámica temporal del contenido volumétrico de agua del suelo a 0-10 cm de profundidad (%), (B) temperatura del suelo a 0-10 cm de profundidad (° C) y (C) densidad de raíces a 0-10 cm de profundidad (mg de masa seca cm ⁻³) en parches de suelo desnudo (símbolos blancos) y en parches con vegetación (símbolos negros) durante el período de estudio (junio de 2015 a mayo de 2016) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media ± IC (n = 3).	38
Figura 2.4. Dinámica temporal del flujo de CO ₂ del suelo (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹) en parches de suelo desnudo (símbolos blancos) y en parches con vegetación (símbolos negros) durante el período de estudio (junio de 2015 a mayo de 2016) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media ± IC (n = 3).	39
Figura 2.5. (A) Contenido volumétrico de agua en el suelo a 0-10 cm de profundidad (%) antes, al día siguiente y tres días después de un evento de lluvia discreto (3,5 mm) durante el verano. (B) Liberación de CO ₂ desde el suelo (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹) de parches de suelo desnudo y parches con vegetación antes, al día siguiente y tres días después de la lluvia. Los símbolos representan la media ± IC (n = 3).	41
Figura 2.6. Diagramas de contorno de flujo de CO ₂ del suelo (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹) en relación con el contenido volumétrico de agua del suelo a 0-10 cm de profundidad (%) y la temperatura del suelo a 0-10 cm de profundidad (°C) desde (A) parches de suelo desnudo y (B) parches con vegetación.	42
Figura 2.7. Relación entre el flujo de CO ₂ del suelo (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹) y la densidad de raíces (mg cm ⁻³). Cada punto representa una muestra durante el período de estudio (junio de 2015 a mayo de 2016). La línea continua es la regresión lineal ajustada a todos los datos y la banda gris es el intervalo de confianza del 95%.	43
Figura 3.1. Dinámica temporal en el contenido volumétrico de agua del suelo a 0-10 cm de profundidad (%) para cada tratamiento (A): control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F), y para cada tipo de parche (B): parche de suelo desnudo y parche con vegetación, durante el periodo de estudio (junio 2015 a mayo 2016) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media ±IC (n= 3).	58
Figura 3.2. Dinámica temporal en la densidad de raíces a 0-10 cm de profundidad (mg de masa seca cm ⁻³) para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) and irrigación-fertilización (I+F) en: (A) parches de suelo desnudo y (B) parches con vegetación, durante el periodo de estudio (junio 2015 a mayo 2016) en la estepa patagónica. Los símbolos representan la media ±IC (n= 3).	61
Figura 3.3. Dinámica temporal en el flujo de CO ₂ (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹) para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en: (A) parches de suelo desnudo y (B) parches con vegetación, durante el periodo de estudio (junio 2015 a mayo 2016) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media ±CI (n= 3).	62
Figura 3.4. Diagramas de contorno de flujo de CO ₂ del suelo (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹) en relación con el contenido de agua del suelo a 0-10 cm de profundidad (%) y la temperatura del suelo a 0-10 cm de profundidad (°C) desde (A) parches de suelo desnudo y (B) parches con vegetación.	63

Figura 3.5. Diagramas de contorno de flujo de CO ₂ del suelo (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹) en relación con el contenido de agua del suelo a 0-10 cm de profundidad (%) y la temperatura del suelo a 0-10 cm de profundidad (°C) desde: (A) tratamiento C, (B) tratamiento F, (C) tratamiento I y (D) tratamiento I+F...	64
Figura 3.6. Relación entre el flujo de CO ₂ del suelo (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹) y la densidad de raíces (mg cm ⁻³). Cada punto representa una medida durante el período de estudio (junio de 2015 a mayo de 2016), en parches de suelo desnudo (cuadrados) y en parches con vegetación (triángulos). Las líneas son las regresiones lineales ajustadas a los datos (continua para parches con vegetación y partida para parches de suelo desnudo) y las bandas grises son los intervalos de confianza del 95%. La ecuación de la recta ajustada a los parches con vegetación es: $y=0,252+0,026x$. La ecuación de la recta ajustada a los parches de suelo desnudo es: $y=0,197+0,026x$	65
Figura 3.7. Contenido de N en forma de amonio (mg NH ₄ ⁺ -N Kg ⁻¹) y de nitrato del suelo (mg NO ₃ ⁻ -N Kg ⁻¹) en noviembre, febrero y mayo, para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F), en parches de suelo desnudo (A-C) y en parches con vegetación (B-D). Los valores son las medias ±IC (n= 3).	66
Figura 3.8. Relación amonio (NH ₄ ⁺ -N) / nitrato (NO ₃ ⁻ -N) para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F). Los valores son las medias ±IC (n= 3).	67
Figura 3.9. (A) Tasa de amonificación (mg N Kg ⁻¹ m ⁻¹) y (B) tasa de nitrificación (mg N Kg ⁻¹ m ⁻¹) para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) durante primavera, verano y otoño en una estepa patagónica. Los valores son las medias ±IC (n= 3).....	68
Figura 3.10. (A) Relación entre la tasa de amonificación mensual (mg N kg ⁻¹ m ⁻¹) y el contenido de N en forma de amonio inicial (mg NH ₄ ⁺ -N kg ⁻¹), y (B) relación entre la tasa de nitrificación mensual (mg N kg ⁻¹ m ⁻¹) y el contenido de N en forma de nitrato inicial (mg NO ₃ ⁻ -N kg ⁻¹). Cada valor representa la media ±EE (n= 3) para cada tratamiento, estación del año y tipo de parche. Las líneas son las regresiones lineales ajustadas a los datos y las bandas grises son los intervalos de confianza del 95%.....	69
Figura 4.1. Sistema para medir conductividad hidráulica de tallos.	85
Figura 4.2. <i>Open top chamber</i> utilizada para medir la transpiración de las plantas.	87
Figura 4.3. Potencial hídrico foliar (ψ _f) máximo y mínimo durante primavera y verano, para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media -IC (n= 3).	90
Figura 4.4. (A) Potencial hídrico en el punto de pérdida de turgencia (TLP; MPa), (B) potencial osmótico a máxima saturación (π ¹⁰⁰ ; MPa), (C) contenido simplástico de solutos (mOsmol g ⁻¹), (D) contenido relativo de agua en el punto de pérdida de turgencia (%), (E) módulo de elasticidad foliar (MPa) y (F) capacitancia foliar (mol m ⁻² MPa ⁻¹), para cada especie y tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en primavera en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media ±IC (n= 3-7).....	93
Figura 4.5. Potencial hídrico foliar mínimo en primavera (MPa) en función del punto de pérdida de turgencia (MPa) estimado a partir de las curvas P-V realizadas en primavera, para cada especie y tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media ±IC (n= 3-7). La línea punteada indica la relación 1:1....	94

Figura 4.6. Porcentaje de pérdida de la conductancia hidráulica foliar (%) en función del potencial hídrico foliar (-MPa) para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) y especie: (A) <i>A. prolifera</i> , (B) <i>A. volckmannii</i> , (C) <i>B. microphylla</i> y (D) <i>S. filaginoides</i> en una estepa patagónica. Las líneas son las funciones Weibull ajustadas a los datos. Las líneas verticales indican el valor del P_{50} para cada tratamiento.	95
Figura 4.7. (A) Densidad de la madera (g cm^{-3}) y (B) contenido saturado de agua de la madera ($\% \text{ g}^{-1}$) para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en cuatro especies arbustivas de una estepa patagónica. Los símbolos representan la media +IC (n= 15-30).....	98
Figura 4.8. Conductividad hidráulica específica de tallos ($\text{Kg m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$) a la mañana y mediodía durante primavera y verano, para cada especie y tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media +IC (n= 3).	101
Figura 4.9. Conductividad hidráulica foliar específica de tallos ($10^{-4} \text{ Kg m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$) a la mañana y mediodía durante primavera y verano, para cada especie y tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media +IC (n= 3).....	103
Figura 4.10. Valor Huber para cada especie y tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en (A) primavera y (B) verano en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media +IC (n= 3).....	104
Figura 4.11. Transpiración ($\text{g H}_2\text{O d}^{-1} \text{ pl}^{-1}$) durante el verano para cada especie y tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media +IC (n= 3).....	105
Figura 5.1. (A) Área foliar (cm^2) y (B) área foliar específica ($\text{cm}^2 \text{ g}^{-1}$) para cada especie y tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media \pm IC (n= 9-15).	121
Figura 5.2. Contenido de clorofila a + b (mg g^{-1}) en (A) primavera y (B) verano, para cada especie y tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media \pm IC (n= 5-9).	122
Figura 5.3. (A-B) Tasa de fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en primavera y verano, (C-D) conductancia estomática ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en primavera y verano, y (E-F) tasa de respiración ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en primavera y verano, para cada especie y tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media \pm IC (n= 3-9).	125
Figura 5.4. Eficiencia en el uso de agua instantánea (EUA_{ins} ; $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol H}_2\text{O}^{-1}$) en primavera (A) y verano (B), para cada especie y tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media \pm IC (n= 3-9).	127
Figura 5.5. Disminución en la tasa de fotosíntesis de primavera a verano (%) para cada especie y tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica.....	128

Figura 5.6. (A) $\delta^{13}\text{C}$ (‰), (B) contenido de C (%), (C) contenido de N (%) y (D) relación C:N, para cada especie y tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media \pm IC (n= 3).....	130
Figura 5.7. Eficiencia en el uso de agua integrada en el tiempo (EUA_{int} ; $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol H}_2\text{O}^{-1}$) para cada especie y tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media \pm IC (n= 3).	131
Figura 5.8. Relación entre la eficiencia de uso de agua instantánea (EUA_{ins}) y la eficiencia de uso de agua integrada (EUA_{int}). Cada punto es la media de cada tratamiento y especie \pm IC. La línea continua es la función lineal ajustada a todos los datos. La banda gris es el intervalo de confianza del 95%. La línea punteada es la relación 1:1.	132
Figura 5.9. Eficiencia en el uso de nitrógeno ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol N}^{-1}$) para cada especie y tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica.	133
Figura 6.1. Temperatura diaria mínima del aire (desde 01/01/2015 a 31/08/2019) en la Estación Experimental Río Mayo, INTA. (Fuente: http://sipas.inta.gob.ar/). El gráfico inserto muestra las temperaturas mínimas mensuales del suelo a 10 cm de profundidad para una parcela control (C), una parcela de irrigación (I) y una de irrigación-fertilización (I+F) durante el año 2016, obtenidas de psicrómetros instalados en el suelo.	148
Figura 6.2. Contenido relativo de agua (CRA; %) de (A) hojas, (B) tallos y (C) raíces, para cada especie y tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media \pm IC (n= 5-10).	150
Figura 6.3. Temperatura de nucleación de hielo (INT; °C) en (A) hojas, (B) tallos y (C) raíces, para cada especie y tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media \pm IC (n= 9-15).	151
Figura 6.4. Pérdida de electrolitos (%) en hojas de (A) <i>Berberis microphylla</i> , (B) <i>Poa ligularis</i> , (C) <i>Pappostipa speciosa</i> y (D) <i>Senecio filaginoides</i> , en tallos de (E) <i>Azorella prolifera</i> , (F) <i>A. volckmannii</i> , (G) <i>B. microphylla</i> y (H) <i>S. filaginoides</i> , y en raíces de (I) <i>P. ligularis</i> y (J) <i>P. speciosa</i> , para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media \pm IC (n= 3-11).	154
Figura 7.1. Foto del cuadrante de 50 x 50 cm utilizado para estimar la PPNA de pastos de la estepa patagónica.....	164
Figura 7.2. Foto de la trampa para raíces colocada en el suelo cerca de pastos y arbustos en la estepa patagónica.....	165
Figura 7.3. (A) Altura (cm) y (B) perímetro basal de pastos (<i>Pappostipa humilis</i> , <i>Poa ligularis</i> y <i>Pappostipa speciosa</i>) en diciembre 2018 para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Las barras representan la media \pm IC (n= 15).	170
Figura 7.4. Cambio en la biomasa anual (%) en tres períodos tiempo (2015-2016, 2016-2017 y 2017-2018) de tres especies de arbustos (<i>Azorella prolifera</i> , <i>Adesmia volckmannii</i> y <i>Senecio filaginoides</i>) para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Las barras representan la media \pm IC (n= 15).	171

Figura 7.5. Plantas muertas (%) en tres períodos tiempo (2015-2016, 2016-2017 y 2017-2018) de tres especies de arbustos (<i>Azorella prolifera</i> , <i>Adesmia volckmannii</i> y <i>Senecio filaginoides</i>) para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Las barras representan la media \pm IC.	171
Figura 7.6. Productividad primaria neta aérea ($\text{g m}^{-2} \text{año}^{-1}$) en (A) 2013 y (B) 2017, para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media \pm IC (n= 5-9).	172
Figura 7.7. Biomasa de raíces (g m^{-2}) en trampas de raíces entre agosto 2015 y agosto 2016 para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Las trampas de raíces fueron colocadas en el suelo en mayo 2015. Los símbolos representan la media \pm IC (n= 5).	173
Figura 7.8. Cobertura vegetal (%) en 2018 para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. La línea punteada separa a la izquierda la cobertura total, de arbustos, de pastos, de muerto en pie y de suelo desnudo, y a la derecha la cobertura detallada por especie. Los símbolos representan la media \pm IC (n= 5).	175

La temperatura media del aire y los regímenes de precipitación seguirán cambiando de acuerdo a los escenarios de cambio climático y las deposiciones de Nitrógeno atmosférico continuarán incrementando globalmente. Los ecosistemas áridos como las estepas están fuertemente limitados por la disponibilidad de agua y de nutrientes. Particularmente las estepas patagónicas, además, presentan limitaciones dadas por la asincronía entre la disponibilidad de agua y las temperaturas favorables para el crecimiento y por las altas intensidades y frecuencias de viento. A esto se le suman signos graves de deterioro ambiental como consecuencia del sobrepastoreo y la actividad petrolera y minera. Dado que los pastizales son en general la base de la actividad económica de la Región Patagónica a través de su uso para pastoreo esencialmente ovino, es importante conocer cómo las modificaciones en las entradas de agua y de Nitrógeno podrían afectar a este ecosistema. El objetivo principal de esta tesis fue evaluar las respuestas ecofisiológicas de pastos y arbustos y de procesos ecológicos que ocurren en el suelo en una estepa patagónica arbustiva-graminosa ante un aumento en las entradas de agua por precipitación y de Nitrógeno al suelo. Se utilizó un abordaje experimental a través de ensayos a campo bajo condiciones controladas de disponibilidad de agua y nutrientes, a gran escala y largo plazo en el SO de Chubut, iniciado en 2013 y que continúa en la actualidad. La adición de N ($100 \text{ kg ha}^{-1} \text{ año}$) estimuló las pérdidas de C desde el suelo por respiración, mientras que un incremento entre el 20-25% en la precipitación media anual solo produjo pulsos de emisión de CO_2 a corto plazo. La fertilización provocó una fuerte inmovilización del N en el suelo. En general, el incremento en las precipitaciones y en la disponibilidad de N incrementó el consumo de agua por planta pero sin afectar su estado hídrico. A nivel de las hojas hubo un incremento de la resistencia a la pérdida de la capacidad de transportar agua tanto con la fertilización como con la irrigación. La fertilización con o sin adición de agua, aunque no la irrigación por sí sola, incrementaron el estado nutricional de las hojas de pastos y arbustos aumentando el contenido de N, pero no necesariamente el contenido de clorofilas y la fotosíntesis. Sin embargo, la irrigación estimuló la tasa de fotosíntesis debido al aumento en la difusión estomática de CO_2 . La fertilización redujo la resistencia a las bajas temperaturas de los pastos, sin embargo manteniendo aún grandes márgenes de seguridad en su tolerancia al congelamiento. Aunque la fertilización no modificó la tasa de fotosíntesis de los pastos, aumentó la productividad primaria área

pero con un recambio de especies que consistió en una disminución de la especie con alta palatabilidad, *Poa ligularis* y en un aumento de *Pappostipa humilis*, menos palatable. Los arbustos incrementaron su crecimiento aéreo solo en el año excepcionalmente húmedo debido a un evento extremo natural de precipitación y la adición de nutrientes potenció este efecto, pero a su vez la fertilización aumentó la mortalidad de los arbustos.

Palabras clave: crecimiento - eficiencia hidráulica - fertilización - fotosíntesis irrigación - mineralización - potencial hídrico - respiración edáfica - tolerancia a bajas temperaturas - transpiración.

Mean air temperature and precipitation regime will increase according to climatic changes sceneries as well as atmospheric Nitrogen deposition. Arid ecosystems, like steppes, are strongly limited by water availability and nutrient. Also and particularly patagonian steppes, are controlled by the asynchrony between water availability and favorable temperatures to plant growth and by strong and frequently winds around the year. In addition, patagonian steppes exhibit signals of degradation as consequence of overgrazing by sheep and oil activity. Domestic grazing is the most ubiquitous land use practice and constitutes one of the most important economic activities in the Patagonia Region. Thus it is crucial to know how changes in precipitation and N availability could affect the ecosystem functioning. The main objective of this thesis was to evaluate grasses and shrubs ecophysiological responses and soil ecological processes under increases in precipitation and soil N in a patagonian steppe. A large and long-term field manipulative experiment under water and N controlled conditions was carried out in a shrubby-grass steppe in the SO of Chubut since 2013 to present. Nitrogen addition ($100 \text{ kg ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$) stimulated soil C loss through respiration while an increment of 20 to 25% in mean annual precipitation only led to strong and short term soil CO_2 efflux immediately after water pulses. Fertilization produced soil N-immobilization. In general, irrigation and N fertilization increased plant water use but plant water status was not affected. However, leaves increased the resistance to loss of water transport capacity under N and water addition. Nitrogen addition increased leaf N in grasses and shrubs although only in some species chlorophyll content and photosynthesis increased. On the other hand, irrigation increased photosynthetic rate due to higher stomatal conductance. Grasses exposed to higher soil N were more vulnerable to freezing temperature although they maintained large safety margins. Higher grass aboveground net primary productivity was observed under N addition but there was a change in species composition such that *Poa ligularis*, a palatable species, was partially replaced by *Pappostipa humilis*, a less palatable species. Shrubs only exhibited higher growth during a year exceptionally wet and N addition maximized the effect of higher water availability. Fertilization without water addition increased mortality of shrubs.

Keywords: fertilization – freezing tolerance - growth – hydraulic efficiency – irrigation - mineralization –photosynthesis– soil respiration– transpiration - water potential

Capítulo I

Introducción general

1.1. MARCO CONCEPTUAL

Aproximadamente 1/3 de la superficie terrestre global está ocupada por ecosistemas áridos y semiáridos (Verstraete & Schwartz 1991), y 2/3 de la superficie de Argentina, entre la que se encuentra la Región Patagónica, es árida o semiárida. Dentro de la Patagonia, las estepas de arbustos y pastos con 750000 km² de superficie ocupan la mayor extensión, pero más de un 80% de la misma presenta signos graves de deterioro ambiental, en parte como consecuencia del sobrepastoreo por ovejas que ha ocurrido desde fines del siglo XIX (Aguiar & Sala 1998; Soriano & Sala 1983). En los últimos años la desertificación ha aumentado significativamente en todas las regiones áridas y semiáridas de Argentina, especialmente en la Región Patagónica (SAyDS 2002). A los problemas ambientales relacionados con el uso no sustentable de sus recursos naturales renovables y a las consecuencias de la intensiva explotación petrolera y minera, se suman las limitaciones relacionadas con las escasas precipitaciones y su alta variabilidad temporal, la asincronía entre la disponibilidad de agua y las temperaturas favorables para el crecimiento, la baja disponibilidad de nutrientes y las altas intensidades y frecuencias de viento. Del mismo modo, la aridez debido a la baja disponibilidad de agua en la porción superior del suelo y al limitado uso que las plantas hacen del agua en profundidad, está acentuada por la elevada demanda de agua de la atmósfera durante el verano. Si bien la productividad primaria neta de pastos y arbustos de la estepa patagónica es consistente con las precipitaciones medias anuales, la baja productividad de la vegetación no estaría relacionada con la escasez de agua ya que habría suficiente agua aparentemente disponible a los 2 o 3 metros de profundidad (Bucci et al. 2009, 2011; Pereyra et al. 2017; Schulze et al. 1996).

Las precipitaciones de primavera y verano se manifiestan a través de discretos e impredecibles eventos y permiten humedecer solo la parte superior del suelo (Paruelo & Sala 1995; Sala et al. 1989). Esta aleatoriedad en las entradas de agua al ecosistema podría conducir a la utilización de complejas y diferentes estrategias de uso de agua por parte de las distintas especies de plantas. Las herbáceas (gramíneas y dicotiledóneas) y

arbustos son los grupos de plantas dominantes de las estepas del Distrito Occidental *sensu* Soriano (1956) de la Provincia Patagónica. Gramíneas y arbustos presentan características bien distintivas en cuanto a fenología, arquitectura y distribución de los sistemas radicales y consecuentemente en los patrones de utilización del agua (Paruelo & Sala 1995; Pereyra et al. 2017; Soriano & Sala 1983). Mientras que las gramíneas poseen sistemas radicales superficiales y presentan hojas activas durante todo el año, los arbustos son siempreverdes o caducifolios y tienen raíces más profundas (Bertiller, Beeskow, & Coronato 1991; Bucci et al. 2009; Fernandez & Paruelo 1988; Sala et al. 1989; Soriano, Golluscio, & Satorre 1987). Usando un modelo de dinámica de agua en el suelo para la estepa patagónica (DINAQUA), Paruelo & Sala (1995) mostraron que la precipitación de primavera y verano tiene gran influencia sobre la transpiración anual de los pastos, mientras que la precipitación de otoño-invierno afectaría la transpiración de los arbustos. Aunque algunas especies de arbustos tienen acceso a fuentes de agua permanentes (2 o 3 metros de profundidad; Bucci et al. 2009; Pereyra et al. 2017; Schulze et al. 1996), éstas aparentemente no utilizan eficientemente este recurso (Schulze et al. 1996). Probablemente el “no uso” del agua disponible en profundidad esté relacionado a que el sistema de transporte de agua de los arbustos es poco eficiente (Bucci et al. 2009) o porque otros factores exógenos dificultan el movimiento de agua entre el suelo y las hojas.

Además de este “cuello de botella” de la economía de agua de las plantas de la estepa patagónica, debe ser considerada la posibilidad de que el crecimiento en los ecosistemas patagónicos esté limitado por el asincronismo que existe entre la disponibilidad de los recursos hídricos y nutricionales (Austin et al. 2004; Lauenroth et al. 1978; Yahdjian, Gherardi, & Sala 2011; Yahdjian, Gherardi, & Sala 2014). Aunque el agua es considerada el recurso limitante que determina la estructura de las comunidades en los ecosistemas áridos, la disponibilidad de nutrientes puede también ejercer un fuerte y codominante rol (Hall et al. 2011; Hooper & Johnson 1999; LeBauer & Treseder 2008), dado que en muchos casos los nutrientes y el agua están fuertemente interrelacionados; cuando aumenta la disponibilidad de agua en general incrementa la limitación por N (Epstein et al. 2006). Mientras que la disponibilidad de nutrientes puede limitar las respuestas de la vegetación a la precipitación y humedad del suelo, el agua en el suelo afecta a la fijación de N por la actividad de los microorganismos y la mineralización de la materia orgánica (Bertiller et al. 2006; Burke, Lauenroth, & Parton

1997; Mazzarino et al. 1998). El N es uno de los elementos más deficientes en ecosistemas áridos, que limita la producción primaria (Yahdjian, Gherardi, & Sala 2011), y además tiene un patrón de distribución espacial y temporal altamente heterogéneo (Schlesinger et al. 1996). En la estepa patagónica en los años secos la demanda por parte de las plantas es menor y se produce una acumulación de nutrientes inorgánicos, como el N, en el suelo (Austin et al. 2004), el cual en esta forma es mucho más vulnerable al lavado y volatilización. Cuando la disponibilidad de agua aumenta, la productividad podría estar restringida por el desequilibrio entre la demanda y oferta de nutrientes debido a las pérdidas de N producidas en los años secos. Experimentos de adición de nutrientes (N y P) en el norte de la Patagonia han indicado un incremento en la biomasa aérea, en particular de pastos perennes, sin cambios sobre la biomasa de raíces, la actividad de microorganismos y la cantidad de materia orgánica del suelo (Kowaljow et al. 2010). Por otro lado, experimentos realizados en la misma área de estudio donde se desarrolló esta tesis indicaron que los pastos responden más efectivamente a la adición de N que los arbustos, como consecuencia de sus diferentes estrategias para absorber y retraslocar el N (Yahdjian, Gherardi, & Sala 2014). Mientras que los pastos están adaptados para incorporar N inorgánico principalmente como amonio y tienen mayor eficiencia de reabsorción del N foliar, los arbustos incorporan preferencialmente nitrato y tienen menor eficiencia de reabsorción del N (Carrera, Sain, & Bertiller 2000; Gherardi, Sala, & Yahdjian 2013). Las bajas tasas de mineralización netas y las bajas concentraciones de N inorgánico en el suelo encontradas en las estepas patagónicas sugieren que el crecimiento de las plantas podría estar también limitado por este recurso.

Las bajas temperaturas del aire que ocurren en invierno cuando la disponibilidad de agua en el suelo es mayor también pueden afectar el uso de los recursos del suelo por parte de las plantas. Aunque muchas especies de arbustos de la estepa toleran el congelamiento extracelular (Scholz et al. 2012; Zhang et al. 2016), otras especies evitan el congelamiento a través de super-enfriamiento permanente (Zhang et al. 2016). El congelamiento y descongelamiento del agua extracelular puede ocasionar la pérdida en la eficiencia en el transporte de agua debido a la formación de embolismos, con consecuencias en los procesos de absorción de agua e intercambio de gases, y en última instancia sobre el crecimiento de la planta. Mientras que las hojas de los arbustos pueden tolerar temperaturas inferiores a -20°C y no experimentar daños graves (Scholz

et al. 2012; Zhang et al. 2016), las raíces podrían ser más sensibles al daño por frío (Arias et al. 2015). En general las raíces tienen vasos de conducción de mayor diámetro que otros órganos de la planta, lo cual favorece la formación de embolismos durante el invierno (Cavender-Bares 2005; Feild & Brodribb 2001; Martínez-Vilalta & Pockman 2002). Para las especies arbustivas de las estepas patagónicas se ha observado que aquellas que presentan mayor rigidez en las paredes celulares experimentan el 50% de daño en sus tejidos a temperaturas más bajas (Scholz et al. 2012; Zhang et al. 2016). Asimismo, en los arbustos con vasos del sistema de conducción de agua de mayor diámetro la formación del núcleo de hielo ocurre a temperaturas más altas (Zhang et al. 2016).

La mayoría del Carbono orgánico en ambientes áridos y semiáridos se encuentra en el suelo (Peri 2011). El flujo de CO₂ desde el suelo, involucrado en el ciclo global de C (Bolstad et al. 2004; Euskirchen, Pregitzer, & Chen 2006), es uno de los principales procesos de pérdida de C a la atmósfera (Conant, Klopatek, & Klopatek 2000) y es muy sensible a cambios en la humedad y en el contenido de nutrientes del suelo (Butterbach-Bahl & Gundersen 2011; Cabrera 2007; Davidson, Belk, & Boone 1998; Hu et al. 2009; Hursh et al. 2017; Kelliher et al. 2004; Zhang et al. 2011). Un cambio en la relación fuente-sumidero de las plantas cuando se aumenta la disponibilidad de agua y nutrientes favorecería la asignación de foto-asimilados a la parte aérea de las plantas en detrimento del crecimiento de raíces (Boot & Dubbelden 1990), de modo que podría disminuir el sustrato para la liberación de CO₂ proveniente de la actividad de las raíces.

Además de las restricciones de agua y nutrientes característicos de los ecosistemas áridos en general, hay que tener en cuenta que estos ecosistemas son sensibles al cambio climático global y a otros cambios globales (Niu & Wan 2008). Se prevé que la deposición de N global aumentará como consecuencia de las actividades antrópicas intensivas (actividad agrícola, petrolera, producción de gas, entre otras) incluso en regiones áridas, depositándose mayormente sobre vegetación natural (Báez et al. 2007; Dentener et al. 2006; Gruber & Galloway 2008). La deposición de N está relacionada con un aumento en la disponibilidad de N del suelo y en las concentraciones de N foliar (Baron et al. 2000; Boggs et al. 2005), y consecuentemente podría estimular el crecimiento de las plantas en un ambiente limitado por este nutriente. Para algunas regiones del mundo se espera que las deposiciones de N atmosférico lleguen a ser de 40 a 60 kg N ha⁻¹ año⁻¹ durante el próximo siglo (Galloway et al. 2008; Galloway &

Cowling 2002; Lamarque et al. 2005) Por otra parte, para la Patagonia se prevé un aumento de la temperatura media anual de entre 0,5 y 1 °C para el período 2021-2040 (Camilloni 2018). Las precipitaciones medias anuales no se han modificado significativamente en el periodo 1960-2010 para esta región, pero se han observado fuertes disminuciones sobre la cordillera mientras que aumentos significativos de las precipitaciones se han registrado en algunas zonas del este y sur de la Patagonia (CIMA 2015; Saurral, Camilloni, & Barros 2017). Consistente con lo que ocurre a nivel global, incrementos mayores en la temperatura media del aire en Argentina ocurrirán en regiones a altas latitudes como Patagonia (Camilloni 2018). Asimismo, y siguiendo la tendencia global, los eventos anómalos con periodos cortos de temperaturas extremas, tanto altas como bajas, o periodos de sequía o de lluvias intensas se registrarán en toda la Región Patagónica (Barros & Camilloni 2016). El aumento del N atmosférico y los regímenes de precipitación alterados pueden tener impactos importantes sobre el ciclado del Carbono, del agua y de los nutrientes (Gruber & Galloway 2008; Harpole, Potts, & Suding 2007). Además, estos dos factores pueden interactuar en modos complejos, no necesariamente teniendo efectos aditivos, por lo que es importante estudiar sus efectos por separado y en conjunto. Flombaum, Yahdjian, & Sala (2017) resaltan la importancia de desarrollar más estudios que permitan comprender los efectos de conductores de cambio global, como las precipitaciones y el Nitrógeno, sobre el funcionamiento del ecosistema.

La presente tesis contribuye a responder preguntas relacionadas con los efectos de la fertilización e irrigación sobre un conjunto de variables fisiológicas y ecológicas de especies vegetales dominantes y de procesos ecológicos de la estepa patagónica. En términos generales, esta tesis aporta al conocimiento del funcionamiento del ecosistema en términos de los controles de la productividad primaria, la cual está vinculada a los flujos de energía y a los ciclos de nutrientes y Carbono. Asimismo, pretende aportar herramientas que ayuden a mejorar los pronósticos actuales de desertificación y las posibles respuestas de este ecosistema a cambios globales. El estudio se realizó en una típica estepa arbustiva-graminosa localizada en el suroeste de Chubut, por lo cual se propone que los resultados obtenidos pueden aplicarse a otras estepas o ecosistemas con características similares.

1.2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

El objetivo general de esta tesis consistió en evaluar las respuestas ecofisiológicas de la vegetación y de procesos ecológicos ante cambios en la disponibilidad de agua y nutrientes en el suelo en la estepa patagónica. La hipótesis general asociada a este objetivo fue que el aumento en la disponibilidad de recursos (agua y N) favorece la respiración del suelo y la mineralización del Nitrógeno e incrementa el crecimiento de la vegetación dado que la vegetación presenta menor estrés hídrico, mayores tasas de asimilación de CO₂ y mayor resistencia a las bajas temperaturas. Se utilizó un abordaje experimental con ensayos a campo bajo condiciones controladas de disponibilidad de agua y Nitrógeno a largo plazo y gran escala.

Los objetivos específicos y las hipótesis asociadas consistieron en:

Objetivo específico 1 (Capítulo II): Determinar el patrón estacional de las emisiones de CO₂ del suelo en la estepa patagónica, teniendo en cuenta la heterogeneidad espacial de este ecosistema. Determinar además los efectos de la temperatura y de la humedad del suelo y la densidad de las raíces sobre la respiración del suelo, y estudiar la respuesta de un pequeño pulso de lluvia sobre los flujos de CO₂ del suelo durante la estación seca. La **hipótesis I** plantea que la variabilidad estacional en la respiración del suelo se atribuye a la variación en la temperatura y la humedad del suelo. Dado que mayor temperatura y mayor humedad estimulan la actividad metabólica para el mantenimiento y crecimiento de las raíces y de las comunidades microbianas del suelo, se espera un aumento de la respiración del suelo con un aumento de tales variables. La **hipótesis II** propone que los parches de suelo desnudo liberan una menor cantidad de CO₂ que los parches con vegetación. Ya que los parches con vegetación poseen mayor cantidad de raíces y de microorganismos del suelo que los parches de suelo desnudo, se espera mayor flujo de CO₂ en esos parches. Por otro lado, y dado que el agua es uno de los principales factores impulsores de la actividad biológica en los ecosistemas áridos y semiáridos, se plantea la **hipótesis III**, la cual propone un aumento en la respiración del suelo después de un pulso de lluvia en ambos tipos de parches.

Objetivo específico 2 (Capítulo III): Determinar el impacto del aumento en la disponibilidad de nutrientes y agua sobre las emisiones de CO₂ desde el suelo y de las

tasas de mineralización de Nitrógeno en la estepa patagónica, teniendo en cuenta la heterogeneidad espacial y la variabilidad estacional de este ambiente. La **hipótesis I** propone que la respiración autótrofa (raíces) disminuye en los tratamientos fertilizados e irrigados, ya que un cambio en la relación fuente-sumidero de las plantas cuando se aumenta la disponibilidad de agua y nutrientes favorecería la asignación de fotoasimilados a la parte aérea de la vegetación en detrimento del crecimiento de raíces (Boot & Dubbelden 1990), de modo que disminuiría el sustrato para la liberación de CO₂ autótrofo desde el suelo. La **hipótesis II** plantea que la mineralización de Nitrógeno aumenta con la adición de agua y de nutrientes, dado que incrementan los recursos para que tal proceso ocurra.

Objetivo específico 3 (Capítulo IV): Determinar si el aumento de las precipitaciones y de la disponibilidad de N en el suelo promueve la aclimatación a través de plasticidad fenotípica de características hidráulicas y de parámetros hídricos en especies de pastos y de arbustos que exploran diferentes fuentes de agua en el suelo en la estepa patagónica. La **hipótesis** propone que la eficiencia hidráulica aumenta y el estado hídrico mejora en las plantas bajo los tratamientos de irrigación y de fertilización. La mayor tasa de crecimiento asociada produciría conductos de transporte de agua en el xilema con mayor diámetro (Hacke et al. 2010) y así con mayor conductividad hidráulica. Por otro lado, la mayor disponibilidad de agua en el suelo evitaría o reduciría la acumulación de embolismos. Junto con la mayor eficiencia hidráulica, la mayor biomasa foliar y la conductancia estomática típicamente asociadas con la fertilización e irrigación incrementaría las pérdidas de agua por transpiración (Bucci et al. 2006).

Objetivo específico 4 (Capítulo V): Determinar el efecto de adición de N y/o agua sobre las tasas de intercambio gaseoso y la eficiencia de uso de recursos de pastos y arbustos de la estepa patagónica. La **hipótesis** propone que la adición de agua y/o nutrientes incrementa la tasa de fotosíntesis, pero la pérdida de agua sería proporcionalmente menor con adición de nutrientes y mayor con el incremento en la disponibilidad de agua. La mayor disponibilidad de agua y nutrientes favorecería la absorción de nutrientes desde el suelo por parte de las raíces incrementando su contenido en las hojas, principalmente aquellos destinados al aparato fotosintético. Al mismo tiempo que se alivia el déficit hídrico se reduciría el control estomático favoreciendo la difusión del CO₂ para su asimilación.

Objetivo específico 5 (Capítulo VI): Evaluar el impacto de la fertilización e irrigación sobre la resistencia a las bajas temperaturas de arbustos y pastos. La **hipótesis** establece que la adición de nutrientes incrementa la tolerancia a las bajas temperaturas, mientras que la adición de agua disminuye la resistencia a las bajas temperaturas. Principalmente la adición de N podría proveer los recursos necesarios para incrementar la cantidad de compuestos orgánicos como aminoácidos o proteínas solubles que modifican el umbral de temperatura a la cual las plantas exhiben daños celulares. En cambio, un mayor contenido de agua en los tejidos incrementaría la probabilidad de formación del núcleo de hielo a más altas temperaturas.

Objetivo específico 6 (Capítulo VII): Determinar los efectos de la adición de agua y de N al suelo sobre el crecimiento de la biomasa aérea y subterránea de pastos y arbustos en la estepa patagónica. La **hipótesis** propone que las plantas expuestas a mayor disponibilidad de agua y de nutrientes tienen mayores tasas de crecimiento de la biomasa aérea y reducción en el crecimiento de la biomasa subterránea. El estrés nutricional e hídrico son los principales limitantes de la productividad. Mayor fertilidad y oferta de agua incrementaría el área foliar, la concentración de nutrientes y la asimilación total de carbono, incrementando la fracción fotosintética asignada a la parte aérea y reduciendo la fracción asignada a las raíces.

1.3. SITIO DE ESTUDIO

1.3.1. Área de estudio

El estudio se realizó en el Campo Experimental Río Mayo (CERN) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA 45°24'11"S 70°17'37"W) en el suroeste de la provincia de Chubut, próximo a la localidad de Río Mayo (Figura 1.1). El sitio corresponde a una estepa arbustiva-graminosa del extremo sur del Distrito Occidental de la Provincia Patagónica (Oyarzabal et al. 2018; Soriano 1956). La temperatura media anual histórica del sitio de estudio (1982-2018) es de 9,4°C, con una temperatura media mensual de 15°C en enero y de 2°C en julio, con un período de heladas entre mayo y agosto (Figura 1.2). La precipitación media anual histórica (1982-2018) es de 130 mm (Figura 1.2), con rango entre 55 y 250 mm anuales. La mayoría de las precipitaciones ocurren durante el otoño y el invierno, y los eventos de lluvia durante el verano son aislados e impredecibles (Paruelo et al. 1998a). Los vientos (media anual de 15 km/h)

soplan predominantemente del oeste (Beltrán 1997). Los suelos son de textura gruesa (arenosos), con un contenido alto de grava de diámetro variable, muy bajo contenido de materia orgánica y con presencia de una capa calcárea a una profundidad de entre 45 y 150 cm, dependiendo del sitio (Bucci et al. 2009; Paruelo et al. 1998b). El contenido de agua del suelo varía estacionalmente en las capas más superficiales hasta 1 m de profundidad, aumentando entre mayo y septiembre de 5 a 20% aproximadamente, mientras que a mayor profundidad (2 m) el contenido de agua permanece relativamente constante a través del año y cercano al 10% (Cristiano et al. 2016; Pereyra et al. 2017).

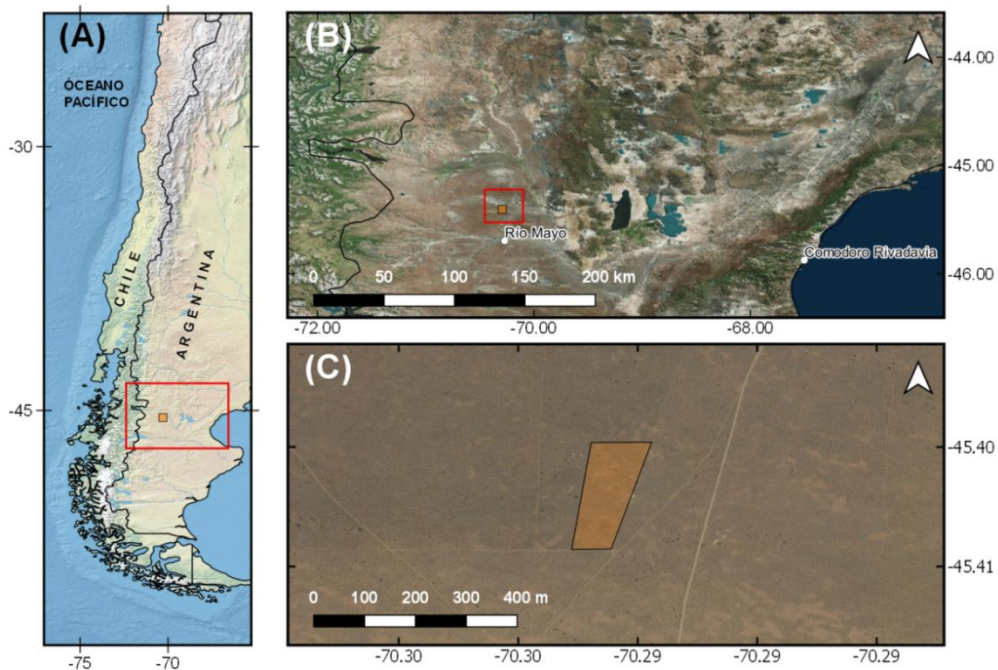


Figura 1.1. A-B) Mapa con la ubicación de la Campo Experimental Rio Mayo (CERM) perteneciente al INTA, Chubut. C) Ubicación de la clausura delimitada para la realización de la tesis.

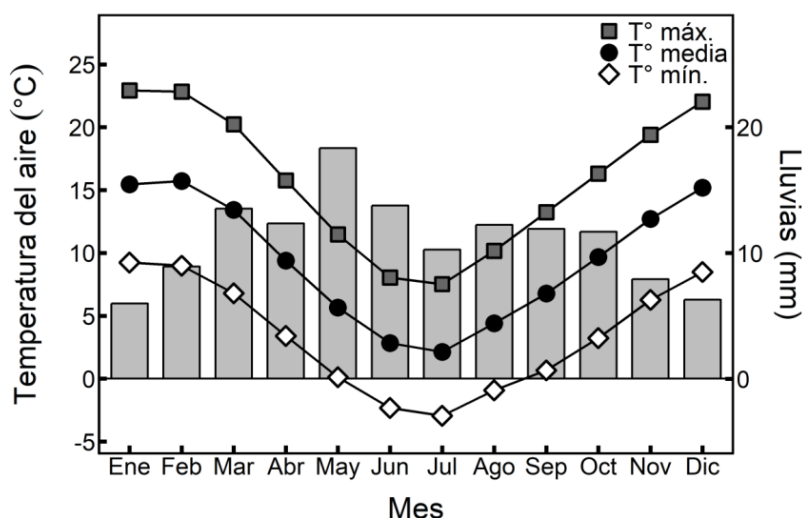


Figura 1.2. Temperatura mensual mínima, media y máxima del aire y lluvias mensuales históricas (1982-2018) en el Campo Experimental Río Mayo (INTA). (Fuente: <http://sipas.inta.gob.ar/>).

En 2012, previo al inicio de los experimentos, se colectaron muestras de suelo a 5, 10, 20 y 40 cm de profundidad en las 20 parcelas de 25 m x 25 m utilizadas para este estudio (ver 1.3.3-Diseño experimental) y se analizó el contenido de materia orgánica y de nutrientes. Los resultados se detallan en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Materia Orgánica (MO, %), Nitrógeno total (N, %), Fósforo (P, mg kg⁻¹), Calcio (Ca⁺², mg kg⁻¹), Magnesio (Mg⁺², mg kg⁻¹), Potasio (K⁺¹, mg kg⁻¹) y Sodio (Na⁺¹, mg kg⁻¹) del suelo a 5, 10, 20 y 40 cm de profundidad en una estepa patagónica en 2012 (condiciones iniciales del experimento). Cada valor representa la media + EE (n = 5).

Profundidad (cm)	MO (%)	N (%)	P (mg kg ⁻¹)	Ca ⁺² (mg kg ⁻¹)	Mg ⁺² (mg kg ⁻¹)	K ⁺¹ (mg kg ⁻¹)	Na ⁺¹ (mg kg ⁻¹)
5	0,63 (0,11)	0,039 (0,003)	11,75 (0,86)	888,0 (68,13)	170,4 (14,73)	284,8 (15,20)	3,40 (0,20)
10	0,76 (0,19)	0,040 (0,002)	8,15 (1,44)	1253,2 (30,64)	206,48 (28,85)	297,6 (12,04)	7,40 (0,79)
20	0,92 (0,13)	0,039 (0,001)	6,94 (0,92)	1237,6 (112,77)	156,32 (18,93)	276,8 (8,31)	8,84 (1,80)
40	0,98 (0,22)	0,049 (0,006)	6,02 (0,31)	1435,2 (93,90)	293,20 (57,63)	283,2 (29,70)	20,08 (4,68)

La principal actividad en la estación experimental es la ganadería ovina extensiva, con una carga media de 0,14 ovejas por hectárea. De mayo a octubre los animales se distribuyen en las diferentes parcelas del campo, mientras que durante el resto del año son transportados a sitios con abundante forraje (mallín).

1.3.2. Descripción del sistema y especies seleccionadas

Las estepas patagónicas son ecosistemas áridos/semiáridos caracterizados por una vegetación de baja densidad de plantas y diversidad de especies, con una cobertura vegetal de entre 30 y 40% (Pereyra et al. 2017). La vegetación está distribuida en parches compuestos de arbustos y pastos en una matriz de suelo desnudo (Soriano, Sala, & Perelman 1994). La actividad económica principal de la región ha sido la ganadería ovina desde fines del siglo XIX (Golluscio, Sala, & Lauenroth 1998).

Las especies de plantas leñosas dominantes de la estepa patagónica del suroeste de Chubut donde se desarrolló este estudio son *Azorella prolifera* (Cav.) G.M. Plunkett & A.N. Nicolas (ex. *Mulinum spinosum*), *Adesmia volckmannii* Phil., *Berberis microphylla* G. Forst. y *Senecio filaginoides* DC (Figura 1.3). Entre las especies de gramíneas dominantes, las cuales son C₃, se presentan *Pappostipa speciosa* (Trin. & Rupr.) Romasch., *Pappostipa humilis* (Cav.) Romasch. y *Poa ligularis* Nees ex Steud. (Figura 1.3), y hierbas perennes y anuales (p.ej. *Cerastium arvense* L. y *Polygala darwiniana* A.W. Benn.). La tabla 1.2 muestra la forma de vida, fenología foliar, altura de las plantas y profundidad máxima de los sistemas radicales de las especies estudiadas en esta tesis.

Los arbustos tienen sistemas de raíces dimórficos con varias raíces laterales y una raíz pivotante (Bucci et al. 2009). De las especies de arbustos que se muestran en la Tabla 1.2, *B. microphylla* es la que presenta sistemas radicales más profundos (Figura 1.4), superando los 2 m, seguido por *A. volckmannii* con raíces que exploran profundidades menores a 2 m (Figura 1.5), mientras que *A. prolifera* (Figura 1.6) y *S. filaginoides* (Figura 1.7) son las especies que tienen raíces menos profundas, alcanzando 1 m en el perfil del suelo (Bucci et al. 2009). Los pastos tienen sistemas de raíces fibrosas y la biomasa subterránea disminuye desde el centro de su base hacia la

periferia. Algunas raíces se expanden fuera del área basal (Soriano, Golluscio, & Satorre 1987), por lo que la zona de influencia de una herbácea está colonizada por las raíces de las especies herbáceas vecinas (Reyes & Aguiar 2017b). Las especies de pastos se caracterizan por presentar sistemas radicales poco profundos, menores a 50 cm, y concentrando la mayoría de sus raíces por encima de los 30 cm (Golluscio & Sala 1993; Soriano, Golluscio, & Satorre 1987; Figura 1.8). Mientras que *P. ligularis* es una especie más mesofítica, es decir, poco tolerante a la sequía, *P. speciosa* es más xerofítica, es decir, muy tolerante a la sequía (Couso & Fernández 2012), aunque ambas especies tienen hojas verdes todo el año, tolerando la sequía de verano (Soriano & Sala 1983). Las especies mesofíticas son las preferidas por el ganado, a diferencia de las especies xerofíticas, que en general tienen hojas más escleromórficas, menos palatables para el ganado. Mientras que los arbustos absorben agua y nutrientes de capas de suelo profundas, los pastos absorben la mayor parte del agua y los nutrientes de las capas más superficiales del suelo (Fernandez & Paruelo 1988; Golluscio, Sala, & Lauenroth 1998; Sala et al. 2012; Soriano, Golluscio, & Satorre 1987), aunque algunas especies arbustivas, como *S. filaginoides*, presentan sistemas dimórficos, con un alto porcentaje de sus raíces superficiales (Fernandez & Paruelo 1988; Leva, Aguiar, & Oesterheld 2009).

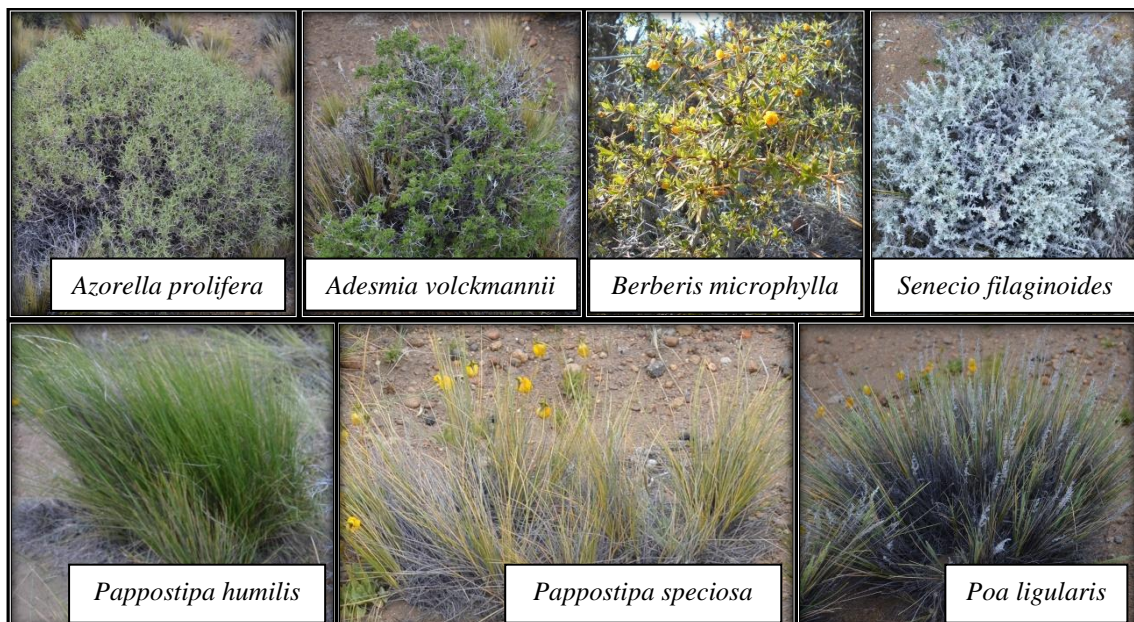


Figura 1.3. Imágenes de las especies dominantes de la estepa patagónica estudiada. Se muestran las especies arbustivas *Azorella prolifera*, *Adesmia volckmannii*, *Berberis microphylla* y

Senecio filafinoides, y las especies de gramíneas *Poa ligularis*, *Pappostipa speciosa* y *Pappostipa humilis* (solo presente en las parcelas fertilizadas).

Tabla 1.2. Formas de vida, fenología foliar, altura de las plantas (cm) y profundidad máxima de los sistemas radicales (cm) de los especies estudiadas en la estepa patagónica. Los valores representan la media \pm EE (n = 15). La profundidad de los sistemas radicales fue extraída de Bucci et al. (2011).

Especie	Familia	Forma de vida	Fenología foliar	Altura de la planta (cm)	Profundidad máxima de raíces (cm)
<i>Azorella prolifera</i>	Apiaceae	Arbusto	Deciduo	40,8 (1,8)	<100
<i>Adesmia volckmannii</i>	Fabaceae	Arbusto	Deciduo	76,2 (4,5)	<200
<i>Berberis microphylla</i>	Berberidaceae	Arbusto	Siempreverde	96,3 (3,5)	>200
<i>Pappostipa speciosa</i>	Poaceae	Pasto	Siempreverde	33,2 (1,6)	<50
<i>Poa ligularis</i>	Poaceae	Pasto	Siempreverde	29,7 (1,5)	<50
<i>Senecio filaginoides</i>	Asteraceae	Arbusto	Siempreverde	36,1 (1,4)	<100



Figura 1.4. Imagen del sistema radical de *Berberis microphylla* en el sitio de estudio.



Figura 1.5. Imagen del sistema radical de *Adesmia volckmannii* en el sitio de estudio.



Figura 1.6. Imagen del sistema radical de *Azorella prolifera* en el sitio de estudio.



Figura 1.7. Imagen del sistema radical de *Senecio filaginoides* en el sitio de estudio.



Figura 1.8. Imagen del sistema radical de *Poa ligularis* en el sitio de estudio.

1.3.3. Diseño experimental

Para testear las hipótesis y responder a los objetivos planteados se instaló un experimento que incluyó tratamientos de irrigación y fertilización (Figura 1.9). En 2013, se delimitó una clausura de 4 hectáreas para exclusión de herbívoros grandes, y se definieron 20 parcelas de 625 m² cada una: 5 parcelas control (C), 5 irrigadas (I), 5

fertilizadas (F) (Figura 1.10) y 5 irrigadas y fertilizadas (I+F) (Figura 1.11). La delimitación de las parcelas se estableció de forma semi-aleatoria, tomando en cuenta que las mismas fueran homogéneas en cuanto a cobertura de especies vegetales y que existiera una separación de al menos 10 m entre parcelas. Las parcelas con el tratamiento de irrigación están equipadas con un sistema semi-automático de riego por aspersión con el cual se aumenta la cantidad de precipitación anual histórica para el sitio en un 20-25% aproximadamente, distribuida en eventos de ~5mm cada uno (Figura 1.12, Figura 1.13). El agua de riego es extraída de un pozo de 6 m de profundidad ubicado próximo a la clausura y excavado específicamente para abastecer a las parcelas. La irrigación es anulada durante el invierno que es el periodo más húmedo, y además para evitar daños en el sistema de riego por congelamiento del agua en las tuberías. La fertilización es realizada dos veces por año aplicando fosfato diamónico y urea al voleo, en una cantidad de 100 kg/ha/año de N. Una de las adiciones se realiza al inicio del invierno y la otra al final del invierno, de modo de favorecer la disolución del fertilizante en el suelo al haber mayor contenido de humedad. La cantidad de N adicionada por año está en concordancia con estudios previos en otros sistemas áridos (Allen et al. 2009; Brooks 2003; Gutierrez et al. 1988; Ladwig et al. 2012; Rao & Allen 2010). La adición de P con el fosfato diamónico se realizó para evitar cualquier posible limitación de este nutriente que interfiera con el efecto de la adición de N. La aplicación de los tratamientos comenzó en 2013 y continúa hasta la actualidad (2019).

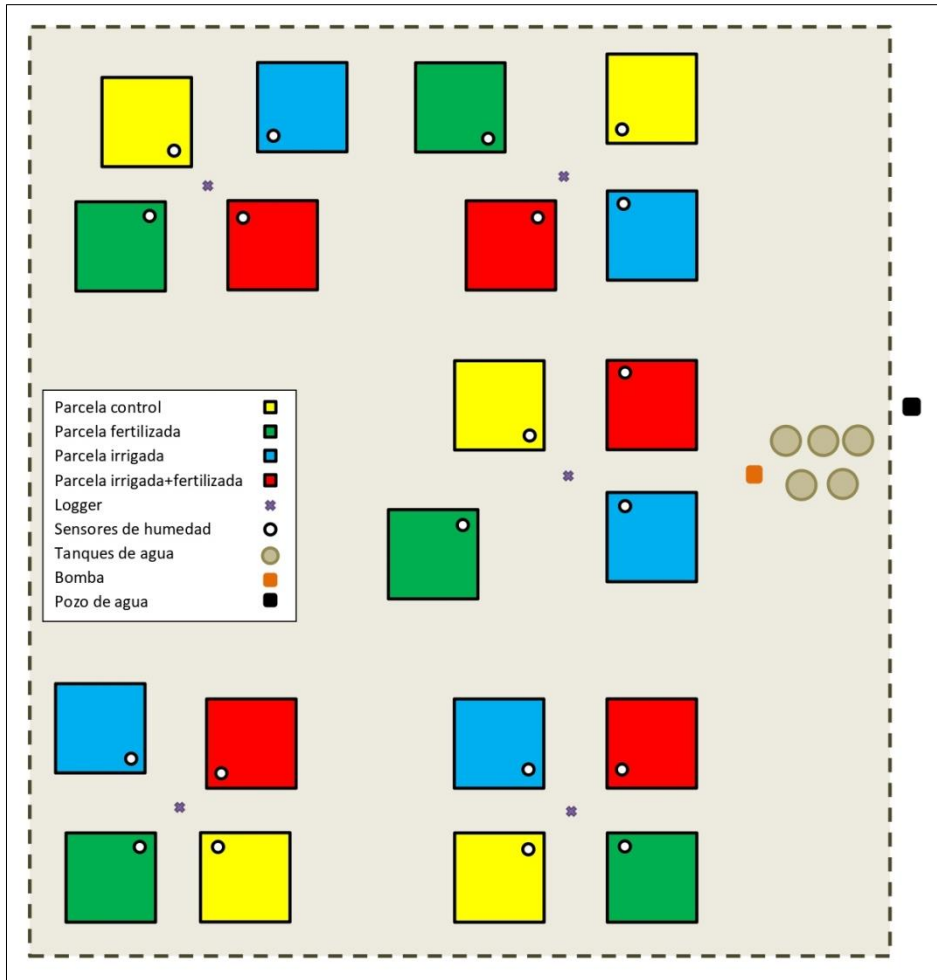


Figura 1.9. Esquema del experimento instalado en el campo.



Figura 1.10. Imagen de una parcela fertilizada en el sitio de estudio en octubre de 2017.



Figura 1.11. Imagen de una parcela irrigada y fertilizada en el sitio de estudio en octubre de 2017.



Figura 1.12. Imagen del sitio de estudio con los aspersores del sistema de irrigación durante un evento de riego en marzo de 2016.



Figura 1.13. Detalle de uno de los aspersores del sistema de irrigación.

En noviembre de 2015, se colectaron 3 muestras de suelo al azar de cada tratamiento y se realizaron determinaciones físico-químicas. La metodología de

muestreo y análisis estadísticos se pueden ver en detalle en el Capítulo III. Los resultados se muestran en la Tabla 1.3. El pH disminuyó y la conductividad eléctrica aumentó en las parcelas F e I+F con respecto a las C. La materia orgánica no fue diferente entre los tratamientos. El nitrógeno total aumentó en las parcelas I+F y el fósforo disponible aumentó en las parcelas F e I+F con respecto a las parcelas C.

Tabla 1.3. pH, conductividad eléctrica (CE, dS m⁻¹), materia orgánica (MO, %), Nitrógeno total (N, %), Fósforo disponible (P, ppm), amonio (mg Kg⁻¹) y nitrato (mg Kg⁻¹) en los primeros ~5 cm del suelo en una estepa Patagónica, en parches de suelo desnudo y en parches con vegetación en cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F). Cada valor representa la media + IC (n = 3). Los datos corresponden a muestras colectadas en noviembre de 2015, luego de dos años del inicio de los tratamientos. Para mayor detalle sobre la metodología de muestro y los análisis estadísticos aplicados ver Capítulo VII.

	Parches de suelo desnudo				Parches con vegetación			
	C	F	I	I+F	C	F	I	I+F
pH	7,17 (0,12)	6,27 (0,12)	7,27 (0,12)	6,37 (0,12)	7,13 (0,24)	6,53 (0,24)	6,93 (0,24)	6,60 (0,24)
CE (dS m⁻¹)	0,14 (0,06)	0,31 (0,09)	0,13 (0,05)	0,31 (0,09)	0,24 (0,08)	0,76 (0,20)	0,21 (0,07)	0,54 (0,13)
MO (%)	0,50 (0,13)				1,08 (0,13)			
N (%)	0,022 (0,006)	0,031 (0,006)	0,021 (0,006)	0,034 (0,006)	0,057 (0,012)	0,066 (0,012)	0,056 (0,012)	0,069 (0,012)
P (ppm)	11,5 (2,53)	51,9 (15,81)	12,1 (2,66)	57,1 (17,91)	18,1 (3,88)	58,6 (15,93)	18,8 (3,98)	63,7 (17,95)
Amonio (mg kg⁻¹)	4,1 (0,51)	101,7 (20,18)	3,0 (0,43)	52,6 (8,61)	5,1 (0,64)	102,7 (20,18)	4,0 (0,59)	53,6 (8,62)
Nitrato (mg kg⁻¹)	2,97 (0,95)	19,57 (4,69)	1,46 (0,52)	7,48 (2,42)	4,84 (1,14)	22,11 (4,79)	2,79 (0,75)	27,05 (5,07)

Desde el inicio del experimento, se determinó continuamente el contenido volumétrico de agua en el suelo, empleando sensores que hacen uso de la reflectometría de dominio de frecuencia (ECHO, Dielectric aquameter, Decagon Devices, Inc) y que realizan una integración a lo largo de los 10 cm de su longitud (Figura 1.14). Cada parcela cuenta con sensores instalados a 10, 40, 100 y 200 cm de profundidad en excavaciones de 1x1x2 m, que fueron realizadas manualmente de modo de ocasionar el menor grado de perturbación del ambiente posible, previo al inicio de los tratamientos. Los sensores se instalaron en forma horizontal introduciéndolos sobre una de las paredes de la excavación de modo tal que cada sensor quedó en total contacto con suelo no perturbado. La trinchera se rellenó luego con el suelo removido tratando de respetar su composición original. Los sensores están conectados a sistemas automáticos de adquisición de datos CR1000 (Campbell Scientific) alimentados por baterías, que a su vez son cargadas por un panel solar, los cuales registran los datos cada 30 minutos.



Figura 1.14. Imagen de una de las excavaciones realizadas en el sitio de estudio con los sensores ECHO que se instalaron a 10, 40, 100 y 200 cm de profundidad en 2013 para determinación del contenido volumétrico de agua del suelo.

Durante el periodo de estudio, el contenido volumétrico de agua del suelo a 10 cm de profundidad varió entre 4 y 20%, con una dinámica estacional marcada, con mayor humedad durante el otoño y el invierno y muy baja humedad durante la primavera y el verano (Figura 1.15A). Los picos en el contenido de agua del suelo correspondieron a eventos de precipitaciones y a eventos de riego (en los tratamientos I e I+F). Como los eventos de riego se realizaron en diferentes días en cada parcela, en la Figura 1.16A se muestra el contenido de agua del suelo a 10 cm de profundidad de una parcela de cada tratamiento en particular, donde se puede visualizar un aumento transitorio en el contenido de agua del suelo durante los eventos de riego en las parcelas I e I+F. Como se puede ver, los primeros 10 cm del suelo fueron muy sensibles a los pulsos de lluvia, y de riego en el caso de los tratamientos con irrigación, aumentando la humedad del suelo inmediatamente después de cada evento. A 40 cm de profundidad, el contenido de agua del suelo tuvo una dinámica estacional semejante a la observada a los 10 cm, pero los picos correspondientes a los eventos de riego que se observaban a los 10 cm no se visualizaron a los 40 cm (Figura 1.15B y Figura 1.16B). Es decir, el contenido de humedad del suelo en el tratamiento de irrigación solo aumentó, transitoriamente, en las capas más superficiales, sin afectar el contenido de agua a 40 cm de profundidad. A los 100 y 200 cm de profundidad, el contenido de agua del suelo fue estable en el tiempo, con valores entre 5 y 10 %, excepto a fines de marzo de 2017, cuando un evento de lluvia excepcional (de 60 mm) provocó un aumento considerable en el contenido de agua del suelo a los 100 cm de profundidad (Figura 1.15C) y un pequeño aumento a los 200 cm, aunque con retraso en el efecto (Figura 1.15D). Este evento de lluvia convirtió al 2017 en un año húmedo.

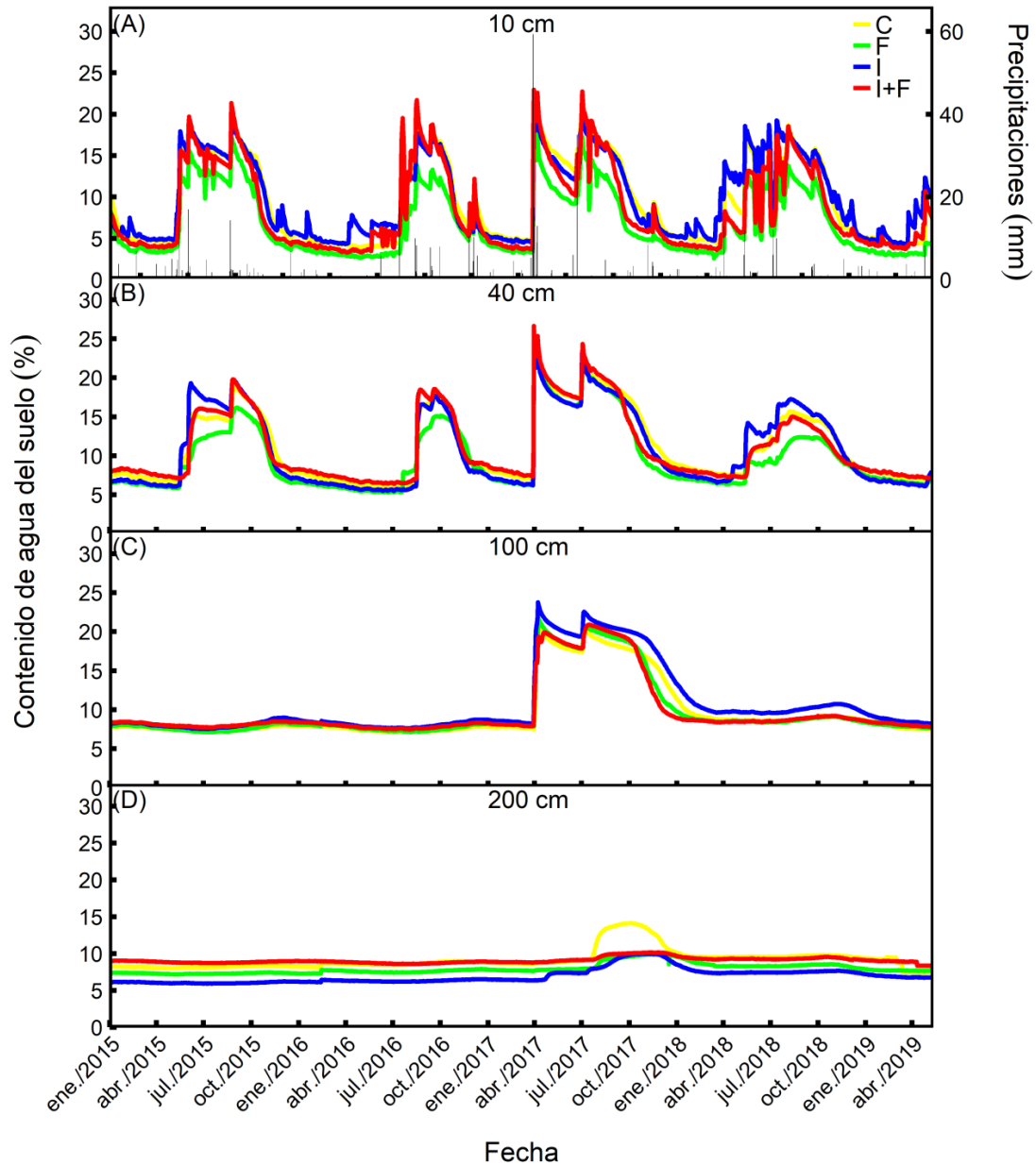


Figura 1.15. Contenido volumétrico de agua del suelo (%) a (A) 10 cm, (B) 40 cm, (C) 100 cm y (D) 200 cm de profundidad de 01/01/2015 a 10/05/2019, para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F), en una estepa patagónica. Las líneas representan la media diaria de cada tratamiento (n= 5). En (A) se indican también las precipitaciones diarias (barras negras), obtenidas de una estación meteorológica localizada a 2 km. del sitio del estudio (Fuente: <http://sipas.inta.gob.ar/>).

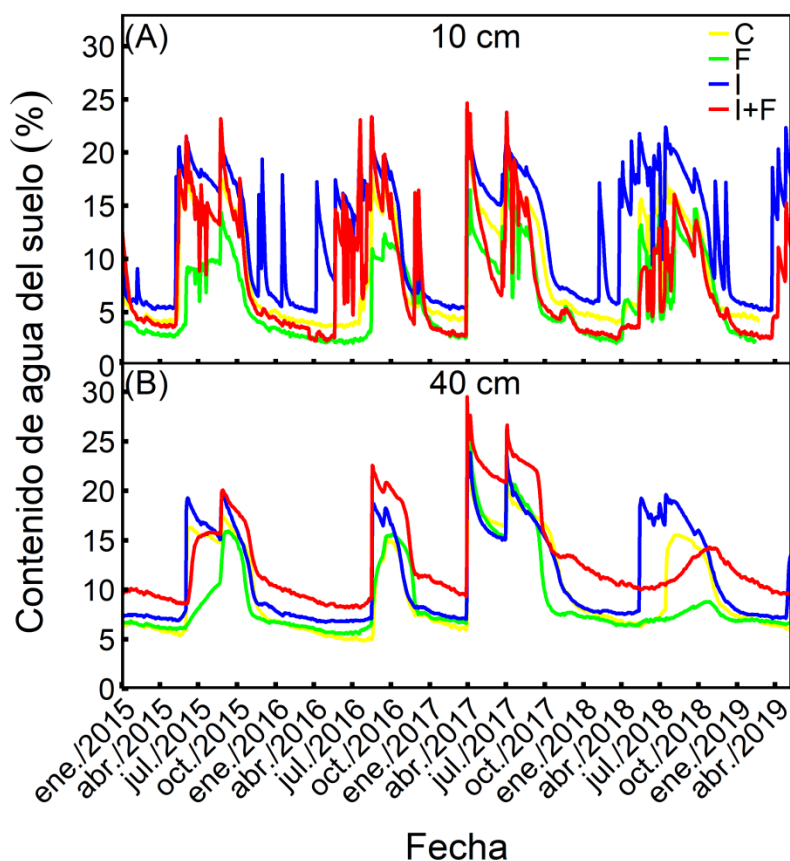


Figura 1.16. Contenido volumétrico de agua del suelo (%) a (A) 10 cm y (B) 40 cm de profundidad de 01/01/2015 a 10/05/2019, para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F), en una estepa patagónica. Cada línea corresponde a los valores diarios de una parcela en particular.

1.4. ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

La tesis se organizó a partir de los objetivos y de las hipótesis asociadas a cada uno de ellos. El presente capítulo (Capítulo I) establece el marco conceptual, presenta los objetivos específicos e hipótesis generales, y detalla el diseño experimental. De esta manera cada capítulo presenta el marco conceptual, la metodología y el análisis estadístico particulares de cada estudio. Cada uno de los capítulos experimentales (II al VII) incluye secciones propias de introducción, métodos (sin mencionar el diseño experimental, que es común a todos y fue explicado en el presente capítulo (Capítulo I), resultados y discusión. En los capítulos II y III se estudian las emisiones de CO₂ del suelo; en el primero de ellos se hace referencia solo a las parcelas control para explicar

la variabilidad espacial y temporal de este proceso y las variables que lo regulan, y en el siguiente capítulo se indaga en el efecto de la irrigación y fertilización sobre este proceso y la mineralización del N. En el Capítulo IV se presentan los resultados referidos al efecto de la irrigación y fertilización sobre la eficiencia en el transporte de agua, consumo de agua y estado hídrico de pastos y arbustos de la estepa patagónica. En el Capítulo V se exploran los efectos de la fertilización e irrigación sobre las tasas fotosintéticas y la eficiencia en el uso de los recursos. El Capítulo VI menciona los resultados de los cambios en la resistencia a bajas temperaturas en arbustos y pastos en respuesta al aumento experimental de las precipitaciones y del N del suelo. El Capítulo VII explora las modificaciones en el crecimiento aéreo y subterráneo como producto de la fertilización e irrigación. En el último capítulo (Capítulo VIII) se presentan las conclusiones generales de la tesis integrando los resultados de los capítulos anteriores, la contribución de la misma al conocimiento general y las perspectivas para futuras investigaciones.

Capítulo II

Emisión de CO₂ desde el suelo en la estepa patagónica

Publicado en: **Carbonell Silletta LM**, Cavallaro A, Kowal R, Pereyra DA, Silva RA, Arias NS, Goldstein G, Scholz FG, Bucci SJ. (2019) Temporal and spatial variability in soil CO₂ efflux in the patagonian steppe. *Plant and Soil*. [https://doi.org/10.1007/s11104-](https://doi.org/10.1007/s11104-019-04268-7)

019-04268-7

Emisión de CO₂ desde el suelo en la estepa patagónica

2.1. INTRODUCCIÓN

El flujo de carbono entre el suelo y la atmósfera ocurre principalmente en forma de dióxido de carbono (CO₂) que se origina a partir de la respiración autótrofa (raíces) y heterótrofa (microbiana). Este proceso es una de las vías principales por la cual el CO₂ fijado por la vegetación retorna a la atmósfera (Bolstad et al. 2004; Borken et al. 2006; Euskirchen, Pregitzer, & Chen 2006). En general, aproximadamente la mitad de la respiración del suelo se deriva de la actividad metabólica para el mantenimiento y crecimiento de las raíces y de los organismos de la rizósfera asociados (Hanson et al. 2000; Högberg et al. 2001). El resto del flujo de CO₂ está asociado con la respiración de las comunidades microbianas (Giardina et al. 2004; Trumbore 2000). Sin embargo, la proporción de la respiración del suelo proveniente de la contribución autótrofa y heterótrofa varía estacional y espacialmente dentro de un ecosistema y entre ecosistemas (Hanson et al. 2000; Wang et al. 2014).

El flujo de CO₂ desde el suelo suele ser mencionado también como "respiración del suelo" (Xu & Shang 2016). Varios factores afectan la respiración del suelo, incluida la temperatura (Davidson & Janssens 2006), y humedad (Bao et al. 2016; Zhang et al. 2010), la cantidad y calidad de broza (Han et al. 2015), la salinidad (Lai et al. 2012) y la materia orgánica (Lai et al. 2013). En ecosistemas sin una marcada estacionalidad en las precipitaciones, la temperatura del suelo es un buen estimador de la respiración del suelo (Bolstad et al. 2004; Fang & Moncrieff 2001), sin embargo, en ciertos biomas la humedad y el carbono del suelo emergen como estimadores dominantes de la respiración del suelo (Hursh et al. 2017). En condiciones de sequía, la cantidad y distribución de las precipitaciones constituyen también factores clave que controlan la respiración del suelo (Deng et al. 2012).

Las regiones áridas y semiáridas representan casi un tercio de la superficie terrestre global y la respiración del suelo es el proceso principal para la emisión de carbono en estas regiones (Conant, Klopatek, & Klopatek 2000). En general, estos ecosistemas se caracterizan por bajas tasas de respiración del suelo (Cable et al. 2011) y

muestran una alta variabilidad estacional e interanual en las precipitaciones. Durante el período seco ocurren algunos pulsos de lluvia pequeños y erráticos (Collins et al. 2008; Reynolds et al. 2004). Estos eventos discretos e impredecibles de precipitación impulsan la actividad metabólica de las raíces y de los microorganismos hasta que el agua disponible se agota, lo que afecta las emisiones de CO₂ del suelo (Davidson, Belk, & Boone 1998; Jarvis et al. 2007; Kelliher et al. 2004). Los efectos de los pulsos de lluvia sobre los flujos de CO₂ del suelo generalmente se intensifican por la condición seca precedente del suelo, y estos son menos evidentes si el suelo está húmedo previo al evento de lluvia (Cable et al. 2008).

En ambientes áridos y semiáridos la vegetación está distribuida en forma heterogénea, con micrositios de suelo desnudo (expuesto, sin vegetación) y micrositios de vegetación. Este patrón de distribución genera heterogeneidad en la disponibilidad de recursos y en la densidad de raíces y microorganismos que puede tener efectos relevantes en la respiración del suelo (Cable et al. 2008; Han et al. 2017; Han et al. 2014b; Helmuth, Kingsolver, & Carrington 2005; Martin & Bolstad 2009). Por lo tanto, aumentar la resolución temporal y espacial de las estimaciones de la respiración del suelo puede ayudar a reducir la incertidumbre al cuantificar los flujos de carbono de los ecosistemas (Martin & Bolstad 2009). Los ambientes áridos han recibido menos atención en el estudio de la respiración del suelo que otros ecosistemas alrededor del mundo (Xu & Shang 2016). Particularmente para la estepa patagónica, los flujos de CO₂ son desconocidos (pero ver Peri, Bahamonde, & Christiansen (2015) para las estepas magallánicas). La estepa patagónica es una región fría y árida/semiárida con un asincronismo entre la disponibilidad de agua y las temperaturas favorables para la actividad biótica (Austin et al. 2004; Bertiller et al. 2006; Scholz et al. 2012). Además, estos son ambientes muy heterogéneos donde los arbustos y las gramíneas se agrupan formando islas de fertilidad (Garner & Steinberger 1989; Mazzarino et al. 1998; Soriano, Sala, & Perelman 1994). Los suelos en los parches con vegetación contienen más humedad y nutrientes que los parches de suelo desnudo que los rodean (Austin et al. 2004). Por lo tanto, se espera que la tasa de respiración del suelo presente también un marcado patrón espacial. En este estudio se evaluó el patrón estacional de las emisiones de CO₂ desde el suelo en la estepa patagónica, teniendo en cuenta la heterogeneidad espacial de este ecosistema. También se analizaron los efectos de la temperatura y de la humedad del suelo y la densidad de las raíces sobre la respiración del suelo. Además, se

estudió la respuesta de un pequeño pulso de lluvia sobre los flujos de CO₂ desde el suelo durante la estación seca. La **hipótesis I** planteada fue que la variabilidad estacional en la respiración del suelo se atribuye a la variación en la temperatura y la humedad del suelo. Dado que mayor temperatura y mayor humedad estimulan la actividad metabólica para el mantenimiento y crecimiento de las raíces y de las comunidades microbianas del suelo, se espera un aumento de la respiración del suelo con un aumento de tales variables. Además, se planteó la **hipótesis II** de que los parches de suelo desnudo liberan una menor cantidad de CO₂ que los parches con vegetación. Ya que los parches con vegetación poseen mayor cantidad de raíces y de microorganismos del suelo que los parches de suelo desnudo, se espera mayor flujo de CO₂ en esos parches. Por otro lado, y dado que el agua es uno de los principales factores impulsores de la actividad biológica en los ecosistemas áridos y semiáridos, se estableció la **hipótesis III**, que predice un aumento en la respiración del suelo después de un pulso de lluvia en ambos tipos de parches. El estudio fue desarrollado en las parcelas control del experimento de irrigación y fertilización descrito en el Capítulo I.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Variables ambientales

Se registraron las precipitaciones mensuales y las temperaturas medias mensuales desde junio de 2015 a mayo de 2016. Los datos fueron obtenidos de una estación meteorológica localizada a 600 m del sitio del estudio (Fuente: <http://sipas.inta.gob.ar/>).

2.2.2. Propiedades físico-químicas del suelo

Se determinaron las propiedades físico-químicas del suelo en tres de las cinco parcelas control que conformaron el diseño experimental aplicado en la presente tesis. En noviembre de 2015, se tomaron al azar tres muestras (5 cm de diámetro y hasta 5 cm de profundidad) de la capa superior del suelo en dos tipos de parches (suelo desnudo y parches con vegetación) y en cada parcela. Luego se mezclaron adecuadamente para producir una muestra compuesta de cada parcela y tipo de parche. Los parches con vegetación fueron definidos como los sitios que tenían una mezcla de arbustos y pastos

representativos del área de estudio. Los parches de suelo desnudo fueron definidos como sitios lo más alejados posible (al menos 50 cm) de los parches con vegetación o de cualquier planta individual. Las muestras fueron secadas al aire y tamizadas con una malla de 2 mm previo a los análisis. Para todas las muestras de suelo se determinó pH, conductividad eléctrica, materia orgánica, Nitrógeno total y Fósforo disponible. La salinidad se determinó en un extracto saturado, corregido posteriormente por la temperatura (Richards 1954) y los valores se informaron en dS m^{-1} a 25°C. El pH del suelo se determinó en una solución 1:2.5 de H₂O destilada y deionizada. La materia orgánica del suelo, el Nitrógeno total y el Fósforo disponible se analizaron en el Laboratorio de Suelos del INTA (EEA, Chubut, Argentina). La materia orgánica del suelo se determinó utilizando el método de oxidación húmeda (Walkley & Black 1934). El Nitrógeno total del suelo se determinó con el método Kjeldahl (Bremner 1996). El Fósforo disponible se midió utilizando el método de Olsen (Olsen et al. 1954).

2.2.3. Flujo de CO₂, temperatura y contenido de humedad del suelo

El flujo de CO₂ desde el suelo se determinó en ambos tipos de parches, mensual o bimestralmente durante todo el año, desde junio de 2015 a mayo de 2016 en tres parcelas. Se usó una cámara cerrada portátil para determinar la respiración del suelo (6400-09, LI-COR), conectada a un sistema de intercambio de gases (LI-6400, LI-COR) (Figura 2.1). La cámara cubre un área de 80 cm² y en el caso de los parches con vegetación las mediciones fueron realizadas lo más cerca posible de la base de los arbustos que conformaban la corona. Collares de PVC de 10 cm de diámetro y 4,4 cm de altura se insertaron en el suelo a 2,2 cm de profundidad un día antes de cada fecha de medición para permitir la estabilización del flujo de CO₂ previo a las mediciones. En cada periodo de medición se instalaron nuevos collares en otros sitios dentro de cada parcela. Para cada medición fueron necesarios entre 5 y 20 minutos, dependiendo de la época del año (en invierno las mediciones tomaron más tiempo porque las tasas de respiración del suelo son relativamente bajas), y cada una incluyó tres ciclos promediados consecutivos. Para evitar los efectos de las fuertes fluctuaciones diurnas de la temperatura del aire sobre la respiración del suelo, las mediciones se realizaron entre las 11:00 y las 15:00 hs, durante dos días consecutivos con condiciones climáticas similares en cada fecha de medición.

Durante cada medición de respiración se midió la temperatura del suelo a una profundidad de 0 a 10 cm con una sonda de temperatura del suelo del LI-6400. De manera similar, se midió el contenido volumétrico de agua del suelo (%) a una profundidad de 0 a 10 cm, cerca de los collares instalados utilizando sondas de capacitancia ECH2O (Decagon Devices, Inc.). Las sondas tienen una resolución de 0,1% y una sensibilidad de temperatura máxima de 0,003 m³/m³ por 1°C. Las sondas se calibraron en el laboratorio con muestras de suelo obtenidas del sitio de estudio (Pereyra et al. 2017).

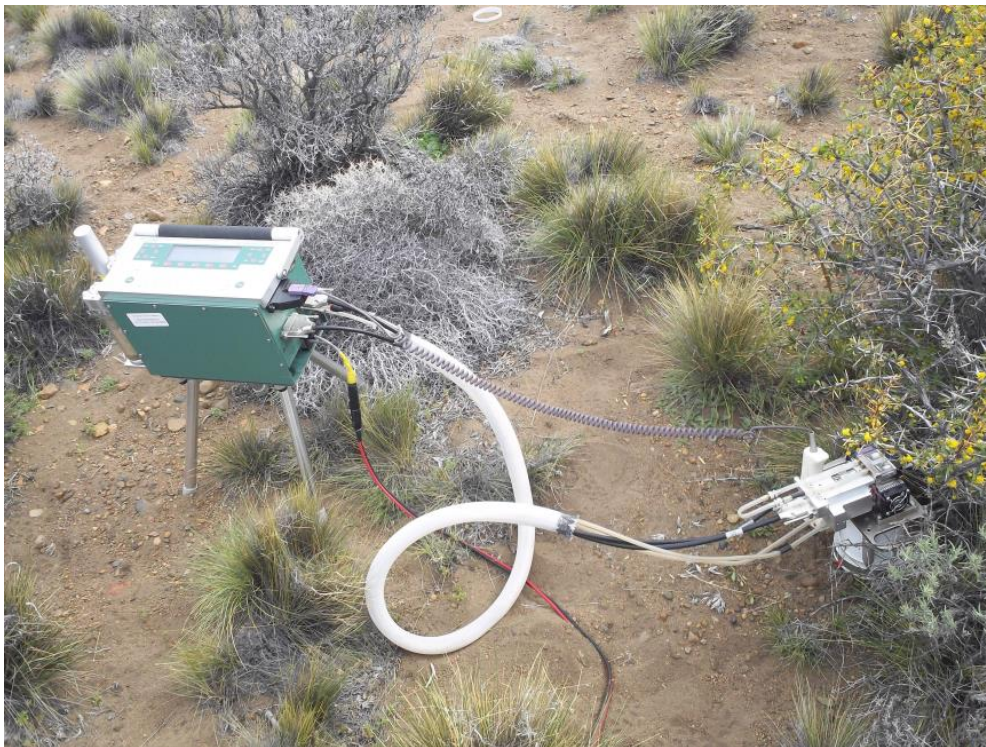


Figura 2.1. Sistema de intercambio de gases (LI-6400, LI-COR) conectado a una cámara cerrada portátil para la determinación de la respiración del suelo (6400-09, LI-COR).

2.2.4. Respuestas del flujo de CO₂ del suelo a un pulso de lluvia

En enero de 2015 se determinó el flujo de CO₂ desde el suelo previo a un evento de lluvia de 3,5 mm, un día y tres días después del evento. Las mediciones del flujo de emisión de CO₂ del suelo se realizaron siguiendo el mismo procedimiento que fue explicado anteriormente, en tres parcelas y cuatro medidas por parcela. Del mismo modo, el contenido de agua del suelo se midió a una profundidad de 0 a 10 cm, cerca de

los collares instalados en el suelo, utilizando las mismas sondas ECH2O mencionadas anteriormente.

2.2.5. Densidad de raíces y recuento de bacterias del suelo

Al final de cada medición de respiración del suelo se recolectaron muestras de suelo de 10 cm de diámetro y 10 cm de profundidad de cada collar instalado y se transportaron al laboratorio para su análisis. Las raíces fueron separadas cuidadosamente del suelo fresco tamizando con una malla de 0,5 mm. Luego las raíces se lavaron y se secaron en estufa a 70°C hasta peso constante. La densidad de raíces se determinó como masa seca de raíces por unidad de volumen de suelo.

Las bacterias heterótrofas cultivables de suelo superficial (0-5 cm) se determinaron en noviembre mediante el método de recuento de dilución en placa (ver Pepper & Gerba 2015). Se recogió una muestra de suelo (cada una de ellas consistió en un conjunto de 3 submuestras) en los dos tipos de parches en cada parcela. Para cada muestra, se pesó 1 g de suelo y se colocó en botellas de dilución que contenían 20 ml de solución salina estéril. Las botellas se agitaron a 1000 rpm durante 5 minutos, y luego se diluyó en serie 1 ml de la suspensión y se extendieron 0,1 ml sobre agar nutritivo. Las placas se incubaron a 25°C durante 4 días. Luego se contaron las colonias y se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC). Sólo las placas que contenían entre 30 y 300 colonias se consideraron para el recuento.

2.2.6. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software R versión 3.4.4 (R Development Core Team, 2018). Se utilizaron modelos lineales (ML) con test-F para evaluar el efecto del tipo de parche (variable explicativa) sobre las características químicas del suelo y el recuento de bacterias del suelo (variables dependientes). Se usaron modelos lineales ajustados de mínimos cuadrados (GLSs) con test-F para evaluar el efecto del tipo de parche (variable explicativa) sobre la densidad de raíces y sobre la respiración del suelo (variable dependiente), con estructura de correlación temporal (corAR1). También se utilizaron GLSs para evaluar el efecto de la interacción entre el tipo de parche y el mes (variables explicativas) sobre el contenido de agua del suelo, la

temperatura del suelo, la densidad de raíces y la respiración del suelo (variables dependientes), utilizando corAR1. Para evaluar el efecto del pulso de lluvia sobre el contenido de agua del suelo y el flujo de CO₂ del suelo, se realizaron GLSs con el factor tiempo con tres categorías (antes de la lluvia, 1 día después de la lluvia y 3 días después de la lluvia) y el factor tipo de parche y su interacción como variables explicativas. En ambos GLSs, se utilizó la estructura de correlación de simetría compuesta (corCompSym), pero este factor no fue significativo (prueba REML: $\chi^2 = 0.029$, $df = 1$, $p = 0.86$ para el GLS con contenido de agua en el suelo como variable dependiente, y $\chi^2 = 0.2$, $df = 1$, $p = 0.65$ para el GLS con flujo de CO₂ del suelo como variable dependiente), por lo cual se eliminó este factor de los modelos. El análisis post-hoc de Tukey se utilizó para evaluar las diferencias en el contenido de agua del suelo y el flujo de CO₂ del suelo después de la lluvia con respecto a antes de la lluvia. Se testeó un modelo de regresión múltiple, utilizando GLS, para evaluar el efecto de la interacción entre la temperatura del suelo y el contenido de agua del suelo (variables explicativas), con el tipo de parche como covariable, sobre el flujo de emisión de CO₂ del suelo (variable dependiente), utilizando corAR1. Se probó una regresión lineal entre la densidad de raíces (variable explicativa), con el tipo de parche como covariable, y el flujo de emisión de CO₂ del suelo (variable dependiente), utilizando corAR1. El R² de Cox y Snell (Cox & Snell 1989) fue calculado con la función “nagelkerke” del paquete de R “rcompanion” versión 2.1.7 (Mangiafico 2015). Los GLSs se llevaron a cabo utilizando la función “gls” del paquete de R “nlme” versión 3.1-131.1 (Pinheiro & Bates 2000). Cuando fue necesario, todos los modelos se ajustaron mediante modelos de varianza; la selección del modelo se basó en el criterio de información de Akaike (AIC) (Burnham & Anderson 2002). La simplificación de los efectos fijos de todos los modelos para alcanzar el modelo mínimo adecuado se llevó a cabo mediante una prueba de hipótesis (test-F). El análisis post-hoc de Tukey se utilizó para comparaciones múltiples en todos los modelos cuando el test-F fue significativo, utilizando la función “glht” del paquete de R “multcomp” versión 1.4-8 (Bretz et al. 2010). Para graficar los resultados del modelo mejor ajustado, se utilizó el paquete de R “visreg” versión 2.5-0 (Breheny & Burchett 2017).

2.3. RESULTADOS

La precipitación acumulada en el sitio de estudio desde junio de 2015 a mayo de 2016 fue de 101.9 mm. Alrededor del 70% de la precipitación ocurrió entre junio y septiembre (invierno) (Figura 2.2 A). La temperatura del aire media mensual varió entre 3°C en invierno y 16°C en verano (Figura 2.2 B).

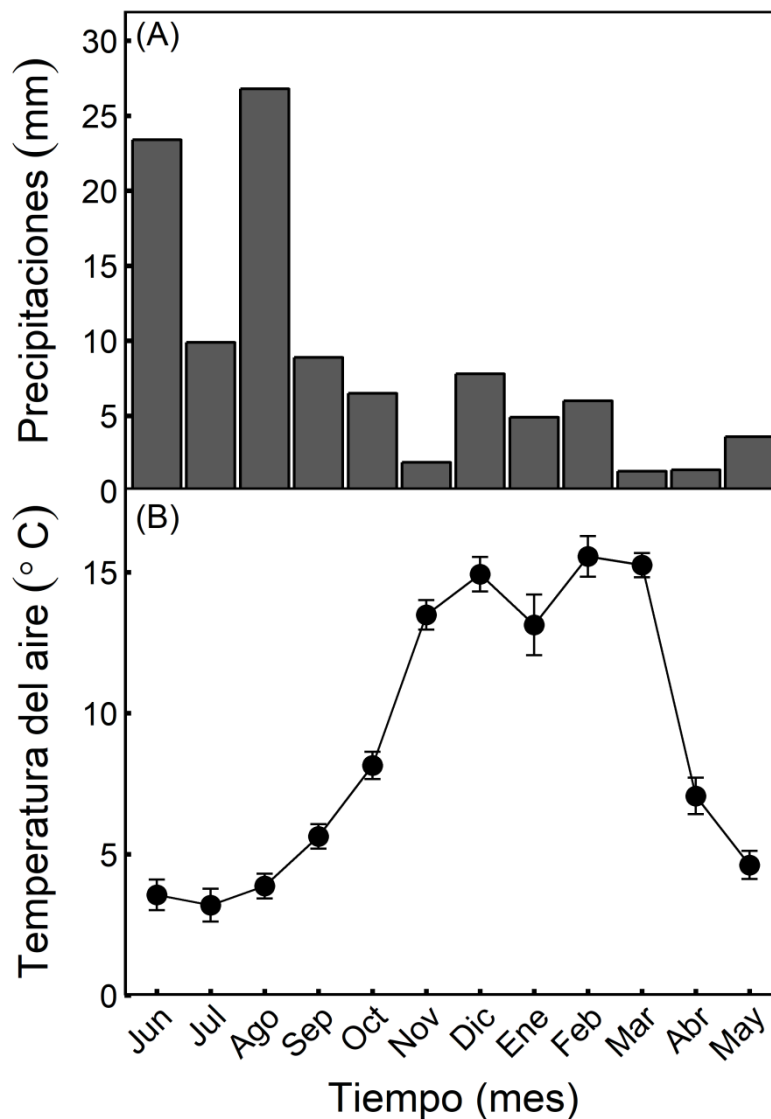


Figura 2.2. (A) Precipitaciones mensuales (mm) y (B) temperatura del aire media mensual (°C) durante el período de estudio (junio de 2015 a mayo de 2016) en una estepa patagónica. Los

datos fueron obtenidos de una estación meteorológica localizada a 600 m del sitio del estudio (Fuente: <http://sipas.inta.gob.ar/>).

Las propiedades químicas del suelo variaron entre los tipos de parche, excepto el pH (Tabla 2.1). La materia orgánica y el P disponible fueron significativamente mayores en los parches con vegetación que en los parches de suelo desnudo ($p = 0,005$ y $p = 0,006$, respectivamente). La conductividad eléctrica del suelo y el contenido de N fueron marginalmente más altos ($p = 0.087$ y $p = 0.07$, respectivamente) en los parches con vegetación que en los parches de suelo desnudo.

Tabla 2.1. pH, conductividad eléctrica (dS m^{-1}), materia orgánica (%), Nitrógeno total (%), Fósforo disponible (ppm), densidad de raíces media anual (mg cm^{-3}), flujo de CO_2 medio anual ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y bacterias heterótrofas totales ($\text{UFC} \times 10^5 \text{ g}^{-1}$ suelo) del suelo en parches de suelo desnudo y con vegetación. Cada valor representa la media + IC ($n = 3$). Se muestran el valor estadístico F, los grados de libertad (Df) y el valor de probabilidad p .

	Parches de suelo desnudo	Parches con vegetación	F	Df	<i>p</i>
pH	7,17 ± 0,24	7,13 ± 0,24	0,07	(1, 4)	0,8
Conductividad eléctrica (dS m^{-1})	0,14 ± 0,08	0,24 ± 0,08	5,08	(1, 4)	0,087
Materia orgánica (%)	0,48 ± 0,18	1,01 ± 0,18	32,3	(1, 4)	0,005
Nitrógeno total (%)	0,021 ± 0,04	0,067 ± 0,04	5,97	(1, 4)	0,07
Fósforo disponible (ppm)	11,5 ± 2,4	18,1 ± 2,4	28,4	(1, 4)	0,006
Densidad de raíces media anual (mg cm^{-3})	1,14 ± 0,25	2,31 ± 0,42	30,6	(1, 71)	<0,0001
Flujo de CO_2 medio anual ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,21 ± 0,05	0,31 ± 0,08	13,4	(1, 83)	0,0004
Bacterias heterotróficas totales ($\text{CFU} \times 10^5 \text{ g}^{-1}$ suelo)	19,8 ± 23,6	21,0 ± 23,6	0,01	(1, 4)	0,93

El contenido de agua en el suelo (Figura 2.3 A) varió estacionalmente en el área de estudio ($F_{(8,75)} = 77,7$, $p < 0.0001$) y entre los tipos de parche ($F_{(1,75)} = 14,3$, $p = 0,0003$), sin interacción significativa entre meses y tipos de parche ($F_{(8,67)} = 1,76$, $p = 0,1$). El contenido de agua en el suelo alcanzó el 30% en septiembre (final del invierno) y fue cercano a 10% de enero a mayo (verano a otoño). En los parches de suelo desnudo el contenido de agua del suelo fue 6,5% mayor ($p = 0,0002$) que en los parches con

vegetación. La temperatura del suelo y el contenido de agua del suelo mostraron patrones estacionales opuestos (Figura 2.3 B). La interacción entre los meses y los tipos de parche fue significativa ($F_{(8,67)} = 2,32, p = 0,03$) para la temperatura del suelo. La temperatura del suelo fue baja durante el invierno y alcanzó su valor máximo en enero. No hubo diferencias sustanciales en la temperatura del suelo entre los tipos de parche.

La densidad de raíces también varió estacionalmente y entre los tipos de parche ($F_{(7,64)} = 2,46, p = 0,03$ y $F_{(1,64)} = 27,4, p < 0,0001$, respectivamente; Figura 2.3 C), sin interacción significativa entre mes y tipo de parche ($F_{(7,57)} = 0,44, p = 0,87$). La densidad de raíces fue mayor en la primavera en ambos tipos de parche (Figura 2.3 C). La densidad de raíces fue más de dos veces mayor en los parches con vegetación que en los parches de suelo desnudo durante todo el año (Figura 2.3 C). Asimismo, la densidad de raíces media anual fue cerca de dos veces mayor en los parches con vegetación que en los parches de suelo desnudo (Tabla 2.1). El recuento de bacterias heterotróficas no mostró diferencias significativas entre los tipos de parche (Tabla 2.1).

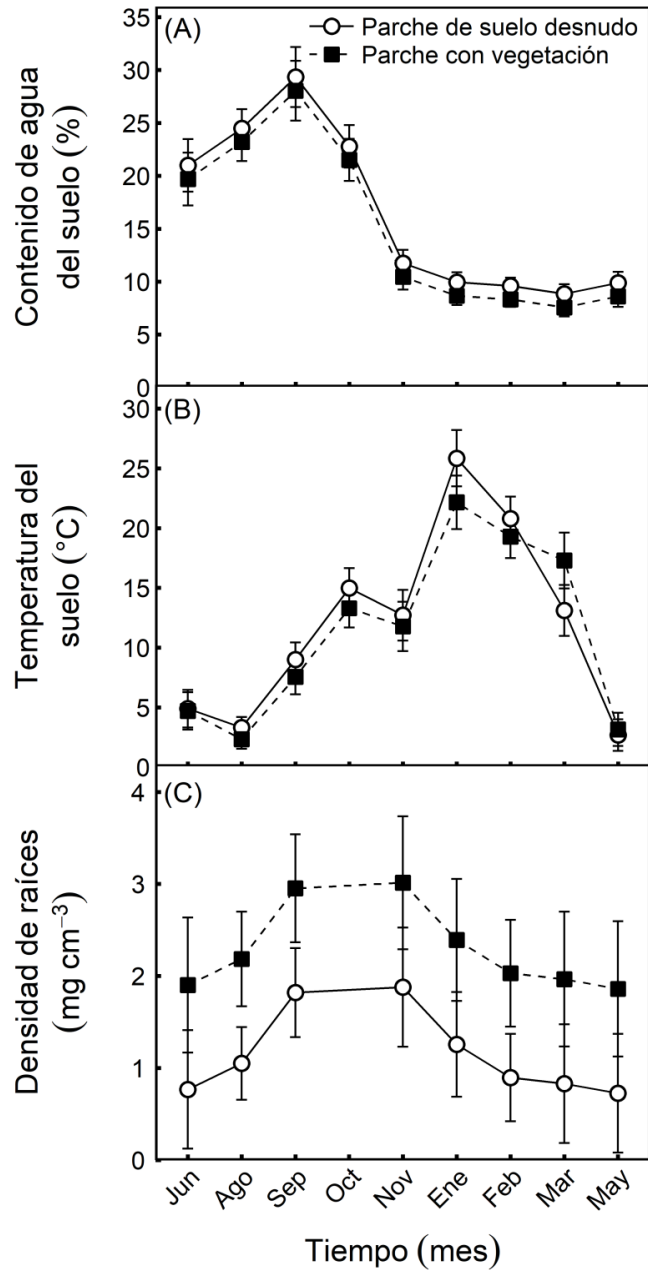


Figura 2.3. (A) Dinámica temporal del contenido volumétrico de agua del suelo a 0-10 cm de profundidad (%), (B) temperatura del suelo a 0-10 cm de profundidad (° C) y (C) densidad de raíces a 0-10 cm de profundidad (mg de masa seca cm⁻³) en parches de suelo desnudo (símbolos blancos) y en parches con vegetación (símbolos negros) durante el período de estudio (junio de 2015 a mayo de 2016) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media ± IC (n = 3).

El flujo de CO₂ desde el suelo en ambos tipos de parche mostró un fuerte patrón estacional ($F_{(8,75)} = 33,5$, $p < 0.0001$) (Figura 2.4). Los valores fueron bajos (por debajo de 0,3 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en invierno, verano y otoño. El flujo de CO₂ desde el suelo se

incrementó a fines del invierno (septiembre), alcanzando su valor máximo en noviembre y luego comenzó a disminuir a principios del verano (enero). Los valores máximos fueron cercanos a $0,6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El flujo de CO_2 desde los parches con vegetación fue mayor que el de los parches de suelo desnudo durante todo el año ($F_{(1,75)} = 22,1, p < 0,0001$). No hubo interacción significativa entre los meses y los tipos de parche ($F_{(8,67)} = 22,1, p = 0,55$). El flujo de CO_2 anual promedio del suelo en los parches con vegetación fue 48% mayor que en los parches de suelo desnudo ($p = 0,0004$; Tabla 2.1).

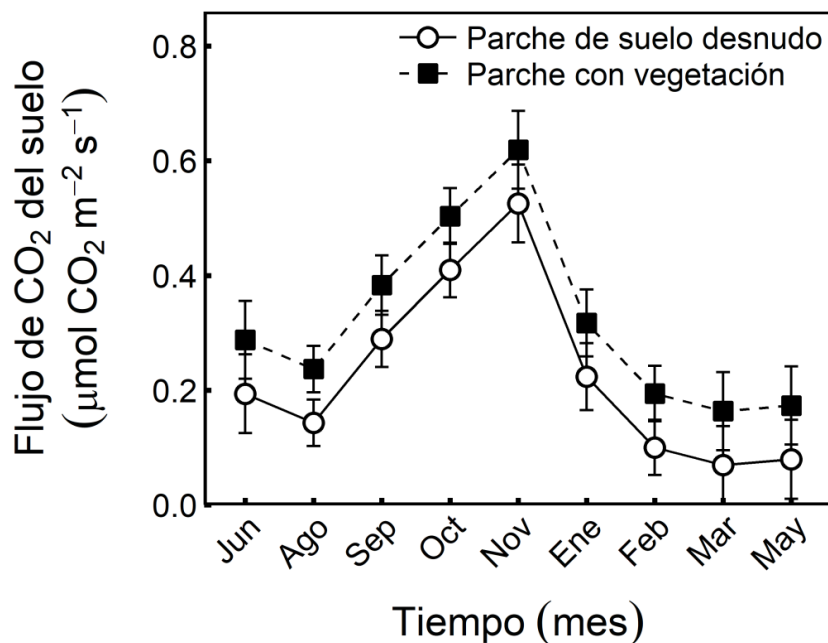


Figura 2.4. Dinámica temporal del flujo de CO_2 del suelo ($\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en parches de suelo desnudo (símbolos blancos) y en parches con vegetación (símbolos negros) durante el período de estudio (junio de 2015 a mayo de 2016) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media \pm IC ($n = 3$).

Un pulso de lluvia (3,5 mm) durante la estación seca (enero) aumentó 3 veces el contenido de agua superficial del suelo inmediatamente después del evento, pero regresó a los valores registrados antes de la lluvia tres días después del evento ($F_{(2,69)} = 62,1, p < 0,0001$ para el factor tiempo) (Figura 2.5 A). No hubo diferencias significativas entre los tipos de parche ($F_{(1,68)} = 0,71, p = 0,4$) ni interacción significativa entre el

tiempo y el tipo de parche ($F_{(2,66)} = 0,35, p = 0,71$) para el contenido de agua del suelo. El flujo de CO_2 desde el suelo mostró una respuesta diferencial a este pulso de agua dependiendo del tipo de parche (Figura 2.5 B). Hubo una interacción significativa entre el tiempo y el tipo de parche ($F_{(2,66)} = 3,19, p = 0.048$) para el flujo de CO_2 desde el suelo. Hubo un incremento significativo en el flujo de CO_2 en los parches con vegetación un día después del pulso de lluvia con respecto a los valores observados previo al evento de lluvia (Figura 2.5 B). Sin embargo, el flujo de CO_2 desde los parches de suelo desnudo no mostró respuestas significativas al pulso de lluvia. Después de tres días desde el pulso de lluvia, los valores de flujo de CO_2 desde el suelo fueron relativamente similares y sin diferencias significativas a los valores observados antes del evento de lluvia en ambos tipos de parche.

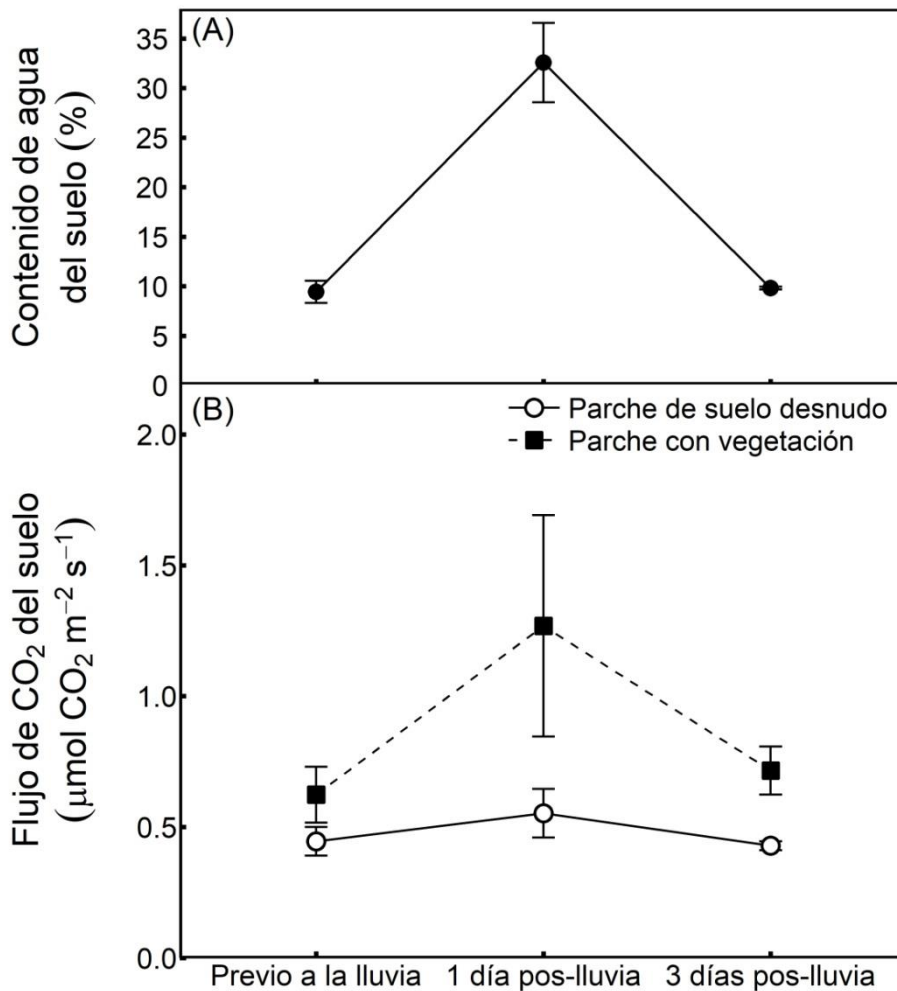


Figura 2.5. (A) Contenido volumétrico de agua en el suelo a 0-10 cm de profundidad (%) antes, al día siguiente y tres días después de un evento de lluvia discreto (3,5 mm) durante el verano. (B) Emisión de CO₂ desde el suelo ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) de parches de suelo desnudo y parches con vegetación antes, al día siguiente y tres días después de la lluvia. Los símbolos representan la media \pm IC (n = 3).

El flujo de CO₂ desde el suelo se correlacionó con la temperatura y el contenido de agua del suelo, con una interacción significativa entre ambos factores ($R^2 = 0,25$, $F_{(1,80)} = 10,6$, $p = 0,002$) y un efecto significativo del tipo de parche ($F_{(1,80)} = 15,2$, $p = 0,0002$). Los gráficos de contorno (Figura 2.6 A-B) mostraron que los valores más altos de respiración del suelo fueron observados cuando la temperatura y el contenido de agua en el suelo eran altos. A igual valor de temperatura y contenido de agua del suelo, la respiración del suelo desde los parches con vegetación fue mayor que la de los parches de suelo desnudo. La emisión de CO₂ desde el suelo también se correlacionó lineal y positivamente con la densidad de raíces (Figura 2.7), con una relación lineal y positiva ($R^2 = 0,36$, $F_{(1,71)} = 19,5$, $p < 0,0001$), sin diferencias estadísticamente significativas entre los tipos de parche ($F_{(1,70)} = 0,95$, $p = 0,33$).

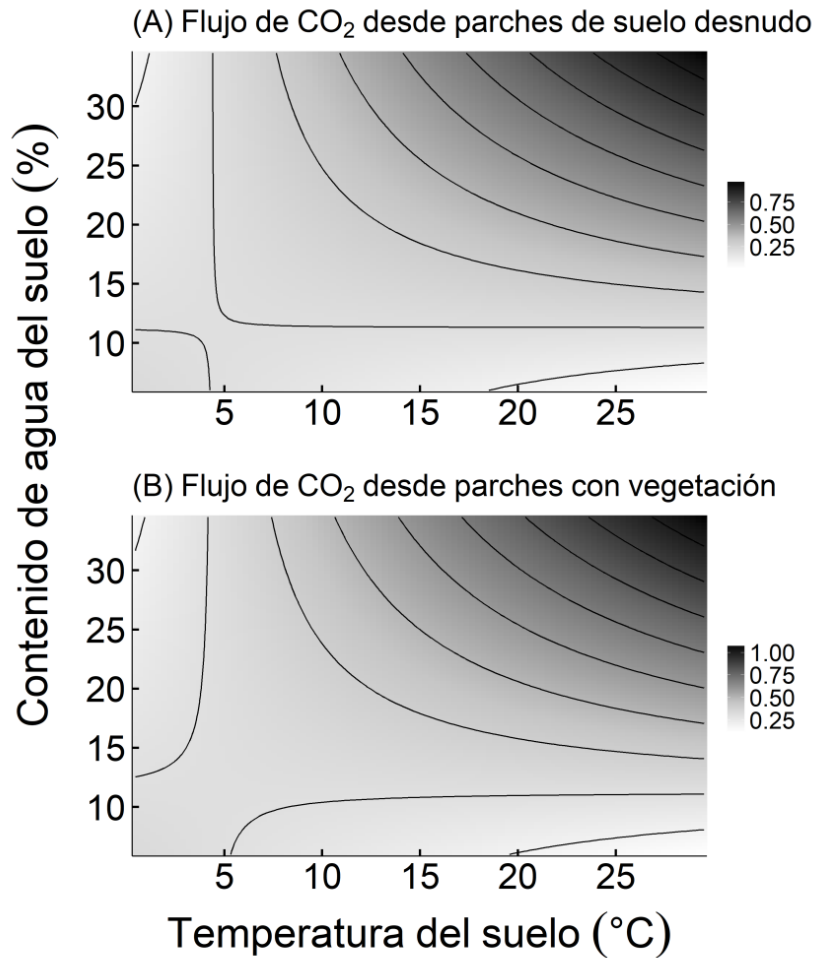


Figura 2.6. Diagramas de contorno de flujo de CO₂ del suelo ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en relación con el contenido volumétrico de agua del suelo a 0-10 cm de profundidad (%) y la temperatura del suelo a 0-10 cm de profundidad (°C) desde (A) parches de suelo desnudo y (B) parches con vegetación.

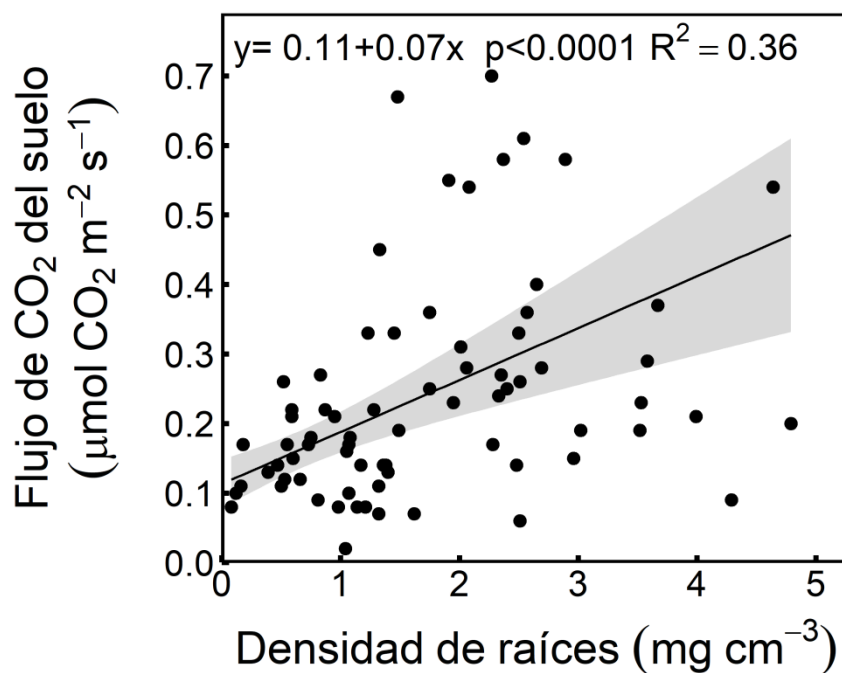


Figura 2.7. Relación entre el flujo de CO₂ del suelo ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y la densidad de raíces (mg cm^{-3}). Cada punto representa una muestra durante el período de estudio (junio de 2015 a mayo de 2016). La línea continua es la regresión lineal ajustada a todos los datos y la banda gris es el intervalo de confianza del 95%.

2.4. DISCUSIÓN

2.4.1. Dinámica estacional de la respiración del suelo

El flujo de CO₂ desde el suelo en la estepa patagónica se ubicó dentro del rango informado para otros ecosistemas áridos y semiáridos (Cable et al. 2011; Carbone, Winston, & Trumbore 2008; Maestre & Cortina 2003; Peri, Bahamonde, & Christiansen 2015; Xu & Shang 2016). Por ejemplo, el flujo anual promedio de CO₂ desde el suelo en el desierto de Mohave es de $0,33 \mu\text{mol m}^2 \text{ s}^{-1}$ y en Great Basin, un desierto frío similar a la estepa patagónica desde el punto de vista funcional, es de $0,97 \mu\text{mol m}^2 \text{ s}^{-1}$ (Cable et al. 2011). La emisión de CO₂ del suelo mostró una estacionalidad pronunciada. Una dinámica estacional similar en la respiración del suelo fue observada por Peri (2011) en pastizales semiáridos en la porción más austral de la Patagonia.

Para varios ecosistemas, los flujos de CO₂ desde el suelo aumentan exponencialmente con la temperatura y, a menudo, están limitados por la humedad

disponible del suelo (Carlyle & Than 1988; Fang & Moncrieff 2001; Xu & Shang 2016). Sin embargo, como Davidson, Belk, & Boone (1998) sugieren, es difícil y quizás imposible distinguir el efecto de la temperatura del suelo y la humedad del suelo por separado. En el presente estudio, el flujo de CO₂ desde el suelo mostró una relación significativa con la interacción entre la temperatura del suelo y el contenido de agua del suelo, aumentando la respiración con el aumento de ambas variables y estando limitada por valores bajos de ambas variables, concordando con la primera hipótesis planteada. Del mismo modo que en otros estudios (Curiel Yuste et al. 2003), la emisión de CO₂ desde el suelo, tanto del suelo desnudo como de parches con vegetación, se correlacionó altamente con los cambios en la temperatura del suelo solo cuando el agua no era limitante. Así, temperaturas altas combinadas con un bajo contenido edáfico de agua pueden limitar la respiración del suelo, como se observó durante el verano en el presente estudio. El contenido de agua en el suelo a una profundidad de 0-10 cm disminuyó a 10%, lo que probablemente resultó en una actividad microbiana y de raíces muy bajas. La disminución en la disponibilidad de agua en el suelo durante la estación seca afecta varios procesos fisiológicos que conducen a la deshidratación de la planta y a una pérdida sustancial de la funcionalidad de la raíz en este ecosistema (Bucci et al. 2013; Scholz et al. 2012). Por ejemplo, las raíces superficiales de *S. filaginodes* y *A. prolifera*, dos de las tres especies de arbustos dominantes en esta estepa, pierden hasta el 70% de su capacidad de absorción de agua durante el día (Bucci et al. 2013). Esto también se refleja en una disminución en la transpiración de la planta durante el período de sequía (Pereyra et al. 2017), lo que disminuye la captura de CO₂. Del mismo modo, es muy probable que durante la sequía de verano una parte de la biomasa microbiana muera y otra fracción de los microorganismos del suelo entren en latencia o formen esporas (Liu, Zhang, & Wan 2009; Schimel, Balsler, & Wallenstein 2007), lo que resultaría en una menor emisión de CO₂. Consistente con las bajas tasas de respiración de verano encontradas en este estudio, Gonzalez-Polo & Austin (2009) observaron una disminución del C de la biomasa microbiana y de la actividad de la beta-glucosidasa y aumentos de carbono orgánico extracelular durante el verano con respecto a la primavera en la estepa patagónica.

Por otra parte, las bajas temperaturas durante el invierno afectan la actividad fisiológica de las plantas. Durante el invierno varias especies de la estepa exhiben daño tisular (Scholz et al. 2012; Zhang et al. 2016), modificando la actividad metabólica. De

modo similar, Gonzalez-Polo & Austin (2009) observaron una disminución de la biomasa microbiana y de la actividad beta-glucosidasa durante el invierno en la estepa patagónica.

La relación lineal y positiva encontrada en este estudio entre la respiración del suelo y la densidad de raíces también ayudaría a explicar, al menos en parte, la estacionalidad de la respiración del suelo. En este estudio no se diferenció entre raíces vivas y muertas, pero el hecho de haber encontrado estacionalidad en la densidad de raíces a lo largo del año, da un indicio de que la actividad radical fue variable en el año. Ling-Hao et al. (2002) encontraron también una relación lineal, que explicó el 32% de la variabilidad estacional en la respiración del suelo debido a la variabilidad en la biomasa de raíces.

2.4.2. Características de los parches y variabilidad espacial del flujo de CO₂ del suelo

Los parches de suelo desnudo y los parches con vegetación en la estepa patagónica mostraron diferentes propiedades fisicoquímicas y biológicas. Se sabe que los arbustos y pastos en ecosistemas áridos y semiáridos forman “islas de fertilidad” que tienen mayores recursos de agua y nutrientes que el suelo desnudo (Aguar & Sala 1999; Austin et al. 2004; Garner & Steinberger 1989; Gonzalez-Polo & Austin 2009; Schlesinger et al. 1996). En el presente estudio se encontró menos materia orgánica, P, N y densidad de raíces en los parches de suelo desnudo que en los parches con vegetación, y el contenido de agua del suelo fue casi siempre igual en el suelo desnudo que en los parches con vegetación. A pesar de no ser consistente con algunos de los estudios precedentes mencionados, este patrón en la variabilidad espacial del contenido de agua del suelo era esperable. En un estudio previo en esta misma área se determinó una mayor absorción de agua por las raíces y una mayor pérdida de agua por transpiración en los parches con vegetación que la pérdida de agua a la atmósfera por evaporación directa de suelo desnudo (Pereyra et al. 2017). En consecuencia, el suelo desnudo podría mantener igual cantidad de agua que los parches con vegetación. La mayor densidad de raíces encontrada en los parches con vegetación que en los parches con suelo desnudo y la relación lineal positiva encontrada entre la respiración del suelo y la densidad de raíces, permitiría explicar, al menos en parte, la mayor respiración (que sería la porción autótrofa) en los parches con vegetación que en suelo desnudo.

A pesar de que el método de recuento en placa con agar como medio nutritivo presenta limitaciones debido a que solo puede ser contada una pequeña fracción de la población heterótrofa, se utilizó esta técnica solo con fines comparativos. Se sabe que la biomasa microbiana es heterogénea, siendo más alta en parches con vegetación que en suelo desnudo (Rousk & Bengtson 2014). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el recuento de bacterias heterótrofas entre los tipos de parches durante la primavera en este estudio, similarmente a los hallazgos de Prieto et al. (2011) para otros ecosistemas patagónicos semiáridos. En este estudio no se determinó la biomasa microbiana, sin embargo, otras investigaciones han observado una biomasa microbiana, actividad beta-glucosidasa y actividad deshidrogenasa (una medida de la actividad microbiana general del suelo) sustancialmente mayores en parches con vegetación que en suelo desnudo en ambientes áridos patagónicos (Gonzalez-Polo & Austin 2009; Prieto et al. 2011). A pesar de no ser un resultado concluyente, el conteo bacteriano en este estudio indicaría que no habría diferencias en la respiración heterótrofa entre parches con vegetación y parches de suelo desnudo, y que la respiración autótrofa sería el principal conductor de la variación espacial en la emisión de CO₂.

Además de la variación temporal en el flujo de CO₂ del suelo se observó una variación espacial a pequeña escala, siendo los flujos de CO₂ más altos en los parches con vegetación en comparación con los flujos de los parches de suelo desnudo, apoyando la segunda hipótesis de este estudio. Este hallazgo es consistente con los resultados de otros estudios en ecosistemas áridos (Cable et al. 2008; Sponseller 2007), aunque es contrario a los resultados de Rey et al. (2011) que observaron mayores flujos de emisión de CO₂ de áreas libres de vegetación que de áreas con vegetación en una estepa semiárida en España. Por lo general, esta variabilidad espacial dentro de un sitio no se tiene en cuenta al cuantificar la respiración del suelo a grandes escalas espaciales, pero es necesario resaltar la importancia de incluir esta variable en el análisis de la respiración del suelo. Cabe señalar que las determinaciones fueron realizadas al mediodía, cuando generalmente se observa un umbral de respiración del suelo diaria debido a la mayor temperatura. Esta es una limitación común de los estudios con mediciones manuales, sin embargo en este caso se comparan determinaciones realizadas durante el mismo periodo en diferentes sitios, por lo que tal limitación no compromete los resultados.

2.4.3. Respuestas del flujo de CO₂ del suelo a los pulsos de lluvia

En los ecosistemas áridos y semiáridos los pulsos de precipitación son desencadenantes importantes de la actividad biológica. Se registran aproximadamente 40 eventos de <5 mm por año en la estepa patagónica (Golluscio, Sala, & Lauenroth 1998). Aunque algunas especies de arbustos tienen raíces profundas y absorben la mayor parte del agua de las capas profundas del suelo (Bucci et al. 2009; Pereyra et al. 2017), otras especies de arbustos y pastos, que tienen raíces menos profundas, absorben la mayor parte del agua de las capas superiores del suelo, y utilizan frecuentemente los pulsos cortos de agua (Golluscio, Sigal Escalada, & Pérez 2009), por lo que tienden a crecer rápidamente durante el aumento transitorio del agua del suelo. De manera similar, la comunidad microbiana en estos suelos patagónicos puede responder rápidamente al aumento en la disponibilidad de agua en el suelo (Austin et al. 2004). Después de una lluvia de pequeña magnitud se observó un rápido y corto período de aumento de la actividad fisiológica autótrofa y/o heterótrofa en los parches con vegetación en el presente estudio, apoyando parcialmente la tercera hipótesis. Este incremento a corto plazo de la emisión de CO₂ desde el suelo después del pulso de lluvia, a menudo llamado "efecto abedul", es un fenómeno general en la mayoría de los ecosistemas áridos (Sponseller 2007; Yan et al. 2014). La magnitud del pulso de CO₂ liberado de los parches de vegetación, que duplicó el valor máximo medido durante el año a solo un día después del evento, sugiere que esta emisión podría resultar de la acumulación de microbios y de la necromasa vegetal, o la lisis de células microbianas, lo que aumenta la cantidad de sustrato para la actividad microbiana (Schimel, Balser, & Wallenstein 2007). Aunque se considera que los pulsos pequeños de lluvia solo favorecen la actividad de los microorganismos (Austin et al. 2004), es posible que la respiración autótrofa también aumente. La biomasa de raíces a 0-10 cm de profundidad del suelo representa más del 50% de la de todo el perfil de raíces en el sitio de estudio (Pereyra et al. 2017) y, además, las especies de gramíneas dominantes exhiben absorción de agua desde la superficie de la hoja después de un pulso de agua durante la estación seca, lo cual mejora el estado hídrico de la planta (Cavallaro et al. en revisión) y probablemente la tasa fotosintética. El aporte de los foto-asimilados puede aumentar la respiración de las raíces o la actividad microbiana en respuesta a la exudación de las raíces durante unas pocas horas (Han et al. 2014a).

A diferencia de los parches con vegetación, en los parches de suelo desnudo no hubo un aumento sustancial en el flujo de CO₂ después del aumento transitorio en el contenido de humedad de la capa superior del suelo, contradiciendo parte de la tercera hipótesis propuesta. Esto fue llamativo porque aunque los parches de suelo desnudo tenían una menor densidad de raíces que los parches con vegetación, estos no carecían de raíces, por lo cual se esperaba un aumento en el flujo de CO₂ en respuesta a la lluvia. Además, no se encontraron diferencias en la cantidad de bacterias heterótrofas entre ambos tipos de parches, por lo cual se esperaba un aumento en la respiración del suelo desnudo derivado de la respiración heterotrófica. Se encontraron resultados diferentes en otros ecosistemas áridos donde los parches de suelo desnudo tienen una respuesta similar o incluso mayor a los eventos de lluvia que los parches con vegetación (Cable et al. 2008; Song et al. 2012).

2.5. CONCLUSIONES

El flujo de CO₂ desde el suelo en la estepa patagónica exhibió un fuerte patrón estacional, alcanzando su máximo valor en primavera. Los resultados indican que, a escala estacional, la fuerza impulsora para el flujo de CO₂ del suelo es tanto la temperatura del suelo como su contenido de agua, estando la respiración del suelo limitada por valores bajos de ambos factores. Aunque en este estudio no se diferenció la respiración autótrofa de la heterótrofa, la cantidad de raíces fue determinante, al menos en parte, de la respiración del suelo en la estepa patagónica. Aunque los flujos de CO₂ desde el suelo en los parches con cobertura vegetal fueron mayores que los del suelo desnudo, teniendo en cuenta la proporción de cada tipo de cobertura del suelo en el sitio de estudio (cobertura vegetal del 35% y suelo desnudo del 65%; Pereyra et al. 2017), la contribución del suelo desnudo al flujo de CO₂ total desde el suelo sería similar a la contribución de los parches con vegetación en periodos libres de lluvia (en un área de un metro cuadrado el aporte medio anual del suelo desnudo sería de 0,14 μmol CO₂ s⁻¹ y el de parches con vegetación sería de 0,11 μmol CO₂ s⁻¹). En este estudio se destaca la importancia de considerar la heterogeneidad del ambiente en la estimación del flujo de CO₂ del suelo a nivel del ecosistema.

Las especies de arbustos dominantes de la estepa patagónica tienen tasas de asimilación neta relativamente altas (5 a 15 μmol m⁻² s⁻¹) durante la primavera y el

verano (ver Capítulo V de esta tesis). Es así que la estepa patagónica podría funcionar como un sumidero durante una parte del año. Si otros estudios muestran que la fijación de carbono es mayor que la pérdida de C por respiración del suelo y la vegetación, entonces este ecosistema árido podría contribuir sustancialmente al secuestro de CO₂ global debido a su gran extensión geográfica, y tal como fue observado para ecosistemas áridos y semiáridos alrededor del mundo (Ahlström et al. 2015). Futuras investigaciones deberían incluir el análisis del intercambio neto de carbono de este ecosistema

Por otra parte, los resultados de este estudio sugieren que los pulsos de lluvia durante los períodos secos pueden conducir a un aumento transitorio del flujo de CO₂ desde el suelo en los parches con vegetación, lo que puede contribuir significativamente al balance anual de carbono del ecosistema. Esto infiere a pensar que las mediciones manuales de emisión de CO₂ desde el suelo, que son esencialmente puntuales, constituyen una limitación importante puesto que no reflejan estos cambios a corto plazo, lo que podría resultar en una subestimación del flujo de CO₂ total del suelo en la estepa patagónica. Sin embargo, este hallazgo revela que los cambios en el número de eventos pequeños de lluvia, así como los cambios en la cobertura vegetal podrían tener grandes consecuencias en la ecología del suelo y la bioquímica de ecosistemas secos y heterogéneos.

Capítulo III

Efecto de la irrigación y fertilización sobre las emisiones de CO₂ desde el suelo en la estepa patagónica

Efectos de la irrigación y fertilización sobre las emisiones de CO₂ desde el suelo en la estepa patagónica

3.1. INTRODUCCIÓN

Muchos estudios sobre los efectos del cambio climático en los ecosistemas terrestres han indicado cambios significativos en los procesos ecológicos que ocurren en el suelo, como la mineralización de Nitrógeno y la respiración del suelo (Emmett et al. 2004; Wang et al. 2014). Estos procesos son extremadamente sensibles a las alteraciones de la temperatura y la precipitación (Liu, Zhang, & Wan 2009), por lo que el cambio climático podría afectar funciones clave del ecosistema, como la disponibilidad de nutrientes y el almacenamiento y el ciclo del Carbono. La respiración, el principal flujo de CO₂ desde el suelo, es uno de los principales procesos de pérdida de C a la atmósfera (Conant, Klopatek, & Klopatek 2000), y se puede originar como respiración autótrofa o heterótrofa (Hanson et al. 2000; Högberg et al. 2001). Además, durante la mineralización llevada a cabo por microorganismos del suelo, el N orgánico es transformado en inorgánico a través de la amonificación y nitrificación (Butterbach-Bahl & Gundersen 2011), al mismo tiempo que ocurre una liberación de CO₂ producto de la actividad microbiana. En los últimos años se ha reconocido que parte de la materia orgánica también es degradada por factores abióticos como la radiación solar (Austin & Vivanco 2006), a través de la cual se libera una fracción de CO₂. Tanto la emisión de CO₂ desde el suelo como su concentración de Nitrógeno inorgánico y las tasas de mineralización presentan una dinámica estacional y varían entre ecosistemas (Austin & Sala 2002; Reichmann, Sala, & Peters 2013; Schimel, Bilbrough, & Welker 2004; Yahdjian, Sala, & Austin 2006; Zhang et al. 2011; Zhao et al. 2010).

Varios factores modifican tanto el flujo de CO₂ como la mineralización del suelo, tales como la temperatura y la humedad edáfica (Briones et al. 2009; Butterbach-Bahl & Gundersen 2011; Cabrera 2007; Celaya-Michel & Castellanos-Villegas 2011; Conant, Klopatek, & Klopatek 2000; Davidson, Belk, & Boone 1998; Fang & Moncrieff 2001; Hursh et al. 2017; Kelliher et al. 2004; Liu, Zhang, & Wan 2009; Rustad et al. 2001; Zak et al. 1999) así como el contenido de nutrientes (Hu et al. 2009;

Janssens et al. 2010; Sinsabaugh et al. 2015; Zhang et al. 2011). Por lo tanto, modificaciones en estos factores tienen el potencial de variar estos procesos. En general, la temperatura del suelo tiene una mayor influencia sobre la actividad microbiana y consecuentemente sobre la mineralización que la humedad del suelo (Zak et al. 1999). Aun así, una disminución en la humedad edáfica debido a sequía puede disminuir la respiración del suelo y la mineralización en ambientes áridos (Wang et al. 2014), mientras que un aumento en la humedad puede tener el efecto opuesto (Kelliher et al. 2004; Rey et al. 2016). Burke, Lauenroth, & Parton (1997) mostraron que la adición de agua puede promover la mineralización neta del N y, en consecuencia, aumentar la disponibilidad de N del suelo. La fertilización puede modificar la disponibilidad de los nutrientes en el suelo, el pH o la composición de la comunidad microbiana, lo cual afecta la transformación y descomposición de los compuestos orgánicos por los microorganismos y finalmente la emisión de CO₂. Algunos estudios indican que la fertilización disminuye la emisión de CO₂ desde el suelo (Burton et al. 2004; Hagedorn, Bucher, & Schleppei 2001; Haynes & Gower 1995; Janssens et al. 2010) a través de una disminución en la respiración heterótrofa (Treseder 2008; Zhou et al. 2014). Sin embargo, otros estudios sugieren que el aumento en la productividad primaria neta y así en la producción de broza por la fertilización estimula la actividad microbiana y por lo tanto la mineralización y la respiración heterótrofa (Zhang et al. 2011). Además, altos niveles de amonio provenientes de la fertilización química pueden llevar a retrasos significativos en el proceso de nitrificación (Cabrera 2007), modificando la relación nitrato / amonio (Reichmann, Sala, & Peters 2013).

Las regiones áridas y semiáridas se caracterizan por poseer flujos bajos de CO₂ desde el suelo (Maestre & Cortina 2003; Rustad et al. 2001) y de mineralización (Bertiller et al. 2006; Mazzarino et al. 1998; Yahdjian & Sala 2008) comparada con otros ecosistemas alrededor del mundo. Estas regiones se caracterizan por eventos de lluvia discretos e impredecibles que permiten que solo se humedezca la parte superior del suelo (Paruelo & Sala 1995; Sala et al. 1989). Tales pulsos de lluvia tienen impactos cruciales en el flujo de CO₂ del suelo y en la mineralización produciendo pulsos de emisión de CO₂ a la atmósfera (Carbonell Silletta et al. 2019; Davidson, Belk, & Boone 1998; Jarvis et al. 2007; Kelliher et al. 2004). De la misma manera, la descomposición microbiana de la materia orgánica ocurre esencialmente en períodos cortos cuando la materia orgánica y el suelo están húmedos y las temperaturas del suelo son moderadas

(Celaya-Michel & Castellanos-Villegas 2011). Los microorganismos responden rápidamente a la disponibilidad de humedad en el suelo, incluso cuando se trata de un evento pequeño que solo humedece la superficie (Austin et al. 2004). Sin embargo, en algunos experimentos de irrigación no se ha observado una respuesta en la mineralización (Fisher & Whitford 1995; Fisher et al. 1987; Schimel & Parton 1986) o bien se han encontrado respuestas positivas en la nitrificación pero negativas en la amonificación (Yahdjian & Sala 2008). Incluso se ha observado un incremento en el N inorgánico del suelo bajo condiciones de sequía en ecosistemas áridos (Reynolds et al. 1999; Whitford, Martinez-Turanzas, & Martinez-Meza 1995; Yahdjian, Sala, & Austin 2006). Durante los períodos de sequía, los microorganismos del suelo incorporan solutos para ajustes osmóticos ante la ausencia de agua en el suelo, inmovilizando los nutrientes disponibles en el ambiente (Celaya-Michel & Castellanos-Villegas 2011). Tanto el amonio como el nitrato pueden ser absorbidos por las plantas o inmovilizados por los microorganismos quienes compiten por ellos en condiciones limitantes de N (Butterbach-Bahl & Gundersen 2011; Ueda, Tokuchi, & Hiura 2015).

La estepa patagónica es una región fría y árida/semiárida donde el agua (Bucci et al. 2009; Pereyra et al. 2017) y los nutrientes, principalmente el N, son muy escasos (Austin et al. 2004; Bertiller et al. 2006; Gherardi, Sala, & Yahdjian 2013). En este ecosistema la estación de crecimiento ocurre cuando las temperaturas comienzan a incrementar y la disponibilidad de agua en el suelo comienza a disminuir (primavera), tal que existe un asincronismo en los factores ambientales clave para el crecimiento de la vegetación (Austin et al. 2004; Bertiller et al. 2006), la cual tiene una distribución heterogénea tal que los arbustos y las gramíneas se agrupan formando islas de fertilidad (Aguilar et al. 1996; Golluscio, Sigal Escalada, & Pérez 2009; Mazzarino et al. 1998; Soriano, Sala, & Perelman 1994). Como en la mayoría de los ecosistemas áridos, el mayor porcentaje del C orgánico se encuentra en el suelo (Peri 2011). En general los ecosistemas áridos han recibido menos atención en el estudio de las emisiones de CO₂ desde el suelo que otros ecosistemas (Xu & Shang 2016). Aunque existen algunos estudios sobre el flujo de CO₂ en el suelo (Carbonell Silletta et al. 2019; Peri, Bahamonde, & Christiansen 2015; Capítulo II de esta tesis) y sobre la mineralización para las estepas patagónicas (Austin et al. 2004; Yahdjian & Sala 2008; Yahdjian, Sala, & Austin 2006), no hay estudios que hayan evaluado los efectos de la adición de agua y nutrientes a largo plazo sobre estos procesos y su interacción. El objetivo específico de

este estudio consistió en determinar el impacto del aumento en la disponibilidad de nutrientes y agua sobre las emisiones de CO₂ desde el suelo y de las tasas de mineralización de Nitrógeno en la estepa patagónica, teniendo en cuenta la heterogeneidad espacial y la variabilidad estacional de este ambiente. La primera **hipótesis** propuesta fue que la respiración autótrofa (raíces) disminuye en los tratamientos fertilizados e irrigados, ya que un cambio en la relación fuente-sumidero de las plantas cuando se aumenta la disponibilidad de agua y nutrientes favorecería la asignación de foto-asimilados a la parte aérea de la vegetación en detrimento del crecimiento de raíces (Boot & Dubbelden 1990), de modo que disminuiría el sustrato para la liberación de CO₂ autótrofo desde el suelo. Por otra parte, la segunda **hipótesis** plantea que la mineralización de Nitrógeno aumenta con la adición de agua y de nutrientes, dado que incrementan los recursos para que tal proceso ocurra. Para ello se diseñó un experimento manipulativo a campo como el descrito en el Capítulo I donde se evaluaron las propiedades físico-químicas del suelo, la densidad de raíces, las unidades formadoras de colonias bacterianas, la respiración del suelo, la amonificación y la nitrificación en parcelas control (C), irrigadas (I), fertilizadas (F) e irrigadas y fertilizadas (I +F).

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Propiedades químicas del suelo

Se determinó en tres parcelas por tratamiento (C, F, I e I+F): pH, salinidad, materia orgánica (MO), Nitrógeno total y Fósforo disponible para muestras de suelo colectadas en noviembre de 2015, del mismo modo que se mencionó en el Capítulo II. A su vez, se obtuvo la relación C/N, utilizando el factor propuesto por Van Bemmelen de 1,724 para determinar el contenido de carbono a partir del contenido de MO, el cual asume que el 58% de la MO está compuesta por C (Tabatabai, 1996). Las determinaciones fueron realizadas teniendo en cuenta dos tipos de parches (parches vegetados y parches de suelo desnudo).

3.2.2. Flujo de CO₂, temperatura, contenido de humedad, densidad de raíces y recuento de bacterias del suelo

El flujo de emisión de CO₂ del suelo se determinó de igual manera que en el Capítulo II. Las mediciones fueron tomadas mensual o bimestralmente durante todo el año, de junio de 2015 a mayo de 2016, en días consecutivos con condiciones climáticas similares en cada fecha de medición, en tres parcelas de cada tratamiento. Luego de retirar la cámara de respiración, se procedió a medir la temperatura del suelo y su contenido volumétrico de agua a una profundidad de 0 a 10 cm, y se colectó el suelo hasta 10 cm de profundidad para la determinación de la densidad de raíces, del mismo modo en que fue descrito en el Capítulo II. El recuento de bacterias del suelo fue realizado como se indicó en el Capítulo II, en muestras de suelo colectadas en noviembre de 2015.

3.2.3. Dinámica del Nitrógeno del suelo

Las tasas de mineralización de N del suelo fueron estimadas *in situ* en tres periodos entre junio de 2015 a mayo de 2016. En cada ocasión, un tubo de PVC de 5 cm de diámetro y 10 cm de largo fue enterrado en el suelo a una profundidad de 7,5 cm en cada tipo de parche y en cada parcela. Los tubos fueron colocados en noviembre de 2015 (primavera), febrero de 2016 (verano) y mayo de 2016 (otoño), y fueron dejados enterrados en el mismo sitio por 1-2 meses. Al momento de la colocación de los tubos, una muestra de suelo de 5 cm de diámetro y 10 cm de profundidad cercana al lugar donde fue instalado cada tubo, fue extraída para la determinación del contenido de N inorgánico inicial. Al final de cada periodo de incubación, cada muestra de suelo recolectado de los tubos fue transferida al laboratorio. Las muestras de suelo fresco fueron tamizadas con una malla de 2 mm y, una vez congeladas, fueron enviadas al Laboratorio de Suelos (INTA Balcarce, Argentina) para analizar el contenido de N inorgánico del amonio (NH₄⁺-N) y del nitrato (NO₃⁻-N) mediante un método de destilación (Bremner & Keeney 1965). Las tasas de amonificación y nitrificación fueron determinadas a partir de la diferencia entre el contenido inicial y final de NH₄⁺-N y NO₃⁻-N en el suelo, respectivamente, durante cada período de incubación, dividida por el número de días, y expresada en mg N kg suelo⁻¹ mes⁻¹. La relación NH₄⁺-N/NO₃⁻-N del suelo fue calculada con los valores de contenido inicial en cada una de las tres estaciones.

3.2.4. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software R versión 3.4.4 (R Development Core Team, 2018). Se utilizaron modelos lineales (ML) con test-F para evaluar el efecto del tipo de parche y del tratamiento (variables explicativas) sobre las características químicas del suelo y el recuento de bacterias del suelo (variables dependientes). Se usaron modelos lineales ajustados de mínimos cuadrados (GLSs) con test-F para evaluar el efecto del tipo de parche y del tratamiento (variables explicativas) sobre la densidad de raíces y sobre la respiración del suelo (variables dependientes), con estructura de correlación temporal (corAR1). También se utilizaron GLSs para evaluar el efecto de la interacción entre el tratamiento, el tipo de parche y el mes (variables explicativas) sobre el contenido de agua del suelo, la temperatura del suelo, la densidad de raíces y la respiración del suelo (variables dependientes), utilizando corAR1. En el GLS con respiración del suelo como variable dependiente, se usó la variable temperatura del suelo como covariable, con un factor lineal y uno cuadrático, dada la alta dependencia de la respiración del suelo con la temperatura del momento en que se mide. Se testeó un modelo de regresión múltiple, utilizando GLS, para evaluar el efecto de la interacción entre la temperatura del suelo y el contenido de agua del suelo (variables explicativas), con el tipo de parche y el tratamiento como covariables, sobre el flujo de emisión de CO₂ del suelo (variable dependiente), utilizando corAR1. Y se probó una regresión lineal entre la densidad de raíces (variable explicativa), con el tipo de parche y el tratamiento como covariables, y el flujo de emisión de CO₂ del suelo (variable dependiente), utilizando corAR1. Se utilizaron modelos lineales (ML) con test-F para evaluar el efecto de la interacción entre el tipo de parche, el tratamiento y la estación del año (variables explicativas) sobre el contenido de N en forma de amonio y de nitrato inicial y sobre la relación amonio/nitrato (variables dependientes). Para analizar el efecto de la interacción entre el tipo de parche y la estación del año (variables explicativas) sobre las tasas de amonificación y nitrificación (variables dependientes), se usaron MLs con test-F. Se testearon regresiones lineales entre la concentración de amonio y nitrato inicial (variables explicativas) con las tasas de amonificación y nitrificación (variables dependientes), respectivamente, utilizando las medias por estación, tipo de parche y tratamiento. El R² de Cox y Snell (Cox y Snell 1989) fue calculado con la función “nagelkerke” del paquete de R “rcompanion” versión 2.1.7

(Mangiafico 2015). Los GLSs se llevaron a cabo utilizando la función "gls" del paquete de R "nlme" versión 3.1-131.1 (Pinheiro & Bates 2000). Cuando fue necesario, todos los modelos se ajustaron mediante modelos de varianza; la selección del modelo se basó en el criterio de información de Akaike (AIC) (Burnham & Anderson 2002). La simplificación de los efectos fijos de todos los modelos para alcanzar el modelo mínimo adecuado se llevó a cabo mediante una prueba de hipótesis (test-F). El análisis post-hoc de Tukey se utilizó para comparaciones múltiples en todos los modelos cuando el test-F fue significativo, utilizando la función "glht" del paquete de R "multcomp" versión 1.4-8 (Bretz et al. 2010). Cuando se hicieron comparaciones entre tratamientos, solo se comparó cada tratamiento (F, I o I+F) con respecto al control. Para graficar los resultados del modelo mejor ajustado, se utilizó el paquete de R "visreg" versión 2.5-0 (Breheny & Burchett 2017). Los gráficos se elaboraron en función de los resultados de los análisis, tomando en cuenta las interacciones significativas entre factores.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Propiedades fisicoquímicas del suelo

La dinámica temporal del contenido de agua del suelo a 0-10 cm de profundidad fue similar en ambos tipo de parches y en los tratamientos (Figura 3.1 A-B). El contenido de agua del suelo fue mayor entre junio y octubre y menor entre noviembre y mayo. Hubo diferencias significativas en la humedad del suelo entre los tratamientos, los tipos de parche y los meses, con una interacción significativa entre el tipo de parche y el mes ($F_{(8,311)} = 2,1$, $p = 0,0306$) y entre el tratamiento y el mes ($F_{(24,311)} = 1,92$, $p = 0,0066$). Mayor contenido de agua del suelo fue observado en las parcelas irrigadas con respecto al control en agosto ($p = 0,088$) y octubre ($p = 0,014$) (Figura 3.1 A), y fue mayor en los parches de suelo desnudo que en los parches con vegetación en noviembre, enero, febrero y mayo ($p < 0,01$ en todos los meses) (Figura 3.1 B).

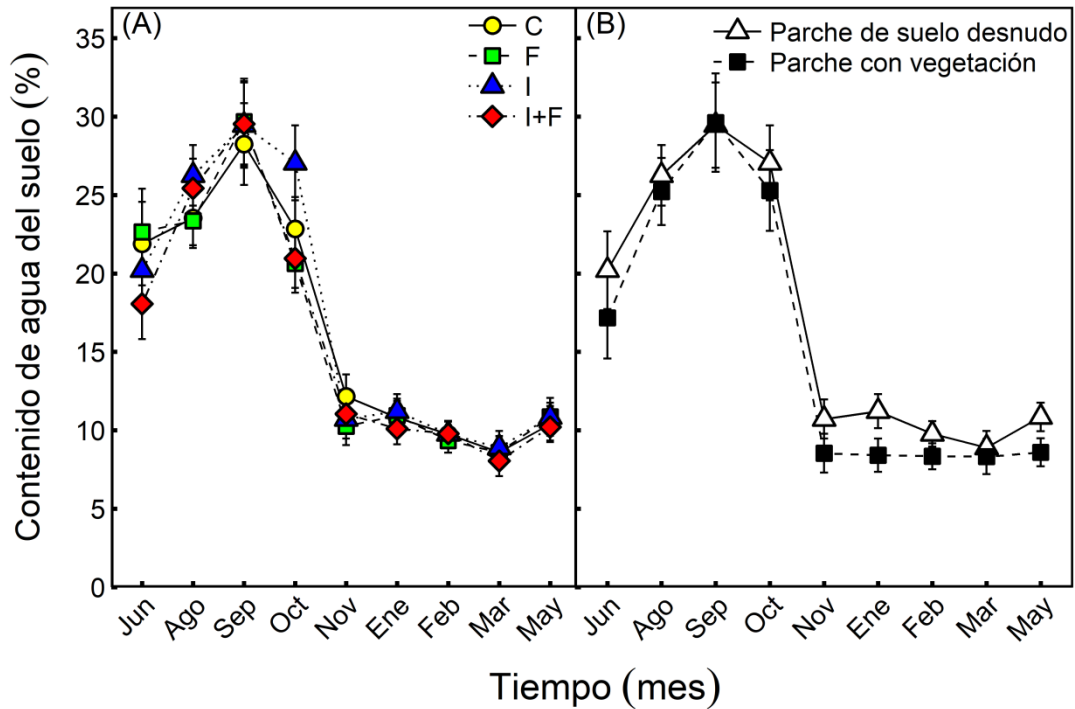


Figura 3.1. Dinámica temporal en el contenido volumétrico de agua del suelo a 0-10 cm de profundidad (%) para cada tratamiento (A): control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F), y para cada tipo de parche (B): parche de suelo desnudo y parche con vegetación, durante el periodo de estudio (junio 2015 a mayo 2016) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media \pm IC (n= 3).

El pH y la conductividad eléctrica fueron significativamente diferentes entre los tratamientos y los tipos de parche, con interacciones significativas (Tabla 3.1). El pH fue más bajo y la conductividad eléctrica más alta en las parcelas fertilizadas y en I+F que en las parcelas control en ambos tipos de parche ($p < 0,05$ en todos los casos) (Tabla 3.1). A su vez, se observó una mayor conductividad eléctrica en los parches con vegetación que en suelo desnudo solo en las parcelas F ($p < 0,001$) e I+F ($p = 0,059$) (Tabla 3.1). La materia orgánica, el Nitrógeno total y el Fósforo disponible fueron mayores en los parches con vegetación que en el suelo desnudo (Tabla 3.1). El contenido de materia orgánica no mostró diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 3.1). El Nitrógeno total fue mayor en las parcelas I+F ($p = 0,045$) y el Fósforo disponible en las parcelas F ($p < 0,0001$) e I+F ($p < 0,0001$) que en las parcelas control en ambos tipos de parche (Tabla 3.1). No se encontraron diferencias en la relación C/N entre los tratamientos ni entre los tipos de parche (Tabla 3.1).

3.3.2. Densidad de raíces, densidad de bacterias heterotróficas y flujo de CO₂ del suelo

La densidad de raíces varió significativamente entre los tratamientos ($F_{(3,335)} = 4,24$, $p = 0,0058$), siendo mayor en las parcelas I+F que en las parcelas control ($p=0,005$) (Figura 3.2). También la densidad de raíces varió entre los tipos de parche y los meses, con interacción significativa ($F_{(8, 335)} = 4,07$, $p = 0,0001$). La densidad de raíces fue más alta en los parches con vegetación que en suelo desnudo en casi todos los meses ($p < 0,01$), excepto en noviembre, marzo y mayo ($p > 0,05$) (Figura 3.2). La densidad media anual de raíces fue significativamente diferente entre tratamientos y entre tipos de parche, siendo mayor en las parcelas I+F que en las control ($p = 0,006$) y mayor en los parches con vegetación que en suelo desnudo (Tabla 3.1). Por otro lado, el recuento de bacterias heterotróficas en el suelo no mostró diferencias significativas entre los tratamientos ni entre tipos de parche (Tabla 3.1).

El flujo de CO₂ desde el suelo varió entre meses, tipos de parche y tratamientos, con interacción significativa entre mes y tipo de parche ($F_{(8,309)} = 6,83$, $p < 0,0001$) y entre tratamiento y mes ($F_{(24,309)} = 4,31$, $p < 0,0001$) (Figura 3.3). La covariable temperatura fue significativa también para el flujo de CO₂ ($F_{(1,309)} = 19,3$, $p < 0,0001$). Las tasas de respiración más altas se observaron en la primavera (septiembre a noviembre). Las tasas fueron mayores en los parches con vegetación que en los parches de suelo desnudo en agosto, septiembre y mayo ($p < 0,001$). Así mismo fueron mayores en las parcelas fertilizadas en septiembre y octubre ($p < 0,05$), y en las parcelas I+F en junio, septiembre, octubre y noviembre ($p < 0,05$) respecto a las parcelas control (Figura 3.3). Los valores máximos de flujo de CO₂ desde el suelo en las parcelas fertilizadas se alcanzaron un mes antes (octubre) que en los otros tratamientos (noviembre) (Figura 3.3). El flujo de CO₂ medio anual varió desde 0,22 en los parches de suelo desnudo a 0,32 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en los parches con vegetación, existiendo diferencias significativas entre los tipos de parche, pero no entre los tratamientos (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. pH, conductividad eléctrica (dS m⁻¹), materia orgánica (%), nitrógeno total (%), Relación C/N, fósforo disponible (ppm), densidad de raíces media anual (mg cm⁻³), flujo de CO₂ medio anual (μmol CO₂ m⁻² s⁻¹) y bacterias heterótrofas totales (UFC x 10⁵ g⁻¹ suelo) del suelo en parches de suelo desnudo y con vegetación. Cada valor representa la media +/- IC (n = 3). Se muestran el valor estadístico F, los grados de libertad (Df) y el valor de probabilidad *p*, para tipo de parche (P) y tratamiento (T).

	Parches de suelo desnudo				Parches con vegetación				Test-F
	C	F	I	I+F	C	F	I	I+F	
pH	7,17 (0,12)	6,27 (0,12)	7,27 (0,12)	6,37 (0,12)	7,13 (0,24)	6,53 (0,24)	6,93 (0,24)	6,60 (0,24)	TxP: F _(3,16) = 4,18 p = 0,023
Conductividad eléctrica (dS m⁻¹)	0,14 (0,06)	0,31 (0,09)	0,13 (0,05)	0,31 (0,09)	0,24 (0,08)	0,76 (0,20)	0,21 (0,07)	0,54 (0,13)	TxP: F _(3,16) = 4,5 p = 0,018
Materia orgánica (%)	0,50 (0,13)				1,08 (0,13)				TxP: F _(3,16) = 1,96 <i>p</i> = 0,16 T: F _(3,19) = 0,35 <i>p</i> = 0,79 P: F _(1,22) = 45,5 p < 0,0001
Nitrógeno total (%)	0,022 (0,006)	0,031 (0,006)	0,021 (0,006)	0,034 (0,006)	0,057 (0,012)	0,066 (0,012)	0,056 (0,012)	0,069 (0,012)	TxP: F _(3,16) = 0,646 <i>p</i> = 0,597 T: F _(3,19) = 3,89 p = 0,025 P: F _(1,19) = 35 p < 0,0001
C/N	16,58 (9,09)	7,82 (9,09)	17,72 (9,09)	7,96 (9,09)	9,90 (3,41)	12,36 (3,41)	8,61 (3,41)	11,34 (3,41)	TxP: F _(3,16) = 1,96 <i>p</i> = 0,161 T: F _(3,19) = 0,516 <i>p</i> = 0,676 P: F _(1,19) = 0,459 <i>p</i> = 0,506
Fósforo disponible (ppm)	11,5 (2,53)	51,9 (15,81)	12,1 (2,66)	57,1 (17,91)	18,1 (3,88)	58,6 (15,93)	18,8 (3,98)	63,7 (17,95)	TxP: F _(3,16) = 0,232 <i>p</i> = 0,873 T: F _(3,19) = 16,2 p < 0,0001 P: F _(1,19) = 10,5 p = 0,004
Bacterias heterotróficas totales (CFU x 10⁵ g⁻¹ suelo)	19,6 (14,6)	3,79 (3,68)	7,57 (6,34)	7,42 (5,23)	21,2 (14,6)	5,35 (4,73)	9,13 (6,71)	8,98 (6,62)	TxP: F _(3,16) = 0,702 <i>p</i> = 0,565 T: F _(3,19) = 1,88 <i>p</i> = 0,168 P: F _(1,19) = 0,342 <i>p</i> = 0,566
Densidad de raíces media anual (mg cm⁻³)	1,04 (0,18)	1,34 (0,23)	1,16 (0,19)	1,58 (0,31)	2,76 (0,30)	3,07 (0,35)	2,89 (0,31)	3,31 (0,40)	TxP: F _(3,348) = 1,34 <i>p</i> = 0,262 T: F _(3,351) = 3,68 p = 0,012 P: F _(1,351) = 134 p < 0,0001
Flujo de CO₂ medio anual (μmol CO₂ m⁻² s⁻¹)	0,22 (0,03)				0,32 (0,04)				TxP: F _(3,348) = 0,322 <i>p</i> = 0,81 T: F _(3,351) = 1,03 <i>p</i> = 0,638 P: F _(1,354) = 49,4 p < 0,0001

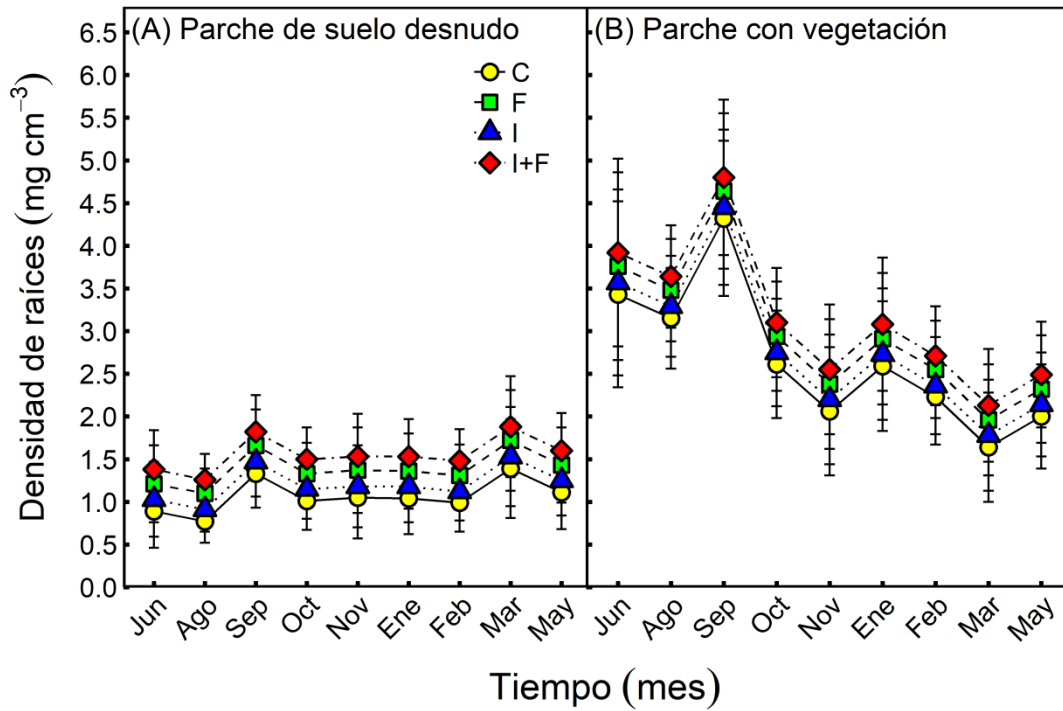


Figura 3.2. Dinámica temporal en la densidad de raíces a 0-10 cm de profundidad (mg de masa seca cm^{-3}) para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en: (A) parches de suelo desnudo y (B) parches con vegetación, durante el periodo de estudio (junio 2015 a mayo 2016) en la estepa patagónica. Los símbolos representan la media \pm IC ($n=3$).

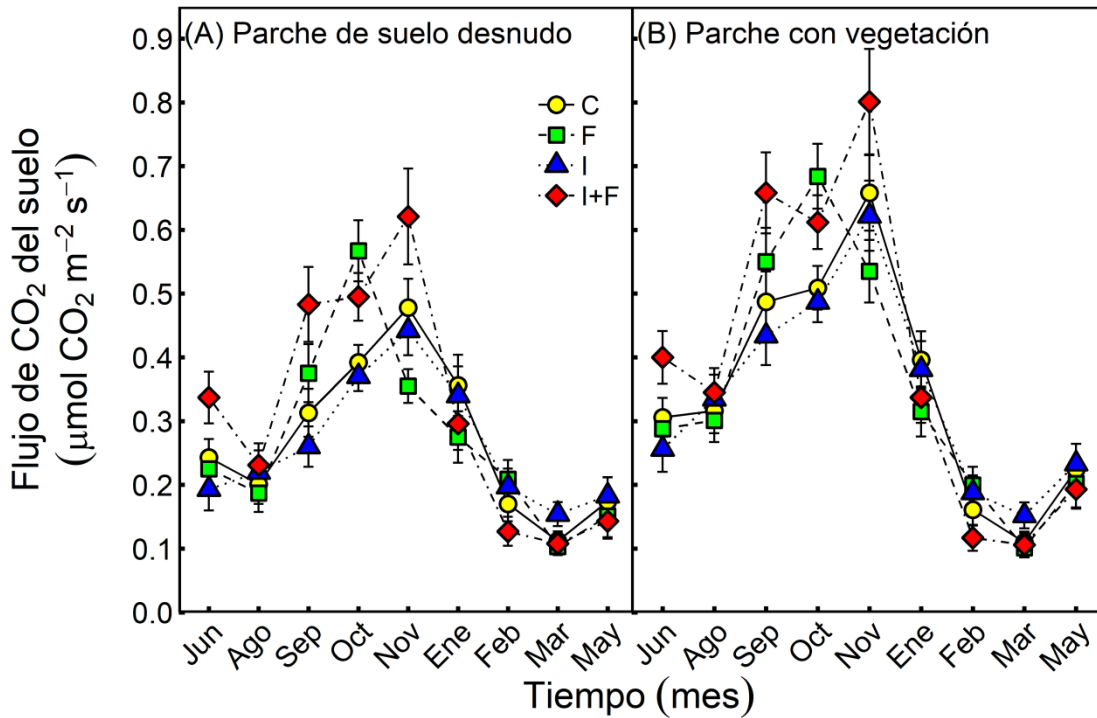


Figura 3.3. Dinámica temporal en el flujo de CO₂ ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en: (A) parches de suelo desnudo y (B) parches con vegetación, durante el periodo de estudio (junio 2015 a mayo 2016) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media \pm IC (n= 3).

El flujo de CO₂ del suelo se relacionó significativamente con la temperatura y el contenido de agua del suelo, existiendo interacción significativa entre ambas variables y a su vez interacción con el tipo de parche ($F_{(1, 336)} = 5,52, p = 0.019$) y el tratamiento ($F_{(3, 336)} = 3, p = 0.031$). Los diagramas de contorno de la Figura 3.4 muestran que en los parches de suelo desnudo el flujo de CO₂ fue mayor con la combinación de valores altos de temperatura y contenido de agua del suelo, mientras que en los parches con vegetación los valores más altos de respiración de suelo se obtuvieron con la combinación de valores altos de temperatura y bajo contenido de agua del suelo, o valores bajos de temperatura y alto contenido de agua del suelo. Los diagramas de contorno de la figura 3.5 muestran que los valores más altos de respiración de suelo se alcanzaron con valores altos de temperatura del suelo combinados con valores altos de contenido de agua del suelo en todos los tratamientos. A igual valor de temperatura y contenido de agua del suelo, la respiración del suelo de los tratamientos F e I+F fue mayor que la del C e I. El flujo de CO₂ desde el suelo también se correlacionó lineal y

positivamente con la densidad de raíces (Figura 3.6) ($R^2 = 0,265$, $F_{(1,353)} = 16,8$, $p = 0,0001$), con diferencias estadísticamente significativas entre los tipos de parche ($F_{(1,353)} = 11,9$, $p = 0,0006$) pero sin diferencias entre tratamientos ($F_{(3,350)} = 0,932$, $p = 0,425$).

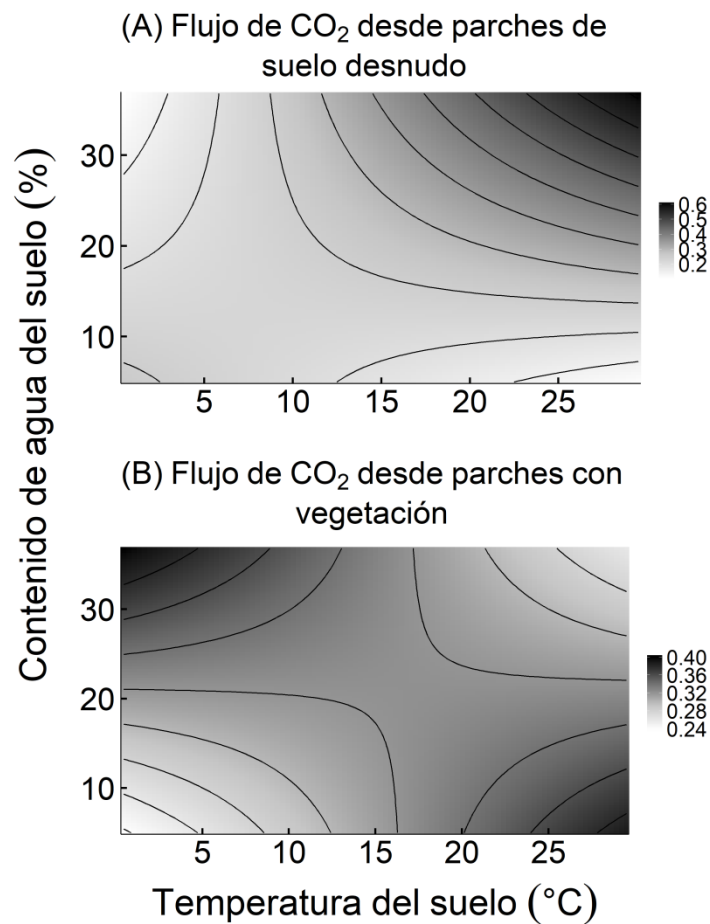


Figura 3.4. Diagramas de contorno de flujo de CO₂ del suelo ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en relación con el contenido de agua del suelo a 0-10 cm de profundidad (%) y la temperatura del suelo a 0-10 cm de profundidad (°C) desde (A) parches de suelo desnudo y (B) parches con vegetación.

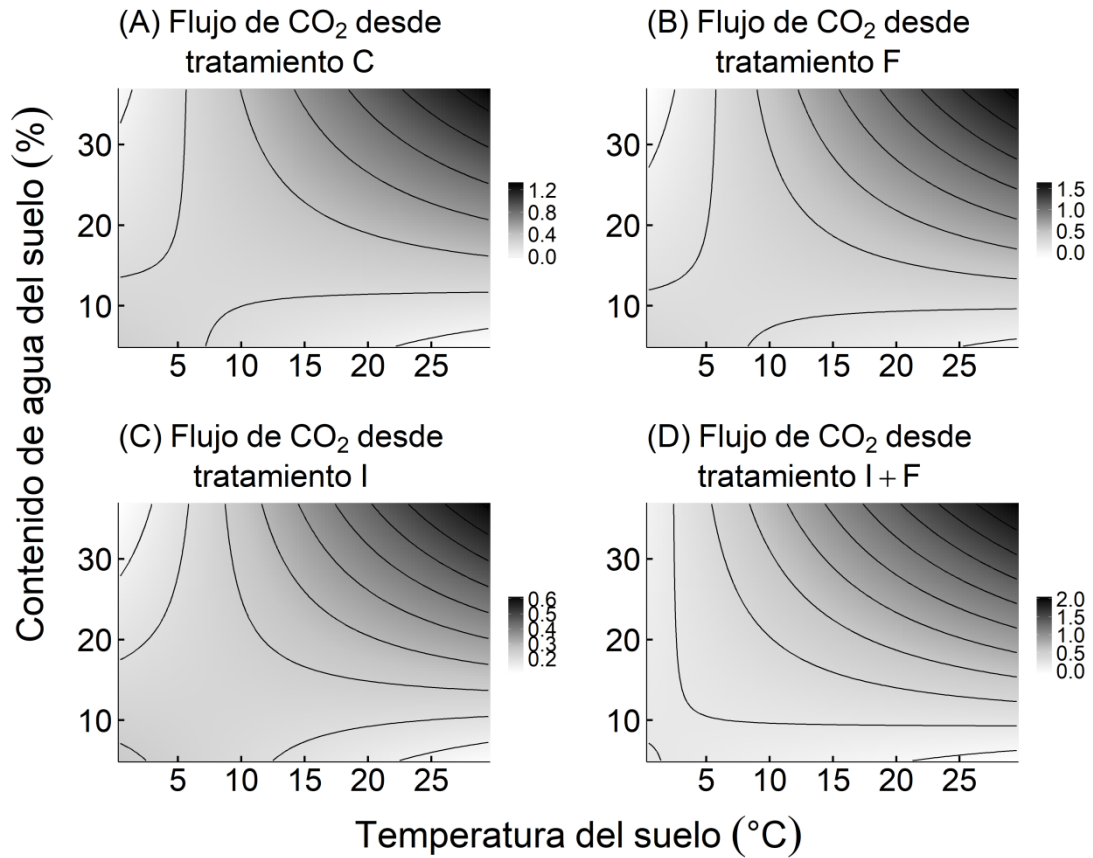


Figura 3.5. Diagramas de contorno de flujo de CO₂ del suelo ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en relación con el contenido de agua del suelo a 0-10 cm de profundidad (%) y la temperatura del suelo a 0-10 cm de profundidad (°C) desde: (A) tratamiento C, (B) tratamiento F, (C) tratamiento I y (D) tratamiento I+F.

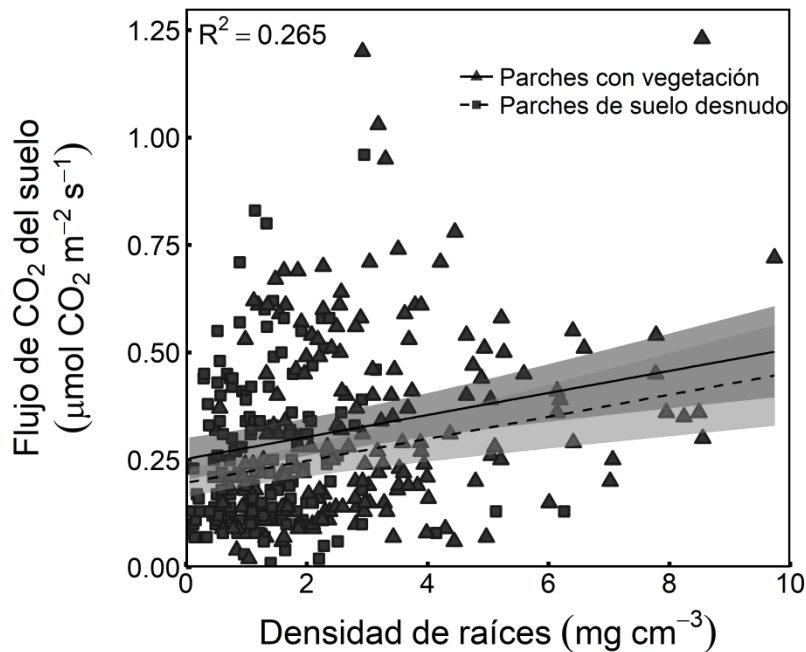


Figura 3.6. Relación entre el flujo de CO₂ del suelo (µmol CO₂ m⁻² s⁻¹) y la densidad de raíces (mg cm⁻³). Cada punto representa una medida durante el período de estudio (junio de 2015 a mayo de 2016), en parches de suelo desnudo (cuadrados) y en parches con vegetación (triángulos). Las líneas de trazos son las regresiones lineales ajustadas a los datos (continua para parches con vegetación y partida para parches de suelo desnudo) y las bandas grises son los intervalos de confianza del 95%. La ecuación de la recta ajustada a los parches con vegetación es: $y=0,252+0,026x$. La ecuación de la recta ajustada a los parches de suelo desnudo es: $y=0,197+0,026x$.

3.3.3. Dinámica del nitrógeno del suelo

El contenido de N en forma de amonio medio del suelo (NH₄⁺-N) a 0-10 cm de profundidad varió entre 3 y 103 mg kg⁻¹, con un efecto significativo del tratamiento ($F_{(2, 63)} = 20,6$, $p < 0,0001$) e interacción entre el tipo de parche y el mes ($F_{(2, 63)} = 3,69$, $p = 0,0304$) (Figura 3.7 A-B). El NH₄⁺-N en las parcelas fertilizadas e irrigadas-fertilizadas fue mayor con respecto al control ($p < 0,0001$) y en las parcelas irrigadas fue marginalmente menor que en el control ($p = 0,056$). El contenido de N en forma de nitrato medio del suelo (NO₃⁻-N) a 0-10 cm de profundidad varió entre 1,5 y 33 mg kg⁻¹, con interacción significativa entre tratamiento y mes ($F_{(6, 56)} = 3,22$, $p = 0,0087$) y entre tratamiento y tipo de parche ($F_{(3, 56)} = 4,56$, $p = 0,0063$) (Figura 3.7 C-D). El NO₃⁻-N fue significativamente mayor en las parcelas fertilizadas e irrigadas-fertilizadas respecto al

control en noviembre y febrero, pero no en mayo, y en ambos tipos de parches ($p < 0,05$). A su vez, el $\text{NO}_3^- \text{-N}$ en los parches con vegetación fue mayor que en los parches de suelo desnudo solo en las parcelas I+F ($p = 0,009$).

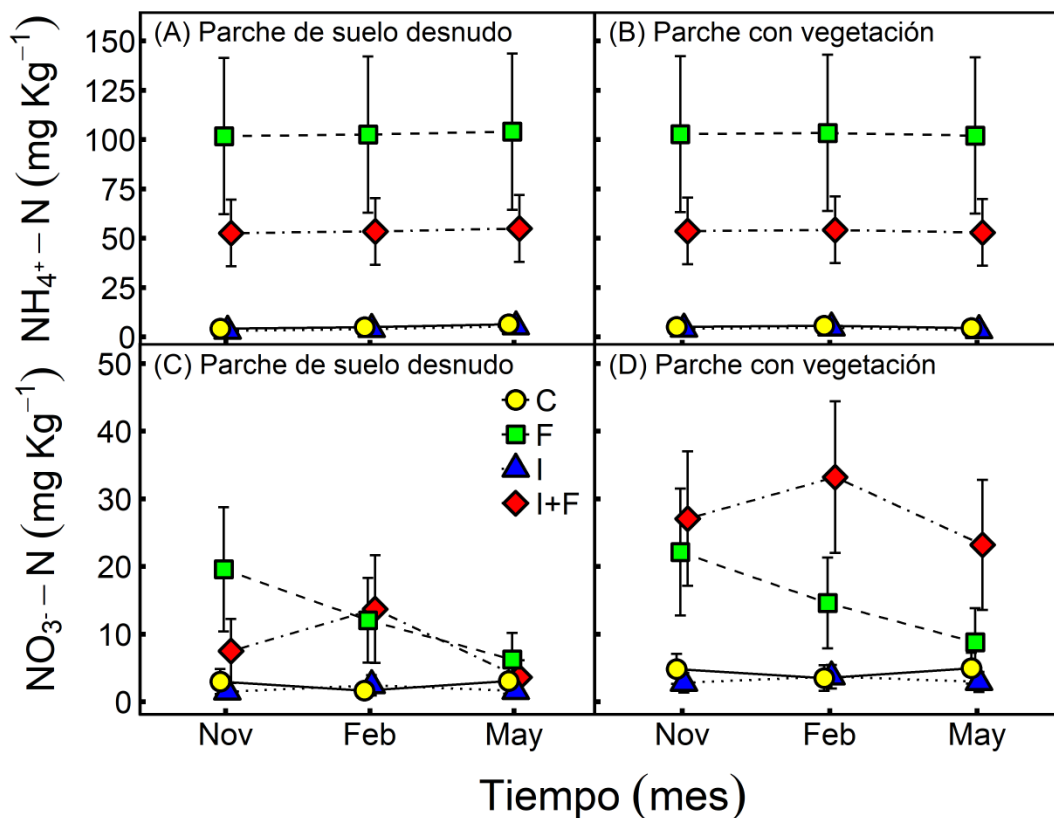


Figura 3.7. Contenido de N en forma de amonio (mg $\text{NH}_4^+ \text{-N Kg}^{-1}$) y de nitrato del suelo (mg $\text{NO}_3^- \text{-N Kg}^{-1}$) en noviembre, febrero y mayo, para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F), en parches de suelo desnudo (A-C) y en parches con vegetación (B-D). Los valores son las medias $\pm \text{IC}$ (n= 3).

La relación $\text{NH}_4^+ \text{-N} / \text{NO}_3^- \text{-N}$ varió significativamente entre los tratamientos ($F_{(3,68)} = 3,82$, $p = 0,0136$), pero no entre los tipos de parche ($F_{(1,67)} = 1,73$, $p = 0,193$) ni entre los meses ($F_{(2,65)} = 0,847$, $p = 0,433$). La relación $\text{NH}_4^+ \text{-N} / \text{NO}_3^- \text{-N}$ fue significativamente mayor en las parcelas fertilizadas con respecto al control ($p = 0,005$), siendo aproximadamente tres veces superior (Figura 3.8).

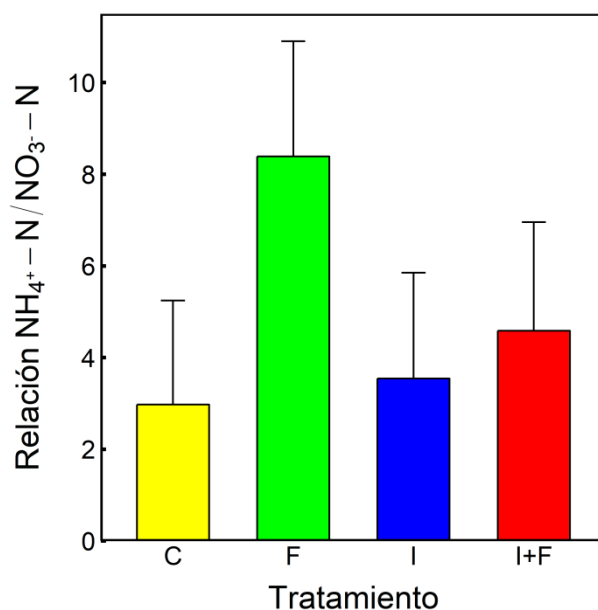


Figura 3.8. Relación $\text{NH}_4^+-\text{N} / \text{NO}_3^--\text{N}$ para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F). Los valores son las medias \pm IC (n= 3).

La tasa de amonificación varió entre -32 y 0,2 $\text{mg N kg}^{-1} \text{ m}^{-1}$, con un efecto significativo del tratamiento ($F_{(3,66)} = 2,99$, $p = 0,0371$) y de la estación ($F_{(2,66)} = 4,53$, $p = 0,0143$), sin interacción significativa entre ambos factores ($F_{(6,60)} = 1,75$, $p = 0,126$). En las parcelas control e irrigadas, las tasas de amonificación tendieron a ser cercanas a cero (Figura 3.9 A). Por otro lado, en las parcelas fertilizadas e I+F, las tasas de amonificación fueron negativas (Figura 3.9 A), aunque solo en las parcelas fertilizadas fueron significativamente menores con respecto al control ($p = 0,04$). También las tasas de amonificación en verano fueron significativamente menores que en primavera ($p = 0,009$). No se visualizaron efectos claros del tratamiento y la estación sobre las tasas de nitrificación ($F_{(3,66)} = 1,92$, $p = 0,135$ para el tratamiento y $F_{(2,69)} = 2,82$, $p = 0,0664$ para la estación) (Figura 3.9 B). Las tasas de nitrificación variaron entre -5,1 y 3,7 $\text{mg N kg}^{-1} \text{ m}^{-1}$ y tendieron a ser negativas en primavera y verano y positivas en otoño (Figura 3.9 B). Se encontró una relación lineal negativa significativa entre el contenido inicial de NH_4^+-N y la tasa de amonificación ($R^2 = 0,66$, $p < 0,0001$) (Figura 3.10 A) y entre el contenido inicial de NO_3^--N y la tasa de nitrificación ($R^2 = 0,38$, $p = 0,0013$) (Figura 3.10 B).

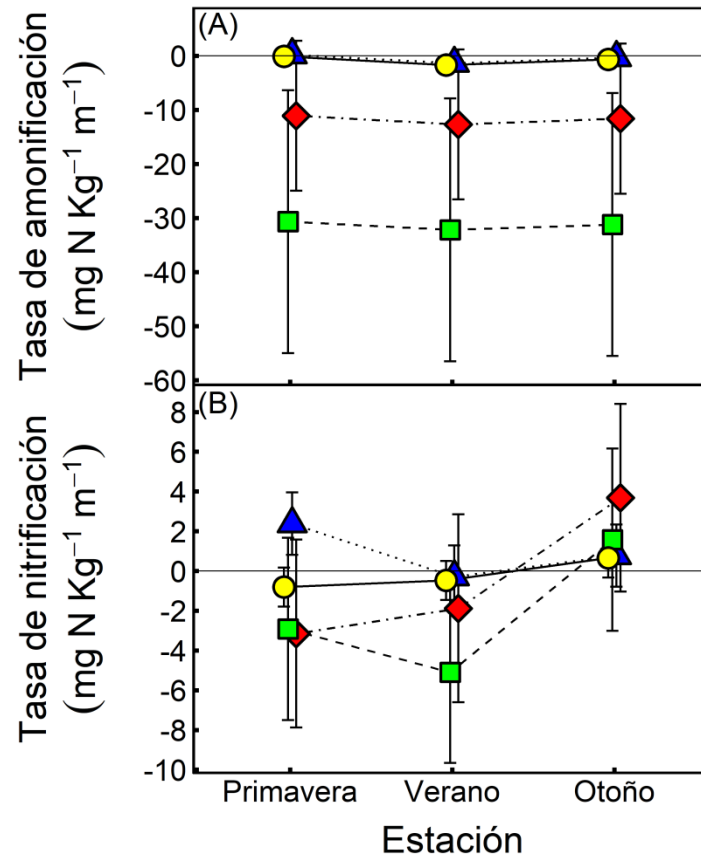


Figura 3.9. (A) Tasa de amonificación ($\text{mg N Kg}^{-1} \text{m}^{-1}$) y (B) tasa de nitrificación ($\text{mg N Kg}^{-1} \text{m}^{-1}$) para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) durante primavera, verano y otoño en una estepa patagónica. Los valores son las medias \pm IC (n= 3).

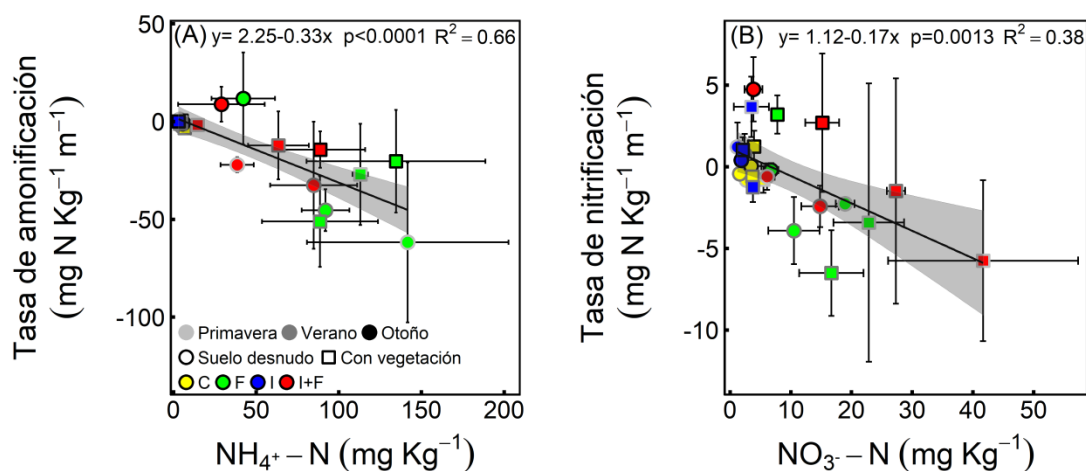


Figura 3.10. (A) Relación entre la tasa de amonificación mensual ($\text{mg N kg}^{-1} \text{ m}^{-1}$) y el contenido de N en forma de amonio inicial ($\text{mg NH}_4^+ \text{-N kg}^{-1}$), y (B) relación entre la tasa de nitrificación mensual ($\text{mg N kg}^{-1} \text{ m}^{-1}$) y el contenido de N en forma de nitrato inicial ($\text{mg NO}_3^- \text{-N kg}^{-1}$). Cada valor representa la media \pm EE ($n=3$) para cada tratamiento, estación del año y tipo de parche. Las líneas son las regresiones lineales ajustadas a los datos y las bandas grises son los intervalos de confianza del 95%.

3.4. DISCUSIÓN

3.4.1. Efectos de la irrigación y fertilización sobre las propiedades fisicoquímicas del suelo

El patrón estacional en la humedad y la temperatura del suelo observado en la estepa patagónica (Carbonell Silletta et al. 2019; Pereyra et al. 2017; Capítulo II) se mantuvo bajo los tratamientos de irrigación y fertilización con N+P. La adición de agua a través de la aplicación de pequeños pulsos (5 mm) desde mediados de la estación de crecimiento hasta el final de la estación seca (octubre-abril), acumuló 20-25% más de la precipitación media anual histórica del sitio (130 mm). Sin embargo, aunque durante los pulsos de lluvia experimentales el contenido de agua del suelo a 10 cm respondió incrementándose (Figura 1.9, Capítulo I), esto no se trasladó a un aumento en la disponibilidad de agua a lo largo del año. Su efecto solo se observó al inicio de la estación de crecimiento, entre agosto y octubre. La explicación podría basarse en el cambio en la cobertura de especies con raíces superficiales como la de *Poa ligularis* la cual exhibió una disminución en las parcelas de irrigación (ver Capítulo VII). Por otro lado, las plantas podrían haber capturado rápidamente el agua adicionada o bien una

parte del agua de cada pulso de irrigación pudo ser luego directamente evaporada desde el suelo o desde el canopeo sin llegar a ser capturada por la vegetación. Por otra parte, y a diferencia de lo observado en estudios previos (Austin et al. 2004; Gonzalez-Polo & Austin 2009), los parches con vegetación presentaron menor humedad del suelo que los parches de suelo desnudo. Este resultado es consistente con la mayor pérdida de agua del ecosistema por transpiración que por evaporación directa del suelo en el sitio de estudio (Pereyra et al. 2017).

La fertilización con urea y fosfato diamónico generalmente conducen a la acidificación del suelo (Fang et al. 2012; Högberg et al. 2006; Vourlitis, Pasquini, & Mustard 2009) tal como fue observado en este estudio. La media global de disminución del pH por adición de N es de 0,26 para los ecosistemas terrestres (Tian & Niu 2015), sin embargo la disminución del pH observado en el presente estudio fue elevado: 0,9 y 0,8 en F y I+F respectivamente. Este valor es más consistente con aquel observado en pastizales del norte de China (0,63), inducido principalmente por la deposición de N (Yang et al. 2012). Los ecosistemas varían en su sensibilidad a la acidificación y esto es dependiente del pH inicial, siendo mayor la disminución cuanto más básico es el pH inicial (Tian & Niu 2015). Los suelos de la estepa patagónica tienen un alto contenido de carbonatos confirmando que son muy sensibles a la acidificación por adición de N. La alta dosis de N aplicada también pudo contribuir a esta significativa acidificación. Este experimento fue iniciado en 2013, y un análisis global ha demostrado que en experimentos a más largo plazo, estos niveles de acidificación pueden ser revertidos (Tian & Niu 2015) debido a cambios en la demanda por parte de la vegetación (Bai et al. 2010) y a un estímulo en la retención y reciclado interno de cationes (Perakis et al. 2013).

La mineralización e inmovilización del N por las comunidades microbianas del suelo está regulada en parte por la proporción C/N del sustrato orgánico utilizado por los microorganismos (Austin et al. 2004). Los tratamientos de fertilización modificaron las relaciones C/N y aunque estos cambios no fueron significativos, la relación C/N se incrementó en un 50% en los parches de suelo desnudo y disminuyó en un 25% en los parches vegetados. Esto ocurrió aunque el C orgánico no fue diferente entre los tratamientos y el N total incrementó con la adición de nutrientes. Bajas relaciones C/N como las observadas en los suelos fertilizados pueden disminuir la demanda microbiana

por Nitrógeno durante la descomposición tal que la mineralización neta de N podría incrementar.

3.4.2. Efectos de la adición de agua y nitrógeno sobre la respiración del suelo

El flujo de CO₂ desde el suelo a la atmósfera y la densidad de raíces fueron diferenciados según el tipo de parche tal como se observó en el Capítulo II de esta tesis así como en otros estudios (Carbonell Silletta et al. 2019; Han et al. 2017; Maestre & Cortina 2003; Martin & Bolstad 2009). Asimismo la adición de nutrientes tuvo un efecto positivo sobre la densidad de raíces y la respiración del suelo. Varios estudios en ecosistemas limitados por agua han encontrado similares resultados dependiendo de la dosis de fertilizante aplicada (Lü & Tian 2007; Wang et al. 2019; Zhu et al. 2016). Sin embargo otros autores han encontrado una disminución en la respiración del suelo (Ammann et al. 2007; Han et al. 2017; Janssens et al. 2010) o ausencia de efectos (Lee & Jose 2003; Vose et al. 1997) como consecuencia de la fertilización en ecosistemas áridos. Como resultado de un meta-análisis, Zhou et al. (2014) encontraron un aumento de la respiración del suelo con la adición de N, siendo más sensibles los ecosistemas de pastizales que los boscosos. En el presente estudio, el aumento en la respiración del suelo en las parcelas fertilizadas fue asociado a la respiración autótrofa. Esto radica en el hecho que la densidad de raíces incrementó con la adición de nutrientes, lo cual se puede traducir en mayor respiración para su crecimiento y mantenimiento (respiración autótrofa). Por tal motivo, la primera hipótesis, la cual proponía disminución de la respiración autótrofa por efecto de la fertilización, fue rechazada.

Por otro lado, la respiración heterotrófica es dependiente entre otros factores de la biomasa microbiana, carbono orgánico del suelo y biomasa de broza (Yoshitake et al. 2007). Aunque en este estudio no se determinó la biomasa bacteriana, la similitud o tendencia a la disminución en la densidad de bacterias heterótrofas del suelo en los tratamientos de fertilización con respecto al control sugeriría que no hubo cambios en la biomasa de estas bacterias o que incluso podría haber disminución en la biomasa. Reducciones en la biomasa microbiana por efecto de fertilización con N han sido reportados previamente (Fisk & Fahey 2001; Lee & Jose 2003). Junto con la ausencia de cambios significativos en el carbono orgánico del suelo, los resultados sugieren una vez más que la respiración heterotrófica no ha contribuido al aumento de la pérdida de

C desde el suelo en los tratamientos F y I+F, siendo la respiración autótrofa la principal responsable de las diferencias en la emisión de CO₂.

Aunque el agua es un factor limitante en los ecosistemas áridos, y el momento y la magnitud de los pulsos de precipitación son los principales desencadenantes de la actividad biológica (Collins et al. 2008; Huxman et al. 2004b), en este estudio los flujos de CO₂ no se modificaron en el tratamiento de irrigación (I), ni aun en los meses donde efectivamente la humedad del suelo superficial fue mayor en este tratamiento respecto al control. Sin embargo, inmediatamente luego de un pulso de lluvia de solo 3 mm la respiración del suelo incrementó significativamente en los parches vegetados (Carbonell Silletta et al. 2019; Capítulo II). Las determinaciones de respiración de suelo en este estudio fueron realizadas luego de que los niveles de contenido de agua en el suelo regresaron a los niveles basales después de unos días de aplicados los pulsos de irrigación. De este modo se podría estar subestimando los flujos de CO₂ desde el suelo a la atmósfera tanto en el tratamiento de irrigación como en el combinado (I+F) si no se consideran los pulsos de CO₂ luego de los pequeños eventos de precipitación. Debido a que no hubo cambios en la densidad de raíces ni en la respiración del suelo por efecto de la irrigación, se rechazó la primera hipótesis, que proponía una disminución de la respiración del suelo por menor asignación de fotoasimilados a la porción subterránea. En otros estudios en ecosistemas áridos, la adición de agua incrementó la respiración del suelo (Chen et al. 2013; Lai et al. 2013; Zhang et al. 2017) y potenció la estimulación de las emisiones de CO₂ por fertilización con Nitrógeno (Wang et al. 2019). Esto último es consistente con los resultados de este estudio donde la adición conjunta de agua y Nitrógeno estimuló significativamente la respiración del suelo en algunos meses de invierno y primavera respecto al control y al tratamiento F.

La temperatura del suelo suele ser el principal factor determinante de la respiración del suelo (Carlyle & Than 1988; Fang & Moncrieff 2001; Xu & Shang 2016), aunque en ecosistemas semiáridos el contenido de agua edáfica se vuelve el impulsor principal del flujo de CO₂ (Jia, Zhou, & Yuan 2007; Rey et al. 2016). Como Davidson, Belk, & Boone (1998) sugieren, es difícil y quizás imposible distinguir el efecto de la temperatura y de la humedad del suelo por separado. En el presente trabajo se pudo determinar el efecto conjunto de ambos factores (temperatura y humedad del suelo) sobre la respiración del suelo. Valores muy bajos de temperatura y humedad del

suelo restringen la respiración del suelo en general independientemente del tratamiento (Chang et al. 2014).

3.4.3. Dinámica del nitrógeno del suelo

En comparación con otros ecosistemas, los suelos de la estepa patagónica tienen un mayor porcentaje de su N mineral en forma de nitrato (NO_3^-) que otros ecosistemas (Austin & Sala 2002), y las plantas de las especies dominantes particularmente los arbustos absorben preferentemente NO_3^- de los horizontes más profundos del suelo (Gherardi, Sala, & Yahdjian 2013; Sala et al. 2012). En el presente estudio el contenido de N en forma de amonio y de nitrato aumentó en las parcelas fertilizadas e I+F, por lo cual las plantas se verían favorecidas en estos tratamientos. El amonio y el nitrato del suelo suelen tener variabilidad estacional en la estepa patagónica dado el uso diferencial que las plantas y/o los microorganismos del suelo hacen de ellos, además de cambios en las condiciones climáticas y en las tasas de descomposición de la materia orgánica (Austin & Sala 2002; Yahdjian, Sala, & Austin 2006). Sin embargo, los resultados reportados por Yahdjian, Sala, & Austin (2006) para la estepa patagónica difieren de los encontrados en este trabajo, ya que en tal publicación informaron que el nitrato fue mayor durante la estación seca mientras que el amonio lo fue durante la estación húmeda. En este estudio se encontró que el amonio disminuyó en mayo, aunque solo en el suelo desnudo, y el nitrato disminuyó en mayo en tratamientos fertilizados e I+F. En otros estudios, el NH_4 y el NO_3 aumentaron inmediatamente después de la fertilización, pero disminuyeron al comienzo de la temporada de lluvias (Kozovits et al. 2007), o el nitrato del suelo disminuyó en un experimento de riego y fertilización y los autores lo relacionaron con la lixiviación (Choi et al. 2005). Yahdjian & Sala (2010) observaron un aumento de la lixiviación del nitrato en suelos de la estepa patagónica luego de pulsos grandes de precipitación.

La incorporación de agua no modificó significativamente las tasas de mineralización del N, concordando con un estudio realizado en otro ecosistema árido (Reichmann, Sala, & Peters 2013) pero en contraposición a los resultados observados por Yahdjian & Sala (2010) en la estepa patagónica, rechazando de este modo la segunda hipótesis planteada. En este último estudio, la tasa de mineralización fue determinada solo 5 días después de manipular el contenido de agua en el suelo con lo

cual ese aumento podría representar solo pulsos de disponibilidad de N. Pulsos de mineralización de N con pulsos de agua han sido reportados en varios estudios (Epstein et al. 2006). Previamente Yahdjian, Sala, & Austin (2006) y en consistencia con los resultados del presente estudio, encontraron que la mineralización neta no cambia a lo largo de un gradiente experimental de precipitación. Esta variabilidad en los efectos de la adición de agua sobre la mineralización puede también estar relacionada a la gran heterogeneidad espacial en recursos que caracteriza a los ecosistemas áridos, más allá de las diferencias entre parches de suelo desnudo y vegetados, y que tiene un rol clave en modular la respuesta del ecosistema a la disponibilidad de agua (Austin 2011; Reichmann, Sala, & Peters 2013).

Por el contrario, los tratamientos con fertilización indujeron una importante inmovilización del Nitrógeno en la mayoría de las estaciones, excepto la nitrificación durante el otoño, rechazando la segunda hipótesis de este estudio que planteaba un aumento de la mineralización por efecto del aumento en la disponibilidad de nutrientes. Esto podría deberse al hecho de que más N en el suelo reduce la biomasa microbiana (Butterbach-Bahl & Gundersen 2011). A pesar de que Sinsabaugh et al. (2015) y Hu et al. (2009) informaron un efecto positivo del aumento de N en la biomasa y la actividad microbiana, un exceso de fertilizante podría inhibir la actividad microbiana, tal como se observó en las relaciones negativas entre el contenido de N inorgánico y las tasas de mineralización. En un estudio en una estepa arbustivo-graminosa, Kowaljew & Mazzarino (2007) no encontraron cambios en la mineralización potencial del N con fertilización inorgánica, y lo relacionaron con una limitación de C para los microorganismos en el tratamiento de fertilización, que afectó la actividad microbiana más que el tamaño de la población. Otros estudios también han indicado que la adición de Nitrógeno sola o con agua tiene escaso o nulo efecto sobre las respuestas microbianas en ecosistemas áridos e incrementa cuando es combinado con el agregado de carbono lábil (Austin & Vivanco 2006).

3.5. CONCLUSIONES

El flujo de CO₂ del suelo en la estepa patagónica tuvo un patrón estacional marcado, y un efecto tanto del tipo de parche como de los tratamientos. Sus principales factores de control fueron la temperatura y humedad del suelo y la densidad de las raíces. Si bien el

tratamiento de riego no produjo ningún cambio en la liberación de CO₂ del suelo, la adición de Nitrógeno estimuló la pérdida de carbono del suelo durante la primavera, siendo más importante este efecto cuando se combinó con el agregado de agua. Los tratamientos de fertilización también produjeron cambios en el N inorgánico del suelo y afectaron las tasas de mineralización del N. Aunque el contenido de N inorgánico en el suelo en la forma de amonio y nitrato aumentó con la fertilización, estos estarían básicamente inmovilizados por los microorganismos, lo cual puede constituir un mecanismo de conservación del N en forma lábil. Por su parte, el tratamiento de irrigación no indujo cambios en el contenido de N en forma de amonio y nitrato ni en las tasas de mineralización. Las bajas tasas de mineralización encontradas incluso en el control sugieren que los procesos de mineralización del suelo en la estepa patagónica podrían estar restringidos a cortos periodos en los cuales ocurren los pulsos de lluvia. En conclusión, mientras que el aumento en la disponibilidad de agua no afectaría a largo plazo la pérdida de carbono del suelo ni la mineralización, la adición de N sola o con agua afectaría ambos procesos. Debido al hecho de que la adición de N limitó la mineralización y por ende la actividad microbiana y que esto no se reflejó en una disminución de la respiración del suelo, se puede considerar que la mayor contribución para la pérdida de carbono proviene de la respiración de las raíces.

Capítulo IV

**Efectos del aumento
experimental en las
precipitaciones y de la adición
de N sobre las relaciones
hídricas y la arquitectura
hidráulica de arbustos y pastos**

Efectos del aumento experimental de las precipitaciones y de la adición de N sobre las relaciones hídricas y la arquitectura hidráulica de arbustos y pastos

4.1. INTRODUCCIÓN

Las propiedades hidráulicas, es decir, las características de los sistemas de conducción de agua de las plantas, así como otros parámetros hídricos tales como el potencial hídrico, son los principales determinantes del balance hídrico de las plantas (Tyree & Ewers 1991; Zimmermann 1978) y son importantes para determinar cómo las plantas responden a los cambios en la disponibilidad de agua (Brodribb & Feild 2000; Scholz et al. 2012; Sperry & Tyree 1990; White, Beadle, & Worledge 1996). La capacidad de transportar agua a través de la planta tiene gran importancia ya que afecta el intercambio de gases, la fotosíntesis y la productividad (Brodribb & Feild 2010; Bucci et al. 2019; Sperry 2000). Dos propiedades funcionales importantes del sistema de conducción de agua de las plantas son la eficiencia hidráulica, o la capacidad de transportar agua en fase líquida, y la seguridad hidráulica, que permite al xilema mantener su función bajo estrés mecánico y biológico (Tyree & Zimmermann 2002). Un modo de evaluar la vulnerabilidad hidráulica es a través del P_{50} , que es el potencial hídrico que induce un 50% de pérdida de la capacidad de transporte de agua (Brodribb & Holbrook 2003), y mediante la determinación de márgenes de seguridad hidráulica (Meinzer et al. 2009). Bajo condiciones de sequía las plantas desarrollan vasos del xilema de menor diámetro por lo que son capaces de tolerar mayores tensiones sin colapsar, pero con el costo de una menor eficiencia hidráulica (Durante, Maseda, & Fernández 2011). Es decir, existe un compromiso o “trade-off” entre eficiencia y seguridad hidráulica, que ha sido reportado para especies de diversos ecosistemas (Bucci et al. 2006, 2012, 2019; Domec & Gartner 2003; Hacke et al. 2006; Jacobsen et al. 2007; Meinzer et al. 2010; Wheeler et al. 2005), mientras que para otras especies, este trade-off no ha sido observado (Bucci et al. 2013; Chen et al. 2009; Gleason, Butler, & Waryszak 2013; Sack & Holbrook 2006). Por el contrario, un aumento en la disponibilidad de agua podría llevar a las plantas a desarrollar vasos del xilema de mayor diámetro, más vulnerables a la cavitación bajo estrés pero con mayor capacidad

de conducir agua. Ciertos rasgos estructurales como el diámetro y la longitud de los vasos, su densidad y el grado de interconexión son usados para evaluar eficiencia y seguridad hidráulica (Tyree & Zimmermann 2002). Estos rasgos pueden ser caracterizados indirectamente a través de la densidad de la madera (Hacke et al. 2001). Una mayor resistencia a la cavitación del xilema a nivel del tallo se ha relacionado con una densidad de madera alta (Hoffmann et al. 2011; Meinzer et al. 2009).

No solo la disponibilidad de agua puede afectar las propiedades hidráulicas y el estado hídrico de las plantas (Bucci et al. 2006). Los cambios en la disponibilidad de nutrientes afectan los patrones de asignación de C y con ello las relaciones hídricas. Por ejemplo, si el área foliar total de una planta se incrementa por efecto de un aumento en la disponibilidad de nutrientes (Clearwater & Meinzer 2001), la eficiencia con la cual el sistema de transporte de agua de los tallos le brinda agua a las hojas disminuye, si no cambia la permeabilidad del tejido de conducción. Asimismo si hay menor asignación de recursos a la biomasa de raíces respecto a la biomasa aérea puede haber un desbalance entre la demanda y el suministro de agua (Bucci et al. 2006). Las plantas podrían disminuir su potencial hídrico, experimentar mayor riesgo de formación de embolismos, cierre estomático e inhibición de la fotosíntesis, y en consecuencia, menor crecimiento e incluso mortalidad. Por ejemplo, se han encontrado efectos negativos de la fertilización con N sobre la turgencia celular (Bucci et al. 2006; Tan & Hogan 1995; Villagra et al. 2013). También se ha encontrado que las plantas pueden exhibir mayores déficit hídricos cuando tienen mayor disponibilidad de N (Bucci et al. 2006; Morgan 1986; Pivovarov et al. 2016; Shangguan, Shao, & Dyckmans 2000). Por otra parte, en algunas especies una mayor disponibilidad de N incrementa el contenido relativo de agua en sus tejidos bajo déficit hídrico, a través de ajuste osmótico (DaMatta et al. 2002b; Garcia, Fuentes, & Gallego 1996).

La estepa patagónica es un desierto frío donde las especies están expuestas a relativamente baja disponibilidad de agua y nutrientes en el suelo y a déficit hídricos de la atmósfera altos durante la estación seca (Bucci et al. 2009; Paruelo & Sala 1995; Pereyra et al. 2017). Las especies de la estepa patagónica exhiben diferentes ajustes morfológicos y fisiológicos frente a la sequía estacional (Scholz et al. 2012). Ellos incluyen reducción en el área foliar, cierre estomático, ajustes osmóticos y ajustes elásticos. Además estas especies, aun aquellas con raíces más profundas, pueden aprovechar los pulsos de lluvia erráticos y pequeños durante la estación seca a través de

la absorción foliar (Cavallaro et al. en revisión), y a través de sus raíces superficiales en el caso de especies con sistemas radicales dimórficos. El uso de agua proveniente de los pulsos de lluvia a través de la absorción radical depende de varios factores, como la profundidad del sistema radical, la funcionalidad de las raíces, la fenología y el grado de xerofitismo (Fernández 2007; Golluscio, Sigal Escalada, & Pérez 2009), así como de la intensidad del evento y de las propiedades físicas del suelo, entre otros (Fernández 2007; Fravolini et al. 2005; Sala & Lauenroth 1982). Se ha observado que los pastos de la estepa patagónica responden positivamente a la adición de grandes pulsos de lluvia (30 mm), reflejándose en un aumento de su potencial hídrico (Golluscio, Sala, & Lauenroth 1998; Golluscio, Sigal Escalada, & Pérez 2009). También se ha postulado que el uso de un pulso de agua durante el verano depende de la necesidad de la planta de capturar N del suelo (Kowaljow & Fernández 2011). La mayor profundidad de los sistemas radicales de los arbustos, que les permite tener acceso a fuentes de agua más estables (Bucci et al. 2009; Pereyra et al. 2017; Schulze et al. 1996), les impediría responder a pulsos de agua que humedecen solo las capas más superficiales del suelo (Golluscio, Sala, & Lauenroth 1998), excepto que tengan sistemas radicales dimórficos. Los arbustos con raíces profundas tienden a mantener sus potenciales hídricos más constantes a través de veranos secos y de veranos húmedos (es decir, se comportan como especies iso-hídricas), mientras que los pastos y los arbustos con raíces más superficiales tienden a ser aniso-hídricas, con mayores fluctuaciones en sus potenciales hídricos de acuerdo a la disponibilidad de agua (Bucci et al. 2009).

Los ecosistemas áridos y semiáridos son los más sensibles a los cambios globales y sus respuestas en relación a aspectos hidrológicos, biológicos y biogeoquímicos son difíciles de predecir (Lioubimtseva & Cole 2006). Los estudios de manipulación de recursos a largo plazo y a campo permiten evaluar el grado de sensibilidad de las especies para responder a cambios en la disponibilidad de los mismos. Las respuestas de la vegetación de ecosistemas áridos a incrementos simultáneos de agua y N por largo tiempo han sido evaluados en diversos estudios, sin embargo estas investigaciones han focalizado sobre características morfológicas (Fan et al. 2013; Ladwig et al. 2012), prestando menor atención sobre aspectos fisiológicos y fueron realizados por un corto periodo de tiempo. Los cambios en la arquitectura hidráulica en respuesta al cambio ambiental son potencialmente importantes dado que las respuestas, particularmente de las especies perennes de larga vida, dependen de si

sus características hidráulicas son plásticas para ajustarse a las nuevas condiciones. La determinación experimental de estos aspectos, aunque presenta limitaciones, puede contribuir significativamente a la estimación más eficiente de las respuestas de la vegetación a los cambios globales, dado que actualmente los modelos aplicados consideran a las características hidráulicas como fijas (McDowell & Allen 2015; McMahon et al. 2011). Aunque en la estepa patagónica existe variabilidad inter-específica en la arquitectura hidráulica y parámetros hídricos (Bucci et al. 2009, 2011; Scholz et al. 2012) así como diferencias intra-específicas entre sitios (Iogna et al. 2011, 2013) se carece de evidencia en relación a la existencia de ajustes de la arquitectura hidráulica en respuesta a cambios en las precipitaciones e incrementos en la disponibilidad de N. En este estudio el objetivo principal fue determinar si el aumento de las precipitaciones y de la disponibilidad de N en el suelo promueve la aclimatación a través de plasticidad fenotípica de características hidráulicas y de parámetros hídricos en especies de pastos y de arbustos que exploran diferentes fuentes de agua en el suelo. La **hipótesis** planteada fue que la eficiencia hidráulica aumenta y el estado hídrico mejora en las plantas bajo los tratamientos de irrigación y de fertilización. La mayor tasa de crecimiento asociada produciría conductos de transporte de agua en el xilema con mayor diámetro (Hacke et al. 2010) y así con mayor conductividad hidráulica. Por otro lado, la mayor disponibilidad de agua en el suelo evitaría o reduciría la acumulación de embolismos. Junto con la mayor eficiencia hidráulica, la mayor biomasa foliar y la conductancia estomática típicamente asociadas con la fertilización e irrigación incrementaría las pérdidas de agua por transpiración (Bucci et al. 2006). Para responder al objetivo y evaluar la hipótesis planteada se realizó un experimento a campo de fertilización y/o irrigación (descrito en el Capítulo I). Los parámetros hídricos y la transpiración fueron determinados en dos especies de gramíneas (*Poa ligularis* y *Pappostipa speciosa*) y en cuatro especies de arbustos (*Adesmia volckmannii*, *Azorella prolifera*, *Berberis microphylla* y *Senecio filaginoides*) (Tabla 1.2, Capítulo I). Además, en las especies arbustivas se determinó la densidad de la madera, la conductancia hidráulica foliar, la conductividad hidráulica de tallos y los márgenes de seguridad hidráulicos.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Potencial hídrico foliar y relaciones presión-volumen

Los potenciales hídricos de la hoja (Ψ_f), de madrugada (máximo) y de mediodía (mínimo), fueron medidos con una cámara de presión (PMS; Corvallis, Oregón) durante noviembre de 2017 (primavera) y fines de enero de 2018 (verano). Se colectaron nueve ramitas terminales correspondientes al crecimiento del año, de tres individuos por especie de diferentes parcelas por tratamiento, durante la madrugada y al mediodía, teniendo en cuenta que las ramas se encontraran en el canopeo medio externo, expuestas al sol.

Se construyeron curvas de presión-volumen (P-V) para tres a siete ramitas terminales con hojas, correspondientes al crecimiento del año, de diferentes individuos por especie y tratamiento utilizando la técnica *bench drying* (Tyree y Hammel 1972). Las muestras se colectaron en noviembre de 2018, durante la mañana. No se pudieron realizar curvas P-V para las dos especies de gramíneas (*P. ligularis* y *P. speciosa*) debido a que el tejido se dañaba rápidamente, imposibilitando llegar a valores bajos de potencial hídrico. Las ramitas fueron cortadas en el campo, recortadas inmediatamente bajo agua y cubiertas con bolsas plásticas negras para evitar la deshidratación. Las muestras fueron rehidratadas solo por dos horas en agua destilada y deionizada para evitar la rápida disminución en el potencial hídrico a medida que el contenido de agua disminuye exhibiendo el “efecto plateau” (Bucci et al. 2009). Después de cada determinación de la presión de equilibrio con la cámara de presión, las ramitas fueron pesadas inmediatamente con precisión de 0,001g y se dejaron transpirar libremente hasta la siguiente medición a los pocos minutos. Después de que se completaron todas las mediciones de equilibrio presión-peso, las ramitas fueron secadas en estufa a 70°C hasta masa constante (72 h) y fueron pesadas. A partir de las determinaciones de presión, masa fresca, masa saturada y masa seca para cada ramita se obtuvieron los siguientes parámetros: potencial osmótico a máxima turgencia, punto de pérdida de la turgencia, contenido relativo de agua (CRA) en el punto de pérdida de turgencia, fracción de agua simplástica, módulo de elasticidad máxima, contenido simplástico de solutos y capacitancia foliar. El contenido simplástico de solutos por unidad de masa seca se determinó de la siguiente manera: la masa seca del tejido se sustrajo de la masa fresca del tejido para obtener el contenido de agua del tejido, que luego se multiplicó

por la fracción de agua simplástica para obtener el volumen de agua simplástica. El potencial osmótico a saturación (π^{100}) fue convertido en osmolalidad multiplicándolo por 410 miliosmol MPa⁻¹. La osmolalidad fue multiplicada luego por el volumen de agua simplástica y dividida por la masa seca de la muestra (Tyree et al. 1978).

El módulo de elasticidad de las paredes celulares (ε) es definido como el cambio en la presión de turgencia (ΔP) en función del cambio en el contenido relativo de agua (ΔCRA) multiplicado por la fracción de agua simplástica (FS) (Evans, Black, & Link 1990):

$$\varepsilon = (\Delta P / \Delta CRA) \times FS$$

Se determinó la capacitancia foliar a partir de la pendiente de la relación entre el contenido relativo de agua y el potencial hídrico. El cálculo de la conductancia hidráulica foliar (ver más abajo) requiere que la capacitancia foliar sea expresada en términos absolutos normalizada por el área foliar (Brodribb & Holbrook 2003). Por ello la capacitancia calculada a partir de la curvas P-V fue multiplicada por la masa saturada de agua en la muestra y luego dividida por el área foliar. En la práctica, las proporciones peso seco de la hoja:área foliar y masa saturada de agua:peso seco de la hoja fueron determinados previamente para cada especie y tratamiento y usada luego para calcular la capacitancia absoluta normalizada por área foliar:

$$C_{\text{foliar}} = \delta CRA / \delta \Psi_f \times (PS / A_f) \times (AA / PS) / M$$

donde PS es el peso seco de la hoja (g), A_f es el área foliar (m²), AA es la masa de agua foliar al 100% de CRA (g), y M es la masa molar de agua (g mol⁻¹).

4.2.2. Conductancia hidráulica foliar y márgenes de seguridad

La conductancia hidráulica foliar (K_{foliar}) fue determinada utilizando el método de rehidratación programada descrito por Brodribb & Holbrook (2003), que involucró el uso de la siguiente ecuación basada en una analogía entre la rehidratación de una hoja y la recarga de un capacitor:

$$K_{\text{foliar}} = C_{\text{foliar}} \times \ln(\Psi_{f0} / \Psi_{ff}) / t$$

donde C_{foliar} es la capacitancia de la hoja (estimada a partir de las curvas de presión-volumen), Ψ_{f0} es el potencial hídrico foliar antes de la rehidratación parcial, Ψ_{ff} es el

potencial hídrico foliar después de la rehidratación parcial y t es la duración de la rehidratación. Una rama con muchas ramificaciones pequeñas de cuatro plantas por especie y tratamiento fueron cortadas al amanecer, transportadas al laboratorio y recortadas bajo agua. Algunos tallitos se dejaron secar en el laboratorio libremente durante períodos de tiempo variables, luego se colocaron en bolsas de plástico que se sellaron y se mantuvieron en la oscuridad durante al menos 1 h para equilibrarse. Otras ramas fueron rehidratadas de manera tal de obtener un rango adecuado de potenciales hídricos para construir las curvas de vulnerabilidad. Las mediciones de potencial hídrico foliar se realizaron en pequeños tallitos terminales con hojas, correspondientes al crecimiento del año y expuestos al sol, para los valores iniciales (Ψ_{f0}) y para los valores finales después de un período de rehidratación de t segundos (Ψ_{ff}). Para Ψ_{ff} se utilizaron ramitas con las que se determinaron los valores iniciales. A partir de los valores de K_{foliar} se determinaron los porcentajes de pérdida de conductancia foliar (PLC), como:

$$PLC = (K_{max} - K) / K_{max} * 100$$

donde K_{max} es la K_{foliar} máxima calculada. Se elaboraron curvas de vulnerabilidad hidráulica como el PLC en función del Ψ_{f0} para cada tratamiento y especie, y se determinaron el P_{50} y el P_{88} , cuyos valores representan el Ψ_{foliar} al cual se pierde el 50% y el 88% de la conductancia hidráulica foliar, respectivamente.

Para describir el grado de conservación de la integridad del sistema de transporte de agua a través de las especies y tratamientos, se usó un margen de seguridad, definido como la diferencia entre el potencial hídrico foliar mínimo (mediodía) durante la estación de crecimiento y aquel en el cual se pierde el 50% de la conductancia hidráulica foliar (P_{50}). Para este cálculo se usaron los promedios de las variables. Este margen de seguridad puede ser positivo o negativo, dependiendo si el potencial hídrico foliar está por encima o por debajo del P_{50} o del P_{88} (Bucci et al. 2019).

4.2.3. Densidad de la madera y contenido de agua

En agosto de 2017 y de 2018, se colectaron tallos terminales de las cuatro especies arbustivas en los cuatro tratamientos (C, F, I e I+F). La densidad de la madera fue determinada con el método de desplazamiento del agua, tal como se explica en Bucci et al. (2012) en 15 segmentos de tallos de aproximadamente 3 cm de largo, a los

cuales se les retiró la corteza. Se estimó el volumen (V) de cada muestra sumergiéndola en un contenedor con agua destilada sobre una balanza digital de 0,001 g de precisión. La muestra fue mantenida sumergida durante la medición del volumen hasta la saturación con la ayuda de una aguja muy delgada, y con cuidado de no tocar las paredes del contenedor. Luego, las muestras se dejaron sumergidas en agua destilada durante la noche, y se pesaron al día siguiente después de secarlas ligeramente para obtener peso saturado (PSat). Por último, las muestras se secaron en estufa a 60°C durante 72 h, y se pesaron para obtener peso seco (PS). La densidad de la madera se calculó obteniendo la masa a partir del PS y dividiendo luego por el V. El contenido saturado de agua se determinó dividiendo el PSat menos el PS por el V, y multiplicando por 100 para expresarlo en % g⁻¹ PS.

4.2.4. Conductividad hidráulica de tallos

La conductividad hidráulica de los tallos se midió en tres tallos largos por especie y tratamiento colectados a la mañana y al mediodía a fines de noviembre de 2017 (primavera) y a fines de enero de 2018 (verano), recortados bajo el agua para evitar embolismos y transportados al laboratorio con ambos extremos sumergidos en agua destilada. Los segmentos de tallos usados fueron más largos (de 5 a 20 cm de longitud, dependiendo de las especies) que los vasos de xilema de mayor longitud determinados por Bucci et al. (2009) para estas especies. El extremo proximal de cada segmento de tallo se conectó a un sistema de conductividad hidráulica (Tyree & Sperry 1989) utilizando un cabezal hidráulico de 50 cm de altura y un fluido perfusionante de agua deionizada y desgasificada. Se conectó una micropipeta graduada (0,001 ml) al extremo abierto y, cuando el flujo de agua fue constante, se registró el tiempo requerido para que el menisco cruzara 1 marca de la graduación de la pipeta (0,001 ml) (Figura 4.1). Se registraron 5 tiempos consecutivos en cada tallo, que fueron promediados para obtener un valor medio por tallo. La conductividad hidráulica (kg m s⁻¹ MPa⁻¹) se calculó como:

$$K_h = J / (\Delta P / \Delta X)$$

donde J es la tasa de flujo a través del segmento de tallo (kg s⁻¹) y $\Delta P / \Delta X$ es el gradiente de presión a través del segmento (MPa m⁻¹). La conductividad hidráulica específica (K_S, kg m⁻¹ s⁻¹ MPa⁻¹) se obtuvo como la relación entre K_h y el área de la

sección transversal del xilema activo, y la conductividad hidráulica foliar específica (K_L , $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$) se obtuvo como la relación entre K_h y el área superficial foliar (A_L) distal a la sección de tallo. El área de xilema activo (A_S) para el transporte de agua fue determinado en la mitad de los segmentos de tallo introduciendo colorante desde uno de los extremos cortados y procediendo luego a realizar un corte transversal para obtener una muestra que fue analizada bajo lupa binocular. Se determinó el valor Huber, que es definido como el área de la sección transversal del xilema activo (en m^2) dividido por el área foliar distal del tallo (en m^2) (Tyree & Ewers 1991). El valor Huber mide la inversión de tejido de un tallo en relación al área foliar distal.



Figura 4.1. Sistema para medir conductividad hidráulica de tallos.

4.2.5. Transpiración

La transpiración de arbustos y pastos se estimó utilizando una *open top chamber* (OTC) (Figura 4.2), descrita por Scholz et al. (2010). La cámara tiene forma cónica en su parte superior montada sobre una base cilíndrica de 0,80 m de diámetro y está construida con una estructura metálica cubierta herméticamente con plástico transparente. Cristiano et al. (2016) incluyeron un diagrama con todos los componentes de la OTC construida en el laboratorio. El cono presenta una abertura superior de 0,2 m de diámetro. La altura total de la cámara es 1,66 m, y el volumen total es $0,64 \text{ m}^3$. La cámara posee un ventilador en su base a través del cual ingresa aire. Las tasas de flujo se midieron en la abertura superior con un anemómetro de hélice. Las densidades de

vapor de agua del aire que entra y sale de la cámara se midieron con un higrómetro de punto de rocío (HR 33 T, YES, Yankee Environment System, Ontario, Canadá). Las corrientes de aire entrante y saliente de la cámara se canalizan hasta el higrómetro mediante tubos Beva-Line a velocidades de flujo de 4 l/min reguladas por un controlador de flujo. Los datos se registraron cada 1 s con un sistema automático de adquisición de datos (CR10X, Campbell Scientific). La corriente de aire hacia el higrómetro se cambió entre la entrada y la salida a intervalos de 2 minutos. Los flujos de vapor de agua desde la vegetación y del suelo sin vegetación (suelo desnudo) encerrado por la cámara (0,5 m²) se calcularon utilizando la diferencia entre la densidad de vapor de agua del aire de entrada y de salida de la cámara. La evapotranspiración (ET= transpiración [T] + evaporación [E]) se calculó como:

$$ET = V (\rho_{\text{salida}} - \rho_{\text{entrada}}) / A$$

donde ρ_{entrada} y ρ_{salida} son las densidades de vapor de agua (g m⁻³) de las corrientes de aire salientes y entrantes, respectivamente, V es el caudal volumétrico (m³ s⁻¹) y A es el área de la cámara basal (m²).

Para minimizar los efectos de los cambios en las condiciones microclimáticas durante el tiempo de medición (Denmead et al. 1993), cada medición duró entre 4 y 6 minutos. La cámara se colocó en tres sitios de suelo desnudo, sobre tres individuos aislados de *A. prolifera*, de *A. volckmannii* y de *S. filaginoides*, y sobre tres parches dominados por las dos gramíneas *P. ligularis* y *P. speciosa*, en cada tratamiento, para estimar la evaporación de la superficie del suelo y la transpiración de la vegetación, respectivamente. No pudo determinarse la transpiración de *B. microphylla* debido a que el gran tamaño de las plantas impedía el uso de la cámara. Las series de mediciones fueron realizadas a lo largo del día (con intervalos de 3 horas) en cuatro días consecutivos durante febrero (verano). Se restó la evaporación del suelo desnudo de la ET total en las muestras con vegetación para obtener la transpiración de las plantas, tomando en cuenta el porcentaje de suelo desnudo en cada muestra y el valor de evaporación del suelo desnudo. La transpiración fue expresada en g H₂O m⁻² h⁻¹. Para evitar la subestimación de la evaporación del suelo dado que la cámara bloquea las condiciones naturales del viento, las mediciones se realizaron durante días con baja velocidad del viento (<30 km/h).



Figura 4.2. *Open top chamber* utilizada para medir la transpiración de las plantas.

4.2.6. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software R versión 3.4.4 (R Development Core Team, 2018). Se utilizaron modelos lineales (MLs) con test-F para evaluar el efecto de la interacción entre tratamiento y especie (variables explicativas) sobre la densidad de la madera y el contenido saturado de agua de los tallos (variables dependientes). Se usaron modelos lineales mixtos (MLMs) con test-F para evaluar el efecto de la interacción entre tratamiento, momento del día (madrugada y mediodía) y estación del año (primavera y verano) (variables explicativas) sobre el potencial hídrico foliar para cada especie (variable dependiente), con la planta como efecto aleatorio. Se utilizaron modelos lineales (MLs) con test-F para evaluar el efecto de la interacción entre tratamiento y especie (variables explicativas) sobre los parámetros estimados a partir de las curvas presión-volumen: punto de pérdida de turgencia, potencial osmótico a turgencia, contenido simplástico de solutos, contenido relativo de agua en el punto de pérdida de turgencia, módulo de elasticidad y capacitancia foliar (variables

dependientes). Se utilizó la función “fitplcs” del paquete de R “fitplc” versión 1.2-3 (Duursma & Choat 2017) para generar las curvas de vulnerabilidad (PLC en función de potencial hídrico), ajustando funciones Weibull modificadas por Ogle et al. (2009), para cada tratamiento y especie. El paquete “fitplc” estima el P_x (P_{50} y P_{88}), y sus intervalos de confianza (IC) con el método bootstrap. Se utilizaron los IC para establecer diferencias entre los tratamientos para cada especie. Cuando los IC del 95% no se superpusieron entre algún tratamiento y el control, se concluyó que el P_x fue significativamente diferente entre ambos ($p < 0,05$). Se usaron MLs con test-F para evaluar el efecto de la interacción entre tratamiento, momento del día (mañana y mediodía) y estación del año (primavera y verano) (variables explicativas) sobre la conductividad hidráulica foliar específica para cada especie (variable dependiente). Para el valor Huber, se usó un modelo lineal ajustado de mínimos cuadrados (GLS) con tratamiento, especie y estación del año como variables explicativas en interacción, con estructura de correlación de simetría compuesta (corCompSymm para momento del día). Por último, para evaluar el efecto de la interacción entre tratamiento, especie y estación del año (variables explicativas) sobre la transpiración (variable dependiente), se testearon GLSs, con estructura de correlación corCompSym ya que cada muestra consistió de dos medidas diarias, pero este factor no fue significativo (prueba REML: $\chi^2 = 0.67$, $df = 1$, $p = 0.414$, por lo cual se eliminó del modelo. Los GLSs se llevaron a cabo utilizando la función “gls” del paquete de R “nlme” versión 3.1-131.1 (Pinheiro & Bates 2000). Cuando fue necesario, todos los modelos se ajustaron mediante modelos de varianza; la selección del modelo se basó en el criterio de información de Akaike (AIC) (Burnham & Anderson 2002). La simplificación de los efectos fijos de todos los modelos para alcanzar el modelo mínimo adecuado se llevó a cabo mediante una prueba de hipótesis (test-F). El análisis post-hoc de Tukey se utilizó para comparaciones múltiples en todos los modelos cuando el test-F fue significativo, utilizando la función “glht” del paquete de R “multcomp” versión 1.4-8 (Bretz et al. 2010). Cuando se hicieron comparaciones entre tratamientos, solo se comparó cada tratamiento (F, I o I+F) con respecto al control. Para graficar los resultados del modelo mejor ajustado, se utilizó el paquete de R “visreg” versión 2.5-0 (Breheny & Burchett 2017).

4.3. RESULTADOS

4.3.1. El potencial hídrico foliar y relaciones de presión-volumen

En general, el potencial hídrico foliar (Ψ_f) de mediodía (o mínimo) fue significativamente menor (más negativo) (mínimo) que el de madrugada (o máximo) y menor en verano que en primavera para todas las especies ($p < 0,001$ en todas las comparaciones) (Figura 4.3 y Tabla 4.1). Las excepciones fueron que el Ψ_f de mediodía para *A. prolifera* no fue significativamente diferente del Ψ_f de madrugada en los tratamientos F e I durante el verano, así como en el control y en el tratamiento F durante el verano para *P. ligularis* (Figura 4.3). En general, no hubo diferencias significativas de los tratamientos respecto al control en cada estación del año, periodo del día y especie, salvo algunas excepciones (Tabla 4.1). En *A. prolifera*, el Ψ_f mínimo de primavera fue mayor (menos negativo) en el tratamiento I+F que en el control ($p = 0,0001$), pero en verano fue menor que en el control ($p < 0,0001$). En esta especie el Ψ_f máximo en verano fue menor en los tratamientos F ($p = 0,003$), I ($p = 0,0001$) e I+F ($p < 0,0001$) con respecto al control (Figura 4.3). En verano en *P. ligularis*, el Ψ_f de madrugada fue mayor en el tratamiento I+F que en el control ($p = 0,02$), y el Ψ_f mínimo fue menor en los tratamientos I ($p = 0,01$) e I+F ($p = 0,004$) con respecto al control (Figura 4.3). En el resto de las especies no hubo diferencias significativas de los tratamientos respecto al control en cada estación del año y periodo del día (Tabla 4.1).

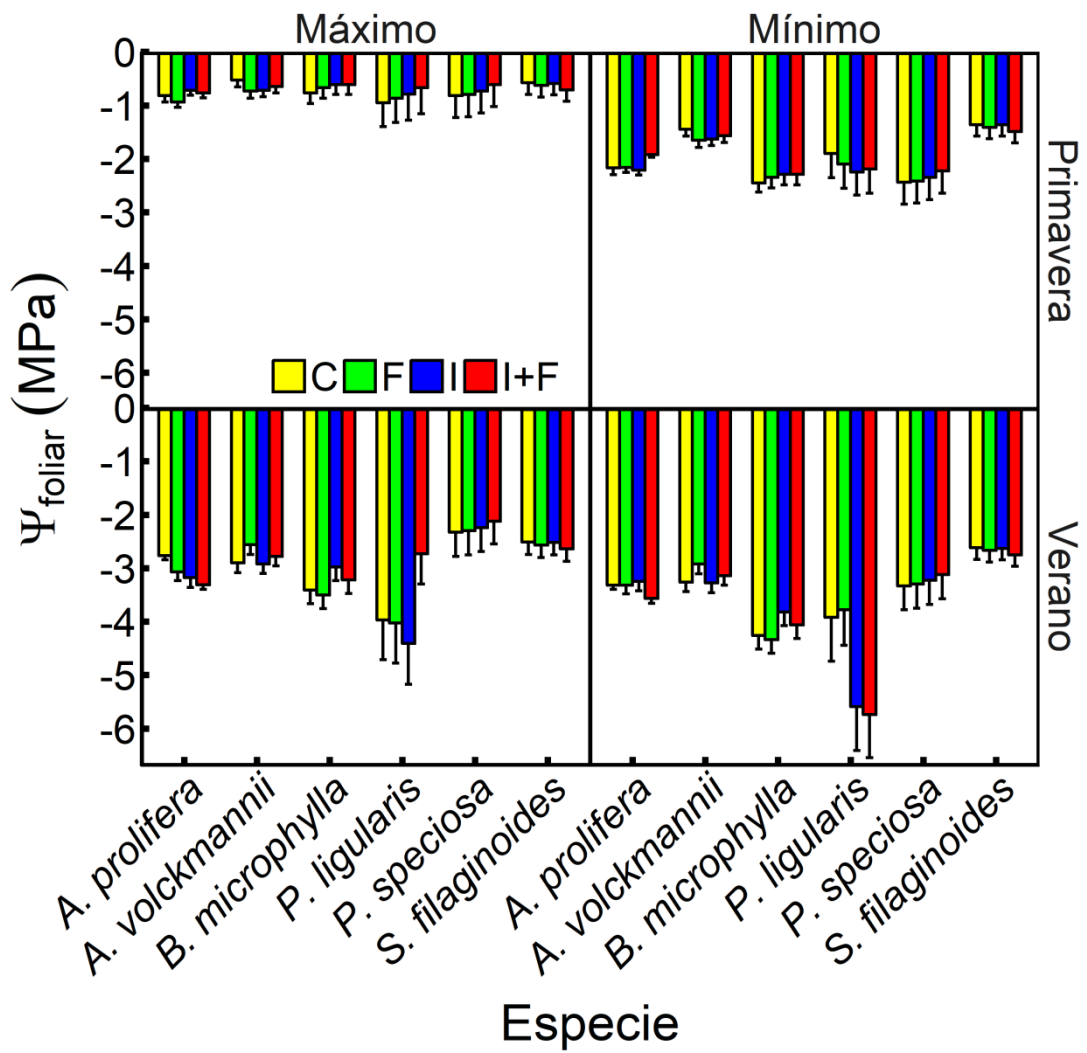


Figura 4.3. Potencial hídrico foliar (Ψ_f) máximo y mínimo durante primavera y verano, para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media \pm IC (n= 3).

Tabla 4.1. Resultados de los test-F para potencial hídrico foliar para cada especie. Se muestran el valor estadístico F, los grados de libertad (df) y el valor de probabilidad p , para tratamiento (T), momento del día (M) y estación del año (E).

Especie	Test-F
<i>A. prolifera</i>	TxMxE: $F_{(3,130)} = 4,59$ $p = \mathbf{0,004}$
<i>A. volckmannii</i>	TxMxE: $F_{(3,54)} = 1,54$ $p = 0,21$
	TxM: $F_{(3,57)} = 0,93$ $p = 0,43$
	MxE: $F_{(1,60)} = 31,5$ $p < \mathbf{0,0001}$
	TxE: $F_{(3,60)} = 4,69$ $p = \mathbf{0,005}$
<i>B. microphylla</i>	TxMxE: $F_{(3,54)} = 0,68$ $p = 0,57$
	TxM: $F_{(3,57)} = 1,4$ $p = 0,25$
	MxE: $F_{(1,60)} = 69,87$ $p < \mathbf{0,0001}$
	TxE: $F_{(3,60)} = 2,95$ $p = \mathbf{0,04}$
<i>P. ligularis</i>	TxMxE: $F_{(3,75)} = 7,19$ $p = \mathbf{0,0003}$
<i>P. speciosa</i>	TxMxE: $F_{(3,76)} = 0,61$ $p = 0,607$
	TxM: $F_{(3,79)} = 0,31$ $p = 0,82$
	TxE: $F_{(3,82)} = 0,30$ $p = 0,82$
	T: $F_{(3,4)} = 0,21$ $p = 0,88$
	MxE: $F_{(1,85)} = 14,84$ $p = \mathbf{0,0002}$
<i>S. filaginoides</i>	TxMxE: $F_{(3,53)} = 0,592$ $p = 0,62$
	TxM: $F_{(3,56)} = 1,41$ $p = 0,25$
	TxE: $F_{(3,59)} = 1,21$ $p = 0,31$
	T: $F_{(3,4)} = 0,30$ $p = 0,83$
	MxE: $F_{(1,62)} = 68,42$ $p < \mathbf{0,0001}$

En cuanto a los parámetros obtenidos a partir de las curvas P-V, el potencial hídrico en el punto de pérdida de turgencia (PPT) fue diferente entre tratamientos y especies, con interacción significativa entre ambos ($F_{(9,45)} = 2,88$, $p = 0,009$). El PPT fue menor en el tratamiento de irrigación con respecto al control en *A. volckmannii* ($p = 0,014$) y fue marginalmente mayor en el tratamiento I+F que en el control en *S. filaginoides* ($p = 0,054$) (Figura 4.4 A). El potencial osmótico a saturación (π^{100}) también fue diferente entre tratamientos y especies, con interacción significativa entre ambos ($F_{(9,45)} = 2,51$, $p = 0,02$). El π^{100} fue marginalmente menor en el tratamiento I+F que en el control en *A. prolifera* ($p = 0,087$) y fue mayor en el tratamiento de fertilización con respecto al control en *B. microphylla* ($p = 0,002$) (Figura 4.4 B). El contenido simplástico de solutos tuvo efecto significativo de la interacción entre

tratamientos y especies ($F_{(9,45)} = 4,01$, $p = 0,0008$). En *B. microphylla*, el contenido de solutos fue menor en el tratamiento de fertilización ($p = 0,041$) y marginalmente mayor en el tratamiento de irrigación que en el control ($p = 0,065$), y en *S. filaginoides* el contenido de solutos fue mayor en F ($p = 0,029$) e I+F ($p = 0,039$) respecto al control (Figura 4.4 C). El PPT ocurrió a valores medios de contenido relativo de agua superiores a 60% en todas las especies, siendo mayores en *A. prolifera* y *B. microphylla* que en *A. volckmannii* y *S. filaginoides* ($F_{(3,57)} = 18$, $p < 0,0001$ para el efecto de la especie), sin diferencias significativas entre tratamientos ($F_{(3,54)} = 1,44$, $p = 0,242$) ni interacción significativa entre tratamiento y especie ($F_{(9,45)} = 1,87$, $p = 0,0811$) (Figura 4.4 D). El módulo de elasticidad (ϵ) fue diferente entre tratamientos y especies, con interacción marginalmente significativa entre ambos ($F_{(9,45)} = 2,06$, $p = 0,054$). El ϵ fue menor (paredes más elásticas) en el tratamiento de fertilización que en el control solo en *B. microphylla* ($p = 0,027$) (Figura 4.4 E), sin diferencias entre tratamientos para las otras especies. La capacitancia foliar (C_{foliar}) varió entre 1,4 y 6,7 mol m⁻² MPa⁻¹, siendo diferente entre especies ($F_{(3,57)} = 36,34$, $p < 0,0001$), pero sin diferencias entre tratamientos ($F_{(3,54)} = 1,64$, $p = 0,191$) y sin interacción significativa entre especie y tratamiento ($F_{(9,45)} = 1,71$, $p = 0,114$). La C_{foliar} fue mínima en *B. microphylla*, y máxima en *S. filaginoides* (Figura 4.4 F).

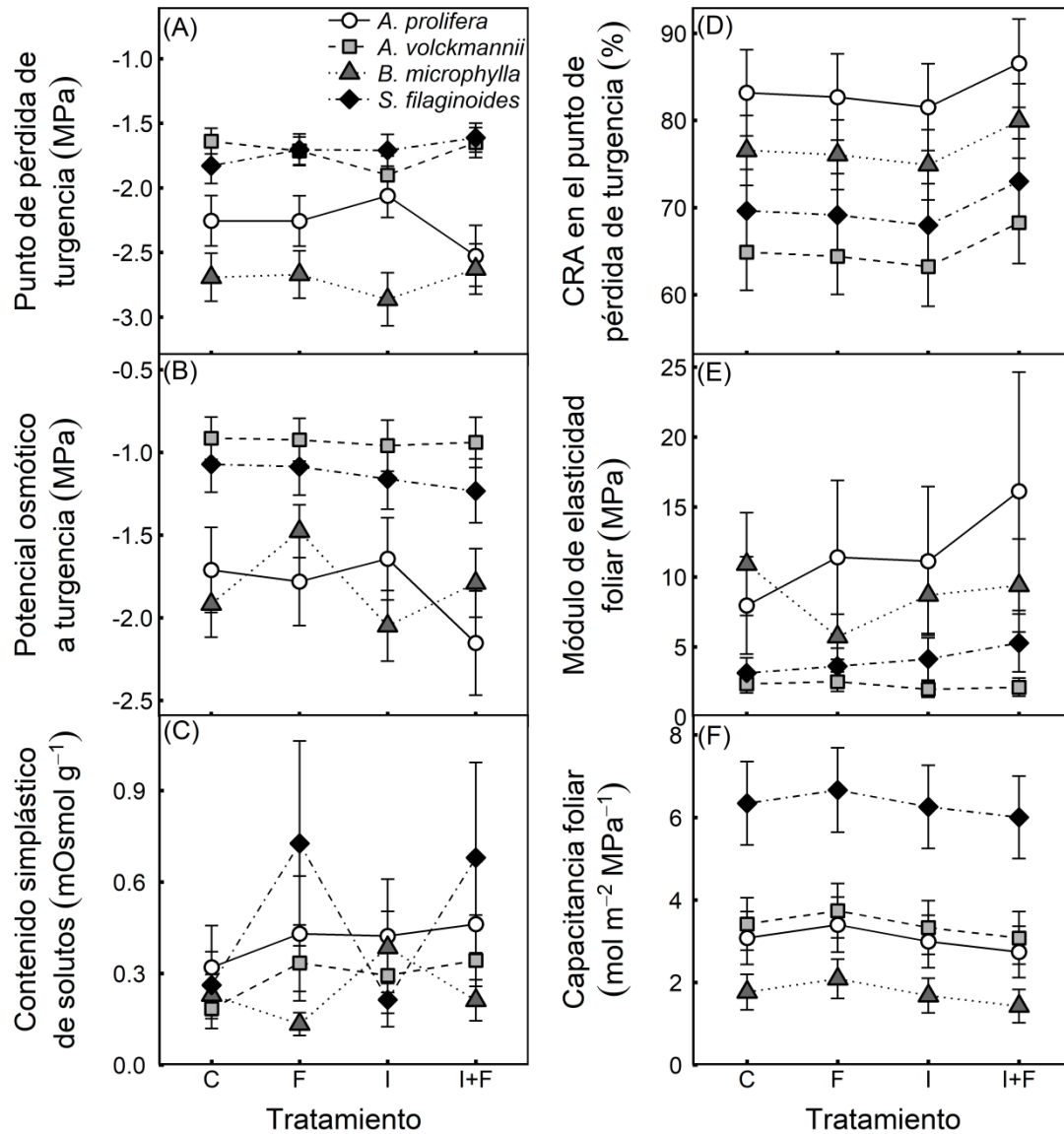


Figura 4.4. (A) Potencial hídrico en el punto de pérdida de turgencia (PPT; MPa), (B) potencial osmótico a máxima saturación (π^{100} ; MPa), (C) contenido simplástico de solutos (mOsmol g⁻¹), (D) contenido relativo de agua en el punto de pérdida de turgencia (%), (E) módulo de elasticidad foliar (MPa) y (F) capacitancia foliar (mol m⁻² MPa⁻¹), para cada especie y tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en primavera en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media \pm IC (n= 3-7).

El potencial hídrico foliar mínimo medido en el campo durante la estación de crecimiento (primavera) fue mayor (menos negativo) que el potencial hídrico en el punto de pérdida de turgencia estimado para hojas colectadas durante la misma estación del año, en todas las especies y tratamientos excepto en *A. volckmannii* en el tratamiento

de fertilización (Figura 4.5). *Berberis microphylla* y *S. filaginoides* fueron las dos especies que presentaron potenciales hídricos mínimos más alejados del PPT.

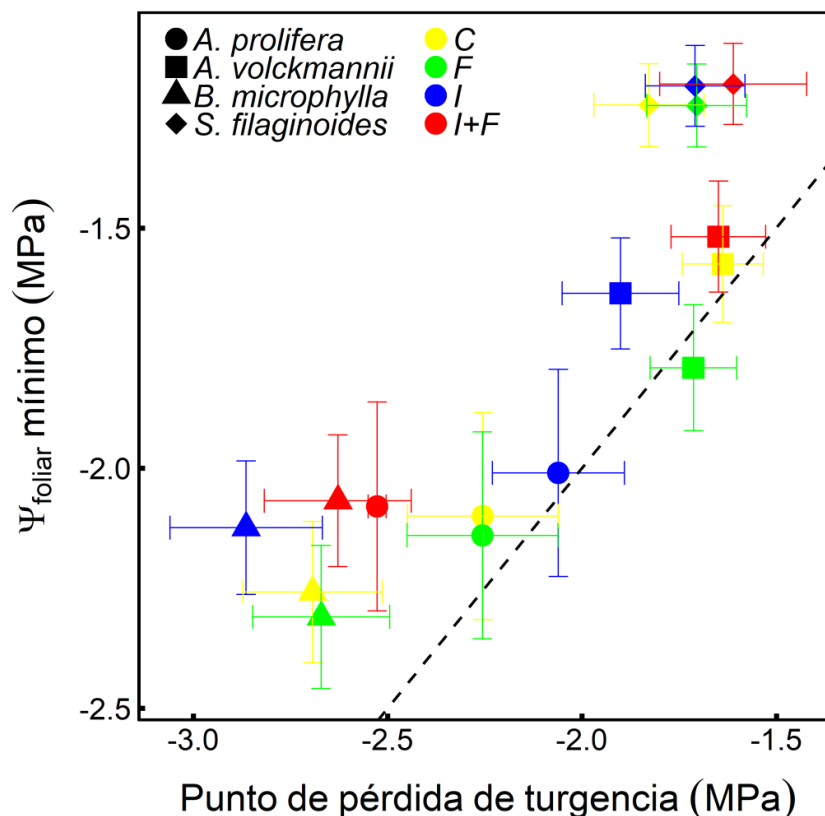


Figura 4.5. Potencial hídrico foliar mínimo en primavera (MPa) en función del punto de pérdida de turgencia (MPa) estimado a partir de las curvas P-V realizadas en primavera, para cada especie y tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media \pm IC (n= 3-7). La línea de trazos indica la relación 1:1.

4.3.2. Conductancia hidráulica foliar y márgenes de seguridad

Las curvas de vulnerabilidad de las hojas, que relacionan el porcentaje de pérdida de la conductancia hidráulica (PLC) con el potencial hídrico foliar (Ψ_f), y el P_{50} fueron significativamente diferentes de las correspondientes al control solo en el tratamiento I+F en *A. prolifera* (Figura 4.6 A) y en el tratamiento I en *A. volckmannii* (Figura 4.6 B). En estos tratamientos, el P_{50} fue significativamente menor que en el control, es decir, el 50% de pérdida de la conductancia hidráulica foliar específica

(K_{foliar}) se produjo a un potencial hídrico más negativo que en el control (Figura 4.6 A-B, Tabla 4.2). En *B. microphylla* y *S. filaginoides* no hubo diferencias significativas en el P_{50} entre tratamientos (Figura 4.6 C-D, Tabla 4.2).

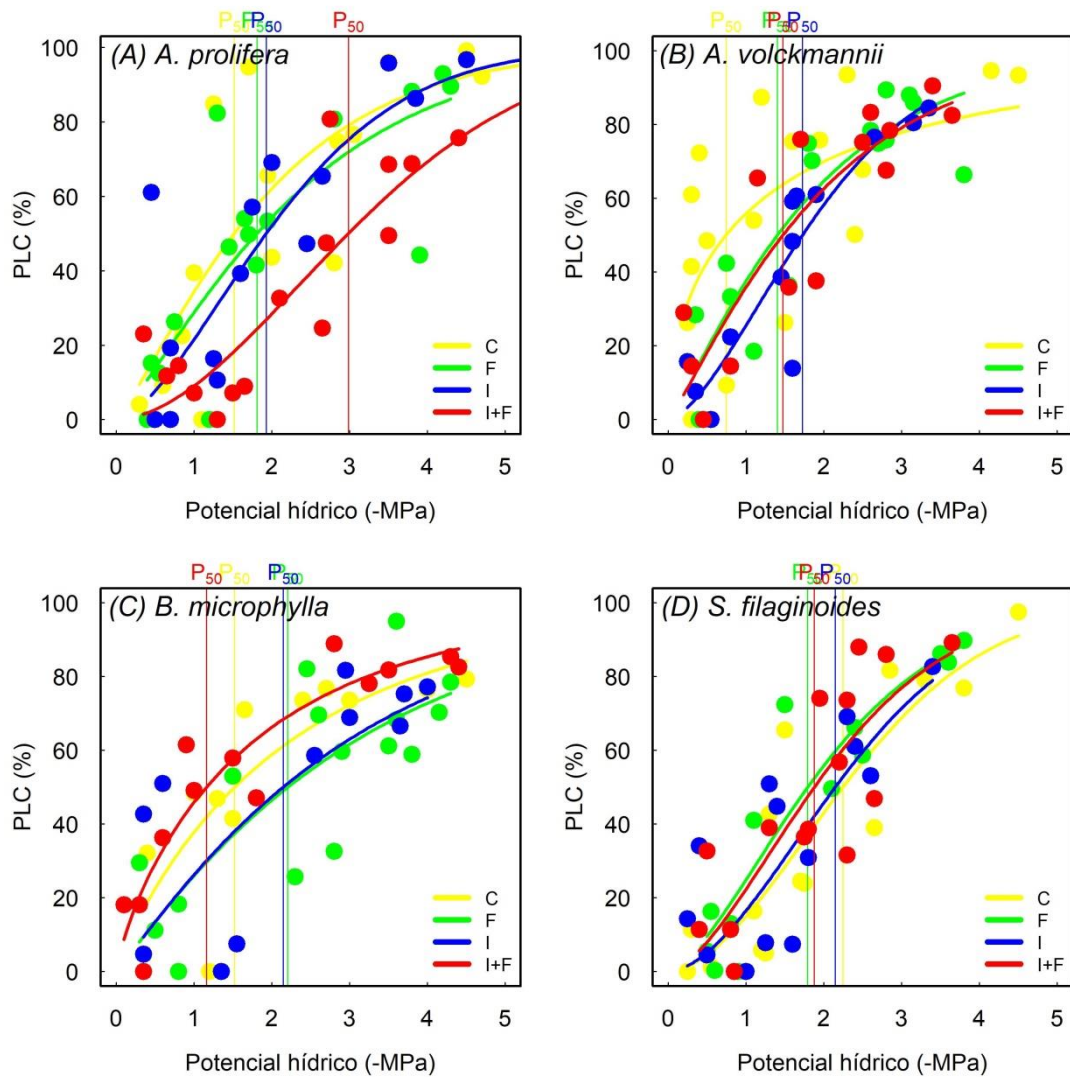


Figura 4.6. Porcentaje de pérdida de la conductancia hidráulica foliar (%) en función del potencial hídrico foliar (-MPa) para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) y especie: (A) *A. prolifera*, (B) *A. volckmannii*, (C) *B. microphylla* y (D) *S. filaginoides* en una estepa patagónica. Las líneas son las funciones Weibull ajustadas a los datos. Las líneas verticales indican el valor del P_{50} para cada tratamiento.

Tabla 4.2. P_{50} (-MPa) y sus intervalos de confianza estimados a partir del método Bootstrap (2,5 y 97,5%), para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) y especie: *A. prolifera*, *A. volckmannii*, *B. microphylla* y *S. filaginoides* en una estepa patagónica. Los valores en negrita indican que son significativamente diferentes del control.

Especie	Tratamiento	P_{50}	2,5%	97,5%
<i>A. prolifera</i>	C	1,52	0,85	2,20
	F	1,81	1,36	2,43
	I	1,93	1,20	2,29
	I+F	2,99	2,44	3,50
<i>A. volckmannii</i>	C	0,74	0,29	1,42
	F	1,40	1,00	1,76
	I	1,73	1,44	2,05
	I+F	1,47	0,88	2,00
<i>B. microphylla</i>	C	1,52	0,92	2,11
	F	2,21	1,47	2,92
	I	2,15	0,91	2,91
	I+F	1,16	0,82	1,56
<i>S. filaginoides</i>	C	2,25	1,79	2,73
	F	1,79	1,30	2,19
	I	2,15	1,68	3,21
	I+F	1,88	1,50	2,26

El margen de seguridad hidráulico $\Psi_{f \text{ mín}} - P_{50}$ fue positivo, es decir, el potencial hídrico de la hoja estuvo por encima (menos negativo) del potencial en el cual se pierde el 50% de la conductancia hidráulica, solo en el tratamiento I+F en *A. prolifera*, en el tratamiento I en *A. volckmannii* y *B. microphylla*, y en todos los tratamientos en *S. filaginoides* (Tabla 4.3). El margen de seguridad hidráulico $\Psi_{f \text{ mín}} - P_{88}$ fue positivo en todos los tratamientos y especies (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Potencial hídrico foliar de mediodía promedio durante la primavera ($\Psi_{f \text{ mín}}$), potencial hídrico foliar en que se pierde el 50% de la conductancia hidráulica foliar (P_{50}), potencial hídrico foliar en que se pierde el 88% de la conductancia hidráulica foliar (P_{88}) y márgenes de seguridad hidráulico (diferencia entre $\Psi_{f \text{ mín}}$ y P_{50} , y entre $\Psi_{f \text{ mín}}$ y P_{88}), para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) y especie: *A. prolifera*, *A. volckmannii*, *B. microphylla* y *S. filaginoides* en una estepa patagónica. Los valores en negrita indican los márgenes de seguridad positivos.

Especie	Tratamiento	$\Psi_{f \text{ mín}}$	P_{50}	$\Psi_{f \text{ mín}} - P_{50}$	P_{88}	$\Psi_{f \text{ mín}} - P_{88}$
<i>A. prolifera</i>	C	-2,1	-1,52	-0,58	-3,85	1,75
	F	-2,14	-1,81	-0,33	-4,57	2,43
	I	-2,01	-1,93	-0,08	-3,88	1,87
	I+F	-2,08	-2,99	0,91	-5,52	3,44
<i>A. volckmannii</i>	C	-1,57	-0,74	-0,83	-5,53	3,96
	F	-1,79	-1,40	-0,39	-3,73	1,94
	I	-1,64	-1,73	0,09	-3,52	1,88
	I+F	-1,52	-1,47	-0,048	-3,90	2,38
<i>B. microphylla</i>	C	-2,26	-1,52	-0,74	-5,24	2,98
	F	-2,31	-2,21	-0,1	-6,35	4,04
	I	-2,12	-2,15	0,03	-6,05	3,93
	I+F	-2,07	-1,16	-0,91	-4,50	2,43
<i>S. filaginoides</i>	C	-1,24	-2,25	1,01	-4,18	2,94
	F	-1,24	-1,79	0,54	-3,75	2,51
	I	-1,20	-2,15	0,95	-4,05	2,85
	I+F	-1,20	-1,88	0,68	-3,78	2,58

4.3.3. Densidad y contenido de agua de la madera

La densidad de la madera fue diferente entre los tratamientos y las especies, con interacción significativa entre ambas variables ($F_{(9,335)} = 2,34$, $p = 0,014$). Fue menor en el tratamiento I+F con respecto al control en *A. prolifera* ($p = 0,022$), mientras que fue mayor en el tratamiento I+F que en el control en *B. microphylla* ($p = 0,046$) y fue marginalmente mayor en el tratamiento I que en el control en *S. filaginoides* ($p = 0,088$) (Figura 4.7 A). *A. prolifera* presentó la madera de menor densidad, siendo menor a $0,4 \text{ g cm}^{-3}$, mientras que *A. volckmannii* y *B. microphylla* tuvieron las maderas más densas de las cuatro especies, siendo cercanas a $0,8 \text{ g cm}^{-3}$ (Figura 4.7 A).

El contenido saturado de agua de los tallos varió entre tratamientos y especies, con interacción significativa entre ambas variables ($F_{(9,335)} = 2,83$, $p = 0,003$). El contenido saturado de agua fue menor en los tratamientos de irrigación ($p = 0,011$) e I+F ($p = 0,016$) con respecto al control en *B. microphylla*, y fue marginalmente menor en el tratamiento de irrigación con respecto al control ($p = 0,053$) en *S. filaginoides* (Figura 4.7 B). El contenido saturado de agua fue máximo en *A. prolifera*, y mínimo en *A. volckmannii* y *B. microphylla* (Figura 4.7 B).

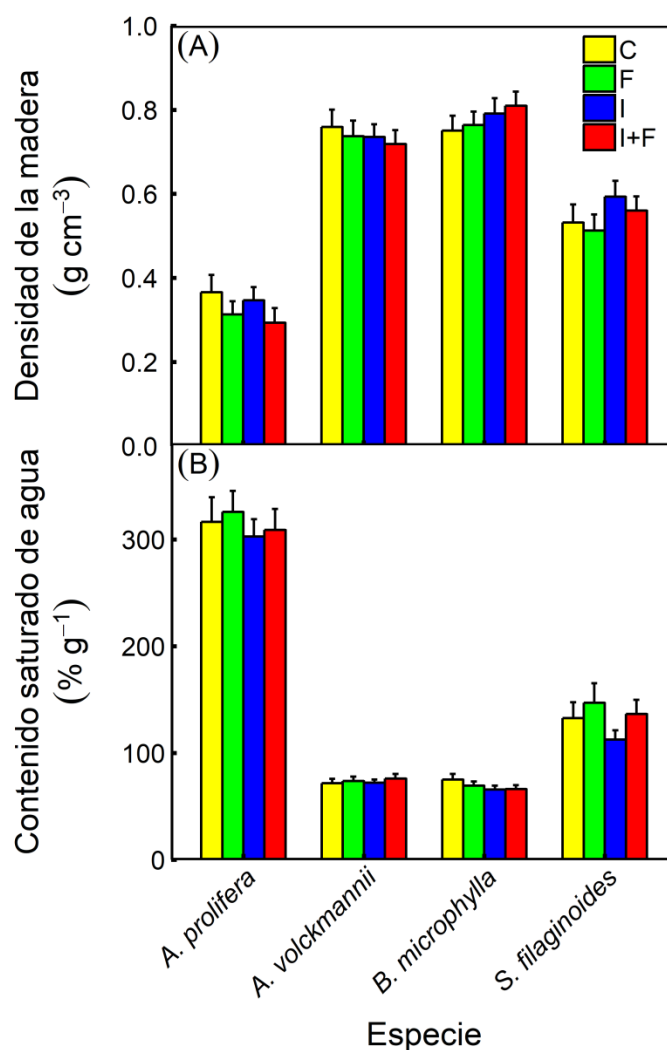


Figura 4.7. (A) Densidad de la madera (g cm^{-3}) y (B) contenido saturado de agua de la madera ($\% \text{ g}^{-1}$) para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en cuatro especies arbustivas de una estepa patagónica. Los símbolos representan la media +IC ($n = 15-30$).

4.3.4. Conductividad hidráulica de tallos y valor Huber (A_L/A_S)

La conductividad hidráulica específica (K_S), una medida de la eficiencia en el transporte de agua a nivel de tallo, varió entre los tratamientos, las estaciones del año (primavera vs. verano) y el momento del día (mañana vs. mediodía) de modo diferente según la especie (Tabla 4.4). La K_S varió entre 0,026 y 0,554 $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$. En *A. prolifera*, la K_S fue cercana a 0,1 $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$ y no hubo diferencias significativas entre tratamientos ni entre estaciones ni en el momento del día (Tabla 4.4, Figura 4.8). En *A. volckmannii* K_S fue significativamente mayor al mediodía que a la mañana ($p = 0,008$) en ambas estaciones, y ningún tratamiento se diferenció del control ni entre las estaciones (Figura 4.8). La K_S de *B. microphylla* fue menor en verano que en primavera ($p < 0,0001$), y en ningún tratamiento fue significativamente diferente del control (Figura 4.8). En *S. filaginoides*, la K_S alcanzó los valores más altos de las cuatro especies estudiadas. En esta especie, la K_S fue menor en los tratamientos F ($p = 0,003$) e I+F ($p < 0,001$) con respecto al control solo durante la mañana en verano, y en estos tratamientos la K_S fue menor en verano que en primavera ($p < 0,0001$) (Figura 4.8).

Tabla 4.4. Resultados de los test-F de la conductividad hidráulica específica (K_s) para cada especie. Se muestran el valor estadístico F, los grados de libertad (df) y el valor de probabilidad p , para tratamiento (T), momento del día (M) y estación del año (E).

Especie	Test-F
<i>A. prolifera</i>	TxMxE: $F_{(3,40)} = 0,665$ $p = 0,578$
	TxM: $F_{(3,43)} = 0,02$ $p = 0,996$
	MxE: $F_{(1,46)} = 0,16$ $p = 0,69$
	TxE: $F_{(3,47)} = 0,51$ $p = 0,68$
	E: $F_{(1,50)} = 0,07$ $p = 0,79$
	M: $F_{(1,51)} = 0,18$ $p = 0,67$
	T: $F_{(3,52)} = 0,79$ $p = 0,5$
<i>A. volckmannii</i>	TxMxE: $F_{(3,32)} = 0,615$ $p = 0,611$
	ExM: $F_{(1,35)} = 0,28$ $p = 0,6$
	TxM: $F_{(3,36)} = 1,22$ $p = 0,316$
	TxE: $F_{(3,39)} = 3,5$ $p = \mathbf{0,024}$
<i>B. microphylla</i>	M: $F_{(1,39)} = 7,13$ $p = \mathbf{0,011}$
	TxMxE: $F_{(3,38)} = 0,567$ $p = 0,64$
	TxM: $F_{(3,41)} = 0,587$ $p = 0,627$
	MxE: $F_{(1,44)} = 0,538$ $p = 0,467$
	TxE: $F_{(3,45)} = 1,39$ $p = 0,258$
	T: $F_{(3,48)} = 1,5$ $p = 0,227$
<i>S. filaginoides</i>	M: $F_{(1,51)} = 0,451$ $p = 0,505$
	E: $F_{(1,52)} = 17,7$ $p = \mathbf{0,0001}$
	TxMxE: $F_{(3,38)} = 2,46$ $p = 0,08$
	MxE: $F_{(1,41)} = 0,649$ $p = 0,425$
<i>S. filaginoides</i>	TxM: $F_{(3,42)} = 3,46$ $p = \mathbf{0,025}$
	TxE: $F_{(3,42)} = 3,66$ $p = \mathbf{0,02}$

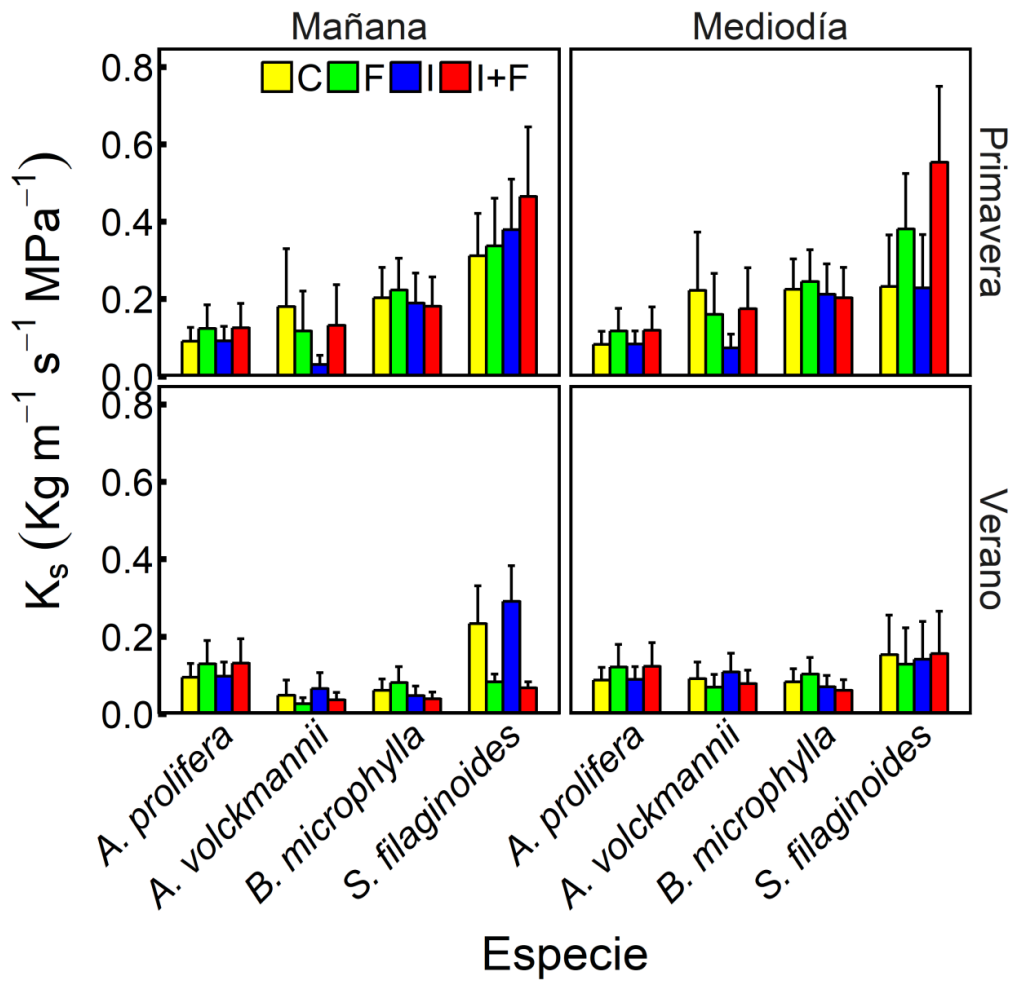


Figura 4.8. Conductividad hidráulica específica de tallos ($\text{Kg m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$) a la mañana y mediodía durante primavera y verano, para cada especie y tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media +IC (n= 3).

La conductividad hidráulica foliar específica (K_L), una medida de la capacidad de los tallos de suplir agua a las hojas, varió entre 1×10^{-5} y $5 \times 10^{-4} \text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$, existiendo algunas diferencias entre los tratamientos, las estaciones del año y el momento del día según la especie (Tabla 4.5). En *A. prolifera*, la K_L fue mayor en verano que en primavera, tanto la de la mañana ($p = 0,002$) como la del mediodía ($p = 0,003$), pero no hubo diferencias entre K_L de mañana y de mediodía en ambas estaciones ($p = 0,77$ en primavera y $p = 0,58$ en verano) (Figura 4.9). En verano, K_L de *A. prolifera* fue mayor en el tratamiento I+F con respecto al control ($p = 0,047$) (Figura

4.9). En *A. volckmannii*, la K_L fue marginalmente menor en el tratamiento F ($p = 0,067$) y significativamente menor en el tratamiento I ($p = 0,037$) con respecto al control, independientemente de la estación y del momento del día. En esta especie, K_L de mañana fue mayor en verano que en primavera ($p < 0,001$). Además, la K_L de *A. volckmannii* en primavera fue mayor durante el mediodía que a la mañana ($p = 0,017$) pero en verano ocurrió lo opuesto ($p = 0,052$) (Figura 4.9). La K_L de *B. microphylla* fue marginalmente menor en el tratamiento I+F que en el control ($p = 0,053$), menor durante el mediodía que a la mañana ($p = 0,009$) y menor en verano que en primavera ($p = 0,032$) (Figura 4.9). En *S. filaginoides* solo hubo efecto marginal del tratamiento, pero ningún tratamiento se diferenció del control, aunque la K_L tendió a ser menor en el tratamiento F con respecto al control ($p = 0,17$) (Figura 4.9).

Tabla 4.5. Resultados de los test-F de la conductividad hidráulica foliar específica (K_L) para cada especie. Se muestran el valor estadístico F, los grados de libertad (df) y el valor de probabilidad p , para tratamiento (T), momento del día (M) y estación del año (E).

Especie	Test-F
<i>A. prolifera</i>	TxMxE: $F_{(3,40)} = 0,125$ $p = 0,945$
	TxM: $F_{(3,43)} = 0,042$ $p = 0,988$
	MxE: $F_{(1,46)} = 5,08$ $p = \mathbf{0,029}$
	TxE: $F_{(3,46)} = 3,69$ $p = \mathbf{0,018}$
<i>A. volckmannii</i>	TxMxE: $F_{(3,32)} = 0,588$ $p = 0,627$
	TxM: $F_{(3,35)} = 1,36$ $p = 0,272$
	TxE: $F_{(3,38)} = 1,6$ $p = 0,205$
	MxE: $F_{(1,41)} = 14,3$ $p = \mathbf{0,0005}$
	T: $F_{(3,41)} = 3,33$ $p = \mathbf{0,029}$
<i>B. microphylla</i>	TxMxE: $F_{(3,38)} = 0,388$ $p = 0,762$
	TxM: $F_{(3,41)} = 0,294$ $p = 0,83$
	TxE: $F_{(3,44)} = 0,446$ $p = 0,722$
	MxE: $F_{(1,47)} = 1,95$ $p = 0,17$
	E: $F_{(1,48)} = 4,62$ $p = \mathbf{0,037}$
	T: $F_{(3,48)} = 2,78$ $p = \mathbf{0,05}$
M: $F_{(1,48)} = 6,86$ $p = \mathbf{0,012}$	
<i>S. filaginoides</i>	TxMxE: $F_{(3,38)} = 1,2$ $p = 0,321$
	TxM: $F_{(3,41)} = 0,596$ $p = 0,621$
	TxE: $F_{(3,44)} = 0,906$ $p = 0,446$
	MxE: $F_{(1,47)} = 2,06$ $p = 0,158$
	E: $F_{(1,48)} = 0,179$ $p = 0,674$
	M: $F_{(1,49)} = 0,461$ $p = 0,5$
T: $F_{(3,50)} = 2,77$ $p = \mathbf{0,051}$	

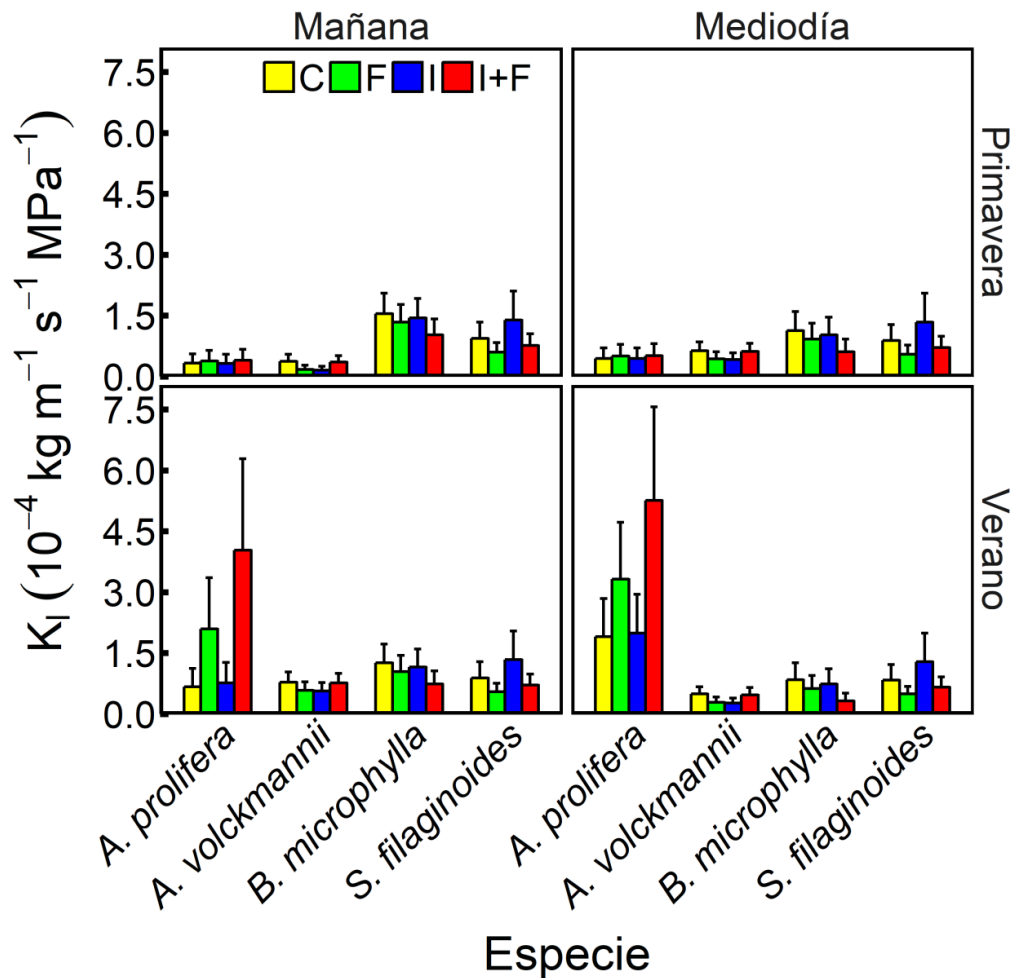


Figura 4.9. Conductividad hidráulica foliar específica de tallos ($10^{-4} \text{ Kg m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$) a la mañana y al mediodía durante primavera y verano, para cada especie y tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media +IC (n= 3).

El valor Huber fue mayor en verano que en primavera para *A. volckmannii* ($F_{(1,45)} = 10,1$, $p = 0,003$), *B. microphylla* ($F_{(1,51)} = 10,6$, $p = 0,002$) y *S. filaginoides* ($F_{(1,51)} = 23,4$, $p < 0,0001$), pero no hubo diferencias significativas entre tratamientos ($F_{(3,42)} = 1,26$ $p = 0,3$, $F_{(3,48)} = 2,01$ $p = 0,125$ y $F_{(3,48)} = 2,13$ $p = 0,11$, respectivamente) (Figura 4.10 A-B). El valor Huber en *A. prolifera* fue diferente entre tratamientos y entre estaciones, con interacción significativa entre ambos factores ($F_{(3,33)} = 4,97$ $p = 0,006$), siendo mayor en el tratamiento I+F respecto al control solo en verano ($p =$

0,004), y mayor en verano que en primavera solo en los tratamientos F ($p < 0,0001$) e I+F ($p < 0,0001$) (Figura 4.10 A-B).

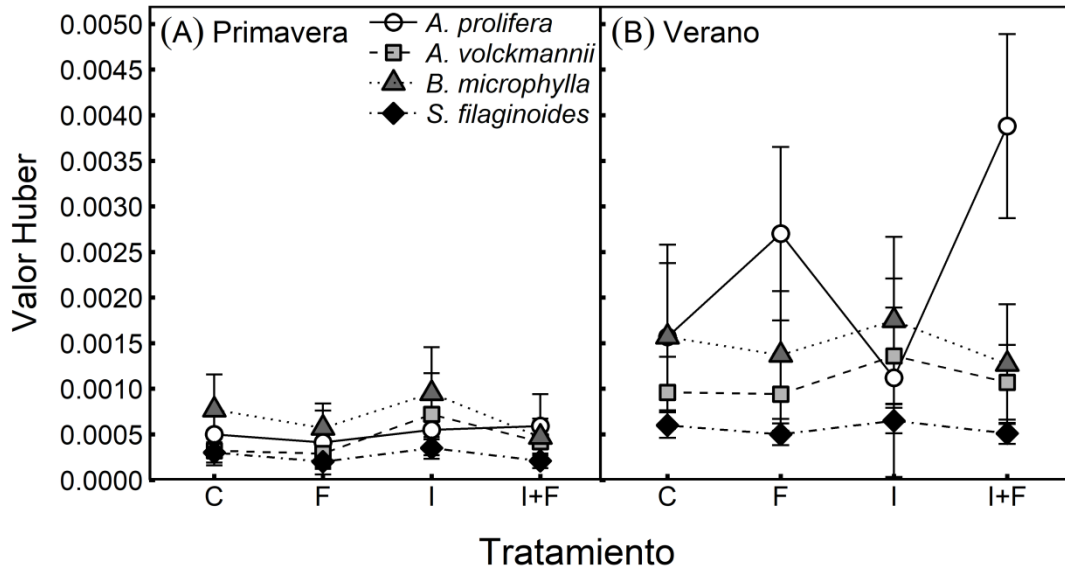


Figura 4.10. Valor Huber para cada especie y tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en (A) primavera y (B) verano en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media +IC (n= 3).

4.3.5. Transpiración

La transpiración varió significativamente entre tratamientos en *A. prolifera* ($F_{(3,6)} = 36,9$, $p = 0,0003$) y *S. filaginoides* ($F_{(3,6)} = 9,62$, $p = 0,016$), pero no en *A. volckmannii* ($F_{(3,7)} = 2,72$, $p = 0,124$) ni en las gramíneas ($F_{(3,6)} = 3,34$, $p = 0,086$) (Figura 4.11). La transpiración de *A. prolifera* fue significativamente mayor en los tratamientos F ($p = 0,0024$) e I ($p < 0,001$), y marginalmente mayor en el tratamiento I+F con respecto al control ($p = 0,057$) (Figura 4.11). La transpiración de *S. filaginoides* fue significativamente mayor en el tratamiento I con respecto al control ($p = 0,002$), y tendió a ser mayor en el tratamiento I+F que en el control pero sin diferencias significativas ($p > 0,05$) (Figura 4.11). A pesar de no presentar diferencias significativas, la transpiración tendió a ser mayor en los tratamientos F, I e I+F en *A. volckmannii* y en los tratamientos I e I+F en las gramíneas (Figura 4.11).

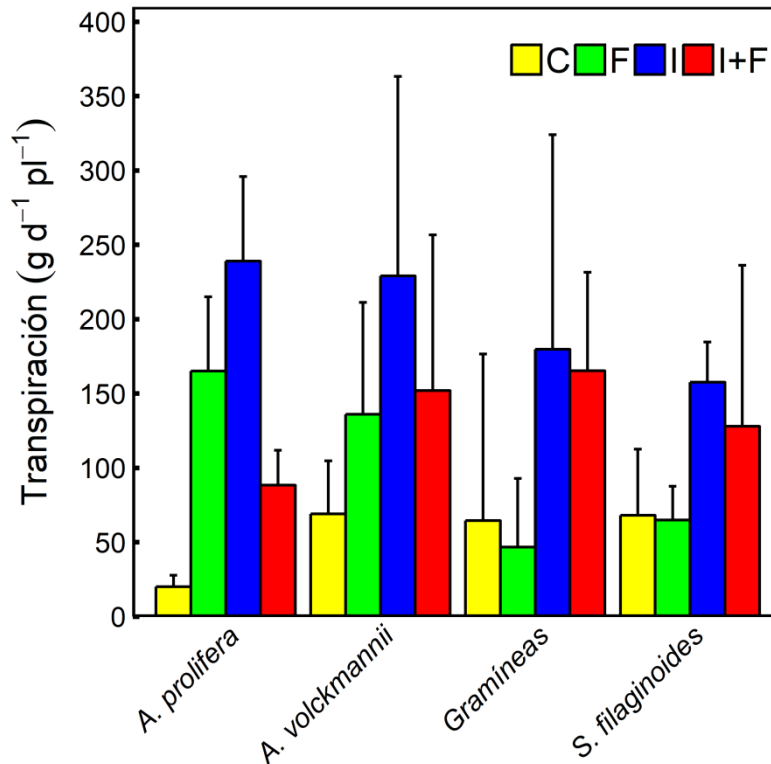


Figura 4.11. Transpiración ($\text{g H}_2\text{O d}^{-1} \text{pl}^{-1}$) durante el verano para cada especie y tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media +IC (n= 3).

4.4. DISCUSIÓN

Dado que el agua y el N son dos factores limitantes del funcionamiento de la vegetación de ecosistemas áridos, el estudio de los efectos del aumento en la precipitación y en la disponibilidad de N contribuye para entender las respuestas de estos ecosistemas a cambios globales. En el presente capítulo se evaluaron sus efectos sobre la eficiencia en el transporte de agua, la transpiración y el estado hídrico de pastos y arbustos de la estepa patagónica y los resultados no fueron consistentes a través de las especies y tratamientos de modo que la hipótesis planteada fue rechazada. Contrario a la hipótesis de que las plantas expuestas a mayor disponibilidad de agua y nutrientes exhiben mayor eficiencia en el sistema de transporte de agua, la eficiencia hidráulica de los tallos fue básicamente conservada con los tratamientos aplicados. Las características hidráulicas de las hojas fueron más plásticas en la dirección de incrementar la resistencia a la sequía tanto con la irrigación y/o con la fertilización. Estos cambios no

fueron acompañados en general por cambios en el estado hídrico. Salvo algunas excepciones como en *P. ligularis* en todos los tratamientos o en *A. prolifera* en I+F se observó una fuerte homeostasis en los potenciales hídricos mínimos.

4.4.1. Efectos del aumento de las precipitaciones y de la disponibilidad de N sobre el estado hídrico

En términos generales e independientemente de los tratamientos y las especies, y en consistencia con estudios previos (Scholz et al. 2012), hubo una variación estacional en el estado hídrico de las plantas. Durante la estación de crecimiento y cuando aún el contenido de agua en el suelo era relativamente alto (Capítulo I; Pereyra et al. 2017), los potenciales hídricos de madrugada fueron mayores que en verano, reflejando que las raíces de las especies están absorbiendo agua de horizontes aún húmedos del suelo. Lo mismo ocurrió con los potenciales hídricos mínimos debido a la mayor demanda evaporativa de la atmósfera y/o menor contenido de agua en el suelo en verano que en primavera. En especies arbustivas que no presentan transpiración durante la noche, tales como las de la estepa patagónica (Bucci et al. 2011), existe un equilibrio termodinámico nocturno entre el suelo y la planta, tal que el potencial hídrico de madrugada refleja el potencial hídrico promedio del suelo que exploran las raíces (Bucci et al. 2004b, 2006). En varios estudios se ha mencionado que las especies de plantas de la estepa patagónica exploran en conjunto todo el perfil del suelo hasta los 3 m de profundidad (Bucci et al. 2009; Golluscio, Cavagnaro, & Valenta 2011) con los pastos en los horizontes superficiales y secos y los arbustos esencialmente en las capas más profundas y húmedas del suelo. Esta distribución de raíces resulta en un mejor estado hídrico alcanzado durante la noche en aquellas especies accediendo a fuentes de agua más estables y abundantes en el suelo que en las especies con raíces más someras (Bucci et al. 2009; Scholz et al. 2012). Esta variabilidad entre grupos funcionales no fue observada en el presente estudio ya que arbustos con raíces profundas como *B. microphylla* presentaron potenciales hídricos de madrugada tan negativos como el pasto *P. ligularis*. Sin embargo, *P. ligularis* sería la especie que explora horizontes más superficiales que el resto de las especies, lo que concuerda con la característica de tener mayor densidad de raíces en superficie que *P. speciosa* (Soriano, Golluscio, & Satorre 1987a). Para el resto de las especies, la variabilidad inter-específica no concuerda con estudios previos que indican una clara diferenciación en los potenciales hídricos de

madrugada entre algunas de las especies (Bucci et al. 2009). Una de las razones de esta inconsistencia podría ser que Bucci et al. (2009) desarrollaron su trabajo en un sitio con diferentes características edáficas y así con diferencias en la capacidad de las raíces de explorar diferentes capas de suelo. Los resultados sugieren que en general los tratamientos no afectaron el potencial hídrico del suelo; excepciones a este comportamiento estarían evidenciadas por *A. prolifera* puesto que su potencial hídrico de madrugada disminuyó con la irrigación y/o fertilización y por *P. ligularis* para quien éste aumentó en el tratamiento I+F. En el caso de *A. prolifera* este cambio en el potencial hídrico de madrugada podría representar un efecto de los tratamientos sobre la transpiración nocturna. Aunque se podría esperar que el aumento en las precipitaciones se refleje en un mayor potencial hídrico del suelo, por lo menos en los horizontes superficiales, la ausencia de cambios se puede deber a un mayor uso de agua por parte de las plantas, a que parte del agua se evapora directamente desde el suelo y/ del canopeo. Por otro lado y dado que la adición de agua se realizó en pulsos pequeños de 5 mm, el agua pudo no infiltrar profundamente y no ser detectada con los sensores de humedad instalados a 10 cm; sin embargo su uso por parte de las plantas efectivamente ha aumentado tal como se observó a través del significativo incremento en la transpiración por planta en el presente estudio.

Luego de 4 años de incrementar las entradas de agua por precipitación entre un 20% a un 25% respecto a la media anual de 130 mm (1982-2018), no hubo un mejoramiento del estado hídrico de las plantas de las especies analizadas. Sin embargo, en otros estudios en este (Golluscio, Sala, & Lauenroth 1998; Golluscio, Sigal Escalada, & Pérez 2009) y otros ecosistemas (Ashbacher & Cleland 2015; Snyder et al. 2004) algunas especies, particularmente las de raíces superficiales respondieron a los pulsos de lluvia mejorando su estado hídrico. Pero a diferencia de estos trabajos que realizaron las determinaciones a corto plazo en respuesta a un único pulso de agua durante una estación, aquí se evaluaron los efectos a largo plazo del incremento acumulado de las precipitaciones a través de frecuentes pulsos de lluvia. Heisler-White et al. (2009) encontraron que el potencial hídrico y la productividad de las plantas de una estepa semiárida fueron mayores cuando se aplicaron menor cantidad de eventos de lluvia de mayor intensidad comparado a mayor cantidad de eventos de menor intensidad. Debido a la alta demanda evaporativa atmosférica de estos sitios, el agua de pequeños eventos podría perderse rápidamente si no es aprovechada por las plantas (Wythers, Lauenroth,

& Paruelo 1999) contribuyendo a las altas tasas de evaporación registradas en el sitio de estudio (Pereyra et al. 2017). A pesar de todo esto, los resultados de este trabajo indican que en general las especies de la estepa patagónica, sean gramíneas (excepto *P. ligularis*) o arbustos de raíces profundas o superficiales fueron capaces de mantener la homeostasis en sus potenciales hídricos mínimos frente a los cambios ambientales. El mayor uso de agua a nivel de planta pudo haber reducido la disponibilidad hídrica del suelo y así haber expuesto a la planta a mayor déficit hídrico, sin embargo esto no ocurrió dado que aparentemente ese mayor consumo fue consecuencia de la adición de agua. Este comportamiento homeostático en el potencial hídrico observado en las especies bajo los tratamientos de incremento en las precipitaciones es también diferente al observado por Bucci et al. (2009) al comparar el estado hídrico de los arbustos durante la estación seca de un año seco (2008) con el correspondiente a un año húmedo (2007), el cual disminuyó significativamente.

Algunos estudios han mencionado efectos negativos de la fertilización sobre la tolerancia a la sequía de las plantas. Por ejemplo, se encontró una disminución en el potencial hídrico mínimo por efecto de la fertilización en especies arbóreas de sabanas neotropicales (Bucci et al. 2006), lo cual indicaría mayor tensión en el xilema y, por ende, mayor susceptibilidad a la formación de embolismos. En otro estudio, se encontró una reducción en la capacidad para mantener la turgencia de los tejidos bajo estrés hídrico, y que fue relacionada a cambios en el módulo de elasticidad o en el potencial osmótico a saturación (Tan & Hogan 1995). En el presente estudio, sin embargo, no se encontraron cambios sustanciales por efecto de la fertilización en el potencial hídrico foliar (excepto en *P. ligularis* en I+F) ni en parámetros de las curvas de presión-volumen como el punto de pérdida de turgencia o el contenido de solutos. No obstante esta falta de respuesta a la adición de N no es tan llamativa dado que en otros estudios tampoco se observaron cambios relacionados con la tolerancia a la sequía (Clearwater & Meinzer 2001; Correia, Torres, & Pereira 1989; DaMatta et al. 2002b; Villar-Salvador et al. 2005).

Consistente con el comportamiento iso-hídrico frente a la irrigación y fertilización, excepto en *A. prolifera* (I+F) y en *P. ligularis* (I e I+F) las especies no realizaron ningún tipo de ajuste elástico u osmótico. Estos ajustes son observados normalmente bajo condiciones de campo y a través de cambios estacionales tal que con el incremento de la sequía en verano los potenciales hídricos en el punto de pérdida de

turgencia (PPT) son más negativos por la disminución en el contenido de agua simplástica o por acumulación de solutos osmóticamente activos (ajuste osmótico) y las paredes celulares más elásticas (ajuste elástico) evitando una drástica caída en el potencial hídrico a medida que el tejido se deshidrata (Scholz et al. 2012). Dado que los potenciales hídricos mínimos no variaron, no hubo necesidad de cambiar los parámetros hídricos, lo cual tiene grandes costos energéticos en la producción de solutos osmóticamente activos o en el cambio de las propiedades estructurales de las paredes celulares. Solo *A. prolifera*, que exhibió un potencial hídrico de mediodía más negativo en I+F que en el control, tendió a tener más bajos PPT y paredes más rígidas. La cercanía entre el potencial hídrico mínimo y el punto de pérdida de turgencia celular en *A. prolifera* y *A. volckmannii* no representaría un riesgo para la planta. En muchas especies, incluidas especies arbustivas patagónicas (Scholz et al. 2012), especies arbóreas del bosque andino patagónico (Bucci et al. 2019; Scholz, Bucci, & Goldstein 2014) y de otros ecosistemas (Farrell, Szota, & Arndt 2017; Guyot, Scoffoni, & Sack 2012) el cierre estomático no está necesariamente relacionado con el PPT. Así las especies pueden mantener relativamente tasa altas de intercambio de gases aun después de perder la turgencia.

4.4.2. Plasticidad de la arquitectura hidráulica a la adición de agua y nutrientes

El transporte de agua dentro de los tallos y a través de las hojas es un determinante importante del estado hídrico de las plantas (Bucci et al. 2004a, 2009). El sistema hidráulico de las plantas determina en gran medida su capacidad fotosintética (Brodribb et al. 2005; Bucci et al. 2019; Xiong, Douthe, & Flexas 2018) y su respuesta a la sequía (Maherali, Pockman, & Jackson 2004), ya que las hojas pueden mantener sus estomas abiertos hasta un determinado potencial hídrico y a una tasa de transpiración determinada que depende de la capacidad de conducir agua de las plantas (Tyree & Zimmermann 2002). Reducciones en la capacidad hidráulica de los tallos y de las hojas pueden resultar en menor fotosíntesis e incluso en mortalidad (McDowell et al. 2008). La capacidad hidráulica de las hojas y de los tallos de las especies de la estepa patagónica analizadas fueron bajas si se comparan con las de otros ecosistemas (Nardini & Luglio 2014), pero similares a las encontradas previamente en este ecosistema árido (Bucci et al. 2013). La baja capacidad de conducir agua de las plantas de ecosistemas áridos es una estrategia funcional para evitar grandes pérdidas de agua (Ladjal, Huc, &

Ducrey 2005; Maherali & DeLucia 2000; Medeiros & Pockman 2011) así como en hábitats con alta disponibilidad de agua la conductancia es relativamente alta (Manzoni et al. 2013; Nardini & Tyree 1999).

En general, en este estudio no se observaron diferencias sustanciales en la K_s a nivel de los tallos, excepto en *S. filaginoides* donde disminuyó con la fertilización. Esta relativa estabilidad en la capacidad de transporte de agua de tallos refleja la mayor resistencia a la sequía que poseen los tejidos de larga vida y con altos costos de inversión en carbono comparada con la de los órganos de más fácil reemplazo como las hojas y raíces. Ha sido observada segmentación hidráulica a lo largo del sistema de transporte de agua de las plantas para varias especies de arbustos de la estepa patagónica (Bucci et al. 2013). En aquel trabajo Bucci et al. (2013) mostraron que, dependiendo de la especie, los tallos pierden diariamente solo entre el 8% y el 21% de su capacidad hidráulica durante la estación seca, mientras que las hojas hasta el 85%.

Dado que los tratamientos no afectaron la inversión en hojas (similar valor de Huber), la ausencia de cambios en K_s también condujo a similar K_1 entre los tratamientos. Solo en *A. prolifera* hubo menor inversión en hojas que en el sistema de conducción de agua con la fertilización sola o combinada con adición de agua durante el verano (mayor valor de Huber). Este cambio en el patrón de asignación de recursos favoreció a la eficiencia con que las ramas de *A. prolifera* le brindan agua a las hojas (aumentó K_1). En esta misma especie la densidad de madera disminuyó en estos tratamientos. Aunque en este estudio no se realizó un análisis anatómico de la madera, generalmente la densidad de madera está inversamente correlacionada con el tamaño de los conductos xilemáticos y así inversamente correlacionada con la eficiencia hidráulica (Bucci et al. 2004a, 2009; Hoffmann et al. 2011; McCulloh et al. 2012; Meinzer et al. 2009). Este cambio puede explicar el aumento en la conductividad hidráulica de *A. prolifera* con la fertilización. Sin embargo en otras especies donde la densidad de madera cambió significativamente con el tratamiento, como en *B. microphylla* en I+F y en *S. filaginoides* en I el aumento en la densidad de madera no se reflejó en cambios en la eficiencia hidráulica. La relación funcional entre la densidad de madera y la eficiencia hidráulica no siempre es observada (Poorter et al. 2010; Schuldt et al. 2013) dado que la densidad de madera no solo está afectada por las dimensiones y densidad de los vasos sino que también por las características de las fibras y células del parénquima que los rodean (Fan et al. 2012; Martínez-Cabrera et al. 2009). La respuesta de la densidad de

madera a la fertilización es variable entre las especies tal como se observó en este estudio. Mientras que algunos estudios no han observado cambios en la densidad de madera con la fertilización con N (Clearwater & Meinzer 2001) otros encontraron una disminución (Bucci et al. 2006; Scholz et al. 2007).

Mientras que los tallos son en general más resistentes a la formación de embolismos, las hojas son particularmente más vulnerables y pierden un gran porcentaje de su capacidad de conducir agua diariamente (Bucci et al. 2012, 2013), que luego recuperan al día siguiente (Bucci et al. 2003). Tomando en cuenta las curvas de vulnerabilidad de las hojas y los potenciales hídricos mínimos de las especies durante la primavera se observó que K_{foliar} disminuye durante el día desde 25% en *S. filaginoides* hasta 63% en *B. microphylla* en los controles. Previamente y en otro sitio de la estepa patagónica, Bucci et al. (2013) observaron un patrón de variación de K_{foliar} entre 40% y 87% a través de 7 especies arbustivas, pero en ese caso fue durante la estación seca. A diferencia de los tallos, la vulnerabilidad de las hojas a la cavitación parece ser más plástica. Aunque el P_{50} de las hojas solo varió significativamente en el tratamiento I+F en *A. prolifera* y en el tratamiento I en *A. volckmannii*, en los que P_{50} disminuyó, hubo tendencias definidas a incrementar la resistencia a la pérdida de la capacidad hidráulica (menor P_{50}) con la fertilización e irrigación, excepto en *S. filaginoides* donde el comportamiento fue opuesto. En primera instancia, esta plasticidad en la vulnerabilidad a la cavitación solo parece ser consistente con el mayor déficit hídrico que presentaron las hojas de *A. prolifera* en el tratamiento combinado de irrigación y fertilización pero no con la homeostasis en el potencial hídrico de las otras especies en los diferentes tratamientos. Sin embargo, aunque incrementar la resistencia a la sequía podría involucrar más carbono destinado a producir conductos más seguros, asegurar menor pérdida de la conductancia hidráulica reduce los costos energéticos asociados a la reparación diaria de embolismos (Bucci et al. 2003; Mason Earles et al. 2016). Esta aclimatación del sistema de conducción de agua a nivel de las hojas que incluye no solo el camino vascular sino que considera también el transporte de agua a través del mesófilo (Scoffoni et al. 2017) pudo haber contribuido al aumento de la transpiración a nivel de planta en los tratamientos, dado que las especies pudieron mantener mayores valores de K_L durante el día, lo cual fue reflejado en los mayores márgenes de seguridad hidráulica. Las tasas de transpiración de las especies estudiadas fueron similares a otras especies en otros ecosistemas áridos (Bradford et al. 2014; Naithani, Ewers, & Pendall

2012) y a las obtenidas por Pereyra et al. (2017) en un área próxima a la de este estudio. El aumento en el consumo de agua por planta fue uno de los efectos más evidentes de la adición de agua y N sobre la vegetación de la estepa patagónica. Este aumento en las pérdidas de agua no implicó mayores déficit hídricos a pesar de que con la adición de agua la conductancia estomática tendió a incrementar (Capítulo V) y pudo haber sido consecuencia de mayor absorción y eficiencia en el transporte de agua por las raíces (la cual no fue evaluada en este estudio), de reducción de las resistencias hidráulicas a nivel de las hojas o de la planta entera o bien estas modificaciones sumadas a un incremento en la superficie transpiratoria total. Los patrones de transpiración por unidad de superficie foliar que se muestran en el Capítulo V y los observados en este Capítulo a nivel de planta sugieren que particularmente la adición de N sola o combinada con agua pudo incrementar la superficie foliar total. Este aumento en las pérdidas de agua por planta podría tener consecuencias negativas a nivel del balance de agua y C del ecosistema. Sin embargo la extrapolación de los resultados a nivel de ecosistema no es sencilla, dado que las respuestas de diferentes procesos ecofisiológicos a cambios ambientales pueden variar dependiendo del nivel biológico analizado.

4.5. CONCLUSIONES

La hipótesis asociada a este objetivo fue que las plantas expuestas a mayor disponibilidad de agua y nutrientes exhiben mayor eficiencia en el sistema de transporte de agua y mejor estado hídrico. Sin embargo, contrario a la hipótesis, la eficiencia hidráulica de los tallos fue básicamente conservada, aun cuando la densidad de la madera fue reducida o incrementada dependiendo de la especie y tratamiento. Las características hidráulicas de las hojas, sin embargo, fueron más plásticas en la dirección de incrementar la resistencia a la sequía tanto con la irrigación y/o con la fertilización. Estos cambios no fueron acompañados en general por cambios en el estado hídrico. Salvo algunas excepciones como en *P. ligularis* en todos los tratamientos o en *A. prolifera* en I+F se observó una fuerte homeostasis en los potenciales hídricos mínimos. Estos cambios en la eficiencia en el transporte de agua a nivel de las hojas o posibles cambios a nivel de las raíces o planta entera no analizados en este estudio así como un incremento en la superficie transpiratoria, pudieron contribuir al aumento en el consumo de agua por planta con la adición de agua y/o N sin efectos sobre el estado hídrico.

Capítulo V

Efectos de la irrigación y de la fertilización sobre las tasas fotosintéticas y la eficiencia en el uso de recursos de arbustos y pastos

Efectos de la irrigación y de la fertilización sobre las tasas fotosintéticas y la eficiencia en el uso de recursos de arbustos y pastos

5.1. INTRODUCCIÓN

En los ecosistemas semiáridos, los cuales son limitados en la disponibilidad de agua y Nitrógeno (N), el incremento en las entradas de N y el aumento en las precipitaciones frecuentemente estimulan la productividad primaria (Bai et al. 2008; Harpole, Potts, & Suding 2007; Niu et al. 2009; Sala 1988; Yahdjian, Gherardi, & Sala 2011). El nitrógeno foliar es principalmente invertido en la síntesis de los componentes del aparato fotosintético, tal que aproximadamente 75% del N foliar se encuentra en los cloroplastos (Shangguan, Shao, & Dyckmans 2000). En general se asume que la fertilización incrementa la fotosíntesis neta a través de modificaciones en el aparato fotosintético y en la capacidad de asimilación (Kellomäki & Wang 1997; Strand 1997; Turnbull et al. 2007; Wang et al. 2012). El agua y el N pueden interactuar en caminos más complejos a los que podrían ser predichos por la simple adición de los efectos individuales. La fotosíntesis y la conductancia estomática de algunas especies pueden aumentar cuando las plantas tienen mayor contenido de N pero solo cuando están bajo condiciones óptimas de disponibilidad de agua (Shangguan, Shao, & Dyckmans 2000; Wong, Cowan, & Farquhar 1979). En particular en ecosistemas semiáridos la disponibilidad de agua puede influir fuertemente en los efectos del aumento de N sobre la estructura y función del ecosistema (Harpole, Potts, & Suding 2007; Yahdjian, Gherardi, & Sala 2011; Yahdjian & Sala 2010). La fotosíntesis y la conductancia estomática pueden ser afectadas negativamente cuando la humedad del suelo disminuye (Farquhar & Sharkey 1982), mientras que el aumento en la disponibilidad de agua favorece la difusión de CO₂ a las células fotosintéticas tal que la fotosíntesis se incrementa (Green & Mitchell 1992; Kozłowski, Kramer, & Pallardi 1991; Kramer 1983). La respuesta de las plantas a los cambios en la disponibilidad de recursos es dependiente de la especie (Golluscio, Sala, & Lauenroth 1998; Golluscio, Sigal Escalada, & Pérez 2009; Yahdjian, Gherardi, & Sala 2014). Las diferencias entre especies en las respuestas a cambios en la disponibilidad de recursos están

estrechamente ligadas a la profundidad de los sistemas radicales y al tiempo que requieren las raíces para responder. En los ecosistemas áridos, por ejemplo, los eventos de precipitación son erráticos y de pequeña magnitud durante la estación seca limitando la profundidad de infiltración, la cual es demasiado superficial para las especies de raíces más profundas.

La eficiencia en el uso de los recursos es una herramienta útil para evaluar la sensibilidad de un ecosistema a la disponibilidad de recursos (Huxman et al. 2004a) e integra el balance de Carbono y agua. La eficiencia en el uso del agua (EUA) está muy relacionada con la productividad primaria, y refleja la adaptabilidad de los ecosistemas a cambios en las condiciones ambientales (Farquhar, O'Leary, & Berry 1982; Farquhar et al. 1989). La teoría predice, y varios estudios lo confirman, que cuando la disponibilidad de agua es baja la EUA debería aumentar (de Santana et al. 2015; Schultz & Stoll 2010). Así, un incremento en las precipitaciones puede producir una disminución en la EUA, mientras que un aumento en la disponibilidad de N, que podría favorecer los flujos de C, puede inducir un aumento en la EUA (Bai et al. 2008; Brueck et al. 2010; Burke, Lauenroth, & Parton 1997). Estudios previos han demostrado que en zonas áridas y semiáridas el efecto de la adición de N sobre la EUA está regulado por la precipitación durante la estación de crecimiento, aumentando la EUA cuando la humedad es mayor y no teniendo efectos o con efectos negativos sobre la EUA en años secos (Tian et al. 2016; Zhang et al. 2018).

A nivel de hoja, la eficiencia en el uso de agua instantánea (EUA) se define como la cantidad de CO₂ fijada por unidad de agua transpirada. Así, una mayor concentración de N en las hojas, si la misma está destinada al aparato fotosintético, podría conducir a una mayor tasa fotosintética en relación a la cantidad de agua transpirada, aumentando la eficiencia de uso instantánea de este recurso (EUA_{ins}) (DaMatta et al. 2002b). Debido a que las tasas de intercambio gaseoso (ej. fotosíntesis, conductancia estomática) son mediciones instantáneas, que no integran los procesos fisiológicos de una estación de crecimiento, existen determinaciones alternativas, o complementarias, para evaluar la actividad fotosintética integrada durante un determinado periodo. La abundancia relativa del isotopo pesado de C (¹³C) en las hojas maduras constituye una medida integrada en el tiempo de la respuesta del intercambio gaseoso a los factores ambientales a los cuales ha estado expuesta la planta. El análisis de la concentración de ¹³C ($\delta^{13}\text{C}$) en las hojas es un estimador de la eficiencia en el uso

del agua integrada en el tiempo (EUA_{int} ; Farquhar, Ehleringer, & Hubick 1989). La EUA_{int} ha sido ampliamente evaluada en diversos ecosistemas frente a cambios en diversos factores ambientales, como la precipitación, la temperatura, la altitud y la irradiancia (Geßler et al. 2001; Golluscio & Oesterheld 2007; Meinzer, Saliendra, & Crisosto 1992; Shangguan, Shao, & Dyckmans 2000; Wang et al. 2013; Wei et al. 2015; Winter et al. 1982). En general existe una correlación negativa entre la discriminación isotópica del C y la EUA_{int} (Meinzer, Saliendra, & Crisosto 1992; Wright, Rao, & Farquhar 1994). Algunos estudios previos han encontrado que la fertilización con N disminuye la discriminación en contra del ^{13}C ($\Delta^{13}\text{C}$) (y aumenta la EUA_{int} ; Ripullone et al. 2004), mientras que mayor disponibilidad de agua aumenta la $\Delta^{13}\text{C}$ (y reduce la EUA_{int} ; Korol et al. 1999; Shangguan, Shao, & Dyckmans 2000; Warren, McGrath, & Adams 2001). Los rasgos morfológicos y fisiológicos propios de cada especie desempeñan un rol importante en la discriminación isotópica (Comstock & Ehleringer 1992; Hultine & Marshall 2000). Por ejemplo, se ha observado correlación entre el contenido de N de la hoja y el $\delta^{13}\text{C}$ (Sparks & Ehleringer 1997), y entre el área foliar específica (AFE) y el $\delta^{13}\text{C}$ (Vitousek, Field, & Matson 1990). Esto sugiere que el efecto de la disponibilidad de recursos sobre el $\delta^{13}\text{C}$ de las hojas podría ser diferente para cada especie o grupo funcional.

Así como la eficiencia en el uso de agua expresa la relación entre la cantidad de CO_2 fijada por unidad de agua transpirada, la eficiencia en el uso del N (EUN) es una medida de la cantidad de CO_2 fijada por unidad de N absorbido desde el suelo (Livingston et al. 1999; Poorter & Evans 1998). Cambios en la disponibilidad de N en el suelo pueden llevar a modificaciones en las estrategias de uso del N por parte de las plantas. En general, el aumento en la disponibilidad de N tiende a provocar una disminución en la EUN (Aerts & Chapin 2000; Fernández, Pissolito, & Passera 2018; Xia & Wan 2008), debido a una producción menor de biomasa por unidad de N absorbido y/o a un menor tiempo de residencia del N en la planta (Iversen, Bridgham, & Kellogg 2010; Yuan et al. 2005).

Como un típico ecosistema semiárido, la estepa patagónica está limitada por las escasas precipitaciones (Bucci et al. 2013; Sala & Lauenroth 1982; Scholz et al. 2012) y la baja disponibilidad de nitrógeno (Yahdjian, Gherardi, & Sala 2014), siendo sensible a los factores de cambios globales (Golluscio, Sala, & Lauenroth 1998; Pereyra et al.

2017; Yahdjian, Gherardi, & Sala 2014). El objetivo principal de este estudio fue determinar el efecto de adición de N y/o agua sobre las tasas de intercambio gaseoso y la eficiencia de uso de recursos de pastos y arbustos de la estepa patagónica. La **hipótesis** propone que la adición de agua y/o nutrientes incrementa la tasa de fotosíntesis, pero la pérdida de agua sería proporcionalmente menor con adición de nutrientes y mayor con el incremento en la disponibilidad de agua. La mayor disponibilidad de agua y nutrientes favorecería la absorción de nutrientes desde el suelo por parte de las raíces incrementando su contenido en las hojas, principalmente aquellos destinados al aparato fotosintético. Al mismo tiempo que se alivia el déficit hídrico se reduciría el control estomático favoreciendo la difusión del CO₂ para su asimilación. Conocer las respuestas de la vegetación de la estepa patagónica a la alteración en la disponibilidad de agua y nutrientes es relevante para las estimaciones del secuestro de carbono en ecosistemas terrestres en el contexto del cambio climático global. Para responder al objetivo y evaluar la hipótesis planteada se realizó un experimento a campo de fertilización y/o irrigación descrito en el Capítulo 1 de la presente tesis. Se determinó el contenido de clorofila, la tasa de fotosíntesis y la eficiencia de uso de agua y nitrógeno, así como el área foliar específica en dos especies de gramíneas (*Poa ligularis* y *Pappostipa speciosa*) y cuatro de arbustos (*Adesmia volckmannii*, *Azorella prolifera*, *Berberis microphylla* y *Senecio filaginoides*) (Tabla 1.2, Capítulo I). La eficiencia de uso del agua fue determinada aplicando técnicas de intercambio de gases y de análisis de isótopos estables.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Área foliar, área foliar específica y clorofila

El área foliar (AF) y área foliar específica (AFE) fueron determinadas en hojas de 5 plantas por especie y tratamiento durante diciembre de 2015, 2016, 2017 y 2018, teniendo en cuenta que fueran hojas verdes totalmente expandidas, sin signos de daño y expuestas al sol. A partir de un pool de hojas de diferentes tallos se determinaron las áreas en 9-15 muestras de 5-10 hojas frescas cada una, dependiendo del tamaño de las hojas, por medio de fotografías de las mismas y análisis posterior de las imágenes usando el programa ImageJ (Ferreira & Rasband 2012). Las hojas fueron analizadas incluyendo los pecíolos, y en el caso de las gramíneas solo se tomó la lámina sin la

vaina. Luego, las hojas se secaron en estufa a 70°C durante 72 horas y se pesaron para obtener su peso seco. El AFE se calculó como área foliar fresca dividida su peso seco.

Para la determinación del contenido de clorofila a y b de las hojas, se colectaron hojas de 5 plantas por especie y tratamiento durante diciembre de 2015, 2016, 2017 y 2018 y en febrero de 2017. A partir de un pool de hojas frescas de cada periodo de muestreo, se extrajeron muestras de 0,2 g de material al cual se les agregó acetona al 80%, y se determinó la concentración de clorofila mediante un espectrofotómetro de acuerdo con Porra, Thompson, & Kriedemann (1989).

5.2.2. Intercambio de gases y eficiencia de uso de agua instantánea

La fotosíntesis neta (A), la conductancia estomática (g_s) y la transpiración (E) fueron determinadas con un sistema portátil de intercambio de gases (LI-6400, Li-Cor, Lincoln, NE) conectado a una cámara foliar de 3x2 cm. Para las especies arbustivas, 3 a 9 ramitas terminales de diferentes individuos de cada especie y tratamiento fueron analizadas en diciembre de 2016 y 2018 y en febrero de 2017. En el caso de las gramíneas, un conjunto de hojas fue analizado en cada medición. Todas las mediciones fueron realizadas en hojas expuestas al sol y completamente desarrolladas durante el mediodía en días soleados. La densidad de flujo fotónico fue mantenida constante a $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para asegurar la saturación lumínica y evitar la foto-inhibición. La concentración de CO_2 dentro de la cámara foliar fue mantenida a $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de aire, a partir de un cilindro de CO_2 de 12 g conectado al LI-6400. Se determinó el área foliar y el peso seco de las hojas de cada muestra para expresar las variables por unidad de área y de peso. Además, se determinó la eficiencia en el uso del agua instantánea (EUA_{ins}) como A/g_s .

5.2.3. Eficiencia en el uso de agua integrada (EUA_{int}) y eficiencia fotosintética de uso de Nitrógeno

Hojas totalmente expandidas y sanas de diferentes individuos de cada especie y tratamiento fueron colectadas en diciembre de 2017 y se secaron en estufa a 70°C por 72 h. De cada conjunto de hojas se tomaron tres muestras, para cada una de las cuales se determinó la concentración de ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$), el contenido de C y de N y la relación C:N,

utilizando un espectrómetro Thermo Scientific DELTA V Advantage acoplado vía el interface ConFlo IV a un Analizador Elemental Flash 2000 (IRMS-EA) en el Laboratorio de Isótopos Estables en Ciencias Ambientales (LIECA, IANIGLA-CONICET, UTNFRSR, Argentina). Se determinó la discriminación en contra del isótopo pesado como fue propuesto por Farquhar, Ehleringer, & Hubick (1989):

$$\Delta = (\delta^{13}\text{C}_{\text{atmósfera}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{planta}}) / (1 + \delta^{13}\text{C}_{\text{planta}})$$

Se calculó la EUA_{int} como:

$$\text{EUA}_{\text{int}} = Ca / 1,6 ((b' - \Delta) / (b' - a))$$

Donde Ca es la concentración de CO_2 de la atmósfera, b' es la discriminación de la Rubisco (27 ‰) y a es el fraccionamiento debido a la difusión en aire (4,4 ‰).

La eficiencia fotosintética en el uso del Nitrógeno (EUN) se determinó como el cociente entre la media de la tasa fotosintética por unidad de área y la media del contenido de Nitrógeno foliar por unidad de área para cada especie y tratamiento.

5.2.4. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software R versión 3.4.4 (R Development Core Team, 2018). Se usaron modelos lineales ajustados de mínimos cuadrados (GLSs) con test-F para evaluar el efecto de la interacción entre tratamiento y especie (variables explicativas) sobre el área foliar y el área foliar específica (variables dependientes), con estructura de correlación temporal entre años (corAR1). Además, se utilizaron GLSs para evaluar el efecto de la interacción entre tratamiento y mes (variables explicativas) sobre el contenido de clorofilas, la tasa fotosintética, la conductancia estomática, la tasa de respiración y la eficiencia en el uso del agua instantánea (variables dependientes) para cada especie, con estructura de correlación temporal entre años (corAR1). Para las variables obtenidas de los análisis isotópicos ($\delta^{13}\text{C}$, contenido de C, contenido de N, relación C:N, $\Delta^{13}\text{C}$ y EUA), se testearon modelos lineales (MLs) con test-F con la interacción entre tratamiento y especie como variables explicativas. Luego, se testeó la relación entre la EUA_{ins} de primavera con la EUA_{int} . A su vez, se testearon las relaciones entre contenido de Nitrógeno y tasa de fotosíntesis, para las variables expresadas en base área y en base peso. Los GLSs se

llevaron a cabo utilizando la función "gls" del paquete de R "nlme" versión 3.1-131.1 (Pinheiro y Bates 2000). Cuando fue necesario, todos los modelos se ajustaron mediante modelos de varianza; la selección del modelo se basó en el criterio de información de Akaike (AIC) (Burnham y Anderson 2002). La simplificación de los efectos fijos de todos los modelos para alcanzar el modelo mínimo adecuado se llevó a cabo mediante una prueba de hipótesis (test-F). El análisis post-hoc de Tukey se utilizó para comparaciones múltiples en todos los modelos cuando el test-F fue significativo, utilizando la función "glht" del paquete de R "multcomp" versión 1.4-8 (Bretz et al. 2010). Cuando se hicieron comparaciones entre tratamientos, solo se comparó cada tratamiento (F, I o I+F) con respecto al control. Para graficar los resultados del modelo mejor ajustado, se utilizó el paquete de R "visreg" versión 2.5-0 (Breheny y Burchett 2017).

5.3. RESULTADOS

El área foliar (tamaño foliar) y el área foliar específica (AFE) variaron significativamente entre años, existiendo correlación temporal para ambas variables ($\chi^2 = 412,2$, $df = 1$, $p < 0,0001$ y $\chi^2 = 512,6$, $df = 1$, $p < 0,0001$ respectivamente). El tamaño de la hoja varió entre tratamientos y especies, con interacción significativa ($F_{(15, 1019)} = 3,91$, $p < 0,0001$), siendo mayor en los tratamientos de fertilización e I+F con respecto al control en *S. filaginoides* ($p = 0,003$ y $p < 0,001$, respectivamente), y marginalmente mayor en el tratamiento de irrigación que en el control en *P. ligularis* ($p = 0,096$) (Figura 5.1 A). El AFE varió significativamente entre especies ($F_{(5, 1034)} = 198,56$, $p < 0,0001$), teniendo *A. volckmannii* la mayor AFE de todas las especies ($p < 0,0001$) mientras que *A. prolifera* tuvo la menor AFE ($p < 0,0001$). Además, el AFE varió entre tratamientos ($F_{(3,1034)} = 3,12$, $p = 0,025$), sin embargo ningún tratamiento se diferenció significativamente respecto del control.

El contenido de clorofilas (a + b) cambió por efecto de los tratamientos y de la estación, según la especie (Tabla 5.1). El contenido de clorofilas fue menor en verano que en primavera, excepto en *P. ligularis* en la cual fue mayor en verano que en primavera. Aunque hubo una tendencia a mayor contenido de clorofilas con la adición de N en todas las especies, las diferencias significativas fueron observadas en los tratamientos F e I+F con respecto al control en *A. prolifera* ($p = 0,02$ y $p = 0,012$,

respectivamente), mientras que se observaron diferencias marginales en el tratamiento I+F respecto al control en *P. ligularis* ($p = 0,068$) (Figura 5.2 A-B).

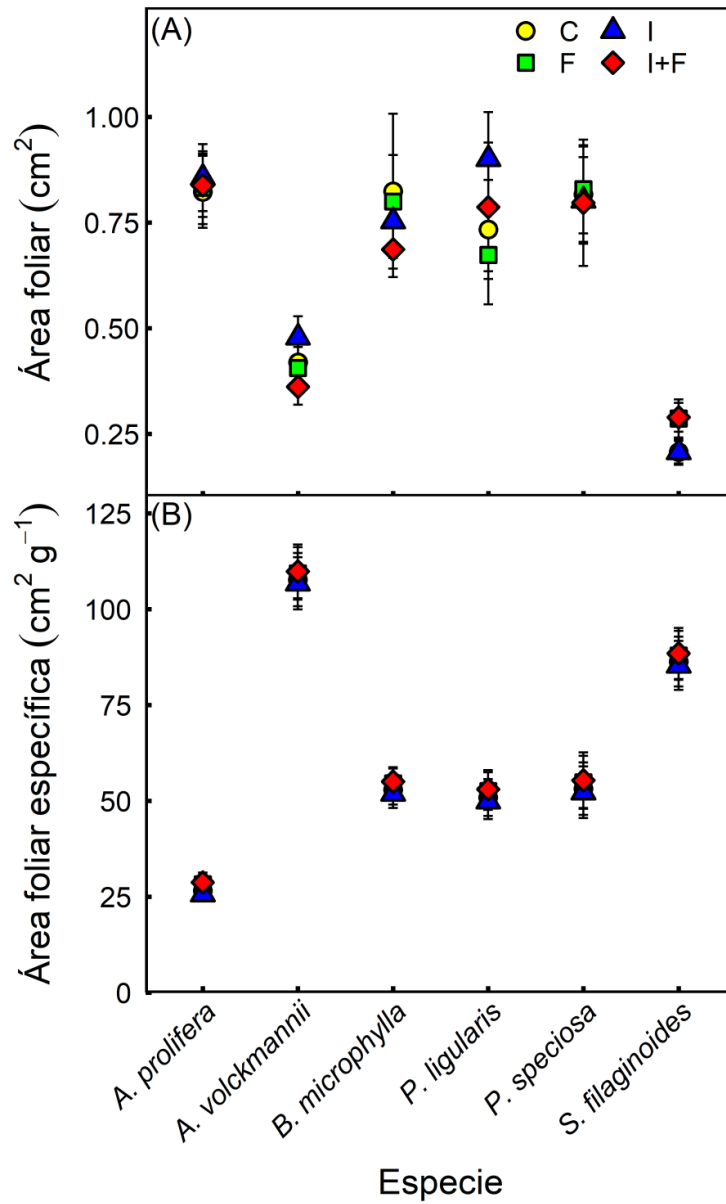


Figura 5.1. (A) Área foliar (tamaño foliar; cm²) y (B) área foliar específica (cm² g⁻¹) para cada especie y tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media ± IC (n= 9-15).

Tabla 5.1. Resultados de los test-F del contenido de clorofilas a y b en las hojas de cada especie. Se muestran el valor estadístico F, los grados de libertad (df) y el valor de probabilidad *p*, para tratamiento (T) y estación del año (E).

Especie	Test-F
<i>A. prolifera</i>	TxE: $F_{(3,107)} = 1,49$ $p = 0,22$
	E: $F_{(1,110)} = 40,7$ $p < 0,0001$
	T: $F_{(3,110)} = 3,63$ $p = 0,015$
<i>A. volckmannii</i>	TxE: $F_{(3,104)} = 1,65$ $p = 0,18$
	T: $F_{(3,107)} = 0,22$ $p = 0,88$
	E: $F_{(1,110)} = 110,32$ $p < 0,0001$
<i>B. microphylla</i>	TxE: $F_{(3,89)} = 1,18$ $p = 0,32$
	T: $F_{(3,92)} = 1,10$ $p = 0,35$
	E: $F_{(1,95)} = 36,54$ $p < 0,0001$
<i>P. ligularis</i>	TxE: $F_{(3,76)} = 0,99$ $p = 0,40$
	E: $F_{(1,79)} = 11,82$ $p = 0,0009$
	T: $F_{(3,79)} = 3,07$ $p = 0,0324$
<i>P. speciosa</i>	TxE: $F_{(3,81)} = 2,36$ $p = 0,08$
	T: $F_{(3,84)} = 0,28$ $p = 0,84$
	E: $F_{(1,87)} = 8,03$ $p = 0,0057$
<i>S. filaginoides</i>	TxE: $F_{(3,110)} = 0,35$ $p = 0,78$
	T: $F_{(3,113)} = 0,46$ $p = 0,71$
	E: $F_{(1,116)} = 16,59$ $p = 0,0001$

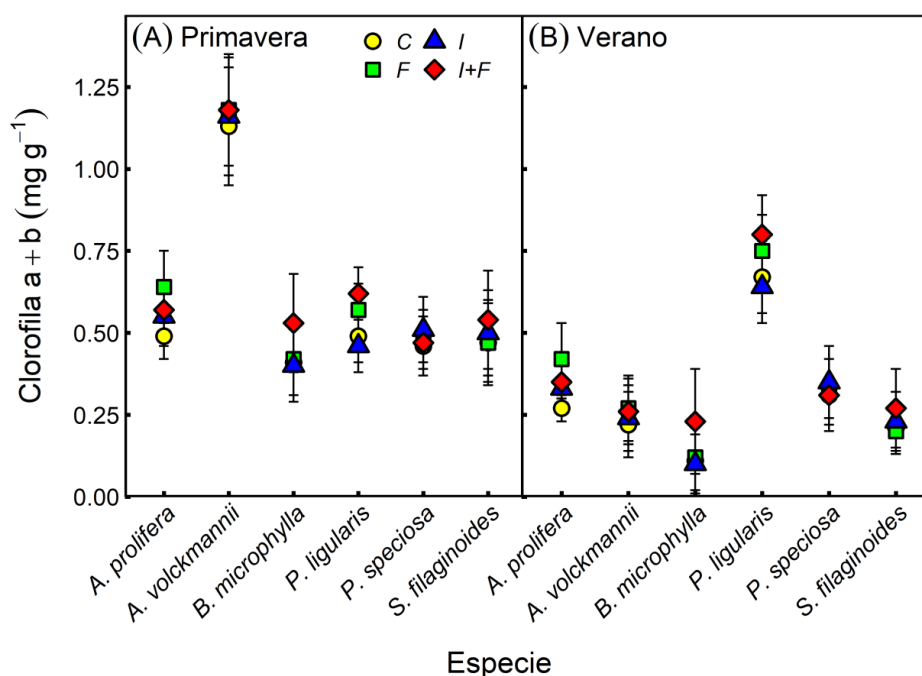


Figura 5.2. Contenido de clorofila a + b (mg g⁻¹) en (A) primavera y (B) verano, para cada especie y tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media \pm IC (n= 5-9).

La tasa de fotosíntesis por unidad de área (A), la conductancia estomática (g_s) y la tasa de transpiración (E) variaron entre tratamientos y estaciones, de modo diferente según la especie (Tabla 5.2). La A fue significativamente menor en febrero (verano) comparada con diciembre (primavera) en todas las especies excepto en *A. volckmannii*, en la cual no hubo diferencias significativas entre estaciones (Figura 5.3 A-B). Además, la A fue menor en el tratamiento I+F en *A. prolifera* ($p = 0,017$), marginalmente mayor en el tratamiento F en *A. volckmannii* ($p = 0,096$), y mayor en el tratamiento I en *B. microphylla* ($p = 0,027$) y en *P. speciosa* ($p = 0,005$) con respecto al control (Figura 5.3 A-B). En *S. filaginoides*, la A fue menor en el tratamiento I+F ($p = 0,043$) en primavera, y mayor en los tratamientos F ($p = 0,031$) e I ($p < 0,01$) en verano con respecto al control (Figura 5.3 A-B). La g_s fue menor en verano con respecto a primavera para todas las especies, excepto en *A. prolifera* y en *A. volckmannii* (Figura 4.3 C-D). A pesar de diferencias entre tratamientos en g_s de *A. prolifera*, *B. microphylla* y *P. ligularis*, ningún tratamiento fue significativamente diferente del control. En *S. filaginoides*, la g_s fue menor en los tratamientos F ($p = 0,006$) e I+F ($p < 0,001$) en primavera con respecto al control, y mayor en los tratamientos F ($p = 0,004$) e I ($p < 0,001$) en verano con respecto al control (Figura 5.3 C-D). La E fue menor en verano que en primavera en casi todas las especies, con excepción de *A. volckmannii*, en la cual no hubo diferencias significativas entre estaciones (Figura 5.3 E-F). A pesar de diferencias entre tratamientos en E de *B. microphylla* y *P. ligularis*, ningún tratamiento fue significativamente diferente del control. En *A. prolifera*, la E fue menor en el tratamiento I+F con respecto al control ($p = 0,04$), y en *S. filaginoides*, la E fue menor en los tratamientos F ($p = 0,005$) e I+F ($p = 0,001$) en primavera con respecto al control, y mayor en los tratamientos F ($p = 0,007$) e I ($p < 0,001$) en verano con respecto al control (Figura 5.3 E-F).

Tabla 5.2. Resultados de los test-F de la tasa fotosintética (A), la conductancia estomática (g_s) y la transpiración (E) por unidad de área para cada especie. Se muestran el valor estadístico F, los grados de libertad (df) y el valor de probabilidad p , para tratamiento (T) y estación del año (E).

Especie	Test-F		
	A	g_s	E
<i>A. prolifera</i>	TxE: $F_{(3,57)}=2,21$ $p = 0,096$	TxE: $F_{(3,57)}=1,3$ $p = 0,28$	TxE: $F_{(3,57)}=1,42$ $p = 0,24$
	T: $F_{(3,60)} = 6,70$ $p = \mathbf{0,0006}$	E: $F_{(1,60)} = 2,66$ $p = 0,11$	E: $F_{(1,60)} = 20,54$ $p < \mathbf{0,0001}$
	E: $F_{(1,60)} = 5,76$ $p = \mathbf{0,019}$	T: $F_{(3,61)} = 2,97$ $p = \mathbf{0,039}$	T: $F_{(3,60)} = 4,61$ $p = \mathbf{0,0057}$
<i>A. volckmannii</i>	TxE: $F_{(3,59)} = 1,58$ $p = 0,20$	TxE: $F_{(3,59)} = 0,36$ $p = 0,78$	TxE: $F_{(3,59)} = 0,49$ $p = 0,69$
	E: $F_{(1,62)} = 0,11$ $p = 0,74$	E: $F_{(1,62)} = 0,0005$ $p = 0,98$	T: $F_{(3,62)} = 0,56$ $p = 0,64$
	T: $F_{(3,63)} = 2,35$ $p = 0,08$	T: $F_{(3,63)} = 1,48$ $p = 0,23$	E: $F_{(1,65)} = 0,24$ $p = 0,62$
<i>B. microphylla</i>	TxE: $F_{(3,55)} = 2,47$ $p = 0,07$	TxE: $F_{(3,54)} = 0,50$ $p = 0,69$	TxE: $F_{(3,55)} = 0,56$ $p = 0,64$
	T: $F_{(3,58)} = 2,60$ $p = 0,06$	T: $F_{(3,57)} = 6,25$ $p = \mathbf{0,001}$	T: $F_{(3,58)} = 3,48$ $p = \mathbf{0,0216}$
	E: $F_{(1,58)} = 14,04$ $p = \mathbf{0,0004}$	E: $F_{(1,57)} = 5,07$ $p = \mathbf{0,028}$	E: $F_{(1,58)} = 9,27$ $p = \mathbf{0,0035}$
<i>P. ligularis</i>	TxE: $F_{(3,57)} = 0,22$ $p = 0,88$	TxE: $F_{(3,58)} = 0,64$ $p = 0,59$	TxE: $F_{(3,58)} = 0,52$ $p = 0,67$
	T: $F_{(3,60)} = 0,95$ $p = 0,42$	T: $F_{(3,61)} = 4,48$ $p = \mathbf{0,0066}$	T: $F_{(3,61)} = 5,14$ $p = \mathbf{0,0031}$
	E: $F_{(1,63)} = 47,75$ $p < \mathbf{0,0001}$	E: $F_{(1,61)} = 41,78$ $p < \mathbf{0,0001}$	E: $F_{(1,61)} = 77,13$ $p < \mathbf{0,0001}$
<i>P. speciosa</i>	TxE: $F_{(3,58)} = 0,81$ $p = 0,49$	TxE: $F_{(3,58)} = 0,58$ $p = 0,63$	TxE: $F_{(3,58)} = 0,87$ $p = 0,46$
	T: $F_{(3,61)} = 5,99$ $p = \mathbf{0,0012}$	T: $F_{(3,61)} = 1,82$ $p = 0,15$	T: $F_{(3,61)} = 2,23$ $p = 0,093$
	E: $F_{(1,61)} = 15,39$ $p = \mathbf{0,0002}$	E: $F_{(1,64)} = 10,22$ $p = \mathbf{0,0022}$	E: $F_{(1,64)} = 13,06$ $p = \mathbf{0,0006}$
<i>S. filaginoides</i>	TxE: $F_{(3,54)} = 4,23$ $p = \mathbf{0,0093}$	TxE: $F_{(3,54)} = 7$ $p = \mathbf{0,0005}$	TxE: $F_{(3,54)} = 5,80$ $p = \mathbf{0,0016}$

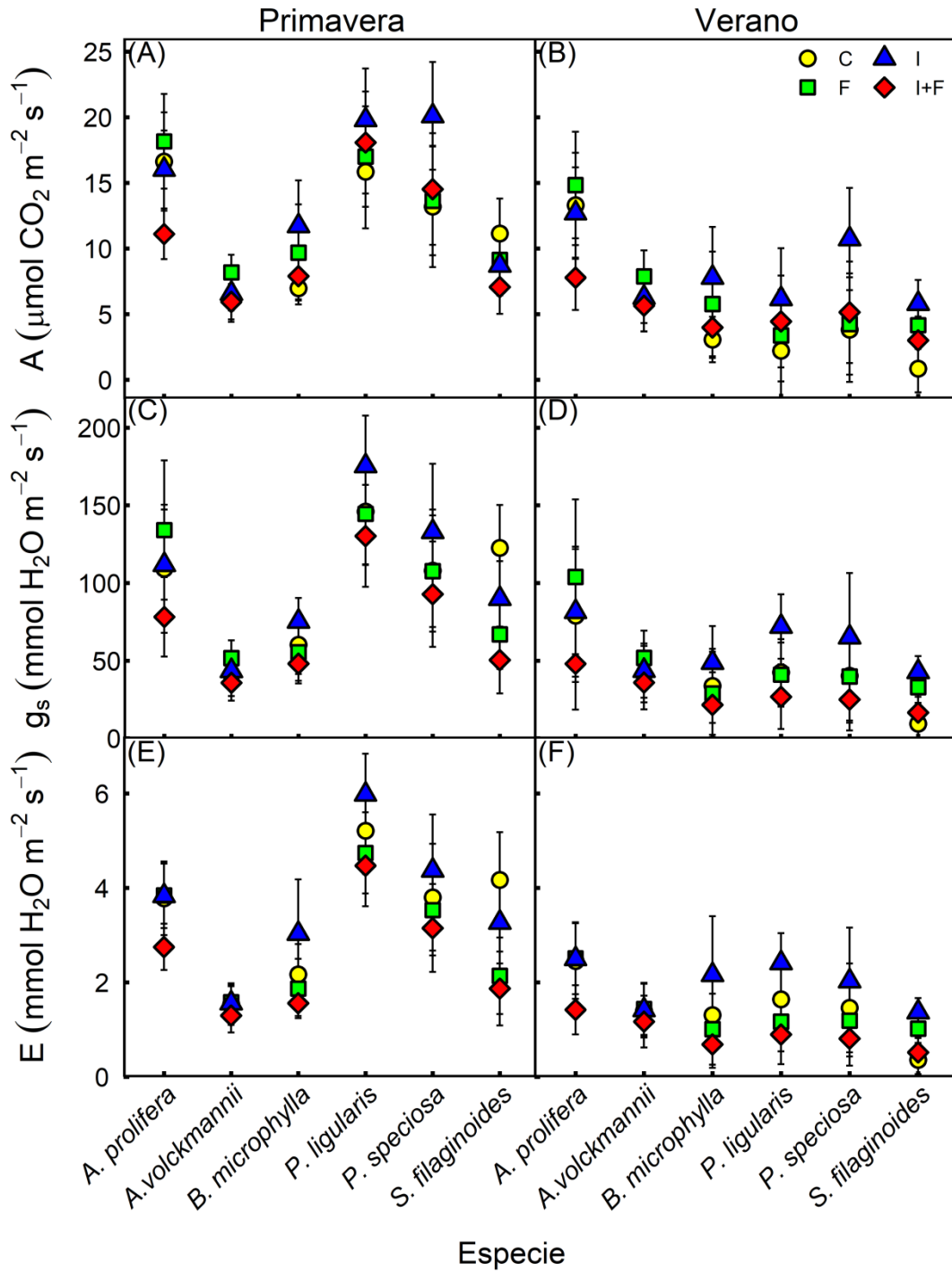


Figura 5.3. (A-B) Tasa de fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en primavera y verano, (C-D) conductancia estomática ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en primavera y verano, y (E-F) tasa de transpiración ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en primavera y verano, para cada especie y tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media \pm IC (n= 3-9).

La eficiencia en el uso de agua instantánea (EUA_{ins}) estimada a partir de la relación entre A y g_s , varió entre tratamientos y estaciones, según la especie (Tabla 5.3). En *A. prolifera*, *A. volckmannii* y *P. speciosa*, la EUA_i no fue significativamente diferente entre tratamientos ni entre estaciones (Figura 5.4). En *B. microphylla*, la EUA_{ins} fue mayor en el tratamiento de fertilización ($p = 0,045$) y marginalmente mayor en el tratamiento de irrigación ($p = 0,079$) con respecto al control en primavera, y fue mayor en el tratamiento I+F con respecto al control en verano ($p = 0,0499$). A su vez, en el tratamiento I+F en *B. microphylla*, la EUA_{ins} fue mayor en verano que en primavera ($p = 0,001$) (Figura 5.4). En *P. ligularis*, la EUA_{ins} fue mayor en los tratamientos F ($p = 0,026$) e I+F ($p = 0,013$) y marginalmente mayor en el tratamiento I ($p = 0,078$) con respecto al control, y fue menor en verano que en primavera ($p < 0,0001$). En *S. filaginoides*, la EUA_{ins} fue mayor en los tratamientos F ($p = 0,017$) e I+F ($p < 0,001$) con respecto al control.

Tabla 5.3. Resultados de los test-F de la eficiencia en el uso del agua instantánea (EUA_{ins}) para cada especie. Se muestran el valor estadístico F, los grados de libertad (df) y el valor de probabilidad p , para tratamiento (T) y estación del año (E).

Especie	Test-F
<i>A. prolifera</i>	TxE: $F_{(3,57)} = 2,22$ $p = 0,096$
	T: $F_{(3,60)} = 0,70$ $p = 0,56$
	E: $F_{(1,63)} = 1,79$ $p = 0,18$
<i>A. volckmannii</i>	TxE: $F_{(3,59)} = 0,27$ $p = 0,84$
	T: $F_{(3,62)} = 1,24$ $p = 0,30$
	E: $F_{(1,65)} = 1,61$ $p = 0,21$
<i>B. microphylla</i>	TxE: $F_{(3,54)} = 9,13$ $p = 0,0001$
<i>P. ligularis</i>	TxE: $F_{(3,57)} = 0,7$ $p = 0,56$
	E: $F_{(1,60)} = 16,66$ $p = 0,0001$
	T: $F_{(3,60)} = 4,75$ $p = 0,0049$
<i>P. speciosa</i>	TxE: $F_{(3,58)} = 1,59$ $p = 0,20$
	E: $F_{(1,61)} = 0,025$ $p = 0,875$
	T: $F_{(3,62)} = 1,69$ $p = 0,18$
<i>S. filaginoides</i>	TxE: $F_{(3,54)} = 0,95$ $p = 0,42$
	E: $F_{(1,57)} = 0,20$ $p = 0,66$
	T: $F_{(3,58)} = 5,87$ $p = 0,0014$

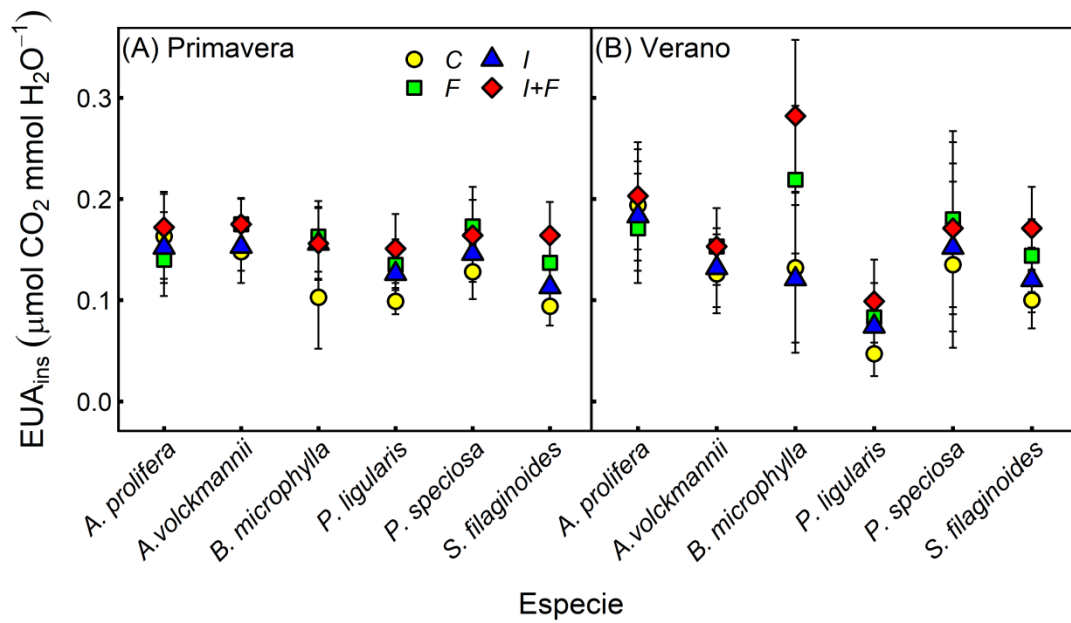


Figura 5.4. Eficiencia en el uso de agua instantánea (EUA_{ins} ; $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol H}_2\text{O}^{-1}$) en primavera (A) y verano (B), para cada especie y tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media \pm IC ($n= 3-9$).

Como puede verse en la Figura 5.5, la reducción en la tasa fotosintética de primavera a verano fue sustancialmente menor en el tratamiento de irrigación con respecto al control en casi todas las especies, excepto en *A. prolifera* y en *A. volckmannii*. Además, la reducción fue menor en los tratamientos con fertilización en *B. microphylla* y *S. filaginoides*, y en el tratamiento I+F en los pastos respecto al control.

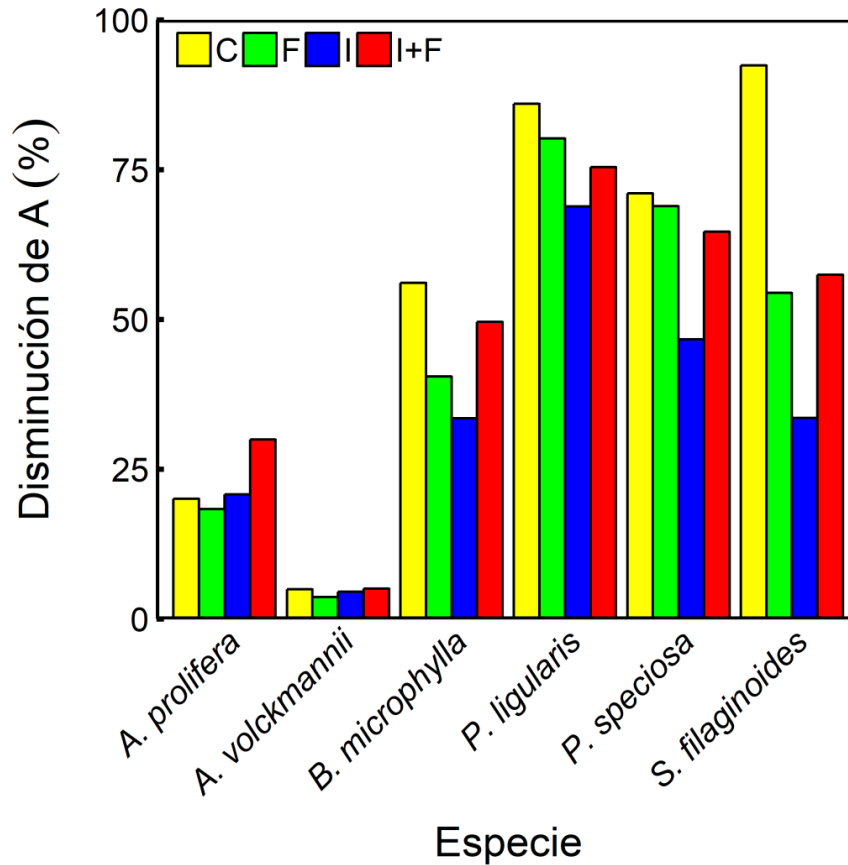


Figura 5.5. Disminución en la tasa de fotosíntesis de primavera a verano (%) para cada especie y tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica.

El análisis isotópico de las hojas reveló modificaciones en el contenido de ^{13}C por efecto de los tratamientos, dependiendo de la especie ($F_{(15,48)} = 598,26$, $p < 0,0001$ para el efecto de la interacción). El $\delta^{13}\text{C}$ varió entre -31 y $-24,5$ ‰ (Figura 5.6 A). En los tratamientos de fertilización e I+F, el $\delta^{13}\text{C}$ aumentó respecto al control en todas las especies ($p < 0,0001$), excepto en *A. volckmannii* en el tratamiento F, y en *A. volckmannii* y *A. prolifera* en el tratamiento I+F, en las cuales $\delta^{13}\text{C}$ disminuyó ($p < 0,001$). Un comportamiento opuesto fue observado en el tratamiento de irrigación donde el $\delta^{13}\text{C}$ disminuyó en tres especies (*A. volckmannii*, *B. microphylla* y *P. speciosa*) ($p < 0,0001$) y aumentó en una sola especie (*S. filaginoides*) respecto al control ($p < 0,0001$).

El contenido de C y N de las hojas se modificó por efecto de los tratamientos, existiendo interacción significativa con la especie ($F_{(15,48)} = 9,31$ $p < 0,0001$ y $F_{(15,48)} = 27,57$ $p < 0,0001$, respectivamente). En *A. volckmannii*, *B. microphylla* y *P. speciosa* el contenido de C no cambió con los tratamientos ($p > 0,05$; Figura 3.6 B). El contenido de C aumentó marginalmente en dos especies (*A. prolifera* y *P. ligularis*) en el tratamiento F respecto al control ($p = 0,069$ y $p = 0,079$, respectivamente), mientras que en el tratamiento I aumentó en una especie (*A. prolifera*, $p = 0,047$) pero disminuyó en otras dos (*P. ligularis* y *S. filaginoides*; $p < 0,001$ en ambas especies). En el tratamiento I+F, el contenido de C aumentó marginalmente en *P. ligularis* ($p = 0,073$) y disminuyó en *A. prolifera* respecto al control ($p < 0,001$). Por otra parte, el contenido de N aumentó en todas las especies en los tratamientos F e I+F respecto al control ($p < 0,001$), y disminuyó en el tratamiento I en *P. ligularis* ($p = 0,042$) y *S. filaginoides* ($p < 0,001$) respecto al control (Figura 5.6 C). La relación C:N de las hojas cambió por efecto de los tratamientos, con interacción significativa con la especie ($F_{(15,48)} = 45,12$ $p < 0,0001$), disminuyendo en los tratamientos F e I+F en todas las especies ($p < 0,001$) y aumentando en el tratamiento I en dos especies (*P. ligularis* y *S. filaginoides*; $p = 0,045$ y $p < 0,01$, respectivamente) respecto al control (Figura 5.6 D).

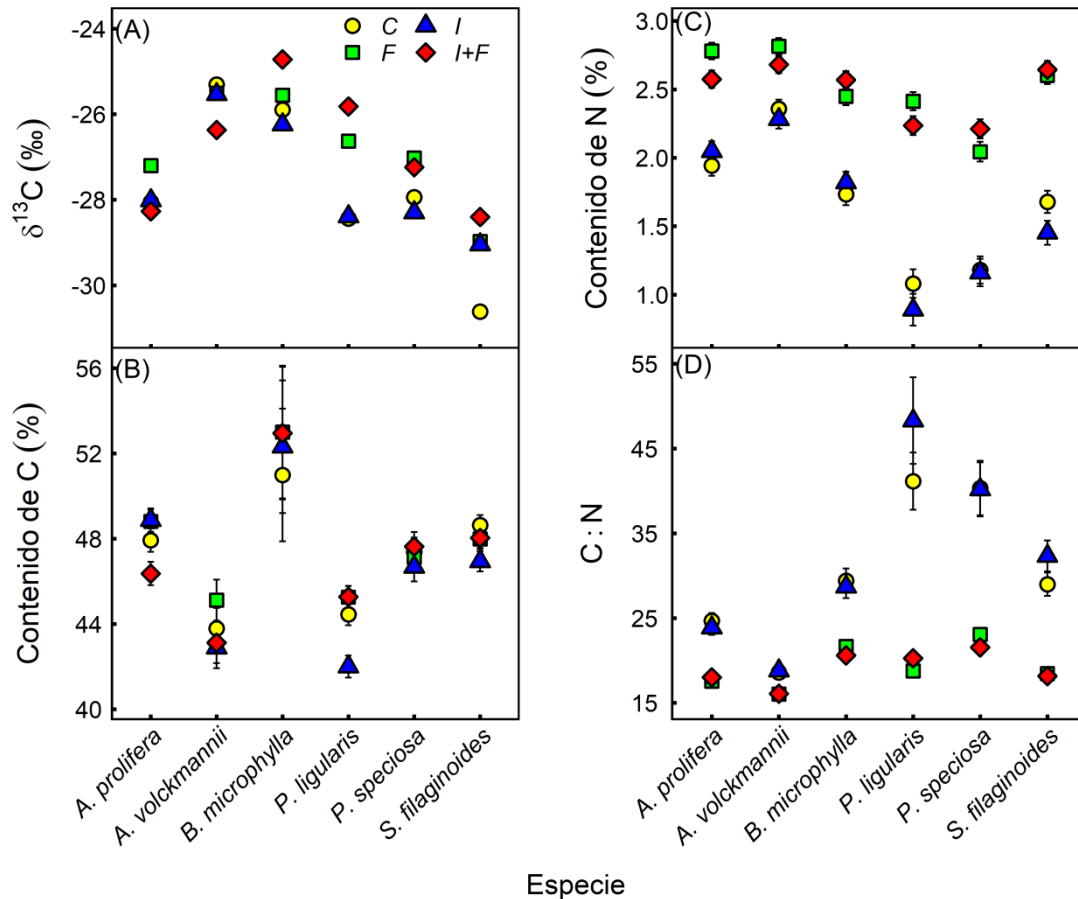


Figura 5.6. (A) $\delta^{13}C$ (‰), (B) contenido de C (%), (C) contenido de N (%) y (D) relación C:N, para cada especie y tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media \pm IC (n= 3).

La eficiencia en el uso de agua intrínseca integrada en el tiempo (EUA_{int} ; estimada a partir de $\delta^{13}C$) varió entre tratamientos y especies, con interacción significativa ($F_{(15,48)} = 525,43$ $p < 0,0001$). La EUA_{int} fue mayor en el tratamiento de fertilización respecto al control en todas las especies ($p < 0,0001$), excepto en *A. volckmannii*, en la cual EUA_{int} disminuyó ($p < 0,001$) (Figura 5.7). En el tratamiento I, la EUA_{int} disminuyó en tres especies (*A. volckmannii*, *B. microphylla* y *P. speciosa*; $p < 0,0001$ en todas las especies) pero aumentó en *S. filaginoides* ($p < 0,0001$). En el tratamiento I+F, disminuyó en dos especies (*A. prolifera* y *A. volckmannii*; $p < 0,0001$ en ambas especies) pero aumentó en las otras cuatro especies respecto al control ($p < 0,0001$) (Figura 5.7).

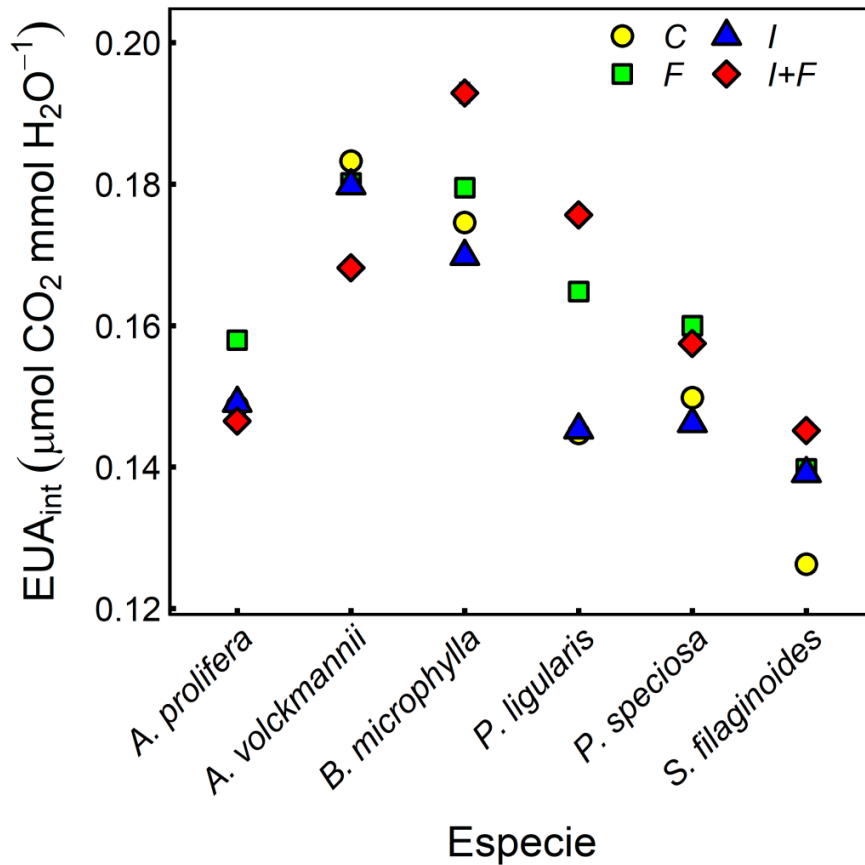


Figura 5.7. Eficiencia en el uso de agua integrada en el tiempo (EUA_{int} ; $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol H}_2\text{O}^{-1}$) para cada especie y tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media \pm IC ($n=3$).

La relación entre la EUA_{ins} con la EUA_{int} en el tiempo fue significativa ($F_{(1,22)} = 4,67$, $p = 0,04$, $R^2 = 0,18$) (Figura 5.8). Sin embargo, la pendiente de esta relación fue menor a la relación 1:1, indicando que la eficiencia de uso de agua instantánea es menor que la eficiencia de uso de agua integrada en el tiempo.

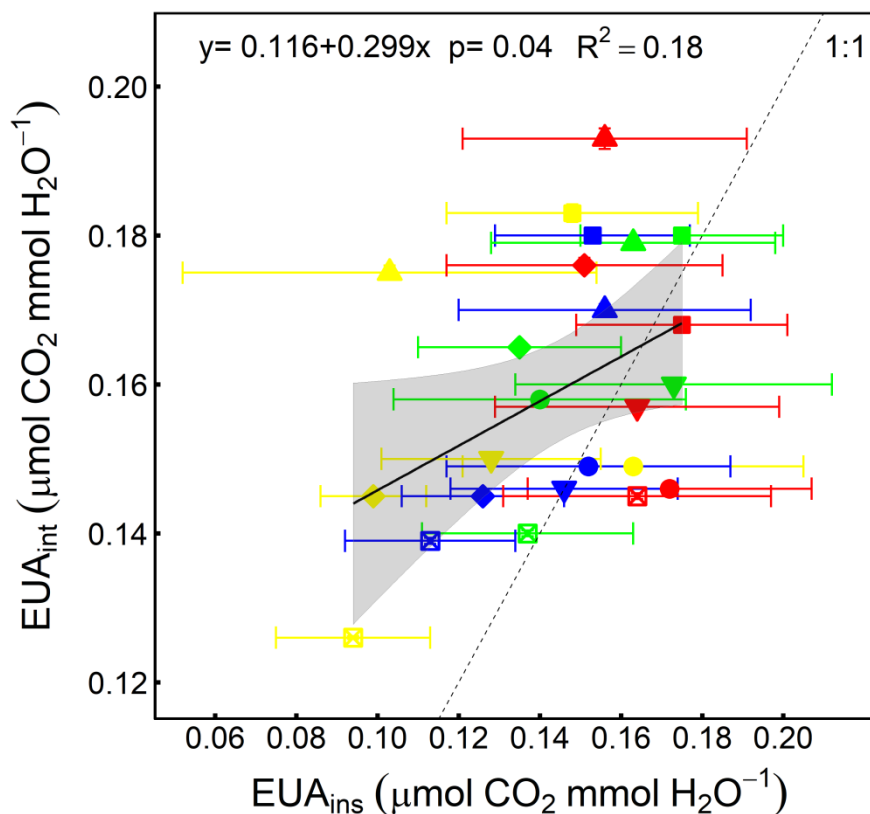


Figura 5.8. Relación entre la eficiencia de uso de agua instantánea (EUA_{ins}) y la eficiencia de uso de agua integrada (EUA_{int}). Cada punto es la media de cada tratamiento y especie \pm IC. La línea continua es la función lineal ajustada a todos los datos. La banda gris es el intervalo de confianza del 95%. La línea punteada es la relación 1:1.

La eficiencia en el uso del Nitrógeno fotosintético (EUN) fue modificada por efecto de los tratamientos (aunque no se pudo evaluar la significancia estadística de estos cambios, ya que fue calculada a partir de valores medios de A y de contenido de N para cada especie y tratamiento debido a que ambas variables no fueron analizadas en las mismas muestras vegetales) (Figura 5.9). En el tratamiento F se observó una reducción de la EUN de hasta un 50% con respecto al control, más evidente en *P. ligularis*, *P. speciosa* y *S. filaginoides*, mientras que en el tratamiento I+F se observó una reducción de la EUN de entre 23 y 58% con respecto al control en todas las especies. En el tratamiento I hubo un aumento en la EUN de entre 45 y 62% en *B. microphylla*, *P. ligularis* y *P. speciosa* respecto al control.

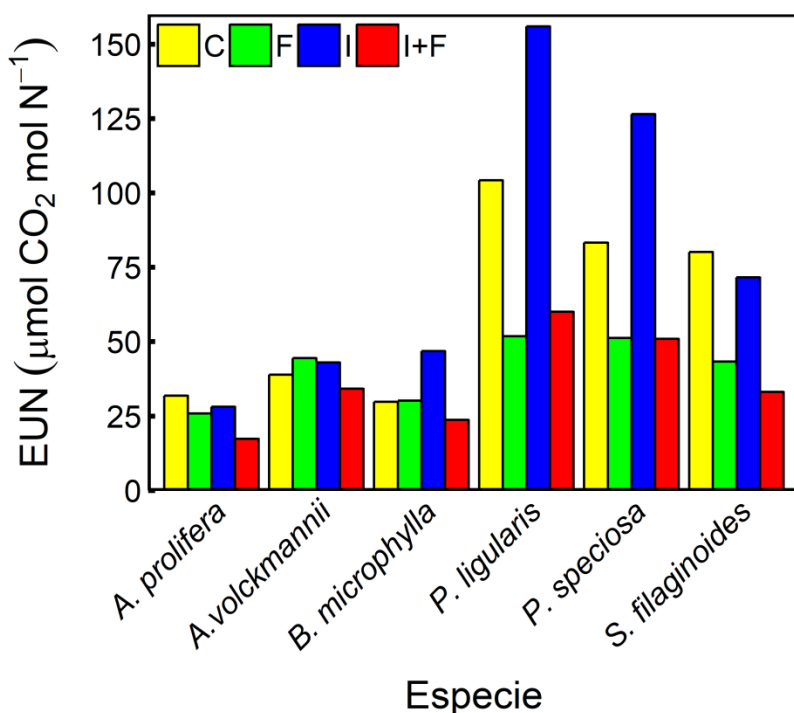


Figura 5.9. Eficiencia en el uso de nitrógeno ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol N}^{-1}$) para cada especie y tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica.

5.3. DISCUSIÓN

5.3.1. Nitrógeno foliar e intercambio de gases

Consistente con la tendencia global de limitación por Nitrógeno en los ecosistemas semiáridos alrededor del mundo, demostrada en el meta-análisis realizado por Yahdjian, Gherardi, & Sala (2011), las especies vegetales respondieron al incremento experimental de N. Luego de 4 años de iniciado el experimento y donde la disponibilidad de N en el suelo se incrementó (ver Tabla 1.3, Capítulo I), el contenido de N de las hojas de todas las especies aumentó en los tratamientos con fertilización, independientemente de la disponibilidad de agua, respecto al control. En un estudio realizado por Yahdjian, Gherardi, & Sala (2014) en un área próxima a la del presente estudio, aunque realizado durante dos años en pequeñas parcelas, solo se observó una respuesta positiva a la fertilización en las gramíneas, mientras que el contenido de N en

las hojas de los arbustos no fue modificado (excepto en *S. filaginoides*), en contraste con los resultados del presente experimento realizado a más largo plazo. A pesar del hecho de que en general los pastos exploran capas más superficiales del suelo para la captura de agua (Bucci et al. 2009, 2011) y de formas inorgánicas de N (Gherardi, Sala, & Yahdjian 2013; Sala et al. 2012), y que tienen una economía de N más abierta (Sala et al. 2012) respecto a los arbustos, en el presente estudio todas las especies fueron capaces de responder a la adición de N en el suelo aumentando el contenido de N en sus hojas. Esto sugiere que los arbustos podrían, en suelos más ricos en N disponible, estar capturando este recurso también de los horizontes superficiales y que todas las especies estarían limitadas por N pero que quizá la velocidad de la respuesta a la mayor disponibilidad del recurso sea diferente, siendo menor para los arbustos. Incluso la especie con capacidad de fijar N atmosférico, *A. volckmannii* (Golluscio, Faigón, & Tanke 2006), incrementó la concentración de N en sus hojas, lo que indicaría que bajo condiciones de alta disponibilidad de N no estaría fijando N simbióticamente. La deposición o la adición de N pueden inhibir su fijación biológica (Regus et al. 2017), siendo ésta más costosa que la absorción de N desde el suelo (Vitousek et al. 2002).

Los efectos del aumento en la disponibilidad de N en el suelo sobre el contenido de N en las hojas fueron independientes del tratamiento de irrigación indicando que el impacto del N no fue mediado por la disponibilidad de agua. Kowaljow & Fernández (2011) hipotetizaron que los arbustos aprovechan los pequeños pulsos de agua para adquirir N del suelo; sin embargo, en el presente estudio no se observó un aumento en el contenido de N de las hojas en el tratamiento de irrigación por lo que tal hipótesis no fue corroborada. En otros estudios en otros ecosistemas tampoco se observó un aumento en la captura de N con el incremento en la disponibilidad de agua (Choi et al. 2005; Fernández, Pissolito, & Passera 2018; Lü et al. 2014; Miller & Timmer 1994; Villar-Salvador et al. 2005). Por otra parte, la irrigación sola sin adición de N no indujo modificaciones en el contenido de N de las hojas, coincidiendo con los resultados de Choi et al. (2005).

Algunos autores han observado un aumento en las tasas fotosintéticas con mayor concentración de N foliar cuando hay suficiente disponibilidad de agua (DaMatta et al. 2002a; Niu et al. 2010). Los resultados del presente estudio indican que la adición de agua, aunque no la de fertilizante, conduce a un aumento en las tasas de intercambio gaseoso excepto en *A. volckmannii* y en *S. filaginoides* donde la fertilización incrementó

la fotosíntesis durante la estación seca. Varios estudios han observado efectos significativos de la precipitación y de la fertilización sobre la conductancia estomática y la fotosíntesis. Sin embargo, hay resultados contradictorios. Por ejemplo, mientras que en algunos estudios con especies arbóreas se ha encontrado una disminución de g_s por efecto de la fertilización (Amponsah et al. 2004; Bucci et al. 2006; Ewers, Oren, & Sperry 2000), en otros estudios no se observaron cambios (Clearwater & Meinzer 2001; DaMatta et al. 2002a; Medici et al. 2007; Talhelm, Pregitzer, & Burton 2011; Villar-Salvador et al. 2005) o el efecto fue positivo (Green & Mitchell 1992; Villar-Salvador et al. 2005). En otros estudios tampoco se encontró un aumento en las tasas fotosintéticas en tratamientos con fertilización (Talhelm, Pregitzer, & Burton 2011), incluso luego de 8 años de tratamiento (Wang et al. 2018). La falta de una respuesta significativa de la tasa de fotosíntesis a la fertilización podría indicar ciertas limitaciones por otros nutrientes, como Ca y Mg, que son fundamentales para el metabolismo de las plantas (Bauer et al. 2004; Elvir et al. 2006; Schaberg, Perkins, & McNulty 1997). Incluso se han reportado pérdidas de Ca^{2+} de las plantas con aumento en la disponibilidad de N (Likens, Driscoll, & Buso 1996; Perakis et al. 2006). Aunque no se ha determinado el contenido de P en las hojas, se podría descartar la limitación por este nutriente dado que uno de los fertilizantes utilizados en este estudio fue fosfato diamónico. Sin embargo, la disminución del pH en el suelo en las parcelas F e I+F (ver Tabla 1.3, Capítulo I) pudo reducir la solubilidad del P. Por otro lado, mientras hubo un aumento en la concentración de clorofilas en las hojas, la adición de N no afectaría la producción de proteínas solubles como la Rubisco como para observar mayores cambios en la tasa de fotosíntesis, tal como ha sido observado en otros estudios (Lu et al. 2006). Además, podría ser considerada una limitación no estomática de la fotosíntesis tal como una reducción en la conductancia del mesófilo (Galmés, Medrano, & Flexas 2007). El exceso de N puede también tener efectos adversos sobre la tasa de fotosíntesis tal como fue observado en dos de las especies cuando fue combinado con la adición de agua. Además, algunas especies pueden aumentar su captura de N cuando hay mayor disponibilidad y reservarlo en sus tejidos, sin incrementar su productividad (Fernández, Pissolito, & Passera 2018).

La mayor tasa de fotosíntesis en el tratamiento de irrigación respecto al control y a los otros tratamientos, sin que el contenido de N y de clorofilas haya incrementado, podría ser consecuencia del incremento en la difusión estomática del CO_2 en relación al

control debido al aumento en la conductancia estomática. Esto sugiere que mientras el control estomático bajo condiciones de sequía evitaría el estrés hídrico en estas especies (Scholz et al. 2012) limitaría la asimilación de CO₂. En estudios previos en la estepa patagónica, Golluscio, Sala, & Lauenroth (1998) y Golluscio, Sigal Escalada, & Pérez (2009) observaron que solo los pastos respondieron positivamente a la adición de grandes pulsos de lluvia (30 mm), reflejándose en un aumento en las tasas fotosintéticas y en la conductancia estomática. Sin embargo, en el presente estudio este aumento fue observado con pulsos más pequeños (5 mm) acumulando entre el final de la estación de crecimiento y estación seca aproximadamente un 20-25% más de agua que la precipitación media anual. Aunque algunas de las especies arbustivas tengan acceso a fuentes de agua más estables en el suelo y más profundas (Bucci et al. 2009), todas las especies arbustivas de este estudio poseen raíces superficiales tal que exploran las primeras capas del suelo.

Durante la estación seca e independientemente del tratamiento las especies exhibieron mayor control estomático que durante la estación de crecimiento y una reducción de la tasa de fotosíntesis. A pesar de que particularmente la fertilización no indujo un aumento en la tasa de fotosíntesis, en todos los tratamientos la reducción estacional en la fotosíntesis fue de menor magnitud que en el control en cuatro de las seis especies estudiadas. La adición de agua más que la de N permitió mantener las tasas de fotosíntesis a niveles más cercanos a los de la estación de crecimiento. Es decir que la asimilación de carbono integrada en el tiempo podría ser mayor bajo los efectos de la adición de recursos y de mayor magnitud con la adición de agua.

5.3.2. Eficiencia de uso de agua y del Nitrógeno

Debido a que las tasas de intercambio gaseoso son mediciones instantáneas, que no integran los procesos fisiológicos en un periodo de tiempo prolongado, una mejor alternativa para evaluar los efectos de los cambios en las condiciones ambientales la constituye el análisis de los isótopos estables (Dawson et al. 2002; Ferrio et al. 2005; Michener & Lajtha 2007; Santiago et al. 2005). La abundancia relativa del ¹³C en las hojas maduras fue analizada en este estudio como una medida integrada en el tiempo de la respuesta de las plantas a la fertilización e irrigación. El grado de discriminación del ¹³C por la planta es dependiente de diferentes factores, como la temperatura, la

humedad, la luz, la concentración de CO₂ y la disponibilidad de nutrientes en el suelo, que afectan la relación entre la conductancia estomática y la tasa fotosintética (Ehleringer, Hall, & Farquhar 1993; Farquhar, Ehleringer, & Hubick 1989). En general, la concentración de ¹³C (δ¹³C) en las hojas de las especies analizadas fue afectada tanto por la adición de agua como de nutrientes. El aumento observado en el δ¹³C por efecto de la fertilización, sola y combinada con la irrigación, fue también encontrado en otros estudios realizados en otros ecosistemas (Cabrera-Bosquet et al. 2007; DaMatta et al. 2002b; Jenkinson, Coleman, & Harkness 1995; Serret et al. 2008; Zhao, Xiao, & Liu 2007). Este incremento en el δ¹³C y, por ende, en la EUA en respuesta a la fertilización al final de la estación de crecimiento podría ocurrir a causa de una mayor limitación estomática de la fotosíntesis (menor conductancia estomática) o mayor eficiencia de carboxilación de los tejidos fotosintéticos, o ambos (Cabrera-Bosquet et al. 2007; Högberg et al. 1995; Ripullone et al. 2004; Serret et al. 2008). Otra explicación podría ser un aumento en la asimilación de carbono sin cambios en el comportamiento estomático (Clearwater & Meinzer 2001; DaMatta et al. 2002b; Ripullone et al. 2004). El mayor contenido de N en las hojas de los tratamientos de fertilización sugiere una mayor capacidad fotosintética intrínseca de los tejidos verdes, lo que causaría el incremento en δ¹³C. Diversos estudios (Livingston et al. 1999; Mckee et al. 2002; Sparks & Ehleringer 1997) han encontrado una relación negativa entre el contenido de N foliar y la Δ¹³C (o, dicho de otro modo, una relación positiva entre el contenido de N y δ¹³C), lo cual refuerza la idea de que mayor contenido de N se corresponde con mayor capacidad fotosintética y menor concentración interna de CO₂.

Mayor disponibilidad de agua en el suelo ejerce una influencia significativa sobre la discriminación del ¹³C (Δ¹³C) de las hojas (Ehleringer, Hall, & Farquhar 1993; Youfeng, Weiguo, & Zhisheng 2008). Plantas expuestas a déficit hídrico generalmente producen hojas con menor Δ¹³C tal que son más eficientes en el uso de este recurso (Hubick & Farquhar 1989; Meinzer, Goldstein, & Grantz 1990; Navarrete-Campos et al. 2013). Del mismo modo ha sido observado que el aumento en la disponibilidad de agua disminuye la EUA en diferentes especies (Chen et al. 2005; Choi et al. 2005; Högberg et al. 1995; Wang et al. 2016; Warren, McGrath, & Adams 2001; Wei et al. 2015; Xu & Zhou 2005). Incluso, y en contraste con los resultados del presente estudio para tres de las especies analizadas, Golluscio & Oesterheld (2007) encontraron que en años húmedos la EUA de especies arbustivas y herbáceas de la estepa patagónica

aumenta respecto a la de años secos. Esta variabilidad inter-específica en las respuestas de la EUA a la disponibilidad de agua ha sido observada en otros ecosistemas por Miller, Williams, & Farquhar (2001). Posiblemente el aumento en la tasa de fotosíntesis en dos de las tres especies donde la EUA disminuyó con la irrigación haya determinado la menor discriminación isotópica en el presente estudio. Mientras que para *S. filaginoides* la EUA incrementó en el tratamiento I, consistente con los resultados de Golluscio & Oesterheld (2007), la disminución en la resistencia a la carboxilación pudo ser más importante que el aumento en g_s cuando la disponibilidad de agua aumentó.

En este estudio el $\delta^{13}\text{C}$ de las hojas fue también variable entre las especies (-31 a -24.5 ‰) al igual que lo observado por Golluscio & Oesterheld (2007) para varias especies de arbustos, herbáceas dicotiledóneas y pastos de la estepa patagónica. A diferencia de otros estudios donde se observaron los valores mayores de $\delta^{13}\text{C}$ en las especies arbustivas que en las herbáceas (Smedley et al. 1991; Wang et al. 2016), las dos especies de gramíneas del presente experimento tuvieron valores intermedios. *Adesmia volckmannii*, la especie fijadora de N_2 , fue la que presentó mayor contenido de N y mayor $\delta^{13}\text{C}$ de todas las especies del presente estudio. Esto tiene sentido ya que una mayor cantidad de N foliar se relaciona con mayor $\delta^{13}\text{C}$ (Bai et al. 2008; Sparks & Ehleringer 1997). Se considera que las especies deciduas son menos conservativas en el uso del agua que las siempreverdes (Lloyd & Farquhar 1994), de modo de maximizar las tasas fotosintéticas durante la estación de crecimiento. Sin embargo, en el presente estudio no se observó un efecto de la fenología foliar sobre el $\delta^{13}\text{C}$, coincidiendo con lo encontrado por Leffler & Enquist (2002) y Vitória et al. (2018).

La comparación de la EUA integrada en el tiempo (estimada a partir de $\delta^{13}\text{C}$) con la instantánea (estimada a partir de la medición puntual de fotosíntesis y conductancia estomática durante la estación de crecimiento), se encontró que esta última subestimó los valores de la EUA integrada. Esto también fue encontrado por Meinzer, Saliendra, & Crisosto (1992) y sugirieron que la subestimación de los valores de EUA instantánea podría ser el resultado de una distribución en parches de la apertura estomática, siendo así sobrestimada la g_s durante las determinaciones de intercambio gaseoso. Tomando en cuenta que esta característica es más frecuentemente observada en hojas de plantas que experimentan mayor déficit hídrico, podría ser una posibilidad.

La adición de nutrientes provocó una disminución en la EUN en las especies analizadas de la estepa patagónica, posiblemente a causa de la falta de respuesta en la fotosíntesis, aún con aumento de N foliar, si bien en la mayoría no hubo un aumento en la cantidad de clorofilas. En diferentes ecosistemas se han encontrado relaciones funcionales negativas entre la disponibilidad de N del suelo y la EUN (Bridgham et al. 1995; Serret et al. 2008; Tatenó & Takeda 2010; Yuan et al. 2006). Livingston et al. (1999) encontraron una correlación negativa entre la EUA y la EUN en plantas expuestas a diferentes niveles de irrigación y fertilización. Esto coincide con los resultados del presente estudio que muestran un aumento en la EUA y una disminución en la EUN en la mayoría de las especies bajo el tratamiento de fertilización y un comportamiento opuesto en el tratamiento de irrigación. En el tratamiento de irrigación disminuyó la cantidad de amonio (y tendió a ser menor la cantidad de nitrato también) en las capas más superficiales del suelo (Capítulo III), y disminuyó la cantidad de N en las hojas de los pastos, lo que se tradujo en un aumento en la EUN. Un incremento en la EUN con mayor disponibilidad de agua sugiere en este caso mayor limitación de N para la productividad de las plantas, tal como explican Epstein et al. (2006). En el tratamiento que combinó fertilización e irrigación se evidenció más el efecto de la fertilización, sugiriendo una mayor limitación de nutrientes que de agua o bien una irrigación insuficiente para lograr un mayor efecto de ese tratamiento.

5.4. CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados sugieren que las especies arbustivas y gramíneas más representativas de la estepa patagónica presentan algunas características compatibles con la plasticidad fenotípica frente a cambios en la disponibilidad de agua y nutrientes. Las especies fueron todas capaces de capturar más N del suelo por efecto de la fertilización aunque en general no lo asignaron a mayor producción de pigmentos fotosintéticos. Además, no hubo un aumento en la conductancia estomática bajo los tratamientos F e I+F, con lo cual posiblemente no pudieron aumentar la difusión del CO₂, limitando el incremento esperado en la tasa de fotosíntesis en base al aumento significativo en el N foliar, excepto en *A. volckmannii* y *S. filaginoides* durante la estación seca. Esto sugiere un cierto grado de desacople entre la fotosíntesis y el N foliar en algunas especies. Por otro lado, mientras que la adición de agua no afectó el contenido de N en las hojas, el aumento en la conductancia estomática pudo facilitar la

difusión de CO₂ e incrementar la tasa de fotosíntesis, sugiriendo que el agua es el factor más limitante para la fotosíntesis cuando la disponibilidad de agua es baja y que no hay un efecto aditivo del tratamiento I+F. Tanto la adición de N como de agua mantuvo las tasas de asimilación de carbono a valores relativamente más altos en la estación seca respecto a la estación de crecimiento que en el control. En el Capítulo VII se hace referencia a las consecuencias de la adición de agua y nutrientes a nivel de individuo sobre el crecimiento y la productividad.

Capítulo VI

**Efectos de la irrigación y de la
fertilización sobre la resistencia
a bajas temperaturas de
arbustos y pastos**

Efectos de la irrigación y de la fertilización sobre la resistencia a bajas temperaturas de arbustos y pastos

6.1. INTRODUCCIÓN

Las bajas temperaturas, además de la disponibilidad de agua y nutrientes, constituyen un factor de estrés importante que afecta el crecimiento, la productividad y la distribución de las especies vegetales en el mundo (Levitt 1980). Los escenarios climáticos predicen un mayor incremento en las temperaturas a mayores latitudes y más en invierno que en verano (Rapacz et al. 2014). Además, se predice que la temperatura mínima diaria y estacional aumentará más que la temperatura máxima. Todo esto sugiere que el riesgo de exposición a temperaturas extremas disminuirá; sin embargo la frecuencia, grado y longitud de eventos extremos con temperaturas congelantes en invierno incrementarían. En esta situación las plantas estarían más expuestas al congelamiento debido a la reducción en el periodo de aclimatación a bajas temperaturas.

La resistencia a las bajas temperaturas, ya sea a través de evitar o tolerar la formación de hielo extracelular, es clave para la supervivencia de las plantas en hábitats con temperaturas congelantes como la estepa patagónica. Las bajas temperaturas que se observan en invierno o en primavera cuando la disponibilidad de agua en el suelo es relativamente alta pueden afectar el uso de los recursos del suelo por parte de las plantas. Por un lado las temperaturas bajas, aunque no sean congelantes, disminuyen la viscosidad del agua y la permeabilidad de las membranas celulares (Ameglio et al. 1990; Lopez & Nobel 1991; Sellin & Kupper 2007) ocasionando una reducción en el transporte de agua dentro de la planta y un aumento en el déficit hídrico (Arias et al. 2015). Por otro lado, las temperaturas por debajo de 0°C pueden causar daños letales en los tejidos vegetales. El daño por congelamiento de los tejidos vegetales generalmente se produce por efecto de la deshidratación del citoplasma durante la formación extracelular de los cristales de hielo (Xin & Browse 2000), por la ruptura de las membranas celulares debido al crecimiento del hielo extracelular y por la formación de hielo intracelular (Pearce 2001). En las especies que tienen capacidad de tolerar la formación de hielo extracelular, esta estrategia está relacionada a la estructura de las

paredes y membranas celulares y a la presencia de sustancias crio-protectoras (Scholz et al. 2012; Smallwood et al. 2002; Zhang et al. 2016).

Mientras que las hojas y los tallos de algunas especies de arbustos patagónicos son tolerantes al congelamiento extracelular a temperaturas inferiores a -20°C (Scholz et al. 2012; Zhang et al. 2016), las raíces son en general más sensibles al daño por frío (Zhang et al. 2016). Aunque las plantas puedan tolerar el congelamiento extracelular (Zhang et al. 2016), estas pueden experimentar pérdida de la capacidad de transporte de agua en los conductos xilemáticos durante los procesos de congelamiento y descongelamiento. En general las raíces tienen conductos xilemáticos de mayor diámetro que otros órganos de la planta, lo cual favorece la formación de embolismos durante el invierno (Cavender-Bares 2005; Feild & Brodribb 2001; Martínez-Vilalta & Pockman 2002). La formación de embolismos en el sistema de transporte de agua de las plantas, que puede ocurrir tanto por congelamiento o por déficit hídrico, puede repercutir negativamente en la asignación de recursos hacia el crecimiento dado los costos asociados con la reparación de los conductos embolizados (Bucci et al. 2003).

Una disminución en la resistencia al congelamiento podría afectar el crecimiento y la supervivencia de las plantas durante la estación de crecimiento siguiente (Malyshev & Henry 2012). Por ejemplo, un aumento en la concentración de Nitrógeno en los tejidos puede disminuir la aclimatación a bajas temperaturas como resultado de un mayor contenido de agua en los tejidos o de una menor acumulación de C en plantas fertilizadas (Malyshev & Henry 2012). Así, se ha observado que la fertilización con N puede reducir la resistencia a las heladas en algunas especies de plantas (Fløistad & Kohmann 2004; Hellergren 1981; Pellet & Carter 1981; Villar-Salvador et al. 2005; Welterlen & Watschke 1985). Sin embargo, otros estudios han encontrado el efecto opuesto, es decir, un incremento en la resistencia a las bajas temperaturas (Bigras et al. 1996; Sandli et al. 1993), o bien no encontraron ningún efecto (Birchler, Rose, & Haase 2001; Fløistad 2002). El aumento en la concentración de nutrientes puede incrementar la capacidad de super-enfriamiento, en particular en las especies que evitan el congelamiento, disminuyendo el potencial osmótico de la savia. Un mayor contenido de N en las hojas como resultado de la fertilización puede estar destinado a proteínas crio-protectoras. Sustancias como las dehidrinas o la prolina que funcionan de manera no coligativa, pueden actuar como crio-protectoras de las membranas celulares previniendo

su ruptura (Gallardo-Cerda et al. 2016; Trischuk et al. 2014) o la deshidratación celular (Eriksson et al. 2011; Kumar & Bhatla 2006) a temperaturas debajo de cero grado.

Por otra parte, mientras que la sequía puede incrementar la tolerancia al congelamiento (Medeiros & Pockman 2011), una mayor disponibilidad de agua por efecto de la irrigación podría disminuir la resistencia a las bajas temperaturas. Mayor volumen de agua en los tejidos aumenta la probabilidad de formación de hielo a temperaturas más altas (Arias et al. 2017; Wilson, Heneghan, & Haymet 2003). Asimismo las especies expuestas a mayor disponibilidad de agua presentan menor cantidad de solutos osmóticamente activos, los cuales contribuyen a disminuir la temperatura de nucleación de hielo (Arias et al. 2015).

El objetivo de nuestro estudio fue evaluar el impacto de la fertilización e irrigación sobre la resistencia a las bajas temperaturas de arbustos y pastos de la estepa patagónica. La **hipótesis** planteada establece que la adición de nutrientes incrementa la tolerancia a las bajas temperaturas, mientras que la adición de agua disminuye la resistencia a las bajas temperaturas. Principalmente la adición de N podría proveer los recursos necesarios para incrementar la cantidad de compuestos orgánicos como aminoácidos o proteínas solubles que cambian el umbral de temperatura a la cual las plantas exhiben daños celulares. En cambio, un mayor contenido de agua en los tejidos incrementaría la probabilidad de formación del núcleo de hielo a más altas temperaturas. Para responder a este objetivo se realizó un experimento de irrigación y fertilización a campo y se trabajó con especies arbustivas y herbáceas representativas de la estepa patagónica tal como fue descrito en el Capítulo I de esta tesis. Se determinó el contenido de agua de los tejidos, la temperatura de nucleación del hielo a través de análisis térmico diferencial y la temperatura de daño de los tejidos.

6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1. Contenido relativo de agua

Para cada especie y tratamiento (control, fertilización, irrigación y fertilización + irrigación) se determinó el contenido relativo de agua (CRA) de hojas, tallos y raíces en agosto de 2018. En el caso de las hojas el CRA (y las otras variables mencionadas abajo) fueron determinadas solo en las especies siempreverdes (*Berberis microphylla*,

Senecio filaginoides, *Poa ligularis* y *Pappostipa speciosa*), dado que en invierno especies como *Adesmia volckmannii* y *Azorella prolifera* no poseen hojas. Para el CRA de raíces (así como las otras variables mencionadas abajo) fueron solo estudiadas en las dos especies de gramíneas, ya que las mismas presentan las raíces más superficiales (Tabla 1.2, Capítulo I) y estarían más expuestas a las bajas temperaturas. Cinco a 10 ramas de cada especie de arbusto y 5 a 10 vástagos de cada especie de pasto fueron colectados por la mañana y almacenados en bolsas plásticas hasta su posterior análisis en el laboratorio. Las muestras (cada una compuesta de 3 a 5 hojas, o un segmento de tallo terminal o 5 segmentos de raíces) fueron primero pesadas para obtener la masa fresca (MF), luego se sumergieron en agua destilada por 24 horas y fueron pesadas nuevamente para obtener la masa saturada (MSat). Finalmente, las muestras fueron secadas en estufa a 60°C por 72 horas y luego pesadas para obtener la masa seca (MS). El CRA fue calculado como: $(MF-MS)/(MSat-MS)*100$.

6.2.2. Análisis térmico

El análisis térmico fue realizado en muestras de hojas, tallos y raíces de cada especie y en cada tratamiento para determinar la temperatura de nucleación de hielo (INT por su sigla en inglés). Las muestras fueron colectadas en agosto de 2018, en 10 individuos de cada especie y en cada tratamiento. Las muestras fueron colocadas en un baño de frío (Thermo Fisher Scientific, USA) con una mezcla de agua y etilenglicol en una relación 1:1 que permite una tasa de descenso de la temperatura de 5°C h⁻¹ desde la temperatura ambiente hasta -27°C. La tasa de descenso de la temperatura fue similar a la utilizada en otros estudios (Lipp et al. 1994; Rada et al. 2001; Zhang et al. 2016), y refleja la tasa máxima de disminución de la temperatura observada en el campo en el área de estudio (Zhang et al. 2016). La temperatura de los tejidos (hojas, tallos terminales y raíces) fue evaluada con termopares de cobre-constantan colocados en contacto directo con el tejido y conectadas a un sistema automático de adquisición de datos (CR10X, Campbell Scientific, USA). La temperatura de cada termopar fue registrada cada 4 segundos. Las INT fueron detectadas a partir de la formación de exotermas en la cinética de temperatura del tejido, ya que un incremento abrupto en la temperatura indica liberación de calor del agua durante la nucleación de hielo extracelular y/o intracelular.

6.2.3. Daño celular

Para evaluar el daño de los tejidos por efecto de temperaturas bajas se usó el método de pérdida de electrolitos (Lipp et al. 1994; Wilner 1960). Se colectaron muestras de hojas, tallos terminales y raíces de cada especie y en cada tratamiento en agosto de 2018. En el laboratorio las muestras, cada una compuesta de 3 a 5 hojas, o un segmento de tallo o 5 segmentos de raíces, se colocaron en tubos plásticos cerrados y se sumergieron en un baño de frío (Thermo Fisher Scientific, USA), con una mezcla de agua y etilenglicol. El baño fue configurado para disminuir su temperatura a una tasa de 5°C h^{-1} , con rampas para mantener la temperatura fija en determinados valores (5, 0, -10, -15, -20 y -27°C) durante 15 minutos. Después de mantener las muestras a una temperatura determinada durante los 15 minutos (ver Lipp et al 1994; Zhang et al. 2016), 3-10 tubos de cada tejido, especie y tratamiento fueron retirados del baño de frío y dejados descongelar a 4°C por 2 hs. Luego se adicionaron 10 ml de agua deionizada en cada tubo y se los mantuvo a 4°C por 24 hs. Posteriormente, los tubos con las muestras fueron colocados en un agitador orbital (Orbital Shaker TS-1000, Arcano) por 1 h. Luego se determinó con un conductivímetro (Hanna HI 98311, Hanna Instruments, USA) la conductividad eléctrica (CE inicial) de la solución en cada muestra. Después de la determinación de la CE inicial, las muestras fueron colocadas en una autoclave por 20 min a 121°C . Este es un procedimiento convencional para determinar la máxima liberación de electrolitos y, de ese modo, la resistencia de los tejidos al congelamiento (Arias et al. 2015; Arora, Wisniewski, & Scorza 1992; Scholz et al. 2012). Posteriormente las muestras fueron mantenidas por 24 hs a 4°C y luego agitadas por 1 h y determinar la CE final. La CE relativa, como un indicador de la pérdida relativa de iones, fue calculada para cada muestra como: $(\text{CE inicial} / \text{CE final}) \times 100$.

Las muestras no fueron inoculadas con hielo de modo de simular condiciones naturales y evitar efectos artificiales de este método como la formación de hielo en la superficie de los tejidos analizados. Las mediciones de daño celular sin inoculación de hielo se han usado ampliamente para evaluar la resistencia al congelamiento (por ejemplo, Arias et al. 2015; Cavender-Bares 2005; Goldstein, Meinzer, & Monasterio 1985; Lipp et al. 1994; Sierra-Almeida and Cavieres 2010). Previamente se realizó una prueba con dos especies de arbustos patagónicos tolerantes a la formación de hielo extracelular (*B. microphylla* y *Nardophyllum obtusifolium* Hook y Arn), la cual mostró

que la inoculación de hielo no tiene ningún efecto sobre la ruptura de la membrana plásmatica y la evaluación de la resistencia al congelamiento (Zhang et al. 2016).

Generalmente se determina el valor de temperatura al cual se libera el 50% de los electrolitos (LT_{50}), definido como la temperatura letal de los tejidos (Cavender-Bares 2005; Lipp et al. 1994; Zhang et al. 2016). Sin embargo en este estudio la mayoría de las especies a -27°C , que es la temperatura mínima posible alcanzada con el baño de frío y la mezcla líquida empleada, no experimentaron el 50% de daño.

6.2.4. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software R versión 3.4.4 (R Development Core Team, 2018). Se usaron modelos lineales (MLs) con test-F para evaluar el efecto de la interacción entre tratamiento y especie (variables explicativas) sobre el contenido relativo de agua y la temperatura de nucleación de hielo de hojas, tallos y raíces (variables dependientes). Debido a que no se analizaron los mismos tejidos en cada especie, debido a la ausencia de tallos en las especies de gramíneas y de hojas en las especies caducifolias, se testeó un ML para cada tejido por separado. Para evaluar las diferencias entre tratamientos y temperaturas (variables explicativas) sobre el daño celular, medido como la pérdida de electrolitos en solución (variable dependiente), se testearon modelos lineales (MLs) con test-F, un modelo para cada especie y órgano. Cuando fue necesario, todos los modelos se ajustaron mediante modelos de varianza; la selección del modelo se basó en el criterio de información de Akaike (AIC) (Burnham y Anderson 2002). La simplificación de los efectos fijos de todos los modelos para alcanzar el modelo mínimo adecuado se llevó a cabo mediante una prueba de hipótesis (test-F). El análisis post-hoc de Tukey se utilizó para comparaciones múltiples en todos los modelos cuando el test-F fue significativo, utilizando la función "glht" del paquete de R "multcomp" versión 1.4-8 (Bretz et al. 2010). Cuando se hicieron comparaciones entre tratamientos, solo se comparó cada tratamiento (F, I o I+F) con respecto al control. Para graficar los resultados del modelo mejor ajustado, se utilizó el paquete de R "visreg" versión 2.5-0 (Breheny y Burchett 2017).

6.3. RESULTADOS

La temperatura mínima del aire en el sitio de estudio alcanzó valores entre -10 a -15°C entre 2015 y 2019. Durante gran parte del año, a excepción del verano, las temperaturas mínimas del aire fueron menores a 0°C (Figura 6.1). La temperatura mínima del suelo a 10 cm de profundidad alcanzó valores inferiores a 0°C durante junio y julio (Figura 6.1, gráfico inserto).

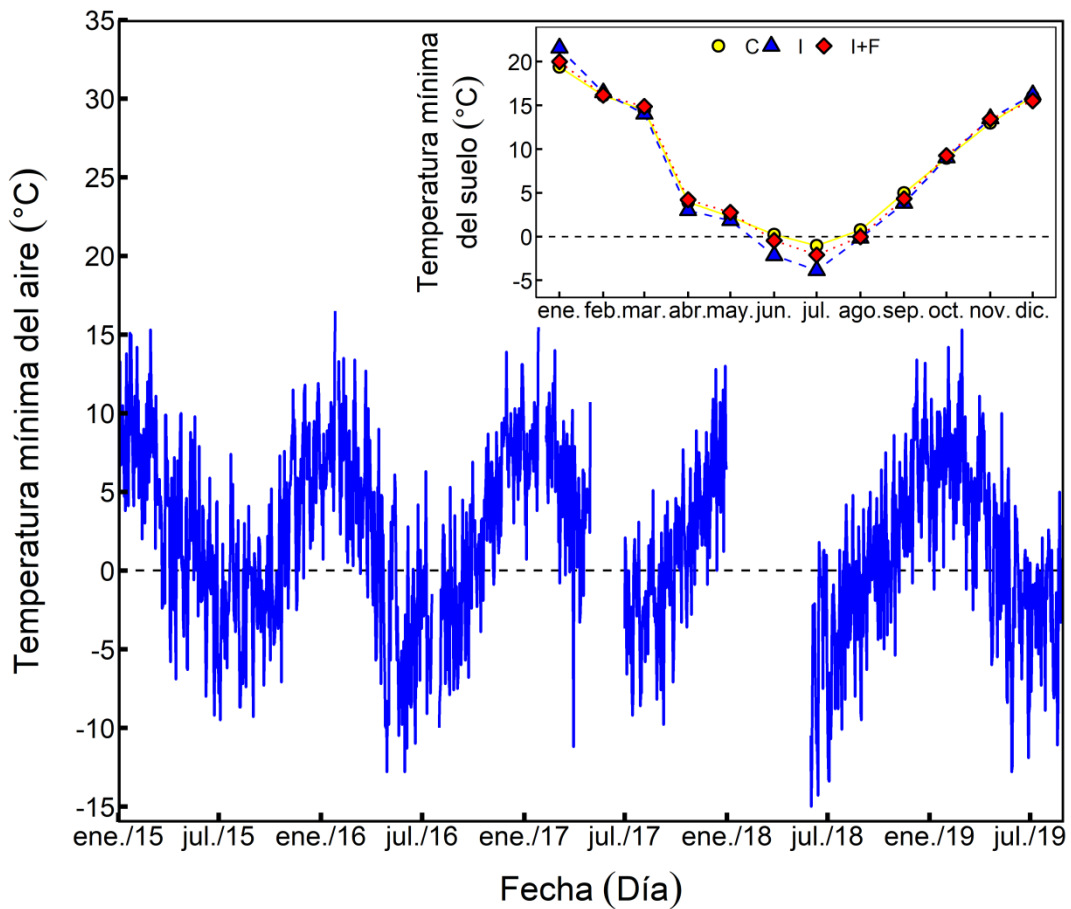


Figura 6.1. Temperatura diaria mínima del aire (desde 01/01/2015 a 31/08/2019) en la Estación Experimental Río Mayo, INTA. (Fuente: <http://sipas.inta.gob.ar/>). El gráfico inserto muestra las temperaturas mínimas mensuales del suelo a 10 cm de profundidad para una parcela control (C), una parcela de irrigación (I) y una de irrigación-fertilización (I+F) durante el año 2016, obtenidas de psicrómetros instalados en el suelo.

6.3.1. Contenido relativo de agua

El contenido relativo de agua (CRA) de las hojas varió significativamente entre las especies ($F_{(3,277)} = 29,24$ $p < 0,0001$) y por efecto de los tratamientos ($F_{(3,277)} = 3,57$ $p = 0,015$), sin interacción significativa entre ambas variables ($F_{(9,268)} = 1,72$ $p = 0,085$). El CRA de las hojas fue mayor en el tratamiento de irrigación ($p = 0,024$) y marginalmente mayor en el tratamiento de irrigación-fertilización ($p = 0,067$) con respecto al control en las cuatro especies analizadas (Figura 6.2 A). Además, el CRA de las hojas fue mayor en *P. speciosa*, aproximadamente 80%, y menor en *S. filaginoides*, aproximadamente 60% (Figura 6.2 A). El CRA de los tallos no varió entre tratamientos ($F_{(3,162)} = 0,42$ $p = 0,74$), pero fue diferente entre las especies arbustivas ($F_{(3,165)} = 90,9$ $p < 0,0001$). Los tallos de *B. microphylla* tuvieron mayor CRA que los de *A. prolifera* y *S. filaginoides* (Figura 6.2 B). El CRA de las raíces de los pastos fue diferente entre tratamientos y entre las dos especies, con interacción significativa entre ambas variables ($F_{(3,22)} = 4,85$ $p = 0,007$). En *P. ligularis* el CRA de las raíces disminuyó marginalmente en el tratamiento I ($p = 0,055$) y significativamente en el tratamiento I+F ($p = 0,037$) con respecto al control (Figura 6.2 C). En *P. speciosa* aumentó marginalmente en el tratamiento F ($p = 0,062$) y significativamente en el tratamiento I+F ($p = 0,027$) respecto al control (Figura 6.2 C). El CRA de las raíces de *P. ligularis* en el control fue mayor que en *P. speciosa* ($p = 0,008$) (Figura 6.2 C).

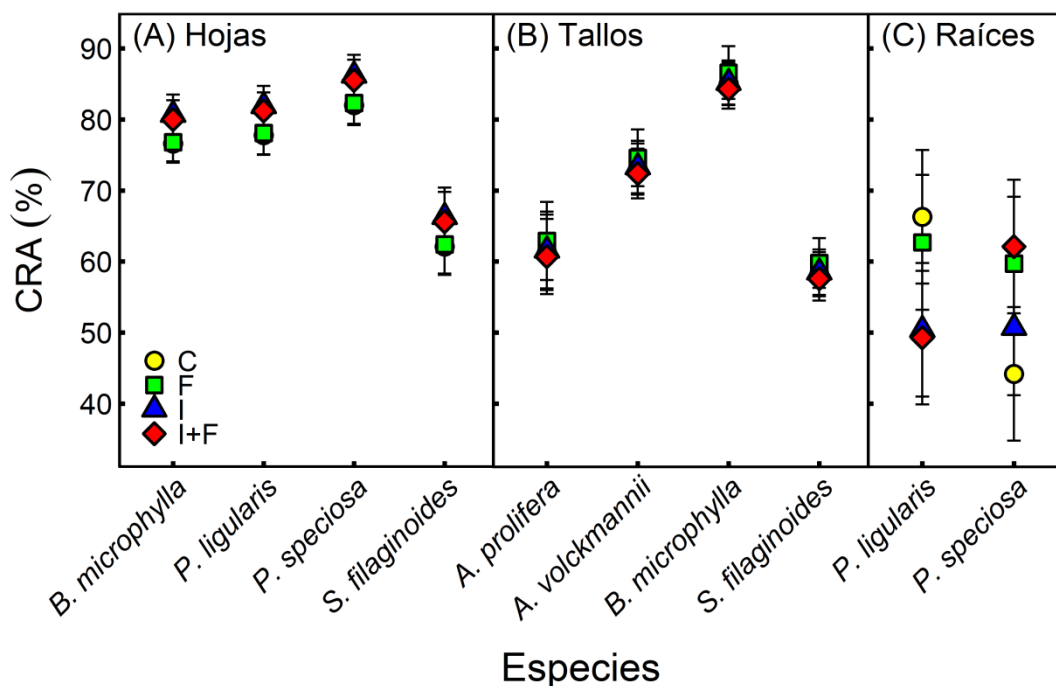


Figura 6.2. Contenido relativo de agua (CRA; %) de (A) hojas, (B) tallos y (C) raíces, para cada especie y tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media \pm IC (n= 5-10).

6.3.2. Análisis térmico

La temperatura de nucleación de hielo (INT) de las hojas varió significativamente entre las especies y por efecto de los tratamientos, con interacción significativa entre ambas variables ($F_{(9,316)} = 2,45$ $p = 0,01$). Solo la INT de las hojas de *P. speciosa* en el tratamiento I+F fue mayor con respecto al control ($p = 0,05$) (Figura 6.3 A). En el resto de las especies, la INT de las hojas no fue diferente entre los tratamientos (Figura 6.3 A). Además, la INT de las hojas fue menor en *P. speciosa* ($p < 0,001$ para la diferencia con el resto de las especies), cercana a -20°C , y mayor en *S. filaginoides* ($p < 0,001$ para la diferencia con el resto de las especies), cercana a -8°C (Figura 6.3 A). En los tallos la INT no varió entre tratamientos ($F_{(3,238)} = 2,2$ $p = 0,088$), pero fue diferente entre las especies arbustivas ($F_{(3,241)} = 49,3$ $p < 0,0001$). La INT de los tallos de *A. volckmannii* y *B. microphylla* fue cercana a -10°C , menor que la INT de los tallos de *A. prolifera* y *S. filaginoides*, que fue aproximadamente -8°C ($p < 0,0001$) (Figura 6.3 B). Por último, la INT de las raíces de los pastos fue diferente entre los tratamientos ($F_{(3,111)} = 8,6$ $p < 0,0001$) y entre las dos especies ($F_{(1,111)} = 9,22$ $p = 0,003$),

sin interacción significativa entre ambas variables ($F_{(3,108)} = 1,1$ $p = 0,352$). La INT de las raíces de los pastos en el control y en el tratamiento I fue cercana a -20°C , mientras que la INT en los tratamientos F e I+F incrementó aproximadamente 3°C (menos negativa) en ambas especies, siendo significativamente mayor ($p = 0,005$ y $p = 0,003$, respectivamente) que en el control (Figura 6.3 C). A su vez, la INT de las raíces de *P. ligularis* fue mayor que la de *P. speciosa* ($p = 0,002$) (Figura 6.3 C). La capacidad de super-enfriamiento de las raíces de *P. speciosa* fue similar a la de sus hojas ($p = 0,14$). En cambio, en *P. ligularis* fue significativamente mayor la capacidad de super-enfriamiento de las raíces que la de las hojas ($p < 0,0001$) (Figura 6.3).

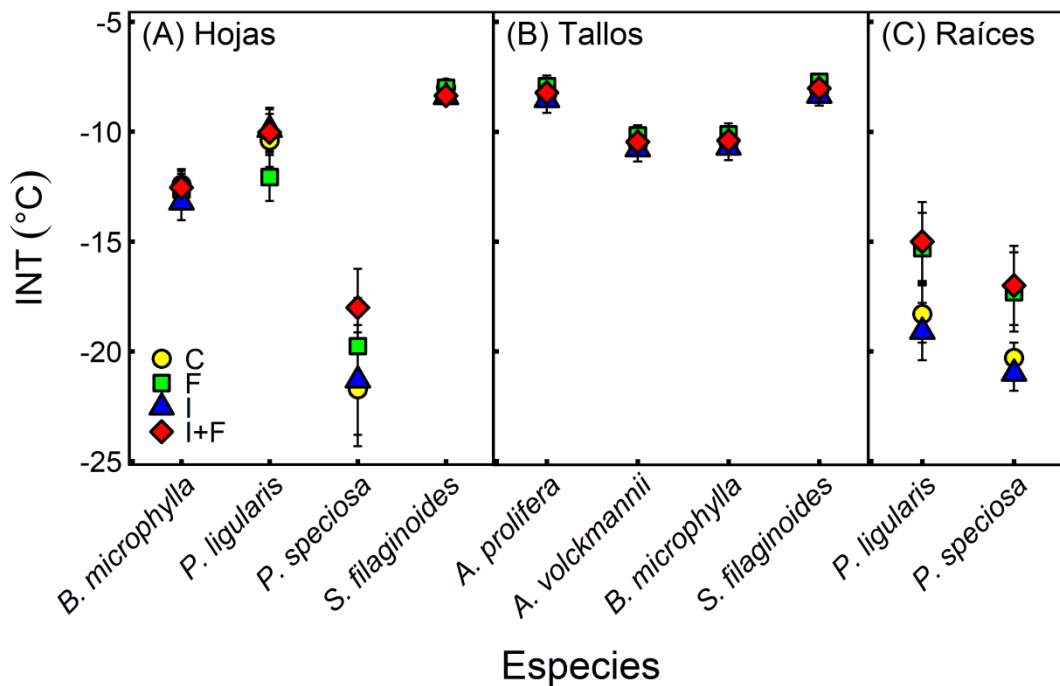


Figura 6.3. Temperatura de nucleación del hielo (INT; $^{\circ}\text{C}$) en (A) hojas, (B) tallos y (C) raíces, para cada especie y tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media \pm IC ($n = 9-15$).

6.3.3. Daño celular

El daño celular fue variable entre las especies y los órganos analizados. En ningún caso se alcanzó un 100% de daño a -27°C , la mínima temperatura alcanzada en el experimento de frío (Figura 6.4). El daño celular de las hojas, estimado a partir de la

pérdida relativa de electrolitos, fue casi nulo en *B. microphylla* (aproximadamente 1% a -27°C) (Figura 6.4 A). En *P. ligularis* el daño varió significativamente por efecto de los tratamientos y entre las temperaturas analizadas, con interacción significativa entre ambas variables ($F_{(12,118)} = 2,24$ $p = 0,014$). Solo el daño de las hojas de *P. ligularis* en el tratamiento I+F fue marginalmente mayor con respecto al control a 0°C ($p = 0,059$), aunque tendió a ser mayor también a temperaturas más bajas en ese tratamiento (Figura 6.4 B). A -27°C el daño celular en hojas de *P. ligularis* varió entre 34 y 72%, sin diferencias significativas entre los tratamientos pero con tendencia a ser mayor en el tratamiento I+F y menor en el tratamiento I con respecto al control (Figura 6.4 B). El daño celular en las hojas de *P. speciosa* varió entre tratamientos y temperaturas, con interacción significativa entre ambas variables ($F_{(12,34)} = 2,86$ $p = 0,008$). El daño en las hojas de *P. speciosa* fue mayor en los tratamientos de fertilización e I+F con respecto al control a -27°C ($p = 0,014$ y $p = 0,034$) y a -20°C ($p < 0,001$ y $p = 0,008$) (Figura 6.4 C). También en esta especie el daño en las hojas fue mayor en el tratamiento F que en el control a -10 ($p = 0,006$) y a 0°C ($p = 0,002$) (Figura 6.4 C). A -27°C , el daño celular en hojas de *P. speciosa* fue mayor que a temperaturas más altas ($p < 0,0001$), siendo de aproximadamente un 20% en el control y en el tratamiento I, y cercano a 40% en los tratamientos F e I+F (Figura 6.4 C). Por su parte, en las hojas de *S. filaginoides* el daño celular varió significativamente entre tratamientos ($F_{(3,87)} = 11,2$ $p < 0,0001$) y entre temperaturas ($F_{(4,87)} = 36,4$ $p < 0,0001$), sin interacción significativa entre ambas variables ($F_{(12,75)} = 1,04$ $p = 0,42$). En esta especie el daño en las hojas fue mayor en el tratamiento de fertilización que en el control ($p < 0,001$), y fue mayor a -27°C que a temperaturas mayores ($p < 0,001$), variando entre 40 y 50% en los cuatro tratamientos (Figura 6.4 D).

El daño celular en tallos de *A. prolifera* fue significativamente diferente entre tratamientos ($F_{(3,92)} = 6,1$ $p = 0,0008$), pero no entre temperaturas ($F_{(4,88)} = 1,84$ $p = 0,13$). En los tallos de *A. prolifera* el daño fue mayor (aprox. 20%) en los tres tratamientos (F, I e I+F) que en el control ($p = 0,011$, $p < 0,001$ y $p = 0,004$, respectivamente) (Figura 6.4 E). En tallos de *A. volckmannii* y de *B. microphylla* el daño celular no varió significativamente entre tratamientos ($F_{(3,88)} = 1,74$ $p = 0,16$ y $F_{(3,90)} = 0,35$ $p = 0,79$, respectivamente), pero sí entre temperaturas ($F_{(4,91)} = 4,65$ $p = 0,002$ y $F_{(4,93)} = 11,3$ $p < 0,0001$, respectivamente). En ambas especies, el daño celular de los tallos fue mayor (20%) a -27°C que a -20°C ($p < 0,001$ y $p = 0,0007$,

respectivamente) (Figura 6.4 F-G). En *S. filaginoides* el daño celular en los tallos fue significativamente diferente entre temperaturas ($F_{(4,87)} = 5,17$ $p = 0,0009$) y entre tratamientos ($F_{(3,87)} = 3,91$ $p = 0,011$), sin interacción significativa entre ambas variables ($F_{(12,75)} = 1,54$ $p = 0,128$). En esta especie el daño celular en los tallos fue 40% a -27°C y ningún tratamiento se diferenció del control (Figura 6.4 H).

En las raíces de *P. ligularis* el daño celular fue diferente entre tratamientos y temperaturas, con interacción significativa entre ambos ($F_{(12,113)} = 2,31$ $p = 0,011$). A -27°C las raíces de *P. ligularis* exhibieron un 40% y un 60% más daño en los tratamientos F e I+F respectivamente, que en el control (Figura 6.4 I). En las raíces de *P. speciosa* el daño celular fue diferente entre tratamientos ($F_{(3,44)} = 14,7$ $p < 0,0001$) y entre temperaturas ($F_{(4,44)} = 65,5$ $p < 0,0001$), sin interacción significativa ($F_{(12,32)} = 0,59$ $p = 0,83$). Así, el daño fue mayor en los tratamientos F e I+F con respecto al control ($p < 0,001$ en ambos tratamientos), y el daño fue mayor a -27°C que a temperaturas mayores ($p < 0,0001$), siendo en los tratamientos F e I+F aproximadamente 60% mientras que en el control fue aproximadamente 50% a -27°C (Figura 6.4 J).

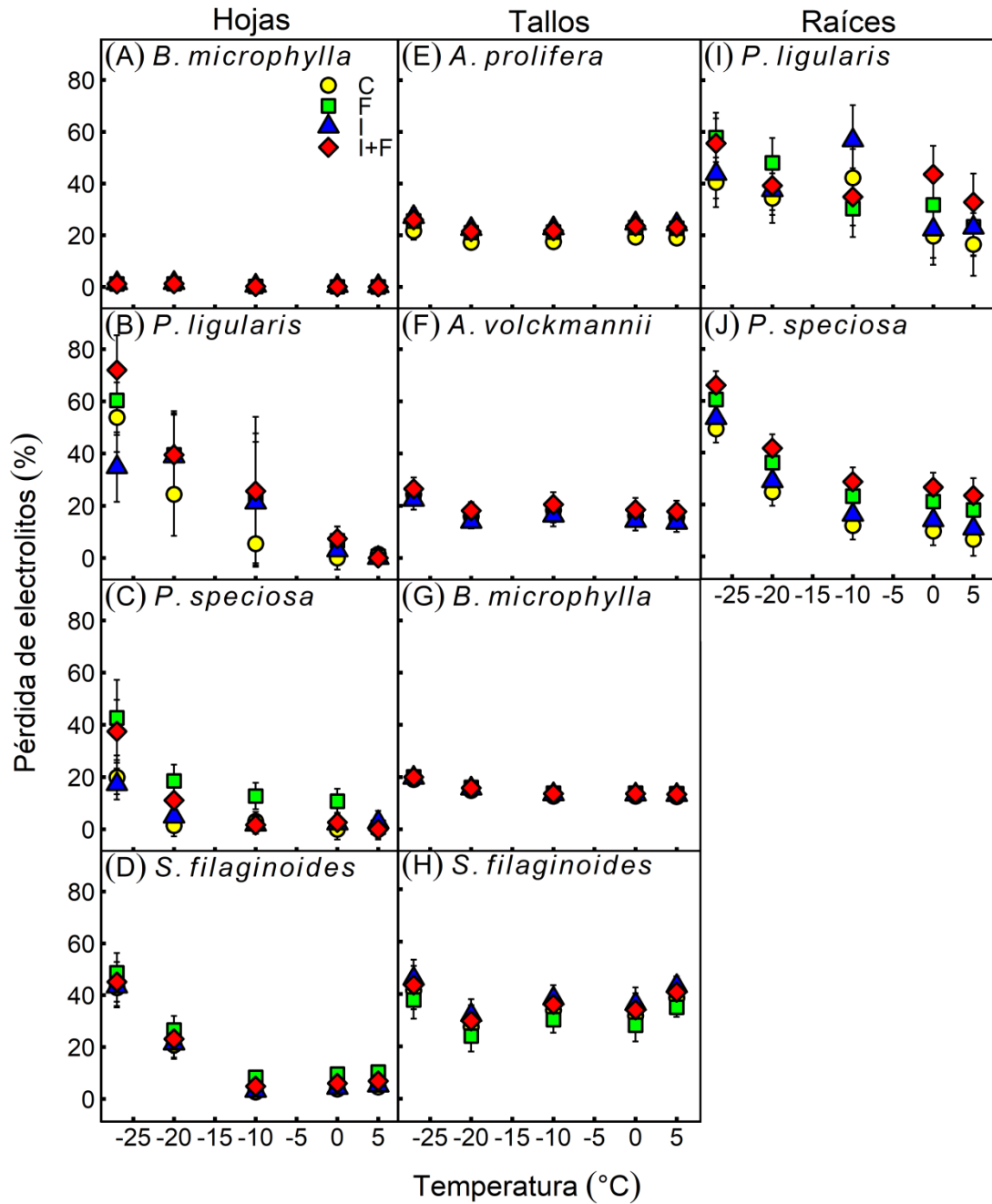


Figura 6.4. Pérdida de electrolitos (%) en hojas de (A) *Berberis microphylla*, (B) *Poa ligularis*, (C) *Pappostipa speciosa* y (D) *Senecio filaginoides*, en tallos de (E) *Azorella prolifera*, (F) *A. volckmannii*, (G) *B. microphylla* y (H) *S. filaginoides*, y en raíces de (I) *P. ligularis* y (J) *P. speciosa*, para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media \pm IC (n= 3-11).

6.4. DISCUSIÓN

La hipótesis planteada de que la fertilización aumenta la resistencia a las bajas temperaturas no fue validada por los resultados, ya que en algunas especies se observó el efecto opuesto, o bien ningún efecto del tratamiento. Así mismo la irrigación no aumentó la vulnerabilidad a las bajas temperaturas en ninguna de las especies analizadas, también rechazando la hipótesis.

El análisis térmico de las especies de pastos y arbustos de la estepa patagónica indicó que, independientemente del tratamiento, la temperatura de nucleación del hielo fue inferior a $-7,5^{\circ}\text{C}$, siendo sustancialmente menor en los pastos (-20°C). Esto significa que las especies de la estepa patagónica tienen una gran capacidad de super-enfriar sus tejidos. Estos valores podrían estar relativamente subestimados dado que cuando se realizan los análisis térmicos en hojas separadas de sus tallos, como en este estudio, la INT tiende a ser menor que en hojas adheridas a sus tallos (Zhang et al. 2016). Los valores de INT obtenidos en este estudio son consistentes con los encontrados por Zhang et al (2016) en algunas de las especies analizadas en el presente trabajo y donde se comparó la resistencia a bajas temperaturas entre especies arbustivas en los cañadones con las de las mesetas patagónicas.

En casi todas las especies y tratamientos un daño celular significativo (cerca del 50%) se produjo a temperaturas inferiores a la temperatura de nucleación del hielo. En *B. microphylla* el daño fue insignificante a la menor temperatura alcanzada en este estudio (-27°C). Similarmente, en un estudio previo realizado en la estepa patagónica por Scholz et al. (2012) se observó que *B. microphylla* casi no exhibe daño celular a -20°C y que en *S. filaginoides* es solo de un 25%. Estos resultados, donde la INT ocurre a temperaturas mayores que la temperatura donde se observa el 50% de daño celular, indican que todas las especies analizadas en el presente estudio tienen como mecanismo de resistencia a las bajas temperaturas la tolerancia al congelamiento extracelular. Zhang et al. (2016) también encontró que muchas especies de arbustos patagónicos son tolerantes aunque algunas tienen como mecanismo la evitación a través del super-enfriamiento, como *Acantholippia seriphoides*. Esta resistencia estaría explicada, al menos en parte, por la mayor rigidez de las paredes celulares durante el invierno (Scholz et al 2012; Zhang et al. 2016). Las diferencias en los umbrales de temperatura, tanto para el INT como para el daño celular, encontradas entre las especies podría ser explicada también por las diferencias inter-específicas en la elasticidad de las paredes

celulares, donde por ejemplo *B. microphylla* tiene paredes más rígidas que *S. filaginoides* (Capítulo IV de esta tesis; Scholz et al. 2012). A su vez, la capacidad de ajuste elástico entre verano e invierno también podría influir en la capacidad de super-enfriamiento. En el estudio realizado por Zhang et al. (2016), *B. microphylla*, quien fue una de las especies más resistente a las bajas temperaturas, fue quien presentó mayor ajuste elástico (paredes celulares más rígidas) entre verano e invierno.

En general, cuanto mayor es el diámetro de los conductos del xilema mayor es su vulnerabilidad al congelamiento, ya que es más probable que se formen burbujas de aire durante el proceso de descongelamiento (Cavender-Bares 2005; Feild & Brodrribb 2001). Así mismo, generalmente las raíces tienen conductos xilemáticos de mayor diámetro que otros órganos de la planta, lo cual podría favorecer la formación de embolismos durante el invierno (Cavender-Bares 2005; Feild & Brodrribb 2001; Martínez-Vilalta & Pockman 2002). Sin embargo, las raíces de las dos especies de pastos estudiadas presentaron una gran capacidad de super-enfriamiento demostrada por el INT ocurriendo a temperaturas entre -15 y -20°C. Sin embargo el 50% de daño celular, excepto en *P. speciosa* en el tratamiento I, fue alcanzado antes de -27°C. La resistencia de las raíces de estos pastos a las bajas temperaturas fue similar a la resistencia de las hojas. A pesar de que estas temperaturas no se observan en el suelo de la estepa patagónica, por lo cual las raíces estarían protegidas del daño celular por congelamiento, hay que tener en cuenta que los tratamientos de fertilización disminuyeron la resistencia al congelamiento. Hacke et al. (2010) encontraron que las plantas de *Populus* sp. presentan vasos xilemáticos de mayor tamaño cuando son fertilizadas con altas dosis de Nitrógeno que cuando se fertilizan con dosis menores. Probablemente la fertilización aumenta el diámetro de los vasos de las raíces debido a la mayor tasa de crecimiento, tornándolas más vulnerables a las bajas temperaturas. En un experimento de fertilización, Malyshev & Henry (2012) también encontraron un aumento en la vulnerabilidad al congelamiento de *Poa pratensis*. Esto también ha sido encontrado en otros pastos (Webster & Ebdon 2005; Welterlen & Watschke 1985). Consistente con los resultados presentes, una reducción de la resistencia al congelamiento en experimentos de fertilización ha sido observada en especies no gramíneas (Hellergren 1981; Kelley 1972; Puempel, Gaebel, & Tranquillini 1975; Smiley & Shirazi 2003). Una disminución en la resistencia al congelamiento, aunque no sea letal, podría afectar el crecimiento, la productividad y la supervivencia de las plantas

(Boorse, Ewers, & Davis 1998; Drake & Franks 2003; Malyshev & Henry 2012). Por esto, algunas especies como *P. ligularis* y *P. speciosa*, podrían ser más vulnerables cuando son fertilizadas.

Por otro lado un mayor contenido de solutos osmóticamente activos (compuestos nitrogenados y carbohidratos solubles) puede proveer protección a las membranas celulares (Lipp et al. 1994; Strauss & Hauser 1986). Las plantas aclimatadas al frío pueden sintetizar además otras moléculas crio-protectoras, como compuestos nitrogenados de bajo peso molecular (por ejemplo, osmotina, prolina, glicina betaína), que pueden ayudar a estabilizar las membranas celulares (D'Angeli & Altamura 2007; Fernández-Escobar, García-Novelo, & Restrepo-Díaz 2011). Un mayor contenido de solutos en el interior de las células podría aumentar la entrada de agua, disminuyendo así el contenido de agua apoplástica y, de este modo, la probabilidad de la formación del núcleo de hielo extracelularmente (Arias et al. 2015). Diversos estudios han observado un aumento en la tolerancia al congelamiento por efecto de la fertilización (Broschat 2010; DeHayes, Ingle, & Waite 1989; Sandli et al. 1993; Taulavuori et al. 2001), lo cual fue relacionado con mayor contenido de nitrógeno en sus tejidos (Sandli et al. 1993). Taulavuori et al. (1997) determinaron que el N extra fue metabolizado a compuestos crioprotectores. Sin embargo, en el presente estudio, el aumento de nitrógeno en las plantas en los tratamientos de fertilización (Capítulo V), tuvo un efecto adverso en algunos tejidos, al aumentar el daño celular tanto en las hojas como en las raíces de los pastos, en las hojas de *S. filaginoides* y en los tallos de *A. prolifera*.

En general mayor contenido de agua en los tejidos está relacionado con una menor resistencia al congelamiento, ya que a mayor volumen de agua aumenta la probabilidad de que un agente de nucleación de hielo pueda generar el núcleo de hielo (Wilson, Heneghan, & Haymet 2003). En algunos estudios se ha encontrado que las plantas expuestas a sequía aumentan su tolerancia al congelamiento (Kreyling et al. 2012; Navarrete-Campos et al. 2013; Arias 2015). Esto está relacionado con que la sequía genera respuestas metabólicas y fisiológicas similares a las que ocurren durante la aclimatación a bajas temperaturas (Coopman et al. 2010). En otros estudios comparando entre años secos y años húmedos se observó que la resistencia al congelamiento es mayor cuando la humedad del suelo incrementa (Pescador et al. 2018). Contrariamente, Sierra-Almeida, Reyes-Bahamonde, & Cavieres (2016) encontraron que el aumento en la disponibilidad de agua en el suelo a través de la

irrigación tiene efectos negativos sobre la resistencia al frío en plantas alpinas. Los resultados observados en el presente experimento demuestran que aunque el CRA incrementó en los tratamientos I e I+F no afectó la INT, excepto en las hojas y las raíces de *S. speciosa* donde INT y el nivel de daño incrementaron. Posiblemente, aunque el CRA incrementó hubo también una redistribución de agua entre los espacios apoplásticos y simplásticos manteniendo constante la INT. Así los resultados sugieren que un aumento en la disponibilidad de agua en el suelo no afecta la tolerancia al congelamiento de las especies analizadas. Sin embargo, en el caso de los pastos y si los incrementos en la disponibilidad de agua en el suelo son acompañados de un aumento en la fertilidad, su supervivencia podría verse afectadas negativamente.

6.5. CONCLUSIONES

La hipótesis planteada en este estudio establecía que la tolerancia a las bajas temperaturas aumenta con la adición de N al suelo, mientras disminuye con el incremento de las precipitaciones. Sin embargo, la hipótesis no fue validada por los resultados de este estudio, ya que la adición de N produjo un efecto opuesto en algunas especies, y en el tratamiento de irrigación no se observaron cambios en la vulnerabilidad a las bajas temperaturas. Todas las especies estudiadas tuvieron una capacidad alta de super-enfriar sus tejidos. La temperatura de nucleación de hielo en los tejidos ocurrió a temperaturas mayores que la temperatura donde se observó el 50% de daño celular, indicando que todas las especies analizadas en el presente estudio tienen como mecanismo de resistencia a las bajas temperaturas la tolerancia al congelamiento extracelular. Solo las especies de pastos disminuyeron su resistencia a las bajas temperaturas con la adición de nutrientes, pero igualmente continúan siendo muy tolerantes a las bajas temperaturas con márgenes de seguridad aún elevados.

Capítulo VII

**Efecto de la irrigación y de la
fertilización sobre el
crecimiento aéreo y
subterráneo de arbustos y
pastos**

Efecto de la irrigación y de la fertilización sobre el crecimiento aéreo y subterráneo de arbustos y pastos

7.1. INTRODUCCIÓN

La productividad primaria neta aérea es un atributo que integra aspectos importantes del funcionamiento de un ecosistema (McNaughton et al. 1989). En los ecosistemas áridos y semiáridos la producción primaria está fuertemente limitada por la disponibilidad de agua y de nutrientes (Le Houérou 1984; Milchunas & Lauenroth 1993; Sala et al. 1988; Skujins 1981; Yahdjian, Gherardi, & Sala 2011b), por lo que los cambios en estos factores modificarán las dinámicas de la vegetación y la productividad, alterando procesos importantes relacionados con el ciclo del C (Lauenroth, Dodd, & Sims 1978; Stevens et al. 2015; Wedin & Tilman 1996). Según sus requerimientos las plantas asignan los foto-asimilados a diferentes partes de la misma. Por ejemplo, si la disponibilidad de nutrientes es relativamente baja las plantas asignan más carbono a sus raíces de modo de aumentar la captura de nutrientes. Si esta limitación fuera aliviada a través de fertilización el patrón de asignación podría cambiar, favoreciendo el crecimiento aéreo a expensas del crecimiento de las raíces (Boot & Mensink 1990; Giardina et al. 2003; Gleeson 1993; Tingey, Johnson, & Phillips 2005). En un meta-análisis de experimentos con fertilización con Nitrógeno (N) en ecosistemas áridos a subhúmedos Yahdjian, Gherardi, & Sala (2011b) encontraron que la producción primaria neta aumenta con la adición de N y que el efecto es mayor con el aumento de las precipitaciones, independientemente de la forma de vida de las plantas y de la naturaleza del fertilizante aplicado. Es decir que los efectos del aumento de N sobre la estructura del ecosistema están fuertemente influenciados por la disponibilidad de agua (Harpole, Potts, & Suding 2007). La disponibilidad de agua afecta la disponibilidad de N en ecosistemas áridos, donde el contenido de N del suelo se reduce cuando la disponibilidad de agua aumenta (Reichmann, Sala, & Peters 2013).

Las respuestas de la productividad subterránea a la fertilización e irrigación en pastizales indican, en general, una reducción de la fracción fotosintética asignada a las raíces con aumento en la disponibilidad de agua (Fahnestock & Detling 1999) y de N

(Harpole, Potts, & Suding 2007; Shangguan et al. 2004). Sin embargo, otros autores (Gao et al. 2011; Li, Lin, & Taube 2011) encontraron un aumento en la producción de raíces en experimentos de irrigación, aunque coincidieron en la disminución en la producción de raíces bajo adición de N en un ecosistema semiárido. Experimentos de adición de nutrientes (N y P) en el norte de la Patagonia han indicado un incremento en la biomasa aérea, en particular de pastos perennes, sin cambios sobre la biomasa de raíces y la cantidad de materia orgánica del suelo (Kowaljow et al. 2010), lo que implica una mayor asignación a la producción de estructuras aéreas.

El aumento en la disponibilidad de agua produce un incremento, en general, de la productividad primaria neta aérea y subterránea en estepas templadas (Austin & Sala 2002; Bai et al. 2008; Gao et al. 2011). Austin & Sala (2002) encontraron un incremento lineal de la productividad primaria neta aérea (PPNA) a lo largo de un gradiente de precipitación en Patagonia. Consistente con esto, experimentos de manipulación de agua han encontrado una relación causal entre la disponibilidad de agua y la PPNA (Chou et al. 2008; Yahdjian & Sala 2006). Sin embargo, en algunos casos la limitación por N restringe el efecto del aumento de la PPNA con la disponibilidad de agua (Austin & Sala 2002; Hooper & Johnson 1999).

La mayoría de los estudios sobre productividad primaria se han enfocado sobre la biomasa aérea sin prestar demasiada atención a lo que sucede con la biomasa subterránea. Sin embargo, las raíces son una parte importante de la vegetación desde un punto de vista estructural y funcional (Carrera & Bertiller 2010; Fox 2000; Oñatibia et al. 2010; Pereyra et al. 2017; Reyes & Aguiar 2017b, 2018; Soriano, Golluscio, & Satorre 1987a). A lo largo de un gradiente de disponibilidad de agua, desde un desierto con 100 mm de precipitación hasta un bosque templado con 800 mm de precipitación, Austin & Sala (2002) encontraron que la razón entre la biomasa subterránea y la biomasa aérea varía de 2,2 en la porción más árida a 0,44 en la más húmeda. Esto resalta la importancia y la contribución que la biomasa radical tiene sobre el funcionamiento del ecosistema.

Además de los cambios en la biomasa y crecimiento de la vegetación por efecto de los cambios en la disponibilidad de agua y de N, la composición de especies y las interacciones pueden cambiar con la disponibilidad de recursos (Bustamante et al. 2012; Lannes et al. 2016; McLendon & Redente 1991; Wedin & Tilman 1996). Por ejemplo,

se ha observado que la cobertura de arbustos aumenta cuando la precipitación media anual disminuye y la precipitación de invierno aumenta, mientras que la cobertura de pastos aumenta cuando la precipitación aumenta (Golluscio, Sigal Escalada, & Pérez 2009; Kowaljew & Fernández 2011; Paruelo et al. 1998b). Por otra parte, resultados de estudios en ecosistemas semiáridos indican que la adición de N incrementa la riqueza de especies y la diversidad de especies de la comunidad (Chalcraft et al. 2008; Gutierrez & Whitford 1987).

El objetivo de este trabajo fue determinar los efectos de la adición de agua y de N al suelo sobre el crecimiento de la biomasa aérea y subterránea de pastos y arbustos en la estepa patagónica. La **hipótesis** propone que las plantas expuestas a mayor disponibilidad de agua y de nutrientes tienen mayores tasas de crecimiento de la biomasa aérea y reducción en el crecimiento de la biomasa subterránea. El estrés nutricional e hídrico son los principales limitantes de la productividad. Mayor fertilidad y oferta de agua incrementaría el área foliar, la concentración de nutrientes y la asimilación total de carbono, incrementando la fracción fotosintética asignada a la parte aérea y reduciendo la fracción asignada a las raíces. Para responder al objetivo se realizó un experimento a campo de manipulación de agua y de N que constó de un control (C), un tratamiento de fertilización (F), otro de irrigación (I) y otro de I+F, tal como el descrito en el Capítulo I.

7.2. MATERIALES Y MÉTODOS

7.2.1. Crecimiento aéreo y PPNA

Para determinar el crecimiento de los pastos se calculó la altura máxima (incluyendo la porción reproductiva) y el perímetro basal de los pastos *Poa ligularis* y *Pappostipa speciosa*. Dado que luego de 5 años de iniciados los tratamientos se observó un número elevado de individuos de *Pappostipa humilis* en las parcelas de los tratamientos de fertilización e I+F, también se analizó esta especie. En las parcelas control y en las irrigadas no se encontró un número adecuado de individuos de *P. humilis* para considerar su muestreo y posterior análisis estadístico. Las determinaciones se realizaron en diciembre de 2018 en individuos que fueron seleccionados

aleatoriamente en cada parcela con el método del cuadrante, con un mínimo de tres individuos ($n = 3$ a 5) de cada especie por parcela ($n = 5$) y tratamiento (C, F, I e I+F).

Para determinar el crecimiento de los arbustos en 2015 se marcaron tres individuos de cada especie (*Azorella prolifera*, *Adesmia volckmannii* y *Senecio filaginoides*) por parcela. Luego en diciembre de cada año (2015, 2016, 2017 y 2018) se midió la altura y el diámetro mayor y perpendicular de cada individuo. *Berberis microphylla* no fue incluida en este análisis debido a que los individuos suelen estar agrupados formando matorrales. Cuando se observaron individuos muertos de un año al siguiente, se registró para determinar el número de plantas muertas por año, y se marcaron y midieron nuevos individuos. Para determinar el diámetro mayor y perpendicular de cada individuo se tomaron fotografías de la parte superior del canopeo identificando un objeto a modo de escala, y se analizaron las imágenes con el programa ImageJ (Ferreira & Rasband 2012). A partir de la altura y el diámetro mayor y perpendicular se estimó la biomasa de cada individuo aplicando relaciones alométricas estimadas por Oñatibia et al. (2010) para las mismas especies y en un área cercana a la del presente estudio. Las ecuaciones utilizadas fueron las siguientes:

$$b = 0,000003 \times dh^{3,9321} \text{ para } A. \textit{prolifera}$$

$$b = 0,0002 \times dh^{3,1402} \text{ para } A. \textit{volckmannii}$$

$$b = 0,0002 \times dh^{3,1876} \text{ para } S. \textit{filaginoides}$$

donde b es la biomasa aérea estimada (g) y dh es el diámetro promedio entre el mayor y su perpendicular más la altura de la planta (cm). El crecimiento anual se determinó como el cambio en la biomasa estimada entre años consecutivos.

Para determinar la PPNA de las gramíneas se utilizó un cuadrante de 50 x 50 cm (Figura 7.1) el cual fue lanzado al azar en cada parcela, teniendo en cuenta que si caía sobre un arbusto se lanzaba de nuevo para evitar a los arbustos en las muestras debido a la dificultad de estimar el crecimiento anual de este grupo funcional a través de este método. Todo el material vegetal fue recortado en su base y trasladado al laboratorio donde se separó el material verde, el material seco y la broza, sin diferenciar el material vegetal por especie. Luego el material se secó en estufa a 70°C por 72 h. Se excluyeron los cactus y las dicotiledóneas herbáceas del análisis debido a su baja representatividad en las muestras. Los pastos perennes conforman el grupo funcional más abundante en la

estepa patagónica, contribuyendo en un 67% a la PPNA de este sistema (Fernández, Sala, & Golluscio 1991). Luego, el material se pesó y se determinó la productividad como la cantidad de biomasa de cada tipo dividido la superficie del cuadrante en cada año, expresada en g m^{-2} . Se determinó la productividad en diciembre de 2013 (corresponde al año de inicio de los tratamientos) y en diciembre de 2017. Sala & Austin (2000) determinaron que este método de estimación de la PPNA en pastizales con marcada estacionalidad, consistiendo en una única cosecha anual, es el que menos errores introduce.



Figura 7.1. Foto del cuadrante de 50 x 50 cm utilizado para estimar la PPNA de pastos de la estepa patagónica.

7.2.2. Crecimiento subterráneo

En mayo de 2015 (previo al inicio de la estación de crecimiento) se enterraron 8 trampas por parcela (5 por cada tratamiento) para cuantificar el crecimiento de raíces nuevas. Las trampas fueron colocadas alrededor de un parche de vegetación que contenía una mezcla de arbustos y pastos representativa del área ya que estos sitios contienen mayor cantidad de raíces que en el suelo desnudo entre parches (ver Figura

2.3, Capítulo II), y así asegurar una rápida colonización del suelo dentro de las trampas. Las trampas consistieron de tubos plásticos de 6 cm de longitud x 4 cm de diámetro que presentaban perforaciones de 10 mm² distribuidas uniformemente en toda su superficie (Figura 7.2). Para la colocación de las trampas se realizaron perforaciones en el suelo de 10 cm, de modo que las trampas quedaron colocadas entre los 4 y los 10 cm de profundidad (ver Reyes & Aguiar 2017). Cada trampa fue rellena con la tierra quitada del mismo lugar, tamizada para quitar las piedras y raíces; también se relleno con tierra el espacio entre la trampa y la tierra circundante de modo que quedaran en íntimo contacto para permitir la colonización de raíces. Así, cada trampa contenía un volumen de suelo de 75,4 cm³. Cada trampa fue retirada en diferente momento, cada 1-3 meses a lo largo de un año, desde el momento en que fueron colocadas en el suelo. Para quitar las trampas del suelo luego del periodo establecido, se insertó un tubo metálico alrededor de cada trampa para cortar las raíces, y luego se extrajo la misma con el suelo en su interior. Cada muestra fue pasada por un tamiz de 3 mm y las raíces se lavaron para quitarles cualquier resto de tierra. Luego se secaron en estufa a 70°C durante 48 h y se pesaron, sin identificar la especie a la que pertenecían. Se expresó la biomasa de raíces en gramos de raíces por superficie de suelo (m²).



Figura 7.2. Foto de una trampa para raíces colocada en el suelo cerca de pastos y arbustos en la estepa patagónica.

7.2.3. Cobertura vegetal e índices de biodiversidad

Se determinó el cambio en la cobertura de plantas entre 2012 (previo al inicio de los tratamientos) y 2018 mediante el método de punto de intercepción (Matteucci & Colma 1982). Para ello se determinó la especie presente cada un metro a lo largo de las dos diagonales de cada parcela. Posteriormente se calculó el porcentaje de cada especie o de suelo desnudo en cada parcela y en cada año. Cabe señalar que no se consideraron las especies herbáceas efímeras, que solo están presentes, principalmente, durante octubre y noviembre.

Con los datos de cobertura vegetal estimados en 2018 en cada parcela se determinaron diferentes índices de biodiversidad. La biodiversidad incluye dos variables importantes: la riqueza de especies y la abundancia relativa de especies. El índice de Margalef (D_{Mg}) mide el número de especies por número de matas (Margalef 1969). Su fórmula es:

$$D_{Mg} = S - 1 / \ln N$$

donde S es el número de especies y N es el número total de individuos o matas.

El índice de dominancia de Simpson (D_{Si}) considera la representatividad de las especies con mayor valor de importancia y varía entre 0 y 1 (Simpson 1949). Su fórmula es:

$$D_{Si} = \sum p_i^2$$

donde p_i es la abundancia proporcional de la especie i (calculada como el número de individuos o matas de la especie i dividido por el número total de individuos o matas de la muestra). Su cálculo está fuertemente determinado por la importancia de las especies más dominantes, por lo que valores más cercanos a 1 indican dominancia de alguna o algunas especies sobre otras.

El índice de Shannon (H) expresa la uniformidad de los valores de abundancia entre todas las especies de una muestra, y contempla tanto la riqueza de especies como la abundancia relativa de cada especie (Shannon y Weaver 1949). Su fórmula es:

$$H = - (\sum p_i \ln p_i)$$

donde p_i es la abundancia proporcional de la especie i (calculada como el número de individuos o matas de la especie i dividido por el número total de individuos o matas de la muestra). H adquiere valores entre 0, cuando hay una sola especie en la muestra, hasta el logaritmo neperiano de S , donde todas las especies están igualmente representadas (distribución uniforme o equitativa). Este índice asume que todos los individuos son escogidos al azar y que todas las especies están representadas en la muestra.

El índice de Pielou (J') muestra el grado de uniformidad o equitatividad en la muestra, y mide la relación entre la diversidad observada en relación a la máxima diversidad esperada (Pielou 1975). Su fórmula es:

$$J' = H / H_{\max}$$

donde H_{\max} es el logaritmo neperiano de S . Su valor oscila entre 0 y 1, de manera que 1 indica máxima equitatividad, donde todas las especies son igualmente abundantes.

7.2.4. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software R versión 3.4.4 (R Development Core Team, 2018). Para evaluar las diferencias entre tratamientos en la altura y el perímetro basal de los pastos, se separó a *P. humilis* del análisis debido a la falta de datos en los tratamientos control y de irrigación. Para evaluar el efecto del tratamiento (variable explicativa) sobre la altura y el perímetro basal de los pastos (*P. ligularis* y *P. speciosa*), se testeó un GLS con test-F, con la especie como co-variable, y con estructura de correlación de simetría compuesta (corCompSymm entre parcelas), pero este factor no fue significativo (prueba REML: $\chi^2 = 2,12$, $df = 1$, $p = 0,14$ para la variable “altura” y $\chi^2 = 0,02$, $df = 1$, $p = 0,88$ para la variable “perímetro”, por lo cual se eliminó de ambos modelos. Se utilizaron GLSs para evaluar el efecto de la interacción entre tratamiento, especie y año (variables explicativas) sobre el crecimiento anual de arbustos (variable dependiente), con estructura de correlación temporal entre años para cada muestra (corAR1) pero este factor no fue significativo (prueba REML: $\chi^2 = 1,44$, $df = 1$, $p = 0,23$, por lo cual se eliminó del modelo. Para evaluar el efecto de la interacción entre tratamiento, especie y año sobre el número de plantas muertas, se testeó un modelo lineal generalizado (GLM) con distribución binomial y con test- χ^2 . Se

usaron modelos lineales ajustados de mínimos cuadrados (GLSs) con test-F para evaluar el efecto de la interacción entre tratamiento y fecha (variables explicativas) sobre la densidad de raíces (variable dependiente), con estructura de correlación temporal entre fechas para cada parcela (corAR1), pero este factor no fue significativo (prueba REML: $\chi^2 = 0,13$, $df = 1$, $p = 0,72$, por lo cual se eliminó del modelo. Para evaluar el efecto de la interacción entre tratamiento y año (variables explicativas) sobre la productividad verde (variables dependientes), se usaron LMs con test-F. Se testearon MLs para evaluar el efecto del tratamiento (variable explicativa) sobre cada tipo de cobertura (variables dependientes) en cada año. Para evaluar el efecto del tratamiento (variable explicativa) sobre los diferentes índices de biodiversidad (variables dependientes), se testearon LMs. Los GLSs se llevaron a cabo utilizando la función “gls” del paquete de R “nlme” versión 3.1-131.1 (Pinheiro y Bates 2000). Los GLMs se llevó a cabo utilizando la función “glm” del paquete de R “lme4” versión 1.1-15 (Bates et al 2014). Cuando fue necesario, todos los modelos se ajustaron mediante modelos de varianza; la selección del modelo se basó en el criterio de información de Akaike (AIC) (Burnham y Anderson 2002). La simplificación de los efectos fijos de los modelos MLs y GLSs para alcanzar el modelo mínimo adecuado se llevó a cabo mediante una prueba de hipótesis (test-F). La simplificación del modelo GLM para alcanzar el modelo mínimo adecuado se llevó a cabo con el test χ^2 . El análisis post-hoc de Tukey se utilizó para comparaciones múltiples en todos los modelos cuando el test-F fue significativo, utilizando la función “glht” del paquete de R “multcomp” versión 1.4-8 (Bretz et al. 2010). Cuando se hicieron comparaciones entre tratamientos, solo se comparó cada tratamiento (F, I o I+F) con respecto al control. Para graficar los resultados del modelo mejor ajustado, se utilizó el paquete de R “visreg” versión 2.5-0 (Breheny y Burchett 2017).

7.3. RESULTADOS

7.3.1. Crecimiento aéreo y PPNA

La altura de las matas de *P. ligularis* y de *P. speciosa* fue diferente entre tratamientos y entre especies, con interacción significativa entre ambos ($F_{(3,114)} = 12,45$, $p < 0,0001$). La altura de las matas de *P. ligularis* fue menor en el tratamiento F que en el control ($p = 0,021$), mientras que en *P. speciosa* la altura fue mayor en los

tratamientos F ($p = 0,05$) e I+F ($p = 0,001$) respecto al control (Figura 7.3 A). La altura de las matas de *P. speciosa* fue mayor que la de las matas de *P. ligularis* solo en los tratamientos F e I+F ($p < 0,0001$ en ambos tratamientos) (Figura 7.3 A). El perímetro basal de las matas de *P. ligularis* y *P. speciosa* fue diferente entre los tratamientos ($F_{(3, 117)} = 6,47, p = 0,0004$) y entre las especies ($F_{(1,117)} = 12,52, p = 0,0006$), sin interacción significativa entre ambos ($F_{(3,114)} = 1,05, p = 0,372$). El perímetro basal fue menor en los pastos en el tratamiento F con respecto al control ($p = 0,029$), y fue mayor en las matas de *P. speciosa* que en las de *P. ligularis* ($p = 0,0004$) (Figura 7.3 B). La altura y el perímetro basal de las matas de *P. humilis*, que solo fue estudiada en los tratamientos F e I+F debido a la ausencia de individuos de esa especie en el control y en el tratamiento I, fueron similares entre ambos tratamientos ($F_{(1,30)} = 1,33 p = 0,26$ para la altura, y $F_{(1,30)} = 1,07 p = 0,31$ para el perímetro basal) (Figura 7.3 A-B).

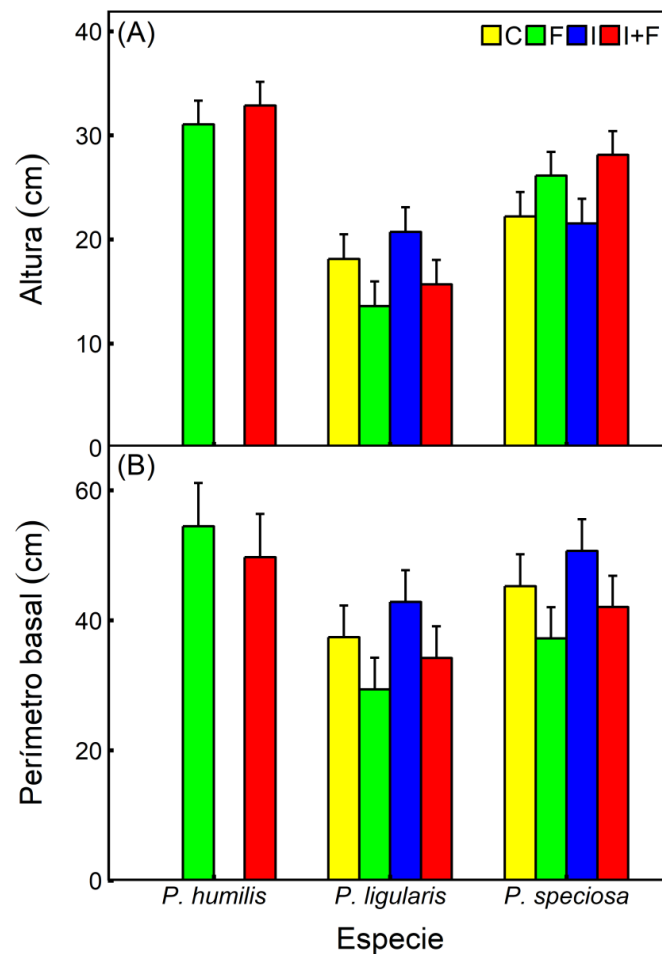


Figura 7.3. (A) Altura (cm) y (B) perímetro basal de pastos (*Pappostipa humilis*, *Poa ligularis* y *Pappostipa speciosa*) en diciembre 2018 para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Las barras representan la media +IC (n= 15).

El crecimiento de los arbustos varió significativamente entre los tres años analizados, entre los tratamientos y entre las tres especies, con interacción significativa entre año y especie ($F_{(1,30)} = 0,51, p = 0,048$) y entre tratamiento y año ($F_{(6,428)} = 4,51, p = 0,0002$). El crecimiento de *A. prolifera* y de *A. volckmannii* fue mayor en el periodo 2016-2017 (correspondiente a un año húmedo, con 233 mm) que en los otros dos periodos (2015-2016: 118 mm, 2017-2018: 108 mm) (Figura 7.4). El crecimiento en el tratamiento de fertilización fue mayor con respecto al control en el periodo 2016-2017 (y el tratamiento I+F tendió a ser mayor que en control en este periodo pero no fue significativo), y el crecimiento en el tratamiento I+F fue menor que en el control en el periodo 2017-2018 (Figura 7.4). Además, el crecimiento en los tratamientos F e I+F fue mayor en el periodo 2016-2017 que en los otros dos periodos, y en el control el crecimiento fue mayor en el periodo 2016-2017 y en 2017-2018 que en 2015-2016 (Figura 7.4).

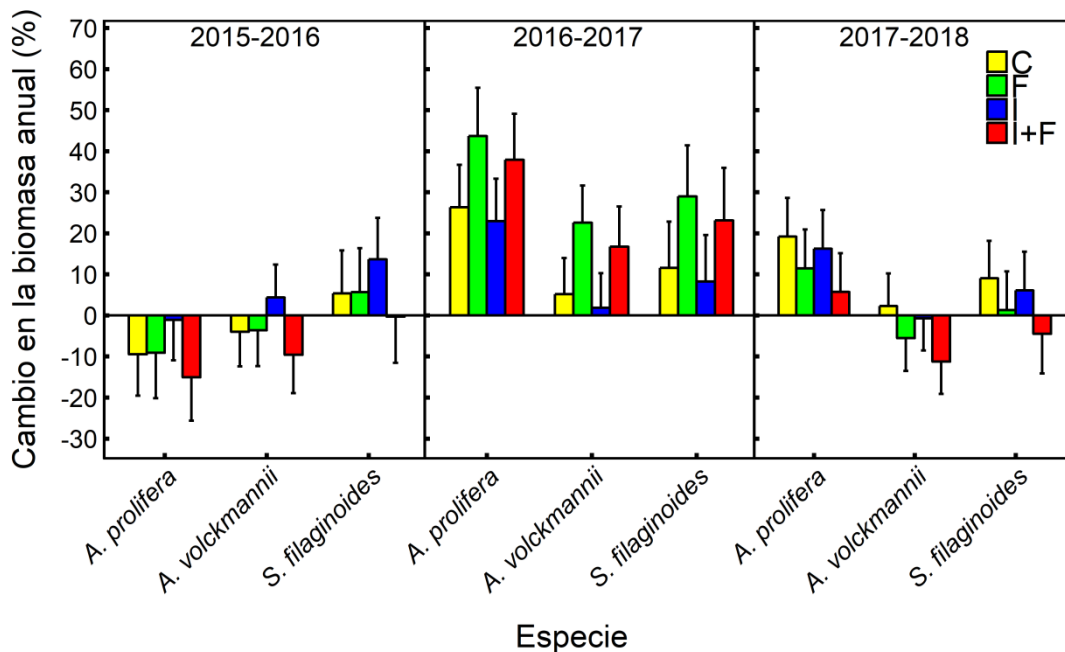


Figura 7.4. Cambio en la biomasa anual (%) en tres períodos tiempo (2015-2016, 2016-2017 y 2017-2018) de tres especies de arbustos (*Azorella prolifera*, *Adesmia volckmannii* y *Senecio filaginoides*) para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Las barras representan la media \pm IC (n= 15).

El porcentaje de plantas que se murieron de una estación de crecimiento a la siguiente fue diferente entre tratamientos, especies y periodos, con interacción significativa entre tratamiento y especie ($\chi^2_{(6)} = 16,82, p = 0,01$) y entre especie y periodo ($\chi^2_{(4)} = 10,12, p = 0,038$). El porcentaje de plantas muertas de *A. prolifera* fue mayor en el tratamiento F con respecto al control, y en *S. filaginoides* fue mayor en el tratamiento I+F que en el control (Figura 7.5). El porcentaje de plantas muertas de *S. filaginoides* en el periodo 2015-2016 fue mayor que en 2017-2018 (Figura 7.5). No se encontraron plantas muertas de *A. volckmannii* en el periodo 2016-2017 en ningún tratamiento, ni de *A. prolifera* en el periodo 2017-2018 (Figura 7.5). En el tratamiento de irrigación solo se encontraron plantas muertas de *S. filaginoides* (Figura 7.5).

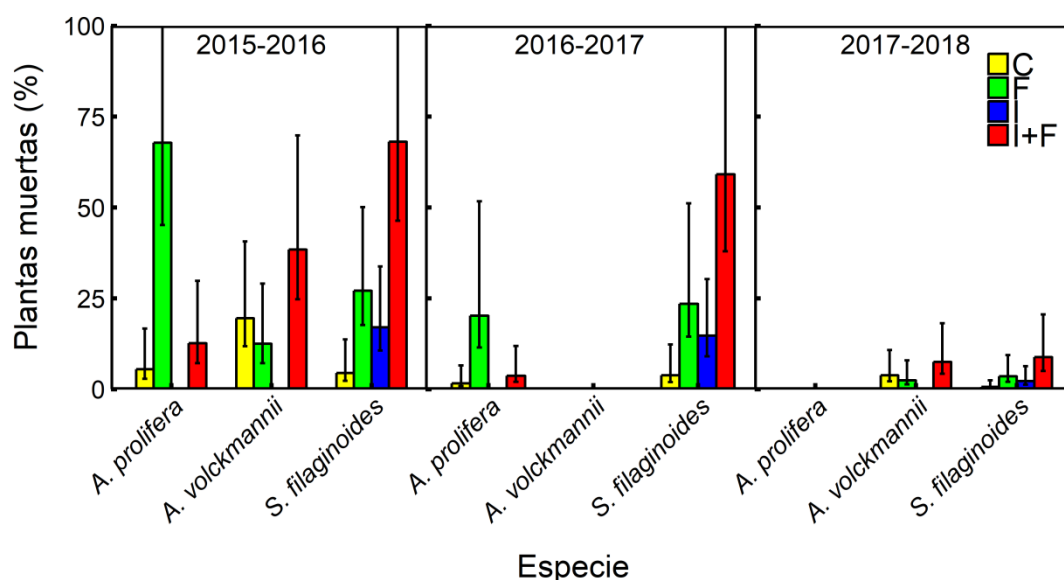


Figura 7.5. Plantas muertas (%) en tres períodos tiempo (2015-2016, 2016-2017 y 2017-2018) de tres especies de arbustos (*Azorella prolifera*, *Adesmia volckmannii* y *Senecio filaginoides*) para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Las barras representan la media \pm IC.

La productividad primaria neta aérea (PPNA) de los pastos fue diferente entre tratamientos y años, con interacción significativa entre ambos ($F_{(3,42)} = 4,52, p = 0,008$). En 2013, cuando se iniciaron los tratamientos de fertilización e irrigación, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos en la PPNA, mientras que en 2017 la PPNA fue mayor en los tratamientos de fertilización e I+F que en el control (Figura 7.6).

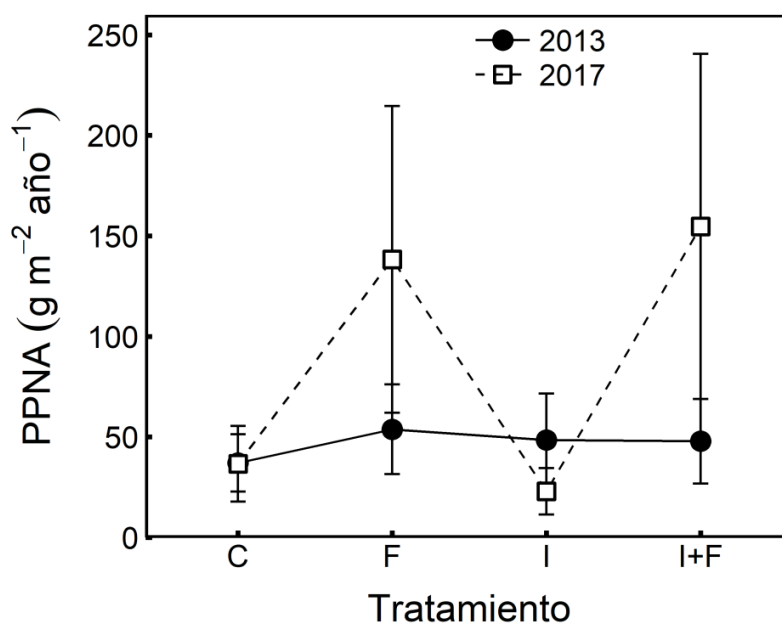


Figura 7.6. Productividad primaria neta aérea ($\text{g m}^{-2} \text{año}^{-1}$) en (A) 2013 y (B) 2017, para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Los símbolos representan la media \pm IC ($n = 5-9$).

7.3.2. Crecimiento subterráneo

La biomasa de raíces en las trampas varió entre tratamientos y entre meses, con interacción significativa entre ambos ($F_{(21,128)} = 1,83, p = 0,022$). La biomasa de raíces fue máxima entre noviembre y febrero, y después fue disminuyendo (Figura 7.7). En el tratamiento de fertilización la biomasa de raíces fue en general menor que en el control aunque solo se detectaron diferencias marginales en octubre y noviembre de 2015 ($p =$

0,06 y $p = 0,08$, respectivamente) (Figura 7.7). El tratamiento de I+F no tuvo efecto significativo sobre la biomasa de raíces, aunque hubo tendencia a ser menor que en el control a partir de octubre de 2015 (Figura 7.7). La biomasa de raíces en el tratamiento de irrigación no fue diferente al control en ningún mes (Figura 7.7).

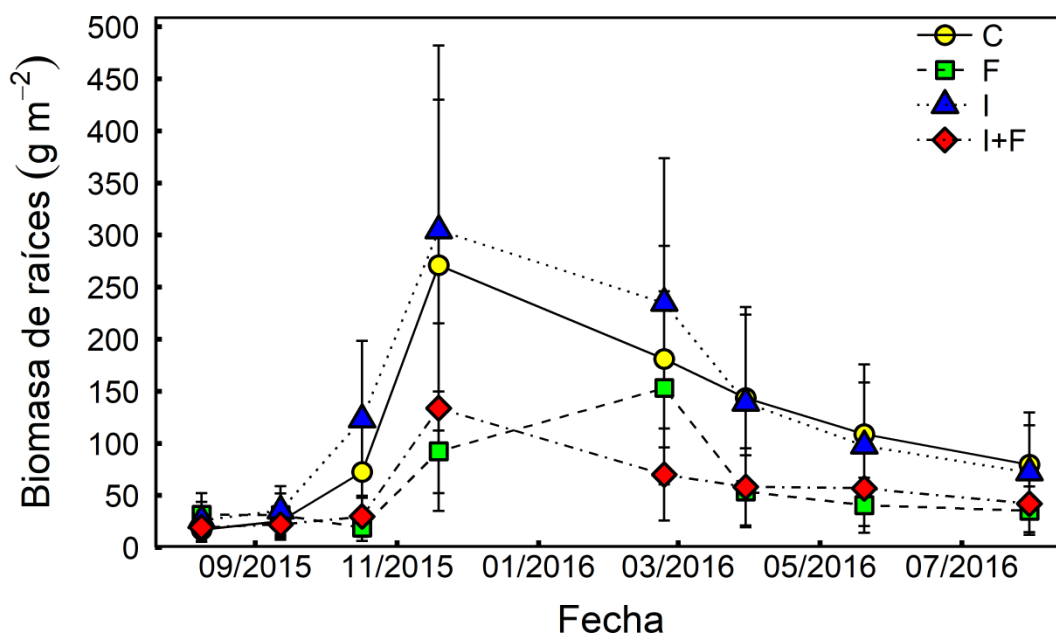


Figura 7.7. Biomasa de raíces (g m^{-2}) en trampas de raíces entre agosto 2015 y agosto 2016 para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. Las trampas de raíces fueron colocadas en el suelo en mayo 2015. Los símbolos representan la media \pm IC ($n = 5$).

7.3.3. Cobertura vegetal e índices de biodiversidad

La cobertura vegetal en 2012 (previo al inicio del experimento) no fue significativamente diferente entre las parcelas ($p > 0,05$), con un rango de cobertura de pastos de entre 22 y 47%, de arbustos de entre 12 y 43% y de suelo desnudo de entre 21 y 44%. La cobertura vegetal en 2018 no varió significativamente entre tratamientos en cobertura total, cobertura solo de arbustos, cantidad de suelo desnudo, y en cobertura de cada una de las especies arbustivas analizadas (*A. prolifera*, *B. microphylla* y *S. filaginoides*) (Tabla 7.1 y Figura 7.8). El tratamiento de fertilización tuvo efectos significativos sobre la cobertura de pastos en 2018, siendo la cobertura menor en el

tratamiento F con respecto al control ($p = 0,031$) (Tabla 7.1 y Figura 7.8). El porcentaje de cobertura de muerto en pie y de *A. volckmannii* variaron significativamente entre tratamientos (Tabla 7.1), pero ningún tratamiento fue significativamente diferente del control ($p >0,05$) (Figura 7.8). La cobertura de *P. ligularis* disminuyó en los tratamientos de fertilización ($p <0,001$), irrigación ($p = 0,028$) e irrigación-fertilización ($p <0,001$), con respecto al control (Figura 7.8). La cobertura de *P. speciosa* disminuyó significativamente en el tratamiento de fertilización con respecto al control ($p = 0,019$) (Figura 7.8). La cobertura de *P. humilis* aumentó significativamente en los tratamientos F ($p = 0,0003$) e I+F ($p <0,0001$) con respecto al control (Figura 7.8).

Tabla 7.1. Resultados de los test-F para el efecto del tratamiento sobre la cobertura vegetal en 2018 para cada tipo de cobertura. Se muestran el valor estadístico F, los grados de libertad (df) y el valor de probabilidad p .

Tipo de cobertura	Test-F
Cobertura total	$F_{(3,16)} = 1,17$ $p = 0,35$
Arbustos	$F_{(3,16)} = 1,98$ $p = 0,16$
Pastos	$F_{(3,16)} = 3,32$ $p = \mathbf{0,047}$
Muerto en pie	$F_{(3,16)} = 3,89$ $p = \mathbf{0,029}$
Suelo desnudo	$F_{(3,16)} = 0,71$ $p = 0,56$
<i>Azorella prolifera</i>	$F_{(3,16)} = 0,71$ $p = 0,56$
<i>Adesmia volckmannii</i>	$F_{(3,16)} = 4,12$ $p = \mathbf{0,024}$
<i>Berberis microphylla</i>	$F_{(3,16)} = 1,56$ $p = 0,24$
<i>Poa ligularis</i>	$F_{(3,16)} = 11,10$ $p = \mathbf{0,0003}$
<i>Pappostipa humilis</i>	$F_{(3,16)} = 24,70$ $p < \mathbf{0,0001}$
<i>Pappostipa speciosa</i>	$F_{(3,16)} = 5,74$ $p = \mathbf{0,0073}$
<i>Senecio filaginoides</i>	$F_{(3,16)} = 1,51$ $p = 0,25$

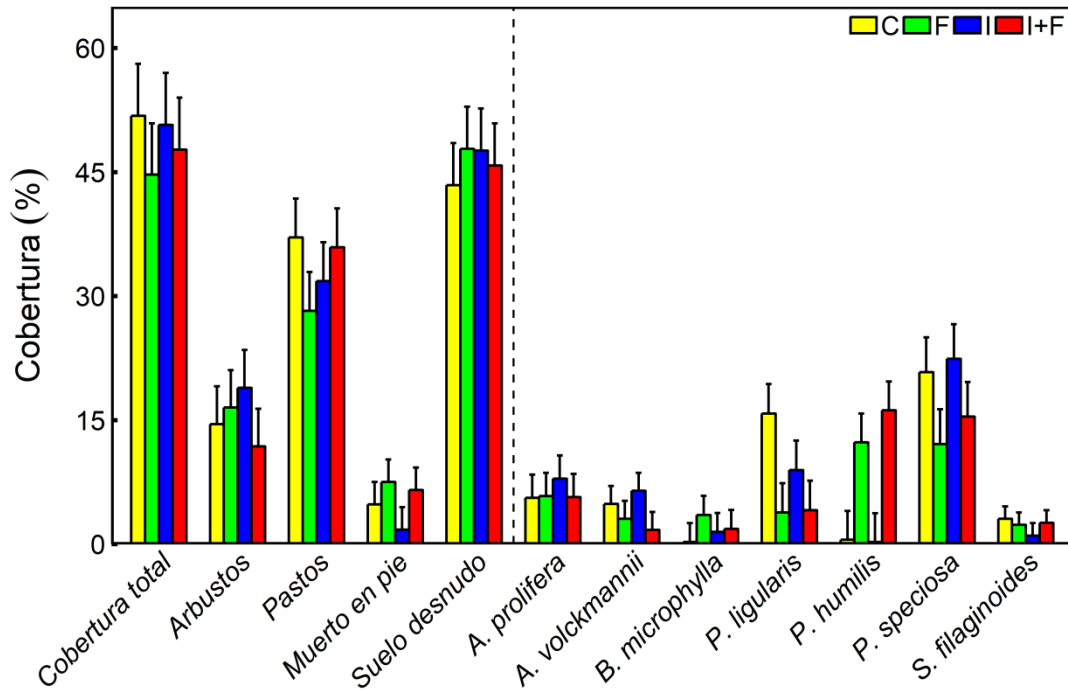


Figura 7.8. Cobertura vegetal (%) en 2018 para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F) en una estepa patagónica. La línea punteada separa a la izquierda la cobertura total, de arbustos, de pastos, de muerto en pie y de suelo desnudo, y a la derecha la cobertura detallada por especie. Los símbolos representan la media \pm IC (n= 5).

En la tabla 7.2 se muestran los diferentes índices de biodiversidad para cada tratamiento. El índice de Margalef fue marginalmente mayor en las parcelas fertilizadas con respecto al control ($p = 0,09$) indicando un aumento en la biodiversidad. Por otra parte, el índice de Simpson fue menor a 0,5 en todos los tratamientos, lo cual indicó falta de dominancia de alguna especie, y a su vez en las parcelas fertilizadas el índice fue marginalmente menor que en el control ($p = 0,057$). El índice de Shannon-Wiener aumentó marginalmente en el tratamiento de fertilización ($p = 0,059$), sugiriendo una distribución más uniforme. El índice de Pielou o de equitatividad varió entre 0,79 y 0,86 en los tratamientos, lo cual indica una equitatividad alta, y no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Tabla 7.2. Índices de biodiversidad: índice de Margalef (D_{Mg}), índice de Simpson (D_{Si}), índice de Shannon-Wiener (H) e índice de Pielou (J'), para cada tratamiento: control (C), fertilización (F), irrigación (I) e irrigación-fertilización (I+F), en una estepa patagónica. Cada valor representa la media + IC ($n = 5$). Se muestran los resultados de los test estadísticos para el efecto del tratamiento sobre cada índice de biodiversidad. Se muestra el valor estadístico F, los grados de libertad entre paréntesis y el valor de probabilidad p .

Índices de biodiversidad	Tratamiento				Test estadístico
	C	F	I	I+F	
D_{Mg}	1,35 (0,30)	1,69 (0,14)	1,34 (0,30)	1,50 (0,21)	$F_{(3,16)} = 2,6$ $p = 0,088$
D_{Si}	0,30 (0,06)	0,23 (0,03)	0,29 (0,05)	0,27 (0,04)	$F_{(3,16)} = 2,8$ $p = 0,073$
H	1,42 (0,19)	1,67 (0,12)	1,45 (0,18)	1,51 (0,16)	$F_{(3,16)} = 2,58$ $p = 0,089$
J'	0,79 (0,08)	0,86 (0,03)	0,83 (0,05)	0,81 (0,06)	$F_{(3,16)} = 1,67$ $p = 0,213$

7.4. DISCUSIÓN

7.4.1. Efectos de los tratamientos sobre el crecimiento y la PPNA

La PPNA de las gramíneas perennes en las parcelas control fue similar a la estimada para otras estepas semiáridas (Bai et al. 2004; Gao et al. 2011; Swindon, Burke, & Lauenroth 2019). El rango de valores de PPNA de los pastos en las parcelas control de este estudio ($18-55 \text{ g m}^{-2} \text{ año}^{-1}$) son semejantes a los reportados por Jobbágy & Sala (2000) para la estepa patagónica y que incluyen la PPNA de pastos de 15 años ($11-49 \text{ g m}^{-2} \text{ año}^{-1}$). Los resultados del presente estudio indicaron un aumento en la PPNA de los pastos con la adición de fertilizante incluyendo N y P, pero sin respuesta a la adición de agua luego de 4 años de iniciado el experimento, el cual incrementó las entradas de agua en un 20-25% por año. El aumento en la PPNA en respuesta a la fertilización ha sido también observado en otros estudios (Boot & Dubbelden 1990; Giardina et al. 2003; Henry et al. 2014; Kowaljow et al. 2010; Yahdjian, Gherardi, & Sala 2014). Este aumento en la PPNA de los pastos con la fertilización podría responder a dos causas: el cambio en la composición de especies de pastos y el cambio en el tamaño de los pastos que fue diferente según la especie. Mientras que *P. humilis* no estaba presente al inicio de los tratamientos y aumentó significativamente su cobertura

por efecto de la fertilización, *P. ligularis* disminuyó, tanto en tamaño como en su porcentaje de cobertura en las parcelas fertilizadas, y las plantas de *P. speciosa* también disminuyeron en tamaño. La explicación para la proliferación de *P. humilis* con la adición de fertilizante puede ser su mayor requerimiento de N, ya que Armas, Pugnaire, & Sala (2008) encontraron una asociación entre esta especie y *A. volckmannii*, la cual tiene mayor cantidad de N en sus hojas que otras especies de arbustos (ver Capítulo V de esta tesis) y posiblemente haya mayor cantidad de N en el suelo alrededor de esta especie. Además, estos autores mencionan una elevada cantidad de plantas de *P. humilis* en áreas que rodean las aguadas, donde hay acumulación de Nitrógeno en el suelo debido a las deposiciones de animales y la orina (observación personal de O. Sala mencionada en Armas, Pugnaire, & Sala 2008). Esto refuerza aún más la idea de que niveles elevados de N en el suelo favorecen el establecimiento de *P. humilis*. Por otra parte, *P. ligularis* parece ser la especie de pasto más perjudicada con la adición de N, quizá por estar compitiendo por los recursos con *P. humilis*. En un estudio de fertilización con N en la estepa patagónica, Yahdjian, Gherardi, & Sala (2014) tampoco encontró un aumento en la PPNA de *P. ligularis*. Por el contrario, en un estudio con fertilización inorgánica en una estepa arbustivo-graminosa similar a la de este estudio, Kowaljow et al. (2010) observaron un incremento en la cobertura vegetal y en la producción primaria, principalmente representada por el pasto perenne *P. ligularis*.

Pappostipa speciosa es considerada más tolerante a la sequía que *P. ligularis* (Couso & Fernández 2012) no cambiando significativamente su biomasa aérea y número de macollos bajo condiciones de sequía debido al aumento en la biomasa de raíces. En la dirección contraria, en este estudio se observó que esta especie también tiende a mantener estable su altura, perímetro basal y cobertura bajo un aumento en la disponibilidad de agua, consistente con su menor grado de plasticidad respecto a otras especies de gramíneas de la estepa patagónica (Couso & Fernández 2012). Por otro lado, *P. ligularis* ha sido mencionada como una especie más plástica frente a la sequía que *P. speciosa*. En estas condiciones *P. ligularis* reduce su biomasa, pero en condiciones óptimas la incrementa (Couso & Fernández 2012). Consistente con esto, en el presente estudio se observó que *P. ligularis* tendió a aumentar su perímetro basal y altura con la irrigación. Sin embargo su cobertura disminuyó significativamente con el aumento en la disponibilidad de agua.

La falta de respuesta a la adición de agua en la PPNA de los pastos observada en este estudio fue también encontrada por Swindon, Burke, & Lauenroth (2019) en otras estepas semiáridas en las cuales solo aumentó la PPNA cuando se combinó la adición de agua con adición de N. La limitación de nutrientes en la estepa patagónica, principalmente de N, podría explicar la falta de respuesta de los pastos a la adición de agua (Hooper & Johnson 1999). Sin embargo, en otros estudios se ha encontrado una respuesta positiva a la adición de agua, incluso en pastizales semiáridos (Bai et al. 2008; Gao et al. 2011; Li, Lin, & Taube 2011; Lü et al. 2014), con (Li, Lin, & Taube 2011) o sin efecto aditivo de la fertilización (Lü et al. 2014). En algunos de esos estudios (Gao et al. 2011; Li, Lin, & Taube 2011; Lü et al. 2014) la adición de agua tuvo incluso mayores efectos sobre la productividad que la fertilización. En la estepa patagónica, Golluscio, Sala, & Lauenroth (1998) encontraron que los pastos respondieron experimentalmente a eventos grandes de lluvia, sugiriendo que la cantidad de agua adicionada en este estudio fue insuficiente para provocar un aumento en la PPNA de los pastos. Por otro lado, Yahdjian & Sala (2006) encontraron una reducción significativa de la PPNA de los pastos cuando se interceptó experimentalmente el 71% de las precipitaciones, pero sin efecto si la restricción era menor. En ese mismo trabajo la PPNA total fue positivamente relacionada con las precipitaciones cuando se incluyó la PPNA de los arbustos. En contraposición a lo encontrado por Yahdjian & Sala (2006) para la estepa patagónica, pero en acuerdo con los resultados del presente estudio, Jobbágy & Sala (2000) encontraron que la PPNA de los pastos no presentó una asociación significativa con las precipitaciones. Para el caso de los arbustos, las respuestas fueron similares a las de Yahdjian & Sala (2006) pero opuestas a las de Jobbágy & Sala (2000) quienes encontraron un aumento en la PPNA de los arbustos con el aumento de las precipitaciones acumuladas a lo largo de 10 años en la estepa patagónica. Yahdjian & Sala (2006) asociaron esta discrepancia al hecho de que usaron parcelas muy pequeñas ($<4\text{m}^2$) y posiblemente las raíces de los arbustos estarían explorando suelo fuera del área del tratamiento. En el presente estudio se usaron parcelas de 625 m^2 y aun así la biomasa de los arbustos no cambió con la adición de un 20-25% más de precipitación que la media anual histórica. Sin embargo, durante el periodo 2016-2017 del presente estudio se registraron 233 mm de precipitación (55% más que la media del área de estudio) y los arbustos con raíces más superficiales (*A. prolifera* y *S. filaginoides*) respondieron positivamente incrementando su biomasa aérea respecto al año anterior con 108 mm (2015-2016). Este rápido incremento de la PPNA

observado en el presente estudio no coincide con lo expuesto por Yahdjian & Sala (2006) de que el retardo en la respuesta de la vegetación al aumento de las precipitaciones está asociado al grado de sequía del año previo.

Similar a los efectos de la irrigación sobre el crecimiento de los arbustos, la fertilización sola o combinada no los afectó. Esto concuerda con los resultados de Yahdjian, Gherardi, & Sala (2014) que encontraron que la PPNA de los arbustos no cambia luego de 2 años de adición de N en coincidencia también con Reichmann, Sala, & Peters (2013) y Fernández, Pissolito, & Passera (2018) en otros ecosistemas áridos. Sin embargo, frente a un año húmedo se observó que los arbustos incrementaron su productividad con la fertilización y con la adición conjunta de agua en mayor medida que en las plantas en el control. El contenido de N en las hojas de los arbustos aumentó por efecto de la fertilización pero sin incrementar la tasa fotosintética durante un año normal (ver capítulo V), reflejándose en la falta de respuesta en la productividad durante 2016 y 2018. Además, y llamativamente, la mortalidad de arbustos fue mayor en los tratamientos con fertilización durante el 2016. En 2017, que fue un año muy húmedo que elevó el contenido de agua en el suelo aun en las capas profundas (2 m de profundidad; Capítulo I), la mayor cantidad de N en sus tejidos, con mayor capacidad fotosintética potencial, fue aprovechada por los arbustos y se reflejó en una mayor productividad. A pesar de esto, *S. filaginoides* registró mayor número de plantas muertas con la fertilización que en las parcelas control. El incremento en la biomasa de los arbustos en el año húmedo sugiere que estos están más limitados por el agua que por los nutrientes, pero que cuando la disponibilidad de agua aumenta lo suficiente, los nutrientes potencian su efecto. Como se mencionó anteriormente, un aumento del 20-25% en las precipitaciones anuales distribuidas en eventos de 5 mm no tendría grandes efectos sobre la biomasa área de arbustos, pero sí un aumento de más del 50% como el registrado durante 2017. Similarmente, los pastos incrementaron su PPNA respecto al control solo en F y I+F durante el año húmedo.

7.4.2. Efectos de los tratamientos sobre la biomasa subterránea

En este estudio no se identificaron las raíces por especie, pero es muy probable que en cada trampa hayan estado presentes raíces de diferentes especies, ya que Reyes & Aguiar (2017b) y Oñatibia, Reyes, & Aguiar (2017) determinaron que no hay

territorialidad en la estepa patagónica. Esto indica que en el suelo cercano a una planta hay raíces de otras especies, tal que la riqueza subterránea es más de tres veces de la que se encuentra en la parte aérea por unidad de superficie. Probablemente las raíces pertenezcan solo a especies de pastos ya que estos tienen la mayoría de sus raíces en los primeros 30 centímetros del suelo, mientras que los arbustos tienen raíces más profundas (Bucci et al. 2009, 2011), aunque ciertos arbustos tienen también alta proporción de sus raíces en los primeros centímetros del suelo (Bucci et al. 2009; Fernandez & Paruelo 1988).

El mayor crecimiento de raíces finas fue encontrado entre octubre y noviembre, coincidiendo con el crecimiento de la biomasa aérea, y con lo encontrado por Soriano, Golluscio, & Satorre (1987a) para el mismo sitio de estudio. Esta estacionalidad está relacionada con el momento en que la temperatura y la humedad del suelo son más favorables para el crecimiento de las plantas. El crecimiento de las raíces generalmente aumenta con el aumento de la temperatura hasta un óptimo a partir de la cual disminuye (McMichael & Burke, 1998; Pregitzer et al. 2000). Además, Swindon, Burke, & Lauenroth (2019) relacionaron la mayor tasa de producción de raíces con el momento de mayores precipitaciones. Durante fines del verano y del otoño la biomasa radical comenzó a disminuir, posiblemente por efecto de su descomposición, si bien la tasa de descomposición de raíces es baja en la estepa patagónica (Austin et al. 2009; Austin & Vivanco 2006; Reyes & Aguiar 2017a).

Tal como se esperaba, el crecimiento de las raíces fue menor en los tratamientos con fertilización, en coincidencia con los resultados de otros estudios en ecosistemas semiáridos (Gao et al. 2011; Harpole, Potts, & Suding 2007; Li, Lin, & Taube 2011; Shangguan et al. 2004). Sin embargo, este resultado fue diferente a aquel encontrado por Ladwig et al. (2012) en el Desierto Chihuahuano, por Swindon, Burke, & Lauenroth (2019) en tres estepas semiáridas del Hemisferio Norte, y por Kowaljow et al. (2010) y Reyes & Aguiar (2017a) en la estepa patagónica, quienes no observaron cambios en la producción de raíces por efecto de la adición de N. También estos resultados están en contraposición a aquellos donde el incremento en la disponibilidad de N resultó en mayor producción de raíces finas. Los resultados del presente estudio indican que a mayor disponibilidad de nutrientes en el suelo se reasignó una mayor proporción de foto-asimilados a la parte aérea que a la subterránea. Una explicación alternativa a la menor biomasa de raíces encontrada en el tratamiento con fertilización puede ser el

cambio en la composición de especies observado con la fertilización, en el cual proliferó *P. humilis*. A diferencia de *P. ligularis* y *P. speciosa*, esta especie tiene menor tasa de proliferación de raíces (Reyes & Aguiar 2017a). Estos autores encontraron, utilizando trampas de raíces similares a las empleadas en este estudio, que la biomasa de raíces de *P. humilis* en las trampas es menor que la biomasa de *P. ligularis* y de *P. speciosa* luego de 6 meses de colocadas las trampas. La disminución en la cobertura de *P. ligularis* y la tendencia a la disminución en la cobertura de *P. speciosa* en conjunto con el establecimiento de *P. humilis*, podría explicar la menor biomasa de raíces con la fertilización.

La irrigación, por otra parte, no produjo cambios en el crecimiento de las raíces, a diferencia de lo propuesto, ya que un aumento en la disponibilidad de agua tiende a disminuir la biomasa asignada a las raíces (Fahnestock & Detling 1999). Sin embargo, Wilcox et al. (2004) han observado que la relación entre la disponibilidad de agua y la biomasa de raíces en el desierto Mojave depende de la especie, ya que mientras que en una especie existió una relación negativa entre ambas, en otra especie no encontraron relación o la relación fue positiva. Swindon, Burke, & Lauenroth (2019) encontraron, en tres estepas diferentes, que la producción de raíces no cambió con la adición de agua, así como tampoco cambió la productividad aérea, tal como en nuestro estudio.

7.4.3. Efectos sobre la biodiversidad

La composición de especies de la estepa patagónica fue alterada por efecto de los tratamientos de adición de agua y de nutrientes, tal como habían propuesto varios autores para otros ecosistemas (McLendon & Redente 1991; Roem, Klees, & Berendse 2002; Vourlitis & Pasquini 2009; Wedin & Tilman 1996). Cada especie respondió de modo diferente al cambio en los recursos debido a diferencias en su capacidad competitiva. Mientras que *P. humilis* fue muy favorecida por la fertilización, aumentando su porcentaje de cobertura, *P. ligularis* fue muy afectada. En cambio, la representatividad de las especies dominantes de arbustos en la comunidad no fue afectada por los tratamientos. Es decir, en general los arbustos fueron más insensibles a los cambios en la disponibilidad de recursos que los pastos, como ha sido establecido para las plantas de la estepa patagónica (Paruelo et al. 1998b; Sala & Lauenroth 1982; Yahdjian & Sala 2006).

Los cambios en la composición de especies por efecto de los tratamientos condujeron a cambios marginales en los índices de biodiversidad. Los índices indicaron una tendencia a un aumento en la biodiversidad con disminución de la dominancia de alguna especie, sugiriendo así una distribución más uniforme al aumentar la disponibilidad de nutrientes. Esto podría interpretarse como un efecto positivo, sin embargo el hecho de que *P. ligularis*, un pasto altamente palatable, esté siendo reemplazado parcialmente por *P. humilis*, un pasto con poco valor forrajero, sería negativo para la estepa patagónica, donde la principal actividad es la ganadería ovina (Adler et al. 2004; Oñatibia, Aguiar, & Semmartin 2015; Soriano, Golluscio, & Satorre 1987b).

7.5. CONCLUSIONES

La hipótesis propuesta en este estudio fue que las plantas expuestas a mayor disponibilidad de agua y nutrientes tienen mayores tasas de crecimiento de la biomasa aérea y reducción en el crecimiento de la biomasa subterránea. Los resultados indicaron un aumento en la PPNA de los pastos con la adición de fertilizante incluyendo N y P, pero sin respuesta a la adición de agua luego de 4 años de iniciado el experimento. Mientras que las matas de las especies de pastos *P. ligularis* y *P. speciosa* disminuyeron su tamaño, el pasto *P. humilis* aumentó significativamente su cobertura en las parcelas fertilizadas. La explicación para la proliferación de esta especie con la adición de N puede ser su mayor requerimiento de N. Por otra parte, el crecimiento de los arbustos no fue afectado por la irrigación, y la fertilización solo tuvo un efecto positivo durante un año húmedo. Además hubo alta mortalidad de arbustos en el tratamiento de fertilización, solo o combinado con adición de agua. El incremento en la biomasa de los arbustos en el año húmedo sugiere que estos están más limitados por el agua que por los nutrientes, pero que cuando la disponibilidad de agua aumenta lo suficiente, los nutrientes potencian su efecto. La producción de raíces finas, que fue máxima durante octubre y noviembre, coincidiendo con el desarrollo de la porción aérea, fue menor en los tratamientos con fertilización. Estos resultados indicarían que a mayor disponibilidad de nutrientes en el suelo se reasignó una mayor proporción de fotoasimilados a la parte aérea que a la subterránea. O bien una explicación alternativa a la menor biomasa de raíces encontrada en el tratamiento con fertilización puede ser el cambio en la composición de especies de pastos observado con la fertilización. Por otra

parte, la irrigación no produjo cambios en el crecimiento de las raíces. Por último, la composición de especies de la estepa estudiada fue alterada por efecto de los tratamientos, ya que cada especie respondió de modo diferente al cambio en la disponibilidad de recursos debido a diferencias en su capacidad competitiva. El cambio más significativo fue la proliferación de *P. humilis* a expensas de la disminución en la cobertura de *P. ligularis* con la adición de N. El hecho de que un pasto altamente palatable esté siendo reemplazado por otro con poco valor forrajero, sería negativo para la estepa patagónica, donde la principal actividad es la ganadería ovina.

Capítulo VIII

Discusión general

8.1. MOTIVACIÓN

Las estepas áridas y semiáridas están fuertemente limitadas por la disponibilidad de agua y de nutrientes. La estepa patagónica en particular presenta además limitaciones dadas por la asincronía entre la disponibilidad de agua y las temperaturas favorables para el crecimiento, las altas intensidades y frecuencias de viento, y problemas ambientales de desertificación relacionados con el sobrepastoreo y la actividad petrolera y minera. En las últimas décadas se han sumado los cambios globales, que se estima aumentarán las deposiciones de N y las temperaturas medias, y se modificarán los regímenes de precipitación. Aunque para gran parte de la Región Patagónica, incluidos los bosques andino-patagónicos y las estepas se prevé una disminución de las precipitaciones y/o un aumento de las temperaturas (Saurral, Camilloni, & Barros 2017) lo cual generaría un incremento de la sequía, en algunas áreas específicas se espera un aumento de las precipitaciones (Saurral, Camilloni, & Barros 2017). Los pastizales áridos en general, son la base de la actividad económica de la región a través de su uso para pastoreo. Sin embargo debido a las condiciones ambientales a las que están expuestos tienen baja productividad y calidad del forraje (Aguar et al. 1996; Bertiller & Bisigato 1998). En base a lo expuesto el objetivo principal de la tesis fue evaluar cómo un aumento de las entradas de agua (ya sea que representen un aumento natural de las precipitaciones o un aumento a través de prácticas de riego) y un aumento en las disponibilidades de N (ya sea por las deposiciones naturales o por fertilización), afectaría algunos aspectos del funcionamiento del ecosistema y la ecofisiología de sus especies vegetales representativas. Para ello, se estableció un experimento de manipulación de los recursos agua y N a gran escala y a largo plazo. Muchos estudios y en diferentes ecosistemas en los que se evalúan las respuestas a cambios en las precipitaciones se han realizado a lo largo de gradientes espaciales y a distintas escalas temporales (esencialmente cortas) (ej. Austin & Sala 2002; Bai et al. 2008; Huxman, et al. 2004b; Lauenroth, Burke, & Paruelo 2000; Paruelo et al. 1999; Paruelo, Sala, & Beltrán 2000) dando resultados muchas veces contradictorios. La falta de consenso muchas veces puede recaer en la carencia de controles sobre algunos factores que confunden el efecto

de la disponibilidad del recurso que se está evaluando. Por esta razón, el diseño experimental desarrollado en este estudio, a diferencia de aquellos a lo largo de gradientes, permitió controlar el tratamiento hídrico y el de adición de N sin cambiar otros factores ambientales y poder discernir los efectos directos de las variables ambientales analizadas sobre el funcionamiento del ecosistema. Por otro lado, el diseño experimental consideró parcelas de tamaño considerable (625 m^2) con lo cual se aseguró que las raíces de las plantas analizadas estén usando los recursos asignados a cada tratamiento, en contraste con aquellos estudios realizados sobre parcelas con superficies menores a 3 m^2 . Asimismo se evaluaron los efectos a largo plazo y no las respuestas inmediatas luego de un pulso de lluvia dado que el experimento se inició en 2013 y se mantiene en la actualidad, incorporando entre un 20 a un 25% más de agua cada año respecto a la precipitación media anual entre 1982-2018 y $100 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$.

8.2. RESULTADOS PRINCIPALES

En primera instancia se evaluó el patrón estacional de las emisiones de CO_2 del suelo en la estepa patagónica, teniendo en cuenta la heterogeneidad espacial de este ecosistema; además se determinaron los efectos de la temperatura y de la humedad del suelo y la densidad de las raíces sobre la respiración del suelo, y se estudió la respuesta de un pequeño pulso de lluvia sobre los flujos de CO_2 del suelo durante la estación seca. La primera hipótesis establecía que la variabilidad estacional en la respiración del suelo se atribuye a la variación en la temperatura y la humedad del suelo, mientras que la segunda hipótesis proponía que los parches de suelo desnudo liberan una menor cantidad de CO_2 que los parches con vegetación, y la tercera hipótesis establecía un aumento en la respiración del suelo después de un pulso de lluvia en ambos tipos de parches. El estudio a lo largo de un año pudo evaluar la fuerte dinámica estacional en los flujos de CO_2 , y su relación con los cambios en la temperatura y la humedad del suelo. Las mayores emisiones se produjeron con la combinación de alta temperatura y humedad en el suelo, coincidiendo con la estación de máxima actividad metabólica de la vegetación de la estepa. Además, la marcada heterogeneidad espacial de la estepa se reflejó también en las mayores emisiones de CO_2 desde parches con vegetación que desde parches de suelo desnudo, independientemente del tratamiento. Los parches vegetados fueron altamente sensibles a pequeños pulsos de agua, generando un gran pulso de CO_2 a corto plazo, mientras que los parches de suelo no respondieron. Estos

resultados sugirieron que la respiración de las raíces es el principal componente de la respiración del ecosistema y que si por efecto del cambio climático o por prácticas agrícolas se incrementan las entradas de agua por precipitación podrían a su vez incrementarse las pérdidas de C desde el suelo.

El segundo objetivo específico de esta tesis fue determinar el impacto del aumento en la disponibilidad de nutrientes y agua sobre las emisiones de CO₂ del suelo y de las tasas de mineralización de Nitrógeno en la estepa patagónica, teniendo en cuenta la heterogeneidad espacial y la variabilidad estacional de este ambiente. Se propusieron dos hipótesis, la primera proponía que la respiración autótrofa (raíces) disminuye en los tratamientos fertilizados e irrigados, mientras que la segunda hipótesis planteaba que la mineralización de Nitrógeno aumenta con la adición de agua y de nutrientes, dado que incrementan los recursos para que tal proceso ocurra. Sin embargo, los resultados no apoyan la primera hipótesis ya que la adición de agua no modificó las tasas de emisión de CO₂, excepto inmediatamente luego de un evento de precipitación que generó un importante pulso de emisión de CO₂ a corto plazo (como se explicó en el párrafo anterior), mientras que la adición de nutrientes estimuló la liberación de CO₂ durante la estación de crecimiento, siendo mayor el efecto en el tratamiento que combinó fertilización e irrigación. Dichos cambios se relacionaron con la densidad de raíces del suelo, que fue mayor en las parcelas fertilizadas pero no en las parcelas irrigadas. Por otra parte, la respiración heterótrofa no parece haberse modificado con los tratamientos, ya que la densidad de bacterias heterótrofas del suelo no cambió significativamente con los tratamientos. Por otra parte, la segunda hipótesis tampoco fue apoyada, ya que el aumento en el contenido de amonio y nitrato en el suelo en el tratamiento de fertilización impactó negativamente en las tasas de mineralización, con una fuerte inmovilización del N por las comunidades microbianas del suelo, que podría ser por inhibición de la actividad bacteriana por exceso de N, mientras que el tratamiento de irrigación no afectó la mineralización del Nitrógeno. Asimismo, las bajas tasas de mineralización encontradas incluso en el control sugieren que los procesos de mineralización del suelo en la estepa patagónica podrían estar restringidos a cortos periodos en los cuales ocurren los pulsos de lluvia.

Luego se evaluaron los efectos de la manipulación del recurso hídrico y del N del suelo sobre el estado hídrico y la eficiencia en el transporte de agua de las especies más representativas de la estepa. La hipótesis asociada a este objetivo fue que las

plantas expuestas a mayor disponibilidad de agua y nutrientes exhiben mayor eficiencia en el sistema de transporte de agua y mejor estado hídrico. Sin embargo, contrario a la hipótesis, la eficiencia hidráulica de los tallos fue básicamente conservada, aun cuando la densidad de la madera fue reducida o incrementada dependiendo de la especie y tratamiento. Las características hidráulicas de las hojas, sin embargo fueron más plásticas en la dirección de incrementar la resistencia a la sequía tanto con la irrigación y/o con la fertilización. Estos cambios no fueron acompañados en general por cambios en el estado hídrico. Salvo algunas excepciones como en *P. ligularis* en todos los tratamientos o en *A. prolifera* en I+F se observó una fuerte homeostasis en los potenciales hídricos mínimos. Estos cambios en la eficiencia en el transporte de agua a nivel de las hojas o posibles cambios a nivel de las raíces o planta entera no analizados en este estudio así como un incremento en la superficie transpiratoria, pudieron contribuir al aumento en el consumo de agua por planta con la adición de agua y/o N sin efectos sobre el estado hídrico.

El cuarto objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la adición de nutrientes y/o agua sobre las tasas de intercambio gaseoso y la eficiencia en el uso de recursos de pastos y arbustos de la estepa patagónica. La hipótesis propuso que la adición de agua y/o nutrientes incrementa la tasa de fotosíntesis, pero la pérdida de agua sería proporcionalmente menor con adición de nutrientes y mayor con el incremento en la disponibilidad de agua. Los resultados obtenidos indicaron una mayor absorción de N con adición del fertilizante, que se reflejó en un incremento en el contenido de N en las hojas de todas las especies, pero no necesariamente en un incremento en el contenido de pigmentos fotosintéticos. El agua no fue un limitante para la absorción de N desde el suelo dado que aumentó el contenido de N tanto en el tratamiento F como en I+F pero no en I. En general, no hubo un aumento en la conductancia estomática bajo los tratamientos de fertilización e I+F, con lo cual posiblemente no pudieron aumentar la difusión del CO₂, limitando el incremento esperado en la tasa de fotosíntesis en base al aumento significativo en el N foliar. Por otro lado, mientras que la adición de agua no afectó el contenido de N en las hojas, el aumento en la conductancia estomática pudo facilitar la difusión de CO₂ e incrementar la tasa de fotosíntesis, sugiriendo que el agua es el factor más limitante para la fotosíntesis cuando la disponibilidad de agua es baja. La fertilización provocó, en general, un incremento en la eficiencia en el uso del agua y una disminución en la eficiencia en el uso del Nitrógeno, mientras que la adición de

agua tuvo el efecto opuesto. En el tratamiento que combinó fertilización e irrigación se evidenció más el efecto de la fertilización, sugiriendo una mayor limitación de nutrientes que de agua o bien una irrigación insuficiente para lograr un mayor efecto de ese tratamiento.

El quinto objetivo consistió en determinar si el aumento en las precipitaciones y la adición de N ejercen algún efecto sobre la resistencia a las bajas temperaturas en invierno en arbustos y pastos de la estepa patagónica. La hipótesis planteada estableció que la tolerancia a las bajas temperaturas incrementa con la adición de N al suelo, mientras disminuye con el incremento de las precipitaciones. Sin embargo, la hipótesis no fue validada por los resultados de este estudio, ya que la adición de N produjo el efecto opuesto en algunas especies, y en el tratamiento de irrigación no se observaron cambios en la vulnerabilidad a las bajas temperaturas. Todas las especies estudiadas tuvieron una capacidad alta de super-enfriar sus tejidos. La temperatura de nucleación de hielo en los tejidos ocurrió a temperaturas mayores que la temperatura donde se observó el 50% de daño celular, indicando que todas las especies analizadas en el presente estudio tienen como mecanismo de resistencia a las bajas temperaturas la tolerancia al congelamiento extracelular. Solo las especies de pastos disminuyeron su resistencia a las bajas temperaturas con la adición de nutrientes, pero igualmente continúan siendo muy tolerantes a las bajas temperaturas con márgenes de seguridad aún elevados.

El último objetivo luego de analizar los diferentes aspectos del comportamiento fisiológico de las especies bajo los tratamientos de irrigación y fertilización fue determinar cómo ellos repercuten en el crecimiento de la biomasa aérea y subterránea. La hipótesis propuesta fue que las plantas expuestas a mayor disponibilidad de agua y nutrientes tienen mayores tasas de crecimiento de la biomasa aérea y reducción en el crecimiento de la biomasa subterránea. Los resultados indicaron un aumento en la PPNA de los pastos con la adición de fertilizante incluyendo N y P, pero sin respuesta a la adición de agua luego de 4 años de iniciado el experimento. Mientras que las plantas de las especies de pastos *P. ligularis* y *P. speciosa* disminuyeron su tamaño, el pasto *P. humilis* aumentó significativamente su cobertura en las parcelas fertilizadas. La explicación para la proliferación de esta especie con la adición de N puede ser su mayor requerimiento de N. Por otra parte, el crecimiento de los arbustos no fue afectado por la irrigación, y la fertilización solo tuvo un efecto positivo durante un año húmedo.

Además hubo alta mortalidad de arbustos en el tratamiento de fertilización, solo o combinado con adición de agua. El incremento en la biomasa de los arbustos en el año húmedo sugiere que estos están más limitados por el agua que por los nutrientes, pero que cuando la disponibilidad de agua aumenta lo suficiente, los nutrientes potencian su efecto. La producción de raíces finas, que fue máxima durante octubre y noviembre, coincidiendo con el desarrollo de la porción aérea, fue menor en los tratamientos con fertilización. Estos resultados indicarían que a mayor disponibilidad de nutrientes en el suelo se reasignó una mayor proporción de foto-asimilados a la parte aérea que a la subterránea. O bien una explicación alternativa a la menor biomasa de raíces encontrada en el tratamiento con fertilización puede ser el cambio en la composición de especies de pastos observado con la fertilización. Por otra parte, la irrigación no produjo cambios en el crecimiento de las raíces. Por último, la composición de especies de la estepa estudiada fue alterada por efecto de los tratamientos, ya que cada especie respondió de modo diferente al cambio en la disponibilidad de recursos debido a diferencias en su capacidad competitiva. El cambio más significativo fue la proliferación de *P. humilis* a expensas de la disminución en la cobertura de *P. ligularis* con la adición de N. El hecho de que un pasto altamente palatable esté siendo reemplazado por otro con poco valor forrajero, sería negativo para la estepa patagónica, donde la principal actividad es la ganadería ovina.

La débil respuesta observada en algunas características fisiológicas estudiadas a la adición de agua es posible que sea consecuencia de la baja capacidad de aclimatación, que las plantas estén adaptadas a la baja disponibilidad de agua, o a la cantidad de agua y a la frecuencia con que fue adicionada. En el presente estudio se aplicaron pulsos de aproximadamente 5 mm distribuidos desde mediados de la estación de crecimiento hasta fines de la estación seca, aportando entre un 20 y un 25% más de agua que la precipitación media anual histórica del sitio (130 mm). Estos eventos de riego humedecieron la capa más superficial del suelo de forma transitoria, pero no fueron suficientes para aumentar el contenido de humedad del suelo en capas más profundas. Debido a la alta demanda evaporativa de la atmósfera de la estepa patagónica, el agua de pequeños eventos podría perderse rápidamente si no es aprovechada por las plantas. Sin embargo, hubo respuestas en la transpiración de la vegetación y en las tasas fotosintéticas en el tratamiento de irrigación, aún en los arbustos que tienen raíces profundas, indicando que el recurso estuvo efectivamente disponible para su uso.

Por otra parte, el tratamiento de fertilización tuvo efectos esencialmente sobre características fisiológicas, que influyeron en la productividad y biodiversidad de la estepa patagónica. El aumento en la cantidad de individuos muertos sugiere un efecto negativo de la fertilización. La acidificación del suelo por efecto de la fertilización con N podría estar explicando la inhibición del crecimiento y la menor supervivencia de algunas especies dado su efecto negativo sobre la absorción de nutrientes. Un disturbio en el balance nutricional de las plantas por efecto de la fertilización podría resultar en mortalidad de las plantas (Bobbink, Hornung, & Roelofs 1998; Schulze 1989). Además, la acidificación del suelo por efecto de la fertilización podría tener impacto negativo sobre la germinación y supervivencia de las plántulas (Roem, Klees, & Berendse 2002; Tilman 1997).

La coexistencia de especies en una comunidad ocurre mediante un balance complejo, que es disturbado cuando se modifican ciertos factores. La hipótesis del equilibrio de recursos (Braakhekke & Hooftman 1999) predice que las especies coexistirán en un equilibrio competitivo en un entorno homogéneo cuando las proporciones reales de la oferta de recursos estén equilibradas. La adición de N estaría alterando las dinámicas competitivas de las especies vegetales de la estepa patagónica. Hay varios estudios que demuestran que la adición de N altera la estructura de la comunidad y la composición de especies en diferentes ecosistemas (Goulding et al. 1998; Green & Galatowitsch 2002; Jefferies & Maron 1997; Wedin & Tilman 1996). Bobbink, Hornung, & Roelofs (1998) encontraron que un incremento en la disponibilidad de N resultó en exclusión competitiva de especies de plantas características de un ecosistema por especies nitrofilicas.

En conclusión, los principales aportes de esta tesis son:

- La adición de N estimula las pérdidas de C desde el suelo por respiración, mientras que la adición de agua solo produce pulsos de emisión de CO₂ a corto plazo.
- La fertilización incrementa la inmovilización del N en el suelo.
- El incremento en las precipitaciones y en la disponibilidad de N incrementan la resistencia a la pérdida de la conductancia hidráulica a nivel de las hojas y el consumo de agua por planta pero sin afectar el

estado hídrico, excepto en la especie palatable *P. ligularis* y en *A. prolifera* cuyos potenciales hídricos se tornan más negativos.

- La fertilización con o sin adición de agua, pero no la irrigación por sí sola incrementa el estado nutricional de las hojas de pastos y arbustos aumentando el contenido de N. Sin embargo un aumento en la tasa de fotosíntesis se observó en el tratamiento de irrigación debido al aumento en la difusión estomática de CO₂.
- La fertilización redujo la resistencia a las bajas temperaturas de los pastos, que aun manteniendo grandes márgenes de seguridad en su tolerancia al congelamiento frente a eventos extremos de bajas temperaturas podrían experimentar daño celular.
- Aunque la fertilización no incrementó la tasa de fotosíntesis de los pastos, aumentó la productividad primaria aérea de los pastos pero con un recambio de especies que consistió en una disminución de *P. ligularis* y un aumento de *P. humilis*.
- Los arbustos incrementaron su crecimiento aéreo solo en el año excepcionalmente húmedo debido a un evento extremo de precipitación y la adición de nutrientes potenció el efecto del agua.
- La fertilización condujo a un mayor número de plantas de arbustos muertas, mientras que con un aumento significativo en las precipitaciones dicha mortalidad tendió a disminuir.

8.3. PERSPECTIVAS FUTURAS

Cuanto mayor número de componentes a lo largo de una cadena de condiciones se analicen existe mayor probabilidad de poder explicar certeramente la respuesta a un cambio en las condiciones ambientales, especialmente si el estudio incluye observaciones a largo plazo o tratamientos de manipulación o ambos (Fernández 2007). Las respuestas observadas en este estudio podrían cambiar en un más largo plazo dependiendo del grado de plasticidad fenotípica. Por eso, se requiere continuar observando el comportamiento de la vegetación a los cambios en la disponibilidad de recursos y determinar si existe un valor umbral a partir del cual restringen su respuesta o comienzan a responder dependiendo de la variable analizada. Así mismo, se requiere

evaluar los cambios en la estructura a nivel de comunidad lo cual tiene importantes consecuencias sobre el balance neto de carbono y de agua del ecosistema.

Posibles aspectos a considerar en futuros estudios:

- Evaluar el intercambio neto de Carbono para determinar si el ecosistema es un sumidero o una fuente de C.
- Determinar si el aumento en la cobertura de *P. humilis* con la fertilización se acompaña con un aumento de su palatabilidad.
- Evaluar el efecto de la disminución de las precipitaciones y el efecto combinado con la adición de N.
- Evaluar los efectos de mayores incrementos en la precipitación.
- Continuar con los tratamientos actuales y determinar si los efectos se mantienen o cambian.

Referencias bibliográficas

- Adler, P.B., D.G. Milchunas, W.K. Lauenroth, O.E. Sala, & I.C. Burke. 2004. "Functional Traits of Graminoids in Semi-Arid Steppes: A Test of Grazing Histories." *Journal of Applied Ecology* 41: 653–63.
- Aerts, R., & F.S. Chapin. 2000. "The Mineral Nutrition of Wild Plants Revisited: A Re-Evaluation of Processes and Patterns." *Advances in Ecological Research* 30(C): 1–68.
- Aguiar, M.R., J.M. Paruelo, O.E. Sala, & W.K. Lauenroth. 1996. "Ecosystem Responses to Changes in Plant Functional Type Composition: An Example from the Patagonian Steppe." *Journal of Vegetation Science* 7: 381–90.
- Aguiar, M.R., & O.E. Sala. 1998. "Interactions among Grasses, Shrubs, and Herbivores in Patagonian Grass-Shrub Steppes." *Ecología Austral* 8: 201–10.
- Aguiar, M.R., & O.E. Sala. 1999. "Patch Structure, Dynamics and Implications for the Functioning of Arid Ecosystems." *Tree* 14(7): 273–77.
- Ahlström, A., M.R. Raupach, G. Schurgers, B. Smith, A. Arneth, et al. 2015. "The Dominant Role of Semi-Arid Ecosystems in the Trend and Variability of the Land CO₂ Sink." *Science* 348(6237): 895–99.
- Allen, E.B., L.E. Rao, R.J. Steers, A. Bytnerowicz, & M.E. Fenn. 2009. "Impacts of Atmospheric Nitrogen Deposition on Vegetation and Soils at Joshua Tree National Park." In *The Mojave Desert: Ecosystem Processes and Sustainability*, eds. R.H. Webb et al. Las Vegas, 78–100.
- Ameaglio, T., J. Morizet, P. Cruiziat, & M. Martignac. 1990. "The Effects of Root Temperature on Water Flux, Potential and Root Resistance in Sunflower." *Agronomie* 10: 331–40.
- Ammann, C., C.R. Flechard, J. Leifeld, A. Neftel, & J. Fuhrer. 2007. "The Carbon Budget of Newly Established Temperate Grassland Depends on Management Intensity." *Agriculture, Ecosystems and Environment* 121(1–2): 5–20.
- Amponsah, I.G., V.J. Loeffers, P.G. Comeau, & R.P. Brockley. 2004. "Growth Response and Sapwood Hydraulic Properties of Young Lodgepole Pine Following Repeated Fertilization." *Tree Physiology* 24(10): 1099–1108.
- Arias, N.S., S.J. Bucci, F.G. Scholz, & G. Goldstein. 2015. "Freezing Avoidance by Supercooling in *Olea Europaea* Cultivars: The Role of Apoplastic Water, Solute Content and Cell Wall Rigidity." *Plant, Cell & Environment* 38(10): 2061–70.
- Arias, N.S., F.G. Scholz, G. Goldstein, & S.J. Bucci. 2017. "The Cost of Avoiding Freezing in Stems: Trade-off between Xylem Resistance to Cavitation and Supercooling Capacity in Woody Plants." *Tree Physiology* 37(9): 1251–62.
- Armas, C., F.I. Pugnaire, & O.E. Sala. 2008. "Patch Structure Dynamics and Mechanisms of Cyclical Succession in a Patagonian Steppe (Argentina)." *Journal of Arid Environments* 72: 1552–61.
- Arora, R., M.E. Wisniewski, & R. Scorza. 1992. "Cold Acclimation in Genetically Related (Sibling) Deciduous and Evergreen Peach (*Prunus persica* [L] Batsch): I. Seasonal Changes in Cold Hardiness and Polypeptides of Bark and Xylem Tissues." *Plant Physiology* 99(4): 1562–68.

- Ashbacher, A.C., & E.E. Cleland. 2015. "Native and Exotic Plant Species Show Differential Growth but Similar Functional Trait Responses to Experimental Rainfall." *Ecosphere* 6(November): 1–14.
- Austin, A.T., L. Yahdjian, J.M. Stark, J. Belnap, A. Porporato, et al. 2004. "Water Pulses and Biogeochemical Cycles in Arid and Semiarid Ecosystems." *Oecologia* 141: 221–35.
- Austin, A.T. 2011. "Has Water Limited Our Imagination for Aridland Biogeochemistry?" *Trends in Ecology & Evolution* 26(5): 229–35.
- Austin, A.T., & L. Vivanco. 2006. "Plant Litter Decomposition in a Semi-Arid Ecosystem Controlled by Photodegradation." *Nature* 442(7102): 555–58.
- Austin, A.T, P.I. Araujo, & P.E. Leva. 2009. "Interaction of Position, Litter Type, and Water Pulses on Decomposition of Grasses from the Semiarid Patagonian Steppe." *Ecology* 90(9): 2642–47.
- Austin, A.T., & O.E. Sala. 2002. "Carbon and Nitrogen Dynamics across a Natural Precipitation Gradient in Patagonia, Argentina." *Journal of Vegetation Science* 13: 351–60.
- Báez, S., J. Fargione, D.I. Moore, S.L. Collins, & J. R. Gosz. 2007. "Atmospheric Nitrogen Deposition in the Northern Chihuahuan Desert: Temporal Trends and Potential Consequences." *Journal of Arid Environments* 68(4): 640–51.
- Bai, Y., X. Han, J. Wu, Z. Chen, & L. Li. 2004. "Ecosystem Stability and Compensatory Effects in the Inner Mongolia Grassland." *Nature* 431(7005): 181.
- Bai, Y., J. Wu, Q. Xing, Q. Pan, J. Huang, et al. 2008. "Primary Production and Rain Use Efficiency Across a Precipitation Gradient on the Mongolia Plateau." *Ecology* 89(8): 2140–53.
- Bai, Y., J. Wu, C. Clark, S. Naeem, Q. Pan, et al. 2010. "Tradeoffs and Thresholds in the Effects of Nitrogen Addition on Biodiversity and Ecosystem Functioning: Evidence from Inner Mongolia Grasslands." *Global Change Biology* 16: 358–72.
- Bao, X., X. Zhu, X. Chang, S. Wang, B. Xu, et al. 2016. "Effects of Soil Temperature and Moisture on Soil Respiration on the Tibetan Plateau." *PLOS ONE* 11(10): e0165212.
- Baron, J.S., H.M. Rueth, A.M. Wolfe, K.R. Nydick, E.J. Allstott, et al. 2000. "Ecosystem Responses to Nitrogen Deposition in the Colorado Front Range." *Ecosystems* 3(4): 352–68.
- Barros, V., I. Camilloni. 2016. "La Argentina y el cambio climático: de la física a la política". Buenos Aires: Eudeba.
- Bauer, G.A., F.A. Bazzaz, R. Minocha, S. Long, A. Magill, et al. 2004. "Effects of Chronic N Additions on Tissue Chemistry, Photosynthetic Capacity, and Carbon Sequestration Potential of a Red Pine (*Pinus resinosa* Ait.) Stand in the NE United States." *Forest Ecology and Management* 196(1): 173–86.
- Bertiller, M.B., A.M. Beeskow, & F. Coronato. 1991. "Seasonal Environmental Variation and Plant Phenology in Arid Patagonia (Argentina)." *Journal of Arid Environments* 21(1): 1–11.
- Bertiller, M.B, M.J. Mazzarino, A.L. Carrera, P. Diehl, P. Satti, et al. 2006. "Leaf Strategies and Soil N across a Regional Humidity Gradient in Patagonia." *Oecologia* 148: 612–24.
- Bertiller, M.B., & A. Bisigato. 1998. "Vegetation Dynamics under Grazing Disturbance . The State-and-Transition Model for the Patagonian Steppes." *Ecología Austral* 8: 191–99.

- Bigras, F.J., A. Gonzalez, A.L. D'Aoust, & C. Hébert. 1996. "Frost Hardiness, Bud Phenology and Growth of Containerized *Picea Mariana* Seedlings Grown at Three Nitrogen Levels and Three Temperature Regimes." *New Forests* 12(3): 243–59.
- Birchler, T.M., R. Rose, & D.L. Haase. 2001. "Fall Fertilization with N and K: Effects on Douglas-Fir Seedling Quality and Performance." *Western Journal of Applied Forestry* 16(2): 71–79.
- Bobbink, R., M. Hornung, & J.G.M. Roelofs. 1998. "The Effects of Air-Borne Nitrogen Pollutants on Species Diversity in Natural and Semi-Natural European Vegetation." *Journal of Ecol* 86: 717–38.
- Boggs, J.L., S.G. McNulty, M.J. Gavazzi, & J.M. Myers. 2005. "Tree Growth, Foliar Chemistry, and Nitrogen Cycling across a Nitrogen Deposition Gradient in Southern Appalachian Deciduous Forests." *Canadian Journal of Forest Research* 3: 1901–13..
- Bolstad, P.V., K.J. Davis, J. Martin, B.D. Cook, & W. Wang. 2004. "Component and Whole-System Respiration Fluxes in Northern Deciduous Forests." *Tree Physiology* 24: 493–504.
- Boorse, G.C., F.W. Ewers, & S.D. Davis. 1998. "Response of Chaparral Shrubs to below-Freezing Temperatures: Acclimation, Ecotypes, Seedlings vs. Adults." *American Journal of Botany* 85(9): 1224–30.
- Boot, R.G.A., & K.C. den Dubbelden. 1990. "Effects of Nitrogen Supply on Growth, Allocation and Gas Exchange Characteristics of Two Perennial Grasses from Inland Dunes." *Oecologia* 85: 115–21.
- Boot, R.G.A., & M. Mensink. 1990. "Size and Morphology of Root Systems of Perennial Grasses from Contrasting Habitats as Affected by Nitrogen Supply." *Plant and Soil* 129: 291–99.
- Borken, W., K.E. Savage, E.A. Davidson, & S.E. Trumbore. 2006. "Effects of Experimental Drought on Soil Respiration and Radiocarbon Efflux from a Temperate Forest Soil." *Global Biogeochemical Cycles* 12: 177–93.
- Braakhekke, W.G., & D.A.P. Hooftman. 1999. "The Resource Balance Hypothesis of Plant Species Diversity in Grassland." *Journal of Vegetation Science* 10(2): 187–200.
- Bradford, J.B., D.R. Schlaepfer, W.K. Lauenroth, & I.C. Burke. 2014. "Shifts in Plant Functional Types Have Time-Dependent and Regionally Variable Impacts on Dryland Ecosystem Water Balance." *Journal of Ecology* 102(6): 1408–18.
- Breheny, P., & W. Burchett. 2017. "Visualization of Regression Models Using Visreg." *The R Journal* 9(2): 56–71.
- Bremner, J.M. 1996. Nitrogen Total. In: methods of soil analysis. Part 3. Chemical methods. Madison WI. SSSA-ASA. Pp 1149-1176.
- Bremner, J.M., & D.R. Keeney. 1965. "Steam Distillation Methods for Determination of Ammonium, Nitrate and Nitrite." *Analytica Chimica Acta* 32: 485–95.
- Bretz F., T. Hothorn, & P. Westfall. 2010. Multiple comparisons using R. CRC Press.
- Bridgham, S.D., J. Pastor, C.A. McLaugherty, & C.J. Richardson. 1995. "Nutrient-use efficiency: a litterfall index, a model, and a test along a nutrient-availability gradient in North Carolina peatlands." *The American Naturalist* 145(1): 1–21.
- Briones, M.J.I., N.J. Ostle, N.P. McNamara, & J. Poskitt. 2009. "Functional Shifts of Grassland Soil Communities in Response to Soil Warming." *Soil Biology and Biochemistry* 41: 315–22.

- Brodribb, T.J., & T.S. Feild. 2000. "Stem Hydraulic Supply Is Linked to Leaf Photosynthetic Capacity: Evidence from New Caledonian and Tasmanian Rainforests." *Plant, Cell & Environment* 23(12): 1381–88.
- Brodribb, T.J., & T.S. Feild. 2010. "Leaf Hydraulic Evolution Led a Surge in Leaf Photosynthetic Capacity during Early Angiosperm Diversification." *Ecology Letters* 13(2): 175–83.
- Brodribb, T.J., & N.M. Holbrook. 2003. "Stomatal Closure during Leaf Dehydration, Correlation with Other Leaf Physiological Traits." *Plant Physiology* 132(4): 2166–73.
- Brodribb, T.J., N.M. Holbrook, M.A. Zwieniecki, & B. Palma. 2005. "Leaf Hydraulic Capacity in Ferns, Conifers and Angiosperms: Impacts on Photosynthetic Maxima." *New Phytologist* 165(3): 839–46.
- Brooks, M.L. 2003. "Effects of Increased Soil Nitrogen on the Dominance of Alien Annual Plants in the Mojave Desert." *Journal of Applied Ecology* 40(2): 344–53.
- Broschat, T.K. 2010. "Fertilization Improves Cold Tolerance in Coconut Palm." *Hortechology* 20(5): 852–55.
- Brucek, H., K. Erdle, Y. Gao, M. Giese, Y. Zhao, et al. 2010. "Effects of N and Water Supply on Water Use-Efficiency of a Semiarid Grassland in Inner Mongolia." *Plant and Soil* 328(1): 495–505.
- Bucci, S.J., F.G. Scholz, G. Goldstein, F.C. Meinzer, & L.D.S.L. Sternberg. 2003. "Dynamic Changes in Hydraulic Conductivity in Petioles of Two Savanna Tree Species: Factors and Mechanisms Contributing to the Refilling of Embolized Vessels." *Plant, Cell & Environment* 26: 1633–45.
- Bucci, S.J., G. Goldstein, F.C. Meinzer, F.G. Scholz, A.C. Franco, et al. 2004a. "Functional Convergence in Hydraulic Architecture and Water Relations of Tropical Savanna Trees: From Leaf to Whole Plant." *Tree Physiology* 24: 891–99.
- Bucci, S.J., F.G. Scholz, G. Goldstein, C. Frederick, J.A. Hinojosa, et al. 2004b. "Processes Preventing Nocturnal Equilibration between Leaf and Soil Water Potential in Tropical Savanna Woody Species." *Tree Physiology* 24: 1119–27.
- Bucci, S.J., F.G. Scholz, G. Goldstein, F.C. Meinzer, A.C. Franco, et al. 2006. "Nutrient Availability Constrains the Hydraulic Architecture and Water Relations of Savannah Trees." *Plant, Cell & Environment* 29: 2153–67.
- Bucci, S.J., F.G. Scholz, G. Goldstein, F.C. Meinzer, & M.E. Arce. 2009. "Soil Water Availability and Rooting Depth as Determinants of Hydraulic Architecture of Patagonian Woody Species." *Oecologia* 160: 631–41.
- Bucci, S.J., F.G. Scholz, P.I. Campanello, L. Montti, M. Jimenez-Castillo, et al. 2012. "Hydraulic Differences along the Water Transport System of South American *Nothofagus* Species: Do Leaves Protect the Stem Functionality?" *Tree physiology* 32: 880–93.
- Bucci, S.J., F.G. Scholz, M.L. Peschiutta, N.S. Arias, F.C. Meinzer, et al. 2013. "The Stem Xylem of Patagonian Shrubs Operates far from the Point of Catastrophic Dysfunction and Is Additionally Protected from Drought-Induced Embolism by Leaves and Roots." *Plant, Cell & Environment* 36: 2163–74.

- Bucci, S.J., L.M. Carbonell Silletta, A. Garré, A. Cavallaro, S.T. Efron, et al. 2019. "Functional Relationships between Hydraulic Traits and the Timing of Diurnal Depression of Photosynthesis." *Plant, Cell & Environment* 42(5), 1603-1614.
- Bucci, S.J., F.G. Scholz, P.A. Iogna, & G. Goldstein. 2011. "Economía Del Agua de Especies Arbustivas de Las Estepas Patagónicas." *Ecología Austral* 21: 43–60.
- Burke, I.C., W.K. Lauenroth, & W.J. Parton. 1997. "Regional and Temporal Variation in Net Primary Production and Nitrogen Mineralization in Grasslands." *Ecology* 78(5): 1330–40.
- Burnham, K.P., & D.R. Anderson. 2002. *Model Selection and Multimodel Inference*. New York: Springer.
- Burton, A.J., K.S. Pregitzer, J.N. Crawford, G.P. Zogg, & D.R. Zak. 2004. "Simulated Chronic NO₃ deposition Reduces Soil Respiration in Northern Hardwood Forests." *Global Change Biology* 10(7): 1080–91.
- Bustamante, M.M.C., D.Q. de Brito, A.R. Kozovits, G. Luedemann, T.R.B. de Mello, et al. 2012. "Effects of Nutrient Additions on the Diversity of the Herbaceous-Subshrub Layer of a Brazilian Savanna (Cerrado)." *Plant Ecology* 213: 795–808.
- Butterbach-Bahl, K., & P. Gundersen. 2011. "Nitrogen Processes in Terrestrial Ecosystems." En *The European Nitrogen Assessment*, eds. M.A. Sutton et al. Cambridge University Press, 99–125.
- Cable, J.M., K. Ogle, D.G. Williams, J.F. Weltzin, & T.E. Huxman. 2008. "Soil Texture Drives Responses of Soil Respiration to Precipitation Pulses in the Sonoran Desert: Implications for Climate Change." *Ecosystems* 11: 961–79.
- Cable, J.M., K. Ogle, R.W. Lucas, T.E. Huxman, M.E. Loik, et al. 2011. "The Temperature Responses of Soil Respiration in Deserts: A Seven Desert Synthesis." *Biogeochemistry* 103: 71–90.
- Cabrera-Bosquet, L., G. Molero, J. Bort, S. Nogués, & J.L. Araus. 2007. "The Combined Effect of Constant Water Deficit and Nitrogen Supply on WUE, NUE and $\Delta^{13}C$ in Durum Wheat Potted Plants." *Annals of Applied Biology* 151(3): 277–89.
- Cabrera, M.L. 2007. "Mineralización Y Nitrificación: Procesos Claves En El Ciclo Del Nitrógeno." *Informaciones Agronómicas del Cono Sur* 34: 9.
- Camilloni, I. 2018. "Ciencia e Investigación." *Ciencia e Investigación* 68(5): 90.
- Carbone, M.S., G.C. Winston, & S.E. Trumbore. 2008. "Soil Respiration in Perennial Grass and Shrub Ecosystems: Linking Environmental Controls with Plant and Microbial Sources on Seasonal and Diel Timescales." *Journal of Geophysical Research* 113(G02022): 1-14.
- Carbonell Silletta, L.M., A. Cavallaro, R. Kowal, D.A. Pereyra, R.A. Silva, et al. 2019. "Temporal and Spatial Variability in Soil CO₂ Efflux in the Patagonian Steppe." *Plant and Soil* 1-12. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04268-7>
- Carlyle, J.C., & U.B. Than. 1988. "Abiotic Controls of Soil Respiration Beneath an Eighteen-Year-Old *Pinus radiata* Stand in South-Eastern Australia." *Journal of Ecology* 76: 654–62.
- Carrera, A.L., C.L. Sain, & M.B. Bertiller. 2000. "Patterns of Nitrogen Conservation in Shrubs and Grasses in the Patagonian." *Plant and Soil* 224: 185–93.
- Carrera, A.L., & M.B. Bertiller. 2010. "Relationships among Plant Litter, Fine Roots, and Soil Organic C and N across an Aridity Gradient in Northern Patagonia, Argentina." *Ecoscience* 17(3): 276–86.

- Cavender-Bares, J. 2005. "Impacts of Freezing on Long-Distance Transport in Woody Plants." *Vascular transport in plants*: 401–24.
- Celaya-Michel, H., & A.E. Castellanos-Villegas. 2011. "Nitrogen Mineralization on Arid and Semi-Arid Land Soil." *Tierra Latinoamericana* 29(3): 343–56.
- Chalcraft, D.R., S.B. Cox, C. Clark, E.E. Cleland, K.N. Suding, et al. 2008. "Scale-Dependent Responses of Plant Biodiversity to Nitrogen Enrichment." *Ecology* 89(8): 2165–71.
- Chang, C.T., S. Sabaté, D. Sperlich, S. Poblador, F. Sabater, et al. 2014. "Does Soil Moisture Overrule Temperature Dependence of Soil Respiration in Mediterranean Riparian Forests?" *Biogeosciences* 11(21): 6173–85.
- Chen, J.W., Q. Zhang, X.S. Li, & K.F. Cao. 2009. "Independence of Stem and Leaf Hydraulic Traits in Six Euphorbiaceae Tree Species with Contrasting Leaf Phenology." *Planta* 230(3): 459–68.
- Chen, S., Y. Bai, L. Zhang, & X. Han. 2005. "Comparing Physiological Responses of Two Dominant Grass Species to Nitrogen Addition in Xilin River Basin of China." *Environmental and Experimental Botany* 53(1): 65–75.
- Chen, W., B. Wolf, X. Zheng, Z. Yao, K. Butterbach-Bahl, et al. 2013. "Carbon Dioxide Emission from Temperate Semiarid Steppe during the Non-Growing Season." *Atmospheric Environment* 64: 141–49.
- Choi, W.J., S.X. Chang, H.L. Allen, D.L. Kelting, & H.M. Ro. 2005. "Irrigation and Fertilization Effects on Foliar and Soil Carbon and Nitrogen Isotope Ratios in a Loblolly Pine Stand." *Forest Ecology and Management* 213(1–3): 90–101.
- Chou, W.W., W.L. Silver, R.D. Jackson, A.W. Thompson, & B. Allen-Diaz. 2008. "The Sensitivity of Annual Grassland Carbon Cycling to the Quantity and Timing of Rainfall." *Global Change Biology* 14(6): 1382–94.
- CIMA. 2015. "Cambios Climáticos En La Región Patagonia, Antártida E Islas Del Atlántico Sur." En: *Cambio Climático En Argentina; Tendencias Y Proyecciones*, 279–341.
- Clearwater, M.J., & F.C. Meinzer. 2001. "Relationships between Hydraulic Architecture and Leaf Photosynthetic Capacity in Nitrogen-Fertilized *Eucalyptus Grandis* Trees." *Tree Physiology* 21: 683–90.
- Collins, S.L., R.L. Sinsabaugh, C. Crenshaw, L. Green, A. Porras-Alfaro, et al. 2008. "Pulse Dynamics and Microbial Processes in Aridland Ecosystems." *Journal of Ecology* 96(3): 413–20.
- Comstock, J.P., & J.R. Ehleringer. 1992. "Correlating Genetic Variation in Carbon Isotopic Composition with Complex Climatic Gradients." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(16): 7747–51.
- Conant, R.T., J.M. Klopatek, & C.C. Klopatek. 2000. "Environmental Factors Controlling Soil Respiration in Three Semiarid Ecosystems." *Soil Science Society of America Journal* 64: 383–90.
- Coopman, R.E., J.C. Jara, R. Escobar, L.J. Corcuera, & L.A. Bravo. 2010. "Genotypic Variation in Morphology and Freezing Resistance of *Eucalyptus globulus* Seedlings Subjected to Drought Hardening in Nursery." *Electronic Journal of Biotechnology* 13(1): 1–9.
- Correia, M.J., F. Torres, & J.S. Pereira. 1989. "Water and Nutrient Supply Regimes and the Water Relations of Juvenile Leaves of *Eucalyptus globulus*." *Tree Physiology* 5(4): 459–71.

- Couso, L.L., & R.J. Fernández. 2012. "Phenotypic Plasticity as an Index of Drought Tolerance in Three Patagonian Steppe Grasses." *Annals of Botany* 110(4): 849–57.
- Cox D.R. & E.J. Snell. 1989. *Analysis of binary data*, 2nd edn. Chapman and Hall/CRC, London.
- Cristiano, P.M., D.A. Pereyra, S.J. Bucci, N. Madanes, F.G. Scholz, et al. 2016. "Remote Sensing and Ground-Based Measurements of Evapotranspiration in an Extreme Cold Patagonian Desert." *Hydrological Processes* 30(24): 4449–61.
- Curiel Yuste, J., I.A. Janssens, A. Carrara, L. Meiresonne, & R. Ceulemans. 2003. "Interactive Effects of Temperature and Precipitation on Soil Respiration in a Temperate Maritime Pine Forest." *Tree Physiology* 23: 1263–70.
- D'Angeli, S., & M.M. Altamura. 2007. "Osmotin Induces Cold Protection in Olive Trees by Affecting Programmed Cell Death and Cytoskeleton Organization." *Planta* 225(5): 1147–63.
- DaMatta, F.M., R.A. Loos, E.A. Silva, & M.E. Loureiro. 2002a. "Limitations to Photosynthesis in *Coffea canephora* as a Result of Nitrogen and Water Availability." *Journal of Plant Physiology* 159(9): 975–81.
- DaMatta, F.M., R.A. Loos, E.A. Silva, & M.E. Loureiro. 2002b. "Effects of Soil Water Deficit and Nitrogen Nutrition on Water Relations and Photosynthesis of Pot-Grown *Coffea canephora* Pierre." *Trees* 16: 555–58.
- Davidson, E.A., E. Belk, & R.D. Boone. 1998. "Soil Water Content and Temperature as Independent or Confounded Factors Controlling Soil Respiration in a Temperate Mixed Hardwood Forest." *Global Change Biology* 4(2): 217–27.
- Davidson, E.A., & I.A. Janssens. 2006. "Temperature Sensitivity of Soil Carbon Decomposition and Feedbacks to Climate Change." *Nature* 440: 165–73.
- Dawson, T.D., S. Mambelli, A.H. Plamboek, P.H. Templer, & K.P. Tu. 2002. "Stable Isotopes in Plant Ecology." *Annual Review of Ecology and Systematics* 33(2002): 507–59.
- DeHayes, D.H., M.A. Ingle, & C.E. Waite. 1989. "Nitrogen Fertilization Enhances Cold Tolerance of Red Spruce Seedlings." *Can. J. For. Res.* 19: 1037–43.
- Deng, Q., D. Hui, D. Zhang, G. Zhou, J. Liu, et al. 2012. "Effects of Precipitation Increase on Soil Respiration: A Three-Year Field Experiment in Subtropical Forests in China." *PLOS ONE* 7(7): e41493.
- Denmead, O.T., F.X. Dunin, S.C. Wong, & E.A.N. Greenwood. 1993. "Measuring Water Use Efficiency of Eucalypt Tress with Chambers and Micrometeorological Techniques." *Journal of Hydrology* 150: 649–64.
- Dentener, F., J. Drevet, J.F. Lamarque, I. Bey, B. Eickhout, et al. 2006. "Nitrogen and Sulfur Deposition on Regional and Global Scales: A Multimodel Evaluation." *Global Biogeochemical Cycles* 20(GB4003):1-21.
- Domec, J.C., & B.L. Gartner. 2003. "Relationship between Growth Rates and Xylem Hydraulic Characteristics in Young, Mature and Old-Growth Ponderosa Pine Trees." *Plant, Cell & Environment* 26(3): 471–83.

- Drake, P.L., & P.J. Franks. 2003. "Water Resource Partitioning, Stem Xylem Hydraulic Properties, and Plant Water Use Strategies in a Seasonally Dry Riparian Tropical Rainforest." *Oecologia* 137(3): 321–29.
- Durante, M., P.H. Maseda, & R.J. Fernández. 2011. "Xylem Efficiency vs. Safety: Acclimation to Drought of Seedling Root Anatomy for Six Patagonian Shrub Species." *Journal of Arid Environments* 75(5): 397–402.
- Duursma, R., & B. Choat. 2017. "Fitplc - an R Package to Fit Hydraulic Vulnerability Curves." *Journal of Plant Hydraulics* 4: 2.
- Elvir, J.A., G.B. Wiersma, M.E. Day, M.S. Greenwood, & I.J. Fernandez. 2006. "Effects of Enhanced Nitrogen Deposition on Foliar Chemistry and Physiological Processes of Forest Trees at the Bear Brook Watershed in Maine." *Forest Ecology and Management* 221(1–3): 207–14.
- Emmett, B.A., C. Beier, M. Estiarte, A. Tietema, H.L. Kristensen, et al. 2004. "The Response of Soil Processes to Climate Change: Results from Manipulation Studies of Shrublands across an Environmental Gradient." *Ecosystems* 7(6): 625–37.
- Epstein, H.E., J.M. Paruelo, G. Piñeiro, I.C. Burke, W.K. Lauenroth, et al. 2006. "Interactions of Water and Nitrogen on Primary Productivity across Spatial and Temporal Scales in Grassland and Shrubland Ecosystems." *Dryland Ecohydrology* (2001): 201–16.
- Eriksson, S.K., M. Kutzer, J. Procek, G. Gröbner, & P. Harryson. 2011. "Tunable Membrane Binding of the Intrinsically Disordered Dehydrin Lti30, a Cold-Induced Plant Stress Protein." *The Plant Cell* 23(6): 2391–2404.
- Euskirchen, E.S., K.S. Pregitzer, & J. Chen. 2006. "Carbon Fluxes in a Young, Naturally Regenerating Jack Pine Ecosystem." *Journal of Geophysical Research* 111(D01101): 1-13.
- Evans, R.D., R.A. Black, & S.O. Link. 1990. "Rehydration-induced Changes in Pressure-volume Relationships of *Artemisia tridentata* Nutt. ssp. *tridentata*." *Plant, Cell & Environment* 13(5): 455–61.
- Ewers, B.E., R. Oren, & J.S. Sperry. 2000. "Influence of Nutrient versus Water Supply on Hydraulic Architecture and Water Balance in *Pinus taeda*." *Plant, Cell & Environment* 23(10): 1055–66.
- Fahnestock, J.T., & J.K. Detling. 1999. "Plant Responses to Defoliation and Resource Supplementation in the Pryor Mountains." *Journal of Range Management* 52(3): 263–70.
- Fan, L.L., Y. Li, L.S. Tang, & J. Ma. 2013. "Combined Effects of Snow Depth and Nitrogen Addition on Ephemeral Growth at the Southern Edge of the Gurbantunggut Desert, China." *Journal of Arid Land* 5(4): 500–510.
- Fan, Z.X., S.B. Zhang, G.Y. Hao, J.W.F. Slik, & K.F. Cao. 2012. "Hydraulic Conductivity Traits Predict Growth Rates and Adult Stature of 40 Asian Tropical Tree Species Better than Wood Density." *Journal of Ecology* 100(3): 732–41.
- Fang, C., & J. Moncrieff. 2001. "The Dependence of Soil CO₂ Efflux on Temperature." *Soil Biology and Biochemistry* 33: 155–65.
- Fang, Y., F. Xun, W. Bai, W. Zhang, & L. Li. 2012. "Long-Term Nitrogen Addition Leads to Loss of Species Richness Due to Litter Accumulation and Soil Acidification in a Temperate Steppe." *PLOS ONE* 7(10): 1–8.

- Farquhar, G.D., M.H. O'Leary, & J.A. Berry. 1982. "On the Relationship between Carbon Isotope Discrimination and the Intercellular Carbon Dioxide Concentration in Leaves." *Aust. J. Plant Physiol.* 9: 121–37.
- Farquhar, G.D., J.R. Ehleringer, & K.T. Hubick. 1989. "Carbon Isotope Discrimination and Photosynthesis." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40(1): 503–37.
- Farquhar, G.D., & T.D. Sharkey. 1982. "Stomatal Conductance and Photosynthesis." *Annual Review of Plant Physiology* 33(1): 317–45.
- Farrell, C., C. Szota, & S.K. Arndt. 2017. "Does the Turgor Loss Point Characterize Drought Response in Dryland Plants?" *Plant, Cell & Environment* 40(8): 1500–1511.
- Feild, T.S., & T. Brodribb. 2001. "Stem Water Transport and Freeze-Thaw Xylem Embolism in Conifers and Angiosperms in a Tasmanian Treeline Heath." *Oecologia* 127(3): 314–20.
- Fernández-Escobar, R., J.M. García-Novelo, & H. Restrepo-Díaz. 2011. "Mobilization of Nitrogen in the Olive Bearing Shoots after Foliar Application of Urea." *Scientia Horticulturae* 127(3): 452–54.
- Fernández, M.E., C.I. Pissolito, & C.B. Passera. 2018. "Water and Nitrogen Supply Effects on Four Desert Shrubs with Potential Use for Rehabilitation Activities." *Plant Ecology* 219(7): 789–802.
- Fernández, R.J. 2007. "On the Frequent Lack of Response of Plants to Rainfall Events in Arid Areas." *Journal of Arid Environments* 68(4): 688–91.
- Fernández, R.J., & J.M. Paruelo. 1988. "Root Systems of Two Patagonian Shrubs: A Quantitative Description Using a Geometrical Method." *Journal of Range Management* 41(3): 220–23.
- Fernández, R.J., O.E. Sala, & R.A. Golluscio. 1991. "Woody and Herbaceous Aboveground Production of a Patagonian Steppe." *Journal of Range Management* 44(5): 434–37.
- Ferreira, T., & W. Rasband. 2012. ImageJ User Guide IJ 1.46r. <http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/guide/user-guide.pdf>.
- Ferrio, J.P., V. Resco, D.G. Williams, L. Serrano, & J. Voltas. 2005. "Stable Isotopes in Arid and Semi-Arid Forest Systems." *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales* 14(3): 371.
- Fisher, F.M., & W.G. Whitford. 1995. "Field Simulation of Wet and Dry Years in the Chihuahuan Desert: Soil Moisture, N Mineralization and Ion-Exchange Resin Bags." *Biology and Fertility of Soils* 20(2): 137–46.
- Fisher, P.M., L.W. Parker, J.P. Anderson, & W.G. Whitford. 1987. "Nitrogen Mineralization in a Desert Soil: Interacting Effects of Soil Moisture and Nitrogen Fertilizer." *Soil Sci. Soc. Am. J.* 51: 1033–41.
- Fisk, M.C., & T.J. Fahey. 2001. "Microbial Biomass and Nitrogen Cycling Responses to Fertilization and Litter Removal in Young Northern Hardwood Forests." *Biogeochemistry* 53(2): 201–23.
- Floistad, I.S. 2002. "Effects of Excessive Nutrient Supply and Short Day Treatment on Autumn Frost Hardiness and Time of Bud Break in *Picea abies* Seedlings." *Scandinavian Journal of Forest Research* 17(4): 295–303.
- Floistad, I.S., & K. Kohmann. 2004. "Influence of Nutrient Supply on Spring Frost Hardiness and Time of Bud Break in Norway Spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) Seedlings." *New Forests* 27(2): 1–11.

- Flombaum, P., L. Yahdjian, & O.E. Sala. 2017. "Global-Change Drivers of Ecosystem Functioning Modulated by Natural Variability and Saturating Responses." *Global Change Biology* 23(2): 503–11.
- Fox, T.R. 2000. "Sustained Productivity in Intensively Managed Forest Plantations." *Forest Ecology and Management* 138(1–3): 187–202.
- Fravolini, A., K.R. Hultine, E. Brugnoli, R. Gazal, N.B. English, et al. 2005. "Precipitation Pulse Use by an Invasive Woody Legume: The Role of Soil Texture and Pulse Size." *Oecologia* 144(4): 618–27.
- Gallardo-Cerda, J., L.A. Bravo, C. Atala, G. Vergara-Quezada, L.J. Corcuera, et al. 2016. "Dehydrins Presence in Xylem Parenchyma Cells Enhances Hydraulic Conductivity and Physiological Performance in *Nothofagus dombeyi*." *South African Journal of Botany* 56: 240–44.
- Galloway, J.N., A.R. Townsend, J.W. Erisman, M. Bekunda, Z. Cai, et al. 2008. "Transformation of the Nitrogen Cycle: Recent Trends, Questions, and Potential Solutions." *Science* 320(5878): 889–92.
- Galloway, J.N., & E.B. Cowling. 2002. "Reactive Nitrogen and the World: 200 Years of Change." *Ambio* 31(2): 64–71.
- Galmés, J., H. Medrano, & J. Flexas. 2007. "Photosynthetic Limitations in Response to Water Stress and Recovery in Mediterranean Plants with Different Growth Forms." *New Phytologist* 175(1): 81–93.
- Gao, Y.Z., Q. Chen, S. Lin, M. Giese, & H. Brueck. 2011. "Resource Manipulation Effects on Net Primary Production, Biomass Allocation and Rain-Use Efficiency of Two Semiarid Grassland Sites in Inner Mongolia, China." *Oecologia* 165: 855–64.
- Garcia, A.L., V. Fuentes, & J. Gallego. 1996. "Influence of Nitrogen Supply on Osmoregulation in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Plants under Moderate Water Stress." *Plant Science* 115(1): 33–38.
- Garner, W., & Y. Steinberger. 1989. "A Proposed Mechanism for the Formation Of 'fertile Islands' in the Desert Ecosystem." *Journal of Arid Environments* 16(3): 257–62.
- Geßler, A., S. Schrempp, A. Matzarakis, H. Mayer, H. Rennenberg, et al. 2001. "Radiation Modifies the Effect of Water Availability on the Carbon Isotope Composition of Beech (*Fagus sylvatica*)." *New Phytologist* 150(3): 653–64.
- Gherardi, L.A., O.E. Sala, & L. Yahdjian. 2013. "Preference for Different Inorganic Nitrogen Forms among Plant Functional Types and Species of the Patagonian Steppe." *Oecologia* 173(3): 1075–81.
- Giardina, C.P., D. Binkley, M.G. Ryan, J.H. Fownes, & R.S. Senock. 2004. "Belowground Carbon Cycling in a Humid Tropical Forest Decreases with Fertilization." *Oecologia* 139(4): 545–50.
- Giardina, C.P., M.G. Ryan, D. Binkley, & J.H. Fownes. 2003. "Primary Production and Carbon Allocation in Relation to Nutrient Supply in a Tropical Experimental Forest." *Global Change Biology* 9(10): 1438–50.
- Gleason, S.M., D.W. Butler, & P. Waryszak. 2013. "Shifts in Leaf and Stem Hydraulic Traits across Aridity Gradients in Eastern Australia." *International Journal of Plant Sciences* 174(9): 1292–1301.

- Gleeson, S.K. 1993. "Optimization of Tissue Nitrogen and Root-Shoot Allocation." *Annals of Botany* 71(1): 23–31.
- Goldstein, G., F. Meinzer, & M. Monasterio. 1985. "Physiological and Mechanical Factors in Relation to Size-Dependent Mortality in a Andean Giant Rosette Species." *Acta Oecologica* 6 (3): 263–75.
- Golluscio, A., E. Sala, & K. Lauenroth. 1998. "Differential Use of Large Summer Rainfall Events by Shrubs and Grasses: A Manipulative Experiment in the Patagonian Steppe." *Oecologia* 115: 17–25.
- Golluscio, R., A. Faigón, & M. Tanke. 2006. "Spatial Distribution of Roots and Nodules, and $\delta^{15}\text{N}$ Evidence of Nitrogen Fixation in *Adesmia volckmanni*, a Patagonian Leguminous Shrub." *Journal of Arid Environments* 67: 328–35.
- Golluscio, R.A., & M. Oesterheld. 2007. "Water Use Efficiency of Twenty-Five Co-Existing Patagonian Species Growing under Different Soil Water Availability." *Oecologia* 154: 207–17.
- Golluscio, R.A., F.P. Cavagnaro, & Y.M.D. Valenta. 2011. "Arbustos de La Estepa Patagónica: ¿adaptados a Tolerar La Sequía O El Pastoreo?" *Ecología Austral* 21: 61–70.
- Golluscio, R.A., V. Sigal Escalada, & J. Pérez. 2009. "Minimal Plant Responsiveness to Summer Water Pulses: Ecophysiological Constraints of Three Species of Semiarid Patagonia." *Rangeland Ecology & Management* 62: 171–78.
- Golluscio, R.A., & O.E. Sala. 1993. "Plant Functional Types and Ecological Strategies in Patagonian Forbs." *Journal of Vegetation Science* 4: 839–46.
- Gonzalez-Polo, M., & A.T. Austin. 2009. "Spatial Heterogeneity Provides Organic Matter Refuges for Soil Microbial Activity in the Patagonian Steppe, Argentina." *Soil Biology and Biochemistry* 41: 1348–51.
- Goulding, K.W.T., N.J. Bailey, N.J. Bradbury, P. Hargreaves, M. Howe, et al. 1998. "Nitrogen Deposition and Its Contribution to Nitrogen Cycling and Associated Soil Processes." *New Phytologist* 139(1): 49–58+59.
- Green, E.K., & S.M. Galatowitsch. 2002. "Effects of *Phalaris arundinacea* and Nitrate-N Addition on the Establishment of Wetland Plant Communities." *Journal of Applied Ecology* 39(1): 134–44.
- Green, T.H., & R.J. Mitchell. 1992. "Effects of Nitrogen on the Response of Loblolly Pine to Water Stress I. Photosynthesis and Stomatal Conductance." *New Phytologist* 122(4): 627–33.
- Gruber, N., & J.N. Galloway. 2008. "An Earth-System Perspective of the Global Nitrogen Cycle." *Nature* 451(7176): 293–96.
- Gutierrez, J.R., & W.G. Whitford. 1987. "Chihuahuan Desert Annuals: Importance of Water and Nitrogen." *Ecology* 68(6): 2032–45.
- Gutierrez, J.R., O.A. Da Silva, M.I. Pagani, D. Weems, & W.G. Whitford. 1988. "Effects of Different Patterns of Supplemental Water and Nitrogen Fertilization on Productivity and Composition of Chihuahuan Desert Annual Plants." *American Midland Naturalist* 119(2): 336.
- Guyot, G., C. Scoffoni, & L. Sack. 2012. "Combined Impacts of Irradiance and Dehydration on Leaf Hydraulic Conductance: Insights into Vulnerability and Stomatal Control." *Plant, Cell & Environment* 35(5): 857–71.

- Hacke, U.G., J.S. Sperry, W.T. Pockman, S.D. Davis, & K.A. McCulloh. 2001. "Trends in Wood Density and Structure Are Linked to Prevention of Xylem Implosion by Negative Pressure." *Oecologia* 126(4): 457–61.
- Hacke, U.G., L. Plavcová, A. Almeida-Rodriguez, S. King-Jones, W. Zhou, et al. 2010. "Influence of Nitrogen Fertilization on Xylem Traits and Aquaporin Expression in Stems of Hybrid Poplar." *Tree Physiology* 30(8): 1016–25.
- Hacke, U.G., J.S. Sperry, J.K. Wheeler, & L. Castro. 2006. "Scaling of Angiosperm Xylem Structure with Safety and Efficiency." *Tree Physiology* 26(6): 689–701.
- Hagedorn, F., J.B. Bucher, & P. Schleppei. 2001. "Contrasting Dynamics of Dissolved Inorganic and Organic Nitrogen in Soil and Surface Waters of Forested Catchments with Gleysols." *Geoderma* 100(1–2): 173–92.
- Hall, S.J., R.A. Sponseller, N.B. Grimm, D. Huber, J.P. Kaye, et al. 2011. "Ecosystem Response to Nutrient Enrichment across an Urban Airshed in the Sonoran Desert." *Ecological Applications* 21(3): 640–60.
- Han, C., T. Liu, L. Duan, S. Zhang, & V.P. Singh. 2017. "Spatio-Temporal Distribution of Soil Respiration in Dune-Meadow Cascade Ecosystems in the Horqin Sandy Land, China." *CATENA* 157: 397–406.
- Han, G., Y. Luo, D. Li, J. Xia, Q. Xing, et al. 2014a. "Ecosystem Photosynthesis Regulates Soil Respiration on a Diurnal Scale with a Short-Term Time Lag in a Coastal Wetland." *Soil Biology and Biochemistry* 68: 85–94.
- Han, G., Q. Xing, Y. Luo, R. Rafique, J. Yu, et al. 2014b. "Vegetation Types Alter Soil Respiration and Its Temperature Sensitivity at the Field Scale in an Estuary Wetland." *PLOS ONE* 9(3): e91182.
- Han, T., W. Huang, J. Liu, G. Zhou, & Y. Xiao. 2015. "Different Soil Respiration Responses to Litter Manipulation in Three Subtropical Successional Forests." *Scientific Reports* 5: 18166.
- Hanson, P.J., N.T. Edwards, C.T. Garten, & J.A. Andrews. 2000. "Separating Root and Soil Microbial Contributions to Soil Respiration: A Review of Methods and Observations." *Biogeochemistry* 48(1): 115–46.
- Harpole, W.S., D.L. Potts, & K.N. Suding. 2007. "Ecosystem Responses to Water and Nitrogen Amendment in a California Grassland." *Global Change Biology* 13(11): 2341–48.
- Haynes, B.E., & S.T. Gower. 1995. "Belowground Carbon Allocation in Unfertilized and Fertilized Red Pine Plantations in Northern Wisconsin." *Tree Physiology* 15(5): 317–25.
- Heisler-White, J.L., J.M. Blair, E.F. Kelly, K. Harmony, & A.K. Knapp. 2009. "Contingent Productivity Responses to More Extreme Rainfall Regimes across a Grassland Biome." *Global Change Biology* 15(12): 2894–2904.
- Hellergren, J. 1981. "Frost Hardiness Development in *Pinus silvestris* Seedlings in Response to Fertilization." *Physiologia Plantarum* 52(2): 297–301.
- Helmuth, B., J.G. Kingsolver, & E. Carrington. 2005. "Biophysics, Physiological Ecology and Climate Change: Does Mechanism Matter?" *Annual Review of Physiology* 67: 177–201.

- Henry, H.A.L., J.S. Hutchison, M.K. Kim, & B.D. McWhirter. 2014. "Context Matters for Warming: Interannual Variation in Grass Biomass Responses to 7 Years of Warming and N Addition." *Ecosystems* 18(1): 103–14.
- Hoffmann, W.A., R.M. Marchin, P. Abit, & O.L. Lau. 2011. "Hydraulic Failure and Tree Dieback Are Associated with High Wood Density in a Temperate Forest under Extreme Drought." *Global Change Biology* 17(8): 2731–42.
- Högberg, P., C. Johnsson, M. Högbom, T. Näsholm, et al. 1995. "Measurements of Abundances of ^{15}N and ^{13}C as Tools in Retrospective Studies of N Balances and Water Stress in Forests: A Discussion of Preliminary Results." *Plant and Soil* 168–169(1): 125–33.
- Högberg, P., A. Nordgren, N. Buchmann, A.F.S. Taylor, A. Ekblad, et al. 2001. "Large-Scale Forest Girdling Shows That Current Photosynthesis Drives Soil Respiration." *Nature* 411(6839): 789–92.
- Högberg, P., H. Fan, M. Quist, D. Binkley, & C.O. Tamm. 2006. "Tree Growth and Soil Acidification in Response to 30 Years of Experimental Nitrogen Loading on Boreal Forest." *Global Change Biology* 12(3): 489–99.
- Hooper, D.U., & L. Johnson. 1999. "Nitrogen Limitation in Dryland Ecosystems: Responses to Geographical and Temporal Variation in Precipitation." *Biogeochemistry* 46: 247–93.
- Hu, L., H. Yang, W. Wang, & J. Guo. 2009. "Soil Nutrient Responses to One Year of Simulated Global Warming and Nitrogen Deposition on the Songnen Meadow Steppes, Northeast China." En 2009 3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering (pp. 1-6). IEEE.
- Hubick, K., & G. Farquhar. 1989. "Carbon Isotope Discrimination and the Ratio of Carbon Gained to Water Lost in Barley Cultivars." *Plant, Cell & Environment* 12(8): 795–804.
- Hultine, K.R., & J.D. Marshall. 2000. "Altitude Trends in Conifer Leaf Morphology and Stable Carbon Isotope Composition." *Oecologia* 123(1): 32–40.
- Hursh, A., A. Ballantyne, L. Cooper, M. Maneta, J. Kimball, et al. 2017. "The Sensitivity of Soil Respiration to Soil Temperature, Moisture, and Carbon Supply at the Global Scale." *Global Change Biology* 23(5): 2090–2103.
- Huxman, T.E., M.D. Smith, P.A. Fay, A.K. Knapp, M.R. Shaw, et al. 2004a. "Convergence across Biomes to a Common Rain-Use Efficiency." *Nature* 429(6992): 651–54.
- Huxman, T.E., K.A. Snyder, D. Tissue, A.J. Leffler, K. Ogle, et al. 2004b. "Precipitation Pulses and Carbon Fluxes in Semiarid and Arid Ecosystems." *Oecologia* 141(2): 254–68.
- Iogna, P.A., S.J. Bucci, F.G. Scholz, & G. Goldstein. 2011. "Water Relations and Hydraulic Architecture of Two Patagonian Steppe Shrubs: Effect of Slope Orientation and Microclimate." *Journal of Arid Environments* 75(9): 763–72.
- Iogna, P.A., S.J. Bucci, F.G. Scholz, & G. Goldstein. 2013. "Homeostasis in Leaf Water Potentials on Leeward and Windward Sides of Desert Shrub Crowns: Water Loss Control vs. High Hydraulic Efficiency." *Oecologia* 173(3): 675–87.
- Iversen, C.M., S.D. Bridgham, & L.E. Kellogg. 2010. "Scaling Plant Nitrogen Use and Uptake Efficiencies in Response to Nutrient Addition in Peatlands." *Ecology* 91(3): 693–707.

- Jacobsen, A.L., R.B. Pratt, F.W. Ewers, & S.D. Davis. 2007. "Cavitation Resistance among 26 Chaparral Species of Southern California." *Ecological Monographs* 77(1): 99–115.
- Janssens, I.A., W. Dieleman, S. Luysaert, J.A. Subke, M. Reichstein, et al. 2010. "Reduction of Forest Soil Respiration in Response to Nitrogen Deposition." *Nature Geoscience* 3(5): 315–22.
- Jarvis, P., A. Rey, C. Petsikos, L. Wingate, M. Rayment, et al. 2007. "Drying and Wetting of Mediterranean Soils Stimulates Decomposition and Carbon Dioxide Emission: the 'Birch Effect.'" *Tree Physiology* 27(7): 929–40.
- Jefferies, R.L., & J.L. Maron. 1997. "The Embarrassment of Riches: Atmospheric Deposition of Nitrogen and Community and Ecosystem Processes." *TREE* 12: 74–78.
- Jenkinson, D.S., K. Coleman, & D.D. Harkness. 1995. "The Influence of Fertilizer Nitrogen and Season on the Carbon-13 Abundance of Wheat Straw." *Plant and Soil* 171(2): 365–67.
- Jia, B., G. Zhou, & W. Yuan. 2007. "Modeling and Coupling of Soil Respiration and Soil Water Content in Fenced *Leymus chinensis* Steppe, Inner Mongolia." *Ecological Modelling* 201(2): 157–62.
- Jobbágy, E.G., & O.E. Sala. 2000. "Controls of grass and shrub aboveground production in the patagonian steppe." *Ecological Applications* 10(2): 541–49.
- Kelliher, F.M., D.J. Ross, B.E. Law, D.D. Baldocchi, & N.J. Rodda. 2004. "Limitations to Carbon Mineralization in Litter and Mineral Soil of Young and Old Ponderosa Pine Forests." *Forest Ecology and Management* 191(1–3): 201–13.
- Kellomäki, S., & K.Y. Wang. 1997. "Photosynthetic Responses of Scots Pine to Elevated CO₂ and Nitrogen Supply: Results of a Branch-in-Bag Experiment." *Tree Physiology* 17(4): 231–40.
- Korol, R.L., M.U.F. Kirschbaum, G.D. Farquhar, & M. Jeffreys. 1999. "Effects of Water Status and Soil Fertility on the C-Isotope Signature in *Pinus radiata*." *Tree Physiology* 19(9): 551–62.
- Kowaljow, E., & R.J. Fernández. 2011. "Differential Utilization of a Shallow-Water Pulse by Six Shrub Species in the Patagonian Steppe." *Journal of Arid Environments* 75: 211–14.
- Kowaljow, E., & J. Mazzarino. 2007. "Soil Restoration in Semiarid Patagonia : Chemical and Biological Response to Different Compost Quality." *Soil Biology & Biochemistry* 39: 1580–88.
- Kowaljow, E., M.J. Mazzarino, P. Satti, & C. Jiménez-Rodríguez. 2010. "Organic and Inorganic Fertilizer Effects on a Degraded Patagonian Rangeland." *Plant and Soil* 332: 135–45.
- Kozovits, A.R., M.M.C. Bustamante, C.R. Garofalo, S.J. Bucci, A.C. Franco, et al. 2007. "Nutrient Resorption and Patterns of Litter Production and Decomposition in a Neotropical Savanna." *Functional Ecology* 21: 1034–43.
- Kramer, P.J. 1983. "Problems in Water Relations of Plants and Cells." *International Review of Cytology* 85(C): 253–86.
- Kreyling, J., G.L.B. Wiesenberg, D. Thiel, C. Wohlfart, G. Huber, et al. 2012. "Cold Hardiness of *Pinus nigra* Arnold as Influenced by Geographic Origin, Warming, and Extreme Summer Drought." *Environmental and Experimental Botany* 78: 99–108.
- Kumar, A., & S.C. Bhatla. 2006. "Polypeptide Markers for Low Temperature Stress during Seed Germination in Sunflower." *Biologia Plantarum* 50(1): 81–86.

- Ladjal, M., R. Huc, & M. Ducrey. 2005. "Drought Effects on Hydraulic Conductivity and Xylem Vulnerability to Embolism in Diverse Species and Provenances of Mediterranean Cedars." *Tree Physiology* 25(9): 1109–17.
- Ladwig, L.M., S.L. Collins, A.L. Swann, Y. Xia, M.F. Allen, et al. 2012. "Above- and Belowground Responses to Nitrogen Addition in a Chihuahuan Desert Grassland." *Oecologia* 169: 177–85.
- Lai, L., X. Zhao, L. Jiang, Y. Wang, L. Luo, et al. 2012. "Soil Respiration in Different Agricultural and Natural Ecosystems in an Arid Region." *PLOS ONE* 7(10): e48011.
- Lai, L., J. Wang, Y. Tian, X. Zhao, L. Jiang, et al. 2013. "Organic Matter and Water Addition Enhance Soil Respiration in an Arid Region." *PLOS ONE* 8(10): e77659.
- Lamarque, J.F., J.T. Kiehl, G.P. Brasseur, T. Butler, P. Cameron-Smith, et al. 2005. "Assessing Future Nitrogen Deposition and Carbon Cycle Feedback Using a Multimodel Approach: Analysis of Nitrogen Deposition." *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 110(19): 1–21.
- Lannes, L.S., M.M.C. Bustamante, P.J. Edwards, & H.O. Venterink. 2016. "Native and Alien Herbaceous Plants in the Brazilian Cerrado Are (Co-)Limited by Different Nutrients." *Plant and Soil* 400(1–2): 231–43.
- Lauenroth, W.K., J.L. Dodd, & P.L. Sims. 1978. "The Effects of Water- and Nitrogen-Induced Stresses on Plant Community Structure in a Semiarid Grassland." *Oecologia* 36(2): 211–22.
- Lauenroth, W.K., I.C. Burke, & J.M. Paruelo. 2000. "Patterns of Production and Precipitation-Use Efficiency of Winter Wheat and Native Grasslands in the Central Great Plains of the United States." *Ecosystems* 3(4): 344–51.
- LeBauer, D., & K. Treseder. 2008. "Nitrogen Limitation of Net Primary Productivity." *Ecology* 89(2): 371–79.
- Lee, K., & S. Jose. 2003. "Soil Respiration, Fine Root Production, and Microbial Biomass in Cottonwood and Loblolly Pine Plantations along a Nitrogen Fertilization Gradient." *Forest Ecology and Management* 185: 263–73.
- Leffler, A.J., & B.J. Enquist. 2002. "Carbon Isotope Composition of Tree Leaves from Guanacaste, Costa Rica: Comparison across Tropical Forests and Tree Life History." *Journal of Tropical Ecology* 18(1): 151–59.
- Leva, P.E., M.R. Aguiar, & M. Oesterheld. 2009. "Underground Ecology in a Patagonian Steppe: Root Traits Permit Identification of Graminoid Species and Classification into Functional Types." *Journal of Arid Environments* 73: 428–34.
- Li, J., S. Lin, & F. Taube. 2011. "Above and Belowground Net Primary Productivity of Grassland Influenced by Supplemental Water and Nitrogen in Inner Mongolia." *Plant and Soil* 340(1-2), 253-264.
- Likens, G.E., C.T. Driscoll, & D.C. Buso. 1996. "Long-Term Effects of Acid Rain: Response and Recovery of a Forest Ecosystem." *Science* 272(5259): 244–46.
- Ling-Hao, L., H. Xing-Guo, W. Qi-Bing, C. Quan-Sheng, Z. Yan, et al. 2002. "Correlations Between Plant Biomass and Soil Respiration in a *Leymus chinensis* Community in the Xilin River Basin of Inner Mongolia." *Acta Botanica Sinica* 44(5): 593–97.

- Lioubimtseva, E., & R. Cole. 2006. "Uncertainties of Climate Change in Arid Environments of Central Asia." *Reviews in Fisheries Science* 14(1–2): 29–49.
- Lipp, C.C., G. Goldstein, F.C. Meinzer, & W. Niemczura. 1994. "Freezing Tolerance and Avoidance in High-elevation Hawaiian Plants." *Plant, Cell & Environment* 17(9): 1035–44.
- Liu, W., Z. Zhang, & S. Wan. 2009. "Predominant Role of Water in Regulating Soil and Microbial Respiration and Their Responses to Climate Change in a Semiarid Grassland." *Global Change Biology* 15: 184–95.
- Livingston, N.J., R.D. Guy, Z.J. Sum, & G.J. Ethier. 1999. "The Effects of Nitrogen Stress on the Stable Carbon Isotope Composition, Productivity and Water Use Efficiency of White Spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) Seedlings." *Plant, Cell & Environment* 22(3): 281–89.
- Lloyd, J., & G.D. Farquhar. 1994. "¹³C Discrimination during CO₂ Assimilation by the Terrestrial Biosphere." *Oecologia* 99(3–4): 201–15.
- Lopez, F.B., & P.S. Nobel. 1991. "Root Hydraulic Conductivity of Two Cactus Species in Relation to Root Age, Temperature, and Soil Water Status." *Journal of Experimental Botany* 42(235): 143–49.
- Lü, C., & H. Tian. 2007. "Spatial and Temporal Patterns of Nitrogen Deposition in China: Synthesis of Observational Data." *Journal of Geophysical Research Atmospheres* 112(22): 1–10.
- Lü, X.T., F.A. Dijkstra, D.L. Kong, Z.W. Wang, & X.G. Han. 2014. "Plant Nitrogen Uptake Drives Responses of Productivity to Nitrogen and Water Addition in a Grassland." *Scientific reports* 4(4817): 1–7.
- Maestre, F.T., & J. Cortina. 2003. "Small-Scale Spatial Variation in Soil CO₂ Efflux in a Mediterranean Semiarid Steppe." *Applied Soil Ecology* 23(3): 199–209.
- Maherali, H., & E.H. DeLucia. 2000. "Xylem Conductivity and Vulnerability to Cavitation of Ponderosa Pine Growing in Contrasting Climates." *Tree Physiology* 20(13): 859–67.
- Maherali, H., W.T. Pockman, & R.B. Jackson. 2004. "Adaptive variation in the vulnerability of woody plants to xylem cavitation." *Ecology* 85(8): 2184–99.
- Malyshev, A.V., & H.A.L. Henry. 2012. "Frost Damage and Winter Nitrogen Uptake by the Grass *Poa pratensis* L.: Consequences for Vegetative versus Reproductive Growth." *Plant Ecology* 213(11): 1739–47.
- Mangiafico S.S. 2015. *An R companion for the handbook of biological statistics, version 1.09c*. New Brunswick, NJ: Rutgers cooperative extension, 274 p. Available from: <http://rcompanion.org/documents/RCompanionBioStatistics.pdf>.
- Manzoni, S., G. Vico, G. Katul, S. Palmroth, R.B. Jackson, et al. 2013. "Hydraulic Limits on Maximum Plant Transpiration and the Emergence of the Safety-Efficiency Trade-Off." *New Phytologist* 198(1): 169–78.
- Marschner, H., E.A. Kirkby, & I. Cakmak. 1996. "Effect of Mineral Nutritional Status on Shoot-Root Partitioning of Photoassimilates and Cycling of Mineral Nutrients." *Journal of Experimental Botany* 47: 1255–63.

- Martin, J.G., & P.V. Bolstad. 2009. "Variation of Soil Respiration at Three Spatial Scales: Components within Measurements, Intra-Site Variation and Patterns on the Landscape." *Soil Biology and Biochemistry* 41(3): 530–43.
- Martínez-Cabrera, H.I., C.S. Jones, S. Espino, & H.J. Schenk. 2009. "Wood Anatomy and Wood Density in Shrubs: Responses to Varying Aridity along Transcontinental Transects." *American Journal of Botany* 96(8): 1388–98.
- Martínez-Vilalta, J., & W.T. Pockman. 2002. "The Vulnerability to Freezing-Induced Xylem Cavitation of *Larrea tridentata* (Zygophyllaceae) in the Chihuahuan Desert." *American Journal of Botany* 89(12): 1916–24.
- Mason Earles, J., O. Sperling, L.C.R. Silva, A.J. Mcelrone, C.R. Brodersen, et al. 2016. "Bark Water Uptake Promotes Localized Hydraulic Recovery in Coastal Redwood Crown." *Plant, Cell & Environment* 39(2): 320–28.
- Matteucci, S. D., & Colma, A. 1982. *Metodología para el estudio de la vegetación. Monografía, 22.*
- Mazzarino, M.J., M. Bertiller, T. Schlichter, & M. Gobbi. 1998. "Nutrient Cycling in Patagonian Ecosystems." *Ecología Austral* 8: 167–81.
- McCulloh, K.A., D.M. Johnson, F.C. Meinzer, S.L. Voelker, B. Lachenbruch, et al. 2012. "Hydraulic Architecture of Two Species Differing in Wood Density: Opposing Strategies in Co-Occurring Tropical Pioneer Trees." *Plant, Cell & Environment* 35(1): 116–25.
- McDowell, N.G., W.T. Pockman, C.D. Allen, D.D. Breshears, N. Cobb, et al. 2008. "Mechanisms of Plant Survival and Mortality during Drought: Why Do Some Plants Survive While Others Succumb to Drought?" *New Phytologist* 178: 719–39.
- McDowell, N.G., & C.D. Allen. 2015. "Darcy's Law Predicts Widespread Forest Mortality under Climate Warming." *Nature Climate Change* 5(7): 669–72.
- Mckee, K.L., I.C. Feller, M. Popp, & W. Wanek. 2002. "Mangrove Isotopic ($\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$) Fractionation across a Nitrogen vs. Phosphorus Limitation Gradient." *Ecology* 83(4): 1065–75.
- McLendon, T., & E.F. Redente. 1991. "Nitrogen and Phosphorus Effects on Secondary Succession Dynamics on a Semi-Arid Sagebrush Site." *Ecology* 72(6): 2016–24.
- McMahon, S.M., S.P. Harrison, W.S. Armbruster, P.J. Bartlein, C.M. Beale, et al. 2011. "Improving Assessment and Modelling of Climate Change Impacts on Global Terrestrial Biodiversity." *Trends in Ecology & Evolution* 26(5): 249–59.
- McNaughton, S.J., M. Oesterheld, D.A. Frank, & K.J. Williams. 1989. "Ecosystem-Level Patterns of Primary Productivity and Herbivory in Terrestrial Habitats." *Nature* 341: 142–44.
- Medeiros, J.S., & W.T. Pockman. 2011. "Drought Increases Freezing Tolerance of Both Leaves and Xylem of *Larrea tridentata*." *Plant, Cell & Environment* 34(1): 43–51.
- Medici, L.O., R.A. Azevedo, L.P. Canellas, A.T. Machado, & C. Pimentel. 2007. "Stomatal Conductance of Maize under Water and Nitrogen Deficits." *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 42(4): 599–601.
- Meinzer, F.C., N.Z. Saliendra, & C.H. Crisosto. 1992. "Carbon Isotope Discrimination and Gas Exchange in *Coffea arabica* during Adjustment to Different Soil Moisture Regimes." *Australian Journal of Plant Physiology* 19: 171–84.

- Meinzer, F.C., D.M. Johnson, B. Lachenbruch, K.A. McCulloh, & D.R. Woodruff. 2009. "Xylem Hydraulic Safety Margins in Woody Plants: Coordination of Stomatal Control of Xylem Tension with Hydraulic Capacitance." *Functional Ecology* 23(5): 922–30.
- Meinzer, F.C., K.A. McCulloh, B. Lachenbruch, D.R. Woodruff, & D.M. Johnson. 2010. "The Blind Men and the Elephant: The Impact of Context and Scale in Evaluating Conflicts between Plant Hydraulic Safety and Efficiency." *Oecologia* 164: 287–96.
- Meinzer, F.C., G. Goldstein, & D.A. Grantz. 1990. "Carbon Isotope Discrimination in Coffee Genotypes Grown under Limited Water Supply." *Plant Physiology* 92(1): 130–35.
- Michener, R.H., & K. Lajtha (Eds.). 2007. *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*. Blackwell Publishing. 566 p.
- Milchunas, D.G., & W.K. Lauenroth. 1993. "Quantitative Effects of Grazing on Vegetation and Soils over a Global Range of Environments." *Ecological Monographs* 63(4): 327–66.
- Miller, B.D., & V.R. Timmer. 1994. "Steady-State Nutrition of *Pinus resinosa* Seedlings: Response to Nutrient Loading, Irrigation and Hardening Regimes." *Tree Physiology* 14(12): 1327–38.
- Miller, J.M., R.J. Williams, & G.D. Farquhar. 2001. "Carbon Isotope Discrimination by a Sequence of Eucalyptus Species along a Subcontinental Rainfall Gradient in Australia." *Functional Ecology* 15(2): 222–32.
- Morgan, J.A. 1986. "The Effects of N Nutrition on the Water Relations and Gas Exchange Characteristics of Wheat (*Triticum aestivum* L.)." *Plant Physiology* 80(1): 52–58.
- Naithani, K.J., B.E. Ewers, & E. Pendall. 2012. "Sap Flux-Scaled Transpiration and Stomatal Conductance Response to Soil and Atmospheric Drought in a Semi-Arid Sagebrush Ecosystem." *Journal of Hydrology* 464–465: 176–85.
- Nardini, A., & J. Luglio. 2014. "Leaf Hydraulic Capacity and Drought Vulnerability: Possible Trade-Offs and Correlations with Climate across Three Major Biomes." *Functional Ecology* 28(4): 810–18.
- Nardini, A., & M.T. Tyree. 1999. "Root and Shoot Hydraulic Conductance of Seven *Quercus* Species." *Annals of Forest Science* 56(5): 371–77.
- Navarrete-Campos, D., L.A. Bravo, R.A. Rubilar, V. Emhart, & R. Sanhueza. 2013. "Drought Effects on Water Use Efficiency, Freezing Tolerance and Survival of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus globulus* x *nitens* Cuttings." *New Forests* 44(1): 119–34.
- Niu, S., H. Yang, Z. Zhang, M. Wu, Q. Lu, et al. 2009. "Non-Additive Effects of Water and Nitrogen Addition on Ecosystem Carbon Exchange in a Temperate Steppe." *Ecosystems* 12(6): 915–26.
- Niu, S., M. Wu, Y. Han, J. Xia, Z. Zhang, et al. 2010. "Nitrogen Effects on Net Ecosystem Carbon Exchange in a Temperate Steppe." *Global Change Biology* 16(1): 144–55.
- Niu, S., & S. Wan. 2008. "Warming Changes Plant Competitive Hierarchy in a Temperate Steppe in Northern China." *Journal of Plant Ecology* 1(2): 103–10.
- Ogle, K., J.J. Barber, C. Willson, & B. Thompson. 2009. "Hierarchical Statistical Modeling of Xylem Vulnerability to Cavitation." *New Phytologist* 182: 541–54.
- Olsen S.R., C.V. Cole, F.S. Watanabe, & L.A. Dean. 1954. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. Circular no. 939. USDA.

- Oñatibia, G.R., M.R. Aguiar, & M. Semmartin. 2015. "Are There Any Trade-Offs between Forage Provision and the Ecosystem Service of C and N Storage in Arid Rangelands?" *Ecological Engineering* 77: 26–32.
- Oñatibia, G.R., M.F. Reyes, & M.R. Aguiar. 2017. "Fine-Scale Root Community Structure and below-Ground Responses to Grazing Show Independence from above-Ground Patterns." *Journal of Vegetation Science* 28(6): 1097–1106.
- Oñatibia, G.R., M.R. Aguiar, P.A. Cipriotti, & F. Troiano. 2010. "Individual Plant and Population Biomass of Dominant Shrubs in Patagonian Grazed Fields." *Ecología Austral* 20: 269–79.
- Oyarzabal, M., J. Clavijo, L. Oakley, F. Biganzoli, P. Tognetti, et al. 2018. "Unidades de Vegetación de La Argentina." *Ecología Austral* 28(1): 040–063.
- Paruelo, J.M., A. Beltrán, E.G. Jobbágy, O.E. Sala, & R.A. Golluscio. 1998a. "The Climate of Patagonia: General Patterns and Controls on Biotic Processes." *Ecología Austral* 8: 85–101.
- Paruelo, J.M., E.G. Jobbágy, O.E. Sala, W.K. Lauenroth, & I.C. Burke. 1998b. "Functional and structural convergence of temperate grassland and shrubland ecosystems." *Ecological Applications* 8(1): 194–206.
- Paruelo, J.M., W.K. Lauenroth, I.C. Burke, & O.E. Sala. 1999. "Grassland Precipitation-Use Efficiency Varies across a Resource Gradient." *Ecosystems* 2: 64–68.
- Paruelo, J.M., & O.E. Sala. 1995. "Water Losses in the Patagonian Steppe: A Modelling Approach." *Ecology* 76(2): 510–20.
- Paruelo, J.M., O.E. Sala, and A.B. Beltrán. 2000. "Long-Term Dynamics of Water and Carbon in Semi-Arid Ecosystems: A Gradient Analysis in the Patagonian Steppe." *Plant Ecology* 150: 133–43.
- Pearce, R.S. 2001. "Plant Freezing and Damage." *Annals of Botany* 87(4): 417–24.
- Pepper I.L., & C.P. Gerba. 2015. Cultural methods. In: Pepper I.L., C.P. Gerba, & T.J. Gentry (eds) *environmental microbiology*, 3rd edn. Pp 195-212 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394626-3.00010-7>.
- Perakis, S.S., D.A. Maguire, T.D. Bullen, K. Cromack, R.H. Waring, et al. 2006. "Coupled Nitrogen and Calcium Cycles in Forests of the Oregon Coast Range." *Ecosystems* 9(1): 63–74.
- Perakis, S.S., E.R. Sinkhorn, C.E. Catricala, T.D. Bullen, J.A. Fitzpatrick, et al. 2013. "Forest Calcium Depletion and Biotic Retention along a Soil Nitrogen Gradient." *Ecological Applications* 23(8): 1947–61.
- Pereyra, D.A., S.J. Bucci, N.S. Arias, N. Ciano, P.M. Cristiano, et al. 2017. "Grazing Increases Evapotranspiration without the Cost of Lowering Soil Water Storages in Arid Ecosystems." *Ecohydrology* 10(6): 1–12.
- Peri, P.L., H. Bahamonde, & R. Christiansen. 2015. "Soil Respiration in Patagonian Semiarid Grasslands under Contrasting Environmental and Use Conditions." *Journal of Arid Environments* 119: 1–8.
- Peri, P.L. 2011. "Carbon Storage in Cold Temperate Ecosystems in Southern Patagonia, Argentina." *En Biomass and Remote Sensing of Biomass*, ed. Islam Atazadeh. InTech, 213–26.
- Pescador, D.S., A.M. Sánchez, A.L. Luzuriaga, A. Sierra-Almeida, & A. Escudero. 2018. "Winter Is Coming: Plant Freezing Resistance as a Key Functional Trait for the Assembly of Annual Mediterranean Communities." *Annals of Botany* 121(2): 335–44.

- Pinheiro, J.C., & D.M. Bates. 2000. *Mixed effects Models in S and S-PLUS*. New York: Springer.
- Pivovarov, A.L., L.S. Santiago, G.L. Vourlitis, D.A. Grantz, & M.F. Allen. 2016. "Plant Hydraulic Responses to Long-Term Dry Season Nitrogen Deposition Alter Drought Tolerance in a Mediterranean-Type Ecosystem." *Oecologia* 181(3): 721–31.
- Poorter, H., & J.R. Evans. 1998. "Photosynthetic Nitrogen-Use Efficiency of Species That Differ Inherently in Specific Leaf Area." *Oecologia* 116: 26–37.
- Poorter, L., I. McDonald, A. Alarcón, E. Fichtler, J.C. Licona, et al. 2010. "The Importance of Wood Traits and Hydraulic Conductance for the Performance and Life History Strategies of 42 Rainforest Tree Species." *New Phytologist* 185(2): 481–92.
- Porra, R.J., W.A. Thompson, & P.E. Kriedemann. 1989. "Determination of Accurate Extinction Coefficients and Simultaneous Equations for Assaying Chlorophylls a and b Extracted with Four Different Solvents: Verification of the Concentration of Chlorophyll Standards by Atomic Absorption Spectroscopy." *Biochimica et Biophysica Acta* 975: 384–94.
- Pregitzer, K.S., D.R. Zak, J. Maziasz, J. DeForest, P.S. Curtis, et al. 2000. "Interactive Effects of Atmospheric CO₂ and Soil-N Availability on Fine Roots of *Populus tremuloides*." *Ecological Applications* 10(1): 18–33.
- Prieto, L.H., M.B. Bertiller, A.L. Carrera, & N.L. Olivera. 2011. "Soil Enzyme and Microbial Activities in a Grazing Ecosystem of Patagonian Monte, Argentina." *Geoderma* 162: 281–87.
- R Development Core Team. 2018. *R: a language and environment for statistical computing*. R Foundation for statistical computing. Vienna, Austria.
- Rada, F., C. García-Núñez, C. Boero, M. Gallardo, M. Hilal, et al. 2001. "Low-Temperature Resistance in *Polylepis tarapacana*, a Tree Growing at the Highest Altitudes in the World." *Plant, Cell & Environment* 24(3): 377–81.
- Rao, L.E., & E.B. Allen. 2010. "Combined Effects of Precipitation and Nitrogen Deposition on Native and Invasive Winter Annual Production in California Deserts." *Oecologia* 162(4): 1035–46.
- Rapacz, M., A. Ergon, M. Höglind, M. Jørgensen, B. Jurczyk, et al. 2014. Overwintering of herbaceous plants in a changing climate. Still more questions than answers. *Plant Science* 225: 34–44.
- Regus, J.U., C.E. Wendlandt, R.M. Bantay, K.A. Gano-Cohen, N.J. Gleason, et al. 2017. "Nitrogen Deposition Decreases the Benefits of Symbiosis in a Native Legume." *Plant and Soil* 414(1–2): 159–70.
- Reichmann, L.G., O.E. Sala, & D.P.C. Peters. 2013. "Water Controls on Nitrogen Transformations and Stocks in an Arid Ecosystem." *Ecosphere* 4(1): 1–17.
- Rey, A., E. Pegoraro, C. Oyonarte, A. Were, P. Escribano, et al. 2011. "Impact of Land Degradation on Soil Respiration in a Steppe (*Stipa tenacissima* L.) Semi-Arid Ecosystem in the SE of Spain." *Soil Biology and Biochemistry* 43(2): 393–403.
- Rey, A., C. Oyonarte, T. Morán-López, J. Raimundo, & E. Pegoraro. 2016. "Changes in Soil Moisture Predict Soil Carbon Losses upon Rewetting in a Perennial Semiarid Steppe in SE Spain." *Geoderma* 287: 135–46.
- Reyes, M.F., & M.R. Aguiar. 2017a. "Root Proliferation Strategies and Exploration of Soil Patchiness in Arid Communities." *Austral Ecology* 42: 810–18.

- Reyes, M.F., & M.R. Aguiar. 2017b. "Is the Zone of Influence Colonized by Roots of Neighboring Species? Field Tests in a Patagonian Steppe." *Journal of Arid Environments* 137: 30–34.
- Reyes, M.F., & M.R. Aguiar. 2017c. "Mind the Gap among Patches in Arid Plant Communities : Rapid Root Proliferation in Response to N Addition." *Journal of Plant Ecology*, 12(1), 89-95.
- Reynolds, J.F., R.A. Virginia, P.R. Kemp, A.G. de Soyza, & D.C. Tremmel. 1999. "Impact of Drought on Desert Shrubs: Effects of Seasonality and Degree of Resource Island Development." *Ecological Monographs* 69(1): 69–106.
- Reynolds, J.F., P.R. Kemp, K. Ogle, & R.J. Fernández. 2004. "Modifying the 'Pulse-Reserve' Paradigm for Deserts of North America: Precipitation Pulses, Soil Water, and Plant Responses." *Oecologia* 141: 194–210.
- Richards, L.A. 1954. "Diagnosis and Improvement of Saline and Alkaline Soils." *Agriculture Handbook* 60: 166.
- Ripullone, F., M. Lauteri, G. Grassi, M. Amato, & M. Borghetti. 2004. "Variation in Nitrogen Supply Changes Water-Use Efficiency of *Pseudotsuga menziesii* and *Populus x euroamericana*; a Comparison of Three Approaches to Determine Water-Use Efficiency." *Tree Physiology* 24(6): 671–79.
- Roem, W.J., H. Klees, & F. Berendse. 2002. "Effects of Nutrient Addition and Acidification on Plant Species Diversity and Seed Germination in Heathland." *Journal of Applied Ecology* 39: 937–48.
- Rousk, J., & P. Bengtson. 2014. "Microbial Regulation of Global Biogeochemical Cycles." *Frontiers in Microbiology* 5(103).
- Rustad, L.E., J.L. Campbell, G.M. Marion, R.J. Norby, M.J. Mitchell, et al. 2001. "A Meta-Analysis of the Response of Soil Respiration, Net Nitrogen Mineralization, and Aboveground Plant Growth to Experimental Ecosystem Warming." *Oecologia* 126: 543–62.
- Sack, L., & N.M. Holbrook. 2006. "Leaf Hydraulics." *Annual Review of Plant Biology* 57(1): 361–81.
- Sala, O.E., R.A. Golluscio, W.K. Lauenroth, & P.A. Roset. 2012. "Contrasting Nutrient-Capture Strategies in Shrubs and Grasses of a Patagonian Arid Ecosystem." *Journal of Arid Environments* 82: 130–35.
- Sala, O.E., W.K. Lauenroth, W.J. Parton, & M.J. Trlica. 1981. "Water Status of Soil and Vegetation in a Shortgrass Steppe." *Oecologia* 48(3): 327–31.
- Sala, O.E., W.J. Parton, L.A. Joyce, & W.K. Lauenroth. 1988. "Primary Production of the Central Grassland Region of the United States." *Ecology* 69(1): 40–45.
- Sala, O.E. 1988. "The Effect of Herbivory on Vegetation Structure." In *Plant Form and Vegetation Structure*, eds. M.J.A. Werger, P.J.M. van der Aart, H.J. Doring, & J.T.A. Verhoeven. The Hague, The Netherlands: SPB Academic Publishing, 317–30.
- Sala, O.E., R.A. Golluscio, W.K. Lauenroth, & A. Soriano. 1989. "Resource Partitioning between Shrubs and Grasses in the Patagonian Steppe." *Oecologia* 81: 501–5.
- Sala, O.E., & W.K. Lauenroth. 1982. "Small Rainfall Events: An Ecological Role in Semiarid Regions." *Oecologia* 53: 301–4.

- Sala, O.E., & A.T. Austin. 2000. "Methods of Estimating Aboveground Net Primary Productivity." En *Methods in Ecosystem Science.*, eds. O.E. Sala, R.B. Jackson, H.A. Mooney, & R.H. Howarth. New York, 31–43.
- Sandli, N., M.M. Svenning, K. Røsnes, & O. Junttila. 1993. "Effect of Nitrogen Supply on Frost Resistance, Nitrogen Metabolism and Carbohydrate Content in White Clover (*Trifolium repens*)." *Physiologia Plantarum* 88(4): 661–67.
- de Santana, T.A., P.S. Oliveira, L.D. Silva, B.G. Laviola, A.A.F. de Almeida, et al. 2015. "Water Use Efficiency and Consumption in Different Brazilian Genotypes of *Jatropha curcas* L. Subjected to Soil Water Deficit." *Biomass and Bioenergy* 75: 119–25.
- Santiago, L.S., K. Silvera, J.L. Andrade, & T.E. Dawson. 2005. "El uso de isótopos estables en biología tropical." *Interciencia* 30(9): 536–42.
- Saurral, R.I., I.A. Camilloni, & V.R. Barros. 2017. "Low-Frequency Variability and Trends in Centennial Precipitation Stations in Southern South America." *International Journal of Climatology* 37(4): 1774–93.
- Schaberg, P.G., T.D. Perkins, & S.G. McNulty. 1997. "Effects of Chronic Low-Level N Additions on Foliar Elemental Concentrations, Morphology, and Gas Exchange of Mature Montane Red Spruce." *Canadian Journal of Forest Research* 27(10): 1622–29.
- Schimel, D.S., & W.J. Parton. 1986. "Microclimatic Controls of Nitrogen Mineralization and Nitrification in Shortgrass Steppe Soils." *Plant and Soil* 93: 347–57.
- Schimel, J.P., T.C. Balser, & M. Wallenstein. 2007. "Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function." *Ecology* 88(6): 1386–94.
- Schimel, J.P., C. Bilbrough, & J.M. Welker. 2004. "Increased Snow Depth Affects Microbial Activity and Nitrogen Mineralization in Two Arctic Tundra Communities." *Soil Biology and Biochemistry* 36(2): 217–27.
- Schlesinger, W.H., J.A. Raikes, A.E. Hartley, & A.F. Cross. 1996. "On the Spatial Pattern of Soil Nutrients in Desert Ecosystems." *Ecology* 77(2): 364–74.
- Scholz, F.G., S.J. Bucci, G. Goldstein, C. Frederick, A.C. Franco, et al. 2007. "Removal of Nutrient Limitations by Long-Term Fertilization Decreases Nocturnal Water Loss in Savanna Trees." *Tree Physiology* 27: 551–59.
- Scholz, F.G., S.J. Bucci, N.S. Arias, F.C. Meinzer, & G. Goldstein. 2012. "Osmotic and Elastic Adjustments in Cold Desert Shrubs Differing in Rooting Depth: Coping with Drought and Subzero Temperatures." *Oecologia* 170(4): 885–97.
- Scholz, F.G., S.J. Bucci, W.A. Hoffmann, F.C. Meinzer, & G. Goldstein. 2010. "Hydraulic Lift in a Neotropical Savanna: Experimental Manipulation and Model Simulations." *Agricultural and Forest Meteorology* 150: 629–39.
- Scholz, F.G., S.J. 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: 1475–87.

- Schuldt, B., C. Leuschner, N. Brock, & V. Horna. 2013. "Changes in Wood Density, Wood Anatomy and Hydraulic Properties of the Xylem along the Root-to-Shoot Flow Path in Tropical Rainforest Trees." *Tree Physiology* 33(2): 161–74.
- Schultz, H.R., & M. Stoll. 2010. "Some Critical Issues in Environmental Physiology of Grapevines: Future Challenges and Current Limitations." *Australian Journal of Grape and Wine Research* 16: 4–24.
- Schulze, E.D. 1989. "Air Pollution and Forest Decline in a Spruce (*Picea abies*) Forest." *Science* 244(7): 776.
- Schulze, E.D., H.A. Mooney, O.E. Sala, E. Jobbagy, N. Buchmann, et al. 1996. "Rooting Depth, Water Availability, and Vegetation Cover along an Aridity Gradient in Patagonia." *Oecologia* 108: 503–11.
- Scoffoni, C., C. Albuquerque, C.R. Brodersen, S.V. Townes, G.P. John, et al. 2017. "Outside-Xylem Vulnerability, Not Xylem Embolism, Controls Leaf Hydraulic Decline during Dehydration." *Plant Physiology* 173(2): 1197–1210.
- Sellin, A., & P. Kupper. 2007. "Temperature, Light and Leaf Hydraulic Conductance of Little-Leaf Linden (*Tilia cordata*) in a Mixed Forest Canopy." *Tree Physiology* 27(5): 679–88.
- Serret, M.D., I. Ortiz-Monasterio, A. Pardo, & J.L. Araus. 2008. "The Effects of Urea Fertilisation and Genotype on Yield, Nitrogen Use Efficiency, $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ in Wheat." *Annals of Applied Biology* 153(2): 243–57.
- Shangguan, Z.P., M.A. Shao, S.J. Ren, L.M. Zhang, & Q. Xue. 2004. "Effect of Nitrogen on Root and Shoot Relations and Gas Exchange in Winter Wheat." *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45.
- Shangguan, Z.P., M.A. Shao, & J. Dyckmans. 2000. "Nitrogen Nutrition and Water Stress Effects on Leaf Photosynthetic Gas Exchange and Water Use Efficiency in Winter Wheat." *Environmental and Experimental Botany* 44: 141–49.
- Sierra-Almeida, A., & L.A. Cavieres. 2010. "Summer Freezing Resistance Decreased in High-Elevation Plants Exposed to Experimental Warming in the Central Chilean Andes." *Oecologia* 163(1): 267–76.
- Sierra-Almeida, A., C. Reyes-Bahamonde, & L.A. Cavieres. 2016. "Drought Increases the Freezing Resistance of High-Elevation Plants of the Central Chilean Andes." *Oecologia* 181(4): 1011–23.
- Sinsabaugh, R.L., J. Belnap, J. Rudgers, C.R. Kuske, N. Martinez, et al. 2015. "Soil Microbial Responses to Nitrogen Addition in Arid Ecosystems." *Frontiers in Microbiology* 6: 1–12.
- Smallwood, M., D.J. Bowles, C. Gerday, M.A. Marahiel, P.L. Davies, et al. 2002. "Plants in a Cold Climate." *Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Sciences* 357(1423): 831–47.
- Smedley, M.P., T.E. Dawson, J.P. Comstock, L.A. Donovan, D.E. Sherrill, et al. 1991. "Seasonal Carbon Isotope Discrimination in a Grassland Community." *Oecologia* 85(3): 314–20.
- Smiley, E.T., & A.M. Shirazi. 2003. "Fall Fertilization and Cold Hardiness in Landscape Trees." *Journal of Arboriculture* 29(6): 342–46.

- Snyder, K.A., L.A. Donovan, J.J. James, R.L. Tiller, & J.H. Richards. 2004. "Extensive Summer Water Pulses Do Not Necessarily Lead to Canopy Growth of Great Basin and Northern Mojave Desert Shrubs." *Oecologia* 141(2): 325–34.
- Song, W., S. Chen, B. Wu, Y. Zhu, Y. Zhou, et al. 2012. "Vegetation Cover and Rain Timing Co-Regulate the Responses of Soil CO₂ Efflux to Rain Increase in an Arid Desert Ecosystem." *Soil Biology and Biochemistry* 49: 114–23.
- Soriano, A. 1956. Los distritos florísticos de la Provincia Patagónica. *Rev. Inv. Agr.* 10:323-348.
- Soriano, A., R.A. Golluscio, & E. Satorre. 1987a. "Spatial Heterogeneity of the Root System of Grasses in the Patagonian Arid Steppe." *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 114(2): 103–8.
- Soriano, A., R.A. Golluscio, & E. Satorre. 1987b. "Spatial Heterogeneity Arid Steppe Grasses in the Patagonian Arid Steppe." *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 114(2): 103–8.
- Soriano, A. & O. Sala. 1983. "Ecological Strategies in a Patagonian Arid Steppe." *Vegetatio* 56: 9–15.
- Soriano, A., O.E. Sala, & S.B. Perelman. 1994. "Patch Structure and Dynamics in a Patagonian Arid Steppe." *Vegetatio* 111: 127–35.
- Sparks, P., & R. Ehleringer. 1997. "Leaf Carbon Isotope Discrimination and Nitrogen Content for Riparian Trees along Elevational Transects." *Oecologia* 109: 362–67.
- Sperry, J.S., & M.T. Tyree. 1990. "Water-stress-induced Xylem Embolism in Three Species of Conifers." *Plant, Cell & Environment* 13(5): 427–36.
- Sperry, J.S. 2000. "Hydraulic Constraints on Plant Gas Exchange." *Agricultural and Forest Meteorology* 104(1): 13–23.
- Sponseller, R.A. 2007. "Precipitation Pulses and Soil CO₂ Flux in a Sonoran Desert Ecosystem." *Global Change Biology* 13: 426–36.
- Stevens, C.J., E.M. Lind, Y. Hautier, W.S. Harpole, E.T. Borer, et al. 2015. "Anthropogenic Nitrogen Deposition Predicts Local Grassland Primary Production Worldwide." *Ecology* 96(6): 1459–65.
- Strand, M. 1997. "Effect of Mineral Nutrient Content on Oxygen Exchange and Chlorophyll a Fluorescence in Needles of Norway Spruce." *Tree Physiology* 17(4): 221–30.
- Strauss, G., & H. Hauser. 1986. "Stabilization of Lipid Bilayer Vesicles by Sucrose during Freezing." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83(8): 2422–26.
- Swindon, J.G., I.C. Burke, & W.K. Lauenroth. 2019. "Seasonal Patterns of Root Production with Water and Nitrogen Additions Across Three Dryland Ecosystems." *Ecosystems* 22(7): 1664-75.
- Talhelm, A., K.S. Pregitzer, & A.J. Burton. 2011. "No Evidence That Chronic Nitrogen Additions Increase Photosynthesis in Mature Sugar Maple Forests." *Ecological Applications* 21(7): 2413-24.
- Tan, W., & G.D. Hogan. 1995. "Effects of Nitrogen Limitation on Water Relations of Jack Pine (*Pinus banksiana* Lamb.) Seedlings." *Plant, Cell & Environment* 18(7): 757–64.
- Tateno, R., & H. Takeda. 2010. "Nitrogen Uptake and Nitrogen Use Efficiency above and below Ground along a Topographic Gradient of Soil Nitrogen Availability." *Oecologia* 163(3): 793–804.

- Taulavuori, E., K. Taulavuori, K. Laine, T. Pakonen, & E. Saari. 1997. "Winter Hardening and Glutathione Status in the Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) in Response to Trace Gases (CO₂, O₃) and Nitrogen Fertilization." *Physiologia Plantarum* 101(1): 192–98.
- Taulavuori, K., E. Taulavuori, A. Niinimaa, & K. Laine. 2001. "Acceleration of Frost Hardening in *Vaccinium vitis-Idaea* by Nitrogen Fertilization." *Oecologia* 127(3): 321–23.
- Tian, D., S. Niu, Q. Pan, T. Ren, S. Chen, et al. 2016. "Nonlinear Responses of Ecosystem Carbon Fluxes and Water-Use Efficiency to Nitrogen Addition in Inner Mongolia Grassland." *Functional Ecology* 30(3): 490–99.
- Tian, D., & S. Niu. 2015. "A Global Analysis of Soil Acidification Caused by Nitrogen Addition." *Environmental Research Letters* 10(2): 1-10.
- Tilman, D. 1997. "Community Invasibility, Recruitment Limitation, and Grassland Biodiversity." *Ecology* 78(1): 81–92.
- Tingey, D.T., M.G. Johnson, & D.L. Phillips. 2005. "Independent and Contrasting Effects of Elevated CO₂ and N-Fertilization on Root Architecture in *Pinus ponderosa*." *Trees* 19(1): 43–50.
- Treseder, K.K. 2008. "Nitrogen Additions and Microbial Biomass: A Meta-Analysis of Ecosystem Studies." *Ecology Letters* 11(10): 1111–20.
- Trischuk, R.G., B.S. Schilling, N.H. Low, G.R. Gray, & L.V. Gusta. 2014. "Cold Acclimation, de-Acclimation and Re-Acclimation of Spring Canola, Winter Canola and Winter Wheat: The Role of Carbohydrates, Cold-Induced Stress Proteins and Vernalization." *Environmental and Experimental Botany* 106: 156–63.
- Trumbore, S. 2000. "Age of Soil Organic Matter and Soil Respiration: Radiocarbon Constraints on Belowground C Dynamics." *Ecological Applications* 10(2): 399-411.
- Turnbull, T.L., N. Kelly, M.A. Adams, & C.R. Warren. 2007. "Within-Canopy Nitrogen and Photosynthetic Gradients Are Unaffected by Soil Fertility in Field-Grown *Eucalyptus globulus*." *Tree Physiology* 27(11): 1607–17.
- Tyree, M.T., M.E. MacGregor, A. Petrov, & M.I. Upenieks. 1978. "A Comparison of Systematic Errors between the Richards and Hammel Methods of Measuring Tissue – Water Relations Parameters." *Canadian Journal of Botany* 56(17): 2153–61.
- Tyree, M.T., & J.S. Sperry. 1989. "Vulnerability of Xylem to Cavitation and Embolism." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40(1): 19–36.
- Tyree, M.T., & F.W. Ewers. 1991. "The Hydraulic Architecture of Trees and Other Woody Plants." *New Phytologist* 119(3): 345–60.
- Ueda, M.U., N. Tokuchi, & T. Hiura. 2015. "Soil Nitrogen Pools and Plant Uptake at Sub-Zero Soil Temperature in a Cool Temperate Forest Soil: A Field Experiment Using ¹⁵N Labeling." *Plant and Soil* 392: 205–14.
- Verstraete, M.M., & S.A. Schwartz. 1991. "Desertification and Global Change." *Vegetatio* 91(1–2): 3–13.
- Villagra, M., P.I. Campanello, S.J. Bucci, & G. Goldstein. 2013. "Functional Relationships between Leaf Hydraulics and Leaf Economic Traits in Response to Nutrient Addition in Subtropical Tree Species." *Tree Physiology* 33(12): 1308–18.

- Villar-Salvador, P., J. Puértolas, J.L. Peñuelas, & R. Planelles. 2005. "Effect of Nitrogen Fertilization in the Nursery on the Drought and Frost Resistance of Mediterranean Forest Species." *Forest Systems* 14(3): 408–18.
- Vitória, A.P., E. Ávila-Lovera, T. de Oliveira Vieira, A.P. Lima do Couto-Santos, T.J. Pereira, et al. 2018. "Isotopic Composition of Leaf Carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and Nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) of Deciduous and Evergreen Understorey Trees in Two Tropical Brazilian Atlantic Forests." *Journal of Tropical Ecology* 34(2): 145–56.
- Vitousek, P.M., K. Cassman, C. Cleveland, T. Crews, C.B. Field, et al. 2002. "Towards an Ecological Understanding of Biological Nitrogen Fixation." En *The nitrogen cycle at regional to global scales* (pp. 1-45). Springer, Dordrecht.
- Vitousek, P.M., C.B. Field, & P.A. Matson. 1990. "Variation in Foliar $\delta^{13}\text{C}$ in Hawaiian *Metrosideros polymorpha*: A Case of Internal Resistance?" *Oecologia* 84(3): 362–70.
- Vose, J.M., K.J. Elliott, D.W. Johnson, D.T. Tingey, & M.G. Johnson. 1997. "Soil Respiration Response to Three Years of Elevated CO_2 and N Fertilization in Ponderosa Pine (*Pinus ponderosa* Doug. Ex Laws.)." *Plant and Soil* 190(1): 19–28.
- Vourlitis, G.L., & S.C. Pasquini. 2009. "Experimental Dry-Season N Deposition Alters Species Composition in Southern Californian Mediterranean-Type Shrublands." *Ecology* 90(8): 2183–89.
- Vourlitis, G.L., S.C. Pasquini, & R. Mustard. 2009. "Effects of Dry-Season N Input on the Productivity and N Storage of Mediterranean-Type Shrublands." *Ecosystems* 12(3): 473–88.
- Walkley A., & I.A. Black. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, as a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci* 37:29–38.
- Wang, C., D. Liu, W. Luo, Y. Fang, & E. Bai. 2016. "Variations in Leaf Carbon Isotope Composition along an Arid and Semi-Arid Grassland Transect in Northern China." *Journal of Plant Ecology* 9(5): 576–85.
- Wang, D., T. Ling, P. Wang, P. Jing, J. Fan, et al. 2018. "Effects of 8-Year Nitrogen and Phosphorus Treatments on the Ecophysiological Traits of Two Key Species on Tibetan Plateau." *Frontiers in Plant Science* 9: 1–12.
- Wang, D., S.A. Heckathorn, X. Wang, & S.M. Philpott. 2012. "A Meta-Analysis of Plant Physiological and Growth Responses to Temperature and Elevated CO_2 ." *Oecologia* 169(1): 1–13.
- Wang, J., X. Fu, Z. Zhang, M. Li, H. Cao, et al. 2019. "Responses of Soil Respiration to Nitrogen Addition in the Sanjiang Plain Wetland, Northeastern China." *PLOS ONE* 14(1): 1–12.
- Wang, N., S.S. Xu, X. Jia, J. Gao, W.P. Zhang, et al. 2013. "Variations in Foliar Stable Carbon Isotopes among Functional Groups and along Environmental Gradients in China - a Meta-Analysis." *Plant Biology* 15(1): 144–51.
- Wang, Y., Y. Hao, X.Y. Cui, H. Zhao, C. Xu, et al. 2014. "Responses of Soil Respiration and Its Components to Drought Stress." *Journal of Soils and Sediments* 14(1): 99–109.
- Warren, C.R., J.F. McGrath, & M.A. Adams. 2001. "Water Availability and Carbon Isotope Discrimination in Conifers." *Oecologia* 127(4): 476–86.

- Webster, D.E., & J.S. Ebdon. 2005. "Effects of Nitrogen and Potassium Fertilization on Perennial Ryegrass Cold Tolerance during Deacclimation in Late Winter and Early Spring." *HortScience* 40(3): 842–49.
- Wedin, D.A., & D. Tilman. 1996. "Influence of Nitrogen Loading and Species Composition on the Carbon Balance of Grasslands." *Science* 274(5293): 1720–23.
- Wei, J., W. Liu, J. Cheng, & W. Li. 2015. " $\delta^{13}\text{C}$ Values of Plants as Indicators of Soil Water Content in Modern Ecosystems of the Chinese Loess Plateau." *Ecological Engineering* 77: 51–59.
- Wheeler, J.K., J.S. Sperry, U.G. Hacke, & N. Hoang. 2005. "Inter-Vessel Pitting and Cavitation in Woody Rosaceae and Other Vessel Led Plants: A Basis for a Safety versus Efficiency Trade-off in Xylem Transport." *Plant, Cell & Environment* 28(6): 800–812.
- White, D.A., C.L. Beadle, & D. Worledge. 1996. "Seasonal, Drought and Species Effects." *Tree Physiology* 16(5): 469–76.
- Whitford, W.G., G. Martinez-Turanzas, & E. Martinez-Meza. 1995. "Persistence of desertified ecosystems : explanations and implications." *Environmental Monitoring and Assessment* 37: 319–32.
- Wilcox, C.S., J.W. Ferguson, G.C.J. Fernandez, & R.S. Nowak. 2004. "Fine Root Growth Dynamics of Four Mojave Desert Shrubs as Related to Soil Moisture and Microsite." *Journal of Arid Environments* 56: 129–48.
- Wilner, J. 1960. "Relative and Absolute Electrolytic Conductance Tests for Frost Hardiness of Apple Varieties." *Can J Plant Sci* 40: 630–37.
- Wilson, P.W., A.F. Heneghan, & A.D.J. Haymet. 2003. "Ice Nucleation in Nature: Supercooling Point (SCP) Measurements and the Role of Heterogeneous Nucleation." *Cryobiology* 46(1): 88–98.
- Winter, K., J.A.M. Holtum, G.E. Edwards, & M.H. O'leary. 1982. "Effect of Low Relative Humidity on $\delta^{13}\text{C}$ Value in Two C3 Grasses and in *Panicum milioides*, a C3-C4 Intermediate Species." *Journal of Experimental Botany* 33(1): 88–91.
- Wong, S.C., I.R. Cowan, & G.D. Farquhar. 1979. "Stomatal Conductance Correlates with Photosynthetic Capacity." *Nature* 282(5737): 424–26.
- Wright, G.C., R.C.N. Rao, & G.D. Farquhar. 1994. "Water-Use Efficiency and Carbon Isotope Discrimination in Peanut under Water Deficit Conditions." *Crop Science* 34(1): 92–97.
- Wythers, K.R., W.K. Lauenroth, & J.M. Paruelo. 1999. "Bare Soil Evaporation under Semi-Arid Field Conditions." *Soil Science Society of America Journal* 63(5): 1341–49.
- Xia, J., & S. Wan. 2008. "Global Response Patterns of Terrestrial Plant Species to Nitrogen Addition." *New Phytologist* 179(2): 428–39.
- Xin, Z., & J. Browse. 2000. "Cold Comfort Farm: The Acclimation of Plants to Freezing Temperatures." *Plant, Cell & Environment* 23(9): 893–902.
- Xiong, D., C. Douthe, & J. Flexas. 2018. "Differential Coordination of Stomatal Conductance, Mesophyll Conductance, and Leaf Hydraulic Conductance in Response to Changing Light across Species." *Plant, Cell & Environment* 41(2): 436–50.
- Xu, M., & H. Shang. 2016. "Contribution of Soil Respiration to the Global Carbon Equation." *Journal of Plant Physiology* 203: 16–28.

- Xu, Z.Z., & G.S.Zhou. 2005. "Effects of Water Stress and Nocturnal Temperature on Carbon Allocation in the Perennial Grass, *Leymus Chinensis*." *Physiologia Plantarum* 123(3): 272–80.
- Yahdjian, L., L. Gherardi, & O. E. Sala. 2011a. "Nitrogen Limitation in Arid-Subhumid Ecosystems: A Meta-Analysis of Fertilization Studies." *Journal of Arid Environments* 75(8): 675–80.
- Yahdjian, L., L. Gherardi, & O.E. Sala. 2011b. "Nitrogen Limitation in Arid-Subhumid Ecosystems: A Meta-Analysis of Fertilization Studies." *Journal of Arid Environments* 75: 675–80.
- Yahdjian, L., & O.E. Sala. 2008. "Do Litter Decomposition and Nitrogen Mineralization Show the Same Trend in the Response to Dry and Wet Years in the Patagonian Steppe?" *Journal of Arid Environments* 72(5): 687–95.
- Yahdjian, L., L. Gherardi, & O.E. Sala. 2014. "Grasses Have Larger Response than Shrubs to Increased Nitrogen Availability: A Fertilization Experiment in the Patagonian Steppe." *Journal of Arid Environments* 102: 17–20.
- Yahdjian, L., & O.E. Sala. 2006. "Vegetation Structure Constrains Primary Production Response to Water Availability in the Patagonian Steppe." *Ecology* 87(4): 952–62.
- Yahdjian, L., & O.E. Sala. 2010. "Size of Precipitation Pulses Controls Nitrogen Transformation and Losses in an Arid Patagonian Ecosystem." *Ecosystems* 13(4): 575–85.
- Yahdjian, L., O.E. Sala, & A.T. Austin. 2006. "Differential Controls of Water Input on Litter Decomposition and Nitrogen Dynamics in the Patagonian Steppe." *Ecosystems* 9: 128–41.
- Yan, L., S. Chen, J. Xia, & Y. Luo. 2014. "Precipitation Regime Shift Enhanced the Rain Pulse Effect on Soil Respiration in a Semi-Arid Steppe." *PLOS ONE* 9(8).
- Yang, Y., C. Ji, W. Ma, S. Wang, S. Wang, et al. 2012. "Significant Soil Acidification across Northern China's Grasslands during 1980s-2000s." *Global Change Biology* 18(7): 2292–2300.
- Yoshitake, S., M. Uchida, H. Koizumi, & T. Nakatsubo. 2007. "Carbon and Nitrogen Limitation of Soil Microbial Respiration in a High Arctic Successional Glacier Foreland near Ny-Ålesund, Svalbard." *Polar Research* 26(1): 22–30.
- Youfeng, N., Liu W., & A. Zhisheng. 2008. "A 130-Ka Reconstruction of Precipitation on the Chinese Loess Plateau from Organic Carbon Isotopes." *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 270(1–2): 59–63.
- Yuan, Z., L. Li, X. Han, S. Wan, & W. Zhang. 2005. "Variation in Nitrogen Economy of Two *Stipa* Species in the Semiarid Region of Northern China." *Journal of Arid Environments* 61(1): 13–25.
- Yuan, Z.Y., L.H. Li, X.G. Han, S.P. Chen, Z.W. Wang, et al. 2006. "Nitrogen Response Efficiency Increased Monotonically with Decreasing Soil Resource Availability: A Case Study from a Semiarid Grassland in Northern China." *Oecologia* 148(4): 564–72.
- Zak, D.R., W.E. Holmes, N.W. MacDonald, & K.S. Pregitzer. 1999. "Soil Temperature, Matric Potential, and the Kinetics of Microbial Respiration and Nitrogen Mineralization." *Soil Science Society of America Journal* 63(3): 575.
- Zhang, L.H., Y.N. Chen, R.F. Zhao, & W.H. Li. 2010. "Significance of Temperature and Soil Water Content on Soil Respiration in Three Desert Ecosystems in Northwest China." *Journal of Arid Environments* 74(10): 1200–11.

- Zhang, X., W. Bai, F.S. Gilliam, Q. Wang, X. Han, et al. 2011. "Effects of in Situ Freezing on Soil Net Nitrogen Mineralization and Net Nitrification in Fertilized Grassland of Northern China." *Grass and Forage Science* 66(3): 391–401.
- Zhang, X., W. Li, H.D. Adams, A. Wang, J. Wu, et al. 2018. "Responses of Ecosystem Water Use Efficiency to Spring Snow and Summer Water Addition with or without Nitrogen Addition in a Temperate Steppe." *PLOS ONE* 13(3): 1–15.
- Zhang, X., Y. Tan, B. Zhang, A. Li, S. Daryanto, et al. 2017. "The Impacts of Precipitation Increase and Nitrogen Addition on Soil Respiration in a Semiarid Temperate Steppe." *Ecosphere* 8(1).
- Zhang, Y.J., S.J. Bucci, N.S. Arias, F.G. Scholz, G.Y. Hao, et al. 2016. "Freezing Resistance in Patagonian Woody Shrubs: The Role of Cell Wall Elasticity and Stem Vessel Size." *Tree Physiology* 36(8): 1007–18.
- Zhao, H., X. Zhang, S. Xu, X. Zhao, Z. Xie, et al. 2010. "Effect of Freezing on Soil Nitrogen Mineralization under Different Plant Communities in a Semi-Arid Area during a Non-Growing Season." *Applied Soil Ecology* 45(3): 187–92.
- Zhao, L.J., H.L. Xiao, & X.H. Liu. 2007. "Relationships between Carbon Isotope Discrimination and Yield of Spring Wheat under Different Water and Nitrogen Levels." *Journal of Plant Nutrition* 30(6): 947–63.
- Zhou, L., X. Zhou, B. Zhang, M. Lu, Y. Luo, et al. 2014. "Different Responses of Soil Respiration and Its Components to Nitrogen Addition among Biomes: A Meta-Analysis." *Global Change Biology* 20(7): 2332–43.
- Zhu, C., Y. Ma, H. Wu, T. Sun, K.J. La Pierre, et al. 2016. "Divergent Effects of Nitrogen Addition on Soil Respiration in a Semiarid Grassland." *Scientific Reports* 6: 4–11.
- Zimmermann, M.H. 1978. "Hydraulic Architecture of Some Diffuse-Porous Trees." *Canadian Journal of Botany* 56(18): 2286–95.