



UNIVERSIDAD NACIONAL
de MAR DEL PLATA



FACULTAD
de CIENCIAS AGRARIAS

**EFFECTO DE LA CONDICIÓN HÍDRICA SOBRE LA NUTRICIÓN NITROGENADA DE
PASTURAS DE FESTUCA ALTA**

Pedro Manuel Errecart

Trabajo de Tesis para ser presentado como requisito parcial para optar al Título de

DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS AGRARIAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

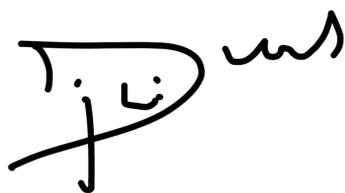
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA

Balcarce, Argentina

Junio de 2022

**EFFECTO DE LA CONDICIÓN HÍDRICA SOBRE LA NUTRICIÓN NITROGENADA DE
PASTURAS DE FESTUCA ALTA**

Ing. Agr. Pedro Manuel Errecart, M.Sc.



.....
Ing. Agr. Jean-Louis Durand, Ph.D.

Director de Tesis

.....
Ing. Agr. Mónica Graciela Agnusdei, M.Sc., Ph.D. †

Codirector de Tesis

EFFECTO DE LA CONDICIÓN HÍDRICA SOBRE LA NUTRICIÓN NITROGENADA DE PASTURAS DE FESTUCA ALTA

Ing. Agr. Pedro Manuel Errecart, M.Sc.

Aprobada por:


p/a
Prof. Liliana TRIARTE, Mag
Secretaría de Posgrado
Facultad de Ciencias Agrarias
UNMAO

.....

Evaluador: Ing. Agr. Alberto Daniel Golberg, *Dr.*


p/a
Prof. Liliana TRIARTE, Mag
Secretaría de Posgrado
Facultad de Ciencias Agrarias
UNMAO

.....

Evaluador: Ing. Agr. Agustín Grimoldi, *MSc., Dr.*


p/a
Prof. Liliana TRIARTE, Mag
Secretaría de Posgrado
Facultad de Ciencias Agrarias
UNMAO

.....

Evaluador: Ing. Agr. Patricio Alejandro Sandaña Gómez, *Dr.*

DEDICATORIA

Va dedicada a vos, Mónica.

¿Por qué te fuiste tan pronto?

AGRADECIMIENTOS

A Jean-Louis Durand, por haber dirigido este trabajo con predisposición incondicional y por haberme recibido en Lusignan durante 2014.

A Mónica Agnusdei, por confiar en mí y de este modo haberme posibilitado no sólo la realización de este doctorado, sino también mi llegada a INTA en marzo de 2008.

A Alejandra Marino, por su enorme colaboración durante la etapa experimental, en especial durante los experimentos de verano.

A José Méndez (padre e hijo), Oscar Erquiaga, Eduardo Montero, Martín Pérez, Miriam Pattini y Luis Alonso por la asistencia brindada durante el desarrollo de los experimentos.

A Fernando Lattanzi y Germán Berone, por la enriquecedora discusión de los resultados obtenidos.

A José Luis Costa y Virginia Aparicio, por facilitar parte del equipamiento empleado en este trabajo.

Al jurado evaluador, por sus convenientes aportes que contribuyeron a la riqueza del manuscrito.

A INTA, que a través de su Programa de Formación de Posgrado y Perfeccionamiento, financió la realización del doctorado y una estadía de varios meses en un centro de referencia del exterior.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	xv
RESUMEN.....	xviii
ABSTRACT.....	xx
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1. Relevancia productiva y principales limitantes del ambiente edafoclimático de la Pampa Deprimida.....	2
1.2. Déficits estacionales en la producción forrajera de la Pampa Deprimida y el rol potencial de la interacción agua-N. Objetivo del trabajo.....	4
1.3. Importancia del crecimiento subterráneo en la captura de recursos edáficos por las plantas. Interrogantes que esta tesis intenta responder.....	6
1.4. Estructura del trabajo.....	8
CAPÍTULO 2: EVALUACIÓN Y AJUSTE DE LA METODOLOGÍA DE DIAGNÓSTICO DEL ESTADO DE NUTRICIÓN NITROGENADA DE PASTURAS DE TIPO TEMPLADO PARA SU IMPLEMENTACIÓN EN SITUACIONES DE LIMITADA DISPONIBILIDAD HÍDRICA.....	9
2.1. Introducción.....	10
2.1.1. Sobre el desarrollo del método preferente para la evaluación de la condición nitrogenada de pasturas y cultivos.....	10
2.1.2. Sobre la aplicabilidad del Ref-N _{cr} cuando hay limitantes para el crecimiento.....	14
2.2. Materiales y Métodos.....	17
2.2.1. Sitio experimental, suelos y clima.....	17
2.2.2. Diseño experimental, manejo agronómico y tratamientos.....	18
2.2.3. Balance hídrico.....	19

2.2.4.	Estrés hídrico.....	20
2.2.5.	Validación de la razón ETR/ET ₀ como indicadora del nivel de estrés hídrico.....	20
2.2.6.	Muestreos y mediciones.....	21
2.2.6.1.	Biomasa aérea y concentración de N.....	21
2.2.6.2.	N _{cr} , Ref-N _{cr} e INN.....	22
2.2.7.	Análisis estadístico.....	23
2.2.8.	Digitalización de información.....	23
2.3.	Resultados.....	24
2.3.1.	Condiciones meteorológicas y disponibilidad de agua en el suelo.....	24
2.3.2.	Crecimiento y absorción de N por la pastura.....	26
2.3.3.	Efecto del estrés hídrico y de su intensidad sobre el N _{cr}	27
2.3.4.	Nutrición nitrogenada de la pastura bajo estrés hídrico.....	29
2.3.5.	Relación entre el estado de nutrición nitrogenada y el rendimiento de forraje.....	30
2.4.	Discusión.....	30
2.4.1.	Validación cruzada de la relación entre ETR/ET ₀ y N _{cr} /Ref-N _{cr}	31
2.4.2.	¿Puede el N _{cr} ser adecuadamente estimado bajo condiciones de estrés hídrico?.....	32
2.4.3.	Avances recientes en la aplicación de la estadística bayesiana para la estimación del N _{cr}	35
2.4.4.	¿Por qué el N _{cr} disminuye en condiciones de estrés hídrico?.....	39
2.4.5.	Interpretando el efecto de un menor N _{cr} bajo estrés hídrico en términos de la demanda de N de la pastura y su INN.....	41
CAPÍTULO 3: EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO DURANTE LA ÉPOCA ESTIVAL SOBRE EL ESTADO DE NUTRICIÓN NITROGENADA DE PASTURAS DE FESTUCA ALTA CRECIENDO EN UN SUELO HIDROHALOMÓRFICO DEL SUDESTE BONAERENSE.....		44
3.1.	Introducción.....	45
3.1.1.	Efectos del estrés hídrico sobre la demanda de N de la pastura.....	46
3.1.2.	Efectos del estrés hídrico sobre la oferta de N del suelo.....	47
3.1.3.	Particularidades del ambiente edafoclimático local y su potencial efecto sobre la nutrición nitrogenada.....	49
3.2.	Materiales y Métodos.....	50

3.2.1.	Sitio experimental.....	50
3.2.2.	Tratamientos y diseño experimental.....	51
3.2.3.	Mediciones.....	52
3.2.3.1.	Datos meteorológicos.....	52
3.2.3.2.	Humedad del suelo.....	52
3.2.3.3.	Biomasa y densidad del largo de raíces.....	53
3.2.3.4.	Contenido de N del suelo.....	54
3.2.3.5.	Estado hídrico de la planta.....	54
3.2.3.6.	Fracción del agua del suelo transpirable por la pastura	55
3.2.3.7.	Biomasa aérea y concentración de N.....	55
3.2.3.8.	Crecimiento de la hoja.....	55
3.2.3.9.	Índice de área foliar, interceptación de radiación y eficiencia de uso de la radiación interceptada.....	56
3.2.3.10.	Estado de nutrición nitrogenada de la pastura.....	57
3.2.3.11.	Demanda de N de la pastura.....	58
3.2.3.12.	Agua transpirada por la pastura.....	58
3.2.3.13.	Flujos de N del suelo.....	60
3.2.4.	Análisis de la magnitud de los efectos del estrés hídrico, del estrés nitrogenado y del estrés combinado hídrico+nitrogenado sobre las variables de respuesta cuantificadas en los experimentos.....	61
3.2.5.	Análisis estadístico.....	63
3.3.	Resultados.....	64
3.3.1.	Condiciones meteorológicas y disponibilidad de agua en el suelo.....	64
3.3.2.	Estado hídrico de la pastura.....	67
3.3.3.	Uso de agua de la pastura.....	69
3.3.4.	Morfogénesis foliar.....	69
3.3.5.	Respuestas de la producción de biomasa aérea y del área foliar al agua y al N.....	71
3.3.6.	Desarrollo del sistema radical.....	73
3.3.7.	Intercepción de la radiación.....	75
3.3.8.	Eficiencia de uso de la radiación interceptada.....	76
3.3.9.	Contenido de N mineral y flujos de N en el suelo, demanda de N e Índice de Nutrición Nitrogenada de la pastura.....	78
3.4.	Discusión.....	83

3.4.1. Un sistema radical de desarrollo predominantemente superficial definió el estado hídrico de las pasturas de festuca alta.....	83
3.4.2. El análisis comparativo de los efectos de los estreses hídrico, nitrogenado e hídrico+nitrogenado sobre las variables de respuesta permitió exponer interacciones agua·N significativas.....	88
3.4.3. Sobre el desafío metodológico que impone la medición de la oferta de N del suelo.....	94
3.4.4. Interacción entre la disponibilidad de agua en el suelo y el estado de nutrición nitrogenada de la pastura.....	96
CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES GENERALES.....	101
BIBLIOGRAFÍA.....	108
APÉNDICE.....	134
Figura I. Evolución de los valores diarios de temperatura media del aire, Evapotranspiración de Referencia y precipitaciones registrados en los experimentos de campo que formaron parte de los Capítulos 2 y 3.....	134
Tabla I. Valores medios de biomasa aérea y su concentración de N, biomasa aérea crítica, concentración crítica de N y valor crítico de N de Referencia propuesto por Lemaire y Salette (1984a) medidos en festuca alta en cada fecha de muestreo de cinco experimentos en seco y dos experimentos bajo riego que formaron parte del Capítulo 2.....	134

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos aplicados y variables meteorológicas registradas en los cinco experimentos	19
Tabla 2. Discriminación isotópica del carbono medida en el último muestreo de biomasa aérea de festuca alta en experimentos conducidos en secano o bajo riego suplementario.....	25
Tabla 3. Efecto del estrés hídrico sobre el N crítico y la estimación del estado de nutrición nitrogenada de festuca alta en cinco experimentos conducidos en secano	29
Tabla 4. Valores alcanzados por las variables meteorológicas registradas durante ambos experimentos	65
Tabla 5. Valores medios ponderados durante el período experimental para la vida media foliar y la tasa de aparición de hojas en pasturas de festuca alta expuestas a dos niveles de disponibilidad de agua y de N durante los veranos de 2009 y de 2010...	71
Tabla 6. Coeficientes describiendo la distribución vertical acumulada de la biomasa de raíces de festuca alta en el perfil del suelo, calculados para cinco fechas de muestreo del Experimento Verano 2009.....	74
Tabla 7. Eficiencias de uso de la radiación fotosintéticamente activa para la producción de biomasa seca aérea y total calculadas en pasturas de festuca alta expuestas a dos niveles de disponibilidad de agua y de N durante experimentos conducidos en los veranos de 2009 y de 2010.....	78
Tabla 8. Índice de Nutrición Nitrogenada medio ponderado durante el período experimental observado en pasturas de festuca alta expuestas a dos niveles de disponibilidad de agua y de N durante los veranos de 2009 y de 2010.....	80
Tabla 9. Valores medios diarios del flujo de N del suelo y de la demanda de N de la pastura estimados durante los períodos secos en pasturas de festuca alta expuestas a dos niveles de disponibilidad de agua y de N durante los veranos de 2009 y de 2010.....	83
Tabla 10. Relaciones lineales múltiples entre la tasa de elongación foliar, el estado de nutrición nitrogenada y algunas variables ambientales.....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Concentración de N en función de la biomasa aérea acumulada en experimentos estudiando rebrotes de primavera de pasturas de festuca alta. Tomado de Lemaire y Salette (1984a).....	11
Figura 2. Descripción gráfica de la metodología de cálculo del Índice de Nutrición Nitrogenada a partir de la biomasa aérea actual, el %N _{actual} y la curva de dilución del N crítico.....	12
Figura 3. Rendimiento relativo de biomasa aérea en función del Índice de Nutrición Nitrogenada, calculado en base al N crítico de Referencia de Lemaire y Salette (1984a), en pasturas polifíticas C ₃ . Tomado de Duru y Ducrocq (1997).....	15
Figura 4. Evolución a lo largo del tiempo de la fracción de agua del suelo disponible y de la razón Evapotranspiración Real/Evapotranspiración de Referencia en cinco experimentos con festuca alta. Las barras verticales indican las fechas de muestreo de biomasa aérea.....	24
Figura 5. Asociación entre la magnitud de cambio en la discriminación isotópica del carbono debida al efecto del estrés hídrico y la evapotranspiración relativa estimada para los experimentos conducidos en seco sobre pasturas de festuca alta.....	25
Figura 6. Absorción de N versus acumulación de biomasa aérea en cinco experimentos de festuca alta conducidos ya sea bajo irrigación o en condiciones de seco.....	26
Figura 7. Relación entre el N crítico de Referencia propuesto por Lemaire y Salette (1984a) y estimaciones de N crítico de festuca alta realizadas en experimentos conducidos bajo riego suplementario o en condiciones de seco, ya sea cuando el balance de agua del suelo indicó disponibilidad no limitante de agua o cuando indicó algún grado de estrés hídrico.	27
Figura 8. Porcentaje de la variación en la razón entre el N crítico y el N crítico de Referencia de Lemaire y Salette (1984a) explicada por estimaciones de la evapotranspiración relativa integradas durante diferentes intervalos de tiempo previos al momento de estimación del N crítico.....	28

Figura 9. Asociación entre la evapotranspiración relativa media estimada durante los once días previos a la determinación del N crítico y el N crítico expresado en términos relativos, en pasturas de festuca alta.....	28
Figura 10. Asociación entre la evapotranspiración relativa media y el N crítico relativo medio de festuca alta estimados durante el tiempo completo de desarrollo en cinco experimentos.....	29
Figura 11. Efecto de la nutrición nitrogenada sobre el rendimiento relativo de biomasa aérea en cuatro experimentos de festuca alta conducidos en secano, cuando el estado de nutrición nitrogenada se calculó en base al N crítico o en base al N crítico de Referencia propuesto por Lemaire y Salette (1984a).....	30
Figura 12. Asociación entre el Índice de Nutrición Nitrogenada medio ponderado en el tiempo observado por Agnusdei <i>et al.</i> (2010) y aquel predicho luego de calcular los balances hídricos y estimar el N crítico en función de la evapotranspiración relativa en cuatro experimentos estudiando rebrotes de forrajeras C ₃ que se desarrollaron bajo condiciones sub-óptimas de crecimiento.....	32
Figura 13. Posible subestimación del N crítico bajo condiciones de estrés hídrico.....	33
Figura 14. Asociación entre los valores de N crítico obtenidos en festuca alta empleando los métodos de cálculo de Justes <i>et al.</i> (1994) y de Greenwood <i>et al.</i> (1990) (a); y efecto de la evapotranspiración relativa media estimada durante los once días previos a la determinación del N crítico sobre el N crítico de festuca alta, calculando a éste según el método de Justes <i>et al.</i> (1994) o según el método de Greenwood <i>et al.</i> (1990) (b).....	34
Figura 15. Cambios simultáneos en la acumulación de N y de biomasa aérea observados con el incremento de la fertilización nitrogenada en aquellos tratamientos no limitados por N, y datos similares reportados en la literatura.....	35
Figura 16. Evolución a lo largo del tiempo de la evapotranspiración relativa diaria y del Índice de Nutrición Nitrogenada de festuca alta durante el experimento Verano 2010.....	42
Figura 17. Contenido volumétrico de agua en cada capa del perfil del suelo y agua recibida en forma de lluvia y/o riego registrados en pasturas de festuca alta creciendo bajo dos niveles de disponibilidad de agua y de N en los Experimentos Verano 2009 y 2010bis.....	66

Figura 18. Variación en función de la profundidad de la humedad volumétrica del suelo medida a -0.33 bar y del valor límite de descenso en la humedad volumétrica registrado en ambos experimentos de verano.....	67
Figura 19. Potencial agua foliar pre-alba registrado en pasturas de festuca alta expuestas a dos niveles de disponibilidad de agua y de N durante los Experimentos Verano 2009 y 2010bis.	67
Figura 20. Relación entre el potencial agua foliar pre-alba en pasturas de festuca alta y la disponibilidad de agua en el suelo, expresada como la fracción del agua del suelo transpirable por la planta.	68
Figura 21. Transpiración en pasturas de festuca alta expuestas a dos niveles de disponibilidad de agua y de N durante los Experimentos Verano 2009 y 2010bis...	69
Figura 22. Tasa de elongación foliar diaria en pasturas de festuca alta expuestas a dos niveles de disponibilidad de agua y de N durante los Experimentos Verano 2009 y 2010bis.....	70
Figura 23. Evolución a lo largo del tiempo del Índice de Área Foliar y la biomasa aérea acumulada en pasturas de festuca alta expuestas a dos niveles de disponibilidad de agua y de N durante los Experimentos Verano 2009 y 2010bis.....	72
Figura 24. Evolución a lo largo del tiempo de la densidad de macollos en pasturas de festuca alta expuestas a dos niveles de disponibilidad de agua y de N durante el Experimento Verano 2009.....	72
Figura 25. Evolución a lo largo del tiempo de la biomasa de raíces y de la densidad del largo de raíces en pasturas de festuca alta expuestas a dos niveles de disponibilidad de agua y de N durante los Experimentos Verano 2009 y 2010bis.....	74
Figura 26. Evolución a lo largo del tiempo de la proporción de la radiación incidente interceptada en pasturas de festuca alta expuestas a dos niveles de disponibilidad de agua y de N durante los Experimentos Verano 2009 y 2010bis.....	76
Figura 27. Regresiones lineales entre la radiación fotosintéticamente activa interceptada acumulada y la biomasa aérea o total en pasturas de festuca alta expuestas a dos niveles de disponibilidad de agua y de N durante los Experimentos Verano 2009 y 2010bis.....	77

- Figura 28. Evolución a lo largo del tiempo del contenido de N mineral del suelo en forma de nitrato más amonio en pasturas de festuca alta expuestas a dos niveles de disponibilidad de agua y de N durante los Experimentos Verano 2009 y 2010bis.....79
- Figura 29. Evolución a lo largo del tiempo de la acumulación de N en la biomasa total en pasturas de festuca alta expuestas a dos niveles de disponibilidad de agua y de N durante los Experimentos Verano 2009 y 2010bis.....79
- Figura 30. Evolución a lo largo del tiempo del Índice de Nutrición Nitrogenada en pasturas de festuca alta expuestas a dos niveles de disponibilidad de agua y de N durante los Experimentos Verano 2009 y 2010bis.....80
- Figura 31. Evolución a lo largo del tiempo de la demanda de N de la pastura y de los flujos de N del suelo en pasturas de festuca alta expuestas a dos niveles de disponibilidad de agua y de N durante los Experimentos Verano 2009 y 2010bis....81
- Figura 32. Magnitudes, expresadas como relaciones de respuesta, de los efectos del estrés hídrico, nitrogenado, hídrico+nitrogenado así como de la interacción entre los mismos sobre once variables de crecimiento en pasturas de festuca alta durante los Experimentos Verano 2009 y 2010bis.....89

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AD: agua disponible en el suelo

ANOVA: Análisis de la Varianza

BA: biomasa aérea

BA_e: BA asociada con funciones estructurales

BA_{cc}: nivel umbral de BA con el que se alcanza el cierre del canopy

BA_{cr}: BA crítica

BA_m: BA asociada con funciones metabólicas

BA_r: BA asociada a tejidos de reserva

β : coeficiente caracterizando la distribución vertical de la biomasa (β_B) o del largo (β_L) de raíces en el perfil de suelo

C: carbono

D: coeficiente de difusión del N mineral en el suelo a capacidad de campo

$\delta^{13}\text{C}$: composición isotópica del C

$\Delta^{13}\text{C}$: discriminación isotópica del C

DLR: densidad del largo de raíces

DMS: diferencia mínima significativa

D_N: demanda de N de la pastura

DPV: déficit de presión de vapor

DRA: disponibilidad relativa diaria de agua en los 0.2 (DRA₂₀), 0.4 (DRA₄₀) o 0.6 (DRA₆₀) metros superficiales del perfil de suelo

ET₀: Evapotranspiración de Referencia

ETR: evapotranspiración real

(ETR/ET₀)_m: media de la razón ETR/ET₀ diaria calculada durante el período experimental

^{11d}(ETR/ET₀)_m: media de la razón ETR/ET₀ diaria calculada durante los once días previos a la fecha de estimación del N_{cr}

EUR: eficiencia de uso de la radiación para la producción de BA (EUR_{BA}) o de biomasa total (EUR_T)

FAD: fracción del agua del suelo disponible

FASTP: fracción del agua del suelo transpirable por la pastura

FC_N : flujo convectivo de N en el suelo

FD: flujo difusivo

FD_N : FD de N en el suelo

FT_N : flujo total de N del suelo

$^{\circ}Cd$: grados día de crecimiento

HR: humedad relativa

IAF: índice de área foliar

INN: Índice de Nutrición Nitrogenada

INN_{mpt} : INN medio ponderado en el tiempo durante el período experimental

LRE: largo radical específico

LRT: largo de raíces total observado hasta 1 m de profundidad

MO: materia orgánica

MS: materia seca

N_{actual} : concentración de N actual en la BA

N_{cr} : nitrógeno crítico

NAC: nitrato de amonio calcáreo

pRI_{int} : proporción de la radiación incidente interceptada por la pastura

Ψ_h : potencial agua foliar

Ψ_{hRel} : Ψ_h relativo

RFA_{inc} : radiación fotosintéticamente activa incidente

RFA_{int} : RFA interceptada

Ref- N_{cr} : N_{cr} de Referencia propuesto por Lemaire y Salette (1984a)

RR: razón de respuesta indicando la magnitud del efecto del estrés hídrico (RR_A), del estrés nitrogenado (RR_N) o del estrés combinado hídrico-nitrogenado (RR_{A+N})

T: transpiración de la pastura

T_a : temperatura media del aire

TAH_{100} : tasa de aparición de hojas, expresada como número de hojas aparecidas en un intervalo de 100 °Cd

TC: tasa de crecimiento

TEF: tasa de elongación foliar

TEF_{mpt} : TEF media ponderada durante el período experimental

TEF_{Rel} : TEF relativa

θ_v : contenido volumétrico de agua del suelo

$^{CC}\theta_v$: θ_v a capacidad de campo

$^{LD}\theta_v$: límite de descenso de la θ_v

VMF: vida media foliar

VMF_{mpt} : VMF media ponderada durante el período experimental

RESUMEN

El agua y el nitrógeno (N) son los factores de crecimiento que limitan más fuertemente la productividad de pasturas y cultivos. Las pasturas y los pastizales templados de la Pampa Deprimida están sujetos a episodios sistemáticos de sequía durante el verano, estación durante la cual el crecimiento de estos recursos forrajeros se reduce sustancialmente. La absorción de agua y de N por parte de las plantas está profundamente interconectada, sin embargo, no está claro si la merma en la productividad primaria de las pasturas de la Pampa Deprimida durante la época estival obedece solamente a los efectos directos de la sequía o si ésta se encuentra también mediada por un empeoramiento en su estado de nutrición nitrogenada. El objetivo de esta tesis fue evaluar el efecto del estado hídrico del sistema suelo-planta sobre la nutrición nitrogenada de pasturas de festuca alta [*Lolium arundinaceum* (Schreb.) Darbysh.] establecidas en un suelo bajo típico del ambiente de la Pampa Deprimida. El método preferente para el diagnóstico del estado de nutrición nitrogenada se basa en el concepto de N crítico (N_{cr}), definido como la mínima concentración de N en la materia seca aérea que permite maximizar la tasa de crecimiento de la pastura. El N_{cr} disminuye a medida que la pastura acumula materia seca, y la primera parte de la tesis involucró la verificación respecto de si la curva de dilución de N_{cr} que fuera originalmente desarrollada sobre pasturas sólo limitadas por N (Ref- N_{cr}), es también aplicable en condiciones de estrés hídrico. Los resultados indicaron que en condiciones de sequía el N_{cr} es menor que el Ref- N_{cr} , siendo dicha reducción directamente proporcional a la intensidad del estrés hídrico. Una segunda parte de la tesis involucró luego la puesta en práctica de esta metodología de diagnóstico corregida en la evaluación del efecto del estrés hídrico sobre el estado de nutrición nitrogenada de una pastura de festuca alta implantada en un suelo Natracualf típico del sudeste bonaerense durante el verano de dos años consecutivos, ensayando dos niveles de disponibilidad de agua (secano vs riego) y dos niveles de fertilización nitrogenada (40 vs 200 kg de N ha⁻¹). La productividad primaria neta de festuca alta estuvo fuertemente co-limitada por agua y por N durante el verano, con respuestas muy altas y comparables al riego y al incremento en el nivel de N aplicado (incrementos promedio 54% y 68%, respectivamente). Las pasturas mostraron sistemas radicales profusamente desarrollados (5.8-9.3 Mg materia seca raíces ha⁻¹), pero concentrados mayormente en el horizonte superficial (66% a 75% de la biomasa o el largo de raíces en los 0.2m superiores del perfil de suelo). La exploración radical del horizonte nártrico (0.25-0.65m de profundidad) y por debajo de éste fue escasa; entonces, a pesar del elevado nivel de

agua disponible en el subsuelo (> 0.4m de profundidad) consecuencia de una napa freática cercana, festuca alta enfrentó situaciones de estrés hídrico cuando el horizonte superficial se secó. Un déficit hídrico extremo, de intensidad récord para el período 1971-2021, afectó negativamente el estado de nutrición nitrogenada de festuca alta, mientras que una sequía moderada, de intensidad cercana al promedio para la época, no tuvo un efecto significativo sobre éste. Estimaciones de la demanda de N de la pastura y de los flujos de N del suelo, sin embargo, indicaron que el estrés hídrico no redujo la disponibilidad relativa de N hacia la pastura; la disminución observada en el estado de nutrición nitrogenada de la pastura habría estado causada entonces por la pérdida de N foliar debido a la senescencia de tejidos inducida por el episodio severo estrés hídrico. Los resultados revelan entonces que, en este ambiente, la nutrición nitrogenada de festuca alta no es particularmente sensible al estrés hídrico. Esto se debería, por un lado, a su gran desarrollo radical que le permite una muy alta capacidad de absorción del N disponible en los horizontes superficiales y, por otro lado, a la restricción fisicoquímica impuesta por el horizonte nátrico, que dificulta el acceso de festuca alta al agua disponible en profundidad, limitando su crecimiento y demanda de N cuando el horizonte superficial se seca. Las principales causas de la baja productividad forrajera de festuca alta durante el verano en el ambiente de la Pampa Deprimida son, entonces, los efectos intrínsecos de la baja disponibilidad de agua y de la deficiencia de N, con el efecto del estrés hídrico viéndose parcialmente mediado por empeoramientos en su estado de nutrición nitrogenada sólo en condiciones de sequía inusualmente severa.

Palabras clave: Índice de Nutrición nitrogenada, raíces, forraje, flujos de nitrógeno en el suelo, Pampa Deprimida.

ABSTRACT

Water and nitrogen (N) are the growth factors most strongly limiting the productivity of pastures and crops. Temperate pastures and grasslands of the Flooding Pampa are subject to systematic drought episodes during summer, season in which the growth of these forage resources is substantially reduced. Water and N uptake by plants are deeply interconnected, however, it is not clear whether the decrease in primary productivity of Flooding Pampa pastures during the warm season obeys just to the direct effects of drought or if this is also mediated by an aggravation in their N nutrition status. The aim of this thesis was to evaluate the effect of the water status of the soil-plant system on the N nutrition of tall fescue [*Lolium arundinaceum* (Schreb.) Darbysh.] pastures established on a lowland soil typical of the Flooding Pampa environment. The preferential method for the diagnosis of the N nutrition status is based on the concept of critical N (N_{cr}), defined as the minimum N concentration in shoots biomass allowing maximum growth rates. The N_{cr} decreases as pastures accumulate shoots biomass, and the first part of this thesis involved verifying whether the N_{cr} dilution curve originally developed on pastures limited only by N (Ref- N_{cr}) had the same applicability under water stress conditions. The results showed that under drought conditions the N_{cr} is lower than the Ref- N_{cr} , such decrease being linearly related to the intensity of water stress. The second part of the thesis involved the application of this corrected diagnosis methodology in the evaluation of the effect of water stress on the N nutrition status of a tall fescue pasture established on typical Natracualf soil of southeast Buenos Aires during the summer season of two consecutive years, by assaying two levels of water availability (rainfed vs irrigated) and two levels of N fertilization (40 vs 200 kg N ha⁻¹). Tall fescue net primary productivity was strongly co-limited by water and N during summer, showing comparable, very high responses to both irrigation and the increase of N rate (average increases of 54% and 68%, respectively). Pastures had profusely developed root systems (5.8-9.3 Mg dry matter roots ha⁻¹), but which were concentrated mostly on topsoil (66-75% of root biomass or length were in the top 0.2m soil layer). Root exploration of the natric horizon (0.25-0.65m depth) and underneath was scarce; then, even when there was ample available water in the subsoil (>0.4m depth) due to a close water table, tall fescue faced water stress conditions whenever the topsoil desiccated. An extreme water stress episode, record for the 1971-2021 period, negatively affected tall fescue N nutrition status, while a moderate drought, of an intensity close to the average for the season, did not have a significant effect on it. Estimations of pasture N demand and soil N fluxes, however, pointed out that water stress did not decrease the

relative availability of N to the pasture; the observed reduction in pasture N nutrition status then would have been caused by the loss of leaf N due to the tissue senescence triggered by the severe water stress event. Results then reveal that tall fescue N nutrition status is not particularly sensitive to water stress in this environment. This would be due to, on the first hand, its huge root development which confers a very high capacity to absorb topsoil available N and, on the second hand, the physicochemical restriction imposed by the natric horizon, which restricts the access of tall fescue to the water available at depth, limiting its growth and N demand whenever the topsoil dries. The major causes of the low forage yield of tall fescue during summer in the Flooding Pampa environment are thus the intrinsic effects of low water availability and N deficiency, with the effect of water stress being partially mediated by aggravations in its N nutrition status only under unusually severe drought.

Key words: Nitrogen Nutrition Index, roots, forage, soil nitrogen fluxes, Flooding Pampa.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Relevancia productiva y principales limitantes del ambiente edafoclimático de la Pampa Deprimida

La Pampa Deprimida o Pampa Inundable es una de las principales áreas ganaderas del país, abarcando aproximadamente 9 millones de ha y extendiéndose hacia el noreste y sudoeste del sistema serrano de Tandilia, comprendiendo las áreas correspondientes a la cuenca del Río Salado y a la depresión de Laprida (Batista *et al.*, 2005). Estadísticas de 2020 indican que la Pampa Deprimida cuenta con 15.5, 18.9 y 15.3% del stock nacional de vacas, terneros y cabezas totales, respectivamente (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca [MAGyP], 2021).

El relieve de la Pampa Deprimida es marcadamente llano, con una pendiente promedio de 0.02% (Conzonno *et al.*, 2001), por lo que no hay una red de drenaje definida para el agua de escurrimiento y los sistemas fluviales son muy escasos, destacándose sólo el Río Salado (Kuppel *et al.*, 2015). Esta topografía relativamente homogénea, sin embargo, está asociada con una marcada heterogeneidad espacial y temporal en el ambiente edáfico, que se ve a su vez reflejada en heterogeneidad florística (Batista *et al.*, 2005; Oyarzabal *et al.*, 2020). Más del 60% del área está ocupada por suelos halomórficos con distintos grados de alcalinidad, salinidad e hidromorfismo, distribuidos en forma de mosaico (Miaczinsky 1995; Instituto de Suelos, 2013). A nivel de subgrupo y según la clasificación de Soil Taxonomy (Soil Survey Staff, 2014), los suelos más comunes en el área son los Natracualfs Típicos (3.2 millones de ha), los Natracuols Típicos (2.6 millones de ha), los Natralbols Típicos (0.5 millones de ha) y los Natracualfs Mólicos (0.4 millones de ha) (Morrás, 2017). Estos suelos suelen ocupar las posiciones más bajas del paisaje (Batista *et al.*, 2005), y tienen un uso predominantemente ganadero debido a sus limitantes: son imperfectamente drenados; presentan un horizonte A de espesor variable con un contenido de materia orgánica (MO) entre bajo y moderado (2-5%) y con pH desde neutro a alcalino, dependiendo del contenido de sodio, por debajo del cual se suele hallar un horizonte B textural con mayor contenido de arcilla, frecuentemente sódico, denso y duro (nátrico) (Rubio y Taboada, 2013; Imbellone *et al.*, 2021). Los perfiles de estos suelos presentan una marcada discontinuidad entre la permeabilidad del horizonte superior y los subyacentes, y en períodos de intensas precipitaciones se puede observar sobre el horizonte B textural la permanencia de una pseudo napa freática (napa colgante) que da origen a cementaciones (fragipanes incipientes) que limitan la infiltración de agua, la difusión de aire y la penetración de raíces (Imbellone *et al.*, 2010). Entre los suelos anteriormente

nombrados, los Natracualfs y Natralbols son los que muestran limitantes más severas para su utilización. Los Natracuols, en cambio, suelen presentar mejores condiciones para el crecimiento de las plantas (Vazquez *et al.*, 2001; Imbellone *et al.*, 2021), y en éstos la introducción de especies forrajeras cultivadas tiene un muy alto índice de éxito; especies como festuca alta [*Lolium arundinaceum* (Schreb.) Darbysh., anteriormente *Festuca arundinacea* (Schreb.)] y agropiro [*Thinopyrum ponticum* (Podp.) Barkworth y Dewey] comúnmente logran naturalizarse en muchos de estos ambientes (Agnusdei y Di Marco, 2015).

El clima de la Pampa Deprimida se clasifica como templado húmedo sin estación seca (C_{fb}, según Koppen). La temperatura media anual del aire varía en dirección sur-norte entre 14 y 17 °C (Bianchi y Cravero, 2010), y el valor medio anual para la radiación global varía en dirección sudeste-noroeste entre 14 y 18 MJ m⁻² día⁻¹ (National Renewable Energy Laboratory, 2021). La evapotranspiración media anual oscila entre 900 y 1000 mm, mientras que la precipitación media anual varía en el mismo rango y no presenta una marcada estacionalidad (Paruelo *et al.*, 2007; Bianchi y Cravero, 2010). La Pampa Deprimida registra sistemáticamente tanto excesos como déficits hídricos (Vázquez *et al.*, 2011; Scarpati y Capriolo, 2013; Di Bella *et al.*, 2016). Debido a la reducida permeabilidad de los suelos, a la escasa pendiente y a la deficiente red de drenaje, los episodios de anegamiento durante la estación fría, bajo una menor demanda atmosférica, son comunes; aunque en suelos que tienen un horizonte subsuperficial textural con un menor nivel de desarrollo los excesos hídricos pueden también deberse al ascenso de la napa freática (Imbellone *et al.*, 2021). Durante la época estival, por el contrario, la evapotranspiración suele exceder a las precipitaciones, resultando en frecuentes eventos de déficit hídrico (Colabelli *et al.*, 2004). Por ejemplo, en Balcarce durante el período 1971-2021, el mes de noviembre se presentó como hídricamente deficitario el 69% de los años, promediando un balance (lluvia – evapotranspiración) de –31 mm, mientras que diciembre fue deficitario el 78% de las ocasiones (balance de –51 mm), y enero y febrero presentaron déficit el 80% y el 76% de los años (balances de –50 mm y –31 mm, respectivamente) (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria [INTA], s.f.). Sin embargo, los datos climáticos muestran que el estrés hídrico estival es un fenómeno que ha ido ganando progresivamente mayor relevancia durante las últimas décadas, dado que la información semejante acotada al período 2000-2021 indica un noviembre hídricamente deficitario el 68% de los años (balance de –32mm), mientras que para diciembre, enero y febrero los valores

correspondientes son de 91% y -76 mm, 82% y -61 mm, y 77% y -21 mm, respectivamente (INTA, s.f.).

La otra gran limitante del ambiente productivo de la Pampa Deprimida es la nutrición nitrogenada de sus recursos forrajeros. Las características fisicoquímicas propias de los suelos halomórficos anteriormente mencionadas resultan en contenidos bajos a moderados de carbono (C) orgánico y N total en el horizonte superficial, debido no sólo a una menor productividad primaria neta sino también debido a mayores pérdidas de C edáfico debido a los procesos de dispersión, erosión y lixiviación (Dalal *et al.*, 2003; Peinemann *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 2010). Como consecuencia, el abastecimiento de N mineral generado como resultado del proceso de mineralización es menor en los suelos salinos y/o sódicos (Pathak y Rao, 1998; Rietz y Haynes, 2003). Por último, las elevadas pérdidas de N mediante volatilización de óxido nitroso (Ghosh *et al.*, 2017) y de amoníaco (Barbieri *et al.*, 2006) que suelen mostrar los suelos halomórficos afecta aún más la provisión de N disponible para las plantas. Las razones anteriormente expuestas explican los muy bajos niveles de N mineral que se observan en los suelos salinos y/o sódicos de la Pampa Deprimida (De Prado *et al.*, 2001). Los pastizales y pasturas de la Pampa Deprimida son, entonces, endémicamente deficientes en N, con el crecimiento de especies de tipo templado mostrando respuestas significativas a la fertilización nitrogenada no sólo durante estaciones con niveles de temperatura del aire favorables como otoño, primavera y verano (Agnusdei *et al.*, 2010; Colabelli *et al.*, 2011), sino también, aunque en menor medida, durante el invierno (Fernández Grecco, 2013). De este modo, la corrección de la deficiencia nitrogenada de las pasturas templadas de la Pampa Deprimida mediante fertilización permitiría, en promedio, incrementar la producción forrajera desde el nivel de 8 Mg de materia seca (MS) ha⁻¹ año⁻¹ observado en condiciones naturales hasta los 17 Mg MS ha⁻¹ año⁻¹ (Insúa *et al.*, 2021).

1.2. Déficits estacionales en la producción forrajera de la Pampa Deprimida y el rol potencial de la interacción agua-nitrógeno. Objetivo del trabajo

Una elevada y estable productividad forrajera constituye la base del éxito de los sistemas ganaderos de carácter pastoril (Bell *et al.*, 2018). La carga animal que el sistema es capaz de sostener es definida por la variabilidad estacional e interanual en la producción de forraje, la que está asociada con los cambios en los niveles de temperatura, radiación y humedad del ambiente. En la Pampa Deprimida, los recursos forrajeros perennes muestran su producción pico durante la primavera, observándose pronunciados baches productivos durante el invierno y el verano (Agnusdei *et al.*, 2001;

Posse *et al.*, 2005; Grigera *et al.*, 2007; Berger *et al.*, 2017). El reducido crecimiento invernal obedece fundamentalmente a los bajos niveles de temperatura del aire y de radiación solar, con valores promedio para el mes de julio de 6-9 °C y 5.5-7 MJ m⁻² día⁻¹, respectivamente (Bianchi y Cravero, 2010; National Renewable Energy Laboratory, 2021); por otra parte, tratándose de especies de origen templado capaces de crecer activamente durante la estación cálida, el bache de crecimiento estival responde fundamentalmente a una combinación de déficit hídrico y de déficit nitrogenado (Colabelli *et al.*, 2011; Insua *et al.*, 2021). Este déficit productivo estival es realmente severo; de hecho, Insua *et al.* (2021) demostró que, en condiciones no limitantes de agua y de nitrógeno (N), la productividad de festuca alta durante el verano es semejante a la producción de primavera. Dos fenómenos inconexos profundizan adicionalmente la problemática de la productividad primaria estival. Por un lado, los recursos forrajeros de los sistemas ganaderos del área se encuentran sujetos a una presión de uso cada vez mayor producto del progresivo desplazamiento de parte del stock ganadero de la Pampa Ondulada, la Pampa Subhúmeda y la Pampa Austral hacia la Pampa Deprimida que viene teniendo lugar durante las últimas décadas, derivado del avance de la agricultura en las áreas antes mencionadas, con ambientes edáficos presentando menores restricciones para el desarrollo de cultivos de grano (Viglizzo *et al.*, 2001; Modernel *et al.*, 2016). Este aumento de la carga animal en los sistemas ganaderos de la Pampa Deprimida genera sobrepastoreo, con impactos negativos sobre la productividad primaria neta, el C orgánico del suelo y la provisión de servicios ecosistémicos, y aumentando la frecuencia de los procesos de erosión (Modernel *et al.*, 2016). Por otro lado, la variabilidad asociada con el proceso de Cambio Climático, que ha generado eventos climáticos extremos con una frecuencia creciente durante el último tiempo, especialmente durante el verano, y del que se espera que sus efectos se profundicen a futuro (Müller *et al.*, 2021).

La disponibilidad de agua y de N son las dos mayores limitantes de la productividad primaria global (Sinclair y Ruffy, 2012; Cossani y Sadras, 2018). Las pasturas y pastizales templados de la Pampa Deprimida son sistemáticamente deficientes en N, y además se encuentran expuestos a frecuentes déficits de precipitación durante la estación cálida. La nutrición nitrogenada y el estado hídrico de las plantas están altamente interrelacionados debido a que la disponibilidad de agua en el suelo afecta tanto los procesos de producción (mineralización, nitrificación) como de pérdida (volatilización, lixiviación) de las formas minerales de N en el suelo (Coyne, 2008; Francis, 2008; Myrold y Bottomley, 2008; Norton, 2008), así como la tasa de absorción

de la solución del suelo y del N en ella disuelto por parte de las plantas alcanzada a través del proceso de transpiración (Allen *et al.*, 1998). Incluso la tasa de asimilación del N dentro de la planta suele verse también afectada en condiciones de déficit hídrico (Havill *et al.*, 1977; Ray y Sisson, 1986; Golberg *et al.*, 1995). De este modo, el impacto productivo de estos episodios transitorios de baja disponibilidad de agua podría verse agravado si éstos trajeran aparejados empeoramientos en el estado de nutrición nitrogenada de las pasturas. Esta tesis plantea como hipótesis general que los eventos de estrés hídrico afectan la nutrición nitrogenada de pasturas C₃ creciendo en este ambiente, ya sea a través de cambios en la demanda de N de la planta y/o en la oferta de N del suelo. El objetivo general de este trabajo de tesis es entonces evaluar el efecto del estado hídrico del sistema suelo-planta sobre la nutrición nitrogenada lograda por pasturas de festuca alta establecidas en un suelo bajo típico del ambiente de la Pampa Deprimida. Festuca alta fue elegida como especie testigo debido a su reconocida tolerancia a estreses abióticos como sequía, baja disponibilidad de nutrientes y valores extremos de pH (Belesky y West, 2009), que ha facilitado su introducción exitosa y su posterior naturalización en el ambiente en cuestión (Maddaloni y Ferrari, 2001; Scheneiter *et al.*, 2015).

1.3. Importancia del crecimiento de raíces en la captura de recursos edáficos por las plantas. Interrogantes que esta tesis intenta responder

La arquitectura del sistema radical de las plantas desempeña un rol crucial sobre la captura de recursos como agua y N y, como tal, podría tener un efecto decisivo sobre su estado de nutrición nitrogenada (Garnett *et al.*, 2009; Palta y Watt, 2009). A pesar del gran avance registrado durante las últimas décadas, el estudio de los sistemas radicales de las pasturas en general, y de festuca en particular, ha sido abordado menos frecuentemente, con sólo 69 de las 114223 entradas de la base de datos Global Root Traits (GRooT) correspondiendo a festuca alta (Guerrero-Ramírez *et al.*, 2021). Además de sus importantes funciones en la estimulación de los procesos relacionados con la dinámica de la MO y el ciclado de nutrientes mediante la generación de un microambiente edáfico de mayor actividad microbiana llamado rizósfera (Oliver *et al.*, 2021); el sistema radical, al ser el agente receptor de las demandas por parte de la biomasa aérea del vegetal y a su vez el responsable de la captura de los elementos demandados, se convierte en un actor clave en la definición de la capacidad de una planta para adaptarse y crecer bajo restricciones de tipo hidromineral, cuyo estudio merece ser profundizado. En el caso específico de festuca alta, se trata de una especie

con capacidad potencial de generar un profuso sistema radical y de explorar y capturar agua desde horizontes profundos del perfil del suelo y, por ende, de mantener estados hídricos más favorables en condiciones de sequía que especies con sistemas radicales más superficiales (Durand *et al.*, 1997). Dada su influencia determinante en la captura de recursos edáficos limitantes como agua y N, y por lo tanto en la determinación de la oferta y demanda de N para y por la planta, estudios que pretenden cuantificar el efecto de la disponibilidad hídrica sobre la nutrición nitrogenada alcanzada por una pastura, deben necesariamente indagar en el componente raíces. El estudio del sistema radical de festuca alta en condiciones de campo constituye entonces uno de los ejes de esta tesis. La evolución del estado de nutrición nitrogenada alcanzado por la pastura bajo diferentes regímenes hídricos se analizó mediante un enfoque que integra la valoración simultánea de la demanda de N de la pastura y de los flujos de N hacia las raíces (oferta de N del suelo), los cuales pueden ser estimados sólo si se cuenta con información relativa al sistema radical así como de otras variables de suelo. El único antecedente de relevancia fue desarrollado en un ambiente edafoclimático con características sustancialmente diferentes (Gonzalez-Dugo *et al.*, 2005; Durand *et al.*, 2010); el efecto del estrés hídrico sobre la nutrición nitrogenada podría resultar diferente en el ambiente de la Pampa Deprimida, con suelos con un mayor contenido de MO y un eventual aporte de humedad en profundidad producto de una napa freática cercana. Esta tesis doctoral resume los hallazgos de una serie de experimentos de campo llevados adelante durante tres años, en diferentes épocas y bajo diferentes niveles de disponibilidad de agua y de N, que permiten responder a los siguientes interrogantes:

- ¿cuál es la arquitectura radical de una pastura perenne en un suelo bajo ganadero típico del ambiente de la Pampa Deprimida?
- ¿puede la morfología radical de la pastura ser alterada por cambios en la disponibilidad de agua y N?
- ¿Cómo afecta la condición hídrica a la oferta de N por parte del suelo?
- ¿Puede la pastura mantener altos niveles de demanda de N a partir de la captura de agua desde horizontes profundos?
- ¿Cómo resulta afectado el balance entre oferta y demanda de N, esto es, el estado de nutrición nitrogenado de la pastura, en estaciones hídricamente deficitarias como lo es la época estival?

1.4. Estructura del trabajo

La tesis está estructurada en 4 capítulos. Los Capítulos 2 y 3 cuentan con sus introducciones respectivas, en las que se abordan las temáticas correspondientes a cada capítulo con un mayor nivel de profundidad y se introducen las hipótesis específicas a contrastar. El Capítulo 2 trata sobre la corroboración respecto de si la metodología preferente para el diagnóstico del estado de nutrición nitrogenada de pasturas y cultivos, desarrollada en condiciones en las que sólo el N es limitante, puede ser también aplicada en situaciones de déficit hídrico. Los resultados indicaron la necesidad de instrumentar una modificación a la misma, y esta metodología de diagnóstico modificada fue luego implementada en el diagnóstico del estado de nutrición nitrogenada de festuca alta durante experimentos estudiando rebrotes de verano, información que se presenta en el Capítulo 3 de la tesis. Las conclusiones generales del trabajo son presentadas en el Capítulo 4.

**CAPÍTULO 2. EVALUACIÓN Y AJUSTE DE LA METODOLOGÍA DE
DIAGNÓSTICO DEL ESTADO DE NUTRICIÓN NITROGENADA DE PASTURAS
DE TIPO TEMPLADO PARA SU IMPLEMENTACIÓN EN SITUACIONES DE
LIMITADA DISPONIBILIDAD HÍDRICA¹**

¹Parte del contenido de este capítulo fue publicado en Errecart, P.M.; Agnusdei, M.G.; Lattanzi, F.A.; Marino, M.A.; Berone, G.D. 2014. Critical nitrogen concentration declines with soil water availability in tall fescue. *Crop Science* 54: 318-330.

2.1. Introducción

2.1.1. Sobre el desarrollo del método preferente para la evaluación de la condición nitrogenada de pasturas y cultivos

La metodología de determinación del estado de nutrición nitrogenada de pasturas y cultivos basada en el concepto de nitrógeno crítico (N_{cr}) tal como se la conoce hoy día, tiene su origen en los estudios pioneros realizados por Duncan Joseph Greenwood en el Reino Unido en la década de 1960 y 1970, y por Gilles Lemaire en Francia a partir de la década de 1980. Greenwood *et al.* (1965) reportaron cómo el contenido de proteína de pasturas del género *Lolium* disminuía con su envejecimiento y acumulación de biomasa, aun cuando las mismas estaban adecuadamente provistas de N. Luego, en 1978, Greenwood y Barnes ajustan un modelo matemático a la disminución de la concentración de N con el aumento de biomasa (“dilución de N”), proponiendo su aplicación en modelos de respuesta al N para mejorar los criterios de diagnóstico al momento de detectar deficiencias nitrogenadas. Este trabajo de 1978 ya habla de “concentración crítica de N” como aquella “que es necesaria para un óptimo crecimiento de las plantas”.

Poco más tarde, en Salette y Lemaire (1981) y Lemaire y Salette (1984a; b) se reportaron resultados de estudios donde se evaluó el crecimiento y la acumulación de N en la biomasa aérea de festuca alta y pasto ovido (*Dactylis glomerata* L.). Tras la aplicación de dosis elevadas de N, los autores observaron que, durante las etapas iniciales de los experimentos, esto es, mientras el N no fue limitante, la dilución del N en la biomasa aérea fue semejante en diferentes años y a su vez tampoco difirió entre ambas especies (Fig.1). Los autores propusieron ajustar para los seis experimentos una “curva de dilución inicial común para condiciones no limitadas en N” del tipo potencial negativa:

$$N (\%) = 4.79 \cdot (BA)^{-0.324} \quad (1)$$

donde BA es la biomasa aérea, en $Mg \text{ ha}^{-1}$. En momentos determinados (en la Fig.1, indicados para cada experimento mediante flechas), la dilución de N adquirió una dinámica diferente (más acelerada) a la dilución inicial común, y a su vez esta tasa de dilución posterior fue variable entre experimentos. Esto obedeció a que el momento en el que el N comenzó a limitar el crecimiento difirió entre años, así como la intensidad de dicha deficiencia nitrogenada.

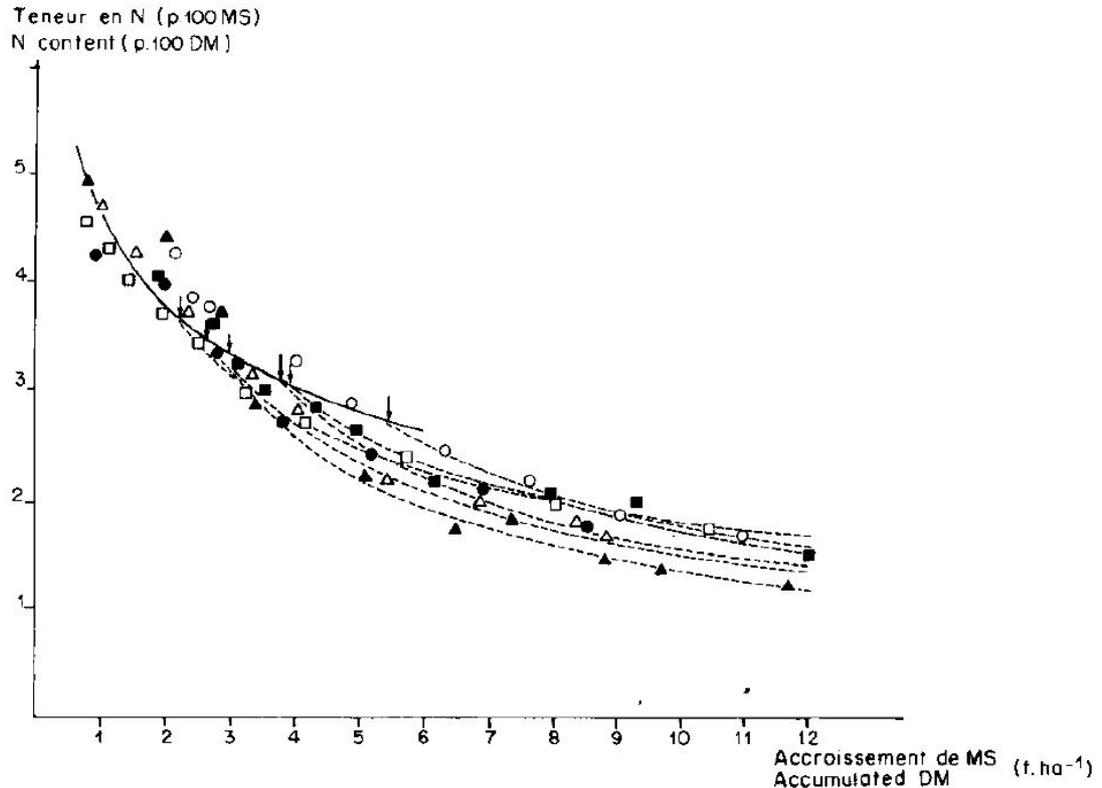


Fig.1. Concentración de N (eje y, en %) en función de la biomasa aérea acumulada (eje x, en Mg ha^{-1}) en experimentos estudiando rebrotes de primavera de pasturas de festuca alta. Los diferentes símbolos corresponden a seis experimentos llevados adelante en diferentes años. Las flechas indican, para cada experimento, los puntos a partir de los cuales la relación de dilución de N adquirió una dinámica diferente a la relación de dilución común observada en la etapa inicial de crecimiento. Tomado de Lemaire y Salette (1984a).

Al año siguiente, Greenwood *et al.* (1985) reportan una dilución de N en la BA similar en especies como papa (*Solanum tuberosum* L.), alfalfa (*Medicago sativa* L.), cebada (*Hordeum vulgare* L.), remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.) y especies hortícolas, pero en este caso ajustando una ecuación de dilución del tipo exponencial negativa. Finalmente, en 1986 Greenwood *et al.* introducen formalmente la noción de curva de dilución de N_{cr} , siendo éste el equivalente a la mínima concentración de N en la BA que permite maximizar la tasa de crecimiento de los cultivos y que deriva del concepto de concentración crítica de nutrientes con génesis en trabajos previos de Macy (1936) y Ulrich (1952). En dicho trabajo además se demuestra cómo la tasa de crecimiento de los cultivos se relacionó, para niveles de concentración nitrogenada inferiores al óptimo, de manera aproximadamente lineal con un indicador del nivel de suficiencia de N como es la razón N_{actual}/N_{cr} , donde N_{actual} es la concentración de N actual en la BA. Como consecuencia, los autores proponen que sería posible, una vez conocida la curva de dilución de N_{cr} para una determinada especie, estimar con precisión la magnitud en la que su crecimiento está siendo limitado por N en cualquier momento del ciclo del cultivo con sólo conocer sus valores de BA y N_{actual} .

Poco después, en 1989, Lemaire *et al.* definieron como Índice de Nutrición Nitrogenada (INN) a esta razón $N_{\text{actual}}/N_{\text{cr}}$ a la Greenwood *et al.* hicieran referencia en su trabajo de 1986 (Fig.2):

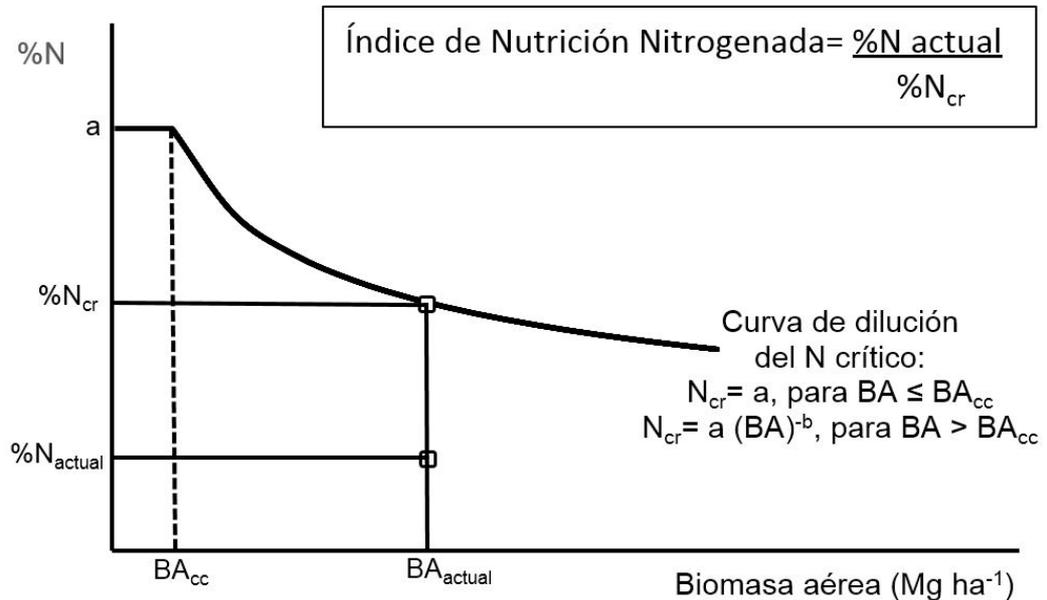


Fig.2. Descripción gráfica de la metodología de cálculo del Índice de Nutrición Nitrogenada a partir de la biomasa aérea actual (BA_{actual}), el $\%N_{\text{actual}}$ y la curva de dilución del N_{cr} . BA_{cc} es la BA asociada al inicio del cierre del canopeo.

De este modo, el estado de nutrición nitrogenada de la pastura o cultivo puede ser evaluado tras contar con los valores de BA y $\%N_{\text{actual}}$ de la pastura. El estado de nutrición nitrogenada se considera óptimo cuando el INN es igual a 1, de consumo de lujo o excesivo cuando es superior a 1, y deficitario cuando es menor a 1. La dilución del N_{cr} con el aumento de la BA indica que, a medida que la pastura crece, el N se acumula a una tasa progresivamente menor que el C. ¿Qué mecanismos explican esta dilución del N? El desarrollo teórico explicando la dilución del N_{cr} fue abordado con profundidad en Lemaire y Gastal (1997). De modo resumido, la dilución del N_{cr} obedece, en primer término y como fuera postulado inicialmente por Greenwood *et al.* (1965), a la mayor acumulación, tanto en términos absolutos como relativos, de material correspondiente a pared celular cumpliendo funciones de soporte estructural a medida que las cubiertas acumulan biomasa aérea. Este mayor requerimiento de tejido de sostén se origina en la progresivamente mayor necesidad de las plantas de crecer en sentido vertical a medida que el canopeo se desarrolla y las plantas detectan competencia intraespecífica por la captación de luz. Un segundo factor que opera al mismo tiempo se relaciona con la partición del N foliar siguiendo el patrón vertical de distribución de la luz. En canopeos progresivamente más cerrados la proporción de hojas recibiendo un nivel de irradiación menor al punto de compensación de luz para la fotosíntesis es cada vez mayor, con lo

cual la clorosis, remobilización del N y senescencia foliar son mayores y esto resulta en una menor concentración promedio de N en la BA. Sin embargo, como se observa en la Fig.2, los mecanismos de dilución del N_{cr} descritos no operan en la etapa inicial de crecimiento, en la que el %N no responde a cambios en el nivel de BA. En estas etapas iniciales del crecimiento de los cultivos, anteriores a la BA asociada al canopeo cerrado (BA_{cc}), las plantas son de menor tamaño y se comportan como plantas creciendo de forma aislada porque aún no detectan competencia por luz por parte de otros individuos circundantes. En esta etapa las plantas suelen mostrar una tasa de crecimiento relativo constante, creciendo mayoritariamente en el plano horizontal, con escasa necesidad de sintetizar tejidos de sostén ni de remobilizar el N foliar dado que no experimentan sombreado. A menudo se asume que la BA_{cc} se asocia a un valor de 1 Mg ha^{-1} , aunque hay suficiente evidencia para considerar que ésta en realidad sería más cercana a 1.5 Mg ha^{-1} (Justes *et al.*, 1994; Lemaire y Gastal, 1997).

Los valores de los coeficientes a y b de la curva de dilución de N_{cr} (Fig.2) han sido establecidos para numerosas especies (Gastal *et al.*, 2015). El coeficiente a representa el % N_{cr} en la BA durante la etapa inicial de crecimiento, antes de alcanzar la BA_{cc} . En esta etapa, casi la totalidad de la BA está constituida por biomasa con funciones metabólicas, esto es, asociada al aparato fotosintético, mientras que la proporción de tejidos estructurales es mínima. El coeficiente a , de este modo, refleja la %N en los tejidos fotosintéticos. Debido a que las especies C_4 tienen una menor necesidad de inversión de N en enzimas fotosintéticas para maximizar su tasa de asimilación de C dado que éstas realizan la fase inicial de este proceso a través de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa, la cual es más eficiente que la enzima rubisco al no exhibir fotorrespiración (Sage y Pearcy, 1987), dicha diferencia en el metabolismo de asimilación de C entre especies C_3 y C_4 resulta en diferentes valores del coeficiente a para estos grupos metabólicos (4.5-5.3 para C_3 vs 3.6-3.9 para C_4). Dentro de cada grupo metabólico, es difícil observar diferencias claras entre especies en el valor del coeficiente a (Greenwood *et al.*, 1990). El coeficiente b caracteriza el patrón de disminución del % N_{cr} durante el crecimiento, con valores mayores de b indicando una mayor tasa de dilución del N. El coeficiente b , por su parte, no muestra diferencias claras entre especies C_3 y C_4 ni entre monocotiledóneas y dicotiledóneas.

¿Cómo es el procedimiento experimental para la obtención de la curva de dilución de N_{cr} ? La metodología involucra la aplicación de varias dosis de N, en un rango que permita alcanzar el crecimiento potencial. A su vez comprende la realización de varios

muestreos de BA, que permitan la determinación del N_{cr} a lo largo del período de rebrote. Usualmente se comienza con un corte de emparejamiento a unos ≈ 5 cm de altura, y se realizan unos 5-6 muestreos de BA durante un período de tiempo equivalente a la vida media foliar de la especie. El método pionero (Lemaire y Salette, 1984a; b; Greenwood *et al.*, 1990) involucra la selección, para cada fecha de muestreo, de la mayor acumulación de BA obtenida con cualquier nivel de N, y su correspondiente %N se identifica como el % N_{cr} . Cuando la mayor acumulación de BA se obtiene con dos o más niveles de N, se considera como % N_{cr} a la menor %N asociada con dichos niveles. Justes *et al.* (1994) propusieron posteriormente un método más preciso para la determinación del N_{cr} . El mismo involucra la aplicación de 4 a 6 niveles de N, idealmente con al menos 2 de ellos permitiendo un crecimiento potencial de la pastura. Un procedimiento estadístico se aplica para la separación de las BA de los niveles limitantes de aquellos correspondientes a los niveles permitiendo un crecimiento potencial, y luego se llega al N_{cr} calculando la intersección entre la recta de la regresión lineal ajustada sobre los datos %N vs BA de los niveles limitantes y la línea vertical correspondiente a la BA media obtenida por los niveles que permitieron un crecimiento potencial. En los estudios realizados en festuca y pasto ovillo por Lemaire y Salette (1984a; b), si bien se emplearon sólo dos dosis de N (más un nivel testigo sin agregado de fertilizante), la mayor de ellas fue lo suficientemente alta como para posibilitar un crecimiento potencial (al menos durante las etapas iniciales de los rebrotes), pero al mismo tiempo tampoco fue excesiva como para permitir un consumo de lujo (Lemaire y Gastal, 1997). Estudios posteriores (Duru *et al.*, 1997) demostraron que la curva de dilución de N_{cr} para festuca alta es de hecho igual a aquella “curva de dilución inicial común para condiciones no limitadas en N” propuesta por Lemaire y Salette (1984a). De este modo, dicha curva de dilución de N_{cr} para festuca alta, que de aquí en más es denominada como *curva de dilución del N_{cr} de Referencia* (Ref- N_{cr}) es, expresada esta vez no en unidades porcentuales sino en mg N por kg de materia seca (MS), de:

$$\text{Ref-}N_{cr} \text{ (en mg N kg}^{-1} \text{ MS)} = 48 \cdot (\text{BA})^{-0.32} \quad (2)$$

2.1.2. Sobre la aplicabilidad del Ref- N_{cr} cuando hay limitantes para el crecimiento

El Ref- N_{cr} es una función empírica que fue originalmente ajustada sobre datos experimentales obtenidos en experimentos de campo desarrollados bajo condiciones de crecimiento favorables, esto es, donde esencialmente sólo el N limitaba el crecimiento, mientras que otros factores como el agua y demás nutrientes tenían una disponibilidad

adecuada. Gran número de estudios posteriormente corroboraron la aplicabilidad del Ref-N_{cr} en tales condiciones (Lemaire *et al.*, 1985; Bélanger, Gastal y Lemaire, 1992; Bélanger y Richards, 1997; Duru *et al.*, 1997; Lemaire y Gastal, 1997; Agnusdei *et al.*, 2010); de este modo, actualmente hay una muy fuerte base teórica y también experimental señalando al INN como el indicador más idóneo del estado de nutrición nitrogenada de una pastura o cultivo (Lemaire y Meynard, 1997; Sadras y Lemaire, 2014; Gastal *et al.*, 2015).

Con respecto al efecto de otros factores de crecimiento, algunos estudios han reportado que el INN se ve reducido bajo menores disponibilidades de P (Duru y Ducrocq, 1997), de S (Salvagiotti y Miralles, 2008) o bajo sequía (Lemaire y Denoix, 1987b), simplemente dando por sentado que el N_{cr} sigue siendo el mismo que en condiciones potenciales de crecimiento y sin plantearse la hipótesis de que éste pudiera ser menor en situaciones de crecimiento limitado. Tomando como ejemplo el trabajo de Duru y Ducrocq (1997), tanto para los tratamientos alto P como para los tratamientos sin P los autores calculan el INN en función del Ref-N_{cr} , y luego calculan las acumulaciones relativas de biomasa de los cuatro tratamientos considerando al tratamiento alto P-alto N como el control (Fig.3):

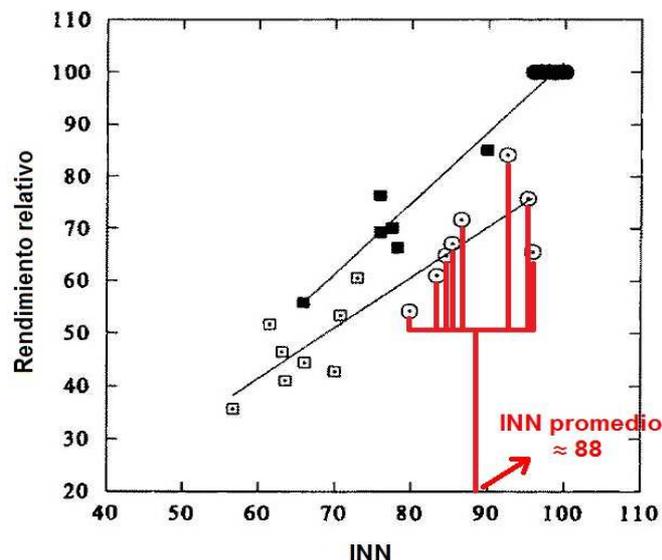


Fig.3. Rendimiento relativo de biomasa aérea en función del Índice de Nutrición Nitrogenada (presentando en escala 0-100 en lugar de la más usual 0-1) calculado en base al N_{cr} de Referencia de Lemaire y Salette (1984a) en pasturas polifíticas C_3 . Símbolos llenos y símbolos vacíos representan tratamientos con alto vs nulo agregado de fósforo, respectivamente; círculos y cuadrados representan tratamientos con alto vs nulo agregado de N, respectivamente. Tomado de Duru y Ducrocq (1997).

Sin embargo, si la dosis alto N hubiera permitido alcanzar el potencial de crecimiento en los ambientes que no recibieron P —hecho improbable tras la aplicación de sólo una dosis elevada de N—, este nivel de crecimiento exhibido por el tratamiento sin P-

alto N sería el verdadero nivel control sobre el cual se debería recalcular el rendimiento relativo de los tratamientos sin P. De este modo, el rendimiento relativo del tratamiento sin P-alto N sería de 1, obteniéndose el mismo con un valor de INN —subestimado— de ≈ 0.88 , como muestra la Fig.3. Dado que un rendimiento relativo de biomasa del orden de 1 por definición debe asociarse con un nivel de nutrición nitrogenada óptimo, la diferencia entre éste y el INN medio reportado en la Fig.3 —en este hipotético caso, del orden del 12%— indica la magnitud aproximada en la que el verdadero N_{cr} estaría siendo sobreestimado por el Ref- N_{cr} en estas condiciones limitantes para el crecimiento. Cabe la aclaración de que la variabilidad observada en el INN del tratamiento sin P-alto N obedece a que el set de datos está compuesto por la combinación de 4 sitios de muestreo x por 2 años. Cada punto representaría un nivel de deficiencia de P diferente y por lo tanto podría estar asociado con un N_{cr} diferente, por lo que la hipotética reducción de 12% en el N_{cr} en realidad representaría un valor promedio para los ambientes limitados en P que fueron estudiados.

En un comienzo se propuso que el N_{cr} no es sustancialmente afectado por otros factores de crecimiento (Lemaire y Gastal, 1997); sin embargo, en tiempos más recientes se acumuló evidencia contraria al respecto, con algunos estudios señalando al efecto de condiciones de crecimiento sub-óptimas como el responsable de discrepancias entre el Ref- N_{cr} y el N_{cr} . En trigo, se sugirió que una estación de crecimiento acortada y una reducida disponibilidad de humedad de suelo causan variabilidad en el N_{cr} (Justes *et al.*, 1994; Ziadi *et al.*, 2010). En papa, se observó un menor N_{cr} bajo estrés hídrico (Bélanger *et al.*, 2001). En forrajeras, Agnusdei *et al.* (2010) reportaron que, en casos puntuales en los que las condiciones de crecimiento no permitieron lograr tasas de crecimiento potenciales, las estimaciones de N_{cr} resultaron inferiores al Ref- N_{cr} . Estas reducciones en el N_{cr} se evidenciaron tanto en especies anuales [raigrás (*Lolium multiflorum* Lam.) y avena (*Avena sativa* L.)] como en especies perennes (agropiro alargado y festuca alta), y fueron concurrentes con condiciones subóptimas de temperatura del aire, radiación o lluvias; sin embargo y con respecto a este último factor, en dichos experimentos no se contó con información precisa del nivel de estrés hídrico alcanzado. Por último, también se ha reportado que el N_{cr} puede presentar variabilidad intraespecífica (Bélanger *et al.*, 2001), ser más elevado durante el primer año de crecimiento (Bélanger y Richards, 1997; 2000) o mostrar una persistente disminución con el envejecimiento en pasturas perennes (Bélanger y Ziadi, 2008).

La ocurrencia de restricciones al crecimiento vegetal, lejos de ser una excepción, es más bien la regla en la mayor parte del área destinada a la producción de forraje (Fay *et al.*, 2015). Los eventos de temperaturas extremas muestran una tendencia progresivamente mayor hacia condiciones más cálidas, con incrementos en la temperatura media del aire y en la duración e intensidad de las olas de calor; los episodios de estrés hídrico por ende son cada vez más recurrentes, no sólo durante la estación cálida sino también durante primavera y otoño (Müller *et al.*, 2021). La determinación del estatus nitrogenado de pasturas creciendo con algún grado de limitante hídrica empleando el Ref- N_{cr} como nivel de referencia resultaría en diagnósticos sesgados si efectivamente hubiera un efecto del estrés hídrico sobre el N_{cr} . Sin embargo, se carece de información respecto del efecto del déficit hídrico sobre el N_{cr} . La hipótesis específica que se plantea es que condiciones de sequía causan menores valores de N_{cr} en festuca alta, y que hay una relación directa entre el grado de severidad del déficit hídrico y el nivel de reducción experimentado por el N_{cr} . El objetivo de este capítulo es, entonces, determinar si el N_{cr} de festuca alta es afectado por el estrés hídrico y, si así lo fuera, establecer si la magnitud de cambio en el N_{cr} se encuentra relacionada con la intensidad del estrés hídrico.

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Sitio experimental, suelos y clima

Los experimentos se llevaron a cabo entre 2008 y 2010 en la Reserva Ganadera N° 7 de la Unidad Integrada Balcarce (UIB, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria-Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Mar del Plata), en Balcarce, Buenos Aires, Argentina (37°47' S y 58°16' O, 130 msnm). El clima es templado húmedo sin estación seca. La temperatura media del aire (T_a) oscila entre 7.8 °C (julio) y 21.4 °C (enero). Los valores medios de los acumulados anuales de Evapotranspiración de Referencia de acuerdo con el método Food and Agriculture Association (FAO) Penman-Monteith (ET_0) y de lluvia son de 990 y 950 mm, respectivamente. A pesar de los altos valores anuales de lluvia, los episodios de estrés hídrico son comunes en la estación cálida, y también en la primavera y el otoño.

Los experimentos se llevaron adelante en un potrero implantado con una pastura de nueve años de edad de festuca alta de tipo templado, cultivar "El Palenque MAG INTA". Cada experimento consistió en el estudio de un rebrote de festuca alta de 40-70 días de duración, dependiendo de la estación del año. En este potrero de festuca, se definieron dos sitios experimentales. En el sitio "A" (37°47'35" S, 58°16'42" O) el suelo es un

Natracualf de textura franca (Soil Survey Staff, 2014) con una capacidad de almacenamiento de agua disponible para las plantas (entre 0.33 y 15 bares de succión) de 56 mm en los 0.6 m superficiales del perfil, de acuerdo con el método de la membrana de presión de Richards (Dane *et al.*, 2002). Los 20 cm superficiales del perfil de suelo tenían un contenido de materia orgánica de 38 g kg⁻¹, pH de 9 (suelo: agua 1: 2.5), un contenido de P disponible de 7 mg kg⁻¹ (Bray I), una conductividad eléctrica de 1.0 dS m⁻¹ y 19% de sodio intercambiable. En el sitio "B" (37°47'31" S, 58°16'38" O), el suelo es un Argiacuol de textura franca, con 59 mm de agua disponible en los 0.6 m superficiales del perfil, y un contenido de materia orgánica de 96 g kg⁻¹ y de P disponible de 8 mg kg⁻¹, un pH de 7.2 y 11.3% de sodio intercambiable en el horizonte superficial.

2.2.2. Diseño experimental, manejo agronómico y tratamientos

El diseño experimental empleado fue el de parcelas divididas, replicadas en dos bloques. Los diferentes niveles de fertilizante nitrogenado fueron aplicados aleatoriamente a nivel de parcela principal. Las parcelas principales (18 m²) se dividieron en subparcelas, las cuales fueron asignadas aleatoriamente a las fechas de muestreo. Se realizaron cuatro a seis muestreos consistiendo en cortes de BA cada siete a diez días, dependiendo del experimento (Tabla I del Apéndice). A los fines de esta tesis, se consideraron como *tratamientos* sólo a los niveles de N ensayados y no a la combinación factorial de todos los niveles de N y todas las fechas de muestreo, dado que (i) en este tipo de estudios las fechas de muestreo no se encuentran estipuladas de antemano y son seleccionadas arbitrariamente a los fines de contar con la información requerida para estimar el N_{cr} en un amplio rango de BA (Justes *et al.*, 1994), y (ii) el diseño de parcelas divididas fue adoptado sólo a los fines de poder agrupar el análisis de todas las fechas de muestreo de cada experimento en un único ANOVA y así contar con una mayor potencia en el test de significancia F (esto es, un menor error de Tipo II) que aquella alcanzable con la opción alternativa que implica realizar un test de ANOVA simple para cada fecha de muestreo de cada experimento (Doncaster *et al.*, 2014).

La pastura se cortó a 5 cm de altura al inicio de cada experimento. Luego se aplicó P al voleo en una dosis de 20 kg P ha⁻¹ en forma de superfosfato triple de calcio, con el objetivo de lograr condiciones no limitantes para el crecimiento en cuanto a disponibilidad del nutriente. A continuación, se aplicaron los tratamientos (cuatro a cinco niveles de disponibilidad de N de acuerdo con el experimento, Tabla 1), en forma de urea o nitrato de amonio calcáreo al voleo. Inmediatamente tras la fertilización, se aplicó

una lámina de riego de 30 mm para facilitar la incorporación del fertilizante nitrogenado y minimizar las pérdidas de N por volatilización.

Tabla 1. Tratamientos aplicados y variables meteorológicas registradas en los cinco experimentos conducidos en condiciones de secano.

Experimento (fecha de fertilización)	Nivel de N y fuente kg N ha ⁻¹	Radiación global incidente media MJ m ⁻² día ⁻¹	Temperatura media del aire °C	Razón (ETR/ET ₀) _m ²
Primavera Temprana 2008 (21/8/08)	0-75-150-225 Urea	14.4	9.4	0.71
Primavera Tardía 2008 (23/10/08)	0-75-150-225 Urea	22.2	15.1	0.51
Otoño 2009 (19/3/09)	0-75-150-225 Urea	12.1	13.3	0.63
Primavera Temprana 2009 (19/8/09)	0-75-150-350-500 NAC ¹	13.1	9.3	0.85
Verano 2010 (30/12/09)	0-75-150-350-500 NAC	21.5	20.5	0.71

¹Nitrato de amonio calcáreo.

²Valor medio estimado durante todo el experimento para la razón diaria entre la Evapotranspiración Real y la Evapotranspiración de Referencia.

El efecto del estrés hídrico sobre el N_{cr} de festuca alta se evaluó en los cinco experimentos detallados en la Tabla 1, en condiciones de secano (excepto el riego inicial realizado tras la fertilización). Un set idéntico de experimentos se condujo en simultáneo aplicando los mismos tratamientos detallados en la Tabla 1 y siguiendo el mismo diseño experimental, pero bajo condiciones hídricas no limitantes logradas mediante riego por goteo (líneas de riego espaciadas 0.6 m entre sí, con goteros de 1 L h⁻¹ ubicados cada 0.3 m). Este capítulo sintetiza entonces la información correspondiente a un total de diez experimentos de campo. Los experimentos Primavera Temprana 2009 fueron llevados adelante en el sitio "B", mientras que los demás experimentos se llevaron a cabo en el sitio experimental "A". La información obtenida en los cinco experimentos conducidos bajo riego, publicada en Errecart *et al.* (2012), fue utilizada a los fines de: (i) verificar la validez de la razón entre la Evapotranspiración Real (ETR, Sección 2.2.3) y la ET₀ como estimador del nivel de estrés hídrico experimentado por la pastura, y (ii) evaluar el efecto de la disponibilidad de agua en el suelo sobre la absorción de N por la pastura; mientras que la información de dos de estos cinco experimentos realizados bajo riego (que recibieron niveles máximos de N que permitieron alcanzar condiciones nitrogenadas supraóptimas) se utilizó a su vez para confirmar la confiabilidad del método de determinación del N_{cr} (Sección 2.2.6.2) aplicado en este trabajo.

2.2.3. Balance hídrico

Los balances de agua del suelo de los cinco experimentos se realizaron de acuerdo con Della Maggiora *et al.* (2003), teniendo en cuenta el nivel inicial de agua disponible

en el suelo, la Evapotranspiración Real (*ETR*) y los aportes de agua mediante lluvia e irrigación:

$$AD_i = AD_{i-1} + \text{lluvia} + \text{riego} - ETR \quad (3)$$

donde AD_i y AD_{i-1} son los niveles de agua disponible el día i y el día previo, respectivamente (en mm). Los balances hídricos se calcularon hasta los 0.6 m de profundidad en base a evidencia experimental (véase Capítulo 3) sugiriendo que el agua disponible a mayor profundidad tiene escasa a nula influencia en el crecimiento de festuca alta en este ambiente. Los cálculos del balance de agua del suelo comenzaron el 1 de agosto de 2008 asumiendo un perfil de suelo a capacidad de campo, condición asegurada por 112 mm de lluvia acumulada durante los 2 meses previos. La *ETR* diaria se asumió igual a la ET_0 diaria toda vez que la fracción del agua del suelo disponible (*FAD*, calculada como la razón entre el AD_i y la capacidad de almacenamiento de agua disponible especificada para los perfiles de suelo en la Sección 2.2.1) fue igual o superior a 0.4 (Weisz *et al.*, 1994; Allen *et al.*, 1998; Ray y Sinclair, 1998). Por debajo de dicho umbral, se asumió que la *ETR* decreció linealmente, siendo nula cuando la *FAD* alcanzó cero. La ET_0 diaria se calculó según el método FAO Penman-Monteith (Allen *et al.*, 1998), a partir de información meteorológica registrada en el sitio experimental (estación meteorológica IMETOS ag, Pessl Instruments GmbH, Weiz, Austria). Se asumió que el estado nitrogenado de la pastura no tuvo efecto sobre la ET_0 (Caviglia y Sadras, 2001; Neves Lopes *et al.*, 2011), y que la escorrentía fue despreciable.

2.2.4. Estrés hídrico

La ejecución de los balances hídricos para cada experimento permitió obtener valores diarios de la razón ETR/ET_0 , y este nivel relativo de evapotranspiración fue considerado como indicador instantáneo del grado de estrés hídrico experimentado por la pastura, con niveles máximo de 1 ($ETR = ET_0$, sin estrés hídrico) y mínimo de 0 (*ETR* nula, máximo estrés hídrico posible).

2.2.5. Validación de la razón ETR/ET_0 como indicadora del nivel de estrés hídrico

Dado que la discriminación isotópica del C ($\Delta^{13}C$, en ‰) usualmente disminuye bajo estrés hídrico (Farquhar *et al.*, 1989) y, en pasturas, correlaciona fuertemente con el nivel de agua disponible para las plantas en el suelo (Schnyder *et al.*, 2006), se emplearon mediciones de $\Delta^{13}C$ para valorar la utilidad de la razón ETR/ET_0 obtenida a

partir de los balances de agua en el suelo como estimadora del nivel de estrés hídrico. La composición isotópica del C de la BA de las muestras ($\delta^{13}\text{C}$, en ‰), calculada como:

$$\delta^{13}\text{C} = \frac{\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}\right)_{\text{muestra}}}{\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}\right)_{\text{standard V-PDB}}} - 1 \quad (4)$$

fue determinada en 0.7 mg de BA proveniente de la última cosecha de los cinco experimentos estudiados empleando un analizador elemental (NA1500, Carlo Erba Strumentazione, Milán, Italia) acoplado a un espectrómetro de masa de relaciones isotópicas de flujo continuo (Deltaplus, Thermo-Finnigan MAT, Bremen, Alemania). Las muestras fueron medidas en conjunto con un gas estándar previamente calibrado contra un estándar isotópico secundario (IAEA-CH6, exactitud de $\pm 0.06\%$ desvíos estándar [DE]). Un estándar de laboratorio (harina de trigo) se corrió cada diez muestras para estimar la precisión de los análisis isotópicos ($\pm 0.09\%$ DE). El $\Delta^{13}\text{C}$ fue luego estimado como:

$$\Delta^{13}\text{C} = \frac{(\delta^{13}\text{C}_{\text{atm}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{muestra}})}{(1000 + \delta^{13}\text{C}_{\text{muestra}})} \cdot 1000 \quad (5)$$

donde $\delta^{13}\text{C}_{\text{atm}}$ es el contenido de ^{13}C del CO_2 atmosférico (asumido en -8.3%).

2.2.6. Muestreos y mediciones

2.2.6.1. Biomasa aérea y concentración de N

En cada subparcela, se seleccionó aleatoriamente un cuadrante de 0.1 m^2 ($0.2 \cdot 0.5\text{m}$). La BA de la pastura dentro del cuadrante seleccionado se cortó al ras del suelo con tijeras mecánicas accionadas por baterías (Guampa 222, Metalúrgica Faré SAIC, Benito Juárez, Argentina). El material senescente se descartó. Las muestras de BA fueron luego liofilizadas (Rificor LA-B4, Rificor SH, Buenos Aires, Argentina) y pesadas para estimar la acumulación de BA (en Mg ha^{-1}). Las muestras secas fueron molidas en un molino Thomas Wiley Mini-Mill (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA) empleando una malla de abertura 40 mesh y su concentración de N total (g N kg^{-1} MS) fue luego determinada de acuerdo con Nelson y Sommers (1973; Método A, sin la modificación del ácido salicílico). La absorción de N por la BA (kg N ha^{-1}) se estimó como el producto entre la BA acumulada y la concentración de N total en la BA.

2.2.6.2. N_{cr} , Ref- N_{cr} e INN

El N_{cr} de la pastura ($g\ N\ kg^{-1}\ MS$) se calculó para cada fecha de muestreo de BA realizada en cada uno de los cinco experimentos, de acuerdo con el procedimiento propuesto por Justes *et al.* (1994). En cada experimento, los valores de BA alcanzados por los tratamientos en todas las fechas de muestreo fueron analizados mediante un único ANOVA. Cuando éste indicó efecto significativo ($p < 0.05$) de los tratamientos aplicados y/o interacción significativa entre tratamientos y fecha de muestreo, se procedió a comparar entre sí los valores de BA alcanzados en cada fecha de muestreo mediante el test de la diferencia mínima significativa (DMS) de Fisher, empleando un α de 0.10 a los fines de aumentar su potencia y así reducir las posibilidades de incurrir en el error de Tipo II. Las fechas de muestreo no fueron consideradas para el cálculo del N_{cr} si dicho análisis indicó que la BA no difirió entre los niveles de N ensayados. En cada fecha de muestreo, los niveles de N cuya acumulación de BA no difirió ($p > 0.10$) de la máxima acumulación de BA registrada, se definieron como no limitados en N. La BA media de los niveles no limitados en N se consideró como la BA crítica (BA_{cr}). Luego, una función lineal del tipo:

$$N = a + b \cdot BA \quad (6)$$

se ajustó sobre el subset compuesto por las réplicas de aquellos niveles limitados en N y del menor nivel de N que permitió alcanzar una acumulación de BA no limitante, y el N_{cr} se calculó ingresando con la BA_{cr} en la Ecuación 6.

El Ref- N_{cr} ($g\ N\ kg^{-1}\ MS$), por su parte, se calculó ingresando con la BA_{cr} en la Ecuación 2 cuando ésta fue igual o superior a $1.55\ Mg\ ha^{-1}$ o se asumió constante en un valor de $41.7\ g\ N\ kg^{-1}\ MS$ cuando fue inferior al citado valor (Justes *et al.*, 1994):

$$Ref-N_{cr} = 48 \cdot (1.55)^{-0.32} = 41.7 \quad (7)$$

El INN de la pastura se estimó como la razón entre el N_{actual} y el N_{cr} . El INN medio ponderado en el tiempo durante el período experimental (INN_{mpt}) se calculó para cada nivel de N ensayado con todos los valores de INN estimados durante el experimento y considerando el largo de los intervalos de tiempo transcurridos entre fechas de medición, como fuera propuesto en Lemaire y Gastal (1997). Los valores de INN superiores a 1.0 se consideraron como 1.0 cuando el INN_{mpt} se regresionó contra la acumulación relativa de BA (la razón entre la acumulación máxima de BA lograda por cada nivel de N y la acumulación máxima absoluta registrada en el experimento), dado que mejoras en el estado de nutrición nitrogenada por encima de la condición óptima no

afectan el crecimiento y subestimarían el efecto nocivo de un período de deficiencia de N durante el experimento sobre la acumulación final de BA.

Como fuera descrito en la sección anterior, los muestreos de BA fueron realizados al ras del suelo (a los fines prácticos, a ≈ 1 cm de altura), mientras que una altura de muestreo de ≈ 5 cm fue empleada en los trabajos que dieron origen a la metodología de diagnóstico a través del INN (Lemaire y Salette, 1984a; b). Esto podría, potencialmente, introducir un sesgo en las estimaciones de N_{cr} por cuanto la incorporación de este estrato basal del canopeo, compuesto mayoritariamente por bases de vainas con menor contenido de clorofila y mayor contenido de carbohidratos de reserva (Volenec, 1986), podría resultar en una menor concentración de N en la BA muestreada. Las bases de las vainas, sin embargo, son también sitios de reserva de N, con su remobilización acelerando la reconstrucción de la maquinaria fotosintética luego de eventos de defoliación, por lo que su contenido de N no es especialmente bajo (Gastal y Saugier, 1986; Gonzalez-Dugo et al., 2012). En efecto, Errecart *et al.* (2012) demostraron que esta modificación en la metodología de muestreo no resulta en variaciones significativas en el diagnóstico del estado de nutrición nitrogenada de especies templadas. No obstante, mayor evidencia al respecto es aportada por los resultados encontrados en este trabajo (ver Sección 2.3.3).

2.2.7. Análisis estadístico

Las comparaciones de medias de tratamiento y las regresiones lineales simples según el método de los cuadrados mínimos se realizaron mediante los procedimientos ANOVA y REG del paquete informático SAS (v 14.1, SAS Institute, Cary, NC, USA), respectivamente (SAS, 2015a; d). Pendientes y ordenadas al origen de las funciones lineales se compararon de a pares usando variables dummy, invocando la instrucción CONTRAST del procedimiento GLM (Littell *et al.*, 2002). La falta de linealidad se evaluó testeando la significancia del término adicional de orden cuadrático.

2.2.8. Digitalización de información

Información publicada previamente para festuca alta así como para otras especies (Lemaire y Denoix, 1987a; Bélanger, Gastal y Lemaire, 1992; Justes *et al.*, 1994; Bélanger y Richards, 2000; Plénet y Lemaire, 2000; Ziadi *et al.*, 2008) se digitalizó empleando el software Engauge Digitizer v 5.0 (Mitchell *et al.*, 2021).

2.3. Resultados

2.3.1. Condiciones meteorológicas y disponibilidad de agua en el suelo

Los experimentos se desarrollaron bajo un rango amplio de condiciones meteorológicas. La radiación global incidente media registrada durante los experimentos varió entre 12 y 22 MJ m⁻² día⁻¹, y la T_a entre 9 y 21 °C (Tabla 1; la evolución mensual de la T_a, de la ET₀ y de las precipitaciones en cada uno de los experimentos se presenta en la Fig. I del Apéndice).

Del mismo modo, las condiciones hídricas experimentadas por las pasturas fueron variadas. Las estimaciones de la FAD por lo general se ubicaron por encima de 0.20 durante la mayor parte de los experimentos, pero alcanzó un mínimo de 0.03 en noviembre de 2008, cuando la razón ETR/ET₀ tocó su mínimo de 0.06 (Fig.4). La razón

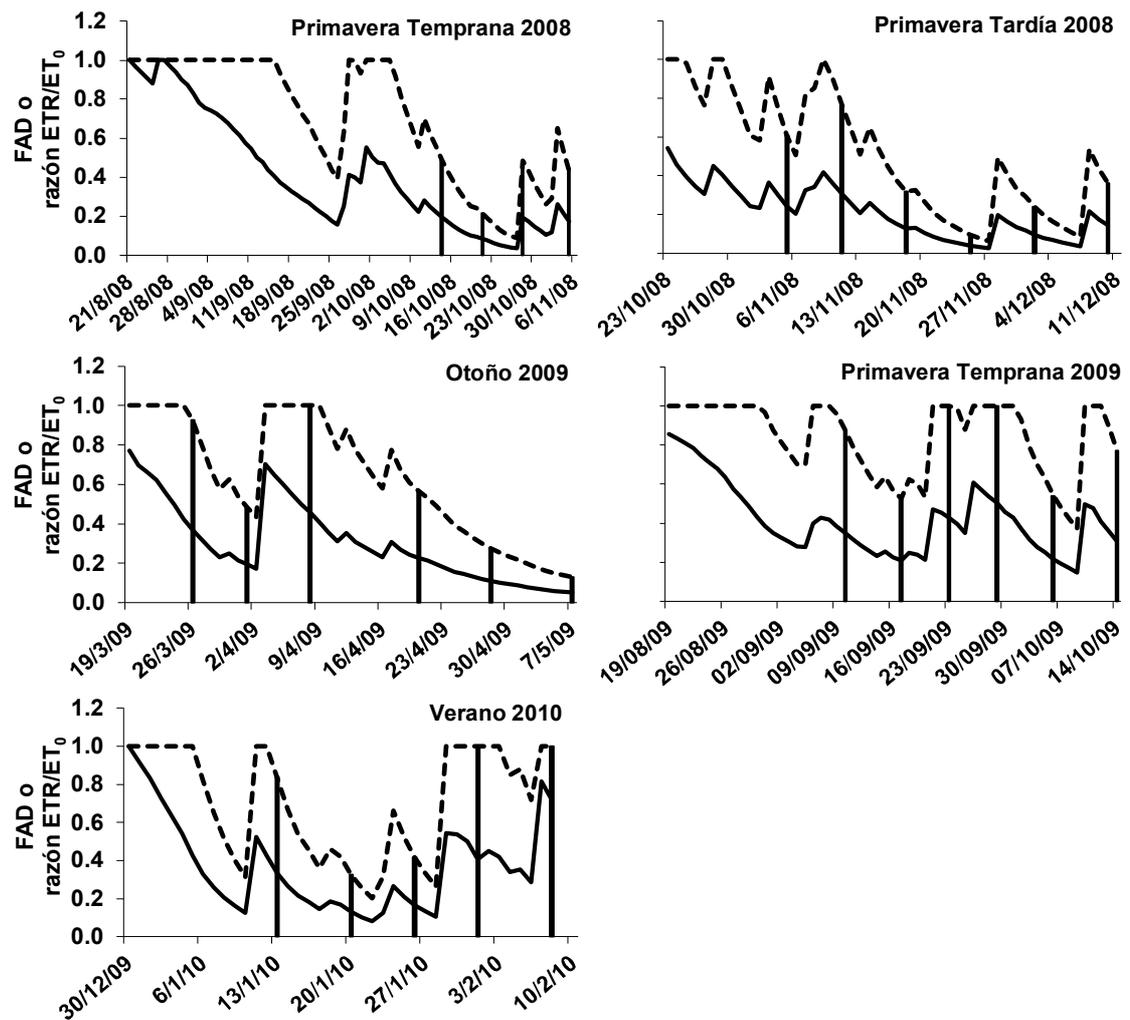


Fig.4. Evolución a lo largo del tiempo de la fracción de agua del suelo disponible (FAD, línea continua) y de la razón entre la Evapotranspiración Real y la Evapotranspiración de Referencia (ETR/ET₀, línea discontinua) en cinco experimentos de festuca alta. Las barras verticales indican las fechas de muestreo de biomasa aérea.

ETR/ET₀ media calculada durante el período completo de cada experimento ([ETR/ET₀]_m) osciló entre 0.51 (Primavera Tardía 2008) y 0.85 (Primavera Temprana 2009) (Tabla 1). Las variaciones de corto plazo en el nivel de estrés hídrico dentro de cada experimento también fueron sustanciales, mostrando la razón ETR/ET₀ cambios marcados aún entre fechas de muestreo consecutivas (Fig.4).

Tabla 2. Discriminación isotópica del carbono ($\Delta^{13}\text{C}$) medida en el último muestreo de biomasa aérea de experimentos de festuca alta conducidos en seco o bajo riego suplementario.

	% _o	
	Secano	Irrigado
Primavera Temprana 2008	20.13	20.56
Primavera Tardía 2008	18.82	20.62
Otoño 2009	20.22	21.76
Primavera Temprana 2009	20.30	20.75
Verano 2010	19.60	20.66

Los valores de $\Delta^{13}\text{C}$ medidos en la última fecha de muestreo siempre fueron menores bajo estrés hídrico (Tabla 2). A su vez, la razón (ETR/ET₀) media estimada para la integridad de los experimentos [(ETR/ET₀)_m] correlacionó fuertemente con la razón entre el valor de $\Delta^{13}\text{C}$ observado en condiciones de seco y bajo riego suplementario (Fig.5). De este modo, la magnitud relativa de estrés hídrico en los experimentos en seco fue proporcional a la magnitud de cambio en el $\Delta^{13}\text{C}$, medida como el grado de desvío con respecto al $\Delta^{13}\text{C}$ observado en los experimentos conducidos bajo irrigación. Esto indica que la razón ETR/ET₀ entregada por los cálculos de balance de agua en el suelo permite estimar con adecuada exactitud el nivel de estrés hídrico experimentado por la pastura durante el experimento.

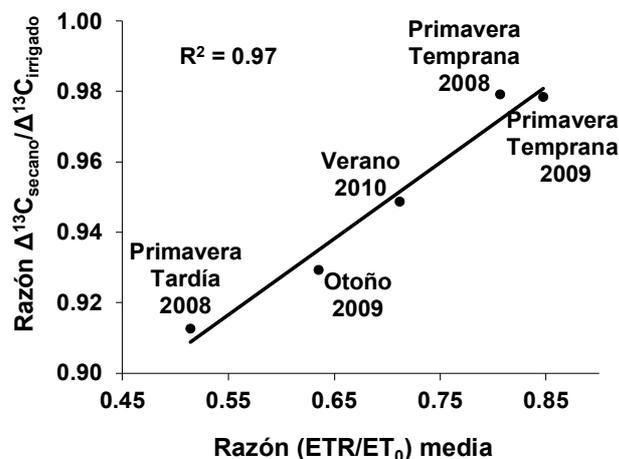


Fig.5. Asociación entre la magnitud de cambio en la discriminación isotópica del carbono ($\Delta^{13}\text{C}$) debida al efecto del estrés hídrico (expresada como la razón entre la $\Delta^{13}\text{C}$ de experimentos en seco y la $\Delta^{13}\text{C}$ de experimentos desarrollados simultáneamente bajo irrigación) y la evapotranspiración relativa estimada para los experimentos conducidos en seco (expresada como el valor medio durante el experimento de la razón entre los valores diarios de la Evapotranspiración Real [ETR] y de la Evapotranspiración de Referencia [ET₀]) en pasturas de festuca alta.

2.3.2. Crecimiento y absorción de N por la pastura

La fertilización nitrogenada incrementó significativamente tanto la acumulación de BA como la absorción de N (Fig.6). Bajo condiciones irrigadas la respuesta a la fertilización fue de hasta 3.82 Mg ha^{-1} y 140 kg N ha^{-1} , respectivamente (ambos máximos registrados en el experimento Verano 2010), mientras que en condiciones de secano las respuestas fueron de hasta 2.58 Mg ha^{-1} y 125 kg N ha^{-1} , respectivamente (en el experimento Primavera Temprana 2009).

Notablemente, de la simple comparación visual de las curvas de acumulación de N en la BA para cada nivel de N bajo riego y bajo condiciones de secano presentadas en la Fig.6 surge que, a valores equivalentes de BA, la absorción de N no fue alterada sus-

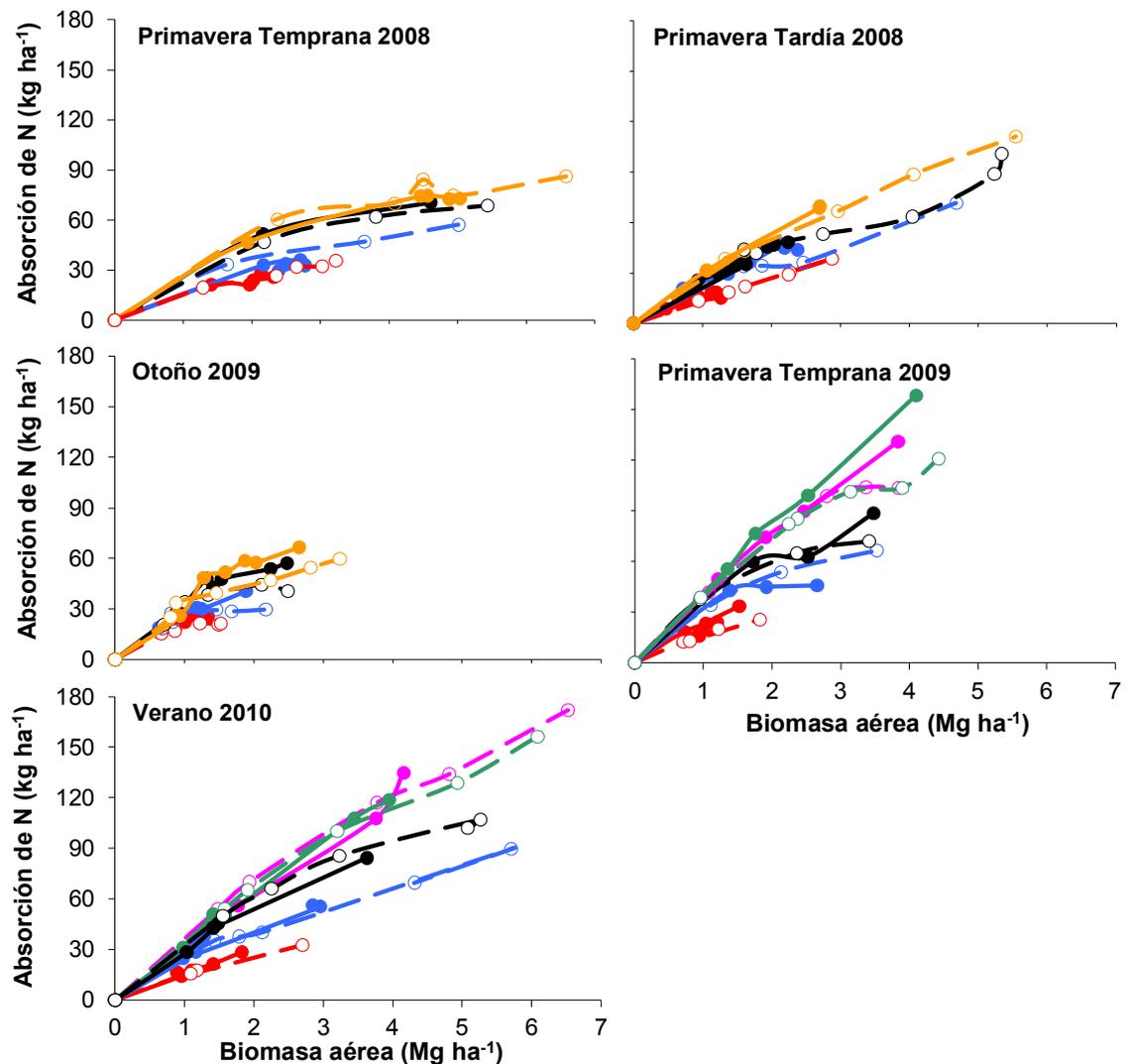


Fig.6. Absorción de N versus acumulación de biomasa aérea en cinco experimentos de festuca alta conducidos ya sea bajo irrigación (símbolos vacíos y líneas discontinuas) o en condiciones de secano (símbolos llenos y líneas continuas). Los diferentes niveles de N ensayados se representan con colores (0N: rojo, 75N: azul, 150N: negro, 225N: naranja, 350N: violeta, 500N: verde).

tancialmente por la disponibilidad de agua. Esto indica que la disponibilidad de N en el suelo en condiciones de secano no fue afectada por el estrés hídrico al punto de restringir la absorción de N por parte de la pastura.

2.3.3. Efecto del estrés hídrico y de su intensidad sobre el N_{cr}

En los experimentos irrigados, el N_{cr} coincidió con el $Ref-N_{cr}$. Los once valores de N_{cr} , estimados sobre un amplio rango de BA ($1.09-6.30 \text{ Mg ha}^{-1}$), promediaron un 97% del $Ref-N_{cr}$ (Fig.7 y Tabla I del Apéndice). Esto sirve de comprobación respecto de la validez del $Ref-N_{cr}$ bajo condiciones de crecimiento no limitantes, y corrobora la confiabilidad del método de estimación del N_{cr} aplicado en este estudio, el cual incorpora muestreos de BA realizados a nivel del suelo.

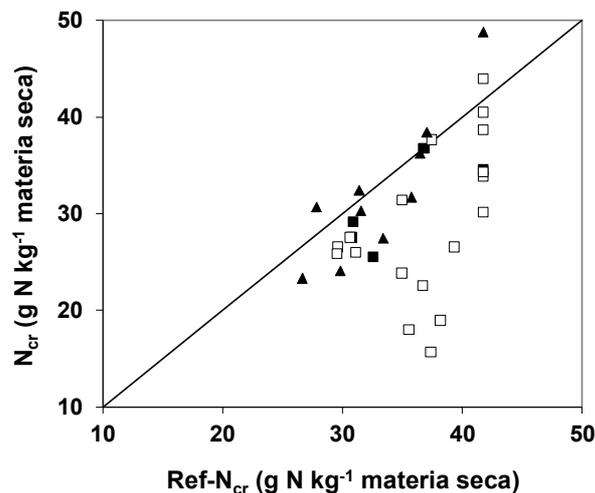


Fig.7. Relación entre el N crítico de Referencia propuesto por Lemaire y Salette (1984a, $Ref-N_{cr}$) y estimaciones del N_{cr} de festuca alta realizadas en experimentos conducidos en condiciones de secano, ya sea cuando el balance de agua del suelo indicó disponibilidad no limitante de agua (cuadrados llenos) o cuando indicó algún grado de estrés hídrico (cuadrados vacíos). Los triángulos corresponden a estimaciones de N_{cr} realizadas en dos experimentos de festuca alta conducidos bajo riego suplementario.

En condiciones de secano, las estimaciones de N_{cr} también fueron realizadas sobre un amplio rango de BA, tanto cuando el agua del suelo no fue una limitante ($ETR/ET_0=1$; $1.50-4.02 \text{ Mg ha}^{-1}$) como cuando sí lo fue ($0.90-4.57 \text{ Mg ha}^{-1}$, Tabla I del Apéndice). Las estimaciones de N_{cr} obtenidas bajo condiciones hídricas no limitantes concordaron con el $Ref-N_{cr}$. Pero cuando la ETR fue menor a la ET_0 , el N_{cr} fue menor al $Ref-N_{cr}$ (Fig.7). Por otra parte, una proporción importante de la variabilidad en la estimación del N_{cr} , expresado esta vez en términos relativos como la razón $N_{cr}/Ref-N_{cr}$, pudo ser explicada por estimaciones de ETR/ET_0 computadas durante diferentes intervalos de tiempo precedentes a la fecha de muestreo y estimación del N_{cr} (Fig.8). El período de tiempo previo a la estimación del N_{cr} en el cual la disponibilidad de agua en el suelo explicó de mejor forma las variaciones en el N_{cr} de la pastura no varió de manera marcada entre

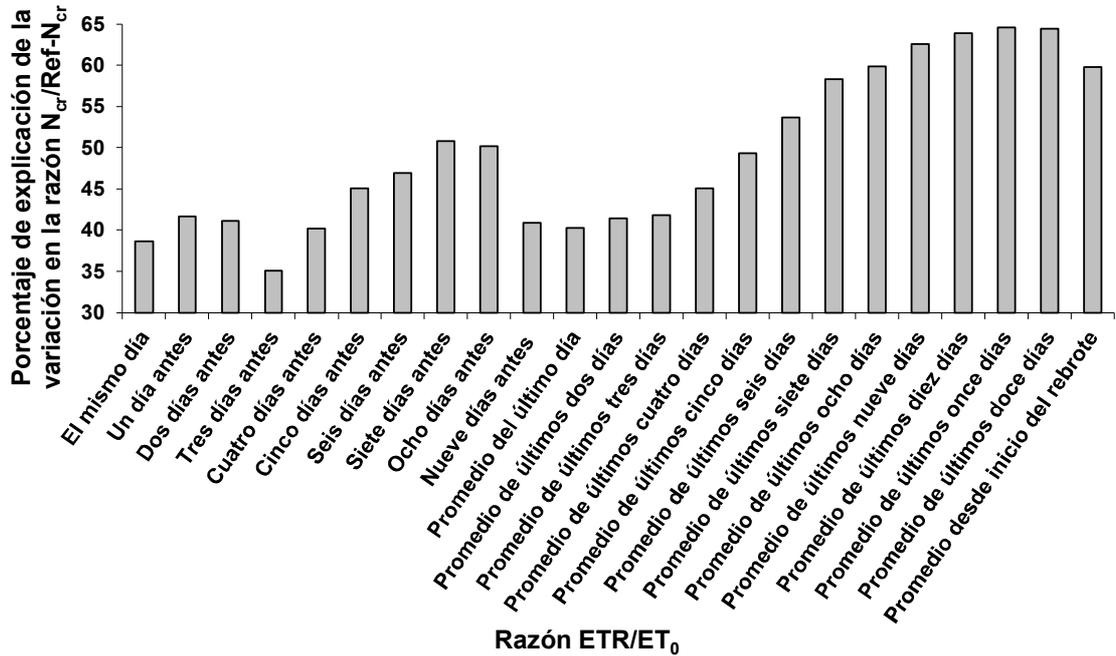


Fig.8. Porcentaje de la variación en la razón entre el N crítico y el N crítico de Referencia de Lemaire y Salette (1984a, $N_{cr}/Ref-N_{cr}$) explicada por estimaciones de la evapotranspiración relativa (expresada como la razón entre la Evapotranspiración Real y la Evapotranspiración de Referencia [ETR/ET_0]) integradas durante diferentes intervalos de tiempo previos al momento de estimación del N_{cr} . Información obtenida en cinco experimentos de festuca alta conducidos en secano.

los cinco experimentos, siendo el nivel medio de estrés hídrico durante los once días previos ($^{11d}[ETR/ET_0]_m$) el intervalo de tiempo que se asoció más fuertemente con las variaciones observadas en el N_{cr} de la pastura cuando los cinco experimentos se consideraron en conjunto ($R^2= 0.65$, Fig.9). Esto indica que la interacción entre el N_{cr} de la pastura y el nivel de agua disponible en el suelo fue relativamente rápida.

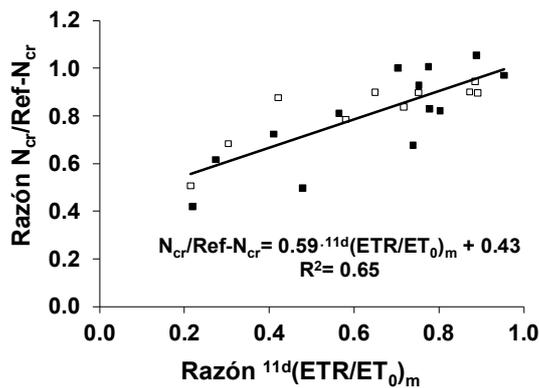


Fig.9. Asociación entre la evapotranspiración relativa (expresada como la media de la razón entre la Evapotranspiración Real y la Evapotranspiración de Referencia diarias estimadas durante los once días previos $\{^{11d}[ETR/ET_0]_m\}$ a la determinación del N crítico (N_{cr})), y el N_{cr} (expresado en términos relativos como la razón entre el N_{cr} y el N_{cr} de Referencia de Lemaire y Salette [1984a, $N_{cr}/Ref-N_{cr}$]), en pasturas de festuca alta. Símbolos vacíos y símbolos llenos representan determinaciones realizadas con niveles de biomasa aérea menores y mayores a 2.5 Mg materia seca ha⁻¹, respectivamente.

Considerando experimentos completos, la asociación entre ambas variables fue también lineal y muy fuerte. De hecho, la disminución media ponderada en el tiempo del N_{cr} fue casi enteramente explicada por el estrés hídrico (Fig.10).

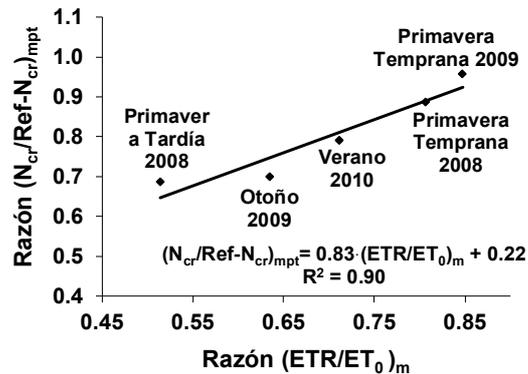


Fig.10. Asociación entre la evapotranspiración relativa (expresada como la media de la razón entre la Evapotranspiración Real y la Evapotranspiración de Referencia diarias $[ETR/ET_0]_m$) y el N_{cr} relativo (expresado como la media ponderada en el tiempo de la razón entre el N_{cr} y el N_{cr} de Referencia de Lemaire y Salette [1984a, $\{N_{cr}/Ref-N_{cr}\}_{mpt}$]) estimados durante el tiempo completo de cinco experimentos de festuca alta.

2.3.4. Nutrición nitrogenada de la pastura bajo estrés hídrico

La fertilización nitrogenada incrementó significativamente el INN (Tabla 3). La condición de nutrición nitrogenada no limitante se alcanzó en todos los experimentos,

Tabla 3. Efecto del estrés hídrico sobre el N crítico (N_{cr}) y la estimación del estado de nutrición nitrogenada en cinco experimentos de festuca alta conducidos en secano.

Experimento	Nivel de N kg ha ⁻¹	Disminución estimada en		INN _{mpt} ² calculado con	
		ETR ¹	N_{cr}	N_{cr}	Ref- N_{cr} ³
Primavera Temprana 2008 ⁴	0	19.4 ⁵	11.3 ⁶	0.44	0.32
	75			0.51	0.37
	150			0.69	0.51
	225			0.79	0.59
Primavera Tardía 2008	0	49.0	31.3	0.55	0.38
	75			0.82	0.57
	150			0.87	0.60
	225			0.97	0.68
Otoño 2009	0	37.0	30.0	0.66	0.54
	75			0.75	0.61
	150			0.90	0.73
	225			0.98	0.79
Primavera Temprana 2009	0	15.0	4.3	0.55	0.50
	75			0.62	0.56
	150			0.86	0.78
	350			1.09	0.99
	500			1.20	1.09
Verano 2010	0	29.0	21.0	0.50	0.39
	75			0.79	0.61
	150			0.95	0.74
	350			1.08	0.84
	500			1.11	0.87

¹Evapotranspiración Real.

²Índice de Nutrición Nitrogenada medio ponderado en el tiempo.

³ N_{cr} de Referencia de Lemaire y Salette (1984a).

⁴Muestreos de biomasa aérea posteriores al 21/10/08 no fueron considerados para el cálculo de los valores presentados en Tabla, debido a falta de certeza respecto del carácter de no limitante del máximo nivel de N ensayado.

⁵Disminución en la ETR= $\{[1 - (ETR/Evapotranspiración\ de\ Referencia)] \cdot 100\}$.

⁶Disminución porcentual en el valor medio ponderado en el tiempo para el N_{cr} = $\{1 - [(N_{cr}/Ref-N_{cr})_{mpt}] \cdot 100\}$.

con la excepción de Primavera Temprana 2008. Dado que el N_{cr} disminuyó linealmente con intensidades crecientes de estrés hídrico (Figs. 9 y 10), las determinaciones del INN de las pasturas hechas en base al $Ref-N_{cr}$ subestimaron el verdadero estado de nutrición nitrogenada en mayor medida cuando la sequía fue más intensa. En el caso más extremo, con una ETR disminuida en un 49%, el verdadero N_{cr} de la pastura disminuyó un 31% y la correspondiente subestimación del INN por el $Ref-N_{cr}$ fue del 30%.

2.3.5. Relación entre el estado de nutrición nitrogenada y el rendimiento de forraje

Los rendimientos estuvieron directamente relacionados con el INN de las pasturas. Cuando el efecto de la disponibilidad de agua en el suelo sobre el N_{cr} fue tenido en cuenta, las acumulaciones máximas de BA se alcanzaron con estados de nutrición nitrogenada cercanos al óptimo (Fig.11a). En cambio, cuando el INN_{mpt} se calculó en base al $Ref-N_{cr}$ (en lugar de hacerlo con el verdadero N_{cr}), la relación resultó sesgada y los rendimientos relativos máximos se alcanzaron con un INN_{mpt} sustancialmente menor que 1 (Fig.11b).

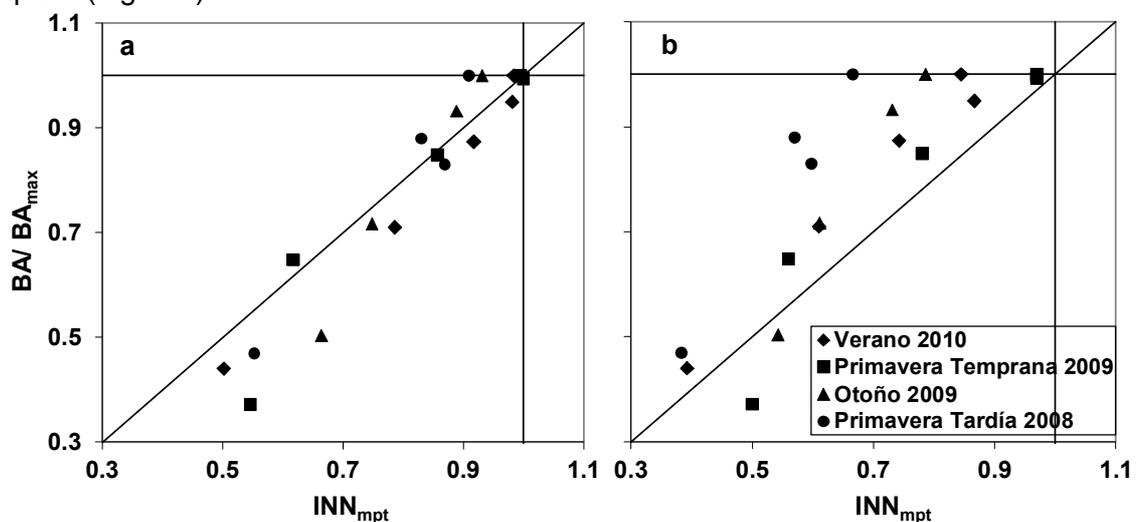


Fig.11. Efecto de la nutrición nitrogenada (expresada como el Índice de Nutrición Nitrogenada medio ponderado a lo largo de la duración de cada experimento, INN_{mpt}) sobre el rendimiento relativo de biomasa aérea (BA, calculado en cada experimento como la razón entre el rendimiento máximo de BA observado con cada nivel de N respecto del rendimiento máximo absoluto de BA observado) alcanzado por los distintos niveles de N ensayados (0 a 500 kg N ha⁻¹) en cuatro experimentos de festuca alta conducidos en secano. El INN_{mpt} se calculó en base al N crítico (N_{cr}), luego de considerar el efecto de la disponibilidad de agua en el suelo sobre éste (a), o en base al N_{cr} de Referencia propuesto por Lemaire y Salette (1984a) (b). No se incluyó información del experimento Primavera Temprana 2008, dado que en el mismo el nivel máximo de N aplicado no permitió alcanzar condiciones no limitantes de nutrición nitrogenada.

2.4. Discusión

El estrés hídrico y la deficiencia de N son las dos mayores limitantes a la producción de cultivos (Sinclair y Rufty, 2012). Tras la determinación del efecto de niveles variables de agua disponible en el suelo sobre el N_{cr} , este trabajo confirmó la validez del $Ref-N_{cr}$

bajo condiciones no limitantes para el crecimiento, y a su vez demostró que el N_{cr} es sistemáticamente menor que el $Ref-N_{cr}$ en situaciones de estrés hídrico, exponiendo un análisis cuantitativo de dicho efecto en diferentes épocas de crecimiento de festuca alta, un cultivo forrajero. El efecto negativo de la sequía sobre el N_{cr} fue también demostrado en cultivos de grano por Hoogmoed y Sadras (2018).

Notoriamente, la magnitud de la desviación del N_{cr} con respecto al $Ref-N_{cr}$ escaló linealmente con la intensidad del estrés hídrico, medido como la razón ETR/ET_0 (Figs.9 y 10). Esto significa que no existe una única curva de dilución del N_{cr} válida para todas las condiciones de estrés hídrico, y por el contrario debe pensarse en una familia de curvas de dilución. El N_{cr} responde continuamente a las condiciones de ETR/ET_0 imperante, con una ventana de tiempo que abarcaría los once días previos, en promedio (Fig.9).

2.4.1. Validación cruzada de la relación entre ETR/ET_0 y $N_{cr}/Ref-N_{cr}$

El trabajo de Agnusdei *et al.* (2010) reportó curvas de dilución de N_{cr} significativamente menores que la correspondiente al $Ref-N_{cr}$ en cuatro experimentos estudiando rebrotes de forrajeras C_3 en los que se habían registrado condiciones sub-óptimas de crecimiento (Raigrás Anual 1994, Avena 1995, Festuca Alta El Palenque Otoño Tardío-Invierno 1996 y Agropiro Alargado Invierno Tardío 1999). Se procedió a calcular los balances hídricos para estos cuatro experimentos para luego poder estimar los valores diarios de la razón ETR/ET_0 y así calcular los valores de N_{cr} correspondientes de acuerdo a la función presentada en la Fig.9. Los valores de INN_{mpt} predichos para cada nivel de N ensayado compararon muy bien con los valores de INN_{mpt} observados por Agnusdei *et al.* (2010) para el experimento Raigrás Anual 1994 (Fig.12), el cual fue el único experimento de aquellos cuatro que estuvo caracterizado por lluvias escasas, resultando en una razón $(ETR/ET_0)_m$ de 0.75. En contraste, los INN_{mpt} predichos fueron sistemáticamente mayores a los observados en los tres experimentos restantes, lo cual resulta razonable dado que en tales experimentos el crecimiento se vio afectado por factores diferentes a la disponibilidad de agua, como por ejemplo bajas temperaturas. En 1996, el número de heladas registradas durante los primeros cuarenta días de rebrote fue un 101% superior a la media para el período 1971-2021, ocasionando un menor crecimiento debido a reducciones en la interceptación y en la eficiencia de uso de la radiación interceptada por festuca alta, mientras que en 1995 durante los meses de julio y agosto se registró un número de heladas un 113% superior a la media para el período antes mencionado, lo que generó daño foliar y una menor densidad de macollos

de avena (Agnusdei *et al.*, 2010; INTA, s.f.). Esta validación independiente de la relación entre N_{cr} y estrés hídrico en una especie anual sugiere que la función presentada en la Fig.9 sería bastante robusta y generalizable a especies forrajeras C_3 .

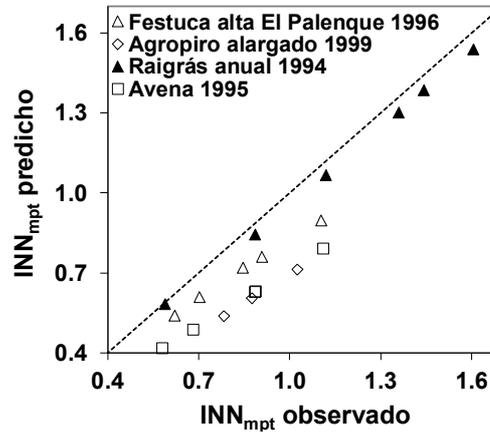


Fig.12. Asociación entre el Índice de Nutrición Nitrogenada medio ponderado en el tiempo (INN_{mpt}) observado por Agnusdei *et al.* (2010) y el INN_{mpt} predicho luego de calcular los balances hídricos y estimar el N crítico en función de la evapotranspiración relativa (calculada como el valor medio, medido durante los once días previos a cada fecha de muestreo, de la razón diaria entre la Evapotranspiración Real y la Evapotranspiración de Referencia [$^{11}d\{ETR/ET_0\}_m$]) en cuatro experimentos estudiando rebrotes de forrajeras C_3 que se desarrollaron bajo condiciones sub-óptimas de crecimiento.

2.4.2. ¿Puede el N_{cr} ser adecuadamente estimado bajo condiciones de estrés hídrico?

Un potencial problema que puede afectar la estimación del N_{cr} bajo condiciones limitantes para el crecimiento surge cuando las tasas de crecimiento de las pasturas son bajas; en este caso la aplicación del método estadístico de Justes *et al.* (1994) para el cálculo del N_{cr} podría arrojar resultados sesgados. Esto se debe a que las menores respuestas de la BA a la aplicación de N que se suelen registrar cuando el crecimiento se encuentra limitado, por ejemplo debido al estrés hídrico, podrían resultar categorizadas como no diferentes desde el punto de vista estadístico. A modo de ejemplo hipotético, la Fig.13 muestra cómo, si bien la DMS en condiciones de secano es menor que bajo condiciones hídricas no limitantes, ésta igualmente es mayor que las diferencias en acumulación de BA alcanzadas entre los tres niveles de N superiores. En un caso como éste, los tres niveles de N en cuestión son categorizados como no limitados por N, subestimando levemente la BA_{cr} y el N_{cr} .

Para comprobar si dicho efecto podría haber sido de importancia en el set de datos que fue objetivo de análisis, se procedió a recalcular los valores de N_{cr} siguiendo el método utilizado tanto en Lemaire y Salette (1984a, b) como en Greenwood *et al.* (1990), esto es, sin emplear método estadístico alguno para la determinación de la BA_{cr} y asig-

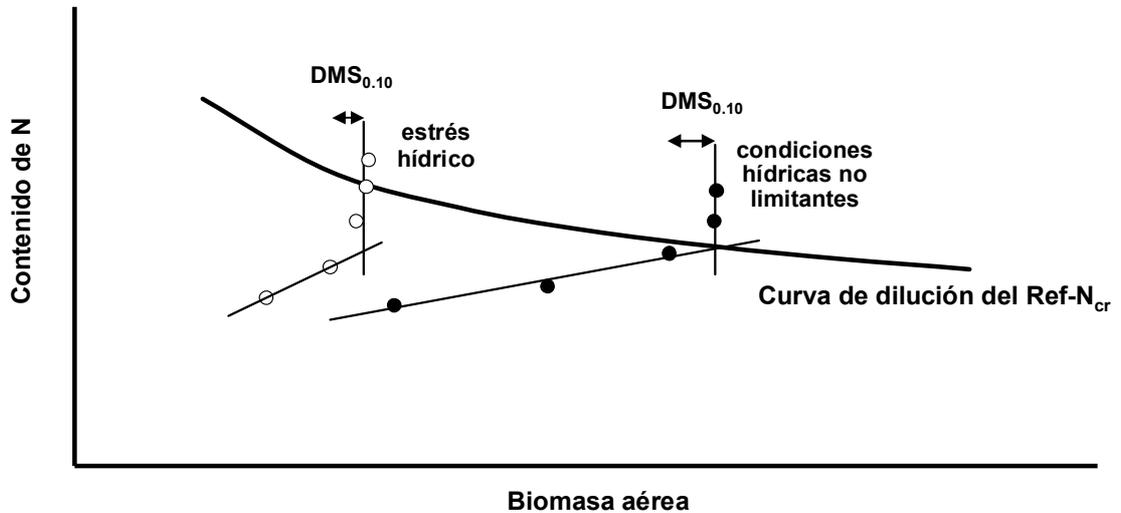


Fig.13. Posible subestimación del N crítico (N_{cr}) bajo condiciones de estrés hídrico. La curva representa la curva de dilución de N_{cr} de Referencia (Ref- N_{cr}) propuesta por Lemaire y Salette (1984a). $DMS_{0.10}$: Diferencia Mínima Significativa calculada con α de 0.10 (hipotética).

nando ésta a la máxima acumulación de BA observada en cada fecha de muestreo, siendo considerado su contenido de N correspondiente como el N_{cr} . Los valores de N_{cr} obtenidos de este modo fueron luego comparados con aquellos presentados en la Fig.7. Los valores de N_{cr} entregados por ambos métodos de cálculo mostraron una buena asociación (Fig.14a). Del mismo modo, cuando la relación presentada en Fig.9 fue recalculada en base a los valores de N_{cr} entregados por el método de cálculo de Greenwood *et al.* (1990), ésta no difirió marcadamente de la relación originalmente propuesta (Fig.14b). Por lo tanto, se concluye que el efecto del estrés hídrico sobre el N_{cr} reportado en este trabajo se trata de un efecto auténtico y no obedece a un artefacto asociado a la metodología de cálculo empleada.

Un segundo factor a tener en cuenta es que la disponibilidad del N en el suelo puede verse limitada bajo estrés hídrico, principalmente debido a reducciones en la mineralización de N y en los flujos de N hacia las raíces impulsados por la transpiración (Gonzalez-Dugo *et al.*, 2010). Si la accesibilidad del N resulta afectada al punto de no poder abastecerse la demanda de N de la pastura, el N_{cr} se estimará bajo condiciones de disponibilidad de N limitantes para el crecimiento de la pastura y, por lo tanto, podría resultar subestimado. La evidencia empírica de esta limitación en el abastecimiento de N es una menor acumulación de N en la BA a valores equivalentes de ésta bajo estrés hídrico que bajo disponibilidad no limitante de agua (Lemaire y Denoix, 1987b; Lemaire *et al.*, 1996). Sin embargo, como muestra la Fig.6, en el ambiente de estudio la absorción de N por la pastura siguió aproximadamente la misma dinámica bajo ambas condiciones

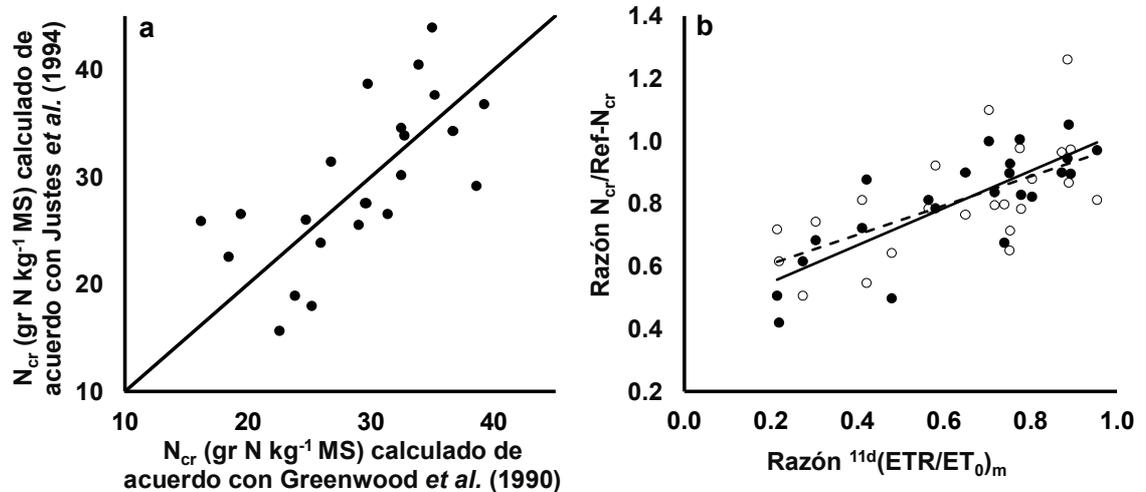


Fig.14. Asociación entre los valores de N crítico (N_{cr}) obtenidos en festuca alta empleando los métodos de cálculo de Justes *et al.* (1994) y de Greenwood *et al.* (1990) (a); y (b) efecto de la evapotranspiración relativa (expresada como la media de la razón entre la Evapotranspiración Real y la Evapotranspiración de Referencia diarias estimadas durante los once días previos $\{^{11d}[ETR/ET_0]_m\}$ a la determinación del N_{cr}) sobre el N_{cr} de festuca alta (expresado en términos relativos como la razón entre el N_{cr} y el N_{cr} de Referencia de Lemaire y Salette [1984a, $N_{cr}/Ref-N_{cr}$]), calculando al N_{cr} según el método de Justes *et al.* (1994, símbolos sólidos y línea de regresión continua, mismos datos presentados en Fig.9) o según el método de Greenwood *et al.* (1990, símbolos vacíos y línea de regresión discontinua). La recta en (a) representa la línea 1:1.

de disponibilidad hídrica; esto es, no hubo diferencias significativas en la acumulación de N a valores equivalentes de BA entre experimentos conducidos en secano y bajo riego suplementario. Las diferencias en la acumulación de N generadas por la menor disponibilidad de agua en el suelo pueden entonces ser atribuidas enteramente al efecto de la sequía sobre la acumulación de BA. Aún bajo condiciones de estrés hídrico que limitaron el crecimiento aéreo en hasta 2.7 Mg ha^{-1} (en Primavera Tardía 2008, Fig.6), festuca alta fue capaz de absorber N a una tasa lo suficientemente alta como para mantener la concentración de N en su BA. Estos resultados sugieren que la disponibilidad relativa de N no fue alterada por el estrés hídrico; esto es, el crecimiento de la pastura y su demanda de N se redujeron en una proporción similar a la de la disponibilidad de N edáfico para las plantas. Si lo expresado anteriormente fuera cierto, la acumulación de N debería seguir aumentando una vez que la acumulación de BA alcanza su plateau. De hecho, los cambios simultáneos en la acumulación de BA y de N que fueron logrados con el incremento en la disponibilidad de N en aquellos tratamientos definidos estadísticamente —debido a que sus acumulaciones de BA no difirieron entre sí al emplear un α del 0.10— como no limitados por N, estuvieron en línea con aquellos reportados en la literatura por estudios que calcularon el N_{cr} en una variedad de especies (Fig.15). Por último, la confiabilidad de las estimaciones de N_{cr} obtenidas bajo condiciones limitantes al crecimiento reportadas en este trabajo fue adicionalmente reafirmada tras observarse que el crecimiento de festuca alta se asoció

de mucho mejor manera con su estado de nutrición nitrogenada cuando éste se calculó en base a su verdadero N_{cr} que cuando se lo hizo basado en el $Ref-N_{cr}$ (Fig.11).

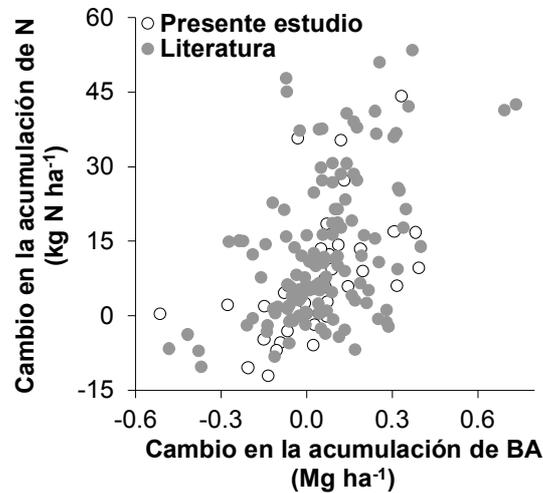


Fig.15. Cambios simultáneos en la acumulación de N y de biomasa aérea (BA) observados con el incremento de la fertilización nitrogenada en aquellos tratamientos no limitados por N. El eje x representa, para cada fecha de muestreo, la diferencia entre la BA de cada tratamiento no limitado por N y la BA media de todos los tratamientos no limitados por N. El eje y representa, también para cada fecha de muestreo y para los niveles de N no limitantes, la diferencia en acumulación de N entre el (los) nivel (es) más elevado (s) y el nivel más bajo. Los datos de la literatura fueron obtenidos de Lemaire y Denoix, 1987a; Bélanger, Gastal y Lemaire, 1992; Justes *et al.*, 1994; Bélanger y Richards, 2000; Plénet y Lemaire, 2000 y Ziadi *et al.*, 2008.

2.4.3. Avances recientes en la aplicación de la estadística bayesiana para la estimación del N_{cr}

Muy recientemente, el aspecto metodológico de la determinación de la curva de dilución del N_{cr} en pasturas templadas fue nuevamente abordado, aplicándose un nuevo método de estimación de ésta propuesto en el trabajo de Makowski *et al.* (2020). Este nuevo método deja de lado la estadística frecuentista tradicional, empleando el enfoque bayesiano para estimar los coeficientes de la curva de dilución. El método fue puesto en práctica por Fernández *et al.* (2021) para el re-análisis de los experimentos de campo que fueran insumo de este capítulo de la tesis y se publicaran en Errecart *et al.* (2014), junto con dos experimentos de festuca alta publicados en Agnusdei *et al.* (2010) y otros cinco experimentos de festuca alta llevados adelante en condiciones hídricas no limitantes en Lusignan, Francia. Este nuevo método de análisis no halló diferencias significativas entre los coeficientes a y b de las curvas de dilución del N_{cr} ajustadas sobre cada experimento, por lo que los autores ajustaron una única curva de dilución del N_{cr} a todo el set de datos. Fernández *et al.* (2021) hacen también un interesante análisis de los efectos del rango de BA observado en los experimentos, del nivel de N aplicado y del tamaño del set de datos analizado sobre el nivel de incertidumbre en la estimación de los coeficientes de la curva de dilución del N_{cr} mediante el método bayesiano. Según

los autores, rangos de BA de entre 1 y al menos 6 Mg ha⁻¹ (valor este último incompatible con déficits hídricos de significancia), niveles de aplicación de N permitiendo un claro incremento en la concentración de N en la BA una vez maximizada la acumulación de ésta, así como el hecho de combinar en el análisis la información perteneciente a al menos cinco experimentos (≈100 pares de observaciones %N-BA) permitirían a este método entregar estimaciones de la curva de dilución del N_{cr} razonablemente confiables. Por último, Ciampitti *et al.* (2021) emplearon este método de análisis para comparar las curvas de dilución ajustadas en condiciones de riego vs secano sobre sólo dos de los experimentos de esta tesis (Primavera Temprana 2009 y Verano 2010) y concluyeron que éstas no difieren significativamente. Este método de análisis basado en la estadística bayesiana tendría varias ventajas. Primero, no requiere de una clasificación preliminar de las observaciones de acumulación de BA en limitadas vs no limitadas por N, y no necesita de la identificación del N_{cr} en cada fecha de muestreo (Makowski *et al.*, 2020). También permite su implementación sobre sets de datos incompletos —por caso, cuando en alguna fecha de muestreo faltara la información de algún nivel de N— porque, para estimar la curva de dilución, el método toma en cuenta el número de fechas de muestreo analizadas, el número de observaciones disponibles en cada fecha y la variabilidad en las observaciones entre fechas y dentro de cada fecha. Los resultados de las estimaciones se expresan a través de distribuciones de probabilidad, permitiendo entonces el análisis del nivel de incertidumbre de las curvas de dilución del N_{cr} ajustadas. El hecho de que el método bayesiano considere la variabilidad entre las fechas de muestreo, sin embargo, puede constituirse en una desventaja si hubiera variaciones marcadas en las condiciones de crecimiento entre experimentos o si hubiera variaciones marcadas entre fechas de muestreo a lo largo de cada experimento, siendo esta última una condición que se cumple frecuentemente en experimentos de campo llevados adelante en condiciones de secano (ver, por caso, las variaciones en la FAD y en la razón ETR/ET₀ reportadas en la Fig.4). Ahora, si la sequía afectara al N_{cr}, la magnitud de dicha afectación debería guardar alguna relación con la magnitud del estrés hídrico, y esto es precisamente lo que se demostró en esta tesis. De este modo, y como se puede observar en la Tabla 1 del Apéndice, el grado de concordancia entre el N_{cr} y el Ref-N_{cr} observado en los experimentos conducidos en secano varió de fecha de muestreo a fecha de muestreo dentro de cada experimento. En cada fecha de muestreo representativa de condiciones de sequía, entonces, la curva de dilución del N_{cr} aplicable es diferente, y si se ajustara una curva de dilución única con toda la información de cada experimento, tal curva de dilución sería, en efecto, tan solo una curva de dilución

representativa de las condiciones de crecimiento promedio registradas a lo largo del experimento. Esta variabilidad entre fechas de muestreos puede ser entonces la razón subyacente del alto nivel de incertidumbre en los valores de los coeficientes de las curvas de dilución estimados en varios de los experimentos reanalizados por Fernández *et al.* (2021) con el método bayesiano. Respecto del efecto de la variabilidad en las condiciones de crecimiento registradas entre diferentes experimentos sobre los parámetros de la curva de dilución, parece lógico que Fernández *et al.* (2021), luego de analizar un set de datos comprendiendo tanto experimentos desarrollados bajo riego como otros bajo secano, comprendiendo estos últimos niveles de estrés hídrico oscilando desde nulo a leve, moderado y grave, hayan ajustado una curva única, promedio, de dilución del N_{cr} que se ubica por debajo ($N_{cr} = 39.3 \cdot BA^{-0.42}$) de la curva de dilución reportada por Lemaire y Salette (1984a) para condiciones de crecimiento no limitantes ($Ref-N_{cr} = 48 \cdot BA^{-0.32}$). Por último, otro aspecto a considerar al momento de evaluar las conclusiones alcanzadas por Fernández *et al.* (2021) y Ciampitti *et al.* (2021) tiene que ver con la relativa laxitud de criterio al momento de seleccionar el nivel de significancia estadística a ser empleado al comparar medias de tratamiento. Constituye práctica habitual al momento de comparar las acumulaciones de BA de los distintos niveles de N aplicados el empleo de la prueba de Fisher con un α de 0.10 (Justes *et al.*, 1994; Agnusdei *et al.*, 2010; Errecart *et al.*, 2014), a fin de aumentar la potencia del test estadístico y así minimizar la posibilidad de subestimar la BA_{cr} , y por ende el N_{cr} . A pesar de ello, este aspecto metodológico del trabajo de Errecart *et al.* (2014) es expresamente criticado por Ciampitti *et al.* (2021), aduciendo que igualmente se podría haber incurrido en subestimaciones de la BA_{cr} —esto no fue así, de acuerdo a la Fig.14—. Sin embargo, y paradójicamente, los mismos autores emplean un α del 0.01 al momento de comparar los coeficientes de las curvas de dilución del N_{cr} ajustadas mediante el método bayesiano sobre cada uno de los catorce experimentos reanalizados en Fernández *et al.* (2021), y emplean un α del 0.05 al momento de comparar las acumulaciones de BA de los diferentes niveles de N en algunos de dichos experimentos (Figs.2B y 2D de Fernández *et al.*, 2021), aduciendo, por ejemplo, que *la ausencia de diferencia estadística en la BA acumulada por los dos máximos niveles de N sugiere que la provisión de N para la dosis de N mayor estuvo en exceso* (sic).

Mas allá de las potenciales razones expuestas previamente explicando porqué la curva promedio de dilución del N_{cr} ajustada por Fernández *et al.* (2021) reportaría menores valores de N_{cr} que la curva de dilución del N_{cr} de Lemaire y Salette (1984a), es necesario también remarcar cómo este nuevo método bayesiano de estimación parece,

de manera intrínseca, subestimar el N_{cr} de festuca alta. En su Fig.2, Fernández *et al.* (2021) presentan en forma conjunta los pares de observaciones %N-BA observados en los diferentes muestreos y la correspondiente curva de dilución del N_{cr} ajustada para algunos experimentos seleccionados, y allí se evidencia cómo el método bayesiano sistemáticamente subestima el N_{cr} , aun tratándose de experimentos no expuestos a déficits hídricos (Figs.2B, 2C y 2D). El método bayesiano de cálculo, tal como fuera aplicado por Fernández *et al.* (2021), desestima importantes respuestas en la acumulación de BA —en los experimentos citados, en niveles de hasta 10 al 15%—, por lo tanto, podría decirse que este método no estima el N_{cr} dado que, por definición, el N_{cr} equivale a la mínima concentración de N asociada con las máximas acumulaciones de BA. Puede además observarse cómo, en dichos experimentos, la curva de dilución del Ref- N_{cr} de Lemaire y Salette (1984a) es muy cercana a los valores de N_{cr} estimables a partir de los pares de observaciones %N-BA registrados en los diferentes muestreos (por ejemplo, Figs.2B y 2D de Fernández *et al.*, 2021). En el mismo sentido, ambas curvas de dilución del N_{cr} ajustadas por Fernández *et al.* (2021) sobre los dos experimentos de festuca alta incluidos en Agnusdei *et al.* (2010), reportan valores de N_{cr} inferiores a los de las curvas de dilución que fueran ajustadas originalmente en dicho trabajo. De este modo, el método bayesiano de cálculo entrega menores estimaciones de N_{cr} que el método de cálculo de Justes *et al.* (1994), método que es usualmente objetado porque podría, potencialmente, subestimar el N_{cr} .

La evidencia sustentando la aplicabilidad del Ref- N_{cr} de Lemaire y Salette (1984a) bajo condiciones no limitantes para el crecimiento, por el contrario, es extensa. En esta tesis, por ejemplo, se reportó cómo las estimaciones del N_{cr} de festuca alta coincidieron con el Ref- N_{cr} (Fig.7), y lo propio observó Agnusdei *et al.* (2010) también en festuca alta, así como en raigrás anual, agropiro alargado y *Bromus catharticus*. En alfalfa nodulada con rizobios, Lemaire *et al.* (1985) observó una curva de acumulación de N en la BA similar a la curva crítica de acumulación de N asociada con la curva de dilución del Ref- N_{cr} de Lemaire y Salette (1984a). En festuca alta, se ha reportado cómo su rendimiento relativo de BA se maximiza con un INN de ≈ 1 , calculado éste a partir del Ref- N_{cr} (Lemaire y Gastal, 1997). La pertinencia del Ref- N_{cr} de Lemaire y Salette (1984a) es también verificable tras comparar su curva de dilución con las concentraciones de N y las acumulaciones de BA alcanzadas en experimentos evaluando diferentes niveles de fertilización nitrogenada, tanto en festuca alta (Bélanger, Gastal y Lemaire, 1992), como en *Phleum pratense* (Bélanger y Richards 1997) y en pastizales compuestos por especies C_3 (Duru y Ducrocq, 1997). Por lo anteriormente expuesto, considero que el

Ref- N_{cr} de Lemaire y Salette (1984a) constituye aún la referencia del nivel de concentración de N a alcanzar en pasturas templadas creciendo bajo condiciones potenciales de crecimiento. Al mismo tiempo, y debido a la variación temporal en las condiciones de crecimiento a las que pasturas y/o cultivos creciendo en condiciones de campo se encuentran expuestos, considero que el empleo de la estadística frecuentista clásica para la estimación del N_{cr} en ventanas de tiempo reducidas —esto es, para cada fecha de muestreo en particular, como se hizo en esta tesis— por el momento sigue siendo la opción más conveniente cuando de evaluar el efecto del estrés hídrico sobre el N_{cr} se trata.

2.4.4. ¿Por qué el N_{cr} disminuye en condiciones de estrés hídrico?

Las condiciones previas de disponibilidad de agua en el suelo determinaron el valor relativo de N_{cr} de las pasturas (Figs.9 y 10). Una relación de este tipo entre $N_{cr}/\text{Ref-}N_{cr}$ y ETR/ET_0 implica que la reducción del N_{cr} con la sequía es de índole proporcional, y una reducción de tal tipo únicamente sería posible si la sequía afectara sólo al coeficiente a de la curva de dilución del N_{cr} , sin afectar al coeficiente b . Variaciones en el coeficiente b implicarían cambios en la razón $N_{cr}/\text{Ref-}N_{cr}$ con el nivel de BA, por lo tanto, si el coeficiente b cambiara bajo sequía, la adición de la BA_{cr} como variable regresora debería incrementar el porcentaje de la variación en la razón $N_{cr}/\text{Ref-}N_{cr}$ explicado por ETR/ET_0 en la regresión simple. El R^2 de la regresión múltiple incluyendo BA_{cr} fue, como se suponía, no significativamente superior al de la regresión simple (0.654 vs 0.646). Asimismo, cuando el set de datos se dividió en dos grupos en función del valor de BA_{cr} (por debajo y por encima de 2.5 Mg ha^{-1} , ver Fig.9) y se ajustaron regresiones lineales a cada uno de ellos, ni las pendientes ($p > 0.20$) ni las ordenadas al origen ($p > 0.15$) de la regresión de $N_{cr}/\text{Ref-}N_{cr}$ en función de ETR/ET_0 difirieron entre grupos. De este modo, y a partir de la ecuación de regresión presentada en la Fig.9, se propone la siguiente curva de dilución de N_{cr} :

$$N_{cr} = a' \cdot (\text{BA})^{-0.32}, \quad (8)$$

donde

$$a' = 20.6 + 28.3 \cdot {}^{11d}(\text{ETR}/\text{ET}_0)_m \quad (9)$$

Una de las causas potenciales de la reducción del N_{cr} bajo estrés hídrico es el aumento de la concentración de carbohidratos en planta, el cual ocasionaría una dilución pasiva de la concentración de N en la BA. Este es un mecanismo verosímil, dado que la

concentración de carbohidratos solubles a menudo se incrementa en plantas expuestas a sequía (Karsten y MacAdam, 2001; Shaimi *et al.*, 2009), aunque no es claro que este cambio se encuentre relacionado linealmente con el estrés hídrico como mostró estarlo el N_{cr} . De hecho, el aumento en la concentración de carbohidratos en la BA sería esperable sólo durante sequías leves a moderadas, en donde se hubiera afectado el crecimiento pero no la fotosíntesis, o si se hubiera afectado la fotosíntesis ésta fuera igualmente superior a la respiración de la planta (Boyer, 1970; McDowell, 2011). En cualquier caso, el proceso de dilución de N_{cr} , resultante del aumento relativo de la fracción de la BA asociada a funciones estructurales (BA_e) en detrimento de aquella relacionada con funciones metabólicas (BA_m) a medida que las plantas crecen, debería ahora contemplar un tercer compartimento: BA_r (por BA asociada a reservas), la cual se trataría mayoritariamente de carbohidratos con un mínimo contenido de N. A medida que el estrés hídrico se intensifica, la BA_r adquiriría una mayor relevancia, dando como resultado un menor N_{cr} .

Otra hipótesis es que el N y la BA muestren diferentes respuestas ante la sequía en lo que concierne a su partición entre raíces y parte aérea. La sequía suele incrementar la partición a tejidos subterráneos (Poorter *et al.*, 2012). Si esta respuesta fuera mayor para el N que para la BA, entonces la concentración de N en la BA disminuiría. Evidencias de una mayor partición a raíces del N que de la BA en condiciones de estrés hídrico fueron aportadas por Gonzalez-Dugo *et al.* (2012) mediante experimentos realizados en hidroponía. De nuevo, el marco teórico de la dilución del N_{cr} debería ser expandido para incluir el componente raíces.

Una tercera posibilidad es que las menores tasas de crecimiento propias de condiciones de estrés hídrico requieran de menos N con fines metabólicos. Las tasas de fotosíntesis, por ejemplo, son menores en condiciones de déficit hídrico, y en tales condiciones se necesita una menor concentración de N en el aparato fotosintético para alcanzar las tasas máximas de asimilación del C (Ghashghaie y Saugier, 1989; Perniola *et al.*, 1999; Shangguan *et al.*, 2000). Por otro lado, la asimilación del N dentro de la planta puede verse también comprometida bajo déficit hídrico (Lawlor y Cornic, 2002). *Festuca alta*, como la mayoría de las herbáceas, lleva adelante la reducción del nitrato mayoritariamente en su biomasa aérea, con una contribución menor de las raíces (Jiang *et al.*, 2002; Scheurwater *et al.*, 2002). Tanto en el género *Festuca* sp. (Havill *et al.*, 1977) como en muchas otras especies (Ray y Sisson, 1986; Golberg *et al.*, 1995; Azedo-Silva *et al.*, 2004; Gloser *et al.*, 2020) se ha reportado un importante efecto del estado

hídrico de la planta sobre el nivel de actividad de la enzima nitrato reductasa. La regulación de esta enzima es compleja y comprende ajustes tanto en los niveles de transcripción y traducción génica como en lo referente a la activación de la misma (Lawlor y Cornic, 2002). Trabajos recientes han demostrado que muchos de los genes involucrados en el metabolismo del N están también involucrados en las respuestas de la planta a la sequía, ejerciendo la fitohormona ácido abscísico a menudo el papel de señal reguladora (Goel y Singh, 2015; Ristova *et al.*, 2016). Una cuarta hipótesis involucra una senescencia foliar acelerada, y en consecuencia una mayor remobilización del N bajo estrés hídrico (Gan y Amasino, 1997). Esto ocasionaría una menor concentración de N en la BA_m. Todos los mecanismos propuestos anteriormente son congruentes con la observación de que la magnitud de la disminución del N_{cr} es independiente de la BA, esto es, de que el estrés hídrico sólo afecta el coeficiente *a* de la curva de dilución del N_{cr}. No obstante, más estudios serán necesarios para dilucidar por completo cuáles son los mecanismos responsables de la reducción del N_{cr} en condiciones de sequía.

2.4.5. Interpretando el efecto de un menor N_{cr} bajo estrés hídrico en términos de la demanda de N de la pastura y su INN

El balance entre la oferta de N del suelo y la demanda de N de la pastura define el estado de nutrición nitrogenada de la pastura (Durand *et al.*, 2010; Gonzalez-Dugo *et al.*, 2010). Un menor N_{cr} en condiciones de sequía implica que los requerimientos de N para maximizar el crecimiento disminuyen en relación con aquellos necesarios bajo condiciones hídricas óptimas. Aun cuando la oferta de N del suelo típicamente disminuye bajo estrés hídrico (Garwood y Williams, 1967), en este estudio no se observó una limitación lo suficientemente fuerte como para restringir la absorción de N por la planta; en general, el N continuó acumulándose en la BA cuando ésta ya no aumentó más (Fig.15). De hecho, tras comparar los estados de nutrición nitrogenada alcanzados en los diferentes experimentos (Tabla 3), se infiere que el estrés hídrico no habría resultado en un agravamiento de la nutrición nitrogenada de las pasturas, sino que probablemente habría tenido un efecto opuesto. Esto es, la demanda de N de las pasturas, la cual en condiciones de sequía se reduce no sólo debido a una menor tasa de crecimiento sino también debido a una menor necesidad nitrogenada por unidad de BA producida —o sea, debido al menor N_{cr}—, habría sido afectada en mayor medida que la oferta de N del suelo. Evidencia de lo anterior puede hallarse cuando se analiza la evolución a corto plazo del INN, por ejemplo, para el experimento Verano 2010

(Fig.16). Como muestra dicha figura, el INN de todos los tratamientos se incrementó durante el período de tiempo en el cual la disponibilidad de agua limitó la ETR, hasta la fecha del 28 de enero. A partir de esta fecha, se registraron lluvias que restauraron la humedad del suelo y se revirtió la tendencia creciente que presentaba el INN (en los niveles de N más altos esto sucedió algo más tarde, probablemente debido a una mayor disponibilidad de N producto del mayor nivel de fertilización). Entonces, durante la primera parte del experimento el suelo abasteció N en exceso de una demanda de N de la pastura que se vio reducida por el estrés hídrico. Este es probablemente el primer trabajo que ha reportado un resultado de este tipo; la mayoría de los estudios previos han encontrado disminuciones en el INN en condiciones de sequía o ningún cambio significativo en el mismo (Lemaire y Denoix, 1987b; Gonzalez-Dugo *et al.*, 2005). Esta discrepancia, sin embargo, no obedecería a una diferente metodología de cálculo del INN (empleo del N_{cr} vs el $Ref-N_{cr}$), dado que cuando se recalcularon los INN para el experimento Verano 2010 en base al $Ref-N_{cr}$ igualmente se observaron incrementos, aunque de menor magnitud, en los valores de INN durante el período de sequía (datos no presentados). De este modo, los resultados sugieren que en el ambiente estudiado, festuca alta es capaz de mantener una tasa de absorción de N relativamente elevada en condiciones de sequía. Atributos de la especie como la biomasa y la densidad del largo de raíces, y el desarrollo y la viabilidad de los pelos radicales tienen un efecto importante sobre la performance de festuca alta en condiciones de estrés hídrico (Huang y Fry, 1998; Huang, 2001; Sun *et al.*, 2013). El componente subterráneo del crecimiento

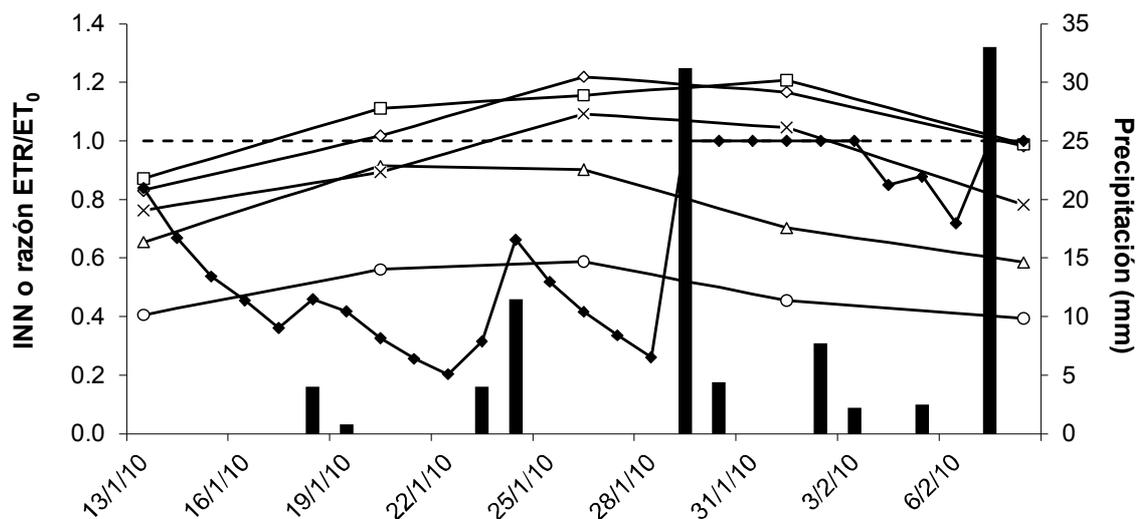


Fig.16. Evolución a lo largo del tiempo de la evapotranspiración relativa diaria (expresada como la razón entre la Evapotranspiración Real y la Evapotranspiración de Referencia [ETR/ET₀], rombos llenos) y del Índice de Nutrición Nitrogenada (INN) de festuca alta durante el experimento Verano 2010 (círculos: 0N; triángulos: 75N; cruces: 150N; rombos vacíos: 350N; cuadrados: 500N). Las columnas representan la precipitación diaria.

de festuca alta, así como la oferta de N del ambiente estudiado, son algunos de los tópicos que se abordan en profundidad en el Capítulo 3 de la tesis.

La hipótesis específica puesta a prueba en este capítulo postulaba que condiciones de sequía ocasionan reducciones en el valor de N_{cr} en festuca alta, y que además la magnitud de tal reducción se encuentra en relación directa con la severidad del estrés hídrico experimentado por la pastura. La evidencia presentada no permite rechazar la hipótesis, dado que el N_{cr} mostró reducciones sistemáticas cuando el nivel de agua en el suelo limitó la evapotranspiración de la pastura, expresada en términos relativos como la razón ETR/ET_0 . A su vez, el grado de reducción en el N_{cr} se halló relacionado en forma lineal con el indicador ETR/ET_0 estimado durante los días previos. Estos resultados indican entonces que el empleo del Ref- N_{cr} en evaluaciones del estado de nutrición nitrogenada de pasturas expuestas a sequía resulta en subestimaciones del mismo, y que es necesario utilizar un N_{cr} corregido por el nivel de estrés hídrico para llegar a un diagnóstico adecuado. Los resultados obtenidos en este capítulo sirven de insumo para el Capítulo 3, en el que se evaluará el efecto de condiciones hídricas sub-óptimas sobre el crecimiento y sobre el estado de nutrición nitrogenada alcanzado por festuca alta, empleando para tal fin el correspondiente N_{cr} corregido por nivel de estrés hídrico.

**CAPÍTULO 3. EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO DURANTE LA ÉPOCA ESTIVAL
SOBRE EL ESTADO DE NUTRICIÓN NITROGENADA DE PASTURAS DE
FESTUCA ALTA CRECIENDO EN UN SUELO HIDROHALOMÓRFICO DEL
SUDESTE BONAERENSE¹**

¹Parte del contenido de este capítulo fue publicado en Errecart, P.M.; Marino, M.A.; Agnusdei, M.G.; Lattanzi, F.A.; Durand J.-L. 2020. The intensity of water stress dictates whether the N status of temperate-type perennial grass swards is affected by drought. *Field Crops Research* 257: 107928.

3.1. Introducción

La mayoría de los estudios que hasta el momento han tratado de evaluar los efectos de la sequía sobre la nutrición nitrogenada de pasturas y/o cultivos han concluido que la primera tiene un efecto negativo sobre la segunda. Lemaire y Denoix (1987b) cuantificaron durante varios años el crecimiento y la acumulación de N en pasturas de festuca y pasto ovillo, tanto en condiciones de secano como bajo irrigación, y hallaron resultados variables en función de la intensidad del déficit hídrico. Cuando se registró una sequía de leve a moderada, las respuestas de la acumulación de BA al riego también fueron moderadas, y a valores equivalentes de BA, la acumulación de N en ésta no difirió entre riego y secano. Sin embargo, cuando el estrés hídrico fue mayor, no sólo la respuesta del crecimiento a la adición de agua fue mayor, sino que además los tratamientos regados acumularon, a iguales valores de BA, una cantidad significativamente mayor de N. Esta dinámica de acumulación de N más ralentizada bajo estrés hídrico, esto es, una curva de dilución de N en la BA más baja, fue entonces identificada como la manifestación de una reducción en el estado de nutrición nitrogenada causada por la sequía. Conclusiones similares resultaron de estudios realizados en alfalfa (Lemaire *et al.*, 1989), y en maíz y sorgo (Lemaire *et al.*, 1996).

Dado que el estado nitrogenado de la planta es la resultante del balance entre su demanda de N y la oferta de N del suelo, su INN resultará afectado si éstos son afectados de manera diferencial por el estrés hídrico. Estudios más recientes han demostrado cómo un mismo nivel de estrés hídrico puede reducir el INN de una especie creciendo activamente, esto es, con una significativa demanda de N, mientras que otra especie que muestra crecimiento reducido en la misma estación puede conservar su estado de nutrición nitrogenada inalterado (Gonzalez-Dugo *et al.*, 2005). Un desbalance entre la oferta y la demanda de N también puede resultar de un desacople espacial en las disponibilidades de agua y N en el suelo. Los trabajos de Garwood y Williams (1967) y D'Aoust y Tayler (1968) demostraron cómo en ciertos ambientes un desecamiento del horizonte superficial del suelo, rico en N, puede resultar en reducciones en el crecimiento de la pastura, aun cuando ésta haga un uso activo del agua disponible a mayores profundidades. En tales situaciones, la inyección de N en profundidad a menudo permite aliviar la mayor parte del efecto negativo de la sequía, demostrando que las reducciones en crecimiento asociadas con ésta estaban explicadas mayoritariamente por reducciones en el estado nitrogenado de la pastura. Este desacople espacial entre el agua y el N también fue identificado por Lemaire y Denoix

(1987b) como el responsable de la disminución en el INN observada en festuca alta en situaciones en las que ésta debió hacer un mayor uso del agua disponible en profundidad debido al desecamiento del horizonte superficial producto de un déficit de precipitaciones. Sin embargo, los desbalances entre la oferta y la demanda de N no serían los únicos posibles responsables de eventuales reducciones en el estado de nutrición nitrogenada. Como fue demostrado por Gonzalez-Dugo *et al.* (2012), aun cuando la oferta de N y su absorción por las raíces no resulte afectada por la sequía, ésta puede alterar la circulación del N dentro de la planta, influyendo sobre su capacidad de transportar el N desde las raíces hacia la parte aérea. Este efecto estaría causado por una menor tasa de carga del N en el xilema y/o por el menor flujo xilemático que se registra en condiciones de estrés hídrico.

La totalidad de los estudios que han evaluado la interacción agua-N, sin embargo, lo hicieron considerando un mismo N_{cr} en condiciones hídricas no limitantes y bajo sequía, el Ref- N_{cr} . Ahora sabemos que, en realidad, el N_{cr} es menor en condiciones de estrés hídrico. ¿Cómo resultará afectado el INN por la sequía cuando no sólo la oferta de N del suelo y la tasa de crecimiento de la pastura son —eventualmente— afectados, sino que también lo es su necesidad intrínseca de N, o sea su requerimiento de N por unidad de BA generada? Éste es el interrogante que intenta responder este capítulo.

3.1.1. Efectos del estrés hídrico sobre la demanda de N de la pastura

La demanda de N del cultivo se encuentra determinada por su N_{cr} , por su nivel de biomasa y por la tasa de cambio de ésta, o tasa de crecimiento del cultivo (Gastal *et al.*, 2015). En el Capítulo 2 se demostró cómo la sequía afecta el N_{cr} . Con respecto al efecto de la sequía sobre el crecimiento, las respuestas de este son complejas porque el impacto tiene lugar a muchos niveles e involucra cambios a nivel morfológico, fisiológico y bioquímico. A su vez, el tipo de respuesta dependerá de la intensidad, la duración y el momento del ciclo del cultivo durante el cual el estrés hídrico impacta. La actividad enzimática, la turgencia celular, el transporte de iones y muchos otros procesos críticos simplemente no son posibles en ausencia de agua (Farooq *et al.*, 2012). El crecimiento de la planta es principalmente el resultado de la división, elongación y diferenciación celular. La sequía afecta la división y expansión celular (Durand *et al.*, 1995; Tardieu *et al.*, 2000). La división celular se ve alterada por cambios en la expresión génica de las células meristemáticas ocasionados por el estrés hídrico (Avramova *et al.*, 2015), mientras una menor concentración intracelular de asimilados, así como una menor presión de turgencia producto del menor flujo de agua a través del xilema son las

principales causas de la reducida expansión celular observada en condiciones de sequía (Cosgrove, 1993; Frensch, 1997). La menor disponibilidad de asimilados bajo sequía es resultado de menores tasas de fotosíntesis, las cuales son en parte ocasionadas por una menor conductancia estomática implementada para reducir la transpiración como estrategia de conservación del agua en condiciones de déficit hídrico (Bradford y Hsiao, 1982). A su vez, una menor concentración de N foliar es requerida para maximizar la tasa de fotosíntesis en condiciones de déficit hídrico, lo que redundaría en una menor demanda de N (Ghashghaie y Saugier, 1989; Shangguan *et al.*, 2000). La menor tasa de fotosíntesis producto de la menor concentración intracelular de CO₂ usualmente se ve reflejada en una menor eficiencia de uso de la radiación interceptada (Sinclair y Muchow, 1999). Sin embargo, si la sequía incide en etapas tempranas del ciclo de cultivo, cuando éste aún no ha alcanzado su índice de área foliar crítico, o si la sequía es lo suficientemente intensa como para ocasionar senescencia, también se verá afectará la capacidad de interceptación de radiación del cultivo (Jamieson *et al.*, 1995). Las hojas tienen un alto contenido de clorofila, de rubisco y demás enzimas fotosintéticas ricas en N, y si el área foliar o BA_m resulta disminuida bajo sequía, esto repercutirá negativamente en la demanda de N. La demanda de N también es afectada por el estrés hídrico cuando éste ocasiona una senescencia prematura, durante la cual moléculas ricas en N de hojas maduras son desmanteladas y el N remobilizado hacia hojas jóvenes (Gan y Amasino, 1997; Otegui, 2018), aunque la eficiencia de este proceso puede ser baja durante sequías de rápida evolución (Khasanova *et al.*, 2013). Por último, la partición de asimilados entre las fracciones aérea y subterránea también es afectada por la condición hídrica; una mayor partición del crecimiento hacia tejidos con un menor contenido de N como lo son las raíces resulta en una menor demanda de N del cultivo en situaciones de sequía (Poorter *et al.*, 2012). Este mecanismo es en realidad de naturaleza pasiva, y se origina en que el crecimiento de la biomasa aérea muestra una mayor sensibilidad al déficit hídrico que el crecimiento de raíces (Spollen *et al.*, 1993; Hsiao y Xu, 2000).

3.1.2. Efectos del estrés hídrico sobre la oferta de N del suelo

La oferta de N del suelo es definida en parte por la presencia de N en la solución del suelo. La cantidad de N mineral presente en la solución del suelo está a su vez regulada por la disponibilidad de agua en el suelo, debido a la influencia que la misma tiene sobre el desarrollo de los procesos microbianos responsables de las transformaciones del N en el suelo: mineralización, nitrificación e inmovilización (Myrold y Bottomley, 2008;

Norton, 2008). Al mismo tiempo, la condición hídrica del suelo define la magnitud de los mecanismos de pérdida de N, principalmente lixiviación y desnitrificación (Coyne, 2008; Francis *et al.*, 2008). Luego, la capacidad de las raíces de las plantas de absorber el N presente en la solución del suelo también es afectada por la condición hídrica del suelo, a través de la influencia de ésta sobre ciertas variables que definen el nivel de los flujos de nutrientes hacia las raíces.

Hay tres mecanismos mediante los que las plantas pueden tomar nutrientes del suelo: intercepción radical, flujo de convección o masal y flujo de difusión de los nutrientes en la solución del suelo (Barber, 1995). Sin embargo, muy pocos iones están tan cerca de la raíz (menos de 1 nm) como para ser directamente absorbidos mediante intercepción radical. De esta manera, hay sólo dos procesos mediante los que los solutos se mueven en respuesta a los disturbios creados por una raíz activa: flujo masal y difusión. El proceso de convección o flujo masal consta en el movimiento hacia las raíces de los iones disueltos en la solución del suelo, mecanismo que es propulsado por el proceso de transpiración que tiene lugar con la apertura estomática, ocurriendo principalmente durante las horas de luz (Tinker y Nye, 2000). La cantidad diaria de N absorbida por flujo de convección puede entonces aproximarse como el producto del consumo diario de agua y la concentración de N en la solución del suelo.

El flujo de difusión es impulsado por un gradiente en la concentración de la forma de N absorbida desde la solución del suelo, gradiente que es creado por la planta misma (Tinker y Nye 2000). El proceso de difusión resulta del movimiento natural de un soluto en una solución, a través de un gradiente de concentración descendente, hacia el estado de mínima energía. El flujo de difusión de una partícula (FD , en moles s^{-1}) a través de una unidad de superficie unitaria es explicado por la Primera Ley de Fick:

$$FD = D \cdot \frac{\Delta C}{\Delta x} \quad (10)$$

donde D es el coeficiente de difusión del elemento en el suelo (en $cm^2 s^{-1}$) y $\Delta C/\Delta x$ es el gradiente espacial de concentración del elemento (en moles cm^{-4}). El coeficiente de difusión D es afectado por el contenido de humedad en el suelo. Un menor contenido de humedad aumenta la tortuosidad del recorrido de la solución del suelo, por lo que el coeficiente de difusión disminuye.

De este modo, un descenso en el contenido de humedad del suelo tiene varios efectos simultáneos: (i) afecta los procesos de transformación del N edáfico alterando el contenido de N mineral en la solución del suelo, (ii) puede reducir el contacto entre el

suelo y la raíz por contracción de ésta, (iii) aumenta —de manera pasiva, por disminución de su volumen— la concentración de iones no sujetos a adsorción (por ej. nitrato) y demás solutos en la solución del suelo, (iv) disminuye la tasa de transpiración del cultivo, y (v) disminuye el coeficiente de difusión del N en la solución del suelo por el incremento en la tortuosidad. El efecto neto de estos cambios suele ser el de una menor oferta de N, lo que indica que el incremento en la concentración de N en la solución del suelo es sobrecompensado por las disminuciones en la transpiración y en el coeficiente de difusión (Tinker y Nye, 2000).

3.1.3. Particularidades del ambiente edafoclimático local y su potencial efecto sobre la nutrición nitrogenada

El antecedente de mayor relevancia para con este estudio es un trabajo desarrollado en Francia, en el cual se evaluó el efecto del déficit hídrico sobre la nutrición nitrogenada, explorando al mismo tiempo la dinámica de la oferta de N por parte del suelo (Gonzalez-Dugo *et al.*, 2005; Gonzalez-Dugo, 2006; Durand *et al.*, 2010). Dicho trabajo se desarrolló con festuca alta y raigrás anual y demostró la aptitud del INN como herramienta para la valoración de cambios rápidos en el estado de nutrición nitrogenada de las pasturas ante variaciones en el estado hídrico del sistema suelo-planta. Los resultados mostraron la existencia de notables diferencias en el INN logrado por las especies evaluadas, diferencias que fueron adjudicadas no sólo a diferentes arquitecturas radicales y capacidades de captura de N, sino también a diferentes niveles de crecimiento y demanda de N. El ambiente evaluado constaba de un suelo pobremente estructurado, de textura limosa, bajo contenido de MO (<1%), con un horizonte rocoso a 1 m de profundidad y sin efectos de una napa freática cercana.

Las características particulares de los suelos bajos ganaderos de la Pampa Deprimida podrían generar escenarios de diferente oferta y/o demanda de N, alterando dicho balance y por consiguiente el estado de nutrición nitrogenada de las pasturas. Con respecto a la oferta de N por parte del suelo, un mayor contenido de MO en el suelo implica un mayor contenido de N total y un mayor aporte de N mineral mediante mineralización. Al mismo tiempo, un mayor contenido de MO suele estar asociado con un mayor desarrollo de la población microbiana y un mayor potencial de inmovilización del N mineral. Por otro lado, dadas las condiciones más favorables para el crecimiento propias de suelos con un mayor contenido de MO, es esperable un mayor desarrollo radical en los suelos bajos del sudeste bonaerense. Los factores anteriormente nombrados pueden derivar en una diferente oferta de N en el suelo en este ambiente.

En cuanto a la demanda de N por parte de la pastura, reparando en que la festuca alta es una especie forrajera que manifiesta capacidad potencial de profundizar en el perfil de suelo con parte de su sistema radical (Lemaire y Denoix 1987b; Durand *et al.*, 1997; 2007), y considerando la eventual disponibilidad de agua en profundidad debido a la cercanía de la napa freática en los suelos bajos, puede ser factible un escenario de mayor crecimiento y demanda de N en un ambiente como el de la Pampa Deprimida si festuca alta es capaz de satisfacer parte de su demanda de agua con aquella disponible en el subsuelo. Eventos de desecamiento del horizonte superficial debido a escasez de precipitaciones —suceso común durante la estación cálida— podrían entonces derivar en un escenario de desacople espacial en las disponibilidades de N —mayor en superficie— y agua —mayor en profundidad—, con efectos negativos sobre la nutrición nitrogenada de las pasturas.

La hipótesis específica planteada es que, en el ambiente de suelos ganaderos bajos propio de la Pampa Deprimida y del sudeste bonaerense, condiciones de estrés hídrico generan reducciones en el INN de festuca alta debido a que la disponibilidad de agua en horizontes profundos genera un desbalance entre la oferta de N del suelo y la demanda de N de la pastura. El objetivo de este capítulo es entonces evaluar el efecto de la disponibilidad de N y de agua sobre la productividad de pasturas de festuca alta creciendo en un suelo hidromórfico durante la estación cálida, determinando el efecto del estrés hídrico sobre (i) el estado de nutrición nitrogenada alcanzado por las pasturas, y (ii) las variaciones a corto plazo en los niveles de oferta y demanda de N estimados en base a información de campo. Se identificará a su vez a los principales mecanismos ecofisiológicos responsables de la respuesta de las pasturas al agregado de agua y de N en este ambiente.

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Sitio experimental

Se realizaron dos experimentos de campo estudiando el rebrote de festuca alta durante la estación estival (experimentos “Verano de 2009” y “Verano de 2010bis”) en el sitio experimental “A” descrito en el Capítulo 2 (Sección 2.2.1), ubicado en la Reserva Ganadera N° 7 de la UIB. Se trata de una pastura de festuca alta de tipo templado que contaba con alrededor de diez años de edad al momento del estudio. El suelo es el Natracualf típico de la Serie 34 del Mapa de Suelos de la UIB (Cabria, 1988), suelo hidromórfico que cuenta con la siguiente secuencia de horizontes: Ap (0-15 cm), A2 (15-25 cm), B2t (25-55 cm, duro y nátrico), B3tca (55-65 cm, duro y nátrico), C1 (65-95

cm) y C2ca (+95 cm). Mediciones realizadas en un freatómetro ubicado en el sitio experimental indicaron que durante los periodos estudiados la napa freática se ubicó a una profundidad de alrededor de 2 m.

3.2.2. Tratamientos y diseño experimental

Se evaluó una combinación factorial de dos niveles de disponibilidad de agua (A–: seco; A+: regado) y dos niveles de disponibilidad de N (N–: 40 kg N ha⁻¹; N+: 200 kg N ha⁻¹). Se siguió un diseño experimental de parcelas subdivididas, replicadas en tres bloques. Los niveles de disponibilidad de agua se asignaron aleatoriamente a nivel de parcela. Las parcelas (75 m²) se dividieron en subparcelas a las que se asignaron aleatoriamente los niveles de N. Las subparcelas (37.5 m²) se dividieron en sub-subparcelas, las cuales fueron asignadas aleatoriamente a las fechas de muestreo. Aunque el factor tiempo (fecha de muestreo) en este caso tiene relevancia dado que resultó de interés poder testear la significancia de los cambios en los valores de las variables medidas a lo largo del tiempo de experimentación, a los fines de esta tesis, sólo los resultantes de la combinación factorial de los dos niveles de disponibilidad de N con los dos niveles de disponibilidad de agua son considerados como *tratamientos*.

La pastura se cortó a 5 cm de altura al comienzo de cada experimento (30 de diciembre de 2008 y 30 de diciembre de 2009). Luego se aplicó P al voleo en una dosis de 20 kg P ha⁻¹ en forma de superfosfato triple de calcio, con el objetivo de lograr condiciones no limitantes para el crecimiento en cuanto a disponibilidad del nutriente. A continuación, se aplicaron al voleo los niveles de N en forma de nitrato de amonio calcáreo. Inmediatamente tras la fertilización, se aplicó una lámina de riego de 30 mm para facilitar la incorporación del fertilizante nitrogenado y minimizar las pérdidas de N por volatilización. Se utilizó un sistema de riego por goteo, con líneas de riego espaciadas cada 0.6 m con goteros de 1 L hr⁻¹ espaciados cada 0.3 m.

El nivel A+ recibió riegos con una frecuencia diaria o cercana a ésta, con el objetivo de mantener el perfil de suelo con un nivel de humedad cercano a capacidad de campo. El nivel A– no recibió agua de riego hasta la fase de rehumectación de los experimentos, con la cual se intentó restablecer el estado hídrico de estos tratamientos para evaluar la respuesta del estado de nutrición nitrogenada tras el fin de la sequía: 54 mm fueron aplicados entre el 21 y el 29 de enero en 2009, y 13 mm fueron aplicados el 29 de enero de 2010.

3.2.3. Mediciones

3.2.3.1. Datos meteorológicos

La información meteorológica, obtenida con el equipamiento descrito en la Sección 2.2.3., fue empleada para calcular la ET_0 diaria de acuerdo con el método FAO Penman-Monteith (Allen *et al.*, 1998). El tiempo térmico, expresado en grados día de crecimiento ($^{\circ}Cd$) acumulados desde el corte inicial de emparejamiento, fue calculado considerando una temperatura base del aire de $4^{\circ}C$ (Sharifiamina *et al.*, 2016).

3.2.3.2. Humedad del suelo

El contenido volumétrico de agua del suelo (θ_v , en %) se determinó semanalmente. En el Experimento Verano 2009, la θ_v por debajo de 0.2 m de profundidad se midió mediante el método de termalización de neutrones (Gardner, 1986) con una sonda Troxler 4302 (Troxler Electronic Laboratories Inc. Research Triangle Park, Raleigh, North Carolina, USA). En cada tratamiento, tubos de acceso para la sonda de 1 m de largo fueron instalados en una sub-subparcela elegida al azar. Las mediciones fueron realizadas a 0.2, 0.3, 0.4, 0.6 and 1.0 m de profundidad. El θ_v se calculó usando una función de θ_v vs conteo de neutrones desarrollada localmente por Suero y Travasso (1988). Luego, la θ_v se calculó para las capas de suelo 0.2-0.4 m (media de mediciones tomadas a 0.2, 0.3 y 0.4 m), 0.4-0.6 m (media de mediciones a 0.4 y 0.6 m) y 0.6-1.0 m (media de mediciones a 0.60 y 1.0 m). En los 0.2 m superficiales, la θ_v se midió mediante el método gravimétrico. Las muestras de suelo se pesaron, secaron durante 48 hs a $105^{\circ}C$ y volvieron a pesar. La densidad aparente del suelo se midió mediante el método del cilindro (Blake y Hartge, 1986). El contenido de humedad gravimétrico (en base seca) luego se convirtió en θ_v ($\theta_v = \text{contenido de humedad gravimétrico} \cdot \text{densidad aparente}$).

En el Experimento Verano 2010bis, la humedad del suelo se midió mediante el método gravimétrico. Se empleó un muestreador hidráulico (#35-SCT Hydraulic Soil Sampling, Coring and Drilling Machine, Giddings Machine Company, Windsor, Colorado, USA) para el muestreo de cilindros de suelo de 0.05 m de diámetro por 1 m de profundidad. Los cilindros de suelo luego fueron fraccionados siguiendo la misma división de profundidades usada para la medición de θ_v en 2009. Mediciones de densidad aparente realizadas a las profundidades correspondientes luego permitieron, aplicando el método descrito en el párrafo anterior, calcular los valores de θ_v en cada capa del perfil de suelo.

3.2.3.3. Biomasa y densidad del largo de raíces

La biomasa de raíces se determinó en cinco oportunidades en cada experimento, extrayendo cilindros de suelo de 0.05 m de diámetro por 1 m de largo con el barreno accionado por el muestreador hidráulico descrito en la sección anterior. Los muestreos tuvieron una frecuencia cercana a semanal, comenzando el 12 de enero en 2009 y el 11 de enero en 2010, respectivamente.

Los cilindros de suelo se dividieron en las profundidades 0-0.1, 0.1-0.2, 0.2-0.4, 0.4-0.6 y 0.6-1.0 m, excepto en los tres muestreos iniciales del Experimento Verano 2009 en los que se unificó el análisis de los segmentos 0-0.1 y 0.1-0.2. Las muestras de suelo se almacenaron a 4 °C hasta su lavado y recolección sobre tamices de 550 μm (Delta-T Root Washer, RWC-type, Delta-T Devices Ltd., Burwell, Cambridge, UK). Las raíces fueron liofilizadas y pesadas. En cada sub-subparcela se extrajeron tres cilindros de suelo, calculándose la biomasa radical (g m^{-2}) de la sub-subparcela como el valor medio de las biomásas observadas en los tres cilindros de suelo.

En ambos experimentos, el largo de raíces se evaluó en la primera, tercera y quinta fechas de muestreo de biomasa de raíces. Un cilindro de suelo seleccionado al azar entre los tres cilindros extraídos por sub-subparcela fue sujeto a una etapa adicional de lavado, separando las raíces de las partículas de suelo remanentes y de otros restos orgánicos mediante flotación. Las raíces fueron luego sumergidas en agua en bandejas de acrílico transparentes y escaneadas en escala de grises a una resolución de 400 ppp con un escáner equipado con una unidad de transparencia (Epson Expression 10000 XL Scanner, Epson America Inc. Long Beach, California, USA). Las raíces fueron luego secadas y pesadas como se describió previamente.

Los archivos de imagen obtenidos (en formato tiff) fueron analizados para cuantificar el largo de raíces con el software WinRhizo (WinRhizo Pro 2007a, Regent Instruments, Quebec, Canada), obteniéndose los valores de densidad del largo de raíces (*DLR*, en cm raíz cm^{-3} suelo) y el largo radical específico (*LRE*, en m g raíz^{-1}). El LRE fue luego usado para estimar la DLR en los cilindros de suelo que no fueron escaneados ($\text{DLR} = \text{biomasa de raíces} \cdot \text{LRE}$). La DLR de cada sub-subparcela fue luego calculada como la media de las DLR de los tres cilindros de suelo. Los valores diarios de DLR a lo largo de los experimentos fueron luego obtenidos mediante interpolación lineal a partir de los valores de DLR obtenidos en muestreos sucesivos.

La distribución relativa de las raíces de festuca alta en el perfil del suelo fue evaluada ajustando el modelo de Gale y Grigal (1987) a la distribución vertical acumulada con la profundidad observada en los experimentos:

$$Pr = 1 - \beta^d \quad (11)$$

donde Pr es la proporción acumulada de biomasa o de largo de raíces desde la superficie del suelo hasta la profundidad d (en cm), y β (β_B o β_L para biomasa y largo, respectivamente) es un coeficiente que caracteriza la distribución vertical de las raíces en el perfil, siendo menor cuanto más superficial sea el sistema radical.

3.2.3.4. Contenido de N del suelo

El contenido de N mineral en forma de nitrato y amonio en el suelo (en mg kg⁻¹) se analizó en cinco oportunidades en el verano de 2009 (12, 20 y 27 de enero, 11 y 17 de febrero) y en cuatro oportunidades en el verano de 2010 (11, 21 y 27 de enero, 9 de febrero). Tres cilindros de suelo de 0.05 m de diámetro por 1 m de largo fueron muestreados por sub-subparcela empleando el muestreador descrito en la Sección 3.2.3.2; los cilindros fueron luego fraccionados en las profundidades 0-0.2 (0-0.1 y 0.1-0.2 en verano 2010), 0.2-0.4, y 0.4-0.6 y 0.6-1.0 m y analizados de acuerdo con Keeney y Nelson (1982). El contenido diario de N mineral en el suelo luego se estimó por interpolación lineal a partir de los valores de contenido de N obtenidos en muestreos sucesivos.

3.2.3.5. Estado hídrico de la planta

Dentro de las metodologías disponibles para la medición del estado hídrico de la planta, se encuentran las basadas en el contenido de agua y aquellas basadas en el estado de energía libre del agua dentro de la planta. De cada grupo, las mediciones más difundidas son el contenido relativo de agua y el potencial agua foliar, respectivamente (Jones, 2014). El potencial agua foliar muestra durante las horas de luz mucha variabilidad a corto plazo debido a su alta sensibilidad a las condiciones ambientales (Zhao *et al.*, 1994). Sin embargo, el potencial agua foliar medido previo al alba —cuando éste habría alcanzado el equilibrio con el agua disponible en el volumen de suelo explorado por las raíces— entrega una medición muy valiosa del estado hídrico de la planta (Jones, 2014). En estudios evaluando el efecto de la sequía sobre el crecimiento, el contenido relativo de agua y el potencial agua foliar pre-alba han mostrado una performance similar (Matin *et al.*, 1989; García *et al.*, 2002). En esta tesis, el potencial hídrico de la planta se cuantificó midiendo, con una frecuencia semanal, el potencial

agua foliar (Ψ_h , en MPa) previo al alba (entre 3:30 y 5:00 am) en la lámina más joven completamente expandida. Las mediciones fueron realizadas con una cámara de presión (Scholander *et al.*, 1965), en dos macollos por subparcela, comenzando el 9 y el 8 de enero en los Experimentos Verano 2009 y Verano 2010bis, respectivamente. Los valores diarios de Ψ_h fueron luego obtenidos mediante interpolación lineal a partir de los valores de Ψ_h medidos en fechas de muestreo sucesivas.

3.2.3.6. Fracción del agua del suelo transpirable por la pastura

La fracción del agua del suelo transpirable por la pastura (*FASTP*) fue estimada de acuerdo con Ritchie (1981), como la razón de las diferencias acumuladas para el perfil del suelo completo (en mm), entre el agua transpirable en un momento dado y la cantidad máxima de agua transpirable que cada capa del perfil es capaz de almacenar. El agua transpirable se calculó a partir de la θ_v y del valor límite de descenso en la θ_v (${}^{LD}\theta_v$) en cada una de las cuatro capas del perfil de suelo, mientras que la cantidad máxima de agua transpirable se calculó a partir de la θ_v medida a -0.33 bar (${}^{CC}\theta_v$) y de la ${}^{LD}\theta_v$. La *FASTP* en cada fecha de muestreo se calculó entonces como:

$$FASTP = \frac{\sum_{j=1}^4 [(\theta_v - {}^{LD}\theta_v)_j \cdot 10 \cdot p_j]}{\sum_{j=1}^4 [({}^{CC}\theta_v - {}^{LD}\theta_v)_j \cdot 10 \cdot p_j]} \quad (12)$$

donde θ_v se expresa en % y p_j es el espesor de la capa j del perfil de suelo (en m). La ${}^{CC}\theta_v$ se midió mediante el método de la membrana de presión de Richards (Dane *et al.*, 2002), y el mínimo valor de θ_v observado durante los experimentos fue considerado como la ${}^{LD}\theta_v$. Luego, los valores diarios de *FASTP* se obtuvieron mediante interpolación lineal a partir de los valores de *FASTP* estimados en fechas de muestreo sucesivas.

3.2.3.7. Biomasa aérea y concentración de N

En cada experimento se realizaron cinco muestreos de BA con una frecuencia cercana a semanal, comenzando el 13 de enero en 2009 y en 2010. El método analítico empleado es aquel descrito en la Sección 2.2.6.1.

3.2.3.8. Crecimiento de la hoja

La morfogénesis foliar se estudió siguiendo el método empleado por Berone *et al.* (2008). Para cada tratamiento, en una sub-subparcela seleccionada al azar se marcaron seis macollos al nivel del suelo con hilos plásticos coloreados al inicio del experimento. Comenzando el 9 de enero en 2009 y el 8 de enero en 2010, cada 3 a 5 días se

realizaron mediciones del largo de todas las láminas verdes y de la vaina de cada macollo, registrándose la aparición de nuevas hojas y de nuevos macollos. El largo de las láminas se midió desde la punta de la hoja hasta su lígula (en hojas completamente expandidas) o hasta la lígula de la hoja previa completamente expandida (en hojas en crecimiento) con una regla graduada en mm. Cuando uno de los macollos marcados murió, se marcó un nuevo macollo.

La tasa de elongación foliar (TEF , en $\text{mm día}^{-1} \text{ macollo}^{-1}$) se calculó como la diferencia en el largo total de las láminas entre mediciones sucesivas, dividida por el número de días comprendido en el intervalo de medición. La tasa de aparición de hojas se calculó como el cociente entre el número de hojas aparecidas por macollo y la duración (en $^{\circ}\text{Cd}$) del período de medición y se expresó sobre una base de 100 $^{\circ}\text{Cd}$ (TAH_{100}). La vida media foliar (VMF , en $^{\circ}\text{Cd}$) se calculó como el producto del filocrono (en $^{\circ}\text{Cd}$) y el número de hojas vivas macollo^{-1} . Los valores medios ponderados durante el tiempo de experimentación para la VMF (VMF_{mpt}) y la TEF (TEF_{mpt}) se calcularon tras considerar el largo de los intervalos de tiempo transcurridos entre fechas de medición (Lemaire y Gastal, 1997). Para el cálculo de la VMF_{mpt} sólo fueron consideradas aquellas estimaciones de VMF realizadas luego de que el número de hojas vivas por macollo se estabilizó y la senescencia comenzó a ser significativa (al menos $1 \text{ mm día}^{-1} \text{ macollo}^{-1}$), descartándose por lo tanto aquellas estimaciones realizadas antes del 16 de enero en 2009 y del 20 de enero en 2010.

3.2.3.9. Índice de área foliar, interceptación de radiación y eficiencia de uso de la radiación interceptada

En cada fecha de muestreo, el índice de área foliar (IAF) de la pastura, así como la proporción de la radiación incidente interceptada por la pastura (ρRI_{int}) fueron medidos empleando un analizador del canopeo LAI-2000 (LI-COR Inc, Lincoln, NE, USA), el cual estima varios parámetros del canopeo de la pastura en función de la atenuación de la radiación difusa lograda por el follaje. Las mediciones realizadas con este instrumental consideran el efecto del acartuchamiento de las hojas sobre el IAF , entregando entonces estimaciones del área foliar efectiva bajo condiciones de campo. En cada sub-subparcela, una medición tomada por encima del canopeo fue seguida de tres mediciones por debajo de éste, realizadas en tres de los cuatro vértices de la sub-subparcela y direccionadas hacia su centro. Sobre la lente del instrumento se empleó la tapa que permite un campo de visión de 45° .

Los valores diarios de IAF y de pRI_{int} se obtuvieron por interpolación a partir de mediciones sucesivas de pRI_{int} , asumiendo que éste varió linealmente con la temperatura diaria acumulada. El valor diario de la radiación fotosintéticamente activa incidente (RFA_{inc} , en $MJ\ m^{-2}\ día^{-1}$) se calculó como RFA_{inc} = radiación global incidente diaria ($MJ\ m^{-2}\ día^{-1}$)·0.48 (Varlet-Grancher *et al.*, 1982). Luego, el valor diario de RFA interceptada (RFA_{int} , en $MJ\ m^{-2}\ día^{-1}$) se calculó como RFA_{int} = RFA_{inc} ·valor diario de pRI_{int} . En cada experimento, la eficiencia de uso de la radiación (en g MS MJ^{-1}) para la producción de BA (EUR_{BA}) o de biomasa total BT (EUR_{BT}) de cada tratamiento se calcularon como las pendientes de las regresiones lineales —ajustadas sobre las medias de tratamiento— entre los valores acumulados de RFA_{int} y aquellos de BA o de BA más biomasa de raíces (biomasa total, BT) (expresados en g MS m^{-2}) que fueran estimados en cada uno de los muestreos de biomasa llevados adelante, respectivamente (Monteith, 1977). Dado que las determinaciones de BA y de biomasa de raíces no se realizaron simultáneamente, la BT en las fechas en las que se midió la primera de ellas se calculó mediante interpolación de los datos obtenidos en muestreos sucesivos de biomasa de raíces. Las ordenadas al origen de las regresiones lineales entre los valores acumulados de RFA_{int} y de BA fueron fijadas en $60\ g\ m^{-2}$, valor estimado del remanente vivo de BA luego del corte inicial realizado a 5 cm de altura, en correspondencia con información obtenida en cortes de forraje llevados adelante previamente en la misma pastura (Marino y Agnusdei, 2007). La biomasa de raíces al comienzo de los experimentos se asumió como igual a aquella medida en el primer muestreo de raíces llevado a cabo 12-13 días más tarde, asumiendo que no hubo crecimiento de raíces inmediatamente después de la defoliación (Crider, 1955; Bélanger, Gastal y Warembourg, 1992). Este supuesto parece ser sólido: la BT asumida al comienzo de los experimentos nunca difirió en más de 7.8% de la ordenada al origen de las regresiones lineales entre los acumulados de RFA_{int} y de BT.

3.2.3.10. Estado de nutrición nitrogenada de la pastura

El INN ($INN = N_{actual} / N_{cr}$) se calculó tras corregir el N_{cr} en función del nivel de estrés hídrico experimentado por la pastura, de acuerdo con la función presentada en la Fig.9:

$$N_{cr} = (48 \cdot [BA]^{-0.32}) \cdot (0.59 \cdot [^{11}dETR/ET_0]_m + 0.43) \quad (13)$$

La razón ETR/ET_0 diaria se asumió igual a uno cada vez que el valor diario de FASTP fue igual o mayor al valor umbral de FASTP en el cual el estado hídrico de festuca alta comenzó a disminuir, y se asumió una disminución lineal de la misma con menores contenidos de humedad de suelo, resultando en una ETR igual a cero cuando la FASTP

alcanzó cero (Weisz *et al.*, 1994; Allen *et al.*, 1998; Ray y Sinclair, 1998). Para obtener el valor umbral de FASTP indicador del comienzo del estrés hídrico, se ajustaron modelos lineal-plateau sobre los datos de Ψ_h en función de FASTP (Fig.20).

El INN_{mpt} se calculó siguiendo la metodología descrita en la Sección 2.2.6.2.

3.2.3.11. Demanda de N de la pastura

La demanda diaria de N de la pastura se estimó según Gastal *et al.* (2015):

$$D_{N_i} = a \cdot (1 - b) \cdot (BA)^{-b} \cdot TC \cdot 100 \quad (14)$$

donde D_{N_i} es la demanda de N de la pastura en el día i (en $\text{mg N m}^{-2} \text{ día}^{-1}$), a y b son los coeficientes de la curva de dilución del N_{cr} para pasturas C_3 , y BA y TC son los valores diarios de la BA (en Mg ha^{-1}) y de la tasa de crecimiento (en $\text{Mg ha}^{-1} \text{ día}^{-1}$) de la pastura, respectivamente. El coeficiente b toma el valor de 0.32, mientras que el coeficiente a se calculó en función del nivel de estrés hídrico experimentado por la pastura, de acuerdo con la Ecuación 9.

3.2.3.12. Agua transpirada por la pastura

En el nivel A+, la ETR se asumió igual a la ET_0 . La ETR diaria fue luego particionada entre las diferentes capas del perfil de suelo en función de su densidad de raíces:

$$ETR_{ij} = ET_{0i} \cdot \left(\frac{DLR_{ij} \cdot p_j \cdot 100}{LRT_i} \right) \quad (15)$$

donde ETR_{ij} es el agua evapotranspirada en el día i desde la capa de suelo j (en mm día^{-1}), ET_{0i} es la ET_0 del día i (en mm día^{-1}), DLR_{ij} es la DLR observada el día i en la capa de suelo j (en cm raíz cm^{-3} suelo) y LRT_i es el largo de raíces total hasta 1 m de profundidad observada el día i (en cm raíz cm^{-2} suelo), obtenido como:

$$LRT_i = \sum_j DLR_{ij} \cdot p_j \cdot 100 \quad (16)$$

Para todas las capas del perfil de suelo excepto la capa superficial, se asumió evaporación nula ($ETR = \text{transpiración } [T, \text{ en } \text{mm día}^{-1}]$). Para la capa superficial de 0.2 m, la T se calculó teniendo en cuenta el IAF (Ritchie, 1972; Allen *et al.*, 1998):

$$T_{ij} = ETR_{ij} \cdot \mu \quad (17)$$

donde T_{ij} es el agua transpirada en el día i desde la capa de suelo j (en mm día⁻¹) y μ es un coeficiente que asume el valor de $1 - e^{(-k \cdot IAF)}$ si j se trata de la capa de suelo superficial y de 1 en cualquier otro caso, siendo k el coeficiente de extinción lumínica, con un valor de 0.49 para festuca alta (Sonohat *et al.*, 2002). La T de la pastura el día i (T_i , en mm día⁻¹) fue luego calculada como la sumatoria de las T_{ij} observadas en todas las capas del perfil hasta 1 m de profundidad:

$$T_i = \sum_j T_{ij} \quad (18)$$

En el nivel A-, la ETR de la pastura se calculó considerando las variaciones en el contenido volumétrico de agua registradas durante cada período de tiempo comprendido entre mediciones de humedad de suelo sucesivas:

$$\overline{ETR}_j = \frac{((\theta_{vj} \text{ inicial} - \theta_{vj} \text{ final}) \cdot p_j \cdot 10)}{d} \quad (19)$$

donde \overline{ETR}_j es la ETR media diaria (en mm día⁻¹) en la capa de suelo j estimada para el período de tiempo comprendido entre las determinaciones de θ_v inicial ($\theta_{vj} \text{ inicial}$) y final ($\theta_{vj} \text{ final}$) en la capa de suelo j , y d es igual a la longitud del período de tiempo transcurrido entre las mediciones de θ_v inicial y final (en días). A los valores de \overline{ETR}_j entregados por la Ecuación 19 luego se les incorporó variabilidad diaria en función de la variación observada en la ET_0 diaria durante el mismo período de tiempo:

$$ETR_{ij} = \overline{ETR}_j \cdot \frac{ET_{0i}}{\overline{ET}_0} \quad (20)$$

donde \overline{ET}_0 es la ET_0 media observada durante el período de tiempo en cuestión (en mm día⁻¹). Las T_{ij} correspondientes a las diferentes capas del perfil fueron luego obtenidas a partir de las ETR_{ij} , tras la aplicación de la Ecuación 17. Por último, la T_i (en mm día⁻¹) se calculó como la sumatoria de las T_{ij} , teniendo además en cuenta las lluvias registradas durante el período y asumiendo como nulos al ascenso capilar, la escorrentía superficial y la percolación profunda:

$$T_i = \frac{\text{lluvia}}{d} + \sum_j T_{ij} \quad (21)$$

donde *lluvia* es igual a la lluvia acumulada durante el período de tiempo comprendido entre las determinaciones sucesivas de θ_v (en mm).

3.2.3.13. Flujos de N del suelo

La oferta de N del suelo hacia la pastura se cuantificó estimando los flujos de convección y de difusión de N hacia las raíces de siguiendo la rutina de cálculo que implementa el modelo de simulación de cultivos STICS (Brisson *et al.*, 2009), metodología que fuera aplicada previamente por Durand *et al.* (2010). El flujo convectivo de N se estimó como el producto del agua transpirada en cada capa del perfil de suelo por la concentración de N de la solución del suelo en dicha capa del perfil. Debido a la imposibilidad de asignar el agua eventualmente recibida en forma de lluvia al flujo transpiratorio de las diferentes capas del perfil, en el nivel A– el flujo convectivo de N se calculó sólo para aquellos períodos de tiempo en los que no se registraron lluvias significativas. Por otro lado, dado que durante los experimentos la napa freática estuvo relativamente cerca de la superficie (a una profundidad de ≈ 2 m) no se puede descartar ascenso capilar; sin embargo, el hecho de que la pastura manifestó estrés hídrico cada vez que el horizonte superficial se secó (Figs.17 y 19) sugiere que el ascenso capilar no contribuiría de forma significativa en el abastecimiento de las necesidades de agua de la pastura en situaciones como la evaluada, esto es, durante la estación cálida y con una alta demanda atmosférica.

El flujo convectivo de N para cada capa de suelo fue entonces calculado como:

$$FC_{N_{ij}} = \frac{Nn_{ij}}{\theta_v} \cdot T_{ij} \quad (22)$$

donde $FC_{N_{ij}}$ y Nn_{ij} son el flujo convectivo de N (en $\text{mg N m}^{-2} \text{ día}^{-1}$) y el contenido de N en forma de nitrato (en mg N m^{-2}) correspondiente al día i en la capa de suelo j , respectivamente. El flujo convectivo de N para todo el perfil del suelo en el día i (FC_{N_i} , en $\text{mg N m}^{-2} \text{ día}^{-1}$) luego resulta de sumar los flujos estimados para todas las capas del perfil:

$$FC_{N_i} = \sum_j FC_{N_{ij}} \quad (23)$$

El flujo difusivo de N se estimó asumiendo raíces equidistantes y dispuestas verticalmente, y asumiendo también que la concentración de N mineral (nitrato más amonio) en la superficie de la raíz era nula, de modo que el gradiente de concentraciones de N que impulsa el proceso de difusión, esto es, entre la solución del

suelo y la superficie de raíces, era igual a la concentración mineral de N en la solución del suelo estimada. El flujo difusivo de N de fue entonces calculado como:

$$FD_{N_{ij}} = 4\sqrt{\pi} \cdot D \cdot FASTP_{ij} \cdot \sqrt{DLR_{ij} \cdot Nn+a_{ij}} \cdot 100 \quad (24)$$

donde $FD_{N_{ij}}$ es el flujo difusivo de N correspondiente al día i en el horizonte j (en mg N m^{-2} día $^{-1}$), D es el coeficiente de difusión del N mineral a capacidad de campo (en cm^2 día $^{-1}$), y $FASTP_{ij}$ y $Nn+a_{ij}$ son la FASTP (en proporción) y la concentración de N mineral (nitrato más amonio) en la solución del suelo (en kg N ha $^{-1}$ mm $^{-1}$) estimadas el día i en la capa de suelo j , respectivamente. La hipótesis de una distribución de raíces uniforme resulta en una maximización del flujo de difusión. En realidad, las raíces están distribuidas heterogéneamente, por lo que el flujo de difusión es menor. Para contrarrestar este efecto, el valor de D empleado en la Ecuación 24 es de 0.018 cm^2 día $^{-1}$, menor que las mediciones de D que han sido reportadas en la literatura (Brisson *et al.*, 2009). El flujo difusivo de N para todo el perfil de suelo en el día i (FD_{N_i} , en mg N m^{-2} día $^{-1}$) luego resulta de la suma de los flujos de difusión estimados para todas las capas de suelo:

$$FD_{N_i} = \sum_j FD_{N_{ij}} \quad (25)$$

Finalmente, el flujo total de N del suelo en el día i (FT_{N_i} , en mg N m^{-2} día $^{-1}$) resulta de la suma de los componentes convectivo y difusivo:

$$FT_{N_i} = FC_{N_i} + FD_{N_i} \quad (26)$$

3.2.4. Análisis de la magnitud de los efectos del estrés hídrico, del estrés nitrogenado y del estrés combinado hídrico+nitrogenado sobre las variables de respuesta cuantificadas en los experimentos

Se calculó y comparó la magnitud de los efectos de los estreses simples y del estrés combinado empleando la razón de respuesta (RR), definida como la razón entre la performance medida bajo estrés y la performance medida en ausencia de estrés (Hedges *et al.*, 1999). La RR cuantifica cambios proporcionales, posibilitando de este modo realizar comparaciones de los efectos observados sobre variables medidas en diferentes unidades, y asume que los efectos de los diferentes factores de estrés son multiplicativos, no aditivos (Schäfer y Piggott, 2018), lo cual es más razonable desde el punto de vista biológico (Sih *et al.*, 1998). Sin embargo, las RR pueden tener propiedades estadísticas indeseables como por ejemplo distribuciones altamente

asimétricas, inconveniente que comúnmente es remediado mediante el uso de sus logaritmos naturales (L) (Hedges *et al.*, 1999; Rosenberg *et al.*, 2013). De este modo, la magnitud del efecto del estrés hídrico fue calculado como (Hedges *et al.*, 1999):

$$L_A = \ln RR_A = \ln \left(\frac{\bar{Y}_{A-N+}}{\bar{Y}_{A+N+}} \right) = \ln \bar{Y}_{A-N+} - \ln \bar{Y}_{A+N+} \quad (27)$$

el cual tiene una varianza igual a:

$$(\sigma_{L_A})^2 = \frac{(\sigma_{A-N+})^2}{(\bar{Y}_{A-N+})^2 \cdot N_{A-N+}} + \frac{(\sigma_{A+N+})^2}{(\bar{Y}_{A+N+})^2 \cdot N_{A+N+}} \quad (28)$$

donde \bar{Y} , σ y N son el valor medio de la variable de crecimiento a comparar, su desvío estándar y el número de réplicas de tratamiento, respectivamente. La magnitud del efecto del estrés nitrogenado ($L_N = \ln RR_N$) y del estrés combinado hídrico+nitrogenado ($L_{A+N} = \ln RR_{A+N}$) así como sus varianzas se calcularon análogamente, reemplazando \bar{Y}_{A-N+} , $(\sigma_{A-N+})^2$ y N_{A-N+} por \bar{Y}_{A+N-} , $(\sigma_{A+N-})^2$ y N_{A+N-} (para el estrés nitrogenado), o por \bar{Y}_{A-N-} , $(\sigma_{A-N-})^2$ y N_{A-N-} (para el estrés combinado). Las magnitudes de los efectos simples del estrés hídrico y del nitrogenado se calcularon sólo con información indicando el efecto de un estrés cuando el otro factor de estrés estuvo ausente (esto es, L_A se calculó con información del nivel $N+$, mientras que L_N se calculó con información del nivel $A+$), ya que de otro modo L_A y L_N resultarían sesgados cada vez que la respuesta de la pastura mostrara una interacción entre ambos estreses (Crain *et al.*, 2008; Folt *et al.*, 1999). Se calcularon intervalos de confianza del 90% para cada L de acuerdo con Hedges *et al.* (1999):

$$L \pm t \left(\frac{\sqrt{\sigma^2}}{\sqrt{N}} \right) \quad (29)$$

donde t es el valor crítico de la distribución t de Student con $N-1$ grados de libertad ($t=2.92$). Los intervalos de confianza para las RR fueron luego obtenidos calculando los antilogaritmos de los intervalos de confianza para L . Se consideró que un factor de estrés generó un efecto significativo sobre la variable de respuesta cada vez que el intervalo de confianza de la RR no incluyó el valor uno. También, si los intervalos de confianza alrededor de dos RR no se solaparon, entonces se consideró que los estreses tuvieron efectos de magnitud significativamente diferente sobre la variable de respuesta.

La RR_{A+N} observada debería coincidir con aquella predicha por los valores de RR_A y RR_N observados si los estreses hídrico y nitrogenado tuvieran efectos multiplicativos:

$$RR_{A+N} \text{ predicha} = RR_A \text{ observada} \cdot RR_N \text{ observada} \quad (30)$$

Una correspondencia perfecta entre los valores observados y predichos de RR_{A+N} es sin embargo poco frecuente, por lo tanto, para concluir si una eventual diferencia entre dichos valores es indicativa de una interacción agua·N significativa —ya sea sinérgica o antagónica— o no lo es, la magnitud de la interacción agua·N se evaluó como una magnitud de efecto en si misma calculando la diferencia entre los logaritmos de las RR obtenidos para estrés hídrico en condiciones de estrés nitrogenado y para estrés hídrico en ausencia de estrés nitrogenado (y viceversa) (Hedges *et al.*, 1999):

$$L_i = \ln\left(\frac{\bar{Y}_{A-N-}}{\bar{Y}_{A+N-}}\right) - \ln\left(\frac{\bar{Y}_{A-N+}}{\bar{Y}_{A+N+}}\right) = \ln\left(\frac{\bar{Y}_{A-N-}}{\bar{Y}_{A-N+}}\right) - \ln\left(\frac{\bar{Y}_{A+N-}}{\bar{Y}_{A+N+}}\right) \quad (31)$$

y luego:

$$L_i = \ln \bar{Y}_{A-N-} - \ln \bar{Y}_{A+N-} - \ln \bar{Y}_{A-N+} + \ln \bar{Y}_{A+N+} \quad (32)$$

donde L_i es el tamaño del efecto de la interacción agua·N, que tiene una varianza:

$$(\sigma_{L_i})^2 = \frac{(\sigma_{A-N-})^2}{(\bar{Y}_{A-N-})^2 \cdot N_{A-N-}} + \frac{(\sigma_{A-N+})^2}{(\bar{Y}_{A-N+})^2 \cdot N_{A-N+}} + \frac{(\sigma_{A+N-})^2}{(\bar{Y}_{A+N-})^2 \cdot N_{A+N-}} + \frac{(\sigma_{A+N+})^2}{(\bar{Y}_{A+N+})^2 \cdot N_{A+N+}} \quad (33)$$

Para cada variable de crecimiento analizada, se calcularon los intervalos de confianza del 90% para la magnitud del efecto de la interacción del mismo modo que se lo hizo para las magnitudes de los efectos de los estreses simples y del estrés combinado. Los intervalos de confianza para los efectos de la interacción agua·N fueron luego obtenidos calculando los antilogaritmos de los intervalos de confianza para L_i . Se asumió una respuesta de la variable de crecimiento no significativamente diferente de aquella propuesta por el modelo multiplicativo, esto es, ausencia de interacción, cada vez que el antilogaritmo del intervalo de confianza de L_i incluyó el valor uno (Crain *et al.*, 2008). Por analogía, intervalos de confianza para L_i que no se solaparon con uno se asumieron como indicativos de una interacción agua·N significativa, ya sea de antagonismo (intervalos por encima de uno) o de sinergismo (intervalos por debajo de uno).

3.2.5. Análisis estadístico

La significancia estadística ($\alpha = 0.05$) de los efectos de tratamiento sobre la BA, biomasa de raíces, LRE, DLR, β_B , β_L , IAF, pRI_{int} , TEF e INN se determinó empleando modelos mixtos, con los efectos de bloque, bloque·nivel de agua y bloque·nivel de agua·nivel de N como aleatorios. Del mismo modo, para aquellas variables integradas

en el tiempo (INN_{mpt} , TAH_{100} , VMF_{mpt} , valor medio diario de FT_{N_i}), se aplicó un modelo mixto con los efectos de bloque y bloque-nivel de agua como aleatorios (Littell *et al.*, 2006). En ambos casos, se usó el procedimiento MIXED del paquete informático SAS (v 14.1, SAS Institute, Cary, NC, USA), seleccionando la opción NOBOUND cuando alguno de los estimadores de los parámetros de covarianza resultó igual a cero y seleccionando en la instrucción MODEL la opción SATTERTH para calcular los grados de libertad de acuerdo con el método de Satterthwaite (SAS, 2015b). Para la comparación de medias de tratamiento se usó la opción SLICE de la instrucción LSMEANS.

Se empleó el procedimiento REG para realizar regresiones lineales simples y múltiples mediante el método de mínimos cuadrados (SAS, 2015d). En el segundo caso, las variables a mantener en el modelo fueron seleccionadas con el método *backward*. Las pendientes de las regresiones de la BA y de la BT en función de la RFA_{int} acumulada se compararon como se indicó en la Sección 2.2.7. El coeficiente de determinación R^2 se calculó según Kvalseth (1985):

$$R^2 = 1 - \frac{\sum(y - \hat{y})^2}{\sum(y - \bar{y})^2} \quad (34)$$

donde y , \bar{y} e \hat{y} son el valor observado en la variable de respuesta, su valor medio y su valor predicho, respectivamente.

Se empleó el procedimiento NLIN (SAS, 2015c) para ajustar el modelo lineal-plateau sobre la información de FASTP vs. Ψ_h , así como para ajustar el modelo de Gale y Grigal sobre la información de largo y biomasa de raíces acumulados vs. profundidad del perfil.

3.3. Resultados

3.3.1. Condiciones meteorológicas y disponibilidad de agua en el suelo

La radiación incidente y la T_a fueron más altas y la humedad relativa del aire fue más baja en el Experimento Verano 2009, resultando en valores más altos de ET_0 y de déficit de presión de vapor (DPV) que en el Experimento Verano 2010bis (Tabla 4; la evolución mensual de la T_a , de la ET_0 y de las lluvias en cada uno de los experimentos se presenta en la Fig. I del Apéndice). Esto, en conjunción con una menor lluvia acumulada, hizo que el nivel A- enfrentara condiciones de crecimiento muy severas en el verano de 2009. Los eventos de déficit hídrico durante la estación cálida son usuales en Balcarce. Durante el período 1971-2021, el déficit de lluvias (la diferencia entre la ET_0 acumulada y las lluvias acumuladas) medio para el bimestre enero-febrero es de 80 mm. Sin

embargo, el déficit de lluvias durante enero-febrero de 2009 fue de 237 mm, un valor récord para el período, apenas mayor al valor de 236 mm registrado en 1972 (INTA, s.f.). Por el contrario, el déficit de lluvias durante enero-febrero 2010 fue de 92 mm, por lo que el verano de 2010 puede ser considerado como un verano promedio en lo que respecta al nivel de déficit hídrico.

Tabla 4. Valores alcanzados por las variables meteorológicas registradas durante ambos experimentos.

Experimento (período evaluado)	Radiación global incidente	T _a ¹	ET ₀ ²	HR ³	DPV ⁴	Lluvia
	MJ m ⁻² día ⁻¹	°C	mm día ⁻¹	%	kPa	mm
Verano 2009 (30/12/08-12/2/09)	24.0	21.7	6.2	65	1.04	86
Verano 2010bis (30/12/09-8/2/10)	21.7	20.5	5.7	71	0.78	111

¹Temperatura del aire.

²Evapotranspiración de Referencia.

³Humedad relativa.

⁴Déficit de presión de vapor.

Una napa freática que se ubicó a una profundidad de alrededor de 2 m durante los períodos de experimentación generó valores elevados y constantes de θ_v en el subsuelo (Fig.17). De hecho, por debajo de los 60 cm de profundidad la θ_v siempre se ubicó por encima del nivel de capacidad de campo (Fig.18). En contraste, la θ_v en las capas superficiales del perfil fluctuó marcadamente durante los experimentos (Fig.17). De este modo, sólo la fracción más superficial del sistema radical de festuca alta experimentó las condiciones contrastantes de disponibilidad de agua que se intentaron imponer en los experimentos. En 2009, la θ_v del nivel A– disminuyó rápidamente durante la primera parte (≈ 350 °Cd) del experimento. En esta etapa, aún el nivel A+ registró una leve reducción en la θ_v , de los horizontes superficiales debido a que la lámina de riego aplicada no fue lo suficientemente elevada como para abastecer las necesidades de agua de una pastura expuesta a demandas evaporativas tan altas. Los menores valores de θ_v fueron medidos en el nivel A– el 20 de enero de 2009, con 13.3-13.6% para la capa de 0-0.2m. A partir del 20 de enero comenzó una fase de recuperación de la θ_v , y estas condiciones de mayor humedad de suelo se mostraron mayormente invariables durante el resto del experimento. En 2010, el nivel A– enfrentó un período seco algo más tarde que en 2009 (≈ 450 °Cd), con la θ_v de los horizontes superficiales disminuyendo hasta el día 29 de enero, cuando comenzó un período húmedo que se extendió durante el resto del experimento. Los niveles mínimos de θ_v medidos en 2010 fueron de 16.9-17.9% y 16.8-18.5% en las capas 0-0.1 y 0.1-0.2 m, respectivamente. Determinaciones de laboratorio realizadas sobre el suelo evaluado arrojaron valores de

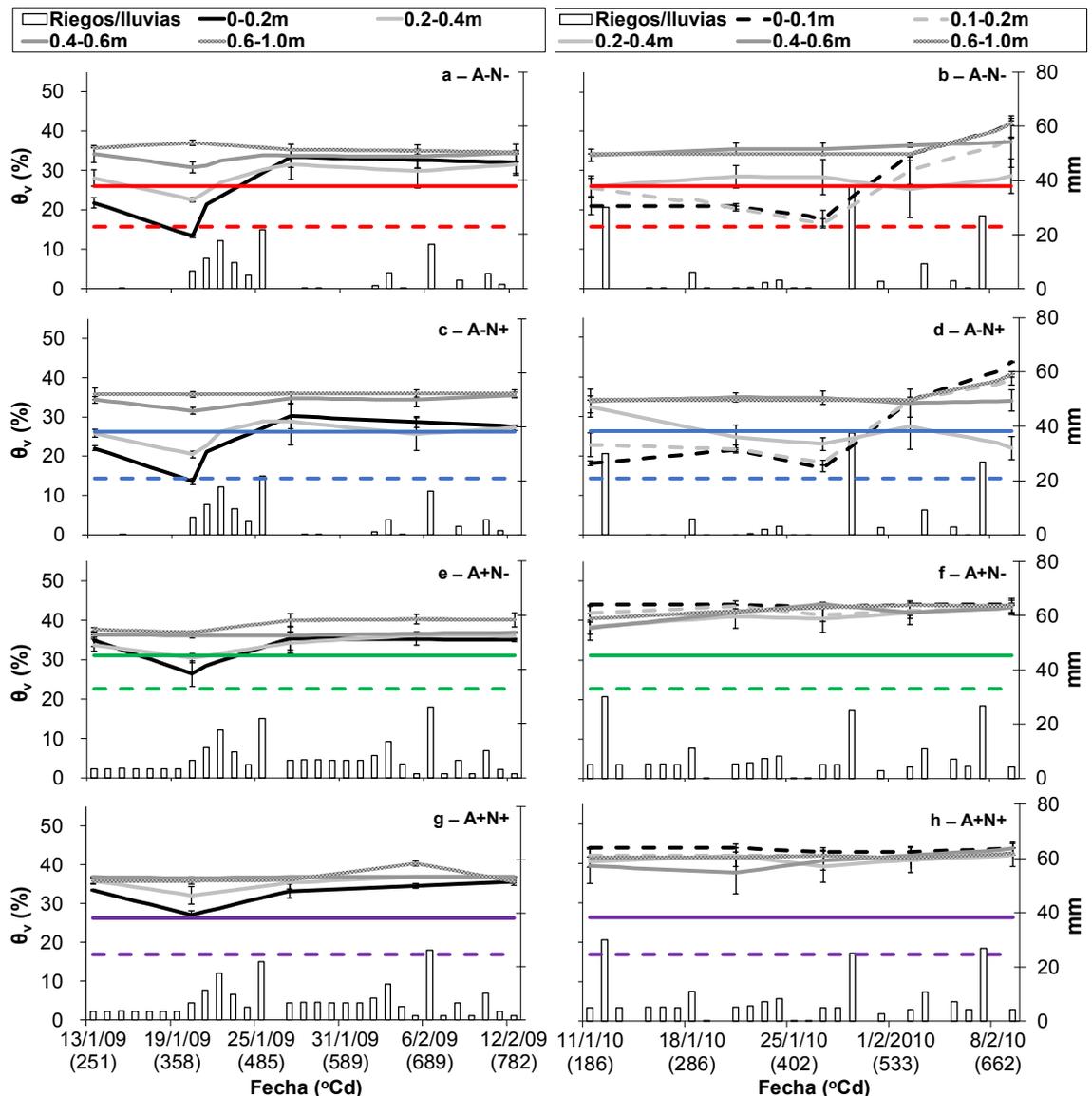


Fig.17. Contenido volumétrico de agua (θ_v) en cada capa del perfil del suelo (líneas, eje y izquierdo) y agua recibida (en mm) en forma de lluvia y/o riego (columnas, eje y derecho) registrados en pasturas de festuca alta creciendo bajo dos niveles de disponibilidad de agua (A-: seco; A+: riego) y de N (N-: 40 kg N ha⁻¹; N+: 200 kg N ha⁻¹) en los Experimentos Verano 2009 (a, c, e y g) y 2010bis (b, d, f y h). Las barras verticales indican ± 1 EE de la media (n= 3). Líneas de diferentes colores indican los valores de θ_v a los niveles de capacidad de campo (líneas continuas) y del punto de marchitez permanente (líneas discontinuas) para cada capa del perfil de suelo, presentándose éstos por separado a los fines de facilitar la lectura de la figura: líneas rojas, azules, verdes y púrpuras indican los valores para las capas 0-0.2m (a, b), 0.2-0.4m (c, d), 0.4-0.6m (e, f) y 0.6-1.0m (g, h), respectivamente.

16.4% y 15.0% para la θ_v a un nivel de succión de 15 bares (punto de marchitez permanente) en las profundidades 0-0.1 y 0.1-0.2 m, respectivamente, lo cual permite poner en perspectiva el nivel de escasez de agua enfrentado por el nivel A- durante los experimentos. Con respecto a la $^{CC}\theta_v$, ésta varió entre 26 y 31% dependiendo de la profundidad (Fig.18). Luego, con valores de densidad aparente que oscilaron entre 1.40 y 1.48 g cm⁻³ suelo, los cálculos arrojan para el perfil de suelo un valor de 49 mm para el acumulado de agua transpirable por la pastura hasta los 0.6 m de profundidad.

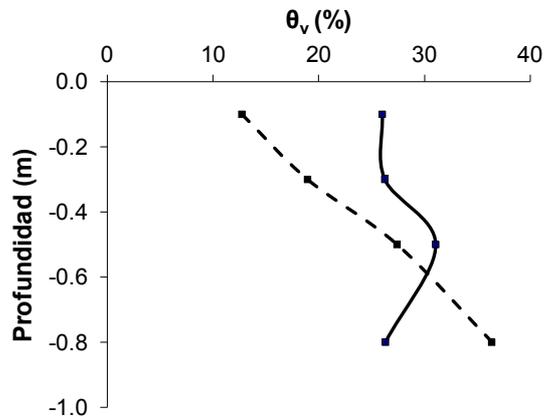


Fig.18. Variación en función de la profundidad de la humedad volumétrica del suelo medida a -0.33 bar (capacidad de campo, $^{CC}\theta_v$, línea continua) y del valor límite de descenso en la θ_v registrado en ambos experimentos de verano ($^{LD}\theta_v$, línea discontinua).

3.3.2. Estado hídrico de la pastura

El nivel de disponibilidad de N no tuvo un efecto significativo sobre el Ψ_h en 2009 ($p=0.31$) así como tampoco en 2010 ($p=0.23$) (Fig.19). El nivel de disponibilidad de agua sí tuvo un gran efecto sobre el Ψ_h en ambos experimentos. El valor máximo de Ψ_h registrado fue de -0.07 MPa, lo que sugiere que, aunque mínima, la transpiración nocturna fue significativa. En 2009, el Ψ_h del nivel A- comenzó a diferenciarse significativamente del correspondiente al nivel A+ en la medición del 13 de enero y esta diferencia se amplió marcadamente el 20 de enero, fecha en la que el nivel A- enfrentaba un severo estrés hídrico, con valores de Ψ_h de -2.28 y -1.95 MPa para los tratamientos A-N- y A-N+, respectivamente. El nivel A+ también registró su Ψ_h mínimo el día 20 de enero, con valores de entre -0.45 y -0.48 MPa. Luego de la rehumectación, el Ψ_h del nivel A- igualó al de A+ hasta el 12 de febrero inclusive, enfrentando A- una leve reducción en su estado hídrico durante la última semana del experimento.

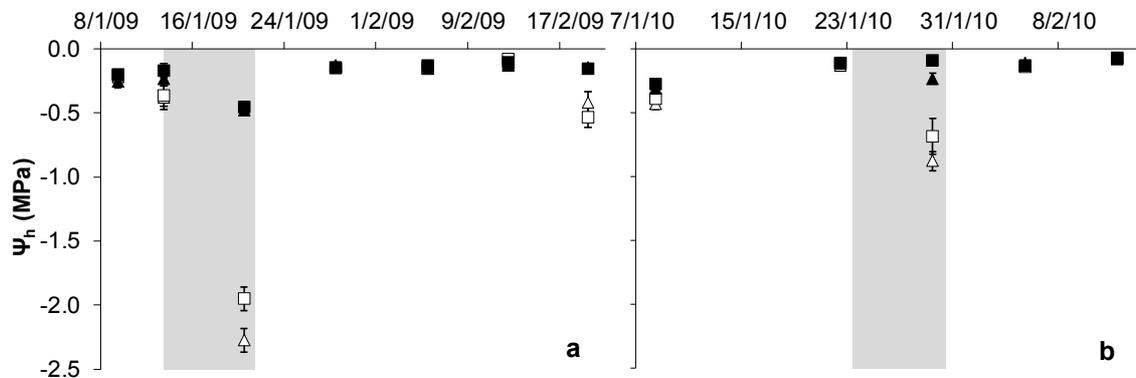


Fig.19. Potencial agua foliar pre-alba (Ψ_h) registrado en pasturas de festuca alta expuestas a dos niveles de disponibilidad de agua (símbolos vacíos y llenos denotan condiciones de sequo y bajo irrigación, respectivamente) y de N (triángulos y cuadrados denotan niveles de 40 y 200 kg de N ha^{-1} , respectivamente) durante los Experimentos Verano 2009 (a) y 2010bis (b). Las áreas de color gris denotan los períodos secos en cada experimento. Las barras verticales indican ± 1 EE de la media ($n=3$).

En 2010, el Ψ_h correspondiente al nivel A– fue ligeramente inferior al del nivel A+ en la primera medición realizada el 8 de enero: -0.41 vs -0.29 MPa ($p= 0.049$). Una lluvia de 30 mm registrada pocos días después (12 de enero) evitó que el nivel A– enfrentara un estrés hídrico significativo durante la primera etapa del experimento. El valor mínimo de Ψ_h para los tratamientos A– se alcanzó el 29 de enero con una media de -0.78 MPa. La rehumectación posterior hizo que el estado hídrico del nivel A– no se diferenciara de aquel correspondiente a los tratamientos regados durante el resto del experimento.

De este modo, las variaciones observadas tanto en la θ_v como en el Ψ_h permitieron definir, para el nivel A–, “períodos secos” y “períodos húmedos” en ambos experimentos: en el verano 2009, se registró un período seco entre el 13 y el 20 de enero, mientras que el resto del experimento puede considerarse como húmedo; mientras que en el verano de 2010 el período inicial hasta el día 22 de enero fue húmedo, seguido de un período seco entre el 23 y el 29 de enero y finalizando el experimento con un período húmedo que comenzó el 30 de enero. Los períodos secos de ambos experimentos son señalados en la Fig.19 mediante un área coloreada.

Los modelos del tipo lineal-plateau describieron adecuadamente la relación entre el Ψ_h y la disponibilidad de agua en el suelo (Fig.20). El valor umbral de la FASTP asociado con el comienzo del estrés hídrico fue algo mayor en 2009 que en 2010 (0.45 vs 0.40), y en 2009 el Ψ_h también disminuyó más aceleradamente una vez que el nivel de humedad de suelo atravesó dicho valor umbral. Las relaciones ETR/ET_0 medias estimadas durante el período seco de 2009 (13 al 20 de enero) para los niveles A– y A+

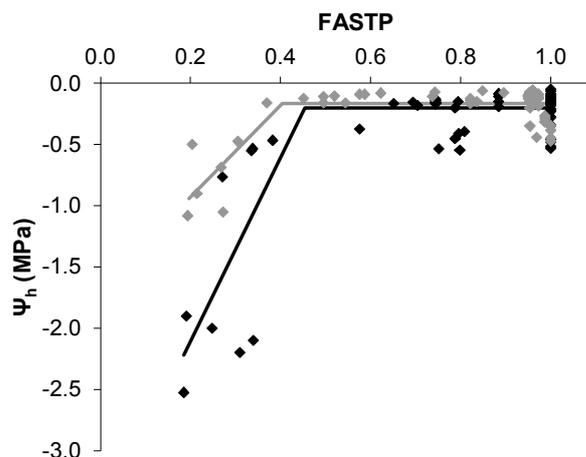


Fig.20. Relación entre el potencial agua foliar pre-alba (Ψ_h) en pasturas de festuca alta y la disponibilidad de agua en el suelo, expresada como la fracción del agua del suelo transpirable por la planta (FASTP). La ecuación del modelo lineal-plateau ajustado para el Experimento Verano 2009 (símbolos negros) es: $\Psi_h = 7.48 \cdot \text{FASTP} - 3.60$ (para $\text{FASTP} \leq 0.45$) y $\Psi_h = -0.20$ (para $\text{FASTP} > 0.45$), $R^2 = 0.76$; y para el Experimento Verano 2010bis (símbolos grises) es: $\Psi_h = 3.73 \cdot \text{FASTP} - 1.68$ (para $\text{FASTP} \leq 0.40$) y $\Psi_h = -0.17$ (para $\text{FASTP} > 0.40$), $R^2 = 0.65$.

fueron de 0.69 y 0.95, respectivamente. En 2010 (23 al 29 de enero) los valores correspondientes fueron 0.78 y 0.99, respectivamente.

3.3.3. Uso de agua de la pastura

Una respuesta positiva de la T al agregado de N fue evidente (Fig.21), la que operó mayormente a través de incrementos en el área foliar (Fig.23a y 23b), dado que el agregado de N no mostró un impacto sustancial sobre el estado hídrico de la pastura (Fig.19). En 2009, la T de los tratamientos A– durante el período seco promedió un 57% de la ET_0 , mientras que en 2010 ésta varió entre 22% (para A–N–, afectado por una baja área foliar, Fig.23b) y 44% (para A–N+). La T del nivel A– se recuperó rápidamente una vez finalizado el período seco, sobre todo en 2010. Considerando la integridad de los experimentos, el nivel A– transpiró un promedio de 63% de la ET_0 en 2009, y entre 42 y 67% en 2010.

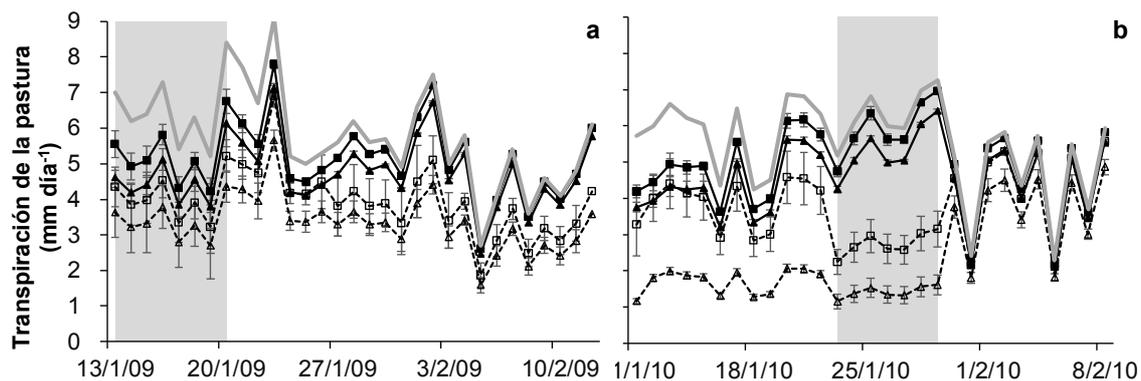


Fig.21. Transpiración en pasturas de festuca alta expuestas a dos niveles de disponibilidad de agua (símbolos vacíos y línea discontinua: secano; símbolos llenos y línea continua: riego) y de N (triángulos y cuadrados denotan niveles de 40 y 200 kg de N ha⁻¹, respectivamente) durante los Experimentos Verano 2009 (a) y 2010bis (b). La línea de color gris indica la ET_0 . Las áreas de color gris denotan los períodos secos en cada experimento. Las barras verticales indican ± 1 EE de la media ($n=3$).

3.3.4. Morfogénesis foliar

El período de crecimiento de la pastura analizado comprendió hasta el 12 de febrero en 2009 y hasta el 8 de febrero en 2010; los últimos (quintos) muestreos de BA fueron realizados posterior al intervalo de tiempo equivalente a la VMF calculada (Tabla 5) y por lo tanto no fueron considerados en el análisis. Tanto en 2009 como en 2010, se detectaron interacciones agua·N·fecha de muestreo, N·fecha de muestreo y agua·fecha de muestreo estadísticamente significativas ($p<0.05$). Los efectos positivos de la disponibilidad de agua y de N sobre la TEF fueron evidentes (Fig.22). En 2009, sin embargo, y en concordancia con lo mostrado por el Ψ_h , no sólo el nivel A– si no también el nivel A+ mostró una reducción en la TEF durante el período seco registrado a mediados de enero. La TEF del nivel A– fue de, todos modos, significativamente menor

a la de A+ en este período ($p < 0.05$). Considerando la integridad del experimento, la TEF_{mpt} se redujo un 22% por el estrés nitrogenado y un 39% por el estrés hídrico.

En 2010, la diferencia en la TEF alcanzada entre ambos niveles de disponibilidad de agua una vez más se vio maximizada durante el período seco (22 al 29 de enero). Pero aún antes de este período, hubo un efecto substancial de la disponibilidad de agua sobre la TEF del nivel N+, aun cuando las lluvias registradas los días 12 y 18 de enero hacen altamente improbable que estos tratamientos hayan tenido un Ψ_h significativamente diferente. En 2010, los estreses nitrogenado e hídrico redujeron la TEF_{mpt} en 42% y en 66%, respectivamente. El mayor efecto del N sobre la TEF en 2010 puede adjudicarse a que el menor nivel de estrés hídrico permitió mayores respuestas al N, mientras que la mayor respuesta al agua también observada en 2010 se debería que el nivel A+ no experimentó reducción alguna en su Ψ_h en ninguna etapa del experimento, a diferencia de lo acontecido en 2009. Notablemente, en ambos experimentos la TEF de los tratamientos A- se recobró abruptamente una vez terminado el período seco, con el tratamiento N+ mostrando una TEF aún mayor que su contraparte irrigada.

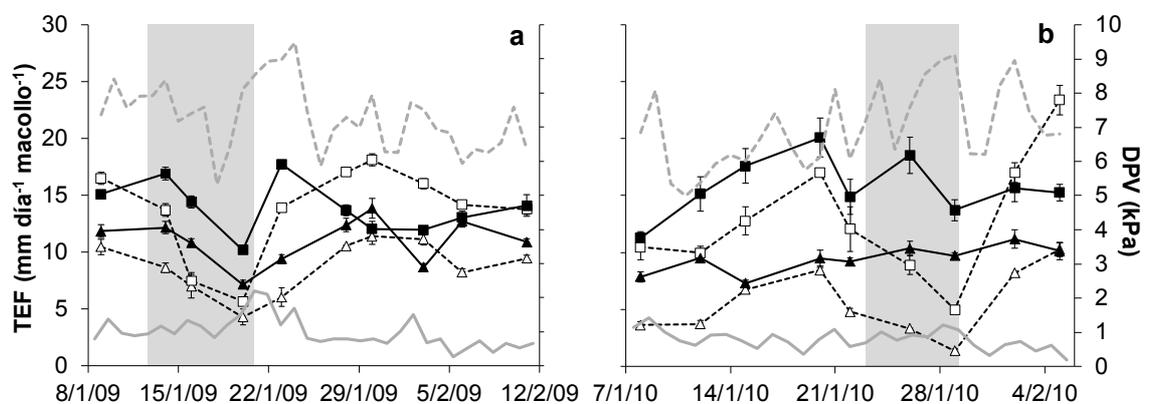


Fig. 22. Tasa de elongación foliar (TEF) diaria (eje Y izquierdo) en pasturas de festuca alta expuestas a dos niveles de disponibilidad de agua (símbolos vacíos y línea discontinua: secano; símbolos llenos y línea continua: riego) y de N (triángulos y cuadrados denotan niveles de 40 y 200 kg de N ha^{-1} , respectivamente) durante los Experimentos Verano 2009 (a) y 2010bis (b). La línea gris discontinua indica la temperatura media diaria del aire (eje Y izquierdo) y la línea gris continua indica el valor diario de déficit de presión de vapor (DPV, eje Y derecho). Las áreas de color gris denotan los períodos secos en cada experimento. Las barras verticales indican ± 1 EE de la media ($n = 3$).

El incremento en la disponibilidad de N se asoció con disminuciones significativas en la VMF, excepto para el nivel A+ en el verano de 2010 (Tabla 5). Con respecto al efecto de la sequía, un evento de intensidad moderada como el registrado en el verano de 2010 resultó en mayor VMF, pero sólo para la condición N-, no registrándose efectos significativos en el nivel N+. En 2009, en cambio, un estrés hídrico mucho más severo generó disminuciones en la longevidad de las hojas, independientemente de la disponibilidad de N. Con respecto a la TAH, ésta mostró una alta respuesta a las

disponibilidades de agua y N. En 2009, tanto la adición de N como de agua incrementaron la TAH, aunque la última de forma no significativa. En 2010 los resultados fueron similares, con la excepción de que no se notó un efecto del N en condiciones A+.

Tabla 5. Valores medios ponderados durante el período experimental para la vida media foliar (VMF_{mpt} , en °Cd) y la tasa de aparición de hojas (TAH_{100} , en número de hojas aparecidas $macollo^{-1}$ en un período de 100 °Cd) en pasturas de festuca alta expuestas a dos niveles de disponibilidad de agua (A-: secano; A+: riego) y de N (N-: 40 kg N ha^{-1} ; N+: 200 kg de N ha^{-1}) durante experimentos conducidos en los veranos de 2009 y de 2010.

		Verano 2009		Verano 2010bis	
		VMF_{mpt}	TAH_{100}	VMF_{mpt}	TAH_{100}
A-	N-	685b ¹ (55) ²	0.35a (0.02)	758a (19)	0.29a (0.01)
	N+	579a (30)	0.45b (0.01)	648b (18)	0.50b (0.02)
A+	N-	788c (73)	0.41a (0.02)	607b (39)	0.48b (0.01)
	N+	690b (19)	0.48b (0.02)	655b (16)	0.47b (0.03)
Significancia de la interacción agua·N (valor p)		0.91	0.47	0.01	0.02

¹Letras comparan tratamientos dentro de cada experimento con un α de 0.05.

²Error estándar.

3.3.5. Respuestas de la producción de biomasa aérea y del área foliar al agua y al N

La respuesta de la producción de BA a los estreses hídrico y nitrogenado fueron consistentes entre experimentos (Fig.23). Las TC máximas fueron observadas en el tratamiento A+N+ con un promedio de 0.150-0.158 Mg MS ha^{-1} día⁻¹. Tanto el estrés hídrico como el nitrogenado tuvieron grandes efectos sobre el crecimiento de la pastura, mostrando el tratamiento A-N- una TC promedio de sólo 0.056-0.062 Mg MS ha^{-1} día⁻¹. La acumulación de BA mostró una interacción agua·N·fecha de muestreo significativa ($p=0.05$) en 2009. La acumulación de BA de los tratamientos A- no mostró efecto significativo del N durante el período seco (13 al 20 de enero), mientras que en el nivel A+ sólo en el muestreo inicial no hubo respuesta al N ($p> 0.42$). La BA acumulada por los tratamientos A-, e incluso la del tratamiento A+N-, disminuyó entre los muestreos del 13 y del 21 de enero de 2009. Los estreses hídrico y nitrogenado también mostraron un efecto negativo sobre el área foliar pero sólo el efecto del N fue significativo ($p< 0.01$), quedando al borde de la significancia tanto el efecto del estrés hídrico ($p= 0.08$) como de la interacción agua·N ($p< 0.07$). Como sucediera con la acumulación de BA, la expansión del área foliar se frenó durante el período seco; es más, en casi todos los tratamientos el IAF disminuyó entre el 13 y el 21 de enero de 2009, pero una vez finalizado éste todos los tratamientos mostraron incrementos significativos de su área foliar entre muestreos sucesivos.

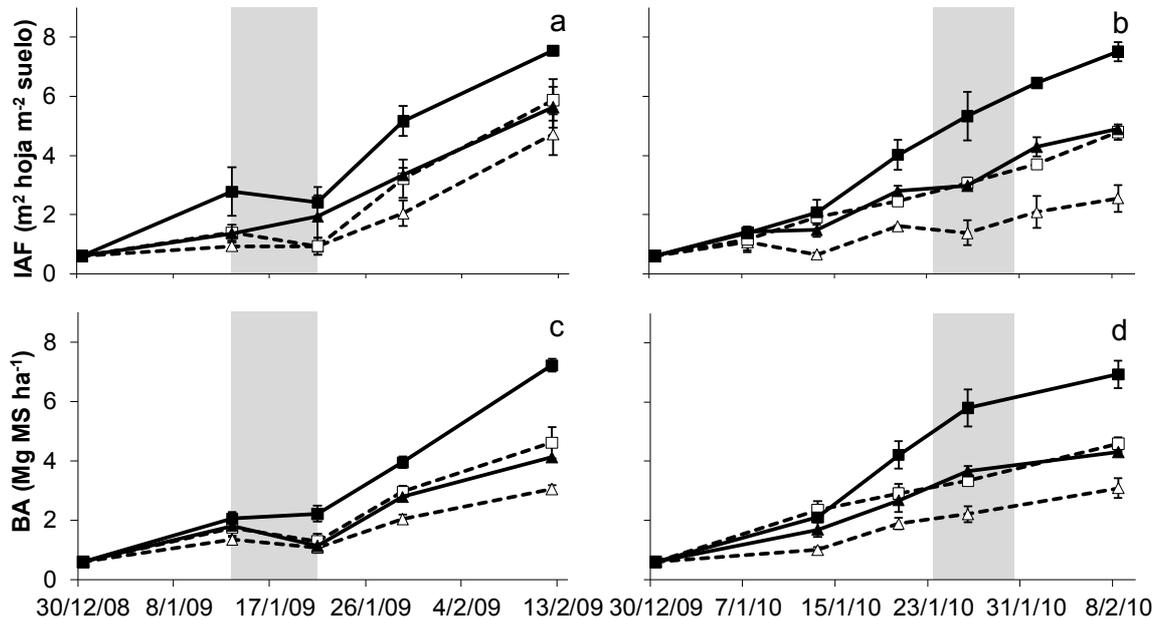


Fig.23. Evolución a lo largo del tiempo del índice de área foliar (IAF) y la biomasa aérea (BA) acumulada en pasturas de festuca alta expuestas a dos niveles de disponibilidad de agua (símbolos vacíos y línea discontinua: seco; símbolos llenos y línea continua: riego) y de N (triángulos y cuadrados denotan niveles de 40 y 200 kg de N ha⁻¹, respectivamente) durante los Experimentos Verano 2009 (a, c) y 2010bis (b, d). Las áreas de color gris denotan los períodos secos en cada experimento. Las barras verticales indican ± 1 EE de la media (n= 3).

Las reducciones observadas en BA e IAF durante el período seco de 2009 se replicaron en la población de macollos de la pastura (Fig.24). La densidad de macollos disminuyó significativamente ($p < 0.05$) entre el 13 y el 21 de enero y se recuperó rápidamente luego de la rehumectación, con todos los tratamientos alcanzando en la fecha del 12 de febrero su densidad techo de macollos con valores de entre 2500 (nivel N-) y 3300 (nivel N+) macollos m⁻².

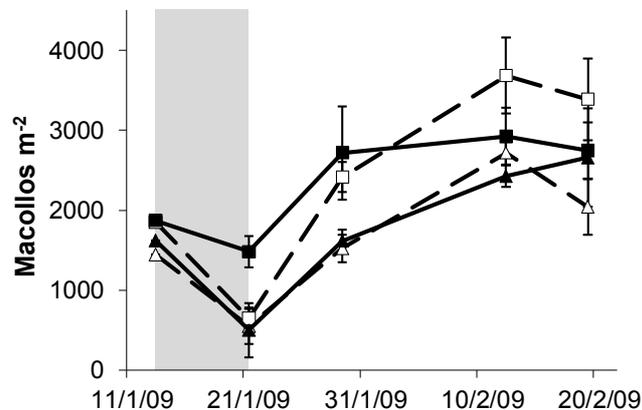


Fig.24. Evolución a lo largo del tiempo de la densidad de macollos en pasturas de festuca alta expuestas a dos niveles de disponibilidad de agua (símbolos vacíos y línea discontinua: seco; símbolos llenos y línea continua: riego) y de N (triángulos y cuadrados denotan niveles de 40 y 200 kg de N ha⁻¹, respectivamente) durante el Experimento Verano 2009. El área de color gris denota el periodo seco del experimento. Las barras verticales indican ± 1 EE de la media (n= 3).

En 2010, debido a la disponibilidad hídrica no limitante experimentada por el nivel A+ y a la menor intensidad del estrés hídrico registrado durante el período seco, los efectos del agua y del N sobre el crecimiento de la pastura fueron aún más evidentes: el IAF mostró interacciones N·fecha de muestreo y agua·fecha de muestreo significativas y la BA mostró interacción significativa agua·N·fecha de muestreo, siendo los valores alcanzados por ambas variables significativamente afectados ($p < 0.01$) por las disponibilidades de agua y N en todos los muestreos que tuvieron lugar a partir del 20 de enero.

3.3.6. Desarrollo del sistema radical

El desarrollo subterráneo de la pastura se mostró mucho menos sensible que la BA a las condiciones hídrico-nitrogenadas. La biomasa de raíces acumulada hasta el metro de profundidad no mostró interacción significativa de ningún tipo ($p > 0.43$) y tampoco fue significativamente afectada ni por el régimen hídrico ($p > 0.30$) ni por la disponibilidad de N ($p > 0.36$) en ningún experimento (Fig.25). Por el contrario, se observaron efectos significativos de la fecha de muestreo ($p < 0.005$) en ambos experimentos. En 2009, la biomasa total de raíces osciló entre 679 y 929 g MS m⁻², mientras que en 2010 lo hizo entre 583 y 737 g MS m⁻². Excepto para el tratamiento A–N– en 2010, en general la biomasa de raíces se incrementó durante el experimento, aunque esto fue más notable en 2009: la biomasa total de raíces al final del experimento fue 37% mayor que al inicio, mientras que en 2010 el aumento correspondiente fue del 23%. Tal como muestra la Fig.25, la distribución vertical de las raíces en el perfil del suelo mostró alta asimetría con una preponderancia de los horizontes superficiales. El incremento en la biomasa de raíces observado durante los experimentos también fue la resultante de un crecimiento neto de raíces registrado mayoritariamente en los horizontes superiores del perfil, con una respuesta que se fue atenuando gradualmente con la profundidad. En 2009, el incremento de la biomasa de raíces fue significativo ($p < 0.001$) en la capa 0-0.2 m y apenas no significativo ($p = 0.058$) en la capa 0.2-0.4 m, mientras que en 2010 el incremento fue no significativo ($p = 0.135$) en 0-0.2 m y significativo ($p < 0.001$) para 0.2-0.4 m. Con respecto al análisis de la distribución vertical acumulada de la biomasa y el largo de raíces en el perfil de suelo, los parámetros β calculados para el Experimento Verano 2010bis mostraron ausencia de efectos de agua o de N, ni variación significativa durante el experimento. Los valores β_B y β_L promediaron 0.947 y 0.949, respectivamente. En el verano de 2009, β_B tampoco acusó efectos del agua o de N. El incremento en la biomasa de raíces observado con el transcurso de los muestreos en

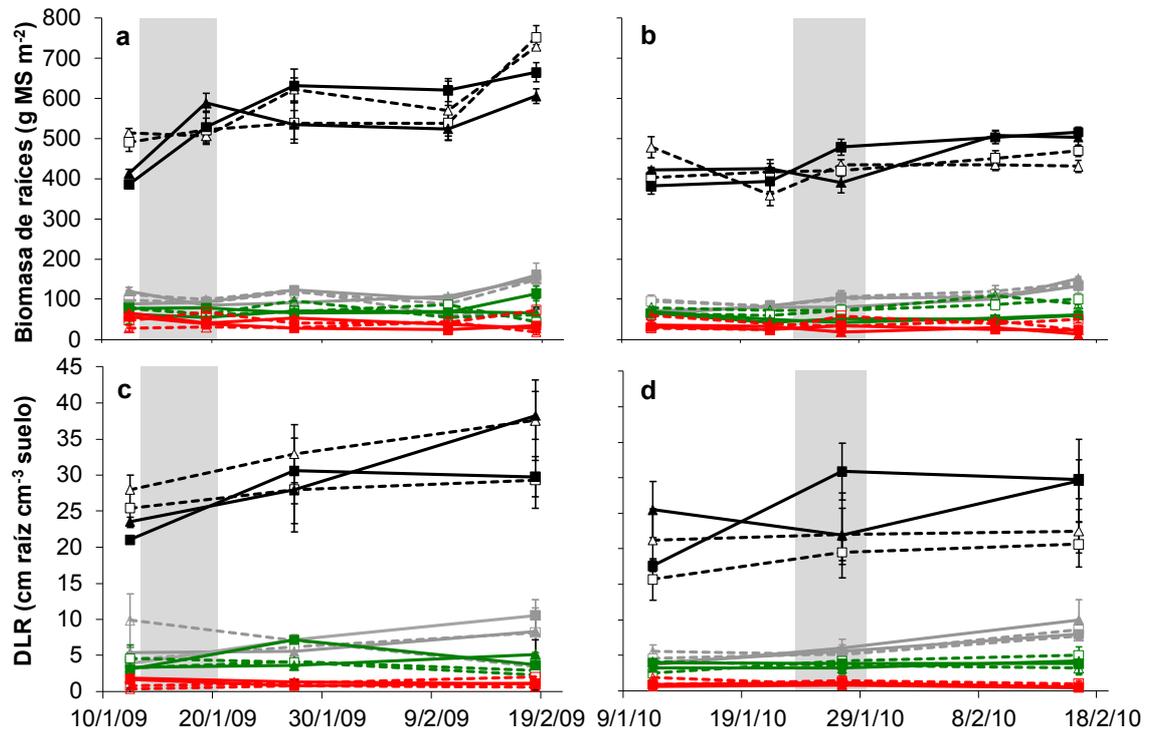


Fig. 25. Evolución a lo largo del tiempo de la biomasa de raíces y de la densidad del largo de raíces (DLR) en pasturas de festuca alta expuestas a dos niveles de disponibilidad de agua (símbolos vacíos y línea discontinua: secano; símbolos llenos y línea continua: riego) y de N (triángulos y cuadrados denotan niveles de 40 y 200 kg de N ha⁻¹, respectivamente) durante los Experimentos Verano 2009 (a, c) y 2010bis (b, d). Símbolos de color negro, gris, verde y rojo indican valores observados en las profundidades del suelo 0-0.2, 0.2-0.4, 0.4-0.6 y 0.6-1.0 m, respectivamente. Las áreas de color gris denotan los períodos secos en cada experimento. Las barras verticales indican ± 1 EE de la media (n= 3).

las capas superiores, sin embargo, si resultó significativo para el análisis de la distribución acumulada, con un β_B de valor progresivamente menor ($p= 0.004$) indicando una distribución de raíces paulatinamente más superficial con el progreso del experimento (Tabla 6). Aunque no significativamente ($p= 0.22$), el β_L también disminuyó durante 2009, desde un valor de 0.948 en el muestreo inicial hasta 0.935 en el último muestreo (datos no presentados).

Tabla 6. Coeficientes describiendo la distribución vertical acumulada de la biomasa de raíces de festuca alta en el perfil del suelo (β_B), calculados para cinco fechas de muestreo del Experimento Verano 2009.

Enero de 2009			Febrero de 2009	
Día 12	Día 19	Día 27	Día 10	Día 18
0.951 ¹ a ² (0.003) ³	0.943ab (0.002)	0.943ab (0.003)	0.940bc (0.003)	0.931c (0.007)

¹Media de cuatro tratamientos (dos niveles de disponibilidad de agua-dos niveles de disponibilidad de N).

²Valores que no comparten ninguna letra son estadísticamente diferentes con un α de 0.05.

³Error estándar.

Excepto en el horizonte superficial de 0 a 0.1 m en 2010, para el cual se observó un incremento significativo de 95 a 115 g⁻¹ entre el primer y el último muestreo, el LRE de festuca alta fue bastante estable durante los experimentos, con un promedio de 110 y 122 m g⁻¹ para todo el perfil en 2009 y 2010, respectivamente (datos no presentados). En 2009, sólo el LRE de la capa 0-0.2 m mostró algún efecto de los tratamientos

aplicados (112 vs 100 m g⁻¹ para los niveles N- y N+, respectivamente), mientras que en 2010 se registró una respuesta opuesta en la capa 0.4-0.6 m (109 [N-] vs 125 [N+] m g⁻¹). De este modo, la DLR de la pastura siguió una tendencia similar a lo largo de los experimentos a la mostrada por la biomasa de raíces (Fig.25), incrementándose significativamente ($p= 0.005$) en la capa 0-0.2 m en 2009. En 2010, el incremento en la DLR fue en cambio significativo tanto para la capa 0-0.2 m ($p= 0.022$) como para la capa 0.2-0.4 m ($p<0.001$), pero no se hallaron efectos significativos del agua y del N sobre la DLR.

Las raíces finas (diámetro < 0.2 mm) mostraron ser un componente mayoritario del sistema radical de festuca alta. La proporción del largo de raíces constituido por raíces finas disminuyó con la profundidad, variando desde un máximo de 0.73 en la capa superficial hasta un mínimo de 0.64 en la capa 0.6-1.0 (promedio de ambos experimentos, datos no presentados). En concordancia, el diámetro promedio de las raíces mostró la tendencia opuesta, incrementándose progresivamente con la profundidad desde 0.238 mm en 0-0.2 m hasta 0.259 mm en 0.6-1.0 m. Adicionalmente, los incrementos observados durante los experimentos en la biomasa de raíces y en la DLR se asociaron con incrementos en la proporción de raíces finas y reducciones en el diámetro promedio de raíces, señalando a la formación de raíces finas como una respuesta importante del sistema radical de festuca alta durante la estación cálida.

3.3.7. Intercepción de la radiación

En 2009, el nivel N+ mostró una pRI_{int} significativamente mayor ($p= 0.01$) que el nivel N- (Fig.26a). Con respecto al efecto del agua, el nivel A+ mostró una mayor pRI_{int} que el nivel A- ($p< 0.05$) durante el período seco (muestreos de los días 13 y 21 de enero), pero las diferencias ya no fueron significativas en los dos últimos muestreos. Como sucediera con el IAF, entre el 13 y el 21 de enero de 2009 la intercepción de radiación del nivel A- disminuyó, mientras que en el nivel A+ se mantuvo estable en un valor promedio de 0.73. La intercepción aumentó rápidamente luego de la rehumectación en ambos regímenes hídricos, pero de todas maneras el valor de 95% de intercepción se alcanzó ≈ 12 días más tarde en el nivel A-. En el Experimento Verano 2010bis, también fue evidente un efecto significativo ($p< 0.05$) de la disponibilidad de N sobre la pRI_{int} entre el segundo y el quinto muestreo, pero este efecto fue mucho más obvio en el nivel A- (Fig.26b). La intercepción de la radiación del tratamiento A-N- se vio afectada por el período seco, reduciéndose de 0.68 el día 20 de enero a 0.60 el día 26 de enero, y éste nunca llegó a interceptar el nivel crítico del 95%.

En 2009, los valores acumulados de RFA_{int} por cada tratamiento no mostraron interacción significativa agua·N ($p=0.54$), mientras que el efecto del N fue significativo ($p<0.01$) y el del agua estuvo al borde de serlo ($p=0.07$) (Fig.26). En 2010, en cambio, si fue significativa la interacción agua·N ($p=0.01$); en este caso, el efecto del N sólo fue significativo ($p<0.05$) en condiciones A–.

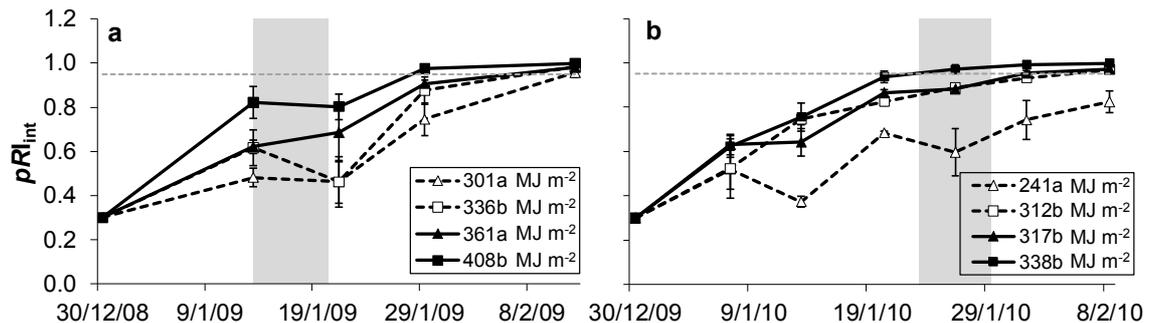


Fig.26. Evolución a lo largo del tiempo de la proporción de la radiación incidente interceptada (pRI_{int}) en pasturas de festuca alta expuestas a dos niveles de disponibilidad de agua (símbolos vacíos y línea discontinua: secano; símbolos llenos y línea continua: riego) y de N (triángulos y cuadrados denotan niveles de 40 y 200 kg de N ha^{-1} , respectivamente) durante los Experimentos Verano 2009 (a) y 2010bis (b). La línea punteada color gris indica el umbral de interceptación crítico del 95%, y las áreas de color gris los períodos secos en cada experimento. Las barras verticales indican ± 1 EE de la media ($n=3$). En las leyendas de la figura se presentan los valores acumulados (en $MJ m^{-2}$) de radiación fotosintéticamente activa interceptada por cada tratamiento durante los experimentos; las letras que acompañan a los valores comparan tratamientos con un α de 0.05.

3.3.8. Eficiencia de uso de la radiación interceptada

La EUR fue hasta un 58% mayor cuando las variaciones en biomasa de raíces fueron tenidas en cuenta (Fig.27 y Tabla 7). Tanto la disponibilidad de agua como de N tuvieron efecto positivo sobre la EUR_{BA} , con algunas diferencias entre experimentos. El incremento en el nivel de N en el verano de 2009 generó incrementos en la EUR_T de 48% y 81% en los niveles A– y A+, respectivamente (el estrés hídrico redujo el estado de nutrición nitrogenada de A–N+, lo que explicaría la menor respuesta al N en el nivel A–); mientras que en 2010 los incrementos correspondientes observados fueron de 53% y 45% en A– y A+, respectivamente. Por el contrario, el efecto positivo sobre la EUR_T de una mejor condición hídrica fue mayor en 2010 —+69% y +60% para los niveles N– y N+, respectivamente— que en 2009 —con valores correspondientes de +24% y +51% para N– y N+, respectivamente—. De manera semejante, fueron evidentes los efectos positivos de la mayor disponibilidad de agua y de N sobre la EUR_{BA} , pero, independientemente del tratamiento, los valores de EUR_{BA} fueron en todos los casos

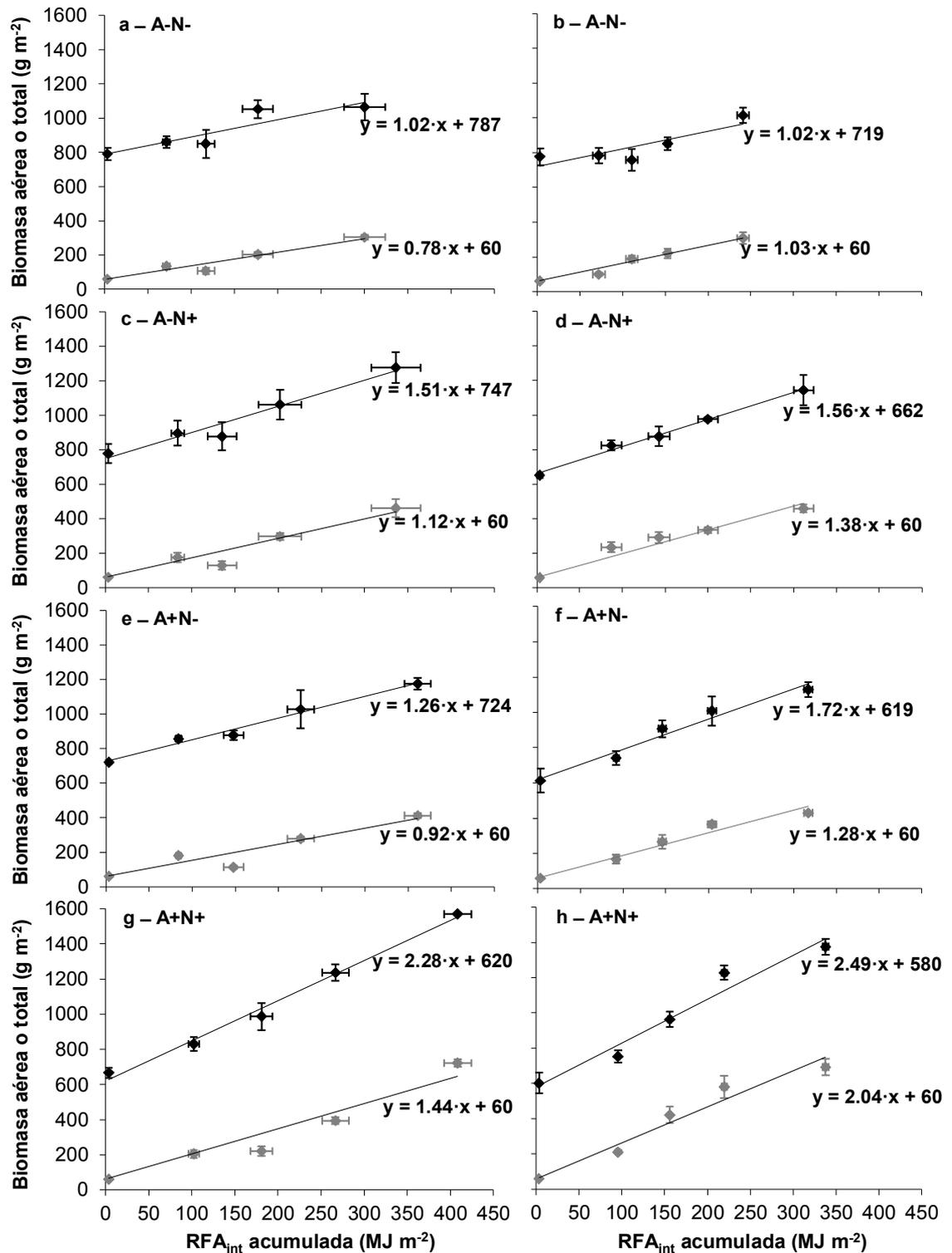


Fig.27. Regresiones lineales entre la radiación fotosintéticamente activa interceptada (RFA_{int}) acumulada y la biomasa aérea (símbolos grises) o total (aérea más la correspondiente a raíces, símbolos negros) en pasturas de festuca alta expuestas a dos niveles de disponibilidad de agua (A-: secano; A+: riego) y de N (N-: 40 kg de N ha⁻¹; N+: 200 kg de N ha⁻¹) durante los Experimentos Verano 2009 (a, c, e y g) y 2010bis (b, d, f y h). Las barras indican ± 1 EE de la media (n=3).

mayores en 2010 que en 2009 debido a una partición aparentemente mayor del crecimiento hacia la parte aérea (razón EUR_{BA}/EUR_T, Tabla 7).

Tabla 7. Eficiencias de uso de la radiación fotosintéticamente activa para la producción de biomasa seca aérea (EUR_{BA}) y total (aérea más la correspondiente a raíces, EUR_T) calculadas en pasturas de festuca alta expuestas a dos niveles de disponibilidad de agua (A–: seco; A+: riego) y de N (N–: 40 kg N ha⁻¹; N+: 200 kg de N ha⁻¹) durante los experimentos conducidos en los veranos de 2009 y de 2010.

Régimen hídrico	Nivel de N	EUR_{BA} (EE ¹)		EUR_T (EE)		Razón EUR_{BA}/EUR_T
		g MS MJ ⁻¹	R ²	g MS MJ ⁻¹	R ²	
<i>Verano 2009</i>						
A–	N–	0.78a ¹ (0.06) ²	0.99 ^{***3}	1.02a (0.27)	0.82 ^{**}	0.76
	N+	1.12ab (0.11)	0.98 ^{***}	1.51a (0.19)	0.95 ^{**}	0.74
A+	N–	0.92a (0.10)	0.97 ^{***}	1.26a (0.10)	0.98 ^{***}	0.73
	N+	1.44b (0.13)	0.98 ^{***}	2.28b (0.12)	0.99 ^{***}	0.63
<i>Verano 2010bis</i>						
A–	N–	1.03a (0.06)	0.99 ^{***}	1.02a (0.35)	0.74 ^{**}	1.00
	N+	1.38a (0.06)	0.99 ^{***}	1.56a (0.07)	0.99 ^{***}	0.88
A+	N–	1.28a (0.05)	0.99 ^{***}	1.72a (0.12)	0.97 ^{***}	0.74
	N+	2.04b (0.12)	0.95 ^{***}	2.49b (0.30)	0.96 ^{**}	0.82

¹Letras comparan tratamientos dentro de cada experimento con un α de 0.05.

²Error estándar de la pendiente de la regresión entre la radiación fotosintéticamente activa interceptada acumulada y la biomasa seca aérea o total (aérea más la correspondiente a raíces) acumulada (Fig.27).

^{3**} y ^{***} indican regresiones significativas con α de 0.01 y de 0.001, respectivamente.

3.3.9. Contenido de N mineral y flujos de N en el suelo, demanda de N e Índice de Nutrición Nitrogenada de la pastura

La disponibilidad de N mineral en el perfil de suelo mostró una distribución vertical proporcionalmente más superficial en 2009 que en 2010 (Fig.28). En ambos experimentos, el N mineral igualmente exhibió una clara disminución de su presencia con la profundidad. La evolución del contenido de N edáfico a lo largo del tiempo durante 2009 fue singular. En principio, los tratamientos del nivel N– mostraron una dinámica muy similar entre sí, con contenidos de N acumulados en todo el perfil que promediaron los 50 kg N ha⁻¹ durante el experimento, mientras que el nivel N+ promedió un nivel entre 70 a 100% superior (102 vs 86 kg N ha⁻¹ para A–N+ y A+N+, respectivamente). Sin embargo, todos los tratamientos, pero especialmente los del nivel N+, exhibieron sus valores máximos promediando el experimento, una vez superado el período seco. Este comportamiento no volvió a repetirse en 2010; si bien el tratamiento A–N+ volvió a mostrar su contenido máximo de N mineral a mediados del experimento —durante el período seco—, este cambio fue de una magnitud muy inferior a la observada en 2009. Esto sugiere un proceso de mineralización de N mucho más activo en 2009, ya sea del N nativo o del N del fertilizante que hubiera sido inmovilizado por la biomasa microbiana durante la etapa inicial del experimento. Se carece de la información necesaria para ser más concluyente al respecto. Al final del período seco de 2009, en el nivel N+ se observó un contenido de N en el suelo notoriamente mayor bajo condiciones de seco que bajo irrigación (+44 kg N ha⁻¹), pero en todo caso esta diferencia podría ser explicada casi

en su totalidad por diferentes tasas de absorción de N de la pastura durante el período previo, a juzgar por las estimaciones de N acumulado en la biomasa total (aérea + la de raíces) que se presentan en la Fig.29 (100 vs 139 kg N ha⁻¹ para el día 21/1/09).

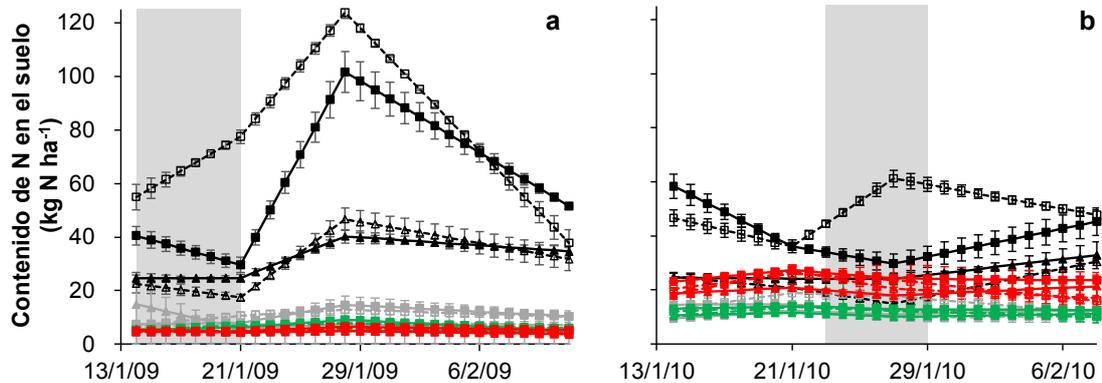


Fig.28. Evolución a lo largo del tiempo del contenido de N mineral del suelo en forma de nitrato más amonio en pasturas de festuca alta expuestas a dos niveles de disponibilidad de agua (símbolos vacíos y línea discontinua: secano; símbolos llenos y línea continua: riego) y de N (triángulos y cuadrados denotan niveles de 40 y 200 kg de N ha⁻¹, respectivamente) durante los Experimentos Verano 2009 (a) y 2010bis (b). Símbolos de color negro, gris, verde y rojo indican valores observados en las profundidades del suelo 0-0.2, 0.2-0.4, 0.4-0.6 y 0.6-1.0 m, respectivamente. Las áreas de color gris denotan los períodos secos en cada experimento. Las barras verticales indican ± 1 EE de la media (n= 3).

En 2010, no se observaron contenidos tan altos de N mineral en el horizonte superficial, pero los valores de N acumulado en todo el perfil no difirieron en demasía de los registrados en 2009, con el nivel N- promediando de 65 a 68 kg N ha⁻¹ y el nivel N+ entre 86 y 102 kg N ha⁻¹ durante el experimento. Durante el período seco, en el nivel N+ nuevamente se halló un mayor contenido de N bajo condiciones de secano (el 26/1/10, +31 kg N ha⁻¹), pero como sucediera en 2009 esto se correspondió con diferencias en la acumulación de N de la pastura (-20 kg N ha⁻¹, Fig.29b).

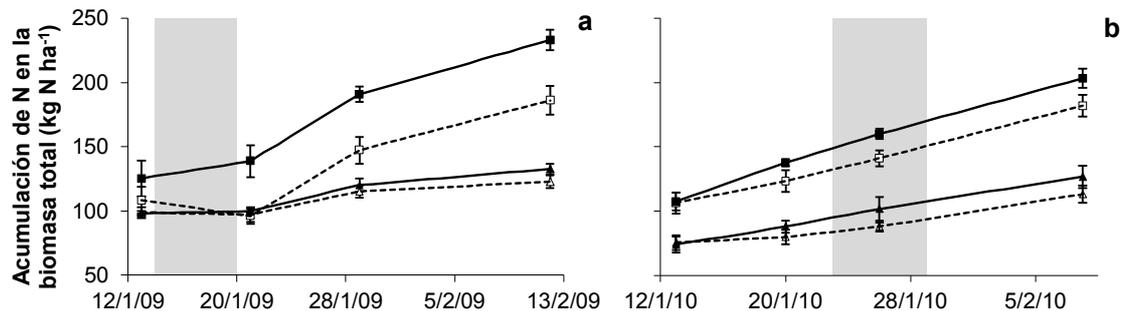


Fig.29. Evolución a lo largo del tiempo de la acumulación de N en la biomasa total (aérea + raíces) en pasturas de festuca alta expuestas a dos niveles de disponibilidad de agua (símbolos vacíos y línea discontinua: secano; símbolos llenos y línea continua: riego) y de N (triángulos y cuadrados denotan niveles de 40 y 200 kg de N ha⁻¹, respectivamente) durante los Experimentos Verano 2009 (a) y 2010bis (b). Las áreas de color gris denotan los períodos secos en cada experimento. Las barras verticales indican ± 1 EE de la media (n= 3).

En el verano de 2009, el INN de los tratamientos N- se mantuvo mayormente constante durante el experimento en un nivel de ≈ 0.51 (Fig.30a), sin registrarse efectos del nivel de disponibilidad de agua ($p > 0.66$). Por el contrario, la disponibilidad de agua

afectó significativamente el estado de nutrición nitrogenada de los tratamientos N+. El INN de A–N+ disminuyó sensiblemente durante la intensa sequía de 2009, resultando en una interacción agua·N significativa ($p= 0.042$). El INN de A–N+ fue significativamente inferior al de A+N+ el 21 y el 29 de enero ($p< 0.04$). De este modo, en el nivel N+ una sequía intensa generó una reducción significativa del INN_{mpt} del 16% (Tabla 8).

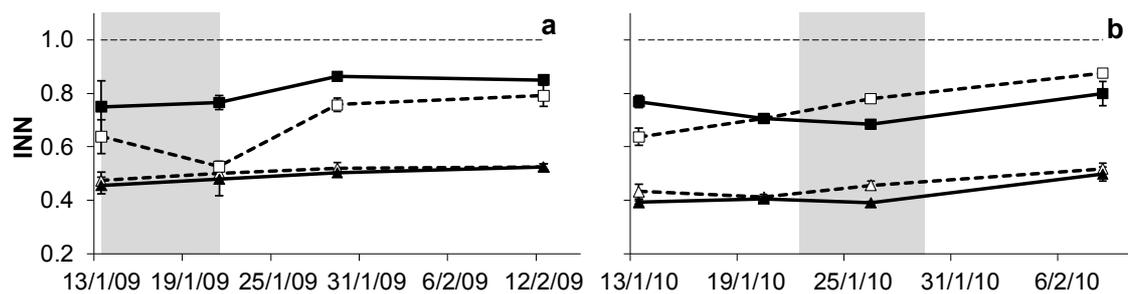


Fig.30. Evolución a lo largo del tiempo del Índice de Nutrición Nitrogenada (INN) en pasturas de festuca alta expuestas a dos niveles de disponibilidad de agua (símbolos vacíos y línea discontinua: seco; símbolos llenos y línea continua: riego) y de N (triángulos y cuadrados denotan niveles de 40 y 200 kg de N ha⁻¹, respectivamente) durante los Experimentos Verano 2009 (a) y 2010bis (b). Las áreas de color gris denotan los períodos secos en cada experimento. Las barras verticales indican ± 1 EE de la media ($n= 3$).

Un efecto significativo de la disponibilidad de N sobre el INN fue también registrado en el verano de 2010 pero, en contraste con 2009, no hubo un efecto sustancial del régimen hídrico, ni siquiera en el nivel N+ (Fig.30b). El INN de ambos tratamientos A– mostró una tendencia creciente durante el experimento, mientras que el nivel A+ exhibió una disminución transitoria durante la primera parte de este, que luego se revirtió a partir del 26 de enero. A diferencia de lo observado en 2009, en 2010 la disponibilidad de agua no afectó el INN_{mpt} (Tabla 8).

Tabla 8. Índice de Nutrición Nitrogenada medio ponderado durante el período experimental (INN_{mpt}) observado en pasturas de festuca alta expuestas a dos niveles de disponibilidad de agua (A–: seco; A+: riego) y de N (N–: 40 kg N ha⁻¹; N+: 200 kg de N ha⁻¹) durante los veranos de 2009 y de 2010.

		INN_{mpt}	
		Verano 2009	Verano 2010bis
A–	N–	0.51a ¹ (0.03) ²	0.46a (0.01)
	N+	0.69b (0.01)	0.77b (0.01)
A+	N–	0.50a (0.03)	0.42a (0.01)
	N+	0.82c (0.01)	0.73b (0.02)
Significancia de la interacción agua·N (valor p)		0.03	0.86

¹Letras comparan tratamientos dentro de cada experimento con un α de 0.05.

²Error estándar.

La tasa de crecimiento de la pastura, más que su valor instantáneo de BA, fue la variable con mayor peso relativo sobre la demanda de N (Figs.31a y 31b). En el verano de 2009, se estimaron demandas de N mínimas durante el período seco cuando resultó afectada la acumulación de BA de la pastura. En tres de los cuatro tratamientos, la de-

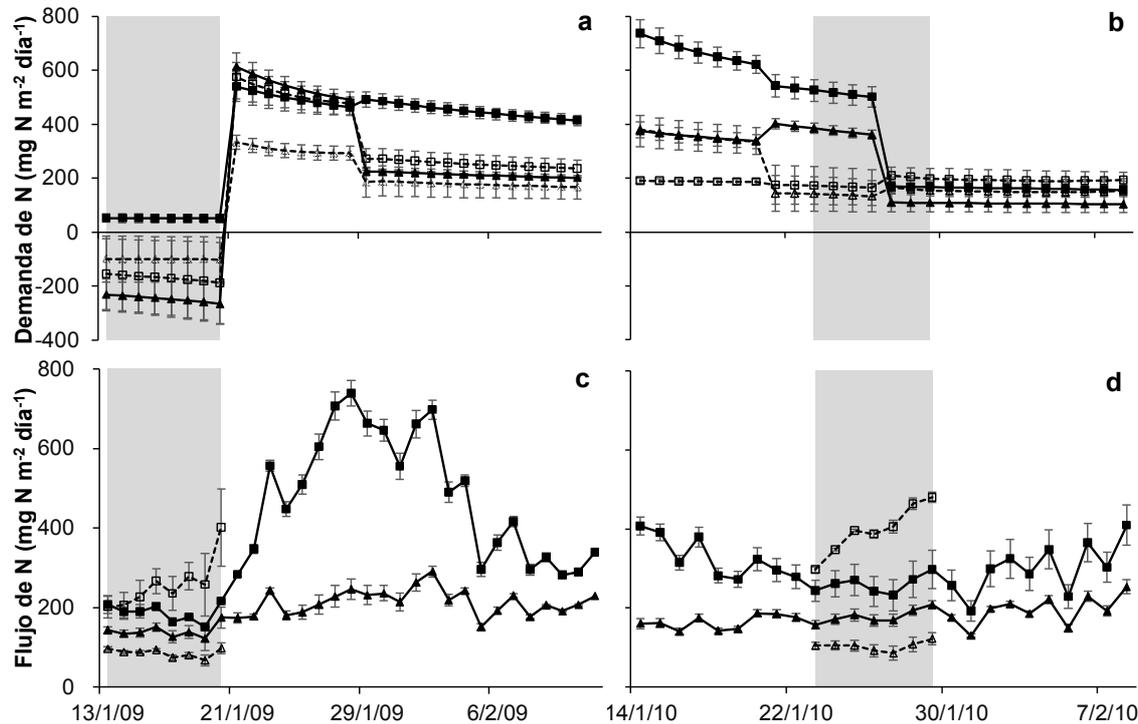


Fig.31. Evolución a lo largo del tiempo de la demanda de N de la pastura y del flujo total de N del suelo en pasturas de festuca alta expuestas a dos niveles de disponibilidad de agua (símbolos vacíos y línea discontinua: secano; símbolos llenos y línea continua: riego) y de N (triángulos y cuadrados denotan niveles de 40 y 200 kg de N ha⁻¹, respectivamente) durante los Experimentos Verano 2009 (a, c) y 2010bis (b, d). Las áreas de color gris denotan los períodos secos de cada experimento. Las barras verticales indican ± 1 EE de la media ($n= 3$).

manda de N habría sido nula ya que su cálculo arrojó valores negativos, debido a que éstos mostraron senescencia apreciable y por ende una tasa de crecimiento negativa durante el déficit hídrico extremo de 2009. Una vez superado el período seco, la demanda de N se recuperó rápidamente cuando se restableció el crecimiento. En 2010, los valores mínimos de demanda de N para ambos tratamientos del nivel A- fueron de nuevo registrados durante el período seco; sin embargo, un estrés hídrico con carácter de moderado que no tuvo un impacto tan severo sobre la tasa de crecimiento no resultó en demandas de N tan reducidas como en 2009. En 2010 sí fue más claro el efecto del régimen hídrico, con los tratamientos A+ mostrando una demanda de N entre 77 y 99% mayor que los del nivel A- durante el período seco.

Con respecto a los flujo totales de N del suelo (convección + difusión), durante los períodos húmedos de los experimentos se registraron lluvias que, si bien esporádicas, fueron de una magnitud suficiente (>20 mm) como para generar incertidumbre respecto al nivel de profundización efectiva de esta humedad en el perfil del suelo en los tratamientos del nivel A- y por ende en cómo asignar el agua de lluvia al flujo transpiratorio de las distintas capas del perfil, de este modo imposibilitando el cálculo del FC_{N_i} para los tratamientos en secano. Tuvieron incluso lugar algunas lluvias durante

el período seco de 2010, pero al ser éstas de escaso volumen (<6 mm), pudieron ser asignadas a la transpiración del horizonte superficial. Por lo tanto, para el nivel A– sólo se presentan los FT_{N_i} calculados durante los períodos secos de ambos experimentos (Figs.31c y 31d). El nivel de fertilización nitrogenada aplicado tuvo un claro efecto sobre los flujos de N del suelo, efecto que fue aún más evidente en 2009 y que estuvo asociado al incremento en el contenido de N mineral en el horizonte superficial observado en el nivel N+ promediando el experimento (Fig.28a). Comparando los flujos de N observados durante los períodos secos, el N ofertado por el suelo mediante convección fue en general más importante que el aportado por el mecanismo de difusión, y esto fue más notorio en 2009 (64% del FT_{N_i} aportado por convección) debido a una T levemente mayor y a valores de θ_v que en general fueron algo inferiores en dicho experimento, condición que es menos conducente para el desarrollo del proceso de difusión (datos no presentados). ¿Tuvo el régimen hídrico un impacto decididamente negativo sobre la oferta de N del suelo? Esta respuesta pareció diferir en función del nivel de N aplicado (Tabla 9). La sequía tuvo un efecto negativo sobre la oferta de N del nivel N–: en ambos experimentos los flujos de N de A–N– fueron menores que los de su contraparte irrigado, aunque en 2009 esta diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa ($p= 0.09$). Sin embargo, lo anterior no desencadenó empeoramientos en el INN de la pastura; véase 2010 por ejemplo, donde la demanda de N de la pastura también se vio reducida en una proporción similar, resultando por ende en una razón oferta/demanda de N invariable durante el período seco e incluso en una muy leve mejora del INN en el muestreo del 26/1/10. Con el agregado de un nivel de N más elevado, en cambio, no se observó un efecto perjudicial del estrés hídrico sobre la oferta de N del suelo sino más bien lo contrario: para el nivel N+, los flujos de N fueron significativamente mayores —entre 39 y 53% superiores— en condiciones de secano. Esta menor oferta de N en condiciones irrigadas estuvo mayormente explicada por el menor contenido de N mineral del suelo en estas condiciones (Fig.28).

La Fig.31c muestra además que la oferta de N del suelo fue significativa durante el severo estrés hídrico de 2009. En todos los casos, ésta tuvo valores muy superiores a la demanda de N de la pastura, indicando que una disminución en la disponibilidad relativa de N para la pastura —esto es, una razón oferta/demanda de N menor— no habría sido la causa de la reducción en el estado de nutrición nitrogenada que manifestó el tratamiento A–N+ durante el período seco de 2009 (Fig.30a).

Tabla 9. Valores medios diarios del flujo total de N del suelo (FT_{N_i}) y de la demanda de N de la pastura (D_{N_i}), ambos en $mg\ N\ m^{-2}\ día^{-1}$, estimados durante los períodos secos en pasturas de festuca alta expuestas a dos niveles de disponibilidad de agua (A-: secano; A+: riego) y de N (N-: $40\ kg\ N\ ha^{-1}$; N+: $200\ kg\ de\ N\ ha^{-1}$) durante los veranos de 2009 y de 2010.

		Verano 2009	Verano 2010bis
		FT_{N_i}	
A-	N-	86a ¹ (4) ²	103a (14)
	N+	259c (39)	397d (7)
A+	N-	141ab (13)	179b (13)
	N+	187b (13)	260c (39)
Significancia de la interacción agua·N (valor p)		0.03	<0.01
		D_{N_i}	
A-	N-	ns ³	147a (41)
	N+	ns	183 ^a (37)
A+	N-	ns	259b (81)
	N+	51 (15)	364b (12)
Significancia de la interacción agua·N (valor p)		-	0.58

¹Letras comparan tratamientos dentro de cada experimento con un α de 0.05.

²Error estándar.

³ D_{N_i} no significativa debido a una tasa de crecimiento neta que resultó negativa.

3.4. Discusión

3.4.1. Un sistema radical de desarrollo predominantemente superficial definió el estado hídrico de las pasturas de festuca alta

Festuca alta es una especie conocida por su habilidad para aprovechar el agua disponible en horizontes profundos del perfil del suelo (Durand *et al.*, 1997, 2007; Lelièvre *et al.*, 2011). En las pasturas de la Pampa Deprimida, a menudo es la especie que muestra el mejor estado hídrico durante las condiciones secas propias del verano que son comunes en la región (Colabelli *et al.*, 2004). Las pasturas de festuca alta tenían sistemas radicales bien desarrollados; los valores de biomasa y largo de raíces observados en estos experimentos fueron en promedio 25 a 30% superiores a los reportados por Durand *et al.* (2010) para una pastura de segundo año en el oeste de Francia. Pero en el ambiente local, festuca alta ubicó cerca de tres cuartas partes de su biomasa total de raíces en los 0.2 m superficiales del perfil del suelo, y la distribución del largo de raíces fue similar. La distribución de raíces en el perfil del suelo fue entonces relativamente superficial; de hecho, fue más superficial que la observada por Durand *et al.* (2010), diferencia que bien puede estar relacionada con las propiedades físicas del subsuelo en el ambiente local. El perfil cuenta con un horizonte b textural denso y fuertemente estructurado con 21 a 30% de sodio intercambiable (horizonte nátrico) de 0.4 m de espesor ubicado a una profundidad de 0.25 m. El horizonte nátrico característico del Grupo Solonetz constituye precisamente la principal limitante a la

utilización productiva de éstos, con dicho horizonte de permeabilidad escasa a nula limitando no sólo el eventual ascenso de la napa freática subyacente sino también obstruyendo el desarrollo profundo de los sistemas radicales (Lavado y Taboada, 1988; Driessen *et al.*, 2001; Imbellone *et al.*, 2021). La exploración de raíces en la parte superior del horizonte B2t (o sea, en la capa de 0.2 a 0.4 m de profundidad) disminuyó marcadamente con respecto a la observada en la capa de suelo suprayacente, en concordancia con trabajos previos reportando una exploración radical reducida en horizontes subsuperficiales nátricos, duros y densos, particularmente bajo condiciones de disponibilidad de agua subóptimas (Yang *et al.*, 2003). No obstante, en ambos experimentos de verano se observó un crecimiento significativo de raíces no sólo en el horizonte superficial sino también en la capa 0.2-0.4 m; el crecimiento de raíces en mayores profundidades fue, por el contrario, nulo o exiguo. De todos modos, el rango de valores que se observó para el coeficiente β entregado por el modelo de Gale y Grigal coincide de plano con el valor de β_B de 0.943 reportado para pasturas templadas establecidas por Jackson *et al.* (1996).

Una distribución de raíces tan superficial, entonces, le impidió a festuca alta acceder al agua disponible en los horizontes profundos del suelo. Por esta razón, festuca alta enfrentó episodios de estrés hídrico de intensidad variable cada vez que la capa superficial del suelo se secó, aun cuando había gran cantidad de agua disponible en profundidad. Por ejemplo, cuando el estado hídrico de los tratamientos A- registró su valor mínimo (-1.95 a -2.27 MPa, el 20 de enero de 2009), la θ_v por debajo de 0.6 m de profundidad era $\geq 36\%$, esto es, superior al nivel de capacidad de campo. Un fenómeno similar fue observado por Gonzalez-Dugo *et al.* (2005) en pasturas de festuca alta de primer año en el centro-oeste de Francia.

Un valor teórico de 5 cm cm^{-3} suelo fue propuesto por van Noordwijk (1983) como la DLR mínima necesaria para que los cultivos puedan absorber agua a una tasa adecuada cuando crecen bajo demandas evaporativas altas. Bajo una demanda atmosférica moderada, sin embargo, un valor de DLR de 1 cm cm^{-3} suelo le suele permitir a trigo y a cebada extraer 90% del agua disponible (Barracough *et al.*, 1989; Gregory y Brown, 1989; Bonachela, 1996; King *et al.*, 2003). En el ambiente estudiado, la DLR por debajo de los 0.6 m de profundidad fue sólo de 0.5 a 2 cm cm^{-3} , un rango similar al de $0.5\text{-}1 \text{ cm cm}^{-3}$ observado en el estudio de Gonzalez-Dugo *et al.* (2005) en horizontes profundos, húmedos. En ambos trabajos, la demanda atmosférica fue elevada, con valores medios de ET_0 superiores a 5.5 mm día^{-1} . De esta manera, una baja DLR desarrollada en

profundidad habría sido la razón principal por la cual festuca alta enfrentó estrés hídrico aun cuando había disponibilidad de agua en el subsuelo. La evolución de la θ_v durante los experimentos además sugiere que no hubo un uso sustancial del agua disponible en profundidad (Fig.17).

Una baja disponibilidad de oxígeno en las capas profundas del suelo podría haber constituido un factor limitante para algunas especies dado que la porosidad llena de aire —esto es, la diferencia entre la porosidad total y la θ_v — en la capa de suelo de 0.6 a 1.0 m de profundidad fue menor a 8% en los momentos de estrés hídrico máximo, y este valor es cercano al valor umbral crítico en el cual ocurriría hipoxia propuesto por Bartholomeus *et al.* (2008). Festuca alta, sin embargo, es una especie altamente tolerante a condiciones de anegamiento (Ploschuk *et al.*, 2017) y es capaz de desarrollar un gran aerénquima (Liu *et al.*, 2017), por lo tanto, parece improbable que la hipoxia haya tenido que ver con el bajo uso del agua disponible en el subsuelo. Por otro lado, los mecanismos de control anticipativo ("*feedforward*") mediante los cuales las raíces que crecen en capas de suelo endurecidas envían señales inhibitorias a la parte aérea podrían constituir una explicación plausible. Dichas señales inhibitorias suelen ser de naturaleza hormonal y pueden afectar la conductancia estomática y la morfogénesis foliar (Passioura, 2002). Ha sido propuesto, sin embargo, que las raíces profundas tendrían un rol crucial en la supervivencia de las especies durante períodos extremadamente secos, pero no tendrían un papel tan gravitante en el sostenimiento de una alta tasa de transpiración (Pierret *et al.*, 2016). De hecho, festuca alta ha demostrado sufrir una mayor mortalidad debido a estrés hídrico sólo con niveles de déficits de lluvia durante la estación cálida superiores a los 450 mm (Poirier *et al.*, 2012). Aun cuando déficits hídricos de tal magnitud son extremadamente raros en la Pampa Deprimida, la profundidad de enraizamiento probablemente sea uno de los principales atributos explicando la presencia predominante de festuca alta en este ambiente (Colabelli *et al.*, 2004).

La TEF muy probablemente sea el parámetro de crecimiento evaluado en este estudio con la mayor sensibilidad al estrés (Durand *et al.*, 1995), dado que usualmente es afectada mucho antes que otros procesos como por ejemplo la fotosíntesis (Boyer, 1970). Debido a la alta tasa de muestreo implementada, las mediciones de TEF realizadas en este estudio tienen una alta resolución temporal que las ubica en una posición ideal para exponer los efectos de corto plazo de la disponibilidad de agua en el suelo sobre el crecimiento de la pastura. De este modo, el análisis de la TEF aportaría

indicios sobre la profundidad del perfil desde la que la pastura abastece sus necesidades de agua. En primer lugar, se evaluó al Ψ_h como variable regresora en la predicción de la TEF, dado que el Ψ_h es considerado como un indicador adecuado de la disponibilidad de agua en el suelo (Prior *et al.*, 1997). La relativización tanto de la TEF como del Ψ_h en función de sus valores máximos observados —y el hecho de que el INN nunca superó el valor de 1.0 en los experimentos— permitió testear el modelo $TEF_{Rel} = INN \cdot \Psi_{hRel}$. La suposición de que los factores de estrés tienen efectos multiplicativos en lugar de aditivos es la preferida en el campo de la biología (Sih *et al.*, 1998; Stephens *et al.*, 2013). En el caso de la TEF, esto implica que el agua y el N afectarían los mismos mecanismos de crecimiento que definen la TEF, y por consiguiente el efecto positivo de la disponibilidad de agua sobre la elongación foliar se vería restringido cada vez que el N esté limitando el crecimiento, y viceversa. Dado que el N afecta mayormente a la división celular y tiene un efecto menor sobre la elongación celular (MacAdam *et al.*, 1989), mientras que el estado hídrico afecta tanto la división como la elongación (Durand *et al.*, 1995; Tardieu *et al.*, 2000), tal suposición se supone correcta. La disponibilidad de agua del suelo representada por su indicador Ψ_{hRel} y el estado de nutrición nitrogenada de la pastura tuvieron un gran efecto sobre la TEF, como era esperable (Gastal *et al.*, 1992; Durand *et al.*, 1995; Colabelli *et al.*, 2004). El modelo $TEF_{Rel} = INN \cdot \Psi_{hRel}$ fue estadísticamente significativo (Regresión#1, Tabla 10), siendo largamente superior al modelo aditivo (datos no presentados). El porcentaje de explicación del modelo, sin embargo, fue de sólo 38%; el modelo no fue lo suficientemente complejo como para describir adecuadamente algunos comportamientos de los datos, como por ejemplo el gran incremento en la TEF del nivel A— una vez finalizados los períodos secos (Fig.22). De hecho, la inclusión de la interacción $INN \cdot \Psi_{hRel}$ (Regresión#2, Tabla 10) resultó en una gran mejora en la explicación lograda por el modelo (R^2 0.59). Luego, y dado que la demanda evaporativa ha demostrado afectar significativamente la TEF independientemente de la disponibilidad de agua del suelo en otras especies (Ben Haj Salah y Tardieu, 1997; Tardieu *et al.*, 2000), se testeó si la adición del DPV y la T_a como variables regresoras mejoraba la predicción de la TEF. El modelo incluyendo DPV y T_a tuvo un desempeño aún mejor (R^2 0.64, Regresión#3, Tabla 10), sugiriendo que la demanda evaporativa también tiene un efecto significativo sobre el desarrollo del área foliar de festuca alta durante la estación cálida. Finalmente, el Ψ_{hRel} fue reemplazado por valores reales de disponibilidad de agua en diferentes profundidades del perfil de suelo —los 0.2, 0.4 o 0.6 m superficiales— en las Regresiones#4-6. La disponibilidad relativa de agua en

cualquiera de estas profundidades se desempeñó mejor que el Ψ_{hRel} como predictor de la TEF, sugiriendo que la Ψ_h no sería un indicador tan confiable de la disponibilidad de agua en el suelo en situaciones de noches cortas y altas demandas evaporativas, como ha sido reportado previamente (Sellin, 1999; Donovan *et al.*, 2001). Sin embargo, el porcentaje de explicación del modelo de regresión disminuyó gradualmente cuando el contenido de agua incluido como predictor fue aquel observado a profundidades crecientes del perfil, lo que sugiere que festuca alta dependió principalmente del nivel de agua disponible en los 0.2 m superficiales del perfil de suelo.

Tabla 10. Relaciones lineales múltiples entre la tasa de elongación foliar, el estado de nutrición nitrogenada y algunas variables ambientales.

Modelo de Regresión	R ² (valor p)
Regresión#1 $TEF_{Rel}^1 = INN \cdot \Psi_{hRel}^2$	0.38 (<0.001)
Regresión#2 $TEF_{Rel} = 0.05 + 0.28 \cdot INN + 0.51 \cdot INN \cdot \Psi_{hRel}$	0.59 (<0.001)
Regresión#3 $TEF_{Rel} = 0.04 + 11.51 \cdot INN - 13.30 \cdot INN \cdot \Psi_{hRel} - 0.53 \cdot INN \cdot T_a^3 - 10.53 \cdot INN \cdot DPV^4 + 0.66 \cdot INN \cdot \Psi_{hRel} \cdot T_a + 13.88 \cdot INN \cdot \Psi_{hRel} \cdot DPV + 0.50 \cdot INN \cdot T_a \cdot DPV - 0.67 \cdot INN \cdot \Psi_{hRel} \cdot T_a \cdot DPV$	0.64 (<0.001)
Regresión#4 $TEF_{Rel} = 0.09 + 10.00 \cdot INN - 7.95 \cdot INN \cdot DRA_{20}^5 - 0.45 \cdot INN \cdot T_a - 7.40 \cdot INN \cdot DPV - 0.02 \cdot T_a \cdot DPV + 0.39 \cdot INN \cdot DRA_{20} \cdot T_a + 6.00 \cdot INN \cdot DRA_{20} \cdot DPV + 0.37 \cdot INN \cdot T_a \cdot DPV + 0.02 \cdot DRA_{20} \cdot T_a \cdot DPV - 0.32 \cdot INN \cdot DRA_{20} \cdot T_a \cdot DPV$	0.72 (<0.001)
Regresión#5 $TEF_{Rel} = -0.72 + 12.91 \cdot INN + 0.84 \cdot DRA_{40}^5 - 11.04 \cdot INN \cdot DRA_{40} - 0.52 \cdot INN \cdot T_a - 8.89 \cdot INN \cdot DPV + 0.46 \cdot INN \cdot DRA_{40} \cdot T_a + 7.67 \cdot INN \cdot DRA_{40} \cdot DPV + 0.39 \cdot INN \cdot T_a \cdot DPV - 0.34 \cdot INN \cdot DRA_{40} \cdot T_a \cdot DPV$	0.69 (<0.001)
Regresión#6 $TEF_{Rel} = -0.93 + 14.83 \cdot INN + 1.07 \cdot DRA_{60}^5 - 12.96 \cdot INN \cdot DRA_{60} - 0.59 \cdot INN \cdot T_a - 10.16 \cdot INN \cdot DPV + 0.53 \cdot INN \cdot DRA_{60} \cdot T_a + 8.91 \cdot INN \cdot DRA_{60} \cdot DPV + 0.44 \cdot INN \cdot T_a \cdot DPV - 0.39 \cdot INN \cdot DRA_{60} \cdot T_a \cdot DPV$	0.68 (<0.001)

¹ TEF_{Rel} = tasa de elongación foliar relativa diaria = TEF ($mm \text{ día}^{-1} \text{ macollo}^{-1}$) / TEF_{Pot} ($mm \text{ día}^{-1} \text{ macollo}^{-1}$), donde TEF_{Pot} es la TEF potencial predicha de acuerdo a la temperatura media diaria del aire por el modelo de Yan y Hunt (1999) de respuesta de las plantas a las temperaturas cardinales, ajustado sobre datos de TEF vs temperatura del aire reportados para festuca alta por Robson (1972) y Gastal *et al.* (1992). Los parámetros del modelo resultaron 29.76 $mm \text{ día}^{-1}$ (TEF máxima), 24.60 °C (temperatura óptima del aire) y 34.17 °C (temperatura máxima del aire).

² Ψ_{hRel} = potencial agua foliar prealba relativo = $1/(\Psi_h / \Psi_{hMax})$, donde Ψ_{hMax} es el máximo Ψ_h registrado en cualquier fecha de muestreo de ambos experimentos ($\Psi_{hMax} = -0.098 \text{ MPa}$).

³ T_a = temperatura media diaria del aire (°C).

⁴DPV = déficit de presión de vapor diario (kPa).

⁵DRA₂₀, DRA₄₀ and DRA₆₀ = disponibilidad relativa diaria de agua en los 0.2, 0.4 y 0.6 m más superficiales del perfil de suelo, respectivamente, con $DRA = AD \text{ (mm)} / AD \text{ a } -0.33 \text{ bar (mm)}$.

3.4.2. El análisis comparativo de los efectos de los estreses hídrico, nitrogenado e hídrico+nitrogenado sobre las variables de respuesta permitió exponer interacciones agua·N significativas

Todas las variables registradas en este trabajo fueron afectadas por los estreses hídrico y nitrogenado, ya sea de forma simple o combinada. Sin embargo, la comparación de los efectos de estos estreses sobre los parámetros de crecimiento es más directa cuando las respuestas se expresan como RRs (Hedges *et al.*, 1999). Respecto de los resultados concernientes con la productividad subterránea, éstos deben ser interpretados con cautela porque limitantes de tiempo impidieron la determinación de la proporción de raíces vivas en ambos experimentos. Asimismo, resultados como la EUR_T y el crecimiento total de la pastura incluyendo raíces nacen de la presunción de crecimiento neto nulo de éstas durante el período de tiempo entre el evento de corte al inicio de los experimentos y el primer muestreo de raíces llevado adelante doce a trece días más tarde; aunque tal presunción es consistente con resultados reportados en otros estudios (Crider, 1955; Bélanger, Gastal y Warembourg, 1992; Oosterheld, 1992).

En general, las respuestas registradas en el crecimiento de BA, el crecimiento total, la TEF, la EUR_{BA} y la EUR_T mostraron grandes efectos de los estreses hídrico y nitrogenado (Fig.32). Notablemente, las magnitudes de los efectos de éstos fueron comparables para las variables anteriormente mencionadas, en ambos experimentos. Las pasturas de festuca alta estuvieron entonces fuertemente co-limitadas por agua y por N, con magnitudes de efecto variando mayormente entre 0.5 y 0.7, lo que implica reducciones de 30 a 50% debido al estrés hídrico o nitrogenado.

Entre los parámetros definiendo el área foliar de la pastura, la TEF_{mpt} fue comparativamente más afectada por el estrés hídrico o nitrogenado que la VMF_{mpt} o la TAH_{100} . La alta sensibilidad demostrada por la TEF_{mpt} coincide con estudios previos (Gastal y Nelson, 1994; Durand *et al.*, 1995; 1997; Bélanger, 1998; Duru y Ducrocq, 2000). Con respecto a la VMF, se espera que bajo estrés nitrogenado así como bajo estreses hídricos no letales se incremente la vida foliar (Duru y Ducrocq, 2000; Kikuzawa y Lechowicz, 2011), pero ello se observó sólo para el estrés nitrogenado en 2009. El estrés hídrico generó una disminución significativa en la VMF en 2009, lo que puede haber sido consecuencia de que la sequía extremadamente severa enfrentada por los tratamientos A-, en lugar de desencadenar respuestas regulatorias resultando en incrementos en la longevidad de las hojas, directamente amenazó la persistencia de la pastura (Kikuzawa y Lechowicz, 2011).

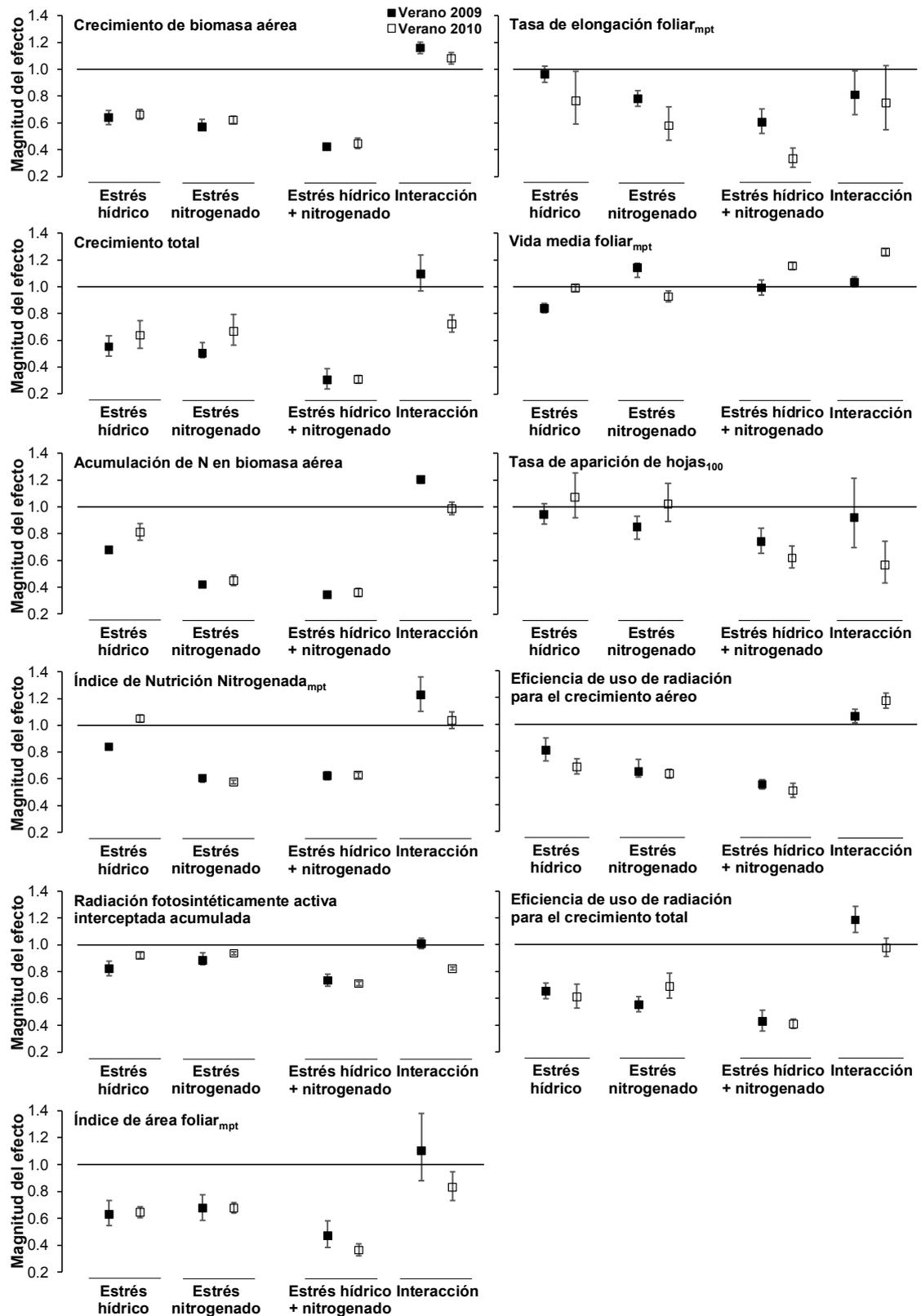


Fig.32. Magnitudes, expresadas como relaciones de respuesta, de los efectos del estrés hídrico, nitrogenado, hídrico+nitrogenado así como de la interacción entre los mismos observadas sobre once variables de crecimiento en pasturas de festuca alta durante los Experimentos Verano 2009 (símbolos llenos) y 2010bis (símbolos vacíos). Las líneas verticales indican los límites de confianza del 90%.

El abastecimiento de agua y de N de la pastura afectan su tasa de asimilación de C, respuesta que se encuentra mediada por los efectos de los estreses hídrico y nitrogenado tanto sobre el despliegue del área foliar —principalmente a través de la afectación de la división y expansión celular y del fenómeno de acartuchamiento de las hojas en condiciones de sequía—, como sobre la capacidad fotosintética de la hoja —fundamentalmente vía los efectos del %N foliar y del Ψ_h sobre aquella y vía reducciones en la conductancia estomática y del mesófilo— (Gastal y Durand, 2000). El efecto agregado de los estreses hídrico y nitrogenado sobre las variables definiendo la morfogénesis foliar se tradujo en reducciones menores pero significativas en la intercepción de radiación de la pastura, con RRs para la RFA_{int} acumulada promediando 0.87 y 0.91 para el estrés hídrico y nitrogenado, respectivamente. Sin embargo, la capacidad fotosintética del canopeo demostró ser el mecanismo ecofisiológico responsable de la mayor parte de las reducciones en el crecimiento manifestadas por festuca alta en condiciones limitantes de agua y N, con las RRs de la EUR_{BA} y de la EUR_T promediadas para los dos estreses y los dos experimentos mostrando valores de 0.69 y 0.63, respectivamente. Los niveles de INN_{mpt} observados en el nivel N- (0.46-0.51) son compatibles con reducciones significativas en la intercepción de radiación debido al estrés nitrogenado, dado que festuca alta logra maximizar ésta con un INN_{mpt} de ≈ 0.7 (Bélanger, Gastal y Lemaire, 1992). Dicho trabajo a su vez mostró cómo la EUR de festuca alta, en cambio, sigue respondiendo a la mejora en su estado de nutrición nitrogenada hasta que éste alcanza el nivel óptimo. Esto, sumado a que ambos experimentos de campo estudiaron la acumulación de forraje durante rebrotes de una duración equivalente a la VMF —esto es, permitiendo niveles de acumulación de forraje muy superiores a aquél asociado con el IAF crítico de festuca alta (≈ 3)— explica el porqué del comparativamente mayor efecto del estrés nitrogenado sobre la EUR que sobre la intercepción de radiación observado en este trabajo, resultados que a su vez concuerdan con lo reportado por Duru *et al.* (1995) en festuca alta y también en pasto ovillo. Por su parte, y al igual que el estrés nitrogenado, el estrés hídrico también tuvo un mayor impacto sobre la EUR que sobre la intercepción de radiación, en tal sentido coincidiendo con lo observado por Akmal y Janssens (2004) en pasturas de raigrás perenne. Gastal y Durand (2000) mostraron como, en pasturas de festuca con un IAF de 0.9 —esto es, bien por debajo del IAF crítico—, la reducción en la intercepción de radiación —vía acartuchamiento de las hojas— y la reducción de la capacidad fotosintética de la hoja —vía reducciones en conductancia estomática— son igualmente responsables de la disminución en la asimilación de C de la pastura. Si bien el efecto de

la sequía sobre la EUR sería mayormente independiente del nivel de desarrollo del canopeo, el efecto sobre la intercepción de radiación, en cambio, sería progresivamente menos importante a medida que la pastura desarrolla niveles crecientes de superficie foliar, superiores al IAF crítico. De nuevo, el hecho de que los experimentos estudiaron acumulaciones máximas de forraje durante el periodo de tiempo cercano a la VMF explica el porqué del mayor efecto del estrés hídrico sobre la EUR que sobre la intercepción de radiación. Por último, resulta notable una respuesta tan elevada a la disponibilidad de agua y de N en una variable como la EUR, cuyo cálculo resulta en un valor promedio para el período experimental. La EUR es raramente constante durante el ciclo de crecimiento de los cultivos aun en ausencia de estrés (Hall *et al.*, 1995), entonces suele no resultar significativamente afectada por un episodio de estrés hídrico incidiendo sobre sólo una parte del ciclo del cultivo (Muchow, 1989). En este estudio, sin embargo, los efectos del agua y del N fueron lo suficientemente fuertes como para alterar significativamente la EUR de festuca alta. De hecho, la EUR mostró RRs a los estreses hídrico y nitrogenado iguales o superiores a aquellas mostrados por un parámetro muy sensible como la TEF.

Con respecto a la economía nitrogenada de la pastura, como es esperado, el INN_{mpt} mostró muy importantes efectos del estrés nitrogenado, los cuales fueron similares en ambos experimentos. Los efectos del estrés hídrico fueron evidentes sólo en 2009, bajo una sequía severa. La magnitud de los efectos del agua y del N observados sobre la acumulación de N en la BA fueron mayores que aquellos hallados sobre el INN_{mpt} , lo cual es lógico dadas las diferentes relaciones entre el crecimiento de la BA y la acumulación de N en ésta que muestran las pasturas cuando desarrollan bajo diferentes niveles de disponibilidad de agua y de N (véase Fig.8.3 de Gastal *et al.*, 2015). Una pastura creciendo con una mayor disponibilidad de N muestra no sólo una mayor acumulación de N a iguales valores de BA que una pastura restringida en N, sino que también logra un mayor crecimiento y por lo tanto un diferencial adicional de acumulación de N. Por la misma razón en 2010 la RR de la acumulación de N al estrés hídrico fue menor que uno, mientras que la correspondiente al INN_{mpt} fue mayor que uno.

Las respuestas de las pasturas al estrés combinado hídrico+nitrogenado en ocasiones resultó congruente con las respuestas a los estreses simples hídrico y nitrogenado observadas. La acumulación de N en la BA, por caso, en 2010 disminuyó un 64% bajo estrés hídrico+nitrogenado ($RR_{A+N} = 0.36$), mientras que el modelo

multiplicativo hubiera predicho la misma magnitud del efecto (RR_{A+N} predicha = RR_A observada \cdot RR_N observada = $0.81 \cdot 0.45 = 0.36$). Sin embargo, en la mayoría de los casos esto no resultó de tal manera. El crecimiento de la BA, por ejemplo, disminuyó 58% bajo estrés hídrico+nitrogenado en 2009 ($RR_{A+N} = 0.42$), mientras que el modelo multiplicativo hubiera predicho una reducción de 64% (RR_{A+N} predicha = $RR_A \cdot RR_N = 0.64 \cdot 0.57 = 0.36$). La situación opuesta también se observó, por ejemplo con la TEF_{mpt} , así como otras inconsistencias. Estas irregularidades sugieren que (i) las respuestas de la pastura pueden verse afectadas por interacciones agua·N, (ii) ciertos mecanismos de crecimiento tienen mayor propensión a exhibir una interacción agua·N que otros, y (iii) las condiciones de crecimiento pueden definir si un mecanismo de crecimiento dado muestra interacción agua·N o no.

En ambos experimentos, el crecimiento de la BA de festuca alta exhibió una interacción cuando se aplicó el estrés combinado hídrico-nitrogenado cuya respuesta puede clasificarse como del tipo antagónico (Fig.32). Interacciones antagónicas entre el estrés hídrico y el nitrogenado —que equivale a respuestas sinérgicas al agregado de agua y N— no son inusuales, con algunos trabajos previos reportando su ocurrencia en cultivos de grano (Cossani *et al.*, 2009), pero también en pastizales naturales (Colabelli y Agnusdei, 2007; Harpole *et al.*, 2007; Colabelli *et al.*, 2011) y en pasturas cultivadas (Lemaire y Denoix, 1987b; Onillon *et al.*, 1995; Gonzalez-Dugo, 2006; Durand *et al.*, 2010; Errecart *et al.*, 2014). En dichos estudios, sin embargo, no se realizó ningún análisis identificando los principales mecanismos de crecimiento responsables de este tipo de respuesta. De ambos determinantes ecofisiológicos del rendimiento, la EUR fue el mecanismo que consistentemente mostró antagonismo entre los estreses hídrico y nitrogenado. Estos resultados entonces confirman a nivel de canopeo resultados previos describiendo, a nivel de hoja, respuestas sinérgicas al agregado de agua y de N de la conductancia estomática, la conductancia del mesófilo y la fotosíntesis neta (Radin y Ackerson, 1981; Otoo *et al.*, 1989; Liu y Dickman, 1996; Shangguan *et al.*, 2000).

El IAF_{mpt} y la RFA_{int} acumulada, por otro lado, mostraron una respuesta multiplicativa en 2009 y una respuesta sinérgica en 2010. LA TEF_{mpt} y la TAH_{100} mostraron magnitudes de efecto para la interacción que en la mayoría de los casos no difirieron estadísticamente de aquellas predichas por el modelo multiplicativo. Inesperadamente, el parámetro de morfogénesis foliar que exhibió la interacción agua·N más consistente fue la VMF_{mpt} , con una respuesta de tipo antagónica. De este modo, en ambos experimentos los tratamientos bajo estrés combinado hídrico-nitrogenado mostraron

una mayor longevidad de hoja que la esperada en función de las respuestas observadas a los estreses simples. La conclusión inversa es que las pasturas creciendo bajo mayores disponibilidades de agua y de N mostraron una VMF más larga que aquella predicha por el modelo multiplicativo a partir de las respuestas observadas al agregado de sólo agua o sólo N. No hay demasiados antecedentes de estudios midiendo el efecto de estreses hídrico y nitrogenados simultáneos sobre la VMF; sólo cabe mencionar el trabajo de Ren *et al.* (2011) en cinco herbáceas perennes de un pastizal natural templado, quienes hallaron una respuesta sinérgica de la VMF a la adición de agua+N en ocho de diez combinaciones genotipo-año; estos resultados entonces serían compatibles con lo observado en el presente estudio. Este tipo de respuesta de la VMF a los cambios en la disponibilidad de agua y N tiene importantes implicancias prácticas, al menos para algunos sistemas de manejo del pastoreo. En sistemas de pastoreo continuo, la eficiencia de utilización del forraje —esto es, la proporción del crecimiento de forraje que es pastoreado por el ganado y no se pierde por senescencia— está determinada por la carga animal, la cual define la frecuencia de defoliación sufrida por la hoja dado que la intensidad de cada evento de defoliación es mayormente constante (Lemaire y Agnusdei, 2000; Lemaire *et al.*, 2009). Pasturas de festuca alta manejadas bajo pastoreo continuo y creciendo bajo alta disponibilidad de agua y de N —las cuales mostrarían una tasa de crecimiento mucho más alta que aquellas limitadas en agua y/o N (Fig.32)—, requerirían ser pastoreadas con cargas mucho mayores para mantener la altura o el IAF objetivos. Entonces, dado que este estudio demostró que mejoras simultáneas en la disponibilidad de agua y N no redujeron la VMF sino que por el contrario tuvieron un efecto positivo sobre ésta, las hojas serán pastoreadas en más ocasiones durante su VMF. Como consecuencia, una mayor proporción del crecimiento de forraje será pastoreado, aumentando la eficiencia de uso de éste.

El crecimiento total de festuca alta mostró una respuesta del tipo multiplicativa en el verano de 2009 y sinergismo en el verano 2010 (Fig.32), indicando una discrepancia entre años en la respuesta de la partición del crecimiento al estrés combinado hídrico-nitrogenado. La partición del crecimiento puede estimarse tras considerar el crecimiento neto aéreo y subterráneo, como la razón EUR_{BA}/EUR_T (Tabla 7). La partición real del C a la parte aérea debería ser apenas menor, debido a las pérdidas subterráneas de C en forma de exudados radicales y debido a la descomposición de las raíces (Bélanger *et al.*, 1994). Sin embargo, el crecimiento neto de raíces nunca excedió el 38% del crecimiento total de la pastura (tratamiento A-N+ en 2009), valor consistente con el 36% reportado por Bélanger *et al.* (1994) para un rebrote de verano de festuca alta. En 2010

se estimaron particiones de C hacia parte aérea consistentemente más altas que en 2009. Se piensa que esto podría estar relacionado con el estrés hídrico más severo que la pastura enfrentó en 2009. La expansión radical es menos sensible al estrés hídrico que la expansión foliar (Spollen *et al.*, 1993; Hsiao y Xu, 2000), y dado que el uso de carbohidratos para el crecimiento aéreo disminuye cuando la TEF se ve reducida (Volenc y Nelson, 1984), entonces en 2009 una mayor proporción de los asimilados habría estado disponible para el crecimiento de raíces, alterando la partición del crecimiento entre parte aérea y raíces. De hecho, un efecto como éste fue reportado en un estudio previo, particularmente bajo condiciones de alta disponibilidad de N (Onillon *et al.*, 1995).

Un aspecto remarcable del set de datos obtenido es que parece mostrar una relación entre la magnitud de las respuestas observadas a los estreses simples hídrico y nitrogenado y el nivel de la respuesta antagónica cuando ambos se presentan simultáneamente. De hecho, cuando se hace una comparación entre años de las respuestas a los estreses simples y de la interacción observadas para cada parámetro presentado en la Fig.32, en diez de once casos la magnitud del efecto de la interacción tomó un valor mayor en el experimento que mostró un mayor efecto de los estreses simples —esto es, cuando los valores de las RRs fueron menores—. En otras palabras, la respuesta de tipo sinérgica ante el agregado simultáneo de agua y N fue más probable —o la magnitud de la respuesta sinérgica fue mayor— cuanto más reducidas fueron las respuestas ante el agregado de sólo uno de ambos factores de crecimiento debido a limitantes en la disponibilidad del otro. En este sentido, la magnitud del efecto de la interacción agua·N podría bien ser considerado como un índice indicando el nivel de co-limitación agua-N experimentado por la pastura.

3.4.3. Sobre el desafío metodológico que impone la medición de la oferta de N del suelo

Cualquier estudio que pretenda cuantificar los flujos de N del suelo, enfrenta un desafío debido a las dificultades metodológicas asociadas con las mediciones de raíces en condiciones de campo. La técnica del barreno y posterior lavado —ya sea implementado manualmente o como en este trabajo con la ayuda de la elutriación hidroneumática (Smucker *et al.*, 1982)— es uno de los métodos más difundidos cuando de cuantificar biomasa y largo de raíces se trata (Jackson *et al.*, 1996; Addo-Danso *et al.*, 2016; Delory *et al.*, 2017), y es a menudo usado para evaluar comparativamente la eficiencia de otros métodos (Day *et al.*, 2013; Addo-Danso *et al.*, 2016). Los resultados

entregados por todos los métodos, no obstante, suelen estar caracterizados por una alta variabilidad (Pierret *et al.*, 2005). La incertidumbre asociada a la modelación de la oferta de N del suelo se incrementa adicionalmente cuando a la variabilidad de la información relativa a raíces se le suma la implementación de suposiciones durante el cómputo de los flujos de convección y de difusión hacia las raíces. No obstante, en experiencias previas empleando esta metodología de cálculo de la oferta de N del suelo, los flujos diarios de N estimados han correlacionado muy bien con los cambios diarios en la acumulación de N de la pastura calculados mediante balance de masa (Durand *et al.*, 2010). La naturaleza hidromórfica de los suelos de la Pampa Deprimida, sin embargo, agrega un grado de complejización adicional en el cálculo de la absorción de agua y por ende de los flujos convectivos de N debido a la napa freática cercana proveyendo una oferta de agua en mayor o menor medida constante en profundidad. En esta situación, el ascenso capilar no debería descartarse y podría resultar en una subestimación de la absorción de agua por parte de la pastura desde horizontes profundos del perfil. Los niveles de humedad volumétrica observados en la capa de suelo más profunda (Fig.18) sugieren que el aporte de humedad por ascenso capilar desde la freática ubicada a ≈ 2 m de profundidad fue significativo. Sin embargo, la presencia en el subsuelo de este fuerte horizonte nátrico que actuó como una forma de barrera física impidiendo el acceso masivo de las raíces de festuca alta a esta humedad profunda, en este caso facilitó el cálculo del consumo de agua de la pastura. Del mismo modo, la suposición de nula pérdida de agua por percolación profunda parece también apropiada debido a la muy baja permeabilidad de los horizontes nátricos (Driessen *et al.*, 2001).

La técnica de microdiálisis, cuya implementación ha experimentado avances importantes en tiempos recientes, se presenta a futuro como una alternativa promisoría para la medición de los flujos de N del suelo. Mediante microdiálisis se ha logrado medir, in situ y en condiciones de campo, los flujos de N mediante difusión (Buckley *et al.*, 2020), e incluso los flujos de N mediante convección tras emplear un perfusato de menor potencial agua (Oyewole *et al.*, 2014). Las determinaciones mediante microdiálisis usualmente integran el efecto de la mayoría de los factores físicos, químicos y biológicos que afectan la disponibilidad de N para la planta, midiendo la oferta de N del suelo hacia una raíz hipotética, haciendo un menor uso de suposiciones sobre procesos del suelo y/o del cultivo y por lo tanto entregando resultados que podrían ser potencialmente más precisos que las estimaciones de flujos de N logradas mediante modelación. Desafortunadamente, aún no se han realizado estudios estimando la oferta de N hacia la raíz mediante microdiálisis que al mismo tiempo hayan cuantificado la demanda de N

y el INN del cultivo. No obstante, la información obtenida con la técnica de microdiálisis todavía debería ser complementada con datos confiables de biomasa y/o largo de raíces para poder calcular la verdadera oferta de N hacia el cultivo.

3.4.4. Interacción entre la disponibilidad de agua en el suelo y el estado de nutrición nitrogenada de la pastura

La disponibilidad de agua tiene un efecto preponderante sobre el abastecimiento de N del suelo (Durand *et al.*, 2010). Por caso, la mineralización de la materia orgánica del suelo es afectada por la sequía, de este modo reduciendo la tasa de reposición de N a la solución del suelo (Deng *et al.*, 2021). Al mismo tiempo, a medida que la disponibilidad de agua del suelo disminuye también lo hace la transpiración de la pastura (Federer, 1979) y por lo tanto el flujo de N mediante convección. A su vez, el contacto entre la raíz y las partículas del suelo también disminuye en suelos más secos (Koebernick *et al.*, 2018), y esto afectaría tanto al mecanismo de difusión como al de convección. La disponibilidad de agua tiene, además, efectos sobre la distribución de N dentro de la planta y, particularmente en festuca alta, su capacidad de transportar el N desde las raíces hacia la parte aérea se ve muy afectada por limitaciones sobre el flujo de agua en el xilema (Gonzalez Dugo *et al.*, 2012). En el presente trabajo, los tratamientos que recibieron el nivel N– mostraron valores de INN muy bajos; sin embargo, la disponibilidad de agua no mostró efecto alguno sobre el estado de nutrición nitrogenada de la pastura: la irrigación de las pasturas recibiendo sólo 40 kg N ha⁻¹ incrementó su crecimiento y acumulación de N, pero el INN se mantuvo inalterado. El riego, entonces, habría incrementado la demanda de N de la pastura y la oferta de N del suelo de forma proporcional. Esto es precisamente lo que las estimaciones de oferta y demanda de N para el período seco del verano 2010 muestran (Tabla 9).

El nivel de fertilización N+ incrementó consistentemente el INN_{mpt} de las pasturas A– y A+ en aproximadamente 0.3 unidades por encima del nivel N–. Bajo este nivel elevado de fertilización nitrogenada, los cálculos de los flujos de N mostraron que en el ambiente evaluado el déficit hídrico no tiene un efecto nocivo sobre la oferta de N del suelo; por el contrario, los flujos de N durante el período seco fueron sustancialmente superiores en secano. Esta respuesta es opuesta a la reportada por Durand *et al.* (2010) en su estudio llevado adelante en Francia, en el cual se aplicó la misma metodología para el cálculo de los flujos de N del suelo. Esta discrepancia en resultados se explica fundamentalmente en que en el ambiente local se observó (i) una tasa de transpiración mayor en condiciones de baja disponibilidad de agua, (ii) un contenido de N mineral en

el suelo superior, y (iii) una mayor contribución de los flujos de difusión a la oferta total de N del suelo. El tratamiento A–N+ transpiró entre 3 y 4 mm día⁻¹ durante los períodos secos, equivalente a un 46 a 60% de la ET₀. Un factor que puede explicar este alto nivel de uso de agua por parte de festuca alta es el gran desarrollo que su sistema radical es capaz de lograr en los suelos del sudeste bonaerense. Los valores de DLR observados, sobre todo en el horizonte superficial, fueron altísimos (>20 cm cm⁻³ suelo). La DLR tiene un papel clave en la definición de la capacidad de absorción de agua de la pastura cuando el nivel de humedad del suelo es inferior al óptimo (de Jong van Lier *et al.*, 2006; 2013), y su rol es aún más importante bajo condiciones de alta demanda atmosférica como aquellas asociadas a la estación cálida (dos Santos *et al.*, 2017). Aún en la capa de suelo ubicada entre 0.2 y 0.4 m de profundidad, festuca alta tuvo una DLR por encima del valor umbral de 5 cm cm⁻³ sugerido por van Noordwijk (1983) como aquel que permite maximizar la absorción de agua del cultivo, y mostró valores de DLR cercanos a éste en la capa de 0.4 a 0.6 m. Con respecto al mayor contenido de N mineral en el suelo en condiciones de secano, como fuera expuesto previamente en la Sección 3.3.9., una explicación plausible es la menor absorción y acumulación de N en la biomasa de la pastura en el nivel A– durante la etapa previa a los períodos secos. Los tratamientos A–N+, que al inicio de los períodos secos mostraron una menor biomasa que A+N+, necesariamente tuvieron una menor tasa de crecimiento durante la etapa inicial del experimento y por lo tanto una menor demanda de N. Por último, la mayor magnitud de los flujos de N mediante difusión es explicada tanto por la mayor DLR así como por el mayor contenido de N mineral en el suelo, aunque este último tiene un efecto más importante debido a que en el cómputo de los flujos de difusión se considera a la concentración de N en la solución del suelo (Brisson *et al.*, 2009), y para ésta el diferencial riego vs secano es aún mayor debido a los menores valores de humedad de suelo que se observaron en secano.

En el verano de 2009, una baja disponibilidad de agua limitó la respuesta del INN del tratamiento A–N+ a la fertilización durante un corto período de tiempo en el que la humedad volumétrica del suelo en los 0.2 m superficiales del perfil alcanzó un mínimo inferior a 14% mientras que la FASTP en todo el perfil de suelo fue de tan solo 0.20; en tal condición la pastura mostró un Ψ_h de –2.0 MPa. La recuperación del INN una vez superado el período seco fue rápida, en concordancia con lo observado en otros estudios (Gonzalez-Dugo *et al.*, 2005). Esto sugiere que la capacidad de absorción de N de las raíces a corto plazo no fue significativamente afectada por este episodio severo de sequía. En cambio, bajo un estrés hídrico menos severo —cercano al promedio para

el área y la estación— como el del verano de 2010, la menor disponibilidad de agua no tuvo efecto negativo sobre el estado de nutrición nitrogenada. El efecto diferencial del estrés hídrico sobre la economía nitrogenada de la pastura dependiendo de su intensidad resulta también evidente tras observar el tipo de respuesta de interacción mostrada tanto por el INN_{mpt} como por el N acumulado por la pastura, con sólo la sequía extrema de 2009 disparando respuestas antagónicas al estrés combinado hídrico-nitrogenado, mientras que en 2010 se hallaron respuestas del tipo multiplicativo (Fig.32). Como se discutiera previamente, las estimaciones de los flujos de N para el tratamiento A–N+ durante el período seco de 2009 mostraron una oferta de N importante, mientras que durante el mismo período la demanda real de N de la pastura fue nula a causa de una tasa neta de crecimiento negativa debido a la pérdida de biomasa aérea mediante senescencia suscitada por la sequía (Tabla 9). Esto sugiere que un desbalance entre la oferta y la demanda de N no habría sido el desencadenante del único episodio de disminución del estado de nutrición nitrogenada asociado con sequía que se observó en estos experimentos. La explicación más plausible es que esta reducción en el INN fue generada por la senescencia. Una senescencia muy precipitada inducida por un episodio de sequía severa puede resultar en una afectación del estado de nutrición nitrogenada dado que la biomasa perdida por senescencia está mayormente compuesta por láminas de hojas (Volaire *et al.*, 1998). La pérdida de N estimada debido a senescencia de hojas, de hecho, tuvo un valor similar a la disminución observada en el N acumulado en la BA entre inicio y fin del período seco que se calculó por balance de masa. Por ejemplo, para el tratamiento A–N+ la pérdida de N acumulado en tejidos aéreos entre las fechas del 13 y el 21 de enero de 2009 fue de $18.4 \text{ kg N ha}^{-1}$. Si se asume que los tejidos senescentes estaban compuestos mayoritariamente por láminas, entonces —y según la relación entre INN de la pastura y su contenido de N en las hojas superiores iluminadas del canopeo reportada en Errecart *et al.* (2012, su Fig.3a)— aquellos 0.46 Mg ha^{-1} perdidos por senescencia en dicho período por una pastura con un INN inicial de 0.64 (Fig.30a) habrían contenido 14 kg de N . Los tratamientos A–N– y A+N– también mostraron senescencia en este período, pero debido a su menor contenido de N en la BA perdieron una menor cantidad de N y por ende no vieron afectado su INN. Esta estimación de pérdidas de N mediante senescencia, sin embargo, asume una remobilización del N foliar nula durante este evento severo de sequía. No abundan los trabajos reportando el efecto de eventos de sequía intensa sobre el estado de nutrición nitrogenada de pasturas perennes. La mayoría de los estudios se han enfocado en la capacidad de persistencia de la pastura, ya sea mediante estrategias de

tolerancia o evasión (Volaire *et al.*, 1998; Zwicke *et al.*, 2015; Norton *et al.*, 2016); en eventos de estrés hídrico tan extremos durante los cuales la persistencia está en riesgo, cualquier impacto de la sequía sobre la nutrición nitrogenada ciertamente puede ser considerado como un efecto secundario, de menor relevancia. Sólo se puede citar el trabajo de Khasanova *et al.* (2013), quienes cuantificaron la remobilización del N foliar durante la sequía en tres géneros incluyendo *Festuca sp.* y reportaron, en particular durante las sequías estivales, un reciclado del N severamente afectado, con *Festuca* perdiendo hasta un 95% de su N foliar debido a la senescencia. Estos resultados entonces avalan la teoría de que la pérdida de N por senescencia habría sido la causa de la disminución temporal en el estado de nutrición nitrogenada de festuca alta observada durante la intensa sequía registrada en el verano de 2009.

Los trabajos pioneros que investigaron la interacción entre el agua y el N sobre el crecimiento de las pasturas mostraron cómo la humedad disponible en los horizontes superficiales del perfil es el mayor determinante de la respuesta del crecimiento al agregado de N (D'Aoust y Tayler, 1968), y también cómo en ciertos ambientes la inyección profunda de N alivió la mayor parte de los efectos negativos del estrés hídrico sobre el crecimiento de la pastura, lo que implica que las reducciones en rendimiento generadas por la sequía estaban mediadas en parte por reducciones en la nutrición nitrogenada (Garwood y Williams, 1967). De hecho, cuando hay agua disponible en profundidad y presencia de N inorgánico en superficie, este desacople espacial entre el agua y el N puede resultar en una disminución en el INN de especies de enraizamiento profundo (Gonzalez-Dugo *et al.*, 2005). Sin embargo, no se halló evidencia de tal fenómeno en pasturas de festuca alta creciendo en un suelo hidrohalmórfico típico de la Pampa Deprimida durante el período estival, debido a que la escasa exploración radical profunda que permite el denso horizonte nátrico subsuperficial no es suficiente —al menos bajo altas demandas evaporativas— para abastecer la demanda de agua de la pastura y generar de este modo un desacople espacial entre agua y N y una oferta/demanda de N desbalanceada.

Este es el primer trabajo que evaluó el estado de nutrición nitrogenada de una pastura bajo estrés hídrico teniendo también en consideración la disminución en el N_{cr} que sucede cuando las condiciones de humedad de suelo dejan de ser las ideales (Capítulo 2, Errecart *et al.*, 2014). Además, las mediciones de humedad de suelo y de potencial hídrico foliar realizadas en los experimentos verano 2009 y verano 2010bis confirmaron para festuca alta el umbral de FAD del 40% para la disminución de la transpiración que

se aplicó en el Capítulo 2 a partir de evidencia provista por estudios llevados adelante en otras especies (Weisz *et al.*, 1994; Ray y Sinclair, 1998). Por un lado, la disminución en el INN debido a sequía que fuera observada en 2009 no obedeció a un desbalance entre oferta y demanda de N. Por otro lado, se registraron respuestas del crecimiento al agregado de N tanto con el agregado simultáneo de agua como sin ésta y, en un verano con características meteorológicas cercanas al promedio para la zona como fue el del año 2010, el efecto observado del déficit hídrico sobre el crecimiento no estuvo mediado por reducciones en el estado de nutrición nitrogenada de la pastura. El estado de nutrición nitrogenada de pasturas de festuca alta de la Pampa Deprimida es entonces relativamente resistente al déficit hídrico, o al menos no es tan sensible como en otros ambientes (Lemaire y Denoix, 1987b; Durand *et al.*, 2010). Esto sugiere que el ambiente local es menos propenso a generar desbalances entre la oferta de N del suelo y la demanda de N de la pastura, y esto obedecería fundamentalmente a (i) el gran desarrollo radical que festuca alta logra en los horizontes superficiales del perfil, donde el contenido de N mineral es mayor, haciendo que ésta sea capaz de mantener una tasa de absorción de N significativa aún con menores niveles de humedad de suelo, y (ii) la presencia del horizonte nátrico subsuperficial, que restringe el acceso de festuca alta a la humedad disponible en profundidad y por lo tanto evita que ésta incremente su demanda de N. De este modo, la información obtenida en estos experimentos permite rechazar la hipótesis específica que postulaba que, en el ambiente hidrohalmórfico de la Pampa Deprimida, desbalances entre la oferta de N del suelo y la demanda de N de la pastura generados por la disponibilidad de agua en profundidad resultan en reducciones en el estado de nutrición nitrogenada de festuca alta.

CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES GENERALES

El uso eficiente del N involucra no sólo el logro de un buen desempeño productivo, sino también consideraciones relativas a la sustentabilidad de la práctica de fertilización (Langholtz *et al.*, 2021). Las aplicaciones excesivas de N causan problemas ecológicos y ambientales como la eutroficación de aguas e incrementos en las emisiones de gases de efecto invernadero, entre otros. Para lograr una alta eficiencia de uso de N es prioritario lograr una alta eficiencia de absorción del nutriente, y para ello es fundamental lograr equilibrar en la mayor medida posible la oferta de N hacia el cultivo con la demanda de N de éste. La demanda de N de cultivos y pasturas depende de su nivel de biomasa, de su tasa de crecimiento y de su N_{cr} . Esta tesis demostró que el N_{cr} de una especie perenne C_3 es menor cuando ésta crece en condiciones limitantes de disponibilidad de agua. La hipótesis general de la tesis planteaba que los eventos de estrés hídrico afectan la nutrición nitrogenada de pasturas C_3 creciendo en el ambiente de la Pampa Deprimida, ya sea a través de cambios en la demanda de N de la planta y/o en la oferta de N del suelo. El estrés hídrico afectó la oferta de N del suelo; a su vez, cambios en el N_{cr} con la disponibilidad de agua del suelo implican cambios en la demanda de N de la pastura. De este modo, no es posible rechazar la hipótesis general planteada.

La consecuencia de un menor N_{cr} bajo estrés hídrico es que, en tales situaciones, las determinaciones de INN basadas en el Ref- N_{cr} subestiman el verdadero estado de nutrición nitrogenada de la pastura. Este sesgo puede ser significativo; los datos presentados en el Capítulo 2 muestran cómo el INN fue subestimado en hasta 30%, dependiendo del nivel de déficit hídrico. Es más, la estimación del estatus nitrogenado con el Ref- N_{cr} habría calificado erróneamente a ciertos tratamientos como limitados por N, cuando en realidad no lo estaban. Esto tiene una importante relevancia práctica, debido a que cambia la cantidad de fertilizante necesaria para alcanzar un determinado INN. Tómese como ejemplo el otoño de 2009, donde para alcanzar un INN de 0.73-0.75 fueron necesarios 75 vs 150 kg de N ha^{-1} . En Argentina, por razones de rentabilidad económica, el nivel de aplicación de fertilizante nitrogenado es muy inferior a la media mundial (en 2018: 29 vs 70 kg N ha cultivada $^{-1}$; FAO, 2021); pero en otras áreas en las que es práctica habitual el uso de mayores dosis de N la implicancia práctica de un menor N_{cr} bajo sequía es aún mayor porque podría evitar la aplicación de N en exceso, con el beneficio no sólo económico sino también ambiental que esto implica.

El análisis de la diferencia entre los niveles de N requeridos expuesto anteriormente cuenta con el beneficio de la retrospectiva, pero sería provechoso desarrollar

tecnologías que asistan en el ajuste de las aplicaciones de N en función del nivel de estrés hídrico esperable. Como muestra la Fig. 10, el N_{cr} relativo promedio de la pastura durante el experimento se asocia muy bien con su nivel relativo de transpiración. Los modelos de simulación de cultivos pueden ser usados con fines predictivos a fines de llegar a recomendaciones sitio- y época-específicas de la dosis óptima de N a aplicar (Christie *et al.*, 2018; 2020). Aún resta avanzar en la calibración de este tipo de modelos con información obtenida localmente sobre la respuesta del INN de la pastura a la dosis de N aplicada, generada en condiciones hídricas no limitantes. Tras lograr dicho ajuste, la inclusión en el modelo de un algoritmo que describa el efecto del estrés hídrico sobre el N_{cr} reportado en este estudio e incluya un estimador de estrés hídrico a corto plazo basado en pronósticos del tiempo o en series climáticas históricas, permitiría a éste predecir el verdadero INN de la pastura.

En esta tesis se desarrolló una función que predice el N_{cr} de festuca alta en función del nivel de estrés hídrico, y luego se validó la misma en raigrás anual. El fenómeno de reducción del N_{cr} en situaciones de estrés hídrico invariablemente complejiza en alguna medida el diagnóstico a campo del estado de nutrición nitrogenada de pasturas y cultivos, pero el beneficio tanto económico como ambiental que su consideración aporta excede ampliamente a esta dificultad. Habiendo sido también reportada en un cultivo de grano C_3 , la reducción del N_{cr} con la sequía parece entonces generalizable a las especies templadas. El concepto de N_{cr} y el fenómeno de su dilución con el incremento de biomasa aplica también sobre especies tropicales, de modo que no habría razón para pensar que la reducción del N_{cr} en condiciones de sequía observada en especies C_3 no habría de replicarse en este tipo de especies. Desafortunadamente, la realización de estudios en especies C_4 que permitan confirmar esta suposición es aún materia pendiente. Dado que este tipo de especies son, en general, más resistentes a la sequía que las especies C_3 , se hipotetiza que tanto la incidencia como la severidad de las reducciones de N_{cr} generadas por sequía serían menores en especies tropicales. Asimismo, se considera relevante la evaluación del efecto de la variación de otros factores de crecimiento sobre el N_{cr} . Para el área de la Pampa Deprimida, resulta particularmente importante la determinación del efecto de la disponibilidad de otros nutrientes como por el ejemplo el fósforo, el cual suele ser deficiente en los suelos de esta región.

Las pasturas de festuca alta que se han naturalizado en el ambiente estudiado tienen un sistema radical ampliamente desarrollado pero que se concentra mayoritariamente

en el horizonte A del perfil del suelo. Si bien durante la estación cálida la disponibilidad de agua en el subsuelo es abundante debido a una napa freática ubicada a una profundidad clasificada como intermedia (≈ 2 m) y considerada como óptima para el desarrollo de cultivos en condiciones de secano (Nosetto *et al.*, 2009), la exploración del suelo por parte de las raíces de festuca en el horizonte nátrico y por debajo de éste es muy escasa. Como consecuencia, el estado hídrico de la pastura es dictado por la disponibilidad de agua en el horizonte superficial y ésta experimenta episodios de estrés hídrico comunes durante la estación cálida, cuando la demanda atmosférica supera a las precipitaciones. Este tipo de limitante edáfica no es técnica ni económicamente fácil de revertir (Imbellone *et al.*, 2021). Aplicaciones muy altas de yeso y su posterior incorporación en el horizonte superficial permiten reducir la sodicidad del horizonte nátrico, pero esto no constituye una solución definitiva dado que a mediano plazo el suelo tiende a volver a su condición original (Costa y Godz, 1999). El subsolado mecánico puede ser una alternativa para reducir la restricción física del horizonte nátrico, pero su efectividad es algo errática (Lavado y Cairns, 1980) y, en caso de generar una mejora en la condición del suelo, su efecto suele ser aún menos perdurable en el tiempo que aquel del enyesado (Grevers y de Jong, 1993). Por estas razones, la medida de manejo más usual es el uso de especies forrajeras que expresan una mejor capacidad de exploración del perfil de suelo, y en este sentido las pasturas perennes se encuentran en una posición ventajosa respecto a las especies anuales debido al mayor desarrollo de su sistema radical (McCallum *et al.*, 2004). Festuca alta es reconocida como una de las especies que mayor capacidad de profundizar en el perfil con sus raíces (Nie *et al.*, 2008) y de penetrar subsuelos duros (Elkins *et al.*, 1977; Qadir *et al.*, 2007), pero tuvo dificultad para explorar el horizonte nátrico y más allá en este estudio. El estudio pionero de Elkins *et al.* (1977) en EE.UU. expuso variabilidad en la capacidad de exploración radical entre cultivares de festuca alta. En Argentina se ha llevado adelante mejoramiento genético de festuca alta con el objetivo de incrementar su performance en ambientes salino-sódicos; sin embargo, éste raramente se basa en cuantificaciones de desarrollo radical debido a la complejidad asociada con la medición de raíces en condiciones de campo. No obstante, la evaluación de cultivares más recientes de festuca alta en lo que respecta a su capacidad de crecimiento en suelos con fuertes restricciones en el subsuelo ameritaría la realización de nuevos estudios. Por último, debería considerarse la evaluación del desempeño de algunas especies forrajeras subtropicales en este ambiente. Otondo *et al.* (2015) observaron que *Chloris gayana* y *Panicum coloratum* generaron una mejora en la condición física del horizonte

superficial en un Natracualf típico de la Pampa Deprimida, pero no evaluaron eventuales efectos en el subsuelo. Estas mismas especies fueron recientemente reportadas en Australia logrando una mayor exploración y una mejora de las características físicas de horizontes sub-nátricos con respecto al pastizal natural reemplazado (Banks *et al.*, 2020).

La baja productividad forrajera de las pasturas de festuca alta durante la época estival en el ambiente estudiado, entonces, se debe a una fuerte co-limitación por agua y por N. El rendimiento de forraje mostró una interacción de tipo antagónica entre los estreses hídrico y nitrogenado; esto es, se observó respuesta sinérgica ante el agregado simultáneo de agua y de N. No todos los mecanismos de crecimiento, sin embargo, reaccionaron de igual modo al agregado de agua y N, siendo la eficiencia de uso de la radiación y la vida media foliar los únicos que mostraron una reacción sinérgica consistente a la adición de agua y de N. Las tasas máximas de crecimiento observadas en el tratamiento irrigado que recibió el nivel alto de N ($0.150\text{-}0.158 \text{ Mg MS ha}^{-1} \text{ día}^{-1}$, o $0.91\text{-}1.06 \text{ g MS m}^{-2} \text{ °Cd}^{-1}$) fueron comparables con los valores que fueran reportados para cultivos forrajeros C_3 creciendo en suelos de la Pampa Húmeda con mayor potencial productivo (Agnusdei *et al.*, 2010). Esto sugiere que las condiciones hidrohalmórficas de este suelo no constituyen una restricción al crecimiento de festuca alta si el suelo cuenta con agua y N disponibles. Una implicancia práctica de la fuerte co-limitación por agua y N que enfrentan las pasturas templadas en este ambiente durante el verano es que la respuesta esperable al sólo agregado de fertilizante nitrogenado es menor que aquella que puede ser lograda en otras épocas del año durante las que la probabilidad de déficit hídrico es menor, como por ejemplo en fines de invierno y de verano (Errecart *et al.*, 2014). Sin embargo, las temperaturas más cálidas y los elevados niveles de radiación de la época estival configuran una situación en la que el potencial de respuesta a la corrección de ambas limitantes de crecimiento es máximo. De hecho, el verano como estación contribuye al mismo nivel que la primavera al potencial productivo anual de 22 Mg ha^{-1} que festuca alta es capaz de alcanzar bajo condiciones no limitantes de agua y de N en el ambiente de la Pampa Deprimida (Insua *et al.*, 2021). El clima se está volviendo progresivamente más errático y extremo, y los productores agropecuarios necesitan de herramientas que les permitan afrontar de mejor modo las limitantes impuestas por los estados del tiempo. La fertilización nitrogenada es una práctica ya establecida en los sistemas ganaderos de la Pampa Deprimida, pero su implementación efectiva durante el verano requiere de medidas que permitan anular o minimizar el efecto de eventuales episodios de sequía.

En este sentido, el uso de riego suplementario durante épocas con déficit de precipitación es una práctica ya arraigada en otras áreas (Milne, 2009; Kirschbaum *et al.*, 2017). Aunque los recursos hídricos subterráneos de la Pampa Deprimida son apropiados para su uso en irrigación (Génova, 2011), su implementación aún no es relevante debido mayormente a motivos de viabilidad económica, pero esto podría cambiar a mediano-largo plazo a medida que el crecimiento en la demanda de alimentos se siga sosteniendo y la superficie disponible para la producción agropecuaria permanezca limitada (Röös *et al.*, 2017).

La experimentación llevada adelante en este trabajo de tesis permitió cumplimentar los objetivos planteados. Sólo un episodio de sequía muy intensa como aquella registrada en el verano 2008/09 afectó el estado de nutrición nitrogenada de festuca alta, mientras que un estrés hídrico de intensidad moderada, cercana al promedio para la zona, no tuvo efecto negativo. Estimaciones de la oferta de N del suelo y de la demanda de N de la pastura indicaron que la disminución en el INN observada en 2009 no fue causada por una disminución en la disponibilidad relativa de N hacia la pastura, sino que habría originado en la pérdida de N por senescencia anticipada que tan intenso estrés hídrico desató. ¿Puede este comportamiento asumirse como generalizado en las pasturas perennes templadas de la Pampa Deprimida? En todo caso, la relativa insensibilidad a la sequía mostrada por la nutrición nitrogenada de festuca alta tiene una estrecha relación con la arquitectura radical que el ambiente edáfico donde se desarrolló el estudio le permitió a la pastura desarrollar. El desarrollo y propiedades del horizonte A y la profundidad a la que se encuentra, en caso de existir, el horizonte nátrico son los factores más importantes en la definición de la aptitud de uso de los suelos hidrohalomórficos (Szabolcs, 1988; Vazquez *et al.*, 2001; Rubio y Taboada, 2013). Si bien sódico, el espeso horizonte A con moderado contenido de materia orgánica de este suelo permite que festuca alta desarrolle un profuso sistema radical con una gran capacidad de absorción del N disponible, aún en condiciones de reducida disponibilidad de agua. Por otro lado, el fuerte horizonte nátrico ubicado en el subsuelo limita severamente la exploración radical y el acceso a la humedad disponible en profundidad, con lo cual no se generan desbalances significativos entre la oferta de N del suelo y la demanda de N de la pastura que pudieran resultar en disminuciones en su estado de nutrición nitrogenada. Sin embargo, en la Pampa Deprimida los suelos de una misma toposecuencia suelen mostrar una marcada heterogeneidad en estos atributos (Batista *et al.*, 2005), por lo que no sería acertado extrapolar lo observado a toda esta amplia área. De este modo, esta tesis pone de manifiesto la importancia que las propiedades

de suelo y subsuelo y la configuración alcanzada por el sistema radical tienen en la definición del estado de nutrición nitrogenada de la pastura. La evaluación del efecto del estrés hídrico sobre el estado de nutrición nitrogenada de pasturas perennes templadas en ambientes edáficos de la Pampa Deprimida con menores y mayores limitantes al crecimiento, como Natracuoles y Natralboles, respectivamente, es por lo tanto una materia interesante de futuros estudios.

BIBLIOGRAFÍA

- Addo-Danso, A.D.; Prescott, C.E.; Smith, A.R. 2016. Methods for estimating root biomass and production in forest and woodland ecosystem carbon studies: a review. *Forest Ecology and Management* 359: 332-351.
- Agnusdei, M.G.; Assuero, S.G.; Lattanzi, F.A.; Marino, M.A. 2010. Critical N concentration can vary with growth conditions in forage grasses: Implications for plant N status assessment and N deficiency diagnosis. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 88: 215-230.
- Agnusdei, M.G.; Colabelli, M.R.; Fernández Grecco, R.C. 2001. *Crecimiento estacional de forraje de pasturas y pastizales naturales para el sudeste bonaerense*. INTA EEA Balcarce. Boletín Técnico N°152, 17 p.
- Agnusdei, M.G.; Di Marco, O. 2015. *Más producción de carne, menos riesgo y más flexibilidad con pasturas perennes en suelos bajos*. Guía práctica para su implementación. INTA. EEA Balcarce https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_cartilla_colombo_y_magliano_ult.pdf .
- Akmal, M.; Janssens, M.J.J. 2004. Productivity and light use efficiency of perennial ryegrass with contrasting water and nitrogen supplies. *Field Crops Research* 88: 143-155.
- Allen, R.G.; Pereira, L.S.; Raes, D.; Smith, M. 1998. Crop evapotranspiration: Guidelines for computing crop requirements. *FAO. Irrigation and Drainage Paper No. 56*, 300 p.
- Avramova, V.; AbdElgawad, H.; Zhang, Z.; Fotschki, B.; Casadevall, R.; Vergauwen, L.; Knapen, D.; Taleisnik, E.; Guisez, Y.; Asard, H.; Beemster, G.T.S. 2015. Drought induces distinct growth response, protection and recovery mechanisms in the maize leaf growth zone. *Plant Physiology* 169: 1382-1396.
- Azedo-Silva, J.; Osório, J.; Fonseca, F.; Correia, M.J. 2004. Effects of soil drying and subsequent re-watering on the activity of nitrate reductase in roots and leaves of *Helianthus annuus*. *Functional Plant Biology* 31: 611-621.
- Banks, R.; Wendling, L.; Basford, K.; Ringrose-Voase, A.; Banks, V. 2020. Beneficial soil profile differences associated with tropical grass pastures on sodic texture contrast soils in Northern New South Wales. *Soil Research* 58: 207-218.

- Barber, S.A. 1995. *Soil nutrient bioavailability. a mechanistic approach*. New York, USA: Wiley. 384 p.
- Barbieri, P.A.; Echeverría, H.E.; Sainz Rozas, H.R.; Picone, L. 2006. Nitrogen use efficiency from urea applied to a tall wheatgrass (*Elytrigia elongata*) prairie in a sodic soil. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 46: 535-543.
- Barracough, P.B.; Kuhlmann, H.; Weir, A.H. 1989. The effects of prolonged drought and nitrogen fertilizer on root and shoot growth and water uptake by winter wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science* 163: 352-360.
- Bartholomeus, R.P.; Witte, J.-P.M.; van Bodegom, P.M.; van Dam, J.C.; Aerts, R. 2008. Critical soil conditions for oxygen stress to plant roots: substituting the Feddes function by a process-based model. *Journal of Hydrology* 360: 147-165.
- Batista, W.B.; Taboada, M.A.; Lavado, R.S.; Perelman, S.B.; León, R.J.C. 2005. Asociación entre comunidades vegetales y suelos de pastizal de la Pampa Deprimida. En: Oesterheld, M. et al. (Comp.). *La heterogeneidad de la vegetación de los agroecosistemas. Un homenaje a Rolando JC León*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Facultad de Agronomía Universidad de Buenos Aires, pp. 113-129.
- Bélanger, G. 1998. Morphogenetic characteristics of timothy grown with varying N nutrition. *Canadian Journal of Plant Science* 78: 103-108.
- Bélanger, G.; Gastal, F.; Lemaire, G. 1992. Growth analysis of a tall fescue sward fertilized with different rates of nitrogen. *Crop Science* 32: 1371-1376.
- Bélanger, G.; Gastal, F.; Warembourg, F.R. 1992. The effects of nitrogen fertilization and the growing season on carbon partitioning in a sward of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb). *Annals of Botany* 70: 239-244.
- Bélanger, G.; Gastal, F.; Warembourg, F.R. 1994. Carbon balance of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.): effects of nitrogen fertilization and the growing season. *Annals of Botany* 74: 653-659.
- Bélanger, G.; Richards, J.E. 1997. Growth analysis of timothy grown with varying N nutrition. *Canadian Journal of Plant Science* 77: 373-380.
- Bélanger, G.; Richards, J.E. 2000. Dynamics of biomass and N accumulation of alfalfa under three N fertilization rates. *Plant and Soil* 219: 177-185.

- Bélanger, G.; Walsh, J.R.; Richards, J.E.; Milburn, P.H.; Ziadi, N. 2001. Critical nitrogen curve and nitrogen nutrition index for potato in eastern Canada. *American Journal of Potato Research* 78: 355-364.
- Bélanger, G.; Ziadi, N. 2008. Phosphorus and nitrogen relationships during spring growth of an aging timothy sward. *Agronomy Journal* 100: 1757-1762.
- Belesky, D.P.; West, C.P. 2009. Abiotic stresses and endophyte effects. In: Fribourg, H.; Hannaway, D.; West, C. (eds) *Tall fescue for the 21st century*. Madison, Wisconsin, USA: ASA-CSSA-SSSA, pp. 49-64.
- Bell, L.W.; Moore, A.D.; Thomas, D.T. 2018. Integrating diverse forage sources reduces feed gaps on mixed crop-livestock farms. *Animal* 12: 1967-1980.
- Ben Haj Salah, H.; Tardieu, F. 1997. Control of leaf expansion rate of droughted maize plants under fluctuating evaporative demand. *Plant Physiology* 114: 893-900.
- Berger, H.; Bilotto, F.; Bell, L.W.; Machado, C.F. 2017. Feedbase intervention in a cow-calf system in the flooding pampas of Argentina: 2. Estimation of the marginal value of additional feed. *Agricultural Systems* 158: 68-77.
- Berone, G.D.; Lattanzi, F.A.; Agnusdei, M.G.; Bertolotti, N. 2008. Growth of individual tillers and tillering rate of *Lolium perenne* and *Bromus stamineus* subjected to two defoliation frequencies in winter in Argentina. *Grass and Forage Science* 63: 504-512.
- Bianchi, A.R.; Cravero, S.A.C. 2010. *Atlas climático digital de la República Argentina*. Buenos Aires, Argentina: Ediciones INTA. 55 p.
- Blake, G.R.; Hartge, K.H., 1986. Bulk density. In: Klute, A. (ed.) *Methods of soil analysis*, Part 1, (2nd ed.). Madison, Wisconsin, USA: ASA-CSSA-SSSA, pp. 363-375.
- Bradford, K.J.; Hsiao, T.C. 1982. Physiological responses to moderate water stress. In: Lange, O.L. et al. (eds.). *Physiological plant ecology II. Water relations and carbon assimilation*. Berlin, Alemania: Springer-Verlag, pp. 263-324.
- Bonachela, S. 1996. Root growth of triticale and barley grown for grain or for forage plus grain in a Mediterranean climate. *Plant and Soil* 183: 239-251.
- Boyer, J.S. 1970. Leaf enlargement and metabolic rates in corn, soybean, and sunflower at various leaf water potentials. *Plant Physiology* 46: 233-235.

- Brisson, N.; Launay, M.; Mary, B.; Beaudoin, N. 2009. *Conceptual basis, formalisations and parameterization of the STICS crop model*. Versailles, Francia: Quae Editions. 297 p.
- Buckley, S.; Brackin, R.; Jämtgård, S.; Näsholm, T.; Schmidt, S. 2020. Microdialysis in soil environments: current practice and future perspectives. *Soil Biology and Biochemistry* 143: 107743.
- Cabria, F.N. 1988. *Memoria del mapa de suelos de la Estación Experimental Agropecuaria del INTA Balcarce*. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. 41 p.
- Caviglia, O.P.; Sadras, V.O. 2001. Effect of nitrogen supply on crop conductance, water- and radiation-use efficiency of wheat. *Field Crops Research* 69: 259-266.
- Christie, K.M.; Smith, A.P.; Rawnsley, R.P.; Harrison, M.T.; Eckard, R.J. 2018. Simulated seasonal responses of grazed dairy pastures to nitrogen fertilizer in SE Australia: pasture production. *Agricultural Systems* 166: 36-47.
- Christie, K.M.; Smith, A.P.; Rawnsley, R.P.; Harrison, M.T.; Eckard, R.J. 2020. Simulated seasonal responses of grazed dairy pastures to nitrogen fertilizer in SE Australia: N loss and recovery. *Agricultural Systems* 182: 102847.
- Ciampitti, I.A.; Makowski, D.; Fernández, J.; Lacasa, J.; Lemarié, G. 2021. Does water availability affect the critical N dilution curves in crops? A case study for maize, wheat, and tall fescue crops. *Field Crops Research* 273: 108301.
- Colabelli, M.R.; Agnusdei, M.G. 2007. *Eficiencia de uso de radiación de un pastizal natural con disponibilidad diferencial de agua y nutrientes en la época estival*. Proceedings of the 20th Meeting of the Latin-American Association of Animal Production, Cuzco, Perú.
- Colabelli, M.R.; Agnusdei, M.G.; Durand, J.L. 2011. Grupos funcionales de plantas, producción de forraje y eficiencia de uso de radiación de pastizales naturales en condiciones potenciales y limitadas de agua y nitrógeno. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 37: 62-74.
- Colabelli, M.; Assuero, S.; Durand, J.-L. 2004. Water status and leaf elongation of C₃- and C₄ grasses of Flooding Pampa grassland. *Journal of Vegetation Science* 15: 817-822.

- Conzonno, V.; Miretzky, P.; Fernandez Cirelli, A. 2001. The impact of man-made hydrology on the lower stream bed of the Salado River drainage basin (Argentina). *Environmental Geology* 40: 968-972.
- Cosgrove, D.J. 1993. Water uptake by growing cells: an assessment of the controlling roles of wall relaxation, solute uptake, and hydraulic conductance. *International Journal of Plant Science* 154: 10-21.
- Cossani, C.M.; Sadras, V.O. 2018. Water-nitrogen colimitation in grain crops. *Advances in Agronomy* 150: 231-274.
- Cossani, C.M.; Slafer, G.A.; Savin, R. 2009. Yield and biomass in wheat and barley under a range of conditions in a Mediterranean site. *Field Crops Research* 112: 205-213.
- Costa, J.L.; Godz, P. 1999. Aplicación de yeso a un natracuol del sudeste de la Pampa Deprimida. *Ciencia del Suelo* 17: 21-27.
- Coyne, M.S. 2008. Biological denitrification. In: Schepers, J.S.; Raun, W. (eds.) *Nitrogen in agricultural systems*. Madison, Wisconsin, USA: ASA-CSSA-SSSA Publishing, pp. 201-254.
- Crain, C.M.; Kroeker, K.; Halpern, B.S. 2008. Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. *Ecology Letters* 11: 1304-1315.
- Crider, F.J. 1955. *Root-growth stoppage resulting from defoliation of grass*. USDA Technical Bulletin No. 1102. 23 p.
- Dalal, R.C.; Eberhard, R.; Grantham, T.; Mayer, D.G. 2003. Application of sustainability indicators, soil organic matter and electrical conductivity, to resource management in the northern grains region. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 43: 253-259.
- Dane, J.H.; Hopmans, J.W.; Romano, N.; Nimmo, J.; Winfield, K.A. 2002. Soil water retention and storage-laboratory methods. In: Dane, J.H.; Topp, G.C. (eds.). *Methods of soil analysis*. Part 4: Physical methods. Madison, WI, USA: SSSA, pp. 675-720.
- D'Aoust, M.J.; Tayler, R.S. 1968. The interaction between nitrogen and water in the growth of grass swards. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 70: 11-17.

- Day, F.P.; Schroeder, R.E.; Stover, D.B.; Brown, A.L.P.; Butnor, J.R.; Dilustro, J.; Hungate, B.A.; Dijkstra, P.; Duval, B.D.; Seiler, T.J.; Drake, B.G.; Hinkle, C.R. 2013. The effects of 11 yr of CO₂ enrichment on roots in a Florida scrub-oak ecosystem. *New Phytologist* 200: 778-787.
- de Jong van Lier, Q.; Metselaar, K.; van Dam, J.C. 2006. Root water extraction and limiting soil hydraulic conditions estimated by numerical simulation. *Vadose Zone Journal* 5: 1264-1277.
- de Jong van Lier, Q.; van Dam, J.C.; Durigon, A.; dos Santos, M.A.; Metselaar, K. 2013. Modeling water potentials and flows in the soil-plant system comparing hydraulic resistances and transpiration reduction functions. *Vadose Zone Journal* 12: 1-20.
- Delory, B.M.; Weidlich, E.W.A.; Meder, L.; Lütje, A.; van Duijnen, R.; Weidlich, R.; Temperton, V.M. 2017. Accuracy and bias of methods used for root length measurements in functional root research. *Methods in Ecology and Evolution* 8: 1594-1606.
- Della Maggiora, A.I.; Irigoyen, A.; Gardiol, J.M.; Caviglia, O.; Echarte, L. 2003. Evaluación de un modelo de balance de agua en el suelo para el cultivo de maíz. *Revista Argentina de Agrometeorología* 2: 167-176.
- Deng, L.; Peng, C.; Kim, D.-G.; Li, J.; Liu, Y.; Hai, X.; Liu, Q.; Huang, C.; Shangguan, Z.; Kuzyakov, Y. 2021. Drought effects on soil carbon and nitrogen dynamics in global natural ecosystems. *Earth-Science Reviews* 214: 103501.
- De Prado, M.R.; Echeverría, H.E.; Lattanzi, F.A.; San Martín, N.F. 2001. Evolución otoño invernal del nitrógeno mineral en un natracuol típico bajo festucas con diferente hábito de crecimiento. *Ciencia del Suelo* 19: 39-46.
- Di Bella, C.E.; Striker, G.G.; Loreti, J.; Cosentino, D.J.; Grimoldi, A.A. 2016. Soil water regime of grassland communities along subtle topographic gradients in the Flooding Pampa (Argentina). *Soil and Water Research* 11: 90-96.
- Donovan, L.; Linton, M.; Richards, J. 2001. Predawn plant water potential does not necessarily equilibrate with soil water potential under well-watered conditions. *Oecologia* 129: 328-335.

- Doncaster, C.P.; Davey, A.J.H.; Dixon, P.M. 2014. Prospective evaluation of designs for analysis of variance without knowledge of effect sizes. *Environmental and Ecological Statistics* 21: 239-261.
- dos Santos, M.A.; de Jong van Lier, Q.; van Dam, J.C.; Freire Bezerra, A.H. 2017. Benchmarking test of empirical root water uptake models. *Hydrology and Earth System Sciences* 21: 473-493.
- Driessen, P.; Deckers, J.; Spaargaren, O.; Nachtergaele, F. 2001. *Lecture notes on the major soils of the world*. Rome, Italy: FAO. 334 p.
- Durand, J.L.; Bariac, T.; Ghesquière, M.; Biron, P.; Richard, P.; Humphreys, M.; Zwierzykowski, Z., 2007. Ranking of the depth of water extraction by individual grass plants, using natural ^{18}O isotope abundance. *Environmental and Experimental Botany* 60: 137-144.
- Durand, J.L.; Gastal, F.; Etchebest, S.; Bonnet, A.C.; Ghesquière, M., 1997. Interspecific variability of plant water status and leaf morphogenesis in temperate forage grasses under summer water deficit. *European Journal of Agronomy* 7: 99-107.
- Durand, J.L.; Gonzalez-Dugo, V.; Gastal, F. 2010. How much do water deficits alter the nitrogen nutrition status of forage crops? *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 88: 231-243.
- Durand, J.-L.; Onillon, B.; Schnyder, H.; Rademacher, I. 1995. Drought effects on cellular and spatial parameters of leaf growth in tall fescue. *Journal of Experimental Botany* 46: 1147-1155.
- Duru, M.; Ducrocq, H. 1997. A nitrogen and phosphorus herbage nutrient index as a tool for assessing the effect of N and P supply on the dry matter yield of permanent pastures. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 47: 59-69.
- Duru, M.; Ducrocq, H. 2000. Growth and senescence of the successive leaves on a cocksfoot tiller. Effect of nitrogen and cutting regime. *Annals of Botany* 85: 645-653.
- Duru, M.; Ducrocq, H.; Tirilly, V. 1995. Modeling growth of cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.) and tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) at the end of spring in relation to herbage nitrogen status. *Journal of Plant Nutrition* 18: 2033-2047.

- Duru, M.; Lemaire, G.; Cruz, P. 1997. Grasslands. In: Lemaire, G. (ed.). *Diagnosis on the nitrogen status in crops*. Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 59-72.
- Elkins, C.B.; Haaland, R.L.; Hoveland, C.S. 1977. *Grass root as a tool for penetrating soil hardpans and increasing crop yields. Proceedings of the 34th Southern Pasture and Forage Crop Improvement Conference*, Auburn, Alabama, USA: pp.21-26.
- Errecart, P.M.; Agnusdei, M.G.; Lattanzi, F.A.; Marino, M.A. 2012. Leaf nitrogen concentration and chlorophyll meter readings as predictors of tall fescue nitrogen nutrition status. *Field Crops Research* 129: 46-58.
- Errecart, P.M.; Agnusdei, M.G.; Lattanzi, F.A.; Marino, M.A.; Berone, G.D. 2014. Critical nitrogen concentration declines with soil water availability in tall fescue. *Crop Science* 54: 318-330.
- Errecart, P.M.; Marino, M.A.; Agnusdei, M.G.; Lattanzi, F.A.; Durand, J.L. 2020. The intensity of water stress dictates whether the N status of temperate-type perennial grass swards is affected by drought. *Field Crops Research* 257: 107928.
- Fay, P.A.; Prober, S.Z.; Harpole, W.S.; Knops, J.M.H.; Bakker, J.D.; Borer, E.T.; Lind, E.M.; Seabloom, E.W.; Wragg, P.D.; McDougall, A.S.; Adler, P.B.; Blumenthal, D.M.; Buckley, Y.M.; Chu, C.; Du, G.; Cleland, E.E.; Collins, S.L.; Ladwig, L.M.; Davies, K.F.; Melbourne, B.A.;; Yang, L.H. 2015. Grassland productivity limited by multiple nutrients. *Nature Plants* 1: 15080.
- Farooq, M.; Hussain, M.; Wahid, A.; Siddique, K.H.M. 2012. Drought stress in plants: an overview. In: Aroca, R. (eds.). *Plant responses to drought stress*. Berlin, Alemania: Springer-Verlag, pp.1-33.
- Farquhar, G.D.; Ehleringer, J.R.; Hubick, K.T. 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40: 503-537.
- Federer, C.A. 1979. A soil-plant atmosphere model for transpiration and availability of soil water. *Water Resources Research* 15: 555-562.
- Fernández, J.A.; Lemaire, G.; Bélanger, G.; Gastal, F.; Makowski, D.; Ciampitti, I.A. 2021. Revisiting the critical nitrogen dilution curve for tall fescue: a quantitative synthesis. *European Journal of Agronomy* 131: 126380.

- Fernández Grecco, R.C. 2013. Dinámica del crecimiento de una pastura de agropiro alargado de acuerdo con la época de fertilización nitrogenada. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 39: 162-168.
- Folt, C.L.; Chen, C.Y.; Moore, M.V.; Burnaford, J. 1999. Synergism and antagonism among multiple stressors. *Limnology and Oceanography* 44: 864-877.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (8 de Julio de 2021). Fertilizers indicators [Dataset]. FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/EF>.
- Francis, D.D.; Vigil, M.F.; Moiser, A.R. 2008. Gaseous losses of nitrogen other than through denitrification. In: Schepers, J.S.; Raun, W. (eds.). *Nitrogen in agricultural systems*. Madison, Wisconsin, USA: ASA-CSSA-SSSA Publishing, pp. 255-279.
- Frensch, J. 1997. Primary responses of root and leaf elongation to water deficits in the atmosphere and soil solution. *Journal of Experimental Botany* 48: 985-999.
- Gale, M.R.; Grigal, D.K. 1987. Vertical root distributions of northern tree species in relation to successional status. *Canadian Journal of Forest Research* 17: 829-834.
- Gan, S.; Amasino, R.M. 1997. Making sense of senescence. Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiology* 113: 313-319.
- García, M.G.; Busso, C.A.; Polci, P.; García Girou, N.L.; Echenique, V. 2002. Water relations and leaf growth rate of three *Agropyron* genotypes under water stress. *Biocell* 26: 309-317.
- Gardner, W.H. 1986. *Water content*. In: Klute, A. (ed.). *Methods of soil analysis*. Part 1, (2nd ed.). Madison, Wisconsin, USA: ASA-CSSA-SSSA Publishing, pp. 493-544.
- Garnett, T.; Conn, V.; Kaiser, B.N. 2009. Root based approaches to improving nitrogen use efficiency in plants. *Plant, Cell and Environment* 32: 1272-1283.
- Garwood, E.A.; Williams, T.E. 1967. Growth, water use and nutrient uptake from the subsoil by grass swards. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 69: 125-130.
- Gastal, F.; Bélanger, G.; Lemaire, G. 1992. A model of the leaf extension rate of tall fescue in response to nitrogen and temperature. *Annals of Botany* 70: 437-442.

- Gastal, F.; Durand, J.L. 2000. Effects of nitrogen and water supply on N and C fluxes and partitioning in defoliated swards. In: Lemaire, G. et al. (eds.). *Grassland ecophysiology and grazing ecology*. Wallingford, Reino Unido: CAB International, pp. 15-39.
- Gastal, F.; Lemaire, G.; Durand, J.-L.; Louarn, G. 2015. Quantifying crop responses to nitrogen and avenues to improve nitrogen-use efficiency. In: Sadras, V.O.; Calderini, D.F. (eds.). *Crop physiology: applications for genetic improvement and agronomy*. (2nd ed.). San Diego, USA: Academic Press, pp. 161-206.
- Gastal, F.; Nelson, C.J. 1994. Nitrogen use within the growing leaf blade of tall fescue. *Plant Physiology* 105: 191-197.
- Gastal, F.; Saugier, B. 1986. Alimentation azotée et croissance de la fétuque élevée. I. Assimilation du carbone et répartition entre organes. *Agronomie* 6: 157-166.
- Génova, L.J. 2011. Calidad del agua subterránea para riego complementario en la Pampa Húmeda argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Plata* 110: 63-81.
- Ghashghaie, J.; Saugier, B. 1989. Effects of nitrogen deficiency on leaf photosynthetic response of tall fescue to water deficit. *Plant, Cell & Environment* 12: 261-271.
- Ghosh, U.; Thapa, R.; Desutter, T.; Yangbo, H.E.; Chatterjee, A. 2017. Saline-sodic soils: potential sources of nitrous oxide and carbon dioxide emissions? *Pedosphere* 27: 65-75.
- Gloser, V.; Dvorackova, M.; Mota, D.H.; Petrovic, B.; Gonzalez, P.; Geilfus, C.M. 2020. Early changes in nitrate uptake and assimilation under drought in relation to transpiration. *Frontiers in Plant Science* 11: 602065.
- Goel, P.; Singh, A.K. 2015. Abiotic stresses downregulate key genes involved in nitrogen uptake and assimilation in *Brassica juncea* L. *PLoS One* 10: e0143645.
- Golberg, A.; Jonas, O.; Pereyra, M.C.; Ledent, J.F. 1995. Nitrate reductase activity in nitrogen and water stressed plants of bread wheat. *Cereal Research Communications* 23: 433-439.
- Gonzalez-Dugo, M.V. 2006. *Effet du déficit hydrique sur l'état de nutrition azotée chez les graminées fourragères*. Thèse Doctorale de L'Université de Poitiers.

- Gonzalez-Dugo, V.; Durand, J.-L.; Gastal, F. 2010. Water deficit and nitrogen nutrition of crops. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 30: 529-544.
- Gonzalez-Dugo, V.; Durand, J.L.; Gastal, F.; Bariac, T.; Poincheval, J. 2012. Restricted root-to-shoot translocation and decreased sink size are responsible for limited nitrogen uptake in three grass species under water deficit. *Environmental and Experimental Botany* 75: 258-267.
- Gonzalez-Dugo, V.; Durand, J.-L.; Gastal, F.; Picon-Cochard, C. 2005. Short-term response of the nitrogen nutrition status of tall fescue and Italian ryegrass swards under water deficit. *Australian Journal of Agricultural Research* 56: 1269-1276.
- Greenwood, E.A.N.; Goodall, D.W.; Titmanis, Z.V. 1965. The measurement of nitrogen deficiency in grass swards. *Plant and Soil* 23: 97-116.
- Greenwood, D.J.; Barnes, A. 1978. A theoretical model for the decline in the protein content in plants during growth. *Journal of Agricultural Sciences, Cambridge* 91: 461-466.
- Greenwood, D.J.; Lemaire, G.; Gosse, G.; Cruz, P.; Draycott, A.; Neeteson, J.J. 1990. Decline in percentage N of C₃ and C₄ crops with increasing plant mass. *Annals of Botany* 66: 425-436.
- Greenwood, D.J.; Neeteson, J.J.; Draycott, A. 1985. Response of potatoes to N fertilizer; Quantitative relations for components of growth. *Plant and Soil* 85: 163-183.
- Greenwood, D.J.; Neeteson, J.J.; Draycott, A. 1986. Quantitative relationships for the dependence of growth rate of arable crops to their nitrogen content, dry weight and aerial environment. *Plant and Soil* 91: 281-301.
- Gregory, P.J.; Brown, S.C. 1989. Root growth, water use and yield of crops in dry environments: what characteristics are desirable? *Aspects of Applied Biology* 22: 235-243.
- Grevers, M.C.J.; de Jong, E. 1993. Soil structure and crop yield over a 5-year period following subsoiling Solonetzic and Chernozemic soils in Saskatchewan. *Canadian Journal of Soil Science* 73: 81-91.
- Grigera, G.; Oesterheld, M.; Pacín, F. 2007. Monitoring forage production for farmers' decision making. *Agricultural Systems* 94: 637-648.

- Guerrero-Ramírez, N.R.; Mommer, L.; Freschet, G.T.; Iversen, C.M.; McCoarmack, M.L.; Kattge, J.; Poorter, H.; van der Plas, F.; Bergmann, J.; Kuyper, T. W.; York, L. M.; Bruelheide, H.; Laughlin, D.C.; Meier, I.C.; Roumet, C.; Semchenko, M.; Sweeney, C.J.; van Ruijven, J.; Valverde-Barrantes, O.J.; Aubin, I.;...; Weigelt, A. 2021. Global root traits (GRooT) database. *Global Ecology and Biogeography* 30: 25-37.
- Hall, A.J.; Connor, D.J.; Sadras, V.O. 1995. Radiation-use efficiency of sunflower crops: effects of specific leaf nitrogen and ontogeny. *Field Crops Research* 41: 65-77.
- Harpole, W.S.; Potts, D.L.; Suding, K.N. 2007. Ecosystem responses to water and nitrogen amendment in California grassland. *Global Change Biology* 13: 2341-2348.
- Havill, D.C.; Lee, J.A.; De-Felice, J. 1977. Some factors limiting nitrate utilization in acidic and calcareous grasslands. *New Phytologist* 78: 649-659.
- Hedges, L.V.; Gurevitch, J.; Curtis, P.S. 1999. The meta-analysis of response ratios in experimental ecology. *Ecology* 80: 1150-1156.
- Hoogmoed, M.; Sadras, V.O. 2018. Water stress scatters nitrogen dilution curves in wheat. *Frontiers in Plant Science* 9: 406.
- Hsiao, T.C.; Xu, L.-K. 2000. Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. *Journal of Experimental Botany* 51: 1595-1616.
- Huang, B. 2001. Nutrient accumulation and associated root characteristics in response to drought stress in tall fescue cultivars. *Horticultural Science* 36: 148-152.
- Huang, B.; Fry, J.D. 1998. Root anatomical, physiological, and morphological responses to drought stress for tall fescue cultivars. *Crop Science* 38: 1017-1022.
- Imbellone, P.A.; Giménez, J.E.; Panigatti, J.L. 2010. *Suelos de la Región Pampeana: procesos de formación*. Buenos Aires, Argentina: Ediciones INTA. 320 p.
- Imbellone, P.A.; Taboada, M.A.; Damiano, F.; Lavado, R.S. 2021. Genesis, properties and management of salt-affected soils in the Flooding Pampas, Argentina. In: Taleisnik, E.; Lavado, R.S. (eds.). *Saline and alkaline soils in Latin America: natural resources, management and productive alternatives*. Cham, Switzerland: Springer Nature Switzerland, pp. 191-208.

- Insua, J.R.; Machado, C.F.; García, S.C.; Berone, G.D. 2021. Forage yield gap analysis for tall fescue pastures in Argentina: a modelling approach. *Grass and Forage Science* 76: 245-257.
- Instituto de Suelos (23 de mayo de 2013). Cartografía digital de Suelos y Fotomosaicos Georeferenciados de Buenos Aires. INTA. GeoINTA. <http://www.geointa.inta.gob.ar/2013/05/23/cartografia-digital-de-suelos-y-fotomosaicos-georeferenciados-de-buenos-aires/>
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. (s.f.). Sistema de Información y Gestión Agrometeorológica. Información meteorológica correspondiente a la EEA Balcarce. Recuperado el 16-03-2022. <http://siga2.inta.gob.ar/#/>
- Jackson, R.B.; Canadell, J.; Ehleringer, J.R.; Mooney, H.A.; Sala, O.E.; Schulze, E.-D. 1996. A global analysis of root distributions for terrestrial biomes. *Oecology* 108: 389-411.
- Jamieson, P.D.; Martin, R.J.; Francis, G.S.; Wilson, D.R. 1995. Drought effects on biomass production and radiation use efficiency in barley. *Field Crops Research* 43: 77-86.
- Jiang, Z.; Hull, R.J.; Sullivan, W.M. 2002. Nitrate uptake and reduction in C₃ and C₄ grasses. *Journal of Plant Nutrition* 25: 1303-1314.
- Jones, H.G. 2014. *Plants and microclimate. a quantitative approach to environmental plant physiology*. (3rd ed.). New York, USA: Cambridge University Press. 407 p.
- Justes, E.; Mary, B.; Meynard, J.M.; Machet, J.M.; Thellier-Huché, L. 1994. Determination of a critical nitrogen dilution curve for winter wheat crops. *Annals of Botany* 74: 397-407.
- Karsten, H.D.; MacAdam, J.W. 2001. Effect of drought on growth, carbohydrates, and soil water use by perennial ryegrass, tall fescue, and white clover. *Crop Science* 41: 156-166.
- Keeney, D.R.; Nelson, D.W. 1982. Nitrogen—inorganic forms. In: Page, A.L.; Miller, R.H.; Keeney, D.R. (eds.) *Methods of soil analysis*. Part 2, (2nd ed.). Madison, Wisconsin, USA: ASA-CSSA-SSSA Publishing, pp. 643-698.

- Khasanova, A.; James, J.J.; Drenovsky, R.E. 2013. Impacts of drought on plant water relations and nitrogen nutrition in dryland perennial grasses. *Plant and Soil* 372: 541-552.
- Kikuzawa, K.; Lechowicz, M.J. 2011. *Ecology of leaf longevity*. Tokyo, Japan: Springer. 147 p.
- King, J.; Gay, A.; Sylvester-Bradley, R.; Bingham, I.A.N.; Foulkes, J.; Gregory, P.; Robinson, D. 2003. Modelling cereal root systems for water and nitrogen capture: towards an economic optimum. *Annals of Botany* 91: 383-390.
- Kirschbaum, M.U.F.; Schipper, L.A.; Mudge, P.L.; Rutledge, S.; Puche, N.J.B.; Campbell, D.I. 2017. The trade-offs between milk production and soil organic carbon storage in dairy systems under different management and environmental factors. *Science of the Total Environment* 577: 61-72.
- Koebnick, N.; Schlüter, S.; Blaser, S.R.G.A.; Vetterlein, D. 2018. Root-soil contact dynamics of *Vicia faba* in sand. *Plant and Soil* 431: 417-431.
- Kuppel, S.; Houspanossian, J.; Noretto, M.D.; Jobbágy, E.G. 2015. What does it take to flood the Pampas?: Lessons from a decade of strong hydrological fluctuations. *Water Resources Research* 51: 2937-2950.
- Kvalseth, T.O. 1985. Cautionary note about R^2 . *The American Statistician* 39: 279-285.
- Langholtz, M.; Davison, B.H.; Jager, H.I.; Eaton, L.; Baskaran, L.M.; Davis, M.; Brandt, C.C. 2021. Increased nitrogen use efficiency in crop production can provide economic and environmental benefits. *Science of the Total Environment* 758: 143602.
- Lavado, R.S.; Cairns, R.R. 1980. Solonetzic soil properties and yields of wheat, oats and barley as affected by deep plowing and ripping. *Soil and Tillage Research* 1: 69-79.
- Lavado, R.S.; Taboada, M.A. 1988. Water, salt and sodium dynamics in a natraquoll in Argentina. *Catena* 15: 577-594.
- Lawlor, D.W.; Cornic, G. 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment* 25: 275-294.

- Lelièvre, F.; Seddaiu, G.; Ledda, L.; Porqueddu, C.; Volaire, F. 2011. Water use efficiency and drought survival in Mediterranean perennial forage grasses. *Field Crops Research* 121: 333-342.
- Lemaire, G.; Agnusdei, M. 2000. Leaf tissue turnover and efficiency of herbage utilisation. In: Lemaire, G. et al. (eds.). *Grassland ecophysiology and grazing ecology*. Wallingford, Reino Unido: CAB International, pp. 265-287.
- Lemaire, G.; Charrier, X.; Hébert, Y. 1996. Nitrogen uptake capacities of maize and sorghum crops in different nitrogen and water supply conditions. *Agronomie* 16: 231-246.
- Lemaire, G.; Cruz, P.; Gosse, G.; Chartier, M. 1985. Etude des relations entre la dynamique de prélèvement d'azote et la dynamique de croissance en matière sèche d'un peuplement de luzerne (*Medicago sativa* L.). *Agronomie* 5: 685-692.
- Lemaire, G.; Da Silva, S.C.; Agnusdei, M.; Wade, M.; Hodgson, J. 2009. Interactions between leaf lifespan and defoliation frequency in temperate and tropical pastures: a review. *Grass and Forage Science* 64: 341-353.
- Lemaire, G.; Denoix, A. 1987a. Croissance estivale en matière sèche de peuplements de fétuque élevée (*Festuca arundinacea* Schreb.) et de dactyle (*Dactylis glomerata* L.) dans l'Ouest de la France. I. Etude en conditions de nutrition azotée et d'alimentation hydrique non limitantes. *Agronomie* 7: 373-380.
- Lemaire, G.; Denoix, A. 1987b. Croissance estivale en matière sèche de peuplements de fétuque élevée et de dactyle dans l'Ouest de la France. II —Interactions entre les niveaux d'alimentation hydrique et de nutrition azotée. *Agronomie* 7: 381-389.
- Lemaire, G.; Durand, J.L.; Lila, M. 1989. Effet de la sécheresse sur la digestibilité in vitro, la teneur en ADF et la teneur en azote de la luzerne (*Medicago sativa* L.). *Agronomie* 9: 841-848.
- Lemaire, G.; Gastal, F. 1997. N uptake and distribution in plant canopies. In: Lemaire, G. (ed.). *Diagnosis on the nitrogen status in crops*. Heidelberg, Alemania: Springer-Verlag, pp. 3-43.
- Lemaire, G.; Gastal, F.; Salette, J. 1989. *Analysis of the effect of N nutrition on dry matter yield of a sward by reference to potential yield and optimum N content*. Proceedings XVI International Grassland Congress, Nice, France: pp.179-180.

- Lemaire, G.; Meynard, J.M. 1997. Use of the Nitrogen Nutrition Index for the analysis of agronomical data. In: Lemaire, G. (ed.). *Diagnosis on the nitrogen status in crops*. Heidelberg, Alemania: Springer-Verlag, pp. 44-58.
- Lemaire, G.; Salette, J. 1984a. Relation entre dynamique de croissance et dynamique de prélèvement d'azote pour un peuplement de graminées fourragères. I Etude de l'effet du milieu. *Agronomie 4*: 423-430.
- Lemaire, G.; Salette, J. 1984b. Relation entre dynamique de croissance et dynamique de prélèvement d'azote pour un peuplement de graminées fourragères. II Etude de la variabilité entre génotypes. *Agronomie 4*: 431-436.
- Littel, R.C.; Milliken, G.A.; Stroup, W.W.; Wolfinger, R.D.; Schabenberger, O. 2006. *SAS® for Mixed Models*. (2nd ed.). Cary, NC, USA: SAS Institute. 828 p.
- Littell, R.C.; Stroup, W.W.; Freund, R.J. 2002. *SAS for linear models*. (4th ed.). Cary, NC, USA: SAS Institute. 492 p.
- Liu, Z.; Dickmann, D.I. 1996. Effects of water and nitrogen interaction on net photosynthesis, stomatal conductance, and water-use efficiency in two hybrid poplar clones. *Physiologia Plantarum 97*: 507-512.
- Liu, M.; Hulting, A.; Mallory-Smith, C. 2017. Comparison of growth and physiological characteristics between roughstalk bluegrass and tall fescue in response to simulated waterlogging. *PLoS One 12*: e0182035.
- MacAdam, J.; Volenec, J.; Nelson, C. 1989. Effects of nitrogen on mesophyll cell division and epidermal cell elongation in tall fescue leaf blades. *Plant Physiology 89*: 549-556.
- Macy, P. 1936. The quantitative mineral nutrient requirements of plants. *Plant Physiology 11*: 749-764.
- Maddaloni, J.; Ferrari, L. 2001. *Festuca alta*. En: Maddaloni, J.; Ferrari, L. (eds.). Forrajeras y pasturas del ecosistema templado húmedo de la Argentina. Buenos Aires, Argentina: Ediciones INTA, pp. 165-182.
- Makowski, D.; Zhao, B.; Ata-UI-Karim, S.T.; Lemaire, G. 2020. Analyzing uncertainty in critical nitrogen dilution curves. *European Journal of Agronomy 118*: 126076.

- Marino, M.A.; Agnusdei, M.G. 2007. *Manejo estacional del suministro de nitrógeno en pasturas de Festuca arundinacea Schreb. (sudeste bonaerense, Argentina): crecimiento y eficiencia de uso de los recursos*. Proceedings of the 20th Meeting of the Latin-American Association of Animal Production, Cuzco, Perú.
- Matin, M.A.; Brown, J.H.; Ferguson, H. 1989. Leaf water potential, relative water content, and diffusive resistance as screening techniques for drought resistance in barley. *Agronomy Journal* 81: 100-105.
- McCallum, M.H.; Kirkegaard, J.A.; Green, T.W.; Cresswell, H.P.; Davies, S.L.; Angus, J.F.; Peoples, M.B. 2004. Improved subsoil macroporosity following perennial pastures. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 44: 299-307.
- McDowell, N.G. 2011. Mechanisms linking drought, hydraulics, carbon metabolism, and vegetation mortality. *Plant Physiology* 155: 1051-1059.
- Miaczynski, C. 1995. Los suelos hidromórficos e hidrohalomórficos de la provincia de Buenos Aires. *Revista de la Facultad de Agronomía (UBA)* 15: 23-36.
- Milne, G. 2009. *Management in New Zealand, Australia and South America*. In: Fribourg, H.; Hannaway, D.; West, C. (eds.). Tall Fescue for the 21st Century. Madison, Wisconsin, USA: ASA-CSSA-SSSA Publishing, pp. 101-117.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. (21 de abril de 2022). *Stock Bovino por departamento y estratificación al 31-12 (2007-2021)* [Archivo PDF] En: Bovinos. Información de interés. Informes. https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/bovinos/informacion_interes/informes/index.php
- Mitchell, M.; Muftakhidinov, B.; Winchen, T. 2021. *Engauge Digitizer Software*. Webpage: <http://markummitchell.github.io/engauge-digitizer>. Accessed: 16-04-2021.
- Modernel, P.; Rossing, W.A.H.; Corbeels, M.; Dogliotti, S.; Picasso, V.; Tiftonell, P. 2016. Land use change and ecosystem service provision in Pampas and Campos grasslands of southern South America. *Environmental Research Letters* 11: 113002.
- Monteith, J.L. 1977. Climate and the efficiency of crop production in Britain. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 281: 277-294.

- Morrás, H.J.M. 2017. *Propiedades químicas y físicas de suelos halomórficos de la fracción norte de los Bajos Submeridionales*. En: Taleisnik, E.; Lavado, R.S. (eds.). *Ambientes salinos y alcalinos de la Argentina: recursos y aprovechamiento productivo*. Buenos Aires, Argentina: Orientación Gráfica Editora, pp. 29-54.
- Muchow, R.C. 1989. Comparative productivity of maize, sorghum and pearl millet in a semi-arid tropical environment. II. Effect of water deficits. *Field Crops Research* 20: 207-219.
- Müller, G.V.; Lovino, M.A.; Sgroi, L.C. 2021. Observed and projected changes in temperature and precipitation in the core crop region of the Humid Pampa, Argentina. *Climate* 9: 40.
- Myrold, D.D.; Bottomley, P.J. 2008. Nitrogen mineralization and immobilization. In: Schepers, J.S.; Raun, W. (eds.). *Nitrogen in agricultural systems*. Madison, Wisconsin, USA: ASA-CSSA-SSSA Publishing, pp. 157-172.
- National Renewable Energy Laboratory. 2021. Data and tools; National Solar Radiation Database Data Viewer. <https://maps.nrel.gov/nsrdb-viewer/>. Accessed: 20-06-2021.
- Nelson, D.W.; Sommers, L.E. 1973. Determination of total nitrogen in plant material. *Agronomy Journal* 65: 109-112.
- Neves Lopes, M.; Feitosa de Lacerda, C.; Duarte Cândido, M.J.; Fernandes Franco Pompeu, R.C.; da Silva, R.G.; Batista Lopes, J.W.; Belem Fernandes. F.R.; Lima Bezerra, F.M. 2011. Gas exchange in massai grass under five nitrogen fertilization levels during establishment and regrowth. *Revista Brasileira de Zootecnia* 40: 1862-1869.
- Norton, J.M. 2008. *Nitrification in agricultural soils*. In: Schepers, J.S.; Raun, W. (eds.). *Nitrogen in agricultural systems*. Madison, Wisconsin, USA: ASA-CSSA-SSSA Publishing, pp. 173-200.
- Norton, M.R.; Malinowski, D.P.; Volaire, F. 2016. Plant drought survival under climate change and strategies to improve perennial grasses. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 36: 29.

- Nosetto, M.D.; Jobbágy, E.G.; Jackson, R.B.; Sznaider, G.A. 2009. Reciprocal influence of crops and shallow ground water in sandy landscapes of the inland Pampas. *Field Crops Research* 113: 138-148.
- Oesterheld, M. 1992. Effect of defoliation intensity on aboveground and belowground relative growth rates. *Oecology* 92: 313-316.
- Oliver, I.C.; Knox, O.G.G.; Flavel, R.J.; Wilson, B.R. 2021. Rhizosphere legacy: plant root interactions with the soil and its biome. In: Gupta, V.V.S.R.; Sharma, A.K.S. (eds.). *Rhizosphere biology: Interactions between microbes and plants*. Singapore, Singapore: Springer, pp. 129-154.
- Onillon, B.; Durand, J.L.; Gastal, F.; Tournebize, R. 1995. Drought effects on growth and carbon partitioning in a tall fescue sward grown at different rates of nitrogen fertilization. *European Journal of Agronomy* 4: 91-99.
- Otegui, M. 2018. Vacuolar degradation of chloroplast components: autophagy and beyond. *Journal of Experimental Botany* 69: 741-750.
- Otondo, J.; Jacobo, E.J.; Taboada, M.A. 2015. Mejora de propiedades físicas por el uso de especies megatérmicas en un suelo sódico templado. *Ciencia del Suelo* 33: 119-130.
- Otoo, E.; Ishii, R.; Kumura, A. 1989. Interaction of nitrogen supply and soil water stress on photosynthesis and transpiration in rice. *Japan Journal of Crop Science* 58: 424-429.
- Oyarzabal, M.; Andrade, B.; Pillar, V.D.; Paruelo, J.M. 2020. Temperate subhumid grasslands of southern South America. In: Di Paolo, D. (ed.). *Encyclopedia of the World's Biomes*. Países Bajos: Elsevier, pp. 1-17.
- Oyewole, O.A.; Inselsbacher, E.; Näsholm, T. 2014. Direct estimation of mass flow and diffusion of nitrogen compounds in solution and soil. *New Phytologist* 201: 1056-1064.
- Palta, J.; Watt, M. 2009. Vigorous crop root systems: form and function for improving the capture of water and nutrients. In: Sadras, V.O.; Calderini, D.F. (eds.). *Crop physiology: applications for genetic improvement and agronomy*. Burlington, Massachusetts, USA: Elsevier, pp. 309-326.

- Paruelo, J.M.; Jobbágy, E.G.; Oesterheld, M.; Golluscio, R.A.; Aguiar, M.R. 2007. The grasslands and steppes of Patagonia and the Rio de la Plata Plains. En: Veblen, T.; Young, K.; Orme, A. (eds.). *The physical geography of South America*. Oxford, Reino Unido: Oxford University Press, pp. 232-248.
- Passioura, J.B. 2002. Soil conditions and plant growth. *Plant, Cell and Environment* 25: 311-318.
- Pathak, H.; Rao, D.L.N. 1998. Carbon and nitrogen mineralization from added organic matter in saline and alkali soils. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 695-702.
- Peinemann, N.; Guggenberger, G.; Zech, W. 2005. Soil organic matter and its lignin component in surface horizons of salt-affected soils of the Argentinian Pampa. *Catena* 60: 113-128.
- Perniola, M.; Posca, G.; Candido, V.; Tarantino, E. 1999. Gas exchange in greenhouse grown pepper under nitrogen and water stress. *Cahiers Options Méditerranéennes* 31: 263-273.
- Pierret, A.; Maeght, J.L.; Clément, C.; Montoroi, J.P.; Hartmann, C.; Gonkhamdee, S. 2016. Understanding deep roots and their functions in ecosystems: an advocacy for more unconventional research. *Annals of Botany* 118: 621-635.
- Pierret, A.; Moran, C.J.; Doussan, C. 2005. Conventional detection methodology is limiting our ability to understand the roles and functions of fine roots. *New Phytologist* 166: 967-980.
- Plénet, D.; Lemaire, G. 2000. Relationships between dynamics of nitrogen uptake and dry matter accumulation in maize crops. Determination of critical N concentration. *Plant and Soil* 216: 65-82.
- Ploschuk, R.A.; Grimoldi, A.A.; Ploschuk, E.L.; Striker, G.G. 2017. Growth during recovery evidences the waterlogging tolerance of forage grasses. *Crop and Pasture Science* 68: 574-582.
- Poirier, M.; Durand, J.L.; Volaire, F. 2012. Persistence and production of perennial grasses under water deficits and extreme temperatures: importance of intraspecific vs. interspecific variability. *Global Change Biology* 18: 3632-3646.

- Poorter, H.; Niklas, K.J.; Reich, P.B.; Oleksyn, J.; Poot, P.; Mommer, L. 2012. Biomass allocation to leaves, stems and roots: Meta-analyses of interspecific variation and environmental control. *New Phytologist* 193: 30-50.
- Posse, G.; Oesterheld, M.; Di Bella, C.M. 2005. Landscape, soil and meteorological influences on canopy dynamics of northern flooding Pampa grasslands, Argentina. *Applied Vegetation Science* 8: 49-56.
- Prior, L.D.; Eamus, D.; Duff, G.A. 1997. Seasonal and diurnal patterns of carbon assimilation, stomatal conductance and leaf water potential in *Eucalyptus tetrodonta* saplings in a wet-dry savanna in northern Australia. *Australian Journal of Botany* 45: 241-258.
- Qadir, M.; Oster, J.D.; Schubert, S.; Noble, A.D.; Sahrawat, K.L. 2007. Phytoremediation of sodic and saline-sodic soils. *Advances in Agronomy* 96: 197-247.
- Radin, J.W.; Ackerson, R.C. 1981. Water relations of cotton plants under nitrogen deficiency. III. Stomatal conductance, photosynthesis, and abscisic acid accumulation. *Plant Physiology* 67: 115-119.
- Ray, I.M.; Sisson, W.B. 1986. Nitrate reductase activity of kleingrass (*Panicum coloratum* L.) during drought in the northern Chihuahuan Desert. *Journal of Range Management* 39: 531-535.
- Ray, J.D.; Sinclair, T.R. 1998. The effect of pot size on growth and transpiration of maize and soybean during water deficit stress. *Journal of Experimental Botany* 49: 1381-1386.
- Ren, H.; Xu, Z.; Huang, J.; Clark, C.; Chen, S.; Han, X. 2011. Nitrogen and water addition reduce leaf longevity of steppe species. *Annals of Botany* 107: 145-155.
- Rietz, D.N.; Haynes, R.J. 2003. Effects of irrigation-induced salinity and sodicity on soil microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry* 35: 845-854.
- Ristova, D.; Carré, C.; Pervent, M.; Medici, A.; Kim, G.J.; Scalia, D.; Ruffel, S.; Birnbaum, K.D.; Lacombe, B.; Busch, W. 2016. Combinatorial interaction network of transcriptomic and phenotypic responses to nitrogen and hormones in the *Arabidopsis thaliana* root. *Science Signaling* 9: rs13.
- Ritchie, J.T. 1972. Model for predicting evaporation from a row crop with incomplete cover. *Water Resources Research* 8: 1204-1213.

- Ritchie, J.T. 1981. Soil water availability. *Plant and Soil* 58: 327-338.
- Robson, M.J. 1972. The effect of temperature on the growth of S. 170 tall fescue (*Festuca arundinacea*). I. Constant temperature. *Journal of Applied Ecology* 9: 643-653.
- Röös, E.; Bajželj, B.; Smith, P.; Patel, M.; Little, D.; Garnett, T. 2017. Greedy or needy? Land use and climate impacts of food in 2050 under different livestock futures. *Global Environmental Change* 47: 1-12.
- Rosenberg, M.S.; Rothstein, H.R.; Gurevitch, J. 2013. Effect sizes: conventional choices and calculations. In: Koricheva, J.; Gurevitch, J.; Mengersen, K. (eds.) *Handbook of meta-analysis in ecology and evolution*. Princeton, New Jersey, USA: Princeton University Press, pp. 61-71.
- Rubio, G.; Taboada, M.A. 2013. Árbol de decisión para diagnosticar la capacidad productiva de suelos de la región pampeana. *Ciencia del Suelo* 31: 235-243.
- Sadras, V.O.; Lemaire, G. 2014. Quantifying crop nitrogen status for comparisons of agronomic practices and genotypes. *Field Crops Research* 164: 54-64.
- Sage, R.F.; Pearcy, R.W. 1987. The nitrogen use efficiency of C₃ and C₄ plants. II. Leaf nitrogen effects on the gas exchange characteristics of *Chenopodium album* (L.) and *Amaranthus retroflexus* (L.). *Plant Physiology* 84: 959-963.
- Salette, J.; Lemaire G. 1981. Sur la variation de la teneur en azote des graminées fourragères pendant leur croissance: formulation d'une loi de dilution. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris* 292: 875-878.
- Salvagiotti, F.; Miralles, D.J. 2008. Radiation interception, biomass production and grain yield as affected by the interaction of nitrogen and sulphur fertilisation in wheat. *European Journal of Agronomy* 28: 282-290.
- SAS. 2015a. The ANOVA Procedure. In: SAS/STAT®14.1 User's Guide. Cary, NC, USA: SAS Institute, pp. 972-1024.
- SAS. 2015b. The MIXED Procedure. In: SAS/STAT®14.1 User's Guide. Cary, NC, USA: SAS Institute, pp. 6048-6234.
- SAS. 2015c. The NLIN Procedure. In: SAS/STAT®14.1 User's Guide. Cary, NC, USA: SAS Institute, pp. 6410-6514.

- SAS. 2015d. The REG Procedure. In: SAS/STAT®14.1 User's Guide. Cary, NC, USA: SAS Institute, pp. 7834-8013.
- Scarpati, O.E.; Capriolo, A.D. 2013. Sequías e inundaciones en la provincia de Buenos Aires (Argentina) y su distribución espacio-temporal. *Investigaciones Geográficas, Boletín del Instituto de Geografía (UNAM) 82: 38-51.*
- Schäfer, R.B.; Piggott, J.J. 2018. Advancing understanding and prediction in multiple stressor research through a mechanistic basis for null models. *Global Change Biology 24: 1817-1826.*
- Scheneiter, J.O.; Kaufmann, I.I.; Ferreyra, A.R.; Llorente, R.T. 2015. The herbage productivity of tall fescue in the Pampas region of Argentina is correlated to its ecological niche. *Grass and Forage Science 71: 403-412.*
- Scheurwater, I.; Koren, M.; Lambers, H.; Atkin, O.K. 2002. The contribution of roots and shoots to whole plant nitrate reduction in fast- and slow-growing grass species. *Journal of Experimental Botany 53: 1635-1642.*
- Schnyder, H.; Schwertl, M.; Auerswald, K.; Schäufele, R. 2006. Hair of grazing cattle provides an integrated measure of the effects of site conditions and interannual weather variability on $\delta^{13}\text{C}$ of temperate humid grassland. *Global Change Biology 12: 1315-1329.*
- Scholander, P.F.; Hammel, H.T.; Bradstreet, E.D.; Hemmingsen, E.A., 1965. Sap pressure in vascular plants. *Science 148: 339-346.*
- Sellin, A. 1999. Does pre-dawn water potential reflect conditions of equilibrium in plant and soil water status? *Acta Oecologica 20: 51-59.*
- Shaimi, N.; Kallida, R.; Volaire, F.; Saidi, N.; Al Faiz, C. 2009. Summer dormancy and drought survival of Moroccan ecotypes of orchardgrass. *Crop Science 49: 1416-1424.*
- Shangguan, Z.; Shao, M.; Dyckmans, J. 2000. Effects of nitrogen nutrition and water deficit on net photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in winter wheat. *Journal of Plant Physiology 156: 46-51.*
- Sharifiamina, S.; Moot, D.J.; Bloomberg, M. 2016. Calculating "Hydrothermal time" to quantify seed germination of tall fescue. *Journal of New Zealand Grasslands 78: 163-168.*

- Sih, A.; Englund, G.; Wooster, D. 1998. Emergent impacts of multiple predators on prey. *Trends in Ecology and Evolution* 13: 350-355.
- Sinclair, T.R.; Muchow, R.C. 1999. Radiation use efficiency. *Advances in Agronomy* 65: 215-265.
- Sinclair, T.R.; Ruffy, T.W. 2012. Nitrogen and water resources commonly limit crop yield increases, not necessarily plant genetics. *Global Food Security* 1: 94-98.
- Smucker, A.J.M.; McBurney, S.L.; Srivastava, A.K. 1982. Quantitative separation of roots from compacted soil profiles by the hydropneumatic elutriation system. *Agronomy Journal* 7: 500-503.
- Soil Survey Staff. 2014. *Keys to soil taxonomy*. (12th ed.). Washington, DC, USA: USDA Natural Resources Conservation Service. 362 p.
- Sonohat, G.; Sinoquet, H.; Varlet-Grancher, C.; Rakocevic, M.; Jacquet, A.; Simon, J.-C.; Adam, B. 2002. Leaf dispersion and light partitioning in three-dimensionally digitized tall fescue-white clover mixtures. *Plant, Cell and Environment* 25: 529-538.
- Spollen, W.G.; Sharp, R.E.; Saab, I.N.; Wu, Y. 1993. Regulation of cell expansion in roots and shoots at low water potentials. In: Smith, J.A.C.; Griffiths, H. (eds.). *Water deficits, plant responses from cell to community*. Oxford, Reino Unido: Bios Scientific Publishers, pp. 37-52.
- Stephens, A.E.A.; Srivastava, D.S.; Myers, J.H. 2013. Strength in numbers? Effects of multiple natural enemy species on plant performance. *Proceedings of the Royal Society of London B* 280: 20122756.
- Suero, E.E.; Travasso, M.I. (12-16 de septiembre de 1988). Medición del contenido de agua en suelos. Métodos de radiación. Actas XII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Corrientes, Argentina.
- Sun, J.; Meyer, W.; Cross, J.; Huang, B. 2013. Growth and physiological traits of canopy and root systems associated with drought resistance in tall fescue. *Crop Science* 53: 575-584.
- Szabolcs, I. (15-20 de junio de 1988). Solonetz soils. Proceedings of the International Symposium on Solonetz Soils. Osijek, Yugoslavia:

- Tardieu, F.; Reymond, M.; Hamard, P.; Granier, C.; Muller, B. 2000. Spatial distributions of expansion rate, cell division rate and cell size in maize leaves: a synthesis of the effects of soil water status, evaporative demand and temperature. *Journal of Experimental Botany* 51: 1505-1514.
- Tinker, P.B.; Nye, P.H. 2000. *Solute movement in the rhizosphere*. New York, USA: Oxford University Press. 464 p.
- Ulrich, A. 1952. Physiological bases for assessing the nutritional requirements of plants. *Annual Review of Plant Physiology* 3: 207-228.
- van Noordwijk, M. 1983. Functional interpretation of root densities in the field for nutrient and water uptake. In: Böhm, W.; Kutschera, L.; Lichtenegger, E. (eds.). *Root ecology and its practical application: International Symposium Gumpenstein 1982*. Bundesanstalt Gumpenstein, Irdning, Austria, pp. 207-226.
- Varlet-Grancher, C.; Bonhomme, R.; Chartier, M.; Artis, P. 1982. Efficience de la conversion de l'énergie solaire par un couvert végétal. *Oecologia Plantarum* 3: 3-26.
- Vazquez, P.; Costa, J.L.; Monterubbianesi, G.; Godz, P. 2001. Predicción de la productividad primaria de pastizales naturales de la Pampa Deprimida utilizando propiedades del horizonte A. *Ciencia del Suelo* 19: 136-143.
- Vázquez, P.; Masuelli, S.; Platzeck, G., Boolsen, O. 2011. Recurrencia de anegamiento en la Pampa Deprimida, Provincia de Buenos Aires. En: Rivas, R.; Carmona, F.; Ocampo, D. (eds.). *Teledetección: Recientes aplicaciones en la Región Pampeana*. Mar del Plata, Argentina: Editorial Martín, pp. 31-46.
- Viglizzo, E.F.; Lértora, F.; Pordomingo, A.J.; Bernardos, J.N.; Roberto, Z.E.; Del Valle, H. 2001. Ecological lessons and applications from one century of low external-input farming in the pampas of Argentina. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 83: 65-81.
- Volaire, F.; Thomas, H.; Lelievre, F. 1998. Survival and recovery of perennial forage grasses under prolonged Mediterranean drought. *New Phytologist* 140: 439-449.
- Volenc, J.J. 1986. Nonstructural carbohydrates in stem base components of tall fescue during regrowth. *Crop Science* 26: 122-127.

- Volenc, J.J.; Nelson, C.J. 1984. Carbohydrate metabolism in leaf meristems of tall fescue. II. Relationship to leaf elongation rates modified by nitrogen fertilization. *Plant Physiology* 74: 595-600.
- Weisz, R.; Kaminski, J.; Smilowitz, Z. 1994. Water deficit effects on potato leaf growth and transpiration: utilizing fraction extractable soil water for comparison with other crops. *American Potato Journal* 71: 829-840.
- Wong, V.N.L.; Greene, R.S.B.; Dalal, R.C.; Murphy, B.W. 2010. Soil carbon dynamics in saline and sodic soils: a review. *Soil Use and Management* 26: 2-11.
- Yan, W.; Hunt, L. 1999. An equation for modelling the temperature response of plants using only the cardinal temperatures. *Annals of Botany* 84: 607-614.
- Yang, J.; Hammer, R.D.; Blanchar, R.W. 2003. Minirhizotron quantification of soybean root growth as affected by reduced A horizon in soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 166: 708-711.
- Zhao, Y.; Fernandez, G.C.J.; Bowman, D.C.; Nowak, R.S. 1994. Selection criteria for drought-resistance breeding in turfgrass. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 119: 1317-1324.
- Ziadi, N.; Bélanger, G.; Claessens, A.; Lefebvre, L.; Cambouris, A.N.; Tremblay, N.; Nolin, M.C.; Parent, L.-É. 2010. Determination of a critical nitrogen dilution curve for spring wheat. *Agronomy Journal* 102: 241-250.
- Ziadi, N.; Brassard, M.; Bélanger, G.; Cambouris, A.N.; Tremblay, N.; Nolin, M.C.; Claessens, A.; Parent, L.-É. 2008. Critical nitrogen curve and nitrogen nutrition index for corn in eastern Canada. *Agronomy Journal* 100: 271-276.
- Zwicke, M.; Picon-Cochard, C.; Morvan-Bertrand, A.; Prud'homme, M.P.; Volaire, F. 2015. What functional strategies drive drought survival and recovery of perennial species from upland grassland? *Annals of Botany* 116: 1001-1015.

APÉNDICE

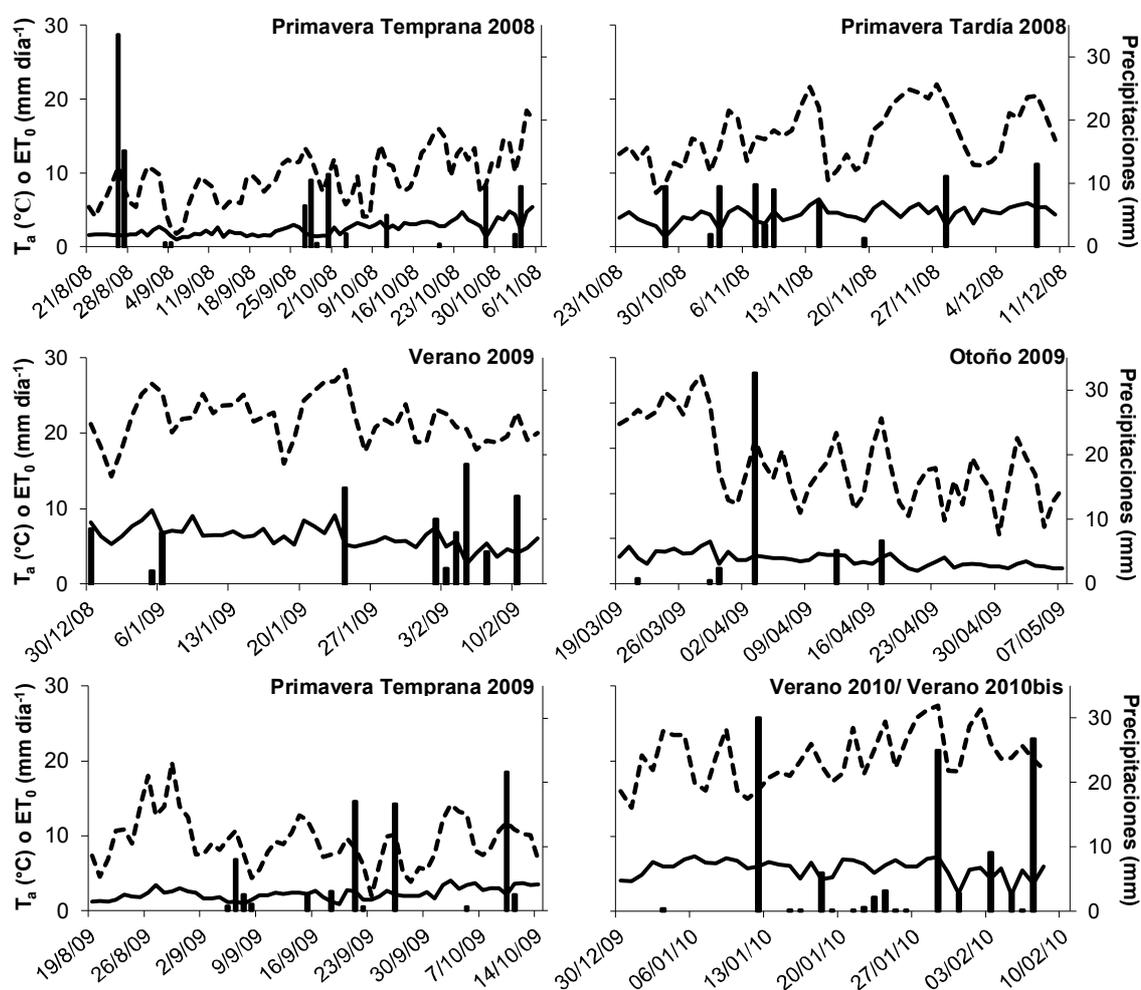


Figura I. Evolución de los valores diarios de temperatura media del aire (T_a , línea discontinua, eje y izquierdo), Evapotranspiración de Referencia (ET_0 , línea continua, eje y izquierdo) y precipitaciones (barras, eje y derecho) registrados en los experimentos de campo que formaron parte de los Capítulos 2 y 3.

Tabla I. Valores medios de biomasa aérea (BA) y su concentración de N, BA crítica (BA_{cr}), concentración crítica de N (N_{cr}) y valor de N_{cr} de Referencia propuesto por Lemaire y Salette (1984a, Ref- N_{cr}) medidos en festuca alta en cada fecha de muestreo de cinco experimentos en seco y dos experimentos bajo riego que formaron parte del Capítulo 2.

Experimento	Fecha de muestreo (°Cd ¹)	Nivel de N	BA	Concentración de N en la BA	BA_{cr}	N_{cr}	Ref- N_{cr}
		kg ha ⁻¹	Mg ha ⁻¹	g N kg ⁻¹ MS ²	Mg ha ⁻¹	—g N kg ⁻¹ MS—	
Primavera Temprana 2008	14/10/08 (227)	0	1.97a ³	10.92	4.54	26.56	29.58
		75	2.71b	13.38			
		150	4.61c	15.33			
		225	4.46c	22.40			
	21/10/08 (289)	0	2.14a	13.37	4.57	25.88	29.52
		75	2.50a	13.44			
		150	3.38b	15.33			

		225	4.57c	16.17			
	28/10/08	0	2.32a	11.13	5.04	14.30 ⁴	28.61
	(339)	75	2.39a	12.53			
		150	4.09b	13.69			
		225	5.04c	14.56			
	5/11/08	0	2.02a	12.14	4.88	10.57 ⁴	28.90
	(417)	75	2.78ab	11.90			
		150	3.44b	11.83			
		225	4.88c	14.81			
Primavera Tardía 2008	5/11/08	0	0.95a	16.66		n.c. ⁵	
	(122)	75	1.37a	22.26			
		150	1.64a	21.77			
		225	n.d. ⁶	n.d. ⁶			
	11/11/08	0	0.47a	18.41	1.06	38.70	41.70
	(186)	75	0.72b	28.63			
		150	0.94c	27.72			
		225	1.06d	29.75			
	18/11/08	0	1.20a	15.40	2.69	31.42	34.97
	(280)	75	1.68b	21.63			
		150	1.94c	23.52			
		225	2.69d	26.74			
25/11/08	0	1.13a	16.66	2.70	23.85	34.93	
(357)	75	2.15b	21.84				
	150	1.47a	23.59				
	225	2.70c	25.90				
2/12/08	0	0.89a	15.68	2.19	15.68	37.35	
(443)	75	2.19b	20.23				
	150	2.04b	22.82				
	225	2.33b	22.54				
10/12/08	0	1.27a	11.83	2.32	22.57	36.67	
(544)	75	2.38b	18.41				
	150	2.24b	21.49				
	225	2.34b	18.27				
Otoño 2009	26/3/09	0	0.64a	27.02	0.91	40.49	41.70
	(121)	75	0.63a	29.82			
		150	0.88b	31.85			
		225	0.93b	27.86			
	1/4/09	0	0.88a	28.28	1.23	34.3	41.70
	(192)	75	1.11ab	32.20			
		150	1.31b	36.68			
		225	1.28b	38.08			
	8/4/09	0	1.00a	21.98	1.50	34.57	41.70
	(250)	75	1.17ab	26.32			
		150	1.41bc	30.10			
		225	1.59c	32.48			
	20/4/08	0	1.14a	23.10	1.87	26.57	39.29
	(349)	75	1.25ab	23.94			
		150	1.52b	26.32			
		225	1.87c	31.36			
	28/4/09	0	1.34a	19.11	2.05	18.96	38.15
	(407)	75	1.88ab	21.49			
		150	2.24b	23.80			
		225	2.03b	28.84			
	7/5/09	0	1.09a	18.34	2.56	18.00	35.53
	(465)	75	1.90b	18.34			
		150	2.47bc	23.10			
		225	2.65c	25.20			
Primavera Temprana 2009	10/9/09	0	0.72a	25.20	1.42	43.96	41.70
	(181)	75	1.38ab	31.50			
		150	1.72b	35.00			
		350	1.21ab	40.88			
		500	1.35ab	41.02			
	17/9/09	0	1.20a	20.16	2.18	37.66	37.46

	(236)	75	1.71ab	22.12			
		150	2.45c	35.21			
		350	1.90bc	38.99			
		500	1.76ab	43.33			
	23/9/09	0	0.92a	18.13	2.30	36.78	36.76
	(263)	75	1.92bc	23.10			
		150	1.61b	27.58			
		350	2.46c	36.40			
		500	2.53c	39.20			
	29/9/09	0	0.94a	17.36	3.97	29.18	30.88
	(287)	75	1.68ab	19.32			
		150	2.52c	24.85			
		350	3.83cd	34.16			
		500	4.10d	38.57			
	6/10/09	0	1.04a	15.96	4.09	27.56	30.61
	(346)	75	1.58a	23.17			
		150	3.48b	25.20			
		350	4.07bc	29.54			
		500	4.10c	31.99			
	14/10/09	0	1.52a	22.26	3.89	26.01	31.08
	(404)	75	2.66b	17.22			
		150	3.29c	21.58			
		350	3.88d	24.78			
		500	3.89d	24.71			
Verano 2010	13/1/10	0	0.96a	15.00		n.c.	
	(238)	75	1.16a	24.22			
		150	1.03a	28.26			
		350	1.11a	30.77			
		500	0.98a	32.27			
	20/1/10	0	0.89a	18.05	1.42	33.87	41.70
	(349)	75	1.29b	29.44			
		150	1.48b	30.66			
		350	1.49b	32.75			
		500	1.41b	35.80			
	26/1/10	0	1.10ab	16.32	1.47	30.17	41.70
	(452)	75	0.98a	25.05			
		150	1.42ab	30.33			
		350	1.77b	32.45			
		500	1.58ab	31.88			
	1/2/10	0	1.41a	15.46	3.37	25.54	32.54
	(566)	75	2.95b	18.86			
		150	3.34b	26.97			
		350	3.75b	28.98			
		500	3.44b	30.84			
	8/2/10	0	1.83a	15.44	4.06	27.55	30.75
	(691)	75	2.85b	19.90			
		150	3.63c	24.61			
		350	4.16d	29.63			
		500	3.95d	30.28			
Primavera Temprana 2009 bajo riego	10/9/09	0	0.71a	17.64	1.09	48.81	41.72
	(181)	75	1.10c	30.87			
		150	0.95b	39.76			
		350	1.08c	38.78			
		500	0.96b	40.46			
	17/9/09	0	1.21a	16.94	2.51	31.73	35.76
	(236)	75	2.13b	24.64			
		150	2.36bc	27.30			
		350	2.80c	35.00			
		500	2.37bc	35.70			
	23/9/09	0	1.37a	15.89	2.36	36.26	36.47
	(263)	75	2.26b	23.31			
		150	2.34b	24.85			

		350	2.28b	30.17			
		500	2.56b	36.75			
	29/9/09 (287)	0	1.82a	14.14	3.11	27.46	33.39
		75	2.44ab	19.74			
		150	2.83bc	17.78			
		350	3.36c	30.35			
		500	3.14bc	31.92			
	6/10/09 (346)	0	1.41a	18.90	3.72	30.27	31.53
		75	2.33b	18.99			
		150	3.42c	21.00			
		350	3.84c	26.91			
		500	3.90c	26.46			
	14/10/09 (404)	0	1.70a	19.04	4.43	24.10	29.81
		75	3.53c	18.83			
		150	2.92b	17.99			
		350	3.93c	23.94			
		500	4.43d	27.30			
Verano 2010 bajo riego	13/1/10 (238)	0	1.15a	15.33		n.c.	
		75	1.44a	24.60			
		150	1.57a	31.86			
		350	1.48a	36.92			
		500	1.58a	33.90			
	20/1/10 (349)	0	1.18a	14.99	2.25	38.41	37.03
		75	1.79b	21.11			
		150	2.25c	29.40			
		350	1.93b	36.26			
		500	1.91b	34.24			
	26/1/10 (452)	0	1.09a	14.31	3.49	32.41	31.39
		75	2.12b	18.94			
		150	3.23c	26.46			
		350	3.77d	30.97			
		500	3.20c	31.28			
	1/2/10 (566)	0	2.70a	12.02	5.49	30.69	27.83
		75	5.71c	15.73			
		150	5.27bc	20.34			
		350	4.82b	27.85			
		500	4.93b	26.11			
	8/2/10 (691)	0	2.06a	12.46	6.30	23.34	26.63
		75	4.31b	16.25			
		150	5.08c	20.08			
		350	6.52d	26.75			
		500	6.08d	25.69			

¹Grados día de crecimiento desde el inicio del experimento (temperatura base del aire de 4°C).

²Materia seca.

³En cada fecha de muestreo, valores medios seguidos de la misma letra no difirieron significativamente de acuerdo con el test de la Diferencia Mínima Significativa (0.10).

⁴Valores de N_{cr} no considerados posteriormente en el análisis (en las últimas tres fechas de muestreo de Primavera Temprana 2008 todos los tratamientos difirieron en su acumulación de BA, de modo que no hubo certeza de que el máximo nivel de N ensayado hubiera permitido un crecimiento potencial. Pero dado que el N_{cr} estimado en la fecha de muestreo del 21/10/2008 fue cercano al Ref- N_{cr} , ésta fecha de muestreo no fue eliminada del análisis).

⁵El N_{cr} no fue estimado (las medias de BA no difirieron entre tratamientos).

⁶No disponible.