

**Bases del control del comportamiento anual o bienal en el cultivo
oleaginoso *Oenothera biennis***

*Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires,
Área Producción Vegetal*

Raúl Giménez

Ingeniero agrónomo – Universidad de Buenos Aires - 2005

Lugar de trabajo: Cátedra de Cultivos Industriales, Facultad de Agronomía.
Universidad de Buenos Aires



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires

COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Edmundo Leonardo Ploschuk

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Magister Scientiae en Producción Vegetal (UBA)

Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Consejero de Estudios

Héctor Daniel Bertero

Biólogo (Universidad Nacional de Córdoba)

Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Consejero de Estudios

Daniel Marcelo Sorlino

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Magister Scientificaliae en Agrometeorología (UBA)

JURADO DE TESIS

Director de tesis

Edmundo Leonardo Ploschuk

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Magister Scientiae en Producción Vegetal (UBA)

Doctor de la Universidad de Buenos Aires

JURADO

Daniel Julio Miralles

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Doctor de la Universidad de Buenos Aires

JURADO

Peter S. Searles

BS in Biology (University of Maryland)

Master in Ecology (Utah State University)

PhD in Ecology (Utah State University)

Fecha de defensa de la tesis: 23 de Agosto de 2010

A mi Pai

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer a Edy, mi director de tesis, quien más allá del excelente desempeño en su función me acompañó en todo momento, me dio su consejo y apoyo, y trabajó a la par mía para poder concluir este trabajo. De igual manera quiero agradecer a mis imprescindibles consejeros, Daniel Bertero y Daniel Sorlino, no sólo por sus invalorable aportes a este trabajo sino además por el gran esfuerzo, compromiso y dedicación que han demostrado en todo momento. Este trabajo no hubiese sido posible de no ser por ellos.

También quiero agradecer muy especialmente a Sofi, una compañera inmejorable, quien no sólo me ayudó en incontables oportunidades sino además, con increíble paciencia, me ha sabido soportar en los peores momentos sin dejar nunca de apoyarme. Muchísimas gracias Sofi, te quiero mucho.

A mis excelentes compañeros de oficina: Diego (ex-compañero pero siempre presente), Clau, Belén, Fercha y Paula (nuestra flamante incorporación). A todos ustedes muchas gracias por su amistad, el aguante, sus consejos y, en menor medida, la tolerancia a mi desorden.

A mis muy estimados compañeros de la cátedra de Cultivos Industriales, cada uno de los cuales contribuyó a su manera, a que pueda finalizar una etapa que parecía interminable. Especialmente a Ale Gil, por el apoyo, a Diego y a Mónica, por escucharme y aconsejarme, a Roberto, por sus sugerencias, a Lili y Nora por transmitirme su experiencia y prestarme sus respectivas tesis y a Pilar por la enorme mano que me dio con el abstract.

A Dieguito, a Luisito Pedace, a David y Hernán los muchachos del batán, y a Guille Durán quienes me dieron una mano bárbara con los experimentos en momentos en que estaba desbordado. También a Roberto Tornese, Juan Carlos y Walter de IFEVA quienes me han prestado la mezcladora de cemento en numerosas oportunidades. A Daniel Miralles y Adriana Kantolic por prestarme las luminarias para los experimentos. A Claudio Chimenti por permitirme usar el invernáculo calefaccionado de IFEVA y a Gustavo Striker por pasarme el registro de térmico del mismo.

A Mirta de Cultivos y a Mabel y las chicas de mesa de entrada de la EPG quienes me han solucionado más de una cuestión administrativa, siempre con la mejor onda, voluntad y predisposición. También a Susana, Amelia (EPG) y a Nora Herrera por la excelente compañía de todos estos años. Sin olvidarme de los muchachos de tesorería ni de Lili y Flor. Gracias también a todos ustedes

A Carlos Carloni de hemeroteca, quien me consiguió algunas publicaciones imposibles que resultaron imprescindibles para establecer el marco teórico y conducir la discusión de esta tesis y a Silvina Maio que me proveyó los datos climáticos para los análisis realizados.

A mi familia y a mis entrañables amigos, de la facultad y de la vida, quienes han sido para mí el principal estímulo para concluir de una buena vez este trabajo. Haberlos descuidado todos estos años ha sido para mí el mayor costo que tuve que afrontar. También a mis compañeros de la EPG, de los que me llevo excelentes recuerdos y a los tesistas que me han estado acompañando en el campito, especialmente, a Iván, María, José y Gerardo. Agradezco también profundamente, el invalorable apoyo que recibí en los últimos tiempos de parte de Nacho García Astelarra y Tincho Weskamp. Muchas gracias por estar.

Finalmente no podría dejar de agradecer a mi viejo, quien fue, es y será siempre una importante fuente de motivación, un referente de trabajo honrado y compromiso y un recurso para salir adelante de cualquier adversidad. Gracias por todo papai, un fuerte abrazo!!!

INDICE GENERAL

<u>CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL</u>	1	
1. PLANTEO DEL PROBLEMA Y REVISIÓN DE ANTECEDENTES.....	1	
1.1 La iniciación floral y sus vías de regulación.....	1	La in
1.1.1 Regulación exógena de la iniciación floral: Señales ambientales que inducen la floración... ..	2	
1.1.1.1 Señales ambientales involucradas en la respuesta de cultivos anuales.....	2	
1.1.1.2 Señales ambientales involucradas en la respuesta de cultivos bienales y perennes.....	6	
1.1.2 Regulación endógena de la iniciación floral: ¿Biomasa mínima o edad fisiológica?.....	7	
1.1.3 Interacción de factores desencadenantes de la floración.....	8	
1.2 El caso de <i>Oenothera biennis</i>	9	Objetiv
1.3 Objetivo general.....	13	
1.3.1 Objetivos específicos.....	13	
1.3.2 Hipótesis.....	13	
<u>CAPITULO 2: METODOLOGÍA GENERAL</u>	15	
2.1 Condiciones experimentales.....	15	
2.2 Mediciones de fenología y tamaño.....	15	
2.2.1 Ciclo de vida de <i>Oenothera biennis</i> y mediciones de fenología.....	16	
2.2.2 Estimaciones de biomasa y crecimiento.....	19	
2.3 Manipulación de factores ambientales reguladores del desarrollo.....	19	
<u>CAPITULO 3: VERNALIZACIÓN DE <i>OENOTHERA BIENNIS</i> EN ESTADO DE PLÁNTULA</u>	21	
3.1 Introducción.....	21	
3.2 Materiales y métodos.....	22	
3.3 Resultados.....	25	
3.4 Discusión.....	30	
<u>CAPITULO 4: EFECTO DE LA DISPONIBILIDAD DE NUTRIENTES SOBRE LA DURACIÓN DE LA ETAPA VEGETATIVA Y EL TAMAÑO AL INICIO DE LA ETAPA REPRODUCTIVA DE <i>OENOTHERA BIENNIS</i></u>	33	
4.1 Introducción.....	33	
4.2 Materiales y Métodos.....	35	
4.3 Resultados.....	35	
4.4 Discusión.....	41	

<u>CAPITULO 5. INFLUENCIA DEL CRECIMIENTO SOBRE LA TASA DE DESARROLLO A FLORACIÓN EN RESPUESTA A FOTOPERÍODOS INDUCTIVOS</u>	47
5.1 Introducción.....	47
5.2 Materiales y métodos.....	48
5.3 Resultados.....	51
5.4 Discusión.....	59
<u>CAPITULO 6: DISCUSIÓN GENERAL</u>	63
<u>ANEXOS</u>	73
Anexo I: Requerimientos para la floración de algunas especies bienales facultativas.....	75
Anexo II: Estimación de biomasa a partir de variables biométricas no-destructivas.....	77
Anexo III: Fotos ilustrativas de plantas de <i>Oenothera biennis</i> de diferente comportamiento reproductivo.....	83
Anexo IV: Experimento preliminar en condiciones ambientales no-vernalizantes.....	85
Anexo V: Definición de la reproducción en condiciones de temperaturas elevadas.....	89
Anexo VI: Aproximación a las temperaturas cardinales de <i>Oenothera biennis</i>	93
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	97

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1: Secuencia de encendido-apagado de las luminarias para la extensión del fotoperíodo a una duración constante de 15 (FP15) y 18 (FP18) horas de luz/día.....	19
Tabla 3.1: Cronograma de actividades desarrolladas para lograr los tratamientos Vn+ y Vn- en Exp.Vn1 y Exp.Vn2 y número de plantas que completaron exitosamente los experimentos.....	22
Tabla 3.2: Cuadro comparativo de las condiciones fototermales exploradas en Exp.Vn1 y Exp.Vn2 luego de la aplicación de los tratamientos Vn+ y Vn-	26
Tabla 3.3: Valores predichos de los parámetros de la función de Boltzmann, aplicada a los tratamientos Vn+ (vernalizadas en estado de semilla) y Vn- (sin vernalización artificial) del Exp.Vn1	28
Tabla 3.4: Valores predichos de los parámetros de la función de Boltzmann, aplicada a los tratamientos Vn+ (vernalizadas en estado de semilla) y Vn- (sin vernalización artificial) del Exp.Vn2	29
Tabla 4.1: Comportamiento reproductivo de plantas de <i>Oenothera biennis</i> sometidas a 3 niveles de disponibilidad nutricional: N0 , N60 y N120	36
Tabla 5.1: Cronograma de actividades desarrolladas en Exp.FP1 y Exp.FP2	49
Tabla I.1: Requerimientos para la floración de algunas especies bienales facultativas.....	75
Tabla II.1: Estimadores de biomasa utilizados en diferentes especies bienales facultativas.....	77
Tabla IV.1: Cronograma de las principales actividades desarrolladas para lograr los tratamientos FP18N+ y FP18N-	85
Tabla V.1: Cronograma de las principales actividades desarrolladas, para los tratamientos FP18 y FPN durante el experimento estival de 2008-2009.....	89

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Duración y tasa de desarrollo de una etapa fenológica de un cultivo ante diferentes temperaturas.....	3
Figura 1.2: Esquema de la respuesta fotoperiódica cuantitativa y cualitativa de plantas de día largo, plantas de día corto y plantas de respuesta neutra.....	5
Figura 2.1: Ciclo de vida de <i>Oenothera biennis</i> y ubicación de las fases descritas por Couvet <i>et al.</i> (1990).....	16
Figura 2.2: Diferentes estadios fenológicos de <i>Oenothera biennis</i>	17
Figura 2.3: Esquema de la estimación del momento de ET1 a partir de una regresión no-lineal (sigmoide) de la altura de la planta en función del tiempo.....	18
Figura 2.4: Detalle de luminarias utilizadas para la extensión artificial del fotoperíodo durante a) la fase vegetativa de <i>Oenothera biennis</i> y b) el inicio de floración de los primeros individuos de una unidad experimental (parcela).....	20
Figura 3.1: Fórmula y esquema del modelo sigmoide de Boltzmann. Interpretación de los parámetros del modelo.....	24
Figura 3.2: Condiciones fototermales (T media, T min, T max y FP) exploradas luego de la aplicación de los tratamientos Vn + y Vn- en Exp.Vn1 y Exp.Vn2	25
Figura 3.3: a) Proporción de individuos de comportamiento anual (%An , plantas florecidas en esa temporada) y b) días transcurridos desde el trasplante hasta el inicio de floración del 50% de las plantas anuales (FL1₍₅₀₎), en Exp1	27
Figura 3.4: Dinámica del inicio de floración (FL1) de plantas de <i>Oenothera biennis</i> , vernalizadas en estado de semilla pre-germinada (Vn+) y sin vernalización artificial (Vn-), correspondientes a Exp.Vn1	27
Figura 3.5: a) Proporción de individuos de comportamiento anual (%An , plantas florecidas en 2005) y b) días transcurridos desde el trasplante hasta el inicio de floración del 50% de las plantas anuales (FL1₍₅₀₎), en Exp2	28
Figura 3.6: Dinámica del inicio de floración (FL1) de plantas de <i>Oenothera biennis</i> , vernalizadas en estado de semilla pre-germinada (Vn+) y sin vernalización artificial (Vn-), correspondientes a Exp.Vn2	29
Figura 4.1: Diagrama de caja y bigotes de la tasa de crecimiento media durante la fase vegetativa (TCv , de 14-Oct a 4-Nov) de plantas de <i>Oenothera biennis</i> sometidas a 3 niveles de disponibilidad nutricional: N0 , N60 , y N120	36
Figura 4.2: Evolución del área de roseta (AR) en plantas de <i>Oenothera biennis</i> sometidas a 3 niveles de disponibilidad nutricional: N0 , N60 y N120	37
Figura 4.3: Evolución del número de hojas aparecidas (NH) en plantas de <i>Oenothera biennis</i> sometidas a 3 niveles de disponibilidad nutricional: N0 , N60 y N120	37

Figura 4.4: Duración del período trasplante-inició de floración (Tr-FL1) de plantas de <i>Oenothera biennis</i> sometidas a 3 niveles de disponibilidad nutricional: N0 , N60 y N120	38
Figura 4.5: a) Área de roseta (AR_{ET1}) y b) número de hojas (NH_{ET1}) de plantas de <i>Oenothera biennis</i> en el momento en que alcanzan el estadio fenológico ET1	39
Figura 4.6: Relación entre la tasa de desarrollo desde el trasplante hasta ET1 (TD_{Tr-ET1} , 1/día) y la tasa de crecimiento media durante la fase vegetativa (TC_v , cm ² /día).....	39
Figura 4.7: Relación entre el tamaño alcanzado por las plantas en ET1 (AR_{ET1} , cm ²) y la tasa de crecimiento media durante la fase vegetativa (TC_v , cm ² /día).....	40
Figura 4.8: Relación entre el número de hojas expandidas en ET1 (NH_{ET1}) y la tasa de crecimiento media durante la fase vegetativa (cm ² /día).....	40
Figura 5.1: Vista parcial de Exp.FP2	50
Figura 5.2: Condiciones fototermales exploradas durante Exp.FP1 (a) y Exp.FP2 (b).....	52
Figura 5.3: Proporción de individuos de Exp.FP1 de comportamiento anual.....	53
Figura 5.4: Tiempo a floración (días desde el trasplante) de plantas de <i>Oenothera biennis</i> del Exp.FP1 sometidas a diferentes niveles de extensión fotoperiódica FP18 , FP15 y FPN y 2 niveles de fertilización: N120 y N0	54
Figura 5.5: Tiempo a floración (días desde el trasplante) de plantas de <i>Oenothera biennis</i> del Exp.FP2 sometidas a diferentes niveles de extensión fotoperiódica FP18 , FP15 y FPN y 2 niveles de fertilización: N120 y N0	54
Figura 5.6: Diagrama de caja y bigotes de la tasa de crecimiento media de plantas de <i>Oenothera biennis</i> sometidas a diferentes niveles de extensión fotoperiódica FP18 , FP15 y FPN y 2 niveles de fertilización: N120 y N0	55
Figura 5.7: Relación entre la tasa de desarrollo a ET1 (TD_{FP-ET1}) y el área de roseta, AR_{FP} (a) o el número de hojas, NH_{FP} , (b) al inicio del tratamiento fotoperiódico (FP15 ó FP18) de plantas de <i>Oenothera biennis</i> con diferente disponibilidad nutricional (N0 ó N120).....	56
Figura 5.8: Coeficiente de determinación r^2 (%) de la regresión lineal de TD_{FP-ET1} en función del área de roseta (AR) o del número de hojas (NH) medidos en diferentes momentos antes del primer registro de ET1	57
Figura 5.9: Relación entre la tasa de crecimiento durante la exposición a fotoperíodos extendidos artificialmente (TD_{FP-ET1}) y el área de roseta de las plantas al inicio de la exposición en plantas de <i>Oenothera biennis</i> sometidas a diferente disponibilidad nutricional (N0 y N120).....	58
Figura 5.10: Relación entre la tasa de desarrollo a ET1 (TD_{FP-ET1}) y la tasa de crecimiento de plantas de <i>Oenothera biennis</i> expuestas a fotoperíodos extendidos artificialmente (FP15 y FP18) y distinta disponibilidad nutricional (N0 y N120).....	58
Figura 6.1: Proporción de individuos de <i>Oenothera biennis</i> de comportamiento bienal, en función de la fecha de trasplante de los diferentes experimentos de esta tesis.....	66

Figura 6.2: Modelos conceptuales para explicar el control del desarrollo a floración de *Oenothera biennis*. **a)** Modelo sugerido a partir de la recopilación de antecedentes; **b)** Modelo alternativo propuesto en esta tesis.....69

Figura II.1: Foto trasversal (**a**) y en planta (**b**) de una roseta de *Oenothera biennis*. Relación entre **PS total** (grs./pl) y diferentes estimadores biométricos. **1) AR:** área de roseta; **2) NH:** número de hojas; **3) HL:** longitud de hoja más larga; **4) DC:** diámetro de corona. Los números romanos (i, ii, iii, iv) indican el esquema correspondiente a cada parámetro.....79

Figura II.2: Foto trasversal (**a**) y en planta (**b**) de una roseta de *Oenothera biennis*. Relación entre **PS parte aérea** (grs./pl) y diferentes estimadores biométricos. **1) AR:** área de roseta; **2) NH:** número de hojas; **3) HL:** longitud de hoja más larga; **4) DC:** diámetro de corona. Los números romanos (i, ii, iii, iv) indican el esquema correspondiente a cada parámetro..... 80

Figura II.3: Validación del modelo de estimación de biomasa aérea a partir del área de roseta.....81

Figura III.1: Plantas de *Oenothera biennis* de diferente comportamiento reproductivo: bianual (izquierda) o anual (derecha).....83

Figuras III.2 y III.3: Planta de comportamiento iteróparo, con floración a partir de la elongación de tallos florales laterales.....83

Figura IV.1: **a)** Dinámica del inicio de floración (**ET1**) de plantas de *Oenothera biennis* fertilizadas (**N+**) y sin fertilizar (**N-**) sometidas a extensión fotoperiódica de 18hs. **b)** Ambiente fototermal explorado durante el experimento.....86

Figura IV.2: : Relación entra la tasa de desarrollo a **ET1** (TD_{FP-ET1}) y la tasa de crecimiento durante la fase vegetativa ($TC_{FP-ET1(1)}$) de plantas de *Oenothera biennis*, fertilizadas (**N+**) y sin fertilizar (**N-**), expuestas a fotoperíodos extendidos artificialmente.....87

Figura V.1: Relación entra la tasa de desarrollo a **ET1** (TD_{FP-ET1}) y la tasa de crecimiento durante la fase vegetativa ($TC_{FP-ET1(1)}$) de plantas de *Oenothera biennis* expuestas a fotoperíodos naturales (**FPN**) o extendidos artificialmente (**FP18**).....90

Figura V.2: Histogramas. Proporción de individuos de comportamiento anual (**%An**) según categorías de tasa de crecimiento ($TC_{FP-ET1(1)}$), para los tratamientos **FPN** (izq.) y **FP18** (der.).....90

Figura V.3: **a)** Dinámica del inicio de floración (**ET1**) de plantas de *Oenothera biennis* vernalizadas artificialmente, sometidas a extensión fotoperiódica de 18hs (**FP18**) y en condiciones fotoperiódicas naturales (**FPN**) **b)** Ambiente fototermal explorado durante el experimento.....92

Figura VI.1: Tasa de desarrollo (1/día) entre la aparición de la 7° y la 12° hoja (TD_{V7-V12}) de rosetas de *Oenothera biennis* creciendo en macetas en condiciones de campo de diferente temperatura media.....94

Figura VI.2: Tasa de desarrollo (1/día) entre la aparición de los estadios fenológicos **ET1** y **FL1** ($TD_{ET1-FL1}$) de plantas de *Oenothera biennis* sometidas a extensión fotoperiódica en condiciones de campo de diferente temperatura media.....95

Figura VI.3: Proporción de individuos anuales (**%An**) en función de **a)** la temperatura máxima diaria ($T_{m\acute{a}x}$) promedio y **b)** la cantidad de días con temperaturas diarias máximas mayores a 30°C; considerando los 15 días posteriores al primer registro del estadio **ET1** en cada tratamiento.....96

DECLARACIÓN

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

Raúl Giménez

ABREVIATURAS

Vn+	Tratamiento de vernalización de semillas pre-germinadas en cámara 5° C.
Vn -	Tratamiento sin vernalización artificial
N	Fertilización (nutrición mineral)
N120	Fertilización, 2 grs. de fertilizante N-P-K (15-6,5-12,5) por planta. (Equivale a 120 kg N/ha)
N60	1 gr. de fertilizante N-P-K (15-6,5-12,5) por planta. (Equivale a 60 kg N/ha)
N0	Tratamiento testigo sin fertilización.
FP	Fotoperíodo (hs.luz/día)
FP18	Fotoperíodo extendido a 18 hs.luz/día
FP15	Fotoperíodo extendido a 15 hs.luz/día
FPN	Fotoperíodo natural
IF	Iniciación floral
ET1	Inicio de elongación del tallo floral
ET1₍₁₎	Momento en que la 1er planta de un experimento alcanza el estado reproductivo (ET1)
ET1₍₅₀₎	Momento en que el 50% de las plantas anuales de una unidad experimental alcanza el estadio ET1 .
FL1	Inicio de floración de una planta individual
FL1₍₅₀₎	Momento en que el 50% de las plantas anuales de una unidad experimental alcanza el estadio ET1 .
%An	Proporción de plantas anuales
Tr	Momento del trasplante de las plántulas a macetas en condiciones de campo
TC	Tasa de crecimiento (cm ² /día)
TC_v	Tasa de crecimiento media de las plantas (cm ² /día) desde su trasplante hasta el momento inmediatamente anterior a que los primeros individuos del experimento alcancen el estadio ET1 .
TC_{FP-ET1(1)}	Tasa de crecimiento media durante la ocurrencia de condiciones inductivas de fotoperíodo, obtenida a partir de mediciones de AR al inicio del tratamiento de fotoperíodo y de la última medición de AR antes de ET1₍₁₎ .
TD	Tasa de desarrollo (día ⁻¹ , función inversa del intervalo entre dos eventos fenológicos)
TD_{Tr-ET1}	Tasa de desarrollo (día ⁻¹) desde el trasplante de la plántula a macetas a campo hasta ET1 .
TD_{FP-ET1}	Tasa de desarrollo (día ⁻¹) desde el inicio del tratamiento de extensión fotoperiódica hasta ET1 .
TD_{ET1-FL1}	Tasa de desarrollo (día ⁻¹) desde ET1 hasta FL1
TD_{Tr-FL1}	Tasa de desarrollo (día ⁻¹) desde el trasplante hasta FL1
AR	Area de roseta
NH	Número de hojas
DC	Diámetro de corona
HL	Longitud de la hoja más larga de la planta
NH_{FP}	Número de hojas de la roseta al inicio del tratamiento fotoperiódico.
NH_{ET1}	Número de hojas de la roseta en ET1 .
AR_{FP}	Area de roseta de las plantas (cm ²) al inicio del tratamiento fotoperiódico.
AR_{ET1}	Area de roseta de las plantas (cm ²) en ET1 .

Tb	Temperatura base
Tópt	Temperatura óptima
Tmáx	Temperatura máxima
PDL	Planta de día largo
PDC	Planta de día corto
PN	Planta de respuesta neutra al fotoperíodo
H₁	Hipótesis 1
H₂	Hipótesis 2
H₃	Hipótesis 3
Exp.Vn1	Experimento de vernalización, invierno-primavera 2005
Exp.Vn2	Experimento de vernalización, primavera-verano 2005
Exp.N	Experimento de nutrición mineral, primavera 2006
Exp.FP1	Experimento de fotoperíodo, primavera 2006.
Exp.FP2	Experimento de fotoperíodo, invierno 2007.
PS parte aérea	Peso seco de la biomasa aérea (grs)
PS total	Peso seco de la biomasa total (parte aérea +raíces)

RESUMEN

El comportamiento bienal facultativo de *Oenothera biennis* representa una limitante para su explotación comercial extensiva. Los individuos de esta especie pueden florecer en la primera estación de crecimiento (ciclo anual) o retrasar su floración hasta la siguiente (ciclo bianual). Este comportamiento estaría modulado por la capacidad endógena de las plantas para responder a las señales ambientales que desencadenan la floración, la cual dependería del logro de un umbral de biomasa. El objetivo de esta tesis fue contribuir al entendimiento de los factores que controlan la floración de *Oenothera biennis* haciendo énfasis en la relación entre el tamaño de las plantas y su respuesta a las señales inductoras de la reproducción. Se realizaron experimentos en macetas a campo donde se manipularon factores candidatos a inducir la floración (vernalización y fotoperíodo). Se modificó la disponibilidad de nutrientes mediante fertilización mineral, para lograr variabilidad en los indicadores de la condición endógena de las plantas (área y tasa de crecimiento de las rosetas). La vernalización, el fotoperíodo (días largos) y la fertilización redujeron la incidencia de plantas de comportamiento bienal (hasta 25% respecto al control) y adelantaron la floración entre 3 y 31 días (según tratamiento y condiciones experimentales) en las plantas de comportamiento anual. La respuesta a la vernalización fue facultativa y no dependió de una biomasa umbral, ya que se vernalizaron plántulas recién germinadas. La respuesta al fotoperíodo tampoco requirió de un tamaño umbral, pero estuvo condicionada por la tasa de crecimiento de las plantas, la cual fue modulada por la fertilización y el área de las rosetas al inicio de las condiciones fotoinductivas. Se identificó a la incidencia de temperaturas elevadas ($T_{\text{media}} > 25^{\circ}\text{C}$; $T_{\text{máx}} > 30^{\circ}\text{C}$), alrededor de la iniciación floral, como un posible factor causal de la bianualidad que inhibiría la reproducción, de una proporción de los individuos, en fechas de siembra tardías. Se concluye que los factores que aceleran el desarrollo (vernalización, fotoperíodos extendidos artificialmente y nutrición mineral) contribuyen indirectamente a reducir la bianualidad, evitando que las condiciones inductivas de la floración coincidan con el período estival de alta temperatura.

Palabras clave: *Oenothera biennis*, onagra, floración, bianualidad, vernalización, alta temperatura, fotoperíodo, tamaño umbral, tasa de crecimiento, tasa de desarrollo.

The facultative biennial habit of *Oenothera biennis* is a constraint for its commercial crop production. Plants may flower during the first growing season (annual cycle), or delay the onset of the reproductive period to the second one (biennial cycle). Previous reports revealed that this behavior would be regulated by the inner ability of plants to respond to environmental factors that trigger flowering (*i.e.* competence) which, in turn, would depend on plant size. Only plants achieving a given threshold size for reproduction would flower during the first year. The aim of this work was to increase the current knowledge about the regulation of flowering and the reproductive behavior of *Oenothera biennis*, stressing the relationship among plant size and flowering responses to vernalization or photoperiod. Experiments were conducted in pots under field conditions where vernalization and/or photo-inductive conditions (long days) were artificially generated. In addition, fertilization was applied to obtain variability in individual plants size and growth rate. Long days, vernalization and fertilization treatments reduced the proportion of biennial plants (up to 25%) and fastened flowering of annual plants in 3 - 31 days (according to treatment and experimental conditions). *O. biennis* showed a facultative vernalization response. Since pre-cotyledonal seedlings were successfully vernalized, no threshold size for vernalization was found. Though photoperiod response does not seem either to depend directly on a given threshold size, it was related to plant growth rate which was a function of both nutrient availability and plant size. The incidence of high temperatures (*i.e.* daily mean temperature > 25°C; maximum temperature > 30°C) around floral initiation was identified as a possible factor that inhibit floral induction in late sowing dates, increasing the proportion of biennial plants. Factors that increase rate of development, such as vernalization, photoperiod extension, or nutrient availability, would contribute to reduce biennial habit by avoiding the coincidence of floral induction with the high temperature season.

Key words: *Oenothera biennis*, evening primrose, flowering, biennial plants, vernalization, high temperature, photoperiod, threshold size, growth rate, rate of development.

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

1. PLANTEO DEL PROBLEMA Y REVISIÓN DE ANTECEDENTES

1.1 La iniciación floral y sus vías de regulación

La floración es un evento crucial para el éxito reproductivo y la continuidad de las angiospermas en el tiempo (Ausín *et al.* 2005; Tan y Swain, 2006) ya que constituye el primer paso de la reproducción sexual (Bernier *et al.* 1993). Dado que las plantas terrestres son organismos sésiles, que crecen y se reproducen en el lugar donde germinan (Ausín *et al.* 2005; Corbesier y Coupland 2006), la ubicación temporal de la floración determinará el éxito (o fracaso) biológico de los individuos que crecen y se desarrollan en un determinado ambiente (Heide 1994).

Existe gran variabilidad entre las especies de plantas superiores en lo que hace al momento de la reproducción y su distribución en el tiempo. Las especies anuales florecen y completan su desarrollo en una sola estación de crecimiento mientras que las especies perennes pueden vivir varios años (Ausín *et al.* 2005). A su vez, entre las perennes pueden distinguirse las especies monocárpicas (o semélparas) de las especies policárpicas (o iteróparas). Las primeras concentran toda su etapa reproductiva en un único episodio luego de períodos de vida de distinta duración, mientras que las segundas se reproducen repetidamente a lo largo de los años, a intervalos regulares o intermitentes (Bazzaz y Ackerly 1992). Por último, existen especies bienales (monocárpicas perennes de vida corta) que se reproducen una única vez, al segundo año de vida, y luego mueren (Bloom *et al.* 2003).

De los diferentes procesos involucrados en la floración (*i.e.* iniciación, organización, maduración de flores y anthesis), la iniciación floral es fundamental ya que determina el cambio irreversible del programa de desarrollo vegetativo al reproductivo (Lang 1952; Kinet 1993; Michaels y Amasino 2000; Simpson y Dean 2002; Zaccai y Edri 2002; Boss *et al.* 2004). El momento en que ocurre esta transición es uno de los eventos de desarrollo más plásticos en el ciclo de vida de las plantas y es determinante para asegurar que la floración y fructificación ocurran en condiciones favorables (Ausín *et al.* 2005).

El momento de floración resulta de vital importancia para la agricultura, la horticultura, la domesticación de especies y el mejoramiento vegetal por lo que un sinnúmero de estudios se han llevado a cabo para entender las bases del control de la floración en diferentes especies vegetales (Bernier *et al.* 1993). En este sentido, análisis fisiológicos y genéticos han mostrado que múltiples señales exógenas (ambientales) y endógenas (fisiológicas) regulan el momento en que se produce la iniciación floral (Mouradov *et al.* 2002; Boss *et al.* 2004). Aunque se ha encontrado mucha similitud entre la base genética para la inducción y formación de los órganos florales en especies de diferente ciclo de vida, los mecanismos fisiológicos que determinan la transición al estado reproductivo en plantas bienales y perennes son menos conocidos y han sido menos estudiados que en las especies anuales (Tan y Swain 2006; Wilkie 2008). De este modo, los modelos fenológicos desarrollados a partir de los cultivos agrícolas tradicionales resultarían insuficientes para predecir adecuadamente la iniciación floral en estos grupos de especies.

En este trabajo se analiza el control de la floración en *Oenothera biennis* L., una especie bienal que puede usarse como modelo para el estudio de la inducción floral en especies perennes. Tras una revisión del estado del arte de los factores que regulan el desarrollo en especies anuales y perennes, se analiza el efecto de aquellos que han sido

más consistentes en determinar la floración de los cultivos de grano tradicionales y se discute el rol de otras señales, endógenas y exógenas, que no suelen considerarse en los cultivos anuales.

1.1.1 Regulación exógena de la iniciación floral: Señales ambientales que inducen la floración.

1.1.1.1 Señales ambientales involucradas en la respuesta de cultivos anuales

La rotación de la Tierra, sobre su eje y alrededor del Sol, provoca cambios periódicos en diferentes variables ambientales que ponen en evidencia el progreso de las estaciones climáticas a lo largo del año (Jarillo *et al.* 2008). Muchas plantas son capaces de detectar e integrar estas señales para sincronizar su desarrollo con el ciclo anual de las estaciones climáticas (Heide 1994; Searle y Coupland, 2004). Estos mecanismos aseguran que la reproducción sexual ocurra bajo condiciones ambientales favorables y permiten el cruzamiento exitoso de muchas especies que requieren una floración sincrónica. Cualquier variable ambiental que exhiba cambios estacionales regulares es potencialmente un factor que controla la transición a floración (Bernier *et al.* 1993; Ausín *et al.* 2005). Por lo tanto, entre las variables ambientales candidatas a regular la inducción de la floración se encuentran: la temperatura, el fotoperíodo (*i.e.* cantidad diaria de horas de luz), la calidad de la luz incidente (composición espectral), la cantidad de luz (densidad de flujo de fotones), la vernalización (exposición a períodos prolongados de frío) y la disponibilidad de agua y nutrientes (Levy y Dean 1998).

Los procesos de desarrollo pueden cuantificarse ya sea a través de cambios en el número de órganos de una planta, como ser el número de hojas formadas (desarrollo morfológico), o bien a través del tiempo transcurrido entre dos eventos fenológicos que definen una fase fenológica (desarrollo fásico), por ejemplo la emergencia y la floración (Atkinson y Porter 1996). El efecto de los factores ambientales sobre el desarrollo de las plantas, y en particular sobre el tiempo a floración, se ha estudiado principalmente en especies de ciclo anual; inicialmente a partir de cultivos de importancia económica (Garner y Allard 1920; Vince-Prue 1975; Roberts y Summerfield 1987; Summerfield *et al.* 1991), y más recientemente en *Arabidopsis thaliana* L., que ha permitido abordar las respuestas fisiológicas a escala molecular y genética (Ausín *et al.* 2005). Adicionalmente, existen algunos trabajos en especies perennes, realizados principalmente con pasturas templadas (Heide 1994) y en menor medida con especies leñosas (Wilkie *et al.* 2008).

Hasta la fecha, la temperatura, la vernalización y el fotoperíodo han sido las variables ambientales más consistentes en la regulación del momento de floración y la duración del ciclo ontogénico de los cultivos tradicionales (Evans 1971; Ellis *et al.* 1988; Wang y Engel 1998; Yan y Wallace 1998). Por su parte, los factores que normalmente se asocian a procesos de crecimiento, como el nivel de fertilidad del suelo, la disponibilidad hídrica y la radiación, entre otros, parecen tener un peso relativo mucho menor (Miralles *et al.* 2003).

La temperatura es un factor ambiental primario en la regulación del desarrollo fenológico de las plantas (Hodges 1991; Baker y Reddy 2001). Los cultivos presentan una respuesta universal a la temperatura de modo tal que no existe insensibilidad a este factor, es decir, que todas las etapas de desarrollo de todas las especies vegetales responden a ella en mayor o en menor medida (Slafer y Rawson 1994). Dentro de un amplio rango de temperaturas, la tasa de desarrollo (definida como la inversa de la duración de una fase fenológica dada, en este ejemplo, desde emergencia hasta

floración) aumenta en forma lineal con incrementos en la temperatura desde una temperatura base (T_b), por debajo de la cual no hay desarrollo mensurable, hasta una temperatura óptima (T_{opt}) la cual minimiza el tiempo a floración. Con temperaturas superiores a la óptima, la floración se retrasa progresivamente hasta alcanzar una temperatura máxima ($T_{máx}$) en la que cesa nuevamente el desarrollo (figura 1.1). Las temperaturas cardinales (T_b , T_{opt} y $T_{máx}$) son propias de cada especie, e incluso pueden variar entre cultivares de una misma especie o entre las distintas fases fenológicas de una misma planta (Slafer y Rawson 1994).

Para el rango de temperaturas subóptimas en el que se desarrolla la mayor parte del ciclo de varios cultivos de grano, existe una metodología que pondera la duración de diferentes etapas del ciclo de un cultivo por la temperatura a la cual se está desarrollando. Este modelo se denomina tiempo térmico (TT) y consiste en la acumulación de unidades térmicas ($^{\circ}\text{C}\cdot\text{día}$), entre T_b y T_{opt} , para la concreción de una fase fenológica dada (figura 1.1). Para su cálculo se emplea la siguiente ecuación.

$$\text{Tiempo térmico } (^{\circ}\text{C}\cdot\text{día}) = (T^{\circ}\text{media} - T^{\circ}\text{base}) \times \text{duración (días)}$$

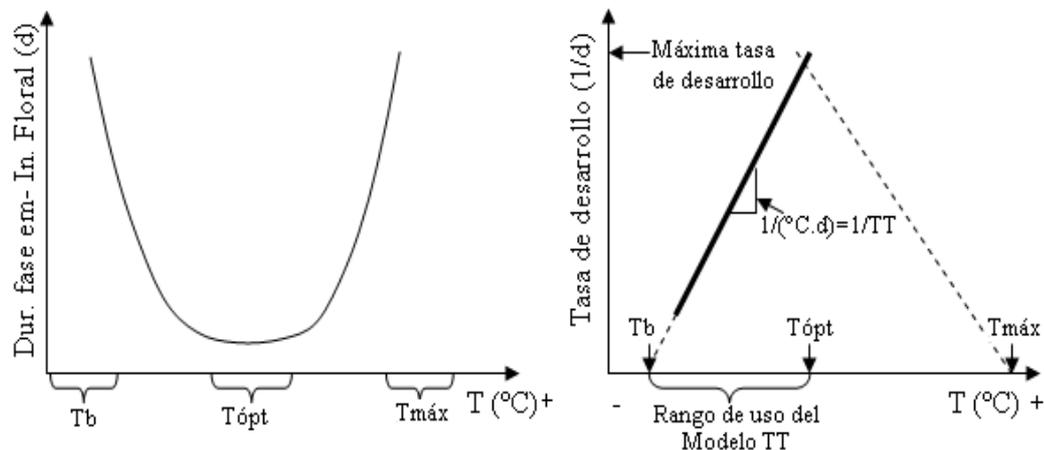


Figura 1.1: Duración (izq.) y tasa de desarrollo (der.) de una etapa fenológica de un cultivo ante diferentes temperaturas. En el eje de abscisas se indican las temperaturas base (T_b), óptima (T_{opt}) y máxima ($T_{máx}$) y la pendiente de la relación cuya recíproca es el tiempo térmico, único para cualquier temperatura ubicada en el rango entre T_b y T_{opt} . Tomado de Miralles *et al.* 2003.

El fotoperíodo es otro factor ambiental importante y uno de los más estudiados en la regulación del momento de la floración en especies de regiones templadas (Mouradov *et al.* 2002). El rol del fotoperíodo en el control del desarrollo se conoce desde 1920, cuando Garner y Allard demostraron que cambios en la duración del día modifican el tiempo a floración en soja y tabaco.

La duración del día varía con las estaciones climáticas siguiendo un patrón predecible que depende de la latitud (Imaizumi y Kay 2006; Jackson 2009). Las plantas, como otros organismos, son capaces de medir diariamente el fotoperíodo y de ajustar su programa de desarrollo con anticipación a los cambios estacionales a fin de asegurar su supervivencia y éxito reproductivo (Yanovsky y Kay 2002). De esta manera, las plantas de latitudes altas suelen responder a fotoperíodos largos de primavera-verano ubicando la floración fuera del período de riesgo de heladas, mientras que las plantas de latitudes menores tienden a evitar que la floración ocurra durante las temperaturas extremas del verano, respondiendo a fotoperíodos cortos (Lyndon 1992; Samach y Coupland 2000).

La señal luminosa es percibida a través de las hojas y medida mediante un mecanismo celular endógeno autónomo llamado reloj biológico ó reloj circadiano (Bünning 1936 citado en Engelmann 2007). Este reloj, que controla los ritmos diarios de expresión de genes, procesos metabólicos como la actividad fotosintética o la respiración, la apertura y cierre estomáticos y el movimiento de hojas, entre otros, tiene un ciclo de aproximadamente 24 horas (ciclo circadiano) que sirve de referencia para la respuesta a las señales de luz incidente (u oscuridad) provenientes del ambiente (Taiz y Zeiger 1998; Samach y Coupland 2000).

Si bien el control de la floración por fotoperíodo está ampliamente difundido en el reino vegetal, la respuesta a esta señal ambiental varía ampliamente entre especies (Searle y Coupland 2004). Las plantas pueden clasificarse en tres grupos principales según el efecto del fotoperíodo sobre su desarrollo hasta floración: a) plantas de día corto (PDC), b) plantas de día largo (PDL) y c) plantas de respuesta neutra o insensibles al fotoperíodo (PN). Las plantas de día corto promueven su floración cuando son expuestas a períodos de luz más cortos que un determinado umbral dentro del ciclo circadiano (figura 1.2). Por el contrario, las plantas de día largo aceleran su desarrollo con períodos de luz mayores a un determinado número de horas, mientras que la inducción floral en las de respuesta neutra no es afectada por la duración del día o la noche (Erwin *et al.* 2005). Adicionalmente, PDL y PDC pueden tener una respuesta de tipo facultativa (cuantitativa) u obligada (cualitativa). Las plantas de respuesta facultativa (*i.e.* cultivos anuales que responden al fotoperíodo) aceleran su floración en presencia de fotoperíodos inductivos (días largos en PDL y días cortos en PDC), pero son capaces de florecer aún si estos no se presentan. Por su parte, en las plantas de respuesta obligada (*i.e.* varias especies perennes) la ocurrencia de fotoperíodos inductivos es condición necesaria para la floración (Erwin *et al.* 2005).

Aunque la mayoría de los trabajos realizados se han dedicado a estudiar cómo el fotoperíodo afecta el desarrollo desde la emergencia hasta la floración, hay algunas cuestiones que merecen ser consideradas. En primer lugar, existen especies que responden al fotoperíodo aún después de la floración (Summerfield *et al.* 1998). En segundo lugar, muchas plantas muestran una sensibilidad diferente al ambiente fototermal según su etapa ontogénica (Adams *et al.* 2001), e incluso pueden darse respuestas ambivalentes, donde el tipo de respuesta (PDC, PDL ó PN) varía entre distintas sub-etapas ontogénicas previas a la floración (Miralles *et al.* 2003). Por último, la mayoría de las especies presentan una fase juvenil pre-inductiva durante la cual son insensibles al fotoperíodo (Roberts y Summerfield 1987; Ellis *et al.* 1992) y cuya duración estaría determinada genéticamente (Major y Kiniry 1991). Superada la fase juvenil, las plantas alcanzan la fase vegetativa adulta (ó fase foto-inductiva, PIP) durante la cual pueden responder a la señal fotoperiódica (figura 1.2).

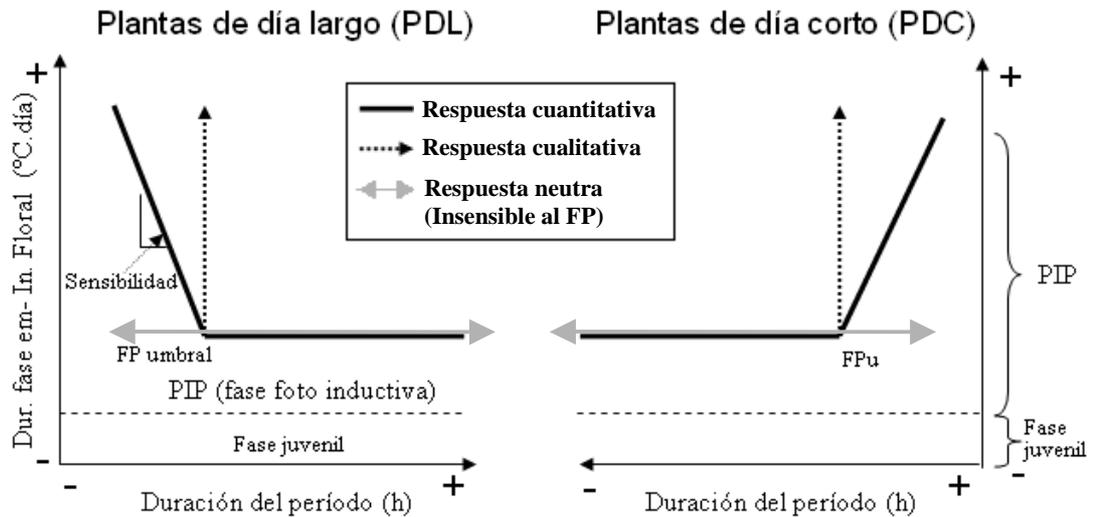


Figura 1.2: Esquema de la respuesta fotoperiódica cuantitativa (línea entera) y cualitativa (línea punteada) de plantas de día largo (izq.) y plantas de día corto (der.). Las plantas de respuesta neutra están representadas en los dos gráficos con una flecha de dos puntas. Adaptado de Miralles *et al.* 2003.

Los cambios en la duración del día resultan un indicador confiable del progreso de las estaciones del año, pero el fotoperíodo por sí solo no es completamente informativo de la época del año. Algunas plantas discriminan entre fotoperíodos equivalentes de principios de otoño y primavera floreciendo bajo condiciones de día largo sólo cuando éstas son precedidas por un período invernal de bajas temperaturas (Yanovski y Kay 2003). Esta respuesta se denomina vernalización y puede definirse como “la adquisición de la capacidad de florecer o la aceleración de la floración de plantas sometidas a un tratamiento de bajas temperaturas” (Chouard 1960). La vernalización sería, por lo tanto, un “proceso preparatorio” para la floración pero no la iniciaría *per se*, sino que crea la capacidad (competencia) para que las plantas puedan florecer ante condiciones ambientales inductoras (Chouard 1960; Sung y Amasino 2004). Sin embargo, otros antecedentes sugieren que, en algunas especies, el tratamiento frío no es sólo una condición preparatoria, sino que además interviene en la inducción y el desarrollo floral temprano (Wilkins y Anderson 2007).

En la mayoría de las plantas estudiadas, el estímulo vernalizante es percibido en el meristema apical, ya sea del tallo de la planta durante la fase vegetativa, o el del embrión dentro de la semilla. Como el meristema debe estar metabólicamente activo para responder a la vernalización, las semillas deben presentar cierto grado de imbibición para ser vernalizadas (Michaels y Amasino 2000). Una vez que una planta ha sido vernalizada, el meristema mantiene la competencia para florecer mucho después de su exposición al frío. De esta manera, las plantas son capaces de responder a señales inductoras de la floración de primavera-verano (*i.e.* mayor temperatura o fotoperíodos largos) ya que pueden “recordar” que han sido vernalizadas previamente durante el invierno (Sung y Amasino 2004). Por otro lado, el efecto vernalizante puede ser parcial o totalmente revertido (devernalización) si inmediatamente después del período de frío, las plantas son expuestas a varios días de alta temperatura, típicamente entre 30 y 40°C (Michaels y Amasino 2000).

Los cultivos anuales suelen tener requerimientos cuantitativos de vernalización (*i.e.* la floración puede eventualmente ocurrir sin exposición al frío, pero se adelanta con

la vernalización) o nulos. El éxito de un tratamiento de vernalización depende, entre otras cosas, de la temperatura a la cual las plantas son expuestas, de la duración y uniformidad del período de frío y de la edad fisiológica de la planta. En la mayoría de las plantas estudiadas, las temperaturas más efectivas para la vernalización están en el rango de 1 a 7 °C, aunque hay gran variabilidad entre especies respecto a las temperaturas que maximizan la respuesta (Lang 1965; Michaels y Amasino 2000). Las plantas deben estar expuestas a períodos de frío más o menos prolongados (*i.e.* de 1 a 3 meses) para lograr un efecto vernalizante (Michaels y Amasino 2000). Cuanto mayor es la duración de exposición a baja temperatura, mayor es la respuesta de las plantas al tratamiento hasta un punto de saturación, en el que la respuesta no varía (Henderson *et al.* 2003, Ausín *et al.* 2005). En algunas especies, interrupciones breves del tratamiento de frío pueden alterar el proceso de vernalización (Michaels y Amasino 2000) mientras que en otras la vernalización con alternancia de temperaturas sería más eficiente que un tratamiento de frío continuo (Chouard 1960). Los requerimientos de vernalización disminuyen por lo general con la edad de los individuos, aunque hay especies que no responden a la vernalización durante los primeros estadios de su desarrollo (Chouard 1960). Existe gran variabilidad respecto a la respuesta de las plantas a la vernalización, ya que la susceptibilidad a este tratamiento puede diferir marcadamente aún entre variedades de una misma especie. (Mouradov *et al.* 2002 ; Baloch *et al.* 2003).

Existen otros factores ambientales como la calidad de luz, la irradiancia o el estrés hídrico que pueden afectar el tiempo a floración y/o interactuar con el fotoperíodo o la vernalización. Sin embargo, el efecto de estos factores sobre el desarrollo de las plantas suele manifestarse en condiciones de deficiencias extremas (Longnecker y Robson 1994, Ma *et al.* 1997) y parece asociarse más con las condiciones en que se desarrolla la inducción de la floración, que a constituirse como parte de un proceso inductivo *per se* (Erwin 2007).

1.1.1.2 Señales ambientales involucradas en la respuesta de cultivos bienales y perennes

En las especies perennes, principalmente de altas latitudes, los factores del ambiente no sólo actúan como señales para coordinar la floración, favorecer el cruzamiento y asegurar el éxito reproductivo de los individuos, sino además, preparan a las plantas para soportar condiciones extremas de inviernos rigurosos (Jansson y Douglas 2007) o sequías estacionales.

Los árboles, especies leñosas principalmente policárpicas (también hay monocárpicas), son quizá el ejemplo más claro de cultivos perennes. Presentan generalmente una fase juvenil larga (*i.e.* puede durar décadas; Böhlenius *et al.* 2006) y una etapa reproductiva que se caracteriza por la alternancia de períodos de activo crecimiento vegetativo, dormición, floración y fructificación que se repiten anualmente siguiendo un patrón estacional (Jansson y Douglas 2007). La diferente competencia de los meristemas (de tallo y ramas) para florecer permite que sólo una proporción de ellos florezca en el año mientras los otros permanecen vegetativos para el crecimiento y floración de los años siguientes (Wang, 2007).

Entre las plantas perennes herbáceas de interés económico se encuentran tanto especies monocárpicas (*i.e.* plantas bienales) como policárpicas (varias ornamentales, hortícolas y pastos, entre otras). Los antecedentes, tanto en unas como en otras, indican que los factores ambientales que regulan el desarrollo de especies anuales también ocupan un rol primario en el control de la floración de estas especies (Kachi y Hirose 1983; Kinet 1993; Heide 1994; Erwin, 2007).

La mayoría de los pastos perennes de climas templados tienen un doble requerimiento para la inducción de la floración: la iniciación de primordios de inflorescencia se desencadena con temperaturas vernalizantes y/o días cortos, mientras que la elongación del tallo floral, el desarrollo de la inflorescencia y la antesis requieren días largos. Por otro lado, algunas pocas especies sólo tienen requerimientos de fotoperíodo largo para florecer (Heide 1994).

Otras herbáceas perennes de importancia económica, principalmente ornamentales y algunas hortícolas, se producen bajo cubierta en condiciones ambientales semi-controladas (*i.e.* con invernáculos equipados y cámaras de crecimiento) para aumentar la estacionalidad de su floración y producción (Erwin 2007). Debido a su alto costo de producción, el rol de los factores del ambiente en la regulación de la floración de estas plantas es estudiado en detalle y se han caracterizado para varias especies y cultivares los requerimientos térmicos y fotoperiódicos, el tipo de respuesta (cualitativa o cuantitativa) a la vernalización y fotoperíodo, la duración efectiva de los tratamientos y las fases de mayor sensibilidad a los mismos (Erwin y Warner 2002; Mattson y Erwin 2005). Asimismo, muchas ornamentales se están clasificando según su respuesta a la irradiancia, un factor ambiental cuyo rol en la regulación de la floración no fue considerado hasta hace poco (Erwin 2007).

Las plantas bienales suelen tener requerimientos de vernalización y/o fotoperíodo, ya sea cualitativos (obligados) o cuantitativos (Prins *et al.* 1990). Lang (1952) se basó en el tipo de respuesta a la vernalización para distinguir a las especies monocárpicas entre bienales, a las que asoció con la respuesta obligada a la vernalización, y anuales de invierno que responden en forma cuantitativa. Sin embargo, esta clasificación no es absoluta ya que el comportamiento reproductivo de una misma planta puede variar entre localidades con características climáticas diferentes (Amasino 2004). De hecho, muchas de las denominadas plantas “bienales”, pueden florecer en un año si crecen en ambientes favorables (Hirose y Kachi 1982) o bien demorar su floración más allá del segundo año de vida en estado silvestre (Kelly 1985; de Jong *et al.* 1986; Prins *et al.* 1990). Como la marcha fotoperiódica no varía entre años, esta variabilidad estaría dada ya sea por la duración e intensidad del período de frío invernal (de Jong *et al.* 1986), o bien por la influencia de otros factores ambientales como la cantidad y calidad de luz, la disponibilidad de nutrientes, humedad y/o temperaturas extremas (Harper y Orden 1970; de Jong 1986; Reekie 1997; Reekie *et al.* 1997).

1.1.2 Regulación endógena de la iniciación floral: ¿Biomasa mínima o edad fisiológica?

En las plantas existen señales internas que determinan cuándo un individuo es capaz de florecer o responder a un estímulo ambiental como el fotoperíodo. Así como los animales son incapaces de reproducirse antes de transcurrido un cierto período desde su nacimiento, las plantas son a menudo incapaces de florecer inmediatamente luego de la germinación. El período que sigue a la germinación, en el que la planta no es capaz de florecer o responder a estímulos ambientales que desencadenan la floración (*i.e.* permanece en etapa vegetativa), se denomina “período o fase juvenil” (Erwin *et al.* 2003). En el momento en que el meristema de la planta adquiere competencia (*i.e.* capacidad de responder a estímulos de la floración), el individuo alcanza la “fase vegetativa adulta” y, si se dan las señales ambientales apropiadas, pasará posteriormente a la etapa reproductiva donde se producirá la formación de primordios florales (Taiz y Zeiger 1998).

A grandes rasgos, cuanto mayor es la duración del ciclo de vida de las plantas, mayor es la duración de la fase juvenil (Erwin 2007) y, por lo tanto, mayor su relevancia en el control del desarrollo. La mayoría de las plantas anuales presentan una fase juvenil corta, de algunos días o pocas semanas de duración; en las bienales, esta fase puede durar varias semanas (Wang 2007) y en los árboles varios años o décadas (Böhlenius *et al.*, 2006).

La transición de la fase juvenil a la fase vegetativa adulta ocurre en forma gradual a medida que aumenta la edad (Jaeger 2006) o tamaño (Erwin 2007) del meristema apical. Esta transición se evidencia, en muchas especies, con cambios morfológicos y/o fisiológicos como variaciones en la morfología de las hojas, la filotaxis, capacidad de enraizamiento, entre otras (Taiz y Zeiger 1998). En aquellas plantas que no manifiestan variaciones aparentes, el fin de la fase juvenil suele asociarse con el número de hojas formadas en el tallo principal (Hand y Atherton 1987; Erwin 2007; Wilkins y Anderson 2007), que es un estimador de su edad fisiológica (Counce *et al.* 2000). Una vez alcanzada la fase adulta, la tendencia a florecer aumenta en la medida que la planta envejece (Erwin 2007) al igual que su sensibilidad a los factores desencadenantes de la floración (Reid y Murfet 1977).

Por otra parte, diversos estudios ecológicos en especies de plantas bienales y monocárpicas perennes sugieren que el tamaño de la planta es un mejor predictor que la edad fisiológica para la estimación de parámetros demográficos importantes como la supervivencia, el desencadenamiento de la reproducción o la fecundidad (Werner 1975; Werner y Caswell 1977; Baskin y Baskin 1979a; Gross 1981; Hirose y Kachi 1982; Klinkhamer *et al.* 1987a y b). Dado que plantas de una misma especie y edad pueden responder al ambiente de modos muy diferentes (dependiendo de su capacidad de aclimatación), los estadíos morfológicos basados en la biomasa acumulada suelen abarcar en forma más precisa la historia previa de las plantas que una clasificación que considere sólo su edad cronológica (Werner 1977). De esta manera, a diferencia de lo observado en los cultivos anuales tradicionales, el logro de un tamaño suficientemente grande parece ser más importante que la edad cronológica en el control de la transición a la fase adulta en estas plantas (Taiz y Zeiger 1998). A partir de un determinado umbral de biomasa, que asegure una producción de semillas adecuada, la probabilidad de florecer aumentaría directamente con el tamaño de las plantas (Gross 1981; de Jong *et al.* 1986).

1.1.3 Interacción de factores desencadenantes de la floración

Las plantas responden a diferentes combinaciones de señales exógenas y de desarrollo autónomo para inducir su floración en el momento apropiado (Colasanti y Sundaresan 2000). El desarrollo de señales endógenas permite a las plantas retrasar su floración hasta alcanzar el tamaño o edad óptimos para la reproducción mientras que las señales ambientales indicarían la época del año más favorable para la polinización y fructificación y asegurarían una floración sincrónica (Erwin 2007).

Entre los factores ambientales que regulan el desarrollo hay señales que tienen efectos inhibitorios y promotores de la floración (Reeves y Coupland 2000). Generalmente, estas señales no actúan en forma aditiva e independiente, sino que existen fuertes interacciones entre ellas de modo que la acción de unas puede variar la efectividad de otras (Bernier *et al.* 1993). De hecho, el efecto promotor de una señal del ambiente puede verse anulado si no se cumplen ciertas condiciones en otros factores (Erwin 2007). El proceso de floración, no obstante, es redundante en el sentido de que la inducción floral puede alcanzarse a través de vías diferentes (Erwin 2007).

Una de las interacciones más frecuentemente documentadas en plantas de regiones templadas es la regulación de la floración por vernalización y fotoperíodo en forma conjunta. La mayoría de las especies bianuales y anuales de invierno requieren de un período de frío y un posterior período de días largos para ubicar la floración en primavera-verano (Taiz y Zeiger 1998; Kasperbauer *et al.* 1962). El efecto de estos factores varía entre especies y su combinación puede dar lugar a interacciones aditivas, sustitutivas, condicionales (*i.e.* la vernalización es condición necesaria para la respuesta a fotoperíodos largos) o sinérgicas (Kasperbauer *et al.* 1962; Clarkson y Russell 1975; Gianquinto 1997; Erwin 2007). También existen casos en los que ocurre respuesta a la vernalización con insensibilidad al fotoperíodo o sensibilidad al fotoperíodo con insensibilidad a la vernalización (Flood y Halloran 1983).

Existe evidencia de que temperaturas no vernalizantes también interactúan con la respuesta al fotoperíodo o la vernalización (Slafer y Rawson 1994). Plantas expuestas a diferentes regímenes térmicos pueden presentar diferencias en su sensibilidad al fotoperíodo o en el fotoperíodo umbral (Lang 1952; Heide y Sønsteby 2007). Análogamente, plantas expuestas a diferentes fotoperíodos pueden responder de forma diferente a la temperatura (Slafer y Rawson 1995). Por otra parte, la exposición a alta temperatura puede inhibir la floración tanto en plantas inducidas por fotoperíodo como por vernalización (Lang 1952; Heide 1994; Erwin 2007).

Otras interacciones reportadas incluyen, además de las señales del ambiente, a los controles endógenos de la floración (Reekie 1997; Wilkie *et al.* 2008). Estudios recientes en plantas ornamentales sugieren que incrementos en la cantidad de luz incidente (*i.e.* radiación) pueden reducir la duración de la fase juvenil en varias especies (Adams 1999; Erwin, 2007). En concordancia, Poethig (1990) sostiene que las condiciones que promueven un crecimiento vigoroso aceleran la transición a la fase adulta mientras que condiciones que retardan el crecimiento pueden prolongar la duración de la fase juvenil. El tamaño umbral, a partir del cual muchas bienales adquieren competencia para responder a las señales desencadenantes de la floración, también varía con la calidad del ambiente (Reekie 1997)

Además de impedir la floración en plantas juveniles, la edad de la planta también afecta la inducción de la floración en plantas maduras (Jackson y Thomas 1999). La sensibilidad tanto a la vernalización como al fotoperíodo varía con la edad de la planta (Gianquinto 1997; Jackson y Thomas 1999), e incluso, entre hojas de distintas edades en una planta (Lang 1952; Khudairi 1954). En general, una vez que la planta alcanza la fase adulta, exhibe una tendencia creciente a florecer y la cantidad de ciclos fotoperiódicos inductivos necesaria es menor (Reid y Murfet 1977). Por otra parte, se ha observado que tratamientos que reducen los niveles endógenos de carbohidratos alargan la duración de la fase juvenil en especies leñosas, mientras que tratamientos que reducen el crecimiento en árboles maduros promueven su floración (Meilan 1997).

1.2 El caso de *Oenothera biennis*

El conocimiento actual de los mecanismos involucrados en la expresión de la floración resulta escaso en algunas especies promisorias para ser introducidas como nuevos cultivos de grano. Tal es el caso de *Oenothera biennis* L., un nuevo cultivo oleaginoso productor de un aceite especial que contiene ácido gamma-linolénico, utilizado para la fabricación de productos farmacéuticos, cosméticos y dietéticos (Grignac 1988).

Oenothera biennis ha sido domesticada recientemente luego del sustancial progreso de diferentes programas de investigación, tanto en la selección y mejoramiento

de variedades, como en la búsqueda de estrategias de manejo que optimicen la producción de semillas (Lapinskas 1999). Sin embargo, su cultivo presenta aún algunos inconvenientes que necesitan ser superados para convertirse en una producción comercial exitosa (Horrobin y Lapinskas 1993). Uno de los principales problemas reside en la variabilidad de la cantidad de estaciones de crecimiento que requiere para florecer: En siembras primaverales, suele comportarse como bianual, mientras que en siembras de fines de verano-principios de otoño, puede llegar a florecer en la primera estación de crecimiento (Lapinskas 1982). Si bien existen evidencias de que esta especie tiene una respuesta de días largos y requerimientos de vernalización (Chouard 1960; Vince-Prue 1975), el entendimiento del efecto de éstas señales resulta insuficiente para explicar su comportamiento reproductivo. **El objetivo general de la tesis es, entonces, generar un avance relevante en el conocimiento de los factores que determinan el comportamiento bienal facultativo de *Oenothera biennis*, analizando el efecto de algunos de ellos en la promoción de la floración y algunas de las formas en que pueden interactuar.**

Bloom *et al.* (2003), explican la variabilidad en el comportamiento reproductivo de esta y otras especies bienales, basándose en la respuesta diferencial a la vernalización de plantas “bienales facultativas” y plantas “bienales estrictas”: Las primeras deben alcanzar un cierto tamaño mínimo (o umbral) de roseta, propio de la especie, población o individuo, para poder ser vernalizadas y elongar el tallo floral (Werner 1975; Baskin y Baskin 1979 a y b; Lacey 1986a; Wesseningh y Klinkhamer 1996; Reekie *et al.* 1997) mientras que las segundas no tendrían este requerimiento *i.e.*, aún las semillas o plántulas pueden ser vernalizadas (Baskin y Baskin 1984). De esta manera, plantas bienales facultativas de idéntico tamaño umbral pueden diferir en el momento de su reproducción debido a diferencias en la calidad del sitio en que se desarrollan (Gross 1981; Sletvold 2002). En la medida en que hayan restricciones para el crecimiento, por una baja calidad de sitio y/o competencia con otras plantas, más tiempo requerirá la roseta para alcanzar el tamaño umbral que le permita responder a la vernalización (Kachi y Hirose 1985; Sletvold 2002).

Chouard (1960), califica a *Oenothera biennis* como una especie de requerimientos intensos y obligados de horas de frío, pero que no puede ser vernalizada en estado de semilla embebida, lo que haría suponer que necesita alcanzar una cierta edad o tamaño para responder a este estímulo ambiental. No obstante, Vince-Prue (1975) la describe como una planta de requerimientos cuantitativos de frío (Collins y Scarisbrick 1994) que responde a la vernalización de semilla (Thomas y Vince-Prue 1997 citado en Erwin 2007). De hecho, la vernalización de semillas de *Oenothera* spp. es una práctica cultural habitual en el noreste de China, donde se hidrata la semilla y luego se la entierra en suelo congelado a principios de primavera o durante el otoño (Deng *et al.* 2001). Dadas estas inconsistencias, **el primer objetivo específico de esta tesis es determinar el tipo de respuesta a la vernalización de *Oenothera biennis*, y verificar si el tratamiento de frío post-germinación y durante el estado cotiledonar, tiene algún efecto sobre el tiempo a floración.**

Estudios en poblaciones espontáneas de *Oenothera biennis* sugieren que, independientemente de su respuesta a la vernalización, los individuos de esta especie deben alcanzar un tamaño mínimo antes de que la floración pueda ser inducida (Gross 1981), como ha sido observado en otras monocárpicas perennes (Werner 1975; Gross 1981; Hirose y Kachi 1982; Kachi y Hirose 1983; de Jong *et al.* 1986; Lacey 1986; Wesseningh y Klinkhamer 1996; Reekie *et al.* 1997). Por debajo de este umbral, las señales ambientales que desencadenan la floración no serían efectivas (Klinkhamer *et al.* 1987b) y, por encima de ese umbral, la probabilidad de florecer en esa estación de

crecimiento aumentaría directamente con el tamaño de la roseta (Gross 1981). Probablemente, este sea un mecanismo que asegura que los individuos acumulen una cantidad suficiente de reservas para llevar a cabo una reproducción exitosa (Werner, 1975), donde la floración se pospondría para incrementar el tamaño de planta y, consecuentemente, la futura producción de semillas (Lacey 1986b).

Como el momento de reproducción de esta especie estaría más asociado al tamaño que a la edad de los individuos (Gross 1981), cualquier factor ambiental que afecte la tasa de crecimiento puede influir en el tiempo a floración (Reekie 1997). No obstante, hay autores que no descartan la importancia del efecto de la edad en la inducción de la floración (Metcalf *et al.* 2003; Childs *et al.* 2004; Burd *et al.* 2006). El tamaño mínimo para floración se ha asociado a diferentes indicadores morfológicos, dependiendo de la especie estudiada. Entre los más comunes se encuentran: el peso seco de la planta, el área foliar de roseta, el diámetro de roseta, la longitud de la hoja más larga, el diámetro de corona y el número de hojas (Verkaar y Schenkeveld 1984; de Jong *et al.* 1986; Bloom *et al.* 2002; Metcalf *et al.* 2003). Este último indicador también se usa frecuentemente para estimar la edad de las plantas (Wang *et al.* 1995).

Numerosos trabajos ecológicos se han realizado para predecir “el” tamaño y/o edad óptimos para la reproducción de especies bienales facultativas con distintos niveles de éxito (Rees y Rose 2002). No obstante, se ha observado gran diversidad, no sólo entre especies sino también entre los individuos de una misma especie, en el tamaño y edad que presentaron a floración (Metcalf *et al.* 2003). Parte de esta variabilidad intraespecífica es atribuida a una componente genotípica (Rees y Rose 2002; Metcalf *et al.* 2003), pero la mayor parte se debería a la componente ambiental, en particular, a las condiciones de crecimiento previas y posteriores al inicio de la reproducción (Reekie 1997; Reekie *et al.* 1997). Como el tamaño umbral óptimo resulta del balance entre la capacidad de crecimiento de las plantas (que determina la futura producción de semillas) y su probabilidad de supervivencia (Wesselingh *et al.* 1997), la reproducción ocurriría a un tamaño y edad mayores, cuanto mayor sea el costo reproductivo que imponga el ambiente (*i.e.* efecto negativo de la reproducción sobre el crecimiento; Reekie y Bazzaz 1992; Reekie *et al.* 1997). En concordancia, Saulnier y Reekie (1995) proponen que, en condiciones de baja disponibilidad de recursos, las rosetas de *Oenothera biennis* deben posponer su reproducción hasta alcanzar un tamaño aún mayor que las que crecen con alta disponibilidad para florecer y lograr un output reproductivo similar (considerando como tal a la biomasa de todas las estructuras reproductivas, que incluyen semillas, frutos y estructuras anexas a la inflorescencia, Thompson y Stewart, 1981). **El segundo objetivo específico de esta tesis consiste, entonces, en determinar el efecto de la disponibilidad de recursos sobre la duración de la etapa vegetativa y el tamaño de las plantas al iniciar la reproducción.**

El comportamiento reproductivo (anual o bienal) de especies bienales facultativas no sólo varía entre sitios de diferente calidad ambiental (Johnson 2006) sino además entre años en un mismo sitio (de Jong *et al.* 1998; Sletvold y Grindeland 2007). Esta variabilidad interanual se ha atribuido principalmente al grado de satisfacción de los requerimientos de vernalización (Wesselingh y de Jong 1995), ya sea por diferencias en la duración e intensidad del período de frío invernal (de Jong *et al.* 1986) o bien por las condiciones de crecimiento previas al invierno que determinarán en última instancia si las plantas pueden ser vernalizadas o no (Wesselingh y de Jong 1995). Si bien en la mayoría de las bienales estudiadas la probabilidad de florecer depende del logro de un “tamaño umbral para la vernalización” (de Jong *et al.* 1986; Simons y Johnston 2003), las condiciones ambientales posteriores al invierno también pueden ser determinantes para la floración de algunas especies (Wesselingh *et al.* 1997; Bloom *et al.* 2003).

La exposición a fotoperíodos largos es otro requerimiento obligado para la floración de *Oenothera biennis* (Chouard 1960; Vince-Prue 1975) y de muchas de las bienales que requieren vernalización (Wesselingh y Klinkhamer 1996). Como la marcha fotoperiódica sigue un patrón que se repite año a año, el momento e intensidad con que se da esta señal inductiva es invariable entre años. No obstante, es probable que la respuesta de los individuos sí difiera sustancialmente entre años debido a variaciones en otros factores del ambiente, como la temperatura, la radiación y/o las precipitaciones, que modulan el crecimiento y el desarrollo, antes y durante la ocurrencia de fotoperíodos inductivos, condicionando su sensibilidad a esta señal ambiental. **El tercer objetivo específico es, por lo tanto, analizar posibles interacciones entre factores ambientales normalmente asociados al crecimiento de las plantas y la respuesta fotoperiódica de la floración de *Oenothera biennis*.**

A continuación se presenta una síntesis de los objetivos, general y específicos, y sus correspondientes hipótesis y predicciones.

1.3 OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

1.3.1 Objetivo general

- Generar un avance relevante en el conocimiento de los factores que determinan el comportamiento bienal facultativo de *Oenothera biennis*, y contribuir de esta manera al entendimiento de la fisiología reproductiva de las especies monocárpicas perennes.

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar si la vernalización de *Oenothera biennis* en estado de semilla pre-germinada es posible.
- Cuantificar el efecto de la disponibilidad de recursos sobre la duración de la fase vegetativa y el tamaño de roseta a iniciación floral.
- Analizar posibles interacciones entre factores ambientales que regulan el crecimiento y la respuesta fotoperiódica de la floración de *Oenothera biennis*.

1.3.3 Hipótesis

- **H₁)** *Oenothera biennis* es sensible a temperaturas vernalizantes desde estadíos tempranos de su desarrollo, incluso antes de que aparezca la primera hoja verdadera.

Predicción:

- En siembras primaverales, las plantas vernalizadas en estado de semilla pre-germinada inducirán la floración en esa misma temporada, o presentarán una menor duración de la etapa emergencia-iniciación floral que plantas no sometidas a este tratamiento.

- **H₂)** En *Oenothera biennis*, el momento y tamaño con que los individuos inician la reproducción, depende de la disponibilidad de recursos que regulan su crecimiento.

Predicción:

- Plantas sometidas a una baja disponibilidad de nutrientes retrasarán su floración y presentarán, al inicio de su reproducción, un tamaño similar al que habrán alcanzado plantas con buena disponibilidad en el mismo estado fenológico.

- **H₃)** Existe interacción entre los factores que gobiernan el crecimiento y el desarrollo de *Oenothera biennis* de modo tal que, las condiciones de crecimiento durante la ocurrencia de señales inductoras de la floración, modulan la capacidad de respuesta de los individuos.

Predicción:

- La respuesta floral de *Oenothera biennis* frente a fotoperíodos inductivos se incrementa cuanto mejores son las condiciones para el crecimiento de los individuos.

CAPITULO 2: METODOLOGÍA GENERAL

2.1 Condiciones experimentales

Todos los experimentos de esta tesis se realizaron en el campo experimental de la Cátedra de Cultivos Industriales de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires (FAUBA) (34°35'S, 58°29'O) en un período de cuatro años de duración comprendido entre 2005 y principios de 2009. Se realizó al menos un experimento para cada uno de los objetivos específicos presentados en el capítulo 1.

El genotipo empleado fue un cultivar comercial de Canadá, con antecedentes de comportamiento bienal en siembras primaverales en la localidad de Chillán (36°35'S, 72°04' O), Chile (Herrera Sepúlveda, 2004). Los experimentos se condujeron en macetas plásticas sopladas de 23 y 7 litros, según el objetivo de los experimentos, cuyo sustrato estuvo compuesto por una mezcla de tierra y arena. En los primeros experimentos (**Exp.Vn1** y **Exp.Vn2**, Capítulo 3) la proporción de tierra-arena fue de 2:1, mientras que en los experimentos siguientes la proporción se ajustó a 5:4 para minimizar la mortandad de plantas causada por el anegamiento de macetas luego de períodos de lluvia de alta intensidad o duración.

La siembra y/o el establecimiento de plántulas se realizó en bandejas de germinación, bajo la cubierta de un invernáculo abierto lateralmente. El trasplante a las macetas, el desmalezado y el riego se realizaron en forma manual. Para el control de plagas se empleó cipermetrina (orugas defoliadoras) y carbaryl (coleópteros). También se emplearon hormiguicidas (sulfloramidas) granulados y líquidos como método preventivo y de control de hormigas cortadoras. Sólo se emplearon funguicidas (Carbendazim y Captan) durante la etapa de siembra y establecimiento de plántulas en las bandejas.

Los registros diarios de temperatura (máxima, mínima y media) empleados para el análisis de todos los experimentos fueron provistos por la Cátedra de Climatología de la FAUBA, excepto los correspondientes al establecimiento de las plantas de **Exp.Vn1** (Capítulo 3) que ocurrió bajo un invernáculo calefaccionado. La temperatura de este experimento se calculó a partir del registro térmico horario de 2 data loggers ubicados próximos a las bandejas de trasplante. La marcha anual del fotoperíodo se obtuvo de la página oficial del Observatorio Naval de Estados Unidos (http://aa.usno.navy.mil/data/docs/RS_OneYear.php). Para el cálculo de la duración del día, se consideró el tiempo transcurrido entre el amanecer y el ocaso más la duración de los crepúsculos civiles (Goodspeed 1975).

2.2 Mediciones de fenología y tamaño

La metodología empleada para seguir el crecimiento y desarrollo de *Oenothera biennis* fue desarrollada y calibrada durante el transcurso de esta tesis. Consecuentemente, los primeros experimentos (*i.e.* de los años 2005 y 2006) no incluyen el análisis de algunas variables que fueron definidas posteriormente. Se describen a continuación metodologías generales que son comunes a experimentos de toda la tesis y una breve descripción del ciclo de vida de las especies bienales y de *Oenothera biennis* en particular. La descripción de metodologías más específicas para cada objetivo en particular, se detallará en la sección de materiales y métodos del capítulo correspondiente al objetivo en cuestión.

2.2.1 Ciclo de vida de *Oenothera biennis* y mediciones de fenología

Las especies bienales normalmente atraviesan tres fases a lo largo de su ciclo de vida: i) crecimiento de roseta, ii) elongación del tallo o vara floral y iii) floración y fructificación (Couvet *et al.* 1990). La primer fase es preponderantemente vegetativa, aunque incluye eventos reproductivos tempranos como el cambio del meristema apical (o axilares según la especie) y el comienzo la diferenciación de primordios de estructuras reproductivas. Estos eventos no pueden detectarse macroscópicamente. Las otras dos etapas forman parte del programa de desarrollo reproductivo y, en general, la elongación de la vara floral es prelude de la floración.

En *Oenothera biennis*, la primer fase se caracteriza por el crecimiento vegetativo de una roseta acaule que se expande en el plano horizontal al ras del suelo (Gross y Werner 1982). Luego de la iniciación floral del ápice de crecimiento, cuando finaliza el programa de crecimiento vegetativo e inicia el desarrollo reproductivo, ocurre la elongación del tallo floral (Hall *et al.* 1988; Reekie y Reekie 1991) y se produce un incremento notable en la tasa de crecimiento (Couvet *et al.* 1990). A medida que transcurre la etapa reproductiva, ocurre una transición en la morfología de las hojas desde las lanceoladas y pecioladas propias de la roseta, a las más cortas y sésiles de la vara floral (Reekie y Reekie 1991). Finalmente, las plantas que alcanzan la floración (fase iii), maduran y mueren en esa misma estación de crecimiento (figura 2.1).

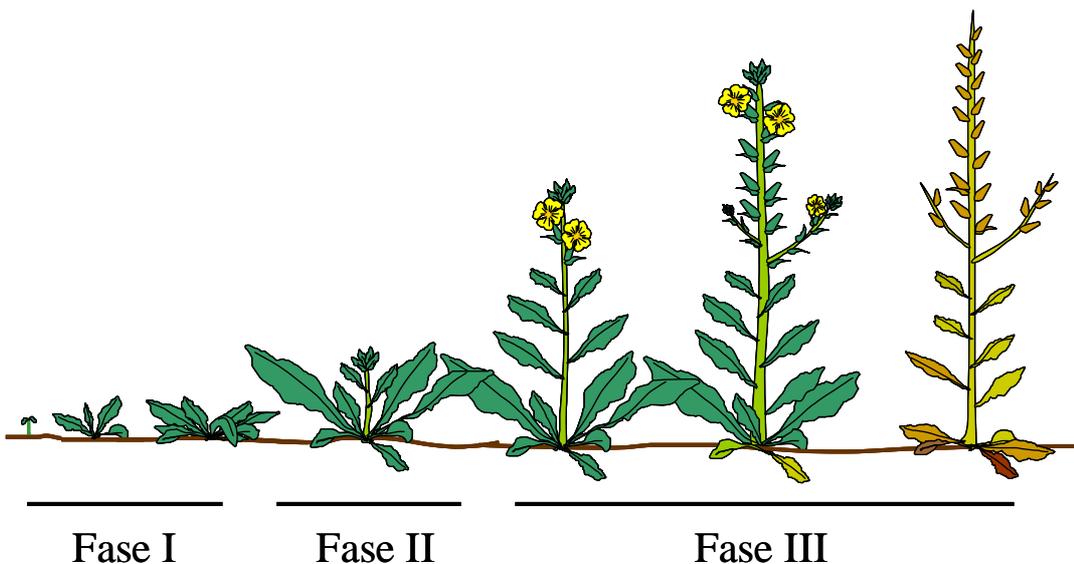


Figura 2.1: Ciclo de vida de *Oenothera biennis* y ubicación de las fases descritas por Couvet *et al.* (1990). Fase I: crecimiento de roseta; fase II: elongación del tallo floral y fase III: floración y fructificación.

Si bien Simpson (1994) ha desarrollado una escala fenológica macroscópica para describir el ciclo de vida de *Oenothera biennis*, en la actualidad no existe una metodología para determinar con precisión el momento de iniciación floral. La primera manifestación visible de que la planta alcanzó el estado reproductivo es la elongación del tallo floral. En la escala de Simpson (1994), el primer estadio reproductivo es GS 2,5 que corresponde a la elongación del quinto entrenudo con una longitud mayor a su ancho. Sin embargo, en esta tesis se optó por crear un indicador más temprano del inicio

de elongación del tallo (el estadio **ET1**), ya que ocurre más próximamente a iniciación floral y es más fácil de determinar que GS 2,5.

En la figura 2.2 se ilustran diferentes estadios del ciclo de vida de *Oenothera biennis*. Los dos estadios fenológicos principales a los que se hará referencia en esta tesis son **ET1**, que marca el fin de la fase I y el comienzo de la fase II y **FL1** que da inicio a la fase III de Couvet *et al.* (1990). Estos estadios se describen a continuación:

- **ET1:** Elongación de la vara floral (o tallo) principal a 1 cm. de distancia de la superficie del suelo (figura 2.2c). Es la primera manifestación macroscópica de que las plantas finalizaron la fase de crecimiento vegetativo de roseta y comenzaron la fase reproductiva. Como éste es un carácter difícil de determinar con exactitud, el momento de ET1 se estimó indirectamente a partir de regresiones no lineales de la altura de la planta en función del tiempo (figura 2.3).
- **FL1:** Inicio de la floración de una planta individual. Una planta alcanza este estadio fenológico con la apertura de su primera flor en el tallo principal (figura 2.2d). Este carácter es objetivo y fácilmente detectable, incluso un día después de ocurrido (las flores abren al atardecer y se van marchitando durante día siguiente). Es equivalente al estadio GS 4,1 de la escala de Simpson (1994).



Figura 2.2: Diferentes estadios fenológicos de *Oenothera biennis*, a) plántula con 3 hojas verdaderas, b) roseta (13 hojas), c) inicio de elongación del tallo floral (poco después de **ET1**) y d) **FL1**, primera flor abierta.

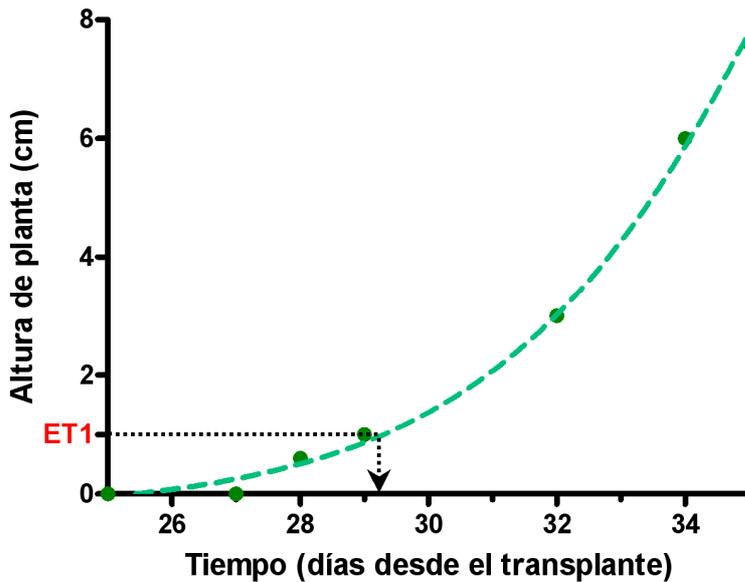


Figura 2.3: Esquema de la estimación del momento de **ET1** a partir de una regresión no-lineal (sigmoide) de la altura de la planta en función del tiempo. El procedimiento consiste en determinar, por despeje matemático, el momento X en que la planta tiene una altura de $Y=1$.

Los estadíos **ET1** y **FL1** son utilizados en esta tesis para describir la fenología a nivel de planta individual. Las plantas que no alcanzaron estos estadíos fenológicos durante el transcurso de los experimentos (*i.e.* no florecieron en la primera estación de crecimiento), se consideraron bianuales. La proporción de individuos de comportamiento anual (**%An**) se calculó como el cociente entre el número de plantas que alcanzaron los estadíos **ET1** y **FL1** sobre el total de plantas que conformaron la unidad experimental. Para la comparación de **%An** entre tratamientos se utilizó la transformación arcoseno de las proporciones registradas (Little y Hills 1975).

Para hacer referencia al estado de desarrollo en que se encuentra una población de individuos (*i.e.* un conjunto de macetas que forman una unidad experimental), se consideró el estadío en que se encuentran el 50% de los individuos que la componen. Se designó **ET1₍₅₀₎** al momento en que el 50% de los individuos alcanzaron el estadío **ET1** y, del mismo modo, se designó **FL1₍₅₀₎**. En los casos en que no todos los individuos alcanzaron los estadíos **ET1** y **FL1**, **ET1₍₅₀₎** y **FL1₍₅₀₎** se calcularon sobre la base de los individuos de comportamiento anual. Por ejemplo, si de una parcela de 20 plantas, florecieron 15, **FL1₍₅₀₎** ocurrió cuando la octava planta abrió su primer flor.

También se consideró relevante, en algunos experimentos, el momento en que se dio el primer registro del estadío **ET1**. Este momento se designó **ET1₍₁₎** y representa el momento en que la 1er planta de un experimento dado alcanza el estado reproductivo (**ET1**). Se asume que antes de **ET1₍₁₎** todas las plantas están en estado vegetativo.

La tasa de desarrollo (**TD**, día⁻¹) entre dos estadíos fenológicos dados se calculó como la función inversa del intervalo (en días) entre ellos. Por ejemplo: la tasa de desarrollo entre **ET1** y **FL1**, se denomina **TD_{ET1-FL1}**, siendo **TD_{ET1-FL1} = 1/(FL1-ET1)**.

Finalmente, el número de hojas aparecidas (**NH**) fue utilizado como un estimador de la edad fisiológica de las plantas en algunos experimentos. Se consideró como aparecida a toda hoja de longitud mayor o igual a 1cm.

2.2.2 Estimaciones de biomasa y crecimiento

Se emplearon mediciones individuales del área de roseta (**AR**) para estimar, en forma no destructiva, la biomasa acumulada por las plantas en diferentes momentos a lo largo de la fase vegetativa. **AR** (cm^2) representa la superficie de suelo cubierta por la parte aérea de la planta y se obtiene a partir de fotografías digitales tomadas a cada planta individual. Este parámetro sirve para estimar tanto la biomasa aérea como la biomasa total (parte aérea + raíz) de las rosetas de *Oenothera biennis* (la metodología utilizada para la estimación no destructiva de biomasa se detalla en Anexo II).

La tasa de crecimiento (**TC**) se calculó como el cociente entre la diferencia entre dos mediciones de **AR**, sobre el intervalo (en días) entre dichas mediciones. Se designó **TC_v**, tasa de crecimiento media de la fase vegetativa ($\text{cm}^2/\text{día}$), a la **TC** medida a partir de la medición de **AR** al momento del trasplante a campo y de la última medición de **AR** antes de **ET1₍₁₎**, es decir, cuando todas las plantas estaban en estado vegetativo.

Del mismo modo, se designó **TC_{FP-ET1(1)}**, tasa de crecimiento media durante la ocurrencia de condiciones inductivas de fotoperíodo, a la **TC** obtenida a partir de las mediciones de **AR** al inicio del tratamiento de fotoperíodo y de la última medición de **AR** antes de **ET1₍₁₎**.

2.3 Manipulación de factores ambientales reguladores del desarrollo

Para estudiar el efecto de las principales variables implicadas en el control del desarrollo, *i.e.* vernalización y fotoperíodo, se generaron, en forma artificial, condiciones potencialmente inductivas para la floración. Estas condiciones se lograron con la exposición de plántulas recién germinadas en cámaras de frío para lograr condiciones de vernalización (Capítulo 3) o bien con la extensión artificial del fotoperíodo natural mediante el empleo de luminarias en condiciones de campo, para lograr fotoperíodos largos inductivos (Capítulo 5). La metodología empleada para la vernalización de las plántulas se describe en detalle en la sección materiales y métodos del capítulo 3. La metodología para lograr la extensión del fotoperíodo, se describe a continuación.

Los tratamientos de extensión fotoperiódica consistieron en suplementar los fotoperíodos naturales con luz artificial de modo de extender el período de luz a una duración constante de 15 ó 18 horas luz/día según el tratamiento (**FP15** ó **FP18**). Para tal fin se emplearon temporizadores electrónicos programados para el encendido y apagado automático de las luminarias (Tabla 2.1).

	Encendido	Apagado	Encendido	Apagado	Duración del período de luz
FP15	Ocaso	8:00 p.m.	05:00 a.m.	Amanecer	15 hrs.
FP18	Ocaso	10:00 p.m.	04:00 a.m.	Amanecer	18 hrs.

Tabla 2.1: Secuencia de encendido-apagado de las luminarias para la extensión del fotoperíodo a una duración constante de 15 (FP15) y 18 (FP18) horas de luz/día. Ocaso y amanecer no toman valores numéricos dado que varían con la época del año (en la práctica el encendido del ocaso y el apagado del amanecer fueron ajustados cada 15 días).

Las luminarias consistieron de una combinación de tubos fluorescentes (36W) y lámparas incandescentes de baja intensidad lumínica (40W) con la que se logró una luz de composición espectral similar a la del ocaso (relación rojo:rojo lejano ≈ 1.3). Las mismas, se dispusieron por encima de las parcelas tratadas (1 luminaria por parcela) a una altura de 1,7 mts (figura 2.4).

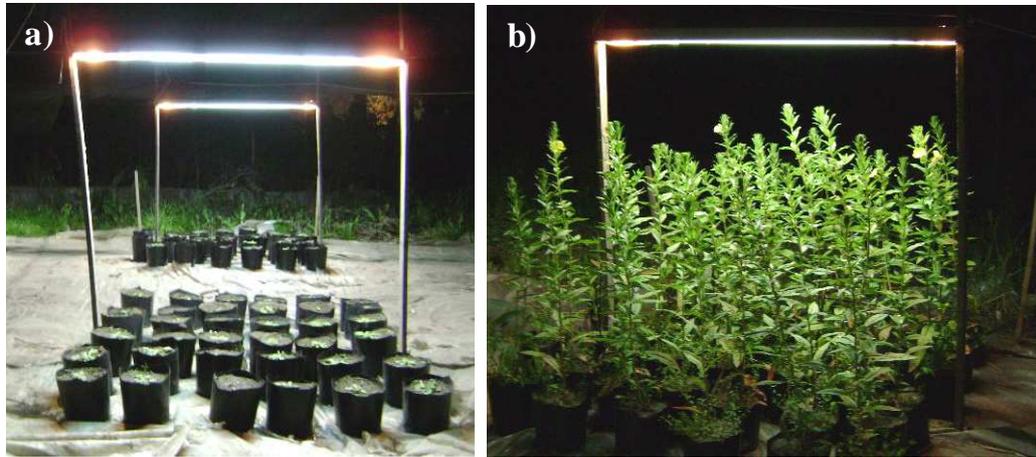


Figura 2.4: Detalle de luminarias utilizadas para la extensión artificial del fotoperíodo durante **a)** la fase vegetativa de *Oenothera biennis* y **b)** el inicio de floración de los primeros individuos de una unidad experimental (parcela). Fotos nocturnas tomadas en (a) 20/7/2007 y (b) 8/10/2007

Finalmente, se utilizó la fertilización como otra forma de manipular las condiciones ambientales en que se desarrollaron las plantas. Si bien la disponibilidad de nutrientes no es un parámetro normalmente asociado a la regulación del desarrollo de los cultivos tradicionales, se consideró como variable probable para que tenga un rol importante en la floración de las especies bienales facultativas dado que, en estas especies, el momento de reproducción estaría más determinado por el tamaño de los individuos que por su edad cronológica (ver referencias en Kachi y Hirose, 1985). La fertilización fue aplicada como un tratamiento para generar contrastes en el tamaño y/o crecimiento de los individuos en los experimentos de los capítulos 4 y 5, donde se detalla el modo y momento de aplicación.

Recapitulando, en esta tesis se manipularon distintas variables ambientales candidatas a ser reguladoras del desarrollo a floración de *Oenothera biennis*. Específicamente se analizó el efecto de la vernalización aplicada en estadios iniciales de las plántulas (Capítulo 3), de los fotoperíodos largos (inductivos) logrados mediante la extensión con luminarias (Capítulo 5) y de la disponibilidad nutricional mediante el uso de fertilizante (Capítulos 4 y 5). En todos ellos se midieron variables fenológicas asociadas al inicio de la reproducción (**ET1**, excepto en Capítulo 3 ya que todavía no se había establecido cómo medir este estadio) y la floración (**FL1**), así como del comportamiento reproductivo de la especie (**%An**). Por último, en los capítulos 4 y 5 se emplearon variables de crecimiento (**AR** y **TC**) y de edad fisiológica (**NH**) para tratar de explicar cómo el tamaño interviene en la regulación del desarrollo y comprobar si el tamaño es mejor indicador que la edad de la capacidad de las plantas de responder a los estímulos ambientales desencadenantes de la floración.

CAPITULO 3: VERNALIZACIÓN DE *OENOTHERA BIENNIS* EN ESTADO DE PLÁNTULA.

3.1 Introducción

La vernalización es un requerimiento generalizado para la floración de las especies bienales (Bender *et al.* 2002a). La mayoría de estas especies tienen requerimientos absolutos (obligados) por lo que son incapaces de florecer sin la exposición previa a períodos prolongados de frío (Lang 1952; Michaels y Amasino 2000; Amasino 2004; Sung y Amasino 2005). Además, también hay especies bienales con requerimientos facultativos (cuantitativos) de frío y, en menor proporción, especies insensibles a la vernalización (Anexo I).

Las especies monocárpicas difieren en el estado ontogénico en que son capaces de ser vernalizadas. Por ejemplo, especies anuales como los cereales invernales, pueden ser vernalizadas en estadíos tempranos de su desarrollo, incluso en estado de semilla inmadura (Urbano Terrón 1992). Otras plantas, sin embargo, son incapaces de recibir el efecto estimulador del frío en estado de semilla y deben alcanzar una determinada edad o estado ontogénico para poder ser vernalizadas (Urbano Terrón 1992; Michaels y Amasino 2000).

Bernier, *et al.* (1981) sostienen que las plantas que presentan requerimientos absolutos de vernalización atraviesan normalmente una fase juvenil durante la cual son insensibles a las bajas temperaturas vernalizantes (Dielén *et al.* 2005). A su vez, en la mayoría de las especies bienales facultativas estudiadas se ha encontrado que la respuesta a la vernalización está condicionada por el logro de un umbral mínimo de biomasa (Werner 1975; Baskin y Baskin 1979a y b; Gross 1981; Taiz y Zeiger 1998), por lo que la aplicación de un tratamiento de frío en las semillas de estas especies tendría un efecto mínimo o nulo (Lang 1952). Por otra parte, también hay antecedentes de especies bienales cuya vernalización no dependería del tamaño de planta, aunque éstas son menos frecuentes (Klinkhamer *et al.* 1987 a y b; Kachi 1990).

Oenothera biennis L. ha sido caracterizada como una típica planta bienal con un requerimiento absoluto de vernalización para la iniciación floral la cual ocurre, posteriormente, bajo condiciones inductivas de día largo (Chouard 1960; Picard 1967). Como tal, la vernalización en estado de semilla embebida sería ineficaz (Chouard 1960) y la capacidad de respuesta a la vernalización se alcanzaría recién con la expansión de la décima hoja, en condiciones de día largo, o de la vigésima hoja en condiciones de día corto (Picard 1965 citado en Urbano Terrón 1992). No obstante, antecedentes más recientes indican que *Oenothera biennis* responde cuantitativamente a la vernalización (Vince-Prue 1975 citado en Collins y Scarisbrick 1994) y que incluso puede ser vernalizada en estado de semilla embebida (Thomas y Vince-Prue 1997 citado en Erwin 2007).

Independientemente del antagonismo entre los antecedentes citados, la caracterización de la respuesta a la vernalización de una especie es de utilidad para definir la factibilidad de su cultivo en diferentes zonas productivas y/o distintas épocas de siembra. Adicionalmente, esta información resulta imprescindible para entender o interpretar la variabilidad interanual que se manifiesta comúnmente en el comportamiento reproductivo de las especies bienales facultativas (Klinkhamer *et al.* 1991). Por lo tanto, el objetivo de esta sección de la tesis es verificar si la vernalización es un requerimiento obligado en *Oenothera biennis* y determinar si el tratamiento de frío, en estado de semilla pre-germinada, es efectivo para satisfacer ese requerimiento.

Para ello, se pone a prueba la primer hipótesis de esta tesis (H_1), que establece que *Oenothera biennis* es sensible a temperaturas vernalizantes, incluso antes de que aparezca la primera hoja verdadera.

3.2 Materiales y métodos

Durante el año 2005 se llevaron a cabo dos experimentos (**Exp.Vn1** y **Exp.Vn2**) en el campo experimental de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires (FAUBA; 34°35'S, 58°29'O) para determinar si la vernalización artificial de semillas embebidas adelanta la floración en *Oenothera biennis*. Estos experimentos se realizaron en fechas de siembra contrastantes (**Exp.Vn1** en invierno y **Exp.Vn2** en primavera) con el fin de generar diferencias en las condiciones fototermales exploradas por las plantas luego de la vernalización. Los detalles de **Exp.Vn1** y **Exp.Vn2** se presentan a continuación (tabla 3.1).

	Exp.Vn1		Exp.Vn2	
	Vn+	Vn-	Vn+	Vn-
Siembra en incubadora 20/30°C	15/06/2005	12/07/2005	06/09/2005	05/10/2005
Entr. A cámara (Vn:5°C S/Vn: 20/30°C)	17/06/2005	14/07/2005	08/09/2005	07/10/2005
Repique a Spildings bajo cubierta	19/07/2005	19/07/2005	12/10/2005	12/10/2005
Trasplante a macetas a campo	07/09/2005	07/09/2005	09/12/2005	09/12/2005
Días en cámara 5°C	32	0	34	0
Número final de plantas/trat.	48	50	44	50

Tabla 3.1: Cronograma de actividades desarrolladas para lograr los tratamientos **Vn+** y **Vn-** en **Exp.Vn1** y **Exp.Vn2** y número de plantas que completaron exitosamente los experimentos.

En ambos experimentos se procedió de manera similar. Se emplearon dos tratamientos: vernalización de semillas (**Vn+**) y testigo sin vernalizar (**Vn-**). Para **Vn+**, semillas de *Oenothera biennis* se dispusieron sobre un papel de germinación humedecido en bandejas plásticas cerradas herméticamente. Estas bandejas se colocaron en una cámara climática de temperaturas alternadas (20–30°C), necesarias para la salida de dormición y se retiraron a los 2 días, cuando la mayoría las semillas ya habían extruído la radícula. Luego de la germinación, las semillas se sembraron en bandejas con arena humedecida (a 7 - 10 mm de profundidad), las cuales permanecieron en una cámara oscura de 5 °C durante 32-34 días (tabla 2.1). La duración del período de frío fue similar a la empleada para la vernalización de semillas de *O. biennis* en siembras primaverales de Polonia, aunque con una temperatura ligeramente superior (Król 2007). A lo largo del tratamiento de vernalización, las bandejas se revisaron periódicamente para regar oportunamente las plántulas y asegurar una adecuada provisión de oxígeno.

En forma paralela, aproximadamente una semana antes de finalizado el período de vernalización de **Vn+**, se incubaron semillas de **Vn-** en cámara climática de 20-30°C. Las que germinaron se sembraron en bandejas con arena humedecida y retornaron a la cámara de 20 – 30 °C donde permanecieron hasta que las plántulas lograron un tamaño de hipocótilo similar al que alcanzaron las plántulas vernalizadas (5 a 7 días).

Las condiciones posteriores a la aplicación de los tratamientos fueron las mismas para **Vn+** y **Vn-**. Las plántulas logradas se trasplantaron a bandejas de germinación

(tierra-arena 2:1) y se colocaron bajo cubierta a fin de asegurar un buen establecimiento y minimizar los riesgos de mortalidad. En **Exp.Vn1** la cubierta consistió en un invernáculo con calefacción para evitar efectos de vernalización natural de las plántulas por la temperatura ambiente de invierno, mientras que en **Exp.Vn2** se empleó un invernáculo sin control de temperatura.

Una vez establecidas, las plántulas se trasplantaron a macetas de 23 litros (tierra-arena 2:1) y se agruparon en grupos de veinte que fueron llevadas a condiciones de campo. En **Exp.Vn1** se utilizó un diseño completamente aleatorizado (DCA), mientras que en **Exp.Vn2** se usó un diseño en bloques completos aleatorizado (DBCA), para reducir posibles efectos de sombreo de un experimento adyacente. Ambos contaron con tres repeticiones por tratamiento. Hubo un porcentaje variable de plantas que murieron antes de finalizado el experimento por lo que el número final de plantas difirió ligeramente entre tratamientos (tabla 3.1).

Se registró el momento en que inició la floración cada planta individual (**FL1**). El porcentaje final de plantas anuales (**%An**: plantas que florecieron y maduraron en el primer ciclo experimental) y el tiempo transcurrido desde el trasplante hasta floración (**FL1₍₅₀₎**: 50% de los individuos con al menos una flor abierta) se comparó entre tratamientos mediante una prueba *t* de significancia estadística.

Para aumentar la sensibilidad del análisis la dinámica del inicio de la floración de cada tratamiento (proporción de plantas en **FL1** en función del tiempo) se ajustó a un modelo no-lineal (función sigmoidea de Boltzmann) cuyos parámetros también se analizaron estadísticamente. La fórmula, la representación gráfica y una interpretación biológica de los parámetros del modelo empleado se presentan en la Figura 3.1.

$$Y = a + \frac{(b - a)}{1 + \exp\left(\frac{c - X}{d}\right)}$$

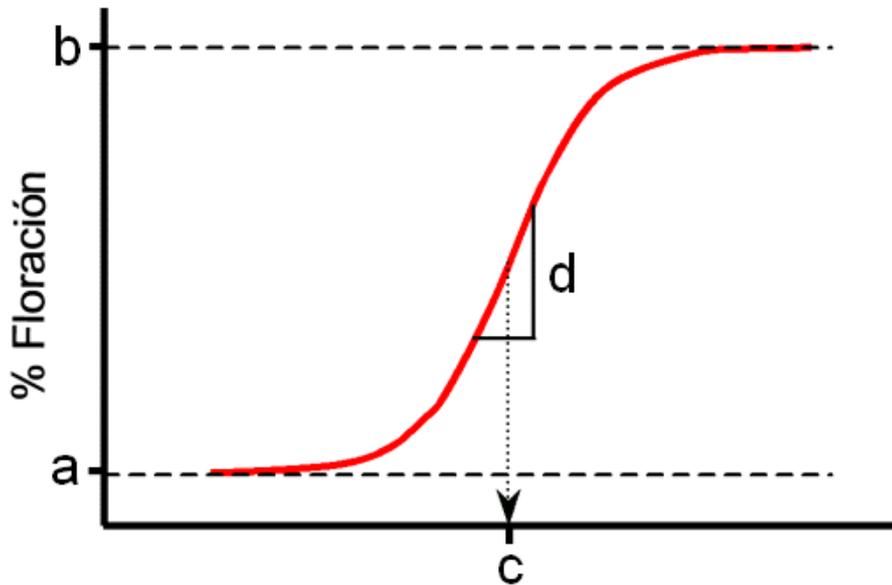


Figura 3.1: Fórmula y esquema del modelo sigmoide de Boltzmann. Interpretación de los parámetros del modelo:

- **X:** Unidad de tiempo (días transcurridos desde el trasplante).
- **Y:** Proporción (%) de los individuos de una unidad experimental (macetas agrupadas en microparcels) que alcanzaron el estadio fenológico **FL1** en el momento X.
- **a:** Mínima proporción de individuos que alcanzan el estadio fenológico **FL1**.
- **b:** Máxima proporción de individuos que alcanzan el estadio fenológico **FL1**. Puede tener valor entre 0 y 100%.
- **c:** Momento (días desde el trasplante) en que ocurre el estadio fenológico en el 50% de los individuos que alcanzan dicho estado al final del experimento.
- **d:** Indicador de la tasa con que los individuos de una población alcanzan el estadio fenológico **FL1**. Da idea de la sincronía o asincronía de una población en iniciar la floración. Cuanto menor es este valor, más sincrónica es la floración.

3.3 Resultados

Las fechas de siembra empleadas en los experimentos **Exp.Vn1** y **Exp.Vn2** permitieron generar situaciones contrastantes en el ambiente fototermal explorado por las plantas al finalizar la aplicación de los tratamientos de vernalización **Vn+** y **Vn-** (figura 3.2, tabla 3.2). Estas diferencias determinaron importantes variaciones en la longitud del ciclo de las plantas hasta la floración (figura 3.3b, Tabla 3.3) y en el comportamiento reproductivo las plantas (figura 3.3a).

Las mayores diferencias en el ambiente térmico ocurrieron a campo, durante el crecimiento vegetativo de las rosetas y elongación de su tallo floral, con temperaturas medias superiores en 5,5 °C en **Exp.Vn2** respecto a **Exp.Vn1**. También se registraron diferencias térmicas importantes durante la fase de establecimiento de las plántulas bajo cubierta (3,2 °C superior en **Exp.Vn2**) debido principalmente a una mayor T_{min} promedio en ese experimento. Durante el inicio de floración (cuando las plantas estaban alcanzando el estadio **FL1**) las diferencias fueron menos marcadas con temperaturas levemente superiores en **Exp.Vn1**. En cuanto al ambiente fotoperiódico, **Exp.Vn2** exploró, en general, condiciones lumínicas potencialmente más inductivas (días más largos) hasta fines del período pre-floración (Tabla 3.2).

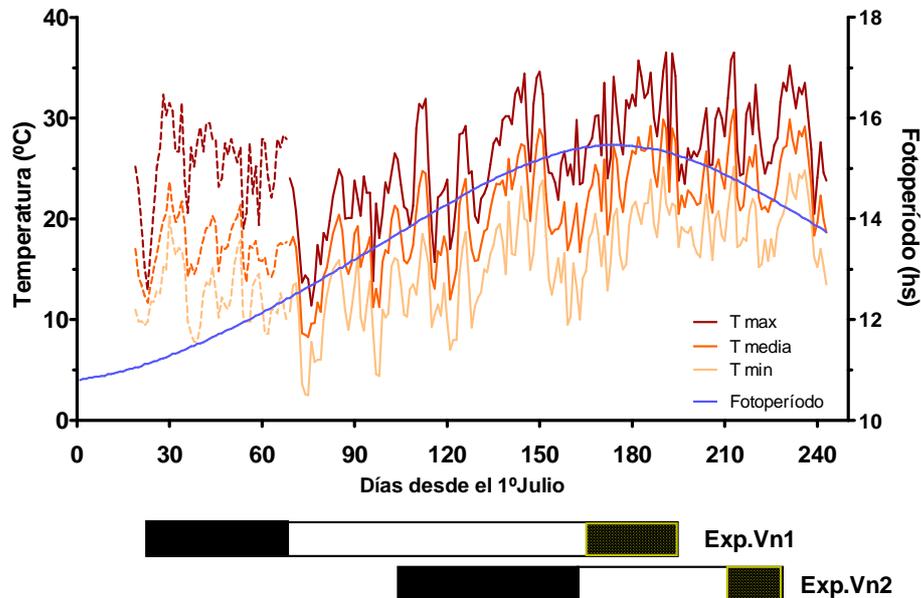


Figura 3.2: Condiciones fototermales (T_{media} , T_{min} , T_{max} y FP) exploradas luego de la aplicación de los tratamientos **Vn+** y **Vn-** en **Exp.Vn1** y **Exp.Vn2**. Las líneas enteras representan las condiciones ambientales a la intemperie y las punteadas las condiciones bajo cubierta en invernáculo con calefacción. Las barras de la parte inferior del gráfico indican los períodos en que ocurrieron las fases de establecimiento de plántulas en bandejas bajo cubierta (trama rayada) y de crecimiento de plantas en macetas en condiciones de campo (sin trama). La barra amarilla señala el período de inicio de floración (**FL1**), de **Vn+** y **Vn-** en forma conjunta, para cada experimento.

	Bandejas bajo cubierta		$\Delta(\text{Exp.2-Exp.1})$
	Exp.1	Exp.2	
Duración (días)	50	59	9
Tmedia (°C)	17,2 ± 0,37	20,4 ± 0,53	3,2
Tmin (°C)	12,3 ± 0,42	14,9 ± 0,52	2,6
Tmax (°C)	25,4 ± 0,59	25,9 ± 0,6	0,5
FP(hs)	11,7 ± 0,06	14,7 ± 0,07	3

	Crecimiento pre-floración (a campo)		$\Delta(\text{Exp.2-Exp.1})$
	Exp.1	Exp.2	
Duración (días)	96	49	-47
Tmedia (°C)	18,4 ± 0,47	23,9 ± 0,43	5,5
Tmin (°C)	13,2 ± 0,46	18,6 ± 0,42	5,4
Tmax (°C)	23,7 ± 0,52	29,3 ± 0,52	5,6
FP(hs)	14,1 ± 0,09	15,3 ± 0,02	1,2

	Inicio de floración (FL1)		$\Delta(\text{Exp.2-Exp.1})$
	Exp.1	Exp.2	
Duración (días)	31	17	-14
Tmedia (°C)	24,8 ± 0,56	23,8 ± 0,77	-1
Tmin (°C)	19,1 ± 0,53	18,8 ± 0,7	-0,3
Tmax (°C)	30,5 ± 0,66	28,8 ± 0,94	-1,7
FP(hs)	15,4 ± 0,01	14,6 ± 0,04	-0,8

Tabla 3.2: Cuadro comparativo de las condiciones fototermales exploradas en **Exp.Vn1** y **Exp.Vn2** luego de la aplicación de los tratamientos **Vn+** y **Vn-**. Para cada variable se presenta el valor medio entre tratamientos, el error estándar y el diferencial entre experimentos.

En los dos experimentos la vernalización de semillas tuvo un efecto promotor sobre la floración de *Oenothera biennis*. En **Exp.Vn1**, este efecto se manifestó como un incremento en la proporción de individuos anuales en **Vn+**, aunque solo para un nivel de significancia cercano al 10% ($p = 0,09$, fig 3.3a). La proporción de plantas florecidas en la primer estación de crecimiento fue relativamente alta: $93,8\% \pm 6,2$ y $84,1\% \pm 2,9$, para **Vn+** y **Vn-** respectivamente. A su vez, las plantas vernalizadas tuvieron una mayor tasa de desarrollo hasta floración, ya que **Vn+** abrió la primer flor, en promedio, casi 5 días antes que **Vn-** ($p < 0,05$, figura 3.3b). El inicio de floración del 50% de los individuos ocurrió a 105 y 111 días del trasplante a campo en **Vn+** y **Vn-** respectivamente.

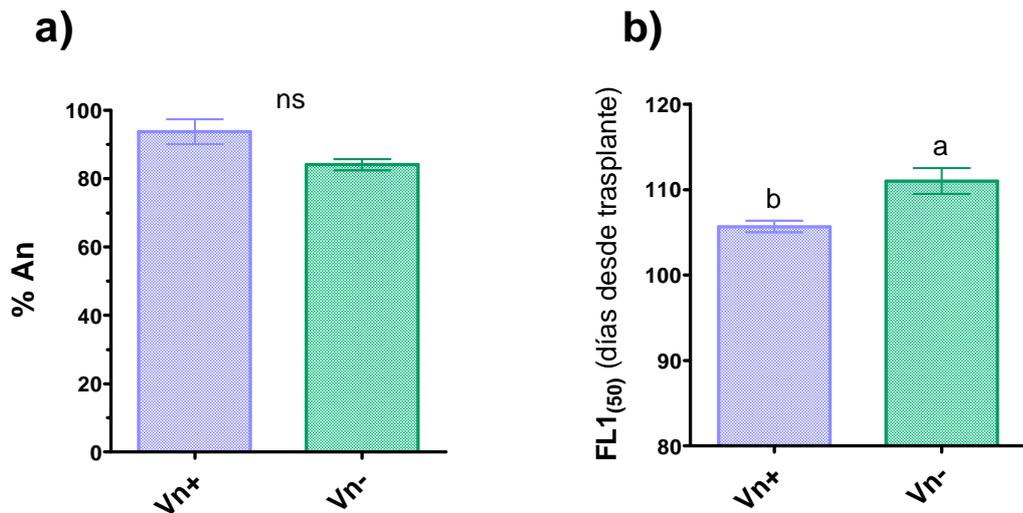


Figura 3.3: a) Proporción de individuos de comportamiento anual (%An, plantas florecidas en esa temporada) y b) días transcurridos desde el trasplante hasta el inicio de floración del 50% de las plantas anuales ($FL1_{(50)}$), en **Exp1**. Tratamientos: **Vn+**, plantas vernalizadas en estado de semilla pre-germinada y **Vn-**, plantas sin vernalización artificial. Letras diferentes indican diferencias significativas y ns, sin diferencias entre tratamientos ($p < 0,05$).

La dinámica del inicio de floración, para los dos tratamientos, pudo representarse adecuadamente con la función sigmoide de Boltzmann ($r^2=0,96$ $n=105$ y $r^2=0,96$ $n=105$ para **Vn+** y **Vn-** respectivamente, figura 3.4). En concordancia con los resultados anteriores, sólo se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) en los parámetros de la función que hacen referencia a la proporción final de plantas florecidas (parámetro b) y al momento en que ocurrió el inicio de floración en el 50% de los individuos de cada tratamiento (parámetro c) (tabla 3.4).

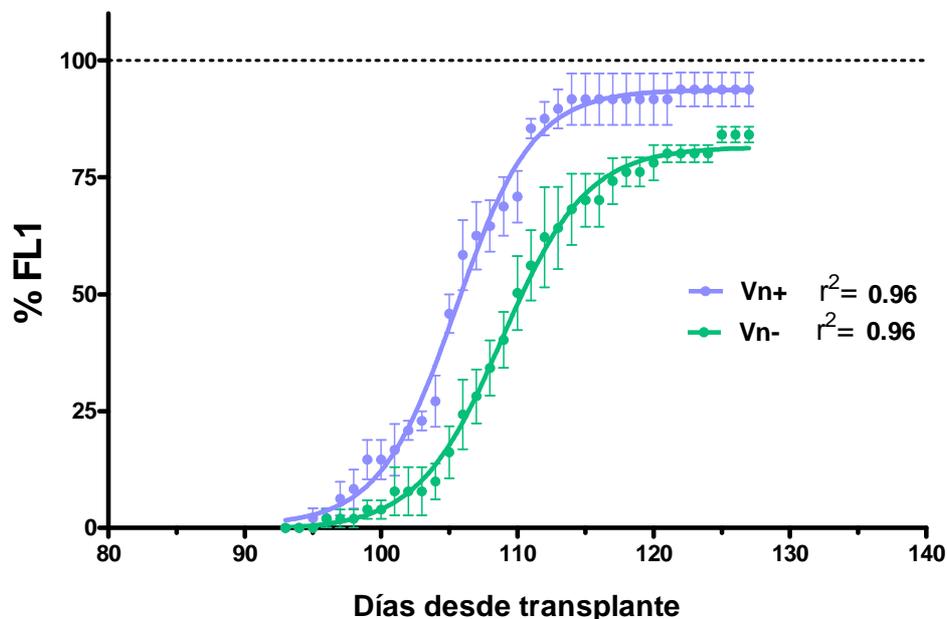


Figura 3.4: Dinámica del inicio de floración (FL1) de plantas de *Oenothera biennis*, vernalizadas en estado de semilla pre-germinada (**Vn+**) y sin vernalización artificial (**Vn-**), correspondientes a **Exp.Vn1**. Las líneas llenas indican el ajuste de las observaciones según la función de Boltzmann ($n=105$), los símbolos los valores promedio observados y las barras su error estándar ($n=3$).

	a	b	c	d
Vn+	0,5892	93,72	105,5	2,83
Vn-	0,3709	81,46	108,9	3,09
Valor-p	0,9406	<0,0001	<0,0001	0,503

Tabla 3.3: Valores predichos de los parámetros de la función de Boltzmann, aplicada a los tratamientos **Vn+** (vernalizadas en estado de semilla) y **Vn-** (sin vernalización artificial) del **Exp.Vn1**.

Los resultados de **Exp.Vn2**, siguieron un patrón similar al de los de **Exp.Vn1**, aunque con una floración más temprana, una proporción considerablemente menor de plantas florecidas y una mayor variabilidad entre repeticiones dentro de los tratamientos. En términos generales, **Vn+** tendió a incrementar la proporción de individuos anuales respecto a **Vn-** (52,5% en **Vn+** vs. 33,8 % en **Vn-**, $p < 0.1$, figura 3.5a), y a reducir el tiempo medio hasta floración (53 días en **Vn+** vs 54,7 días en **Vn-**, $p = 0,13$) aunque sin diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos (figura 3.5b). Sin embargo, cuando se analizaron los resultados a partir de la regresión de Boltzmann (figura 3.6), las diferencias entre tratamientos se hicieron más evidentes ya que, a un nivel de significancia del 5%, **Vn+** presentó tanto una mayor proporción de plantas anuales (parámetro b) como un menor tiempo medio a floración (parámetro c) (Tabla 3.4).

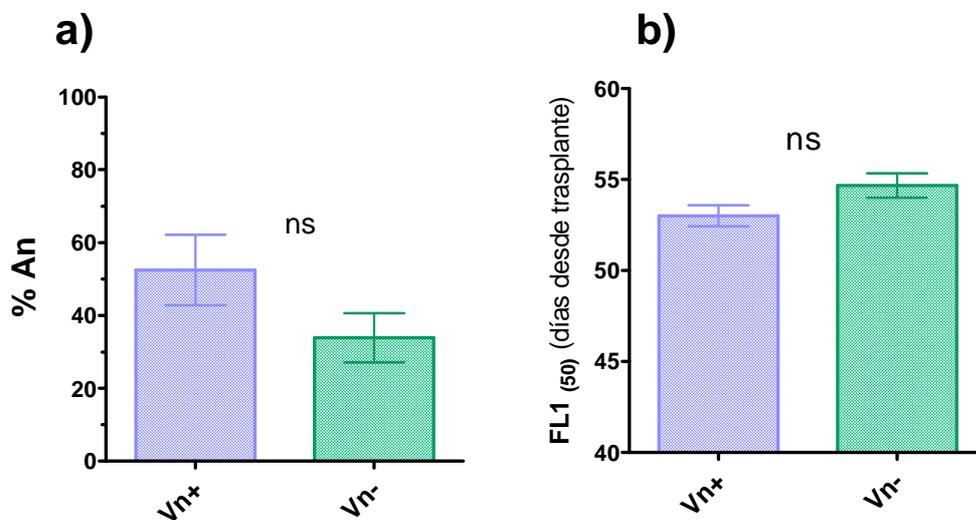


Figura 3.5: a) Proporción de individuos de comportamiento anual (%An, plantas florecidas en 2005) y b) días transcurridos desde el trasplante hasta el inicio de floración del 50% de las plantas anuales (FL1₍₅₀₎) en **Exp2**. Tratamientos: **Vn+**, plantas vernalizadas en estado de semilla pre-germinada y **Vn-**, plantas sin vernalización artificial. ns indica que no hay diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

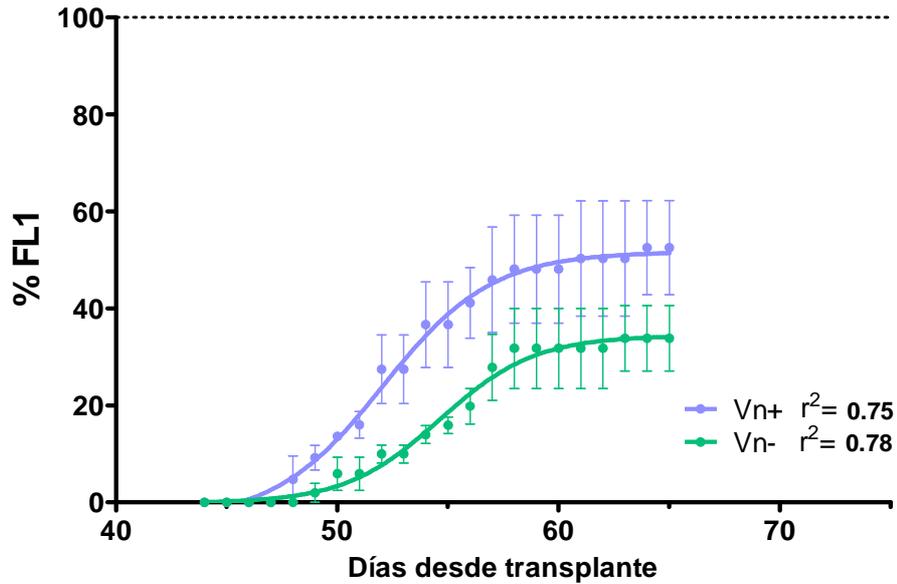


Figura 3.6: Dinámica del inicio de floración (**FL1**) de plantas de *Oenothera biennis*, vernalizadas en estado de semilla pre-germinada (**Vn+**) y sin vernalización artificial (**Vn-**), correspondientes a **Exp.Vn2**. Las líneas llenas indican el ajuste de las observaciones según la función de Boltzmann ($n=66$) y las barras su error estándar ($n=3$).

	a	b	c	d
Vn+	-3,684	51,67	52,06	2,456
Vn-	0,1753	34,40	54,64	4,144
Valor-p	0,5798	<0,0001	0,0256	0,7733

Tabla 3.4: Valores predichos de los parámetros de la función de Boltzmann, aplicada a los tratamientos **Vn+** (vernalizadas en estado de semilla) y **Vn-** (sin vernalización artificial) del **Exp.Vn2**.

3.4 Discusión

Estos resultados apoyan la hipótesis que *Oenothera biennis* es factible de ser vernalizada en estado de semilla embebida (H_1). La respuesta a la vernalización tuvo un carácter tanto cualitativo como cuantitativo ya que las semillas tratadas (**Vn+**), presentaron una menor proporción de individuos de comportamiento bienal (*i.e.* más plantas florecieron en la primera estación de crecimiento) y una floración más temprana en los individuos anuales. Estos resultados concuerdan con lo establecido por Thomas y Vince-Prue (1997) pero contrastan con Chouard (1960), Picard (1965) y otros trabajos que sostienen que la vernalización de especies bienales facultativas sólo es posible tras el logro de un determinado tamaño umbral (Werner 1975; Baskin y Baskin 1979 a y b; Taiz y Zeiger 1998; Bloom *et al.* 2002; Bloom *et al.* 2003) y/o cantidad de hojas expandidas (Picard 1965; Bernier *et al.* 1981 citado en Dielen *et al.* 2005; Erwin *et al.* 2002).

La posibilidad de vernalizar semillas tendría una aplicación práctica directa, sobre todo en siembras primaverales y con especies con requerimientos obligados de frío, ya que haría factible la producción de cultivos en un sólo ciclo productivo (Urbano Terrón 1992). En algunas regiones de China, de hecho, esta práctica se realiza comúnmente en el cultivo de *Oenothera biennis* con la siembra de semillas embebidas en el suelo congelado (Deng *et al.* 2001). En regiones con inviernos más benignos el mismo efecto podría lograrse artificialmente mediante el empleo de cámaras de frío (Whyte 1948).

A raíz de los resultados obtenidos, una primera cuestión importante a analizar es que, si bien la vernalización de semillas contribuyó significativamente a reducir el problema de la bianualidad, hubo una proporción considerable de los individuos tratados que no florecieron, especialmente en **Exp.Vn2** (figuras 3.5a y 3.6). Esto puede deberse a causas diversas como ser: i) que el tratamiento de vernalización no fue completamente eficiente, ii) a posibles efectos de devernalización, o bien iii) a que otros requerimientos necesarios para la floración no fueron satisfechos.

En el primer caso, es probable que no todos los individuos tratados hayan logrado satisfacer sus requerimientos de frío, debido a la naturaleza cuantitativa de la respuesta a la vernalización (*i.e.* cuanto mayor es la duración del tratamiento, mayor la respuesta, Gianquinto 1997; Henderson *et al.* 2003) y a la variabilidad intraespecífica o intrapoblacional que generalmente presenta este carácter (Wesselingh y de Jong 1995; Boudry *et al.* 2002; Metcalf *et al.* 2003; Stinchcombe *et al.* 2005). En este sentido, puede ser que la duración del tratamiento de frío (aprox. 5 semanas) haya resultado insuficiente para satisfacer el requerimiento de frío de todos los individuos, o bien que las condiciones en que se efectuó el tratamiento (5 °C en oscuridad) no hayan sido las óptimas. Si bien un tratamiento de 3 semanas a 5 °C es suficiente para saturar la respuesta a la vernalización e inducir la floración de *Oenothera fruticosa* (Clough *et al.* 2001), Chouard (1960) y Picard (1965) recomiendan, para *O. biennis*, un tratamiento de 10 semanas, con temperaturas alternadas (11 °C día / 3 °C noche) y una fuente de luz para la fotosíntesis de las plantas. Estos autores, sin embargo, vernalizaron plantas de 10 a 20 hojas expandidas, no semillas. La temperatura y la duración del período de frío empleadas en esta tesis son acordes a la aplicadas para la vernalización de semillas en otras especies como *Raphanus sativus* (20 días, 5 °C, Suge y Rappaport 1968), *Lactuca serriola* (28 días, 2-4 °C, Marks y Prince 1979), *Arabidopsis thaliana* (27 días, 4 °C, Nordborg y Bergelson 1999) *Vicia faba* (36 días, 2-3 °C, Filek *et al.* 2000), *Lens culinaris* (30 días, 1,5 °C, Summerfield *et al.* 1985), *Brassica napus* y *Brassica juncea* (25 días, 3 °C, Robertson *et al.* 2002), algunas variedades de *Cyborium intybus* (4

semanas, 4 °C, Dielen *et al.* 2005) y formas bienales de *Brassica campestris* (21 días, 4-6 °C, Chakravarti 1964, citado en Hodgson 1978), entre otras. No obstante, hace falta más investigación para determinar cuál es la duración y las condiciones térmicas y lumínicas óptimas que saturan la respuesta a la vernalización de semillas en *Oenothera biennis*.

En cuanto a la devernalización, no parece probable que el bajo porcentaje de anualidad ocurrido en **Vn+** de **Exp.Vn2**, haya sido producto de la reversión de la vernalización por exposición a altas temperaturas. La devernalización típicamente ocurre con temperaturas en el rango de los 30-40 °C (Bernier *et al.* 1981, citado en Michaels y Amasino 2000) aunque también puede ocurrir con temperaturas de 25-30 °C (Erwin 2007) o incluso de 20-25 °C (Gianquinto 1997). La temperatura media que exploraron las plantas luego del tratamiento de vernalización, tanto en **Exp.Vn1** como en **Exp.Vn2**, estuvo generalmente por debajo este rango (tabla 3.2). Sólo la temperatura máxima durante la fase de crecimiento a campo en **Exp.Vn2** (59 días después de la vernalización), parece ser suficientemente alta como para tener efectos devernalizantes. Sin embargo, para que la devernalización haya sido posible, la exposición a altas temperaturas debió haber ocurrido inmediatamente o poco después de finalizado el tratamiento de frío (Gianquinto 1997; Michaels y Amasino 2000), es decir, durante la fase de establecimiento bajo cubierta. No habría devernalización durante esta fase, ya que la temperatura máxima promedio no difirió demasiado de la del establecimiento de **Exp.Vn1** (tabla 3.2) donde el porcentaje de plantas vernalizadas de comportamiento anual fue considerablemente mayor.

Como la vernalización no es el único factor que regula el desarrollo de *Oenothera biennis*, la baja proporción de individuos anuales en **Exp.Vn2** puede ser producto del incumplimiento de otros requisitos necesarios para la inducción de la floración, por ejemplo, la exposición a días largos (Chouard 1960; Vince-Prue 1975). Si bien **Exp.Vn2** exploró a lo largo de toda la fase pre-floración condiciones de fotoperíodo más inductivas que **Exp.Vn1** (figura 3.2, Tabla 3.2), es probable que las plantas no hayan respondido a esta señal inductora por falta de competencia o sensibilidad a la misma. Los individuos de la especie emparentada *Oenothera erythrosepala*, por ejemplo, tienen que generar un área foliar de al menos 60 cm² para poder responder a los fotoperíodos largos necesarios para su floración (Kachi y Hirose 1983). La posibilidad de que el tamaño de planta condicione la respuesta al fotoperíodo de *Oenothera biennis* se discutirá más adelante en el capítulo 5. Por el momento, como en **Exp.Vn2** la fase de crecimiento pre-floración duró prácticamente la mitad que la de **Exp.Vn1** y el fotoperíodo hacia fines de la misma estaba en franco decrecimiento (figura 3.2), queda abierta la posibilidad de que una proporción importante de los individuos de **Exp.Vn2** no haya logrado el tamaño y/o la edad necesarios para responder a esta señal ambiental mientras duraron las condiciones fotoperiódicas inductivas. Tampoco se descarta la posibilidad de que otro factor, como temperaturas extremas durante la ocurrencia de fotoperíodos inductivos en **Exp.Vn2**, hayan impedido la reproducción de una fracción de los individuos aún habiendo satisfecho sus requerimientos de vernalización y/o tamaño (Reekie *et al.* 1997). La discusión de este tema se retomará en el Capítulo 6 (Discusión general).

La otra cuestión importante a analizar es el hecho que una proporción bastante alta de los individuos haya florecido sin vernalización alguna (**Vn-**). Esto pondría en evidencia que la vernalización no es un requerimiento obligado para la floración de *Oenothera biennis* o, al menos, no lo sería para una fracción importante de los individuos del genotipo estudiado en esta tesis. Este no es el primer antecedente que

registra floración sin vernalización en una especie con requerimientos de frío supuestamente obligados. De hecho, Prins *et al.* (1990), encontraron que, en condiciones de buena disponibilidad nutricional, cerca del 17% de los individuos de *Senecio jacobaea* florecieron en ausencia de frío.

Es discutible que los individuos sin vernalización artificial (**Vn-**) hayan florecido a causa de haber experimentado temperaturas naturalmente vernalizantes durante el establecimiento bajo cubierta y/o la fase de crecimiento pre-floración a campo. El rango óptimo de temperaturas efectivas para la vernalización generalmente se ubica entre 1 y 7°C (Lang 1965; Michaels y Amasino 2000), aunque en la práctica, para caracterizar el potencial de vernalización de un ambiente, suele considerarse la cantidad de horas con temperaturas entre 0,5 y 10 °C (Baskin y Baskin 1979a; Bender *et al.* 2002a; Bloom *et al.* 2003). Tanto en **Exp.Vn1** como en **Exp.Vn2**, se registraron unos pocos días aislados con temperatura mínima por debajo de 10 °C (Figura 3.2). Por lo tanto, la vernalización natural no habría sido posible ya que para haberse dado debería haber ocurrido una exposición más prolongada al frío (*i.e.* varias semanas), ya sea durante un período continuo o brevemente interrumpido (Urbano Terrón 1992).

Respecto a las discrepancias encontradas en los antecedentes sobre el carácter de la respuesta a la vernalización, obligada (Chouard 1960) o facultativa (Vince-Prue 1975) de *Oenothera biennis*, es probable que éstas tengan una base genética. Existen muchas especies monocárpicas que presentan tanto tipos o razas con requerimientos (anuales de invierno o bienales) como sin requerimientos (anuales de verano) de vernalización (Amasino 2004; Amasino 2005). Algunos ejemplos de la literatura son: *Hyosciamus Niger* (Lang 1952) *Arabidopsis thaliana* (Chouard 1960), *Melilotus alba* (Kasperbauer *et al.* 1961), *Oenothera erythrosepala* (Kachi y Hirose 1983), *Verbascum thapsus* (Reinartz 1984), *Melilotus officinalis* (Bernier *et al.* 1993), *Beta vulgaris* (Boudry *et al.* 2002) *Cichorium intybus* (Dielen *et al.* 2005) y *Fragaria vesca* (Heide y Sønsteby 2007) entre otras. *Oenothera biennis*, por su parte, ha sido caracterizada como una especie con una amplia variabilidad en términos de subespecies y razas (Deng *et al.* 2001). Por lo tanto, cabe la posibilidad de que las diferencias entre Chouard (1960) y Vince-Prue (1975) se deban simplemente a que estos autores hayan caracterizado la respuesta a la vernalización de la misma especie a partir de dos poblaciones con requerimientos diferentes.

En la actualidad, existe al menos un cultivar mejorado de *Oenothera biennis* con requerimientos reducidos de frío, el cv. "Anothera" (Ghasemnezhad 2007). Este cultivar ha sido desarrollado recientemente y se ha utilizado con éxito en siembras primaverales (Ghasemnezhad y Honermeier 2007; Ghasemnezhad y Honermeier 2008). Se desconoce si el genotipo estudiado en esta tesis tiene algún tipo de relación con el cv. Anothera. No obstante, los resultados logrados en este capítulo permitieron establecer que, aunque la vernalización no sea un requerimiento obligado, el tratamiento de semillas con frío tiene un efecto promotor de la floración y contribuye efectivamente a reducir el problema de la bianualidad.

En los capítulos siguientes se abordará el efecto del tamaño de las plantas sobre la regulación de su desarrollo, factor que se propone comúnmente como determinante del momento de floración de la mayoría de las especies bienales facultativas. Específicamente, se analizará en el capítulo 4, el efecto de la nutrición mineral sobre el comportamiento reproductivo y el tiempo a floración de *Oenothera biennis*.

CAPITULO 4: EFECTO DE LA DISPONIBILIDAD DE NUTRIENTES SOBRE LA DURACIÓN DE LA ETAPA VEGETATIVA Y EL TAMAÑO AL INICIO DE LA ETAPA REPRODUCTIVA DE *OENOTHERA BIENNIS*.

4.1 Introducción

Tradicionalmente, las especies bienales se han descrito como plantas que germinan y permanecen en estado vegetativo durante la primera estación de crecimiento, mientras que florecen, generan estructuras reproductivas y mueren en la siguiente (Werner 1975; Klinkhamer *et al.* 1987a). Esta definición se aplica perfectamente a unas pocas especies “bienales estrictas” pero no necesariamente a las especies “bienales facultativas” que son más comunes en la naturaleza (Kelly, 1985). En las primeras, la floración dependería de la edad de los individuos y ocurriría sólo en la segunda estación de crecimiento, mientras que en las segundas, la floración podría estar regulada en mayor medida por la acumulación de biomasa en las plantas, manifestándose una gran variabilidad en la cantidad de estaciones de crecimiento que requieren para florecer (Baskin y Baskin 1979a; Kelly 1985; Klinkhamer *et al.* 1987 a, b; Lacey 1988; Prins 1990; Wesselingh y de Jong 1995; Bloom *et al.* 2003).

La heterogeneidad en el comportamiento reproductivo de las plantas bienales facultativas tiene una componente genética pero estaría mayormente determinada por la variabilidad ambiental (Lacey 1988; Reekie 1997; Reekie *et al.* 1997; Johnson 2006). Estas especies suelen tener un ciclo bienal en ambientes ricos en nutrientes, como establecimientos productivos o jardines botánicos, pero retrasan su floración a años posteriores en ambientes naturales menos favorables para el crecimiento (Prins *et al.* 1990; Wesselingh y de Jong 1995; Burd *et al.* 2006). Por otra parte, en ambientes de muy alta fertilidad las plantas pueden manifestar un ciclo de vida anual (Klinkhamer *et al.* 1991).

Existe consenso en que la duración de la etapa vegetativa en estas especies depende en mayor medida del tamaño de las plantas que de su edad cronológica (Werner 1975; Gross 1981; Kachi y Hirose 1985; Klinkhamer *et al.* 1996; Reekie *et al.* 1997; Sletvold 2002; Metcalf *et al.* 2003; Sletvold y Grindeland, 2007). De hecho, varios modelos demográficos de ecología poblacional sugieren que, en condiciones naturales, las plantas se mantienen en estado vegetativo hasta alcanzar un tamaño umbral óptimo que maximiza el éxito reproductivo (Kachi y Hirose 1985; Wesselingh *et al.* 1997; de Jong *et al.* 2000). Este tamaño umbral (o crítico) es un carácter propio de cada especie o población y resulta del balance entre dos procesos tamaño-dependientes: la capacidad de crecimiento de los individuos (y de incrementar la producción de semillas futura) y su probabilidad de morir antes de alcanzar el estado reproductivo (Saulnier y Reekie 1995; Wesselingh y de Jong 1995; Wesselingh y Klinkhamer 1996; Wesselingh *et al.* 1997; Rees y Rose 2002; Metcalf *et al.* 2003; Childs *et al.* 2004).

El tamaño umbral se define como el tamaño que una planta individual debe superar para ser capaz de florecer (Wesselingh *et al.* 1993, 1997; Childs *et al.* 2003). Sólo tras cumplir este requerimiento de tamaño las plantas adquieren competencia para responder a los factores ambientales desencadenantes de la floración como la vernalización y el fotoperíodo (Baskin y Baskin 1979 a y b; Gross 1981; Klinkhamer *et al.* 1987a y b; Wesselingh y de Jong 1995). La existencia de un tamaño umbral ha sido reportada en un sinnúmero de especies bienales facultativas (Anexo I).

La edad de floración de las plantas resulta de la duración del período de crecimiento (*i.e.* cantidad de estaciones de crecimiento) que requieren para alcanzar el

tamaño crítico (Gross 1981). Como los ambientes pueden diferir en la cantidad de recursos disponibles para el crecimiento de las plantas, la duración de la etapa vegetativa está fuertemente determinada por la calidad de sitio (Gross 1981; Hirose y Kachi 1982; Lacey 1986 a y b; Sletvold 2002). En ambientes muy desfavorables, por ejemplo, las plantas crecerán lentamente y les tomará varios años alcanzar el tamaño umbral para florecer (Kachi y Hirose 1983, 1985; de Jong *et al.* 1998). Por su parte, las plantas que crecen en un ambiente de alta fertilidad pueden alcanzar el tamaño crítico más temprano, florecer en el primer año y producir un gran número de semillas (Hirose y Kachi 1982; de Jong *et al.* 1987).

En el pasado, varios autores se han referido a “el” tamaño umbral para la floración, sugiriendo que esta condición es la misma para todos los individuos de una especie o población (Wesselingh *et al.* 1997). Sin embargo, hay evidencias de que el tamaño umbral es un carácter plástico que varía no sólo entre individuos sino que, además, está modulado por el ambiente (Lacey 1986a; Reekie 1997; Wesselingh y de Jong 1995; Bonser y Aarssen 2009).

Hay autores que sostienen que ambientes favorables, con baja probabilidad de muerte de rosetas y buenas condiciones para el crecimiento de las plantas, favorecen la ocurrencia de tamaños umbrales relativamente altos (Lacey 1986a; Wesselingh y de Jong 1995) mientras que condiciones que limitan el crecimiento, o incrementan la mortalidad, favorecen el inicio de la reproducción en plantas de tamaño relativamente menor, cuya fecundidad es también menor (Wesselingh *et al.* 1997; Burd *et al.* 2006; Bonser y Aarssen 2009). Por otro lado, otros autores afirman que las plantas inician su reproducción a una edad y un tamaño relativamente bajos cuando la reproducción afecta poco al crecimiento, mientras que cuando la reproducción tiene un efecto muy negativo sobre el crecimiento, el cambio de fase se daría a un tamaño y edad mayores (Cohen 1976; Saulnier y Reekie 1995; Reekie 1997).

Algunos trabajos en los que se manipuló el momento de reproducción de *Oenothera biennis* mediante la aplicación exógena de giberelinas muestran que, a medida que se retrasa la reproducción, la producción de semillas se incrementa (aunque con incrementos cada vez menores), y que el crecimiento sólo se ve afectado por la reproducción cuando ésta ocurre en estadíos tempranos (Reekie y Reekie 1991; Saulnier y Reekie 1995). A su vez, el efecto negativo de la reproducción sobre el crecimiento es mayor en plantas que crecen en ambientes de baja disponibilidad de recursos, ya que éstas presentan una menor asimilación de carbono (por un menor desarrollo de la estructura para la captación de recursos y una menor funcionalidad del aparato fotosintético) y una mayor removilización de nutrientes desde la raíz y las hojas para sostener el crecimiento activo del tallo y los frutos (Saulnier y Reekie 1995).

Sobre la base de lo anterior, las rosetas de *Oenothera biennis* que crecen en ambientes poco productivos podrían posponer la iniciación floral hasta alcanzar un tamaño igual, o incluso superior, al que presentarían en condiciones nutricionales menos limitantes para soportar el mayor costo que les implica la reproducción en términos de crecimiento. En este capítulo se pone a prueba la segunda hipótesis (**H2**) de esta tesis, la cual plantea que el momento y el tamaño con que los individuos inician la reproducción varía con la disponibilidad de recursos.

4.2 Materiales y métodos

En el año 2006 se realizó un experimento con distintos niveles de disponibilidad nutricional para determinar si ésta incide sobre el tiempo a floración de *Oenothera biennis*, si este efecto está asociado al tamaño de los individuos durante la fase vegetativa y si el tamaño de los individuos al iniciar la reproducción difiere entre situaciones nutricionales.

El experimento comenzó el día 19 de julio con la siembra de semillas de *Oenothera biennis* en bandejas plásticas de germinación (tierra-arena 2:1), las cuales permanecieron bajo la cubierta de un invernáculo abierto hasta su trasplante a macetas de 23 lts. (tierra-arena 5:4) a campo, 85 días después. El mismo día del trasplante, el 12 de octubre, se realizó la aplicación de los 3 tratamientos de fertilización que se describen a continuación:

- **N120**: 2 grs. de fertilizante N-P-K (15-6,5-12,5) por maceta. Equivale a una dosis de 120 kg N/ha, considerando una densidad de 40 pl./m².
- **N60**: 1 gr. de fertilizante N-P-K (15-6,5-12,5) por maceta. Equivale a una dosis de 60 kg N/ha, considerando una densidad de 40 pl./m².
- **N0**: Tratamiento testigo sin fertilización.

Las macetas se dispusieron siguiendo un diseño completamente aleatorizado (DCA) con 30 repeticiones por tratamiento. En cada planta se registró el momento de ocurrencia de los estadios fenológicos **ET1** (inicio de elongación del tallo) y **FL1** (comienzo de floración). Para la estimación del momento de **ET1**, se midió la altura del tallo floral cada un intervalo de 3 a 5 días. Además, se monitoreó la evolución de la biomasa de cada planta, desde el trasplante (**Tr**) hasta **ET1**, mediante mediciones semanales del área de cobertura de las rosetas (**AR**), y su edad fisiológica a partir del número de hojas aparecidas (**NH**). La tasa de crecimiento media de la fase vegetativa (**TCv**) se calculó como la diferencia entre el tamaño registrado inmediatamente antes de los primeros registros de **ET1** (**AR_{ET1(1)}**) y el tamaño al trasplante (**AR_{Tr}**), dividida por el intervalo de tiempo entre ambas mediciones.

Se realizaron regresiones no lineales (modelo sigmoideal de Boltzmann) para estimar el tamaño (**AR_{ET1}**) y número de hojas (**NH_{ET1}**) que presentó cada planta en **ET1**. Estos parámetros, y el momento de **ET1** y **FL1** se compararon entre tratamientos mediante Análisis de la Varianza (ANVA). Por último, se realizaron regresiones lineales para analizar, en forma cuantitativa, la relación entre la tasa de desarrollo desde el trasplante hasta **ET1** (**TD_{Tr-ET1}**, función inversa de la duración de la fase **Tr-ET1**) y la tasa de crecimiento media durante la fase vegetativa.

4.3 Resultados

De las 90 plantas que iniciaron el experimento, 5 murieron durante la fase vegetativa y 1 durante la elongación del tallo floral. Las restantes tuvieron un comportamiento predominantemente anual (tabla 4.1). Sólo una planta de **N0** permaneció sin florecer ni elongar la vara floral, mientras que en **N60** y **N120**, una pequeña proporción de las plantas floreció de varas florales laterales, sin elongar el tallo principal (iteróparas; Anexo III). Para las mediciones de **NH**, **AR** y **TCv** se seleccionaron, al azar, 16 plantas anuales por tratamiento.

	N0	N60	N120
Anuales	27	26	26
Bienales	1	-	-
Iteróparas	-	2	2

Tabla 4.1: Comportamiento reproductivo de plantas de *Oenothera biennis* sometidas a 3 niveles de disponibilidad nutricional: **N0**, sin fertilización adicional, **N60**, fertilización con N-P-K (15-6,5-12,5) en una dosis equivalente a 60kg N/ha, y **N120**, fertilización con N-P-K en una dosis equivalente a 120kg N/ha.

La fertilización N-P-K logró el propósito de generar diferencias significativas en la tasa de crecimiento de las plantas de diferentes tratamientos ($N120=N60>N0$, $p<0.05$). Sin embargo, estas diferencias no fueron netas, ya que hubo individuos de diferentes tratamientos que presentaron **TCv** similares (figura 4.1). La diferencia en tamaño (**AR**), entre tratamientos se hizo evidente a las dos semanas del trasplante ($N120>N0$, $p<0.05$) y fue incrementándose durante el transcurso de la fase vegetativa (figura 4.2). Al día 23, dos días antes de los primeros registros de **ET1**, el tamaño de **N120** casi duplicó el de **N0**. El tamaño de **N60** no difirió del de **N120** en ningún momento de la fase vegetativa y sólo superó en forma significativa al de **N0** al día 31 desde el trasplante, cuando una proporción importante de los individuos ya habían alcanzado el estadio **ET1**.

También se registraron diferencias en la tasa de aparición de hojas ($N120=N60>N0$, $p<0.01$, figura 4.3). En este caso, la diferencia en el número de hojas expandidas fue significativa recién al día 23 después del trasplante.

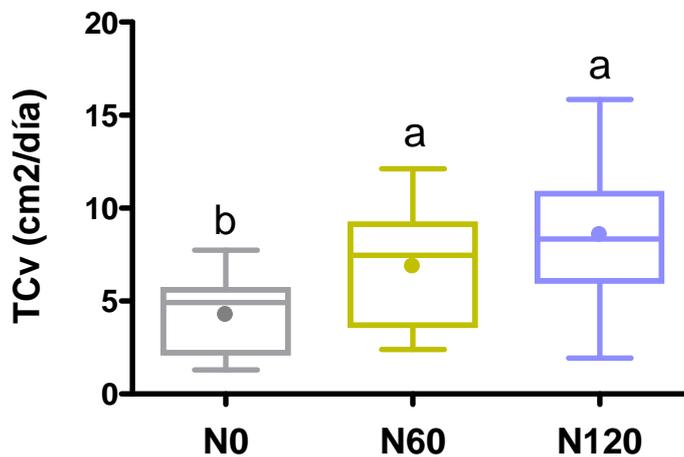


Figura 4.1: Diagrama de caja y bigotes de la tasa de crecimiento media durante la fase vegetativa (**TCv**, de 14-Oct a 4-Nov) de plantas de *Oenothera biennis* sometidas a 3 niveles de disponibilidad nutricional: **N0**, sin fertilización adicional, **N60**, fertilización con 1gr. N-P-K (15-6,5-12,5) por planta, y **N120**, fertilización con 2gr. N-P-K por planta. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los tratamientos ($p<0.01$; $n=16$). La caja delimita los cuartiles 2 y 3 y los bigotes indican el rango de los cuartiles 1(inferior) y 4 (superior). El punto indica la media de los tratamientos.

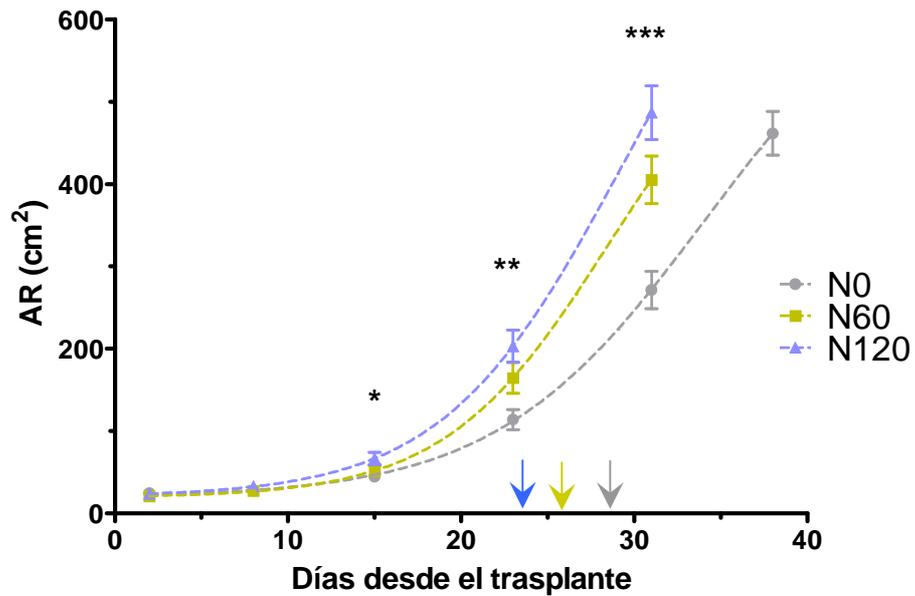


Figura 4.2: Evolución del área de roseta (AR) en plantas de *Oenothera biennis* sometidas a 3 niveles de disponibilidad nutricional: **N0**, sin fertilización adicional, **N60**, fertilización con 1gr. N-P-K (15-6,5-12,5) por planta, y **N120**, fertilización con 2gr. N-P-K por planta. Las líneas punteadas muestran el ajuste a la función no lineal de Boltzmann. Las barras verticales indican el error estándar de las medias (n=16). Los asteriscos indican diferencias significativas: * (P<0.05), ** (P<0.01), *** (P<0.0001). Las flechas indican el momento de $ET1_{(50)}$ de cada tratamiento.

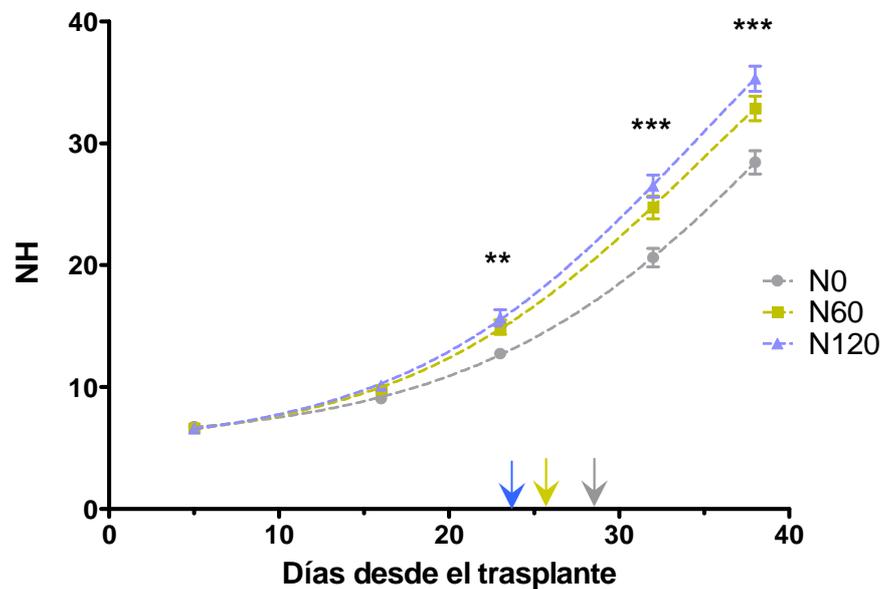


Figura 4.3: Evolución del número de hojas aparecidas (NH) en plantas de *Oenothera biennis* sometidas a 3 niveles de disponibilidad nutricional: **N0**, **N60** y **N120**. Las líneas punteadas muestran el ajuste a la función no lineal de Boltzmann. Las barras verticales indican el error estándar de las medias (n=16). Los asteriscos indican diferencias significativas: ** (P<0.01), *** (P<0.0001). Las flechas indican el momento de $ET1_{(50)}$ de cada tratamiento.

La fertilización de las plantas condujo a un adelantamiento significativo de la floración (figura 4.4). **N120** inició la floración 5 días antes que **N0** (14-Dic y 19-Dic, para **N120** y **N0** respectivamente, $p < 0.05$), y **N60** lo hizo en un momento intermedio (16-Dic) entre **N0** y **N120**. Esta diferencia se debió a un acortamiento en la duración de la etapa de crecimiento vegetativo de roseta (días trasplante-ET1, $\mathbf{N0} > \mathbf{N60} = \mathbf{N120}$, $p < 0.01$), sin registrarse efecto en la duración de la etapa de elongación del tallo floral (ET1-FL1, $p = 0.78$). Por su parte, el tamaño ($\mathbf{AR}_{\mathbf{ET1}}$) y edad fisiológica ($\mathbf{NH}_{\mathbf{ET1}}$) de las plantas al inicio de la etapa reproductiva no varió entre los tratamientos de fertilización (Figura 4.5; $p = 0.42$ y $p = 0.87$ para $\mathbf{AR}_{\mathbf{ET1}}$ y $\mathbf{NH}_{\mathbf{ET1}}$ respectivamente).

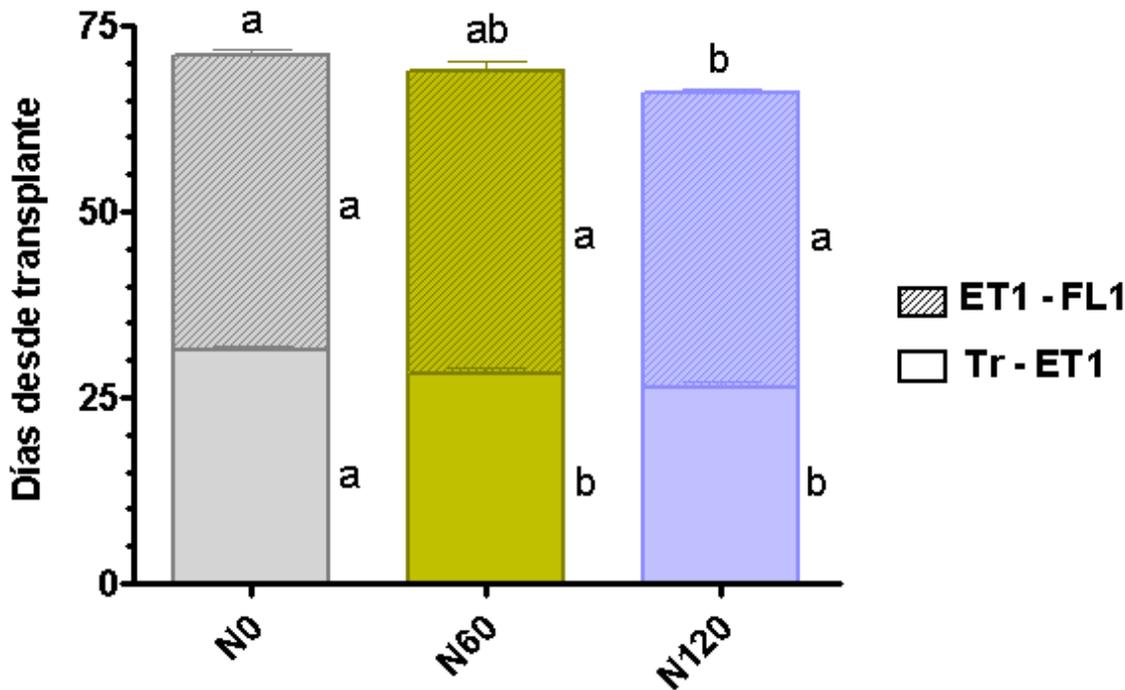


Figura 4.4: Duración del período transplante-inicio de floración (**Tr-FL1**) de plantas de *Oenothera biennis* sometidas a 3 niveles de disponibilidad nutricional: **N0** (gris), **N60** (amarillo) y **N120** (azul). Se discriminan 2 subfases: transplante-ET1 (trazo liso) y ET1-FL1 (trazo rayado). Letras diferentes por encima de las barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la duración total del período Tr-FL1; letras diferentes al costado de las barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos para cada sub-fase (Tr-ET1 y ET1-FL1). Los segmentos representan el error estándar de la media de cada tratamiento y subfase.

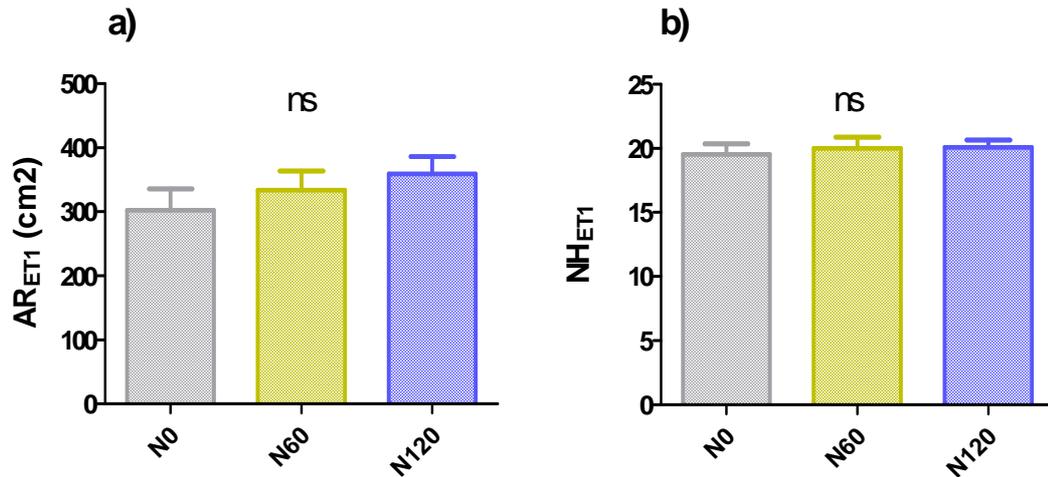


Figura 4.5: a) Área de roseta (AR_{ET1}) y b) número de hojas (NH_{ET1}) de plantas de *Oenothera biennis* en el momento en que alcanzan el estadio fenológico **ET1**. Tratamientos: **N0**, **N60**, y **N120**. ns indica que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$, $n=16$).

La tasa de desarrollo hasta **ET1** (TD_{Tr-ET1} , inversa de la duración de la etapa vegetativa) se asoció lineal y positivamente con la tasa de crecimiento promedio de esta fase, TCv ($r^2=0,33$, $p < 0.0001$, figura 4.6). Como se señaló anteriormente, la aplicación de los tratamientos no logró una diferenciación marcada en la TCv de los individuos, la cual mostró una gran variabilidad poblacional en todos los tratamientos. Las plantas de comportamiento bienal ó iteróparo presentaron TCv muy bajas y fueron incluidas, a modo ilustrativo, en la figura 4.7. Por su parte, el tamaño con que las plantas iniciaron la reproducción (AR_{ET1}) también mostró una relación lineal significativa con TCv ($r^2=0,28$, $p < 0,0001$, figura 4.7), pero no así el NH_{ET1} ($p=0,08$, figura 4.8).

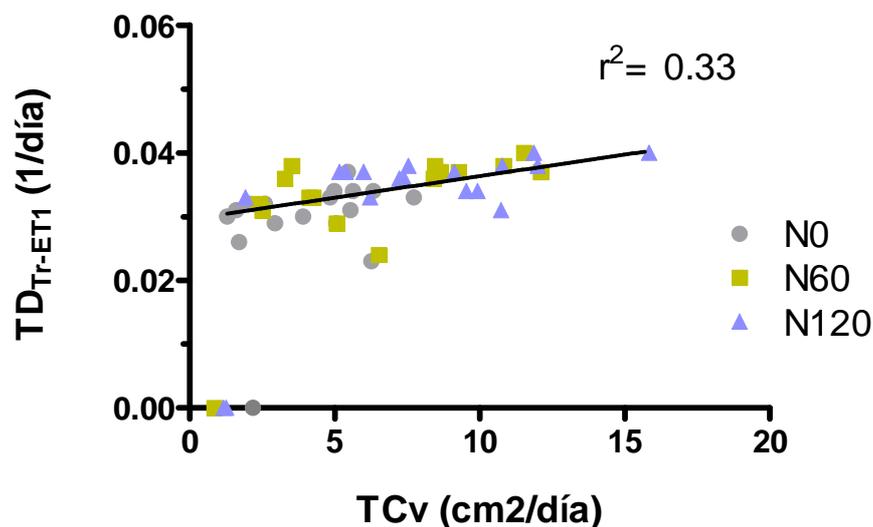


Figura 4.6: Relación entre la tasa de desarrollo desde el trasplante hasta **ET1** (TD_{Tr-ET1} , 1/día) y la tasa de crecimiento media durante la fase vegetativa (TCv , $cm^2/día$). Las plantas con $TD_{Tr-ET1} = 0$, corresponden a individuos bienales (**N0**) ó iteróparos (**N60** y **N120**). Tratamientos: **N0**, sin fertilización adicional, **N60**, fertilización con 1gr. N-P-K (15-6,5-12,5) por planta, y **N120**, fertilización con 2gr. N-P-K por planta. La línea indica el ajuste de todas las observaciones de las plantas anuales a un modelo lineal ($n=48$).

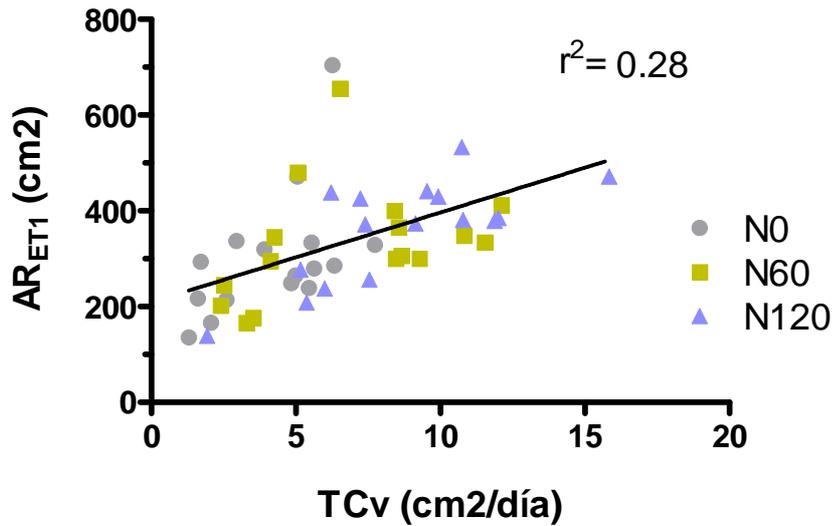


Figura 4.7: Relación entre el tamaño alcanzado por las plantas en ET1 (AR_{ET1} , cm^2) y la tasa de crecimiento media durante la fase vegetativa (TCv , $cm^2/día$). Tratamientos: **N0**, sin fertilización adicional, **N60**, fertilización con 1gr. N-P-K (15-6,5-12,5) por planta, y **N120**, fertilización con 2gr. N-P-K por planta. La línea indica el ajuste de todas las observaciones a un modelo lineal ($n=48$).

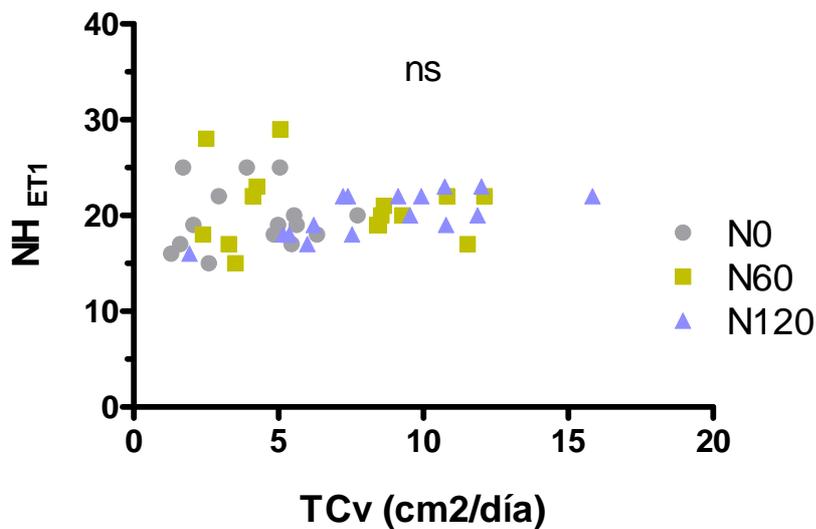


Figura 4.8: Relación entre el número de hojas expandidas en ET1 (NH_{ET1}) y la tasa de crecimiento media durante la fase vegetativa ($cm^2/día$). Tratamientos: **N0**, sin fertilización adicional, **N60**, fertilización con 1gr. N-P-K (15-6,5-12,5) por planta, y **N120**, fertilización con 2gr. N-P-K por planta. ns: el ajuste de las observaciones a un modelo lineal no fue significativo ($P>0,05$, $n=46$).

4.4 Discusión

La tasa de desarrollo hasta **ET1**, el indicador fenológico más cercano a la iniciación floral en *Oenothera biennis*, se aceleró en respuesta a la fertilización (figura 4.4) y se asoció linealmente con la tasa de crecimiento durante la fase vegetativa (figura 4.6). Por lo tanto, en conformidad con lo postulado en **H₂**, el momento en que los individuos inician la reproducción responde a la disponibilidad de recursos para su crecimiento. Este es el primer trabajo en el que se logra relacionar exitosamente el momento de reproducción de una especie bienal facultativa con las condiciones de crecimiento durante la fase vegetativa. La mayoría de los trabajos previos se han limitado a asociar el tamaño (Van der Meijden y Van der Waals-Kooi 1979; Gross 1981; Kachi y Hirose 1985; Lacey 1986; de Jong *et al.* 1986; Prins *et al.* 1990; Klinkhamer *et al.* 1991; Wesselingh y de Jong 1995; de Jong *et al.* 1998; Bloom *et al.* 2002; Sletvold y Grindeland 2007), y/o la tasa de crecimiento de las plantas (Lacey 1986; Wesselingh *et al.* 1997; Sletvold y Grindeland 2007), en algún momento de la fase vegetativa, con la probabilidad de que las plantas florezcan en un año o estación de crecimiento determinados. Sólo un trabajo intentó relacionar el tamaño de las plantas con la fecha de floración, dentro de una estación de crecimiento, pero no logró una correlación significativa (Klinkhamer *et al.* 1991).

La gran variabilidad poblacional registrada en la tasa de crecimiento de los individuos de este experimento (**TC_v**, figura 4.1) no puede ser atribuida totalmente a los tratamientos de fertilización aplicados (**N0**, **N60** y **N120**). Aunque la **TC_v** promedio aumentó con la disponibilidad de nutrientes (**N120**>**N60**>**N0**), algunos individuos de los tratamientos **N60** y **N120** parecen no haber respondido a la fertilización, ya que presentaron valores de **TC_v** tan bajos como los de los individuos de menor **TC_v** del tratamiento testigo (**N0**). Esta variabilidad en la respuesta podría deberse a diferencias en factores microambientales (condiciones diferentes entre macetas), genéticos (potencial de crecimiento de cada individuo) o ambas, que hayan limitado la expresión de la respuesta a la fertilización bajo las condiciones estudiadas. A su vez, la considerable superposición en el rango de **TC_v** medido en los diferentes tratamientos, podría ser la causa de que no se registraran diferencias más notorias en la tasa de desarrollo por efecto de la disponibilidad nutricional (figura 4.4).

Si bien la tasa de crecimiento (**TC_v**) permite explicar parte de la variabilidad temporal con la que los individuos de *Oenothera biennis* alcanzaron el estado reproductivo (**ET1**), se requirieron cambios considerables en **TC_v** (hasta de más de 8 órdenes de magnitud) para generar pequeñas diferencias (*i.e.* 25% aproximadamente) en la tasa de desarrollo a **ET1** (**TD_{Tr-ET1}**, figura 4.6). Este hecho respaldaría lo que sostienen Martínez-Zapater *et al.* (1994), Miralles *et al.* (2003) y Erwin (2007), entre otros, respecto al efecto limitado que suelen tener los factores de crecimiento sobre la regulación del desarrollo. A su vez, la limitada asociación entre **TD_{Tr-ET1}** y **TC_v** también podría ser producto de una hipotética variabilidad poblacional en la satisfacción de otros requerimientos (*i.e.* vernalización, fotoperíodo) para la floración. La realización de experimentos en condiciones que saturan la respuesta a otros factores ambientales reguladores del desarrollo (*ver Exp.FP2*, capítulo V), permitirá obtener una noción más precisa del rol de la **TC_v** en la regulación de la tasa de desarrollo a **ET1**.

El tamaño a **ET1** (**AR_{ET1}**) no varió significativamente entre tratamientos de fertilización pero tendió a aumentar con el incremento en la disponibilidad de nutrientes de **N0** a **N120** (figura 4.5a) y se asoció positivamente con **TC_v** (figura 4.7). Por lo tanto, **AR_{ET1}** sería mayor cuanto mejores son las condiciones para el crecimiento de las plantas. Esta respuesta es contraria a lo que se planteó en la predicción de **H₂** pero

concuera con el hallazgo de Klinkhamer *et al.* (1991), quienes encontraron que las plantas de *Carlina vulgaris* de un ambiente productivo crecieron más rápido, florecieron antes e iniciaron la reproducción con un tamaño mayor que las que crecieron en un ambiente de menor productividad. Adicionalmente, otros trabajos sugieren que el tamaño crítico para la reproducción varía con la disponibilidad de nutrientes siendo mayor cuanto más productivo es el sitio (Lacey 1986; Wesselingh *et al.* 1997; Bonser y Aarsen 2009) o cuanto mayor es la tasa de crecimiento de los individuos (Young 1985).

Podría argumentarse que las diferencias en AR_{ET1} , entre las plantas de diferentes TCv , no necesariamente reflejan diferencias en el tamaño a iniciación floral. La iniciación floral (**IF**) ocurre antes que **ET1** y plantas con diferente TCv seguramente también presentan diferente tasa de crecimiento entre **IF** y **ET1** (Baskin y Baskin 1979b), por lo que la diferencia de tamaño entre **IF** y **ET1** sería mayor en plantas con alta TCv (Metcalf *et al.* 2003). Wesselingh y de Jong (1995) plantean que, para lograr una aproximación adecuada al tamaño umbral, debe observarse el tamaño al inicio de la reproducción de las plantas de menor tasa de crecimiento, ya que en éstas se minimiza la diferencia entre el tamaño observado y el tamaño a iniciación floral. Las plantas del cuartil inferior del rango de TCv de este experimento (el 25% de las plantas de menor crecimiento) iniciaron la reproducción con un AR_{ET1} medio de 218 cm². Sin embargo, las plantas del cuartil superior (el 25% de las plantas de mayor crecimiento) lo hicieron con un AR_{ET1} de 399 cm², es decir, con casi el doble de tamaño que el cuartil inferior. No resulta posible que una diferencia de tal magnitud en AR_{ET1} se deba sólo a una diferencia en la tasa de crecimiento entre **IF** y **ET1**. Por otra parte, si se asume que la tasa de desarrollo entre **IF** y **ET1** es similar para plantas de diferente TCv (si no es mayor para las de mayor TCv), puede establecerse que **IF** ocurre aproximadamente la misma cantidad de días antes de **ET1**, independientemente de la TCv de los individuos. Por lo tanto, como el tamaño medio del cuartil superior siempre fue mayor al del cuartil inferior, cuando se consideraron diferentes momentos posibles para **IF** (*i.e.* 5, 10, 15 y 20 días antes de **ET1**), se descarta la posibilidad de que plantas con diferente TCv presenten el mismo tamaño a iniciación floral.

La variabilidad en el tamaño para iniciar la reproducción puede entenderse, desde el punto de vista ecológico, en términos del balance costo-beneficio que implica el retraso de la reproducción (Bonser y Aarsen 2009). Los beneficios de retrasar la reproducción consisten en un aumento de la fecundidad y/o calidad de la descendencia en la medida que aumenta el tamaño de las plantas, mientras que los costos se asocian a un aumento en la probabilidad de morir antes de la reproducción y a un alargamiento del intervalo intergeneracional (Childs *et al.* 2004). De esta manera, condiciones adversas, que limiten el crecimiento o aumenten la mortalidad, pueden favorecer el inicio de la reproducción con tamaños relativamente pequeños (Bonser y Aarsen 2009). Por otra parte, Hirose y Kachi (1986), estudiando cómo el ambiente modula el tamaño y edad óptimos para la reproducción de *Oenothera glazioviana*, determinaron que la reproducción ocurre a una edad y tamaño mayores cuando el ambiente impone una alta tasa de mortalidad, mientras que si el ambiente impone una baja fecundidad, aumenta la edad de reproducción pero no necesariamente el tamaño óptimo. No hay razones para suponer que los tratamientos empleados en este trabajo generen diferencias marcadas en la tasa de mortalidad de plantas, pero sí en su fecundidad. Por lo tanto, una posible interpretación del significado biológico de los resultados sería que las plantas de **N0** (o las de menor TCv), hayan retrasado su reproducción respecto a **N120** para incrementar su tamaño, y por ende su fecundidad, hasta alcanzar un tamaño tal que les permitiera

afrontar los costos de la reproducción sin efectos perjudiciales sobre su crecimiento futuro (Reekie y Reekie 1991).

El hecho de que con diferentes tasas de crecimiento varíe el tamaño (AR_{ET1} , figura 4.7) pero no el número de hojas expandidas (NH_{ET1} , figura 4.8) con que las plantas iniciaron la reproducción, pone en duda lo establecido para la mayoría de las bienales facultativas de que el tamaño es más importante que la edad en la definición del momento de floración (Werner 1975; Gross 1981; Kachi y Hirose 1985; Klinkhamer *et al.* 1996; Reekie *et al.* 1997; Sletvold 2002; Metcalf *et al.* 2003; Sletvold y Grindeland 2007). La estimación de la edad fisiológica de las plantas a partir del número de hojas expandidas asume que la tasa de aparición de hojas (*i.e.* filocrono) depende fundamentalmente de la temperatura (Atkinson y Porter 1996) y no de factores de crecimiento como la nutrición mineral, salvo en condiciones de carencias extremas (Frank y Bauer 1984; Wilhelm y McMaster 1995; Ma *et al.* 1997). No obstante, en este trabajo, no sólo se registró un adelanto significativo de la reproducción en respuesta a la fertilización (figura 4.4) sino, además, un aumento en la tasa de aparición de hojas (figura 4.3). Un efecto similar fue documentado por Arisnabarreta y Miralles (2004). Estos autores observaron un retraso en la espigazón del cultivo de cebada (*Hordeum vulgare*) ante una reducción en la disponibilidad de nitrógeno, y atribuyeron este efecto a una disminución en la tasa de aparición foliar durante la encañazón ya que el número de hojas a floración no difirió de un tratamiento con alta disponibilidad del nutriente. La misma respuesta también se documentó para el cultivo de trigo (*Triticum aestivum*) en condiciones limitantes de fósforo (Rodríguez *et al.* 1998). Independientemente de que el retraso en la tasa de aparición de hojas sea el factor causal del retraso en el inicio de la reproducción en NO , o viceversa, que el adelanto del cambio de estado de vegetativo a reproductivo (*i.e.* $ET1$), por efecto de la fertilización, haya causado una aceleración en la tasa de aparición foliar (*i.e.* que en la etapa reproductiva las hojas aparezcan a una tasa mayor que durante la fase vegetativa), este trabajo es concluyente en que la disponibilidad de nutrientes, un factor normalmente asociado al control del crecimiento de las plantas, afecta la tasa de desarrollo de *Oenothera biennis*, ya sea, a través de su efecto sobre el desarrollo morfológico (tasa de aparición de hojas), o bien sobre el desarrollo fásico (duración de la fase trasplante- $ET1$).

Es notable que en este trabajo no se haya detectado un efecto marcado de la fertilización sobre el comportamiento reproductivo, anual o bienal, de *Oenothera biennis* ya que en todos los tratamientos predominó la anualidad (tabla 4.1). Sin embargo, el comportamiento reproductivo de los pocos individuos bienales o iteróparos parece estar asociado a una baja tasa de crecimiento de las plantas (figura 4.6). Existen ejemplos en la literatura de cambios importantes en la proporción de individuos anuales por efecto de la aplicación de fertilizantes (Król y Berbecé 2004), de siembras en suelos con diferente disponibilidad nutricional (Gross y Kromer 1986; Król y Berbecé 2004; Król 2007) o en ambientes de diferente productividad (Johnson 2006). Estas diferencias podrían ser producto de las condiciones experimentales en que fueron realizados los experimentos, no sólo en términos del ambiente fototermal y edáfico explorado, sino además del efecto de la competencia intra e interespecífica que puede limitar el acceso de las plantas a los recursos disponibles. El ambiente fototermal es un claro modulador del comportamiento reproductivo de las plantas bienales, ya que involucra a los principales factores reguladores del desarrollo *i.e.* temperatura y fotoperíodo. Un ejemplo concreto de variaciones en el comportamiento reproductivo de *Oenothera biennis*, ante cambios en el ambiente fototermal explorado, puede obtenerse de la

comparación entre **Exp.Vn1** y **Exp.Vn2** en el capítulo 3 de esta tesis. Las condiciones edáficas y la competencia, por su parte, pueden reducir la proporción de individuos anuales por su efecto sobre la capacidad de crecimiento de las plantas (Lacey 1988; Weiner 1990). Las condiciones dadas por la fecha de siembra y trasplante de este experimento parecen haber cubierto los requerimientos térmicos y lumínicos necesarios para la inducción floral de la mayoría de las plantas fertilizadas y sin fertilizar. Respecto al ambiente edáfico, la mezcla de tierra: arena empleada en las macetas y la aplicación periódica de riego, probablemente determinaron que las condiciones de crecimiento para las plantas de este experimento, aún las de **N0**, hayan sido más favorables que las condiciones de suelos arenosos o gravosos en los que naturalmente crece esta especie (Hall 1988). En cuanto al efecto de la competencia, éste fue minimizado ya que se empleó una planta por maceta y se desmalezó en repetidas oportunidades. Esta situación también es muy diferente de las condiciones naturales (Johnson 2006) o de cultivo (Król y Berbec 2004; Król 2007) en que se realizaron los experimentos de los antecedentes.

De las 84 plantas que vivieron hasta el final del experimento, sólo una (de **N0**) manifestó un comportamiento netamente bienal (tabla 4.1). Sin embargo, no todas las plantas restantes tuvieron un ciclo anual sino que 4 de ellas, 2 de **N60** y 2 de **N120**, fueron iteróparas. Estas plantas florecieron a partir de la elongación de varas florales laterales, por inducción de yemas axilares, mientras que el meristema apical permaneció en estado vegetativo sin elongar el tallo principal hasta la estación de crecimiento siguiente (Johnson 2006). Aunque este comportamiento es poco frecuente, ya se ha reportado anteriormente en *Oenothera biennis* (Martínková *et al.* 2004; Johnson 2006) y en otras especies monocárpicas perennes como *Polymnia canadensis* (Bender *et al.* 2002a y b) y *Arabis laevigata* (Bloom *et al.* 2002). Es probable que la inducción temprana de las yemas axilares, y el crecimiento de las varas florales laterales, hayan inhibido la inducción del meristema apical de la roseta en las plantas iteróparas (Obeso 2002), aunque no hay antecedentes en *Oenothera biennis* que confirmen esta teoría. Si bien el comportamiento iteróparo puede resultar ecológicamente ventajoso para la adaptación de la especie a ambientes espacial y temporalmente variables (Bender *et al.* 2002b), no sería un carácter deseable en planteos agronómico-productivos. Varas florales laterales también aparecieron en plantas anuales, sobre todo en **N120**, ya sea antes o después de comenzada la elongación del tallo principal. La cuestión de si estas estructuras establecen o no relaciones jerárquicas entre sí, en cuanto a su capacidad de florecer, podría ser analizada en investigaciones futuras.

En resumen, la fertilización, un factor normalmente asociado al crecimiento de las plantas, afectó el desarrollo de *Oenothera biennis*. Las plantas con menor disponibilidad de nutrientes (o menor **TCv**) retrasaron su reproducción (**ET1**) aunque este retraso no implicó que los individuos inicien la reproducción con un tamaño mayor, o al menos similar, que el de las plantas con mayor disponibilidad de nutrientes (ó **TCv**), como se había planteado en **H2**. Las condiciones experimentales de este ensayo, determinaron una mínima proporción de plantas de comportamiento bienal (o iteróparo), que parece estar asociada a la baja **TCv** de estos individuos. Para lograr una mayor comprensión del efecto de la disponibilidad de nutrientes sobre el comportamiento reproductivo anual o bienal de esta especie, son necesarios experimentos en condiciones nutricionales más limitantes, o bien con fechas de siembra tardías que impliquen un acortamiento de la estación de crecimiento disponible para las plantas, como ha ocurrido en **Exp.Vn2** (capítulo 3) y como se verá en **Exp.FP1** del capítulo siguiente.

A diferencia de la mayoría de los estudios en especies bienales facultativas, este trabajo se basó en la relación existente entre las tasas de crecimiento y desarrollo hasta

ET1 y no en la búsqueda de un tamaño umbral para la reproducción. Para determinar la existencia de un tamaño umbral, por encima del cual las plantas adquieren competencia para responder a los estímulos ambientales que desencadenan la floración, es necesario conocer cuándo estos estímulos se hacen presentes. Dado que esto no fue posible, ya que no se conocen exactamente cuáles son los requerimientos de vernalización y fotoperíodo de esta especie, en el próximo capítulo se analizará el efecto del tamaño (y/o la tasa de crecimiento) de las plantas, durante condiciones inductivas generadas artificialmente con la extensión del fotoperíodo, sobre la tasa de desarrollo a floración.

CAPITULO 5: INFLUENCIA DEL CRECIMIENTO SOBRE LA TASA DE DESARROLLO A FLORACIÓN EN RESPUESTA A FOTOPERÍODOS INDUCTIVOS.

5.1 Introducción

En la mayoría de las especies bienales facultativas, la probabilidad de florecer ante una misma condición inductiva aumenta con el tamaño de las plantas (Klinkhamer *et al.* 1991). El logro de un tamaño umbral, sin embargo, es sólo una condición endógena necesaria para la inducción de la floración. Además, ciertas condiciones exógenas (*i.e.* ambientales) deben presentarse para que una planta pueda florecer (Gross 1981; Hirose y Kachi 1982; Kachi y Hirose 1983; Reekie 1997). Las principales señales ambientales que inducen la floración en estas especies son la vernalización y el fotoperíodo (Gross 1981; Klinkhamer *et al.* 1987a y b; Prins *et al.* 1990; Wesselingh y de Jong 1995; de Jong *et al.* 1998).

Para entender la interacción entre el tamaño y los factores ambientales es necesario conocer cuándo y cómo se determina el momento de floración (De Jong *et al.* 1998). En un principio se creyó que el comportamiento reproductivo de las bienales facultativas se definía en el invierno, es decir, que las condiciones previas y durante esta estación climática determinaban si los individuos florecían o no en la primavera siguiente (Werner 1975; Baskin y Baskin 1979 a y b citados en Klinkhamer 1991). Sólo las plantas que alcanzaran o superasen un determinado tamaño umbral “pre-vernalización” hacia el fin del otoño, adquirirían competencia para responder al frío invernal y florecer en la estación de crecimiento siguiente (Bender *et al.* 2002a). Aquellas plantas que no cumplieran esta condición (*i.e.* las plantas más pequeñas al inicio del invierno) no responderían a la vernalización y pospondrían su floración a años posteriores, aún si lograran superar el umbral de tamaño durante la primavera (Baskin y Baskin, 1979a Bloom *et al.* 2002).

Este modelo conceptual de un “tamaño umbral para la vernalización” (Wesselingh y de Jong 1995) pudo aplicarse para predecir adecuadamente el comportamiento reproductivo de varias especies bienales como *Pastinaca sativa* (Baskin y Baskin 1979b), *Verbascum thapsus* (Reinartz 1984) o *Cynoglossum officinale* (de Jong *et al.* 1986), entre otras. No obstante, no todas las bienales tienen requerimientos de vernalización (Klinkhamer *et al.* 1987b; Simons y Johnston 2003) y hay plantas con requerimientos facultativos (no obligados, Anexo I).

Sin embargo, estudios posteriores demostraron que hay especies que no dependen del tamaño para ser vernalizadas (Klinkhamer *et al.* 1987a; Kachi 1990) pero deben alcanzar un tamaño mínimo post-vernalización para florecer en respuesta al fotoperíodo (Klinkhamer *et al.* 1987b; Kachi 1990; Prins *et al.* 1990; Wesselingh *et al.* 1994; citados en Bender *et al.* 2002a y en Bloom *et al.* 2003). La exposición a fotoperíodos largos es un requerimiento obligado para la floración de muchas bienales facultativas (Tabla I, Anexo). Por lo tanto, si las condiciones posteriores a la vernalización son desfavorables para el crecimiento, y las plantas no logran un “tamaño umbral para la inducción fotoperiódica” durante la ocurrencia de fotoperíodos inductivos, no habrá floración independientemente del tamaño que hayan logrado las plantas al inicio del invierno (Bender *et al.* 2002a).

Aparentemente, tanto la respuesta a la vernalización como al fotoperíodo pueden ser tamaño-dependientes (Prins *et al.* 1990; Klinkhamer *et al.* 1991). El que sea una, la

otra o ambas dependerá de la especie (Klinkhamer *et al.* 1987a y b; Wesselingh y de Jong 1995).

Un estudio en poblaciones naturales de *Oenothera biennis* estableció que la probabilidad de florecer de los individuos se asocia con el tamaño de roseta que logran en el otoño anterior (Gross 1981). Este antecedente sugiere la existencia de un tamaño umbral para la vernalización (*sensu* Wesselingh y de Jong 1995). Sin embargo, las evidencias surgidas de esta tesis indican que la vernalización no es un requerimiento obligado para la floración de *O. biennis* (**Exp.Vn2**, capítulo 3). Por lo tanto, es probable que el control del comportamiento reproductivo de esta especie dependa en mayor medida de otra señal ambiental, como el fotoperíodo.

Oenothera biennis tiene un requerimiento cualitativo de fotoperíodos largos para florecer (Chouard 1960; Vince-Prue 1975). Si bien no hay antecedentes de que esta respuesta esté condicionada por la biomasa de las plantas o la disponibilidad de factores de crecimiento, experimentos manipulativos demostraron que la respuesta al fotoperíodo en la especie emparentada *Oenothera glazioviana* depende del área foliar de las rosetas (Kachi y Hirose 1983). Como es probable que el tamaño de las plantas antes y después del invierno estén correlacionados, existe la posibilidad de que la respuesta fotoperiódica de *O. biennis* también dependa del tamaño de los individuos.

La tasa de crecimiento y la edad pueden ser otros indicadores de la condición endógena de los individuos que, junto al tamaño, determinen el comportamiento reproductivo de las bienales facultativas (Young 1985; Lacey 1986; Klinkhamer *et al.* 1991; Wesselingh y de Jong 1995; Wesselingh *et al.* 1997; Sletvold y Grindeland 2007). Aunque la influencia de estos indicadores ha sido mucho menos informada, y con efectos contrarios según las especies estudiadas (Wesselingh *et al.* 1997), hay evidencias en esta tesis de que las plantas de mayor tasa de crecimiento tienden a iniciar la reproducción antes que las que crecen más lentamente (Figura 4.6, capítulo 4). Por su parte, el número de hojas expandidas es utilizado comúnmente en muchas especies ornamentales como un indicador de la adquisición de competencia para florecer en respuesta a las señales ambientales (Dole y Wilkins 1999; Erwin 2007).

El objetivo de este capítulo es analizar si la respuesta al fotoperíodo de *Oenothera biennis* está condicionada por la acumulación de biomasa de las rosetas vegetativas, de acuerdo a lo postulado en **H₃**. Específicamente se analiza si el tamaño alcanzado por las plantas, inmediatamente antes de su exposición a fotoperíodos inductivos, determina variaciones en su tasa de desarrollo a floración. Además se compara la influencia del tamaño y la edad fisiológica de las plantas (estimada a partir del número de hojas expandidas) como moduladores de la tasa de desarrollo hasta la reproducción y se pone a prueba la relación entre la tasa de crecimiento durante la fase vegetativa y la tasa de desarrollo hasta el inicio de la reproducción, presentada en el capítulo 4 de esta tesis.

5.2 Materiales y métodos

Generalidades y tratamientos

Se realizaron dos experimentos bifactoriales (fotoperíodo x fertilización) en el marco del objetivo específico 3, abordado en esta sección de la tesis. El primero de ellos (**Exp.FP1**) se llevó a cabo durante la segunda mitad de 2006, con el fin de obtener una primera caracterización de la respuesta fotoperiódica del cultivar y de cómo ésta se

modifica en función de la disponibilidad de nutrientes. El segundo experimento (**Exp.FP2**) se realizó en 2007 y es una réplica del primero pero en una fecha de siembra más temprana. Este experimento se realizó no sólo para corroborar la respuesta a los tratamientos observada en **Exp.FP1** en un ambiente fototermal diferente, sino además para tratar de asociar la capacidad de respuesta de los individuos con indicadores de su condición endógena como la biomasa acumulada o el número de hojas expandidas. El cronograma de las principales actividades desarrolladas en estos experimentos presenta en la Tabla 5.1.

	Exp.FP1	Exp.FP2
Siembra en bandejas (bajo invernáculo)	29-7-06	10-3-07
Trasplante a macetas a campo	13-10-06	21-5-07
Fertilización	3-10-06	21-5-07
Inicio tratamiento fotoperiódico	17-10-06	19-6-07

Tabla 5.1: Cronograma de actividades desarrolladas en **Exp.FP1** y **Exp.FP2** .

Ambos experimentos se iniciaron con la siembra de semillas de *Oenothera biennis* en bandejas de germinación bajo un invernáculo abierto lateralmente, donde permanecieron hasta su trasplante a condiciones de campo. Debido a una rotura en el techo del invernáculo en **Exp.FP1**, el número de plantas establecidas fue menor al planificado y se prolongó la fase de establecimiento. Una vez establecidas, las plántulas fueron trasplantadas a macetas de 7lts. (tierra-arena 5:4) y se agruparon en microparcels siguiendo un diseño aleatorizado de parcelas divididas, donde el fotoperíodo (**FP**) fue el factor principal y la fertilización (**N**), el factor secundario (Figura 5.1).

FP estuvo constituido por tres niveles:

- **FP18:** Fotoperíodo constante de 18 horas de luz por día, extendido artificialmente con luminarias.
- **FP15:** Fotoperíodo extendido artificialmente a 15 horas de luz por día. Las plantas sometidas a este tratamiento exploraron un fotoperíodo constante de 15 hrs. excepto en la época en que el fotoperíodo natural supera las 15hrs.luz/día (aproximadamente entre el 20 de noviembre y el 20 de enero).
- **FPN:** Fotoperíodo natural, sin extensión fotoperiódica.

N estuvo constituido por dos niveles:

- **N120:** 2 grs. de fertilizante N-P-K (15-6,5-12,5) por maceta. Equivale a una dosis de 120 kg N/ha.
- **N0:** Tratamiento testigo sin fertilización.



Figura 5.1: Vista parcial de **Exp.FP2**. A cada microparcela se le asignó uno de los 3 niveles del tratamiento fotoperiódico (**FP18**, **FP15** y **FPN**). Cada microparcela consta de 36 macetas a las cuales se les asignó aleatoriamente uno de los dos niveles de fertilización (**N120** y **N0**). Foto tomada el 20 de julio de 2007.

La fertilización se realizó 10 días antes del trasplante en **Exp.FP1** y el mismo día del trasplante en **Exp.FP2**. Los tratamientos de extensión fotoperiódica se iniciaron a los 4 días del trasplante en **Exp.FP1** y 29 días después del trasplante en **Exp.FP2**, una vez definido el número de plántulas que lograron un establecimiento exitoso en las macetas a campo. En este experimento, muchas plantas mostraron síntomas de estrés al poco tiempo del trasplante. Las plantas visiblemente afectadas fueron reemplazadas para mantener el diseño experimental pero los reemplazos no fueron considerados en los análisis efectuados.

Las combinaciones de tratamientos (**FP18 N120**, **FP18 N0**, **FP15N120**, **FP15N0**, **FPN N120** y **FPN N0**) constaron de 3 repeticiones, cada una constituida por 8-9 plantas en **Exp.FP1** y 18 plantas en **Exp.FP2**.

Observaciones y mediciones

Se registró la proporción de plantas anuales (**%An**) en cada combinación de tratamientos de los dos experimentos y el momento de ocurrencia de los estadios fenológicos **ET1** y **FL1** en cada planta individual. El momento en que el 50% de los individuos anuales alcanzaron estos estadios (**ET1₅₀** y **FL1₅₀**), se comparó estadísticamente mediante Análisis de Varianza de dos vías a fin de detectar efectos significativos ($p < 0,05$) de los tratamientos y/o de su interacción sobre la fenología de las plantas.

En **Exp.FP2** se realizaron, además, mediciones sucesivas del número de hojas aparecidas (**NH**, estimador de la edad fisiológica de las plantas) y del área de roseta (**AR**, estimador de la biomasa acumulada). Estas mediciones se realizaron con intervalos de 1-2 semanas desde el trasplante (**Tr**) hasta el inicio del tratamiento de **FP**, y de 3-5 días luego de iniciado **FP**. La tasa de crecimiento media de la fase vegetativa (**TCv**) se calculó como la diferencia entre **AR** medida inmediatamente antes del primer

registro de **ET1** ($ET1_{(1)}$) y **AR** al trasplante dividida por el intervalo de tiempo transcurrido entre estas dos mediciones.

Con el fin de determinar la importancia relativa de la edad y la biomasa como posibles moduladores de la respuesta fotoperiódica se analizó, mediante regresión lineal, la relación entre la tasa de desarrollo desde **FP** hasta **ET1** (TD_{FP-ET1} , función inversa de la duración de la etapa **FP-ET1**) con el tamaño (AR_{FP}) y el número de hojas expandidas (NH_{FP}) al inicio del tratamiento fotoperiódico, en las plantas de **FP15** y **FP18**. Se empleó el mismo tipo de análisis para comparar, a partir de un submuestreo ($n=48$), la relación entre TD_{FP-ET1} y **AR** y **NH** en distintos momentos a lo largo de la fase vegetativa. Para el submuestreo se emplearon 12 plantas por combinación de tratamientos (**FP18 N120**, **FP18 N0**, **FP15N120**, **FP15N0**), seleccionando aquellas que presentaron el mayor contraste en TD_{ET1} (8 plantas por microparcela).

Finalmente, se examinó la relación entre TD_{FP-ET1} y la tasa de crecimiento media de las plantas durante la ocurrencia de fotoperíodos inductivos ($TC_{FP-ET1(1)}$). Este parámetro fue calculado como la diferencia entre el tamaño de las plantas al inicio de **FP** y el medido inmediatamente antes del primer registro de **ET1** ($ET1_{(1)}$).

5.3 Resultados

Las fechas de siembra empleadas permitieron generar situaciones contrastantes en el ambiente fototermal explorado por las plantas en los dos experimentos (Figura 5.2).

En términos generales, las plantas de **Exp.FP1** exploraron temperaturas más bajas durante el establecimiento bajo invernáculo que las de **Exp.FP2** (14.6 ± 4.5 °C vs. 18.5 ± 4.4 °C de temperatura media, para **Exp.FP1** y **Exp.FP2** respectivamente). Las condiciones térmicas luego del trasplante a campo fueron inversas, con temperaturas medias marcadamente superiores en **Exp.FP1** (a modo ilustrativo, la T° media de los primeros 30 días a campo fue de 19.4 ± 3.2 °C vs. 10.5 ± 2.7 °C, para **Exp.FP1** y **Exp.FP2** respectivamente). Ambos experimentos estuvieron expuestos a temperaturas potencialmente vernalizantes (*i.e.* $T^\circ < 10$ °C) en algún momento de su ciclo.

Exp.FP1, no sólo tuvo una mayor temperatura media luego del trasplante, sino además fotoperíodos más largos (más cercanos a un hipotético umbral para la respuesta). En consecuencia, la aplicación del tratamiento fotoperiódico generó un contraste mucho mayor entre las parcelas tratadas (**FP15** y **FP18**) y las no tratadas (**FPN**) en **Exp.FP2** (18 y 15 vs. 10.8 hrs.luz/día para **FP18**, **FP15** y **FPN** al inicio del tratamiento) que en **Exp.FP1** (18 y 15 vs. 13.9 hrs.luz/día para **FP18**, **FP15** y **FPN** al inicio del tratamiento). En este último experimento, **FPN** y **FP15** se igualaron a los 34 días de iniciado el tratamiento.

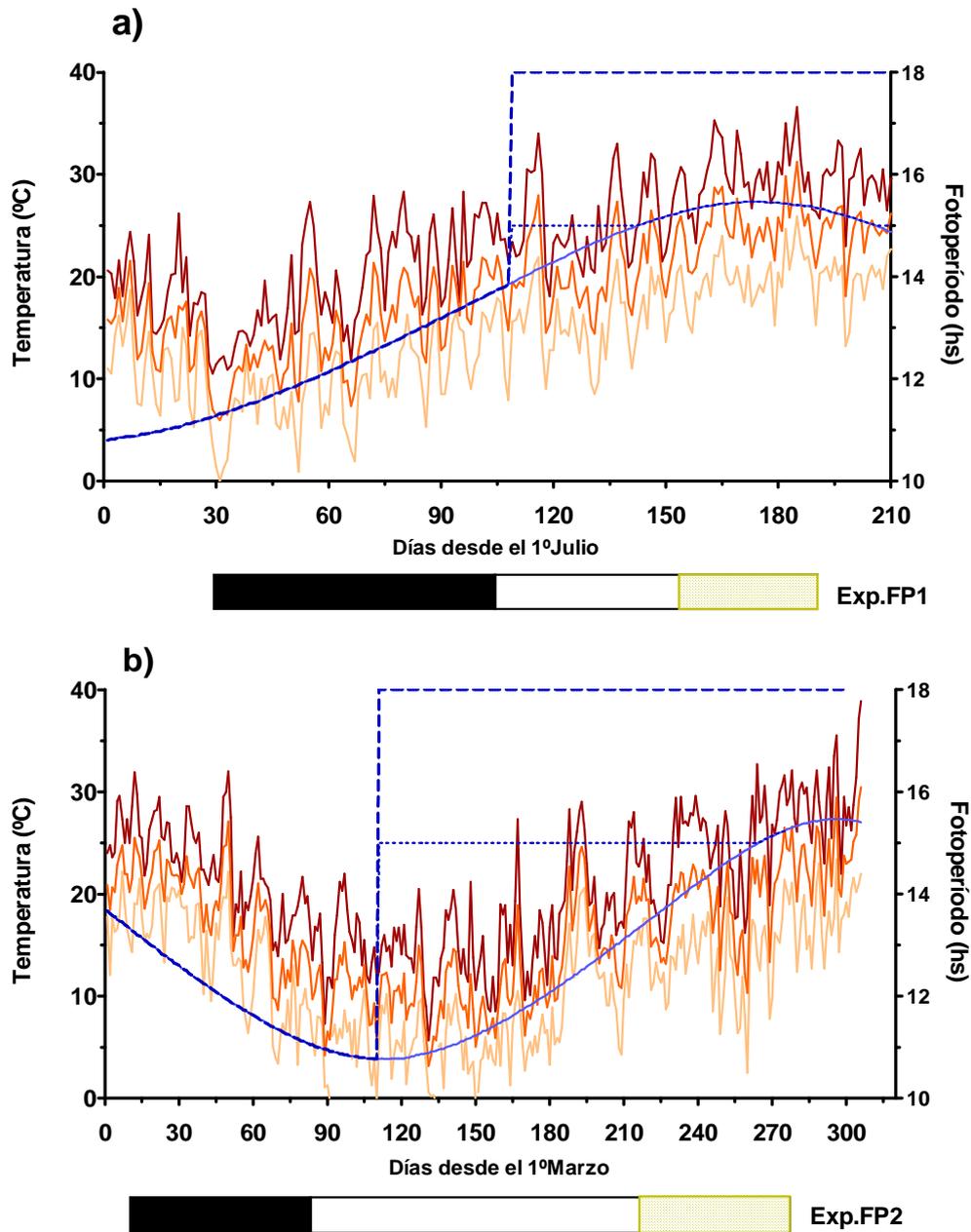


Figura 5.2: Condiciones fototermales exploradas durante **Exp.FP1** (a) y **Exp.FP2** (b). Las líneas de tonalidad anaranjada representan las condiciones térmicas ($T^{\circ}\text{máx}$: oscura, $T^{\circ}\text{media}$: intermedia, $T^{\circ}\text{mín}$: clara) y las de tonalidad azul las condiciones fotoperiódicas (entera: **FPN**, partida: **FP18**, punteada: **FP15**). Las barras de la parte inferior de los gráficos indican los períodos en que ocurrieron las fases de establecimiento de plántulas en bandejas bajo cubierta (barra gris) y de crecimiento de plantas en macetas en condiciones de campo (barra blanca). La barra amarilla señala el período de inicio de floración (**FL1**) considerando las plantas de todos los tratamientos.

En **Exp.FP1**, una proporción considerable de plantas sin fertilizar y sin extensión fotoperiódica manifestó un comportamiento bianual ($25 \pm 7.2\%$ de plantas bienales en **FPN N0**, figura 5.3). Tanto la extensión fotoperiódica como la fertilización contribuyeron a reducir la bianualidad aunque no se encontró interacción significativa entre estos tratamientos (**FP**: $p < 0.05$; **N**: $p < 0.05$; **FP x N**: $p > 0.05$). Sólo las plantas fertilizadas y sometidas a extensión fotoperiódica (**FP18 N120** y **FP15 N120**) tuvieron un 100% de floración en la primer estación de crecimiento. Sin embargo, la proporción de plantas anuales fue similar y cercana al 100% en **FP18 N0**, **FP15 N0** y **FPN N120** y sólo fue considerablemente menor en **FPN N0**.

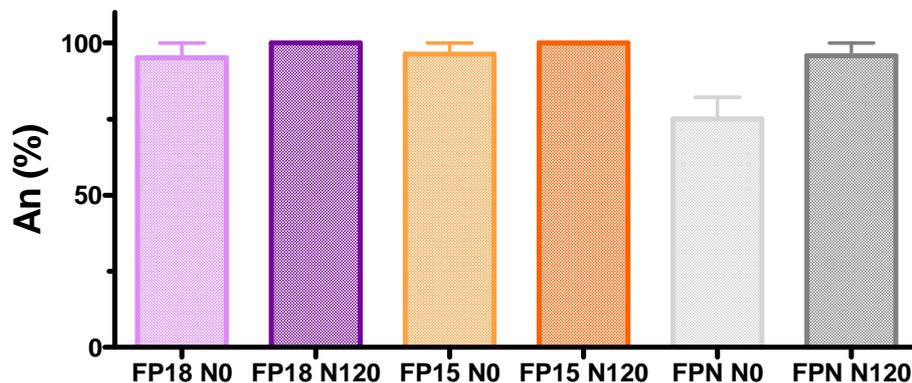


Figura 5.3: Proporción de individuos de **Exp.FP1** de comportamiento anual. Los colores representan diferentes niveles de extensión fotoperiódica (**FP18**-violeta; **FP15**-naranja y **FPN**-gris) y la tonalidad los niveles de fertilización (tonalidad clara: **N0** sin fertilización; tonalidad oscura: **N120** fertilizada con NPK equivalente a 120 KgN/ha). Los segmentos representan el error estándar de la media de cada tratamiento.

En **Exp.FP1**, tanto la extensión fotoperiódica como la fertilización redujeron significativamente el tiempo a **FL1** en las plantas de comportamiento anual (figura 5.4). El efecto de la extensión fotoperiódica fue producto de una reducción en la duración de las sub-fases **Tr-ET1₅₀** ($p = 0.0001$) y **ET1₅₀-FL1₅₀** ($p < 0.0001$) sin detectarse diferencias significativas entre **FP18** y **FP15** ($p > 0.05$). La duración de las sub-fases **Tr-ET1₅₀** y **ET1₅₀-FL1₅₀** en **FPN** fue en promedio 5 y 10 días mayor que las de los tratamientos con extensión, respectivamente. La fertilización, por otra parte, adelantó significativamente la ocurrencia de **ET1₅₀** (5 días en promedio, $p < 0.0001$) pero no tuvo efecto significativo en la duración de la subfase siguiente, **ET1₅₀-FL1₅₀** ($p > 0.05$). En consecuencia, el efecto de la suplementación fotoperiódica sobre la duración de la fase **Tr-FL1** fue mayor que el de la fertilización. No se detectó interacción significativa entre los tratamientos en ninguna de las dos subfases ($p > 0.05$).

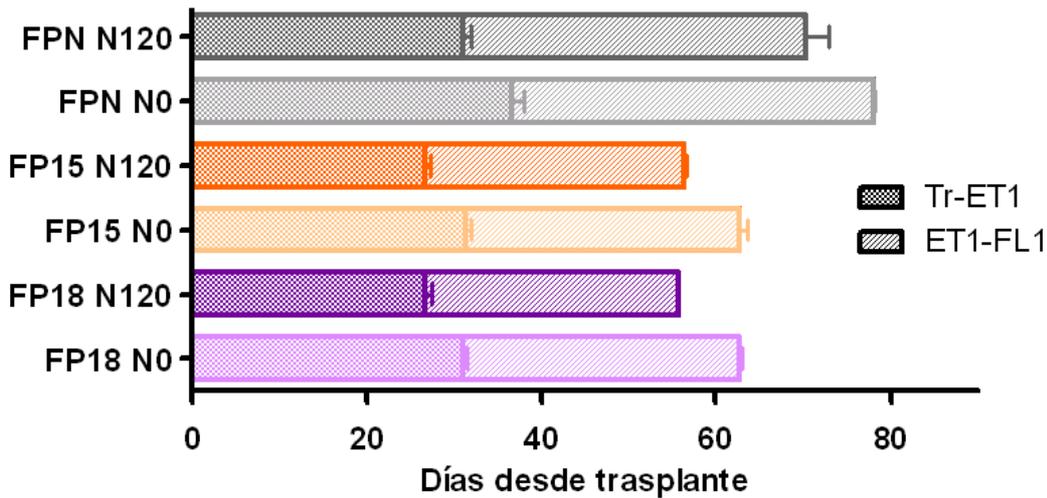


Figura 5.4: Tiempo a floración (días desde el trasplante) de plantas de *Oenothera biennis* del **Exp.FP1** sometidas a diferentes niveles de extensión fotoperiódica **FP18** (violeta), **FP15** (naranja) y **FPN** (gris) y 2 niveles de fertilización: **N120** (fertilizado, tonalidad oscura) y **N0** (sin fertilizar, tonalidad clara). Se discriminan 2 subfases: **transplante-ET1** (trama a cuadros) y **ET1-FL1** (trama rallada). Los segmentos representan el error estándar de la media de cada tratamiento y subfase.

En **Exp.FP2** todas las plantas florecieron en la primera estación de crecimiento, es decir que no se registraron casos de bianualidad. Al igual que en **Exp.FP1**, el tiempo transcurrido desde el trasplante hasta **FL1** varió significativamente en respuesta a los tratamientos, sin detectarse interacción entre ellos (**FP**: $p < 0.0001$; **N**: $p = 0.0003$; **FP x N**: $p > 0.05$). La duración de las subfases **Tr-ET1₅₀** y **ET1₅₀-FL1₅₀** en este experimento fue mayor que la registrada en **Exp.FP1** (figura 5.5).

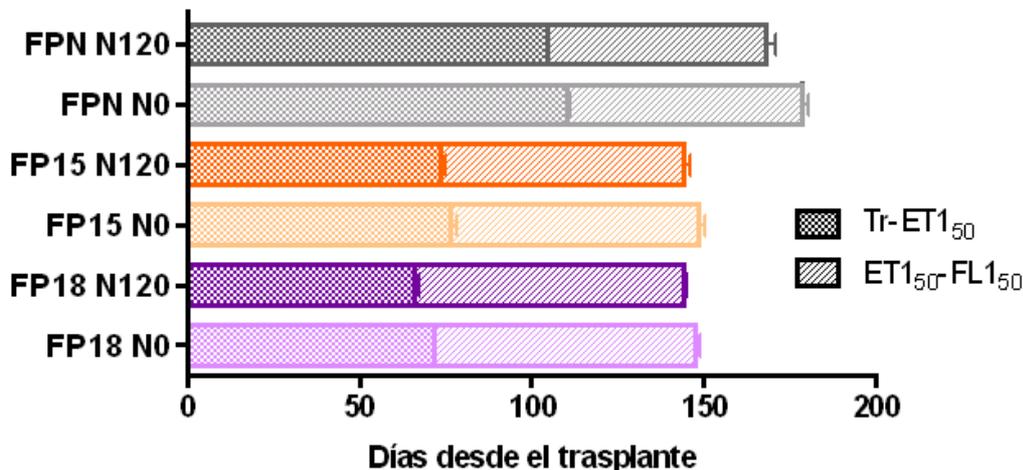


Figura 5.5: Tiempo a floración (días desde el trasplante) de plantas de *Oenothera biennis* del **Exp.FP2** sometidas a diferentes niveles de extensión fotoperiódica **FP18** (violeta), **FP15** (naranja) y **FPN** (gris) y 2 niveles de fertilización: **N120** (fertilizado, tonalidad oscura) y **N0** (sin fertilizar, tonalidad clara). Se discriminan 2 subfases: **Tr-ET1₅₀** (trama a cuadros) y **ET1₅₀-FL1₅₀** (trama rallada). Los segmentos representan el error estándar de la media de cada tratamiento y subfase.

La extensión fotoperiódica fue el tratamiento que mayor impacto tuvo en la tasa de desarrollo hasta **ET1** en **Exp.FP2**. Los tres niveles del tratamiento difirieron significativamente en la duración de la subfase **Tr-ET1₅₀** ($p < 0.0001$) que en promedio duró 68.3, 75.0 y 107.3 días en **FP18**, **FP15** y **FPN** respectivamente. La fertilización, por su parte, redujo la duración de esta subfase 5 días en promedio (**N120** < **N0**, $p = 0.0006$). La duración de la sub-fase **ET1₅₀-FL1₅₀**, por otra parte, sólo varió en respuesta al fotoperíodo, con diferencias significativas entre los tres niveles del tratamiento pero en sentido contrario al registrado en la sub-fase anterior (**FP18** > **FP15** > **FPN**, $p = 0.0003$).

El tratamiento de fertilización en **Exp.FP2**, si bien generó diferencias significativas en la fenología de las plantas, no logró grandes diferencias en la tasa de crecimiento promedio de las plantas de **N0** y **N120**. **TCv** aumentó por efecto de **N** ($p < 0.01$) aunque sólo se lograron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre **N0** y **N120** en **FPN** (figura 5.6).

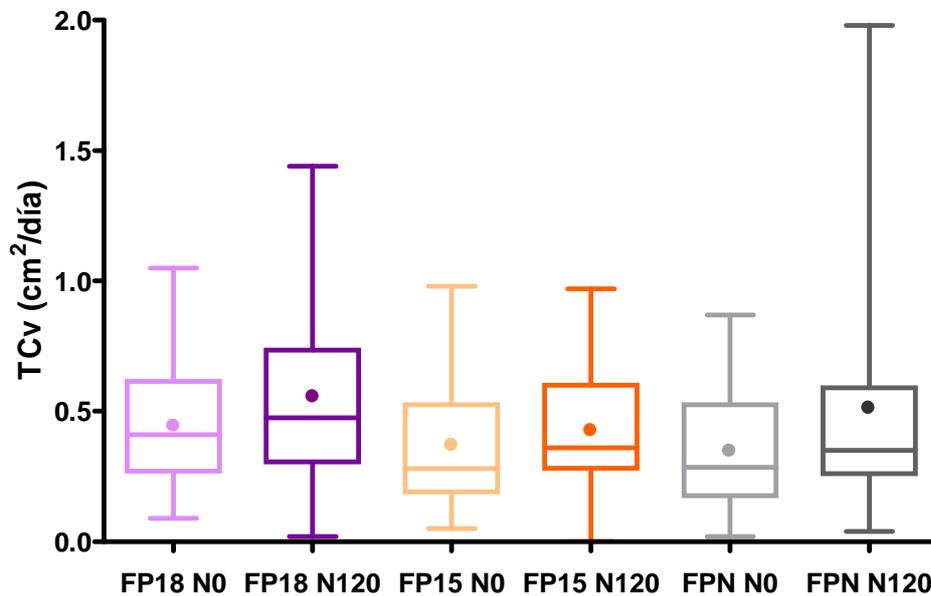
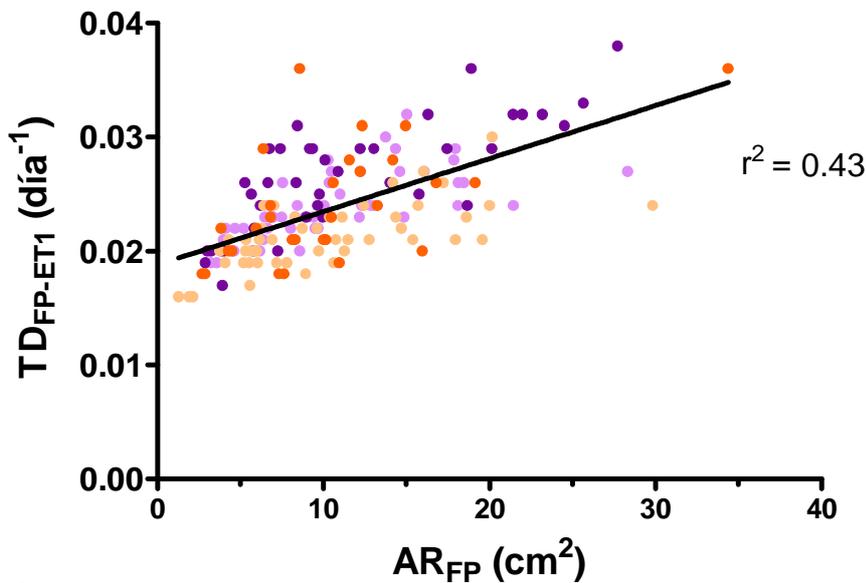


Figura 5.6: Diagrama de caja y bigotes de la tasa de crecimiento media de plantas de *Oenothera biennis* sometidas a diferentes niveles de extensión fotoperiódica **FP18** (violeta), **FP15** (naranja) y **FPN** (gris) y 2 niveles de fertilización: **N120** (fertilizado, tonalidad oscura) y **N0** (sin fertilizar, tonalidad clara). La caja delimita los cuartiles 2 y 3 y los bigotes indican el rango de los cuartiles 1(inferior) y 4 (superior). El punto indica la media de los tratamientos.

La tasa de desarrollo hasta **ET1** (TD_{FP-ET1}) de las plantas de **Exp.FP2** sometidas a extensión fotoperiódica (**FP18** y **FP15**), se relacionó lineal y positivamente con el tamaño (AR_{FP} , $r^2 = 0.43$, $p < 0.0001$) y la edad fisiológica (NH_{FP} , $r^2 = 0.28$, $p < 0.0001$) de las plantas al inicio del tratamiento lumínico (Figura 5.7).

a)



b)

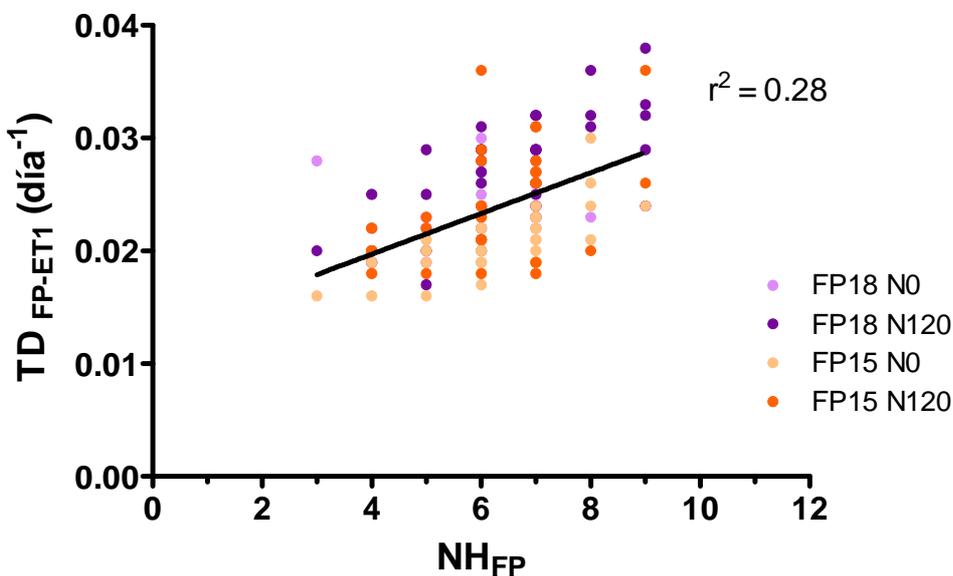


Figura 5.7: Relación entre la tasa de desarrollo a **ET1** (TD_{FP-ET1}) y el área de roseta, AR_{FP} (a) o el número de hojas, NH_{FP} , (b) al inicio del tratamiento fotoperiódico (FP15 ó FP18) de plantas de *Oenothera biennis* con diferente disponibilidad nutricional (N0 ó N120). Cada punto representa una planta individual. La línea indica el ajuste de las observaciones a un función lineal ($n=173$).

La tasa de desarrollo a **ET1** presentó una relación más robusta con el tamaño (**AR**) que con la edad (**NH**) de las plantas. Esta tendencia se manifestó no sólo con las mediciones realizadas al inicio del tratamiento fotoperiódico (Figura 5.7), sino además en aquellas realizadas en un submuestreo (n=48) a lo largo del período previo a **ET1** (figura 5.8). La relación entre **AR** y TD_{FP-ET1} fue más estrecha cuanto más próxima a $ET1_{(1)}$ fue realizada la medición de **AR**.

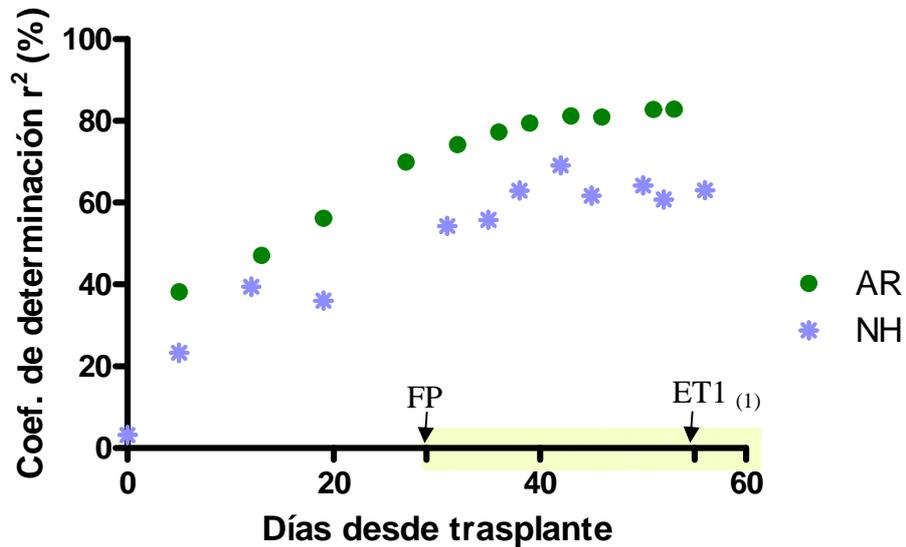


Figura 5.8: Coeficiente de determinación r^2 (%) de la regresión lineal de TD_{FP-ET1} en función del área de roseta (**AR**) o del número de hojas (**NH**) medidos en diferentes momentos antes del primer registro de **ET1** (n=48). FP: Inicio de tratamiento fotoperiódico; $ET1_{(1)}$: primer registro de **ET1**.

El tamaño de las plantas al comienzo del tratamiento fotoperiódico (AR_{FP}), también se asoció con su tasa de crecimiento posterior, medida hasta $ET1_{(1)}$ (figura 5.9). Finalmente, la tasa de crecimiento durante la exposición a condiciones inductivas de fotoperíodo ($TC_{FP-ET1(1)}$), mostró una mayor asociación con TD_{FP-ET1} que la registrada con AR_{FP} y NH_{FP} (figura 5.10).

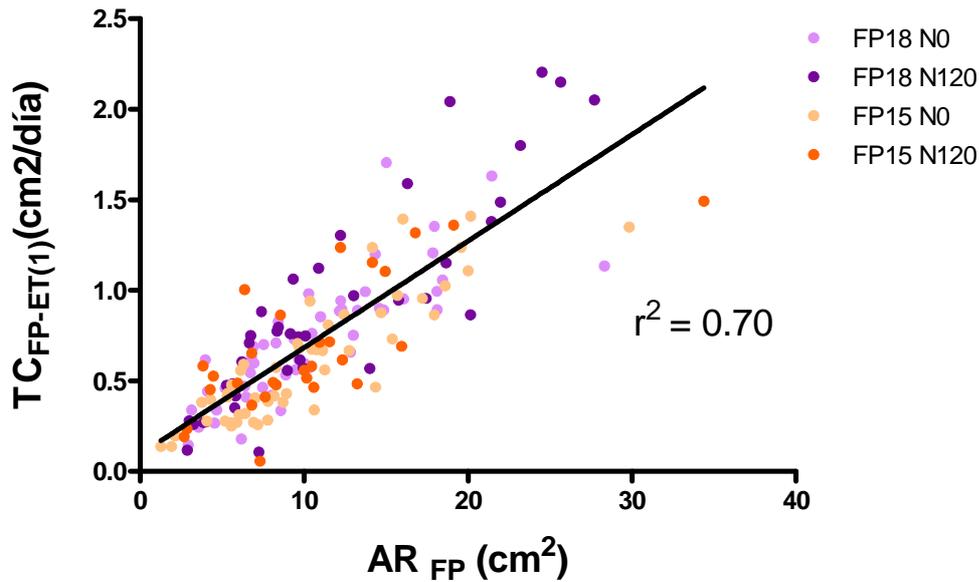


Figura 5.9: Relación entre la tasa de crecimiento durante la exposición a fotoperíodos extendidos artificialmente (TD_{FP-ET1}) y el área de roseta de las plantas (AR_{FP}) al inicio de la exposición en plantas de *Oenothera biennis* sometidas a diferente disponibilidad nutricional (**N0** y **N120**). Cada punto representa una planta individual. La línea indica el ajuste de las observaciones a una función lineal (n=173).

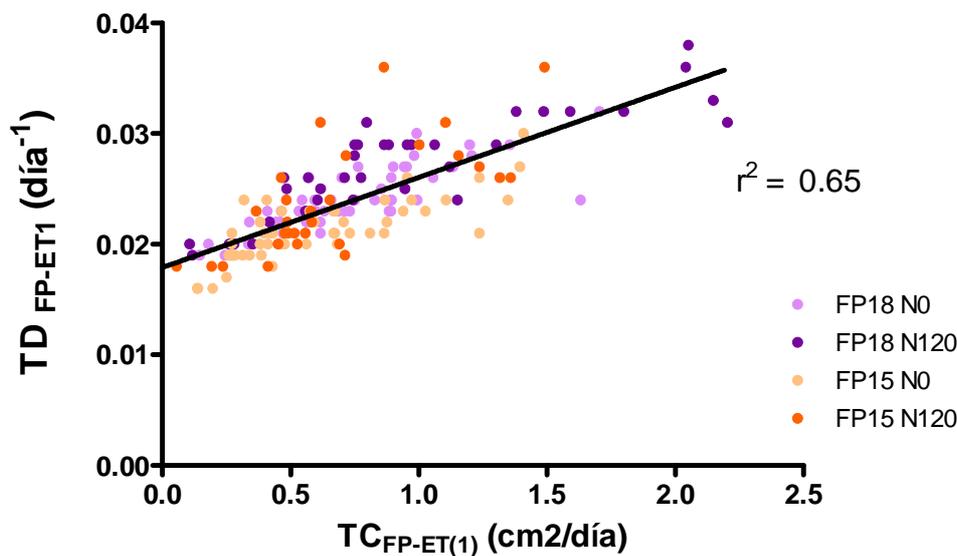


Figura 5.10: Relación entre la tasa de desarrollo a **ET1** (TD_{FP-ET1}) y la tasa de crecimiento de plantas de *Oenothera biennis* expuestas a fotoperíodos extendidos artificialmente (**FP15** y **FP18**) y distinta disponibilidad nutricional (**N0** y **N120**). Cada punto representa una planta individual. La línea indica el ajuste de las observaciones a un función lineal (n=173).

5.4 Discusión

Tanto la extensión fotoperiódica (**FP**) como la fertilización (**N**) son tratamientos efectivos para acelerar la tasa de desarrollo hasta **FL1** (TD_{Tr-FL1}) y promover la anualidad en condiciones ambientales, como las de **Exp.FP1**, que determinan una proporción variable de plantas de comportamiento bienal (figura 5.3). El efecto de **FP** sobre TD_{Tr-FL1} fue mayor que el de **N**, tanto en **Exp.FP1** como en **Exp.FP2**, en concordancia con la literatura que reconoce al fotoperíodo y a la temperatura como principales reguladores del desarrollo de los cultivos (Major 1980, Hodges 1991, González et al. 2002). Por otra parte, el reducido impacto de **N** sobre el crecimiento (figura 5.6) podría ser un argumento alternativo para explicar la baja respuesta a la fertilización, en términos de desarrollo, en los experimentos presentados. Si bien los efectos de **FP** y **N** sobre la fenología de *Oenothera biennis* parecen ser aditivos, ya que no se detectó interacción significativa en ninguno de los análisis realizados en los dos experimentos (figuras 5.3, 5.4 y 5.5), se acepta **H₃** dado que las plantas de mayor tasa de crecimiento, durante la incidencia de señales inductoras de la floración en **Exp.FP2**, iniciaron la reproducción antes que las de menor tasa de crecimiento (figura 5.10).

De acuerdo a lo establecido en los antecedentes (ver referencias en Klinkhamer *et al.* 1987b), el área de roseta (**AR**, estimador de biomasa) resultó ser un mejor indicador que el número de hojas (**NH**, estimador de edad fisiológica) de la capacidad de respuesta de los individuos a los estímulos ambientales que desencadenan la floración (figuras 5.7 y 5.8). Sin embargo fue la tasa de crecimiento durante la exposición a fotoperíodos inductivos (otro parámetro asociado tanto a la disponibilidad de recursos como a la condición endógena de la planta) el indicador que mejor se relacionó con la tasa de desarrollo (figura 5.10). No obstante, como se discutió en el capítulo anterior, la mayor parte de la variabilidad en la TC_{FP-ET1} de los individuos no se debería al efecto de los tratamientos de fertilización aplicados, sino a posibles factores microambientales o genéticos no contemplados durante la realización de los experimentos.

La tasa de crecimiento se ha relacionado con la probabilidad de florecer de otras bienales facultativas como *Cirsium vulgare* (Klinkhamer *et al.* 1987a), *Carlina vulgaris* (Klinkhamer *et al.* 1991), ó *Cynoglossum officinale* (Wesselingh *et al.* 1997) pero no hay antecedentes que hayan asociado este parámetro con la tasa de desarrollo de los individuos de comportamiento anual (Capítulo 4). A su vez, la tasa de crecimiento previa a la reproducción ha tenido, en general, menor influencia que el tamaño sobre el desarrollo reproductivo de estas especies (Klinkhamer *et al.* 1987a; Klinkhamer *et al.* 1991).

Se ha propuesto que un mínimo área foliar puede no ser necesario para la fotoinducción *per se* sino como indicador de la capacidad para proveer de asimilados al meristema apical durante este proceso (Gianquinto 1997). Se cree que los fotoasimilados cumplen un papel importante en la iniciación floral de las plantas, no sólo como parte de una señal endógena compleja asociada a la respuesta fotoperiódica, sino además como principales reguladores del transporte de solutos (entre ellos posibles moléculas promotoras de la floración) hacia el ápice por vía floemática (Perilleux y Bernier 2002 citado en Thomas 2006; Bernier y Perilleux 2005). Sería esperable entonces que las plantas de mayor tasa de crecimiento, al tener una mayor producción de asimilados, se induzcan a floración más rápido en respuesta al fotoperíodo.

Aunque la tasa de crecimiento durante las condiciones inductivas de fotoperíodo ($TC_{FP-ET1(1)}$) es el parámetro que mejor se relacionó con la tasa de desarrollo de *Oenothera biennis* en **Exp.FP2**, es innegable que este indicador está íntimamente relacionado con el tamaño de roseta al inicio del tratamiento (AR_{FP} , figura 5.9). Ambos indicadores dependen, además del genotipo, de los factores ambientales que modulan el crecimiento: AR_{FP} estaría determinado por las condiciones de crecimiento previas a la exposición al fotoperíodo, mientras que TC_{FP-ET1} lo está por las condiciones durante el tratamiento fotoperiódico y por AR_{FP} . Por lo tanto, si AR_{FP} reflejaría en alguna medida el estado endógeno de la planta y su capacidad de respuesta a las señales inductoras (Wesselingh y de Jong 1995; Wesselingh *et al.* 1997), $TC_{FP-ET1(1)}$ es un indicador que integra tanto a la condición endógena como a la calidad del ambiente durante la inducción. Se sugiere entonces la hipótesis que el área de roseta no es en realidad el factor que determina la capacidad de respuesta de las plantas a los factores desencadenantes de la floración sino que interviene indirectamente modulando la capacidad de crecimiento de los individuos durante la ocurrencia de condiciones inductivas. El hecho de que la tasa de crecimiento haya resultado un indicador menos confiable que el tamaño de planta en antecedentes en otras especies, podría deberse, en parte, a que se haya considerado la tasa de crecimiento relativa ($[\text{Tamaño final} - \text{Tamaño inicial}] / \text{Tamaño inicial}$) y no la absoluta ($\text{Tamaño final} - \text{Tamaño inicial}$) como se hizo en esta tesis. La utilización de la tasa de crecimiento relativa, al descartar el efecto del tamaño inicial de las plantas, ignora parte de la información acerca de su condición endógena.

Podría plantearse la hipótesis de que sea la respuesta a la vernalización, y no la fotoperiódica, la que sea modulada por la tasa de crecimiento, dado que la aplicación del tratamiento de luz en **Exp.FP2** coincidió con un período de temperaturas vernalizantes (figura 5.2). Se ha establecido en muchas especies bienales facultativas que la respuesta a la vernalización depende de la biomasa acumulada (Tabla I.1, Anexo I). A su vez, la vernalización puede influir sobre la respuesta fotoperiódica, ya sea adelantando el inicio de la fase fotoinductiva, *i.e.* sensible al fotoperíodo (Hodges 1991), y/o incrementando la sensibilidad de las plantas al fotoperíodo (Gianquinto 1997; Erwin *et al.* 2002). Sin embargo, las plantas de **Exp.FP1**, que prácticamente no tuvieron exposición a temperaturas vernalizantes luego del trasplante, también aceleraron su desarrollo en respuesta a la fertilización. El hecho de que el patrón de respuesta a la fertilización en términos de desarrollo haya sido similar en **Exp.FP1** y **Exp.FP2** (Figuras 5.4 y 5.5) ratifica en buena medida que es genuinamente la respuesta a fotoperíodos inductivos la que es modulada por la tasa de crecimiento. Si no fuera así no debería haber diferencias entre las tasas de desarrollo de **N0** y **N120** en **Exp.FP1**. Por su parte, la posibilidad de que la vernalización de *Oenothera biennis* también dependa de la tasa de crecimiento deberá ser evaluada en futuras líneas de investigación.

Aunque **Exp.FP1** y **Exp.FP2** presentaron en términos generales un patrón de respuesta similar a los tratamientos aplicados, sólo en **Exp.FP1** se registraron casos de bianualidad, principalmente en condiciones naturales de fotoperíodo sin fertilización (**FPN N0**, figura 5.3). La ocurrencia de individuos bienales en **Exp.FP1** podría atribuirse al menos a dos causas posibles: i) a que no se haya satisfecho el requerimiento de vernalización de las plantas, y/o ii) al efecto de algún otro factor, probablemente altas temperaturas, que impida la inducción de la floración de plantas competentes en presencia de señales inductivas (Reekie *et al.* 1997).

Si bien la vernalización no es una condición obligatoria para la floración de todos los individuos, esta señal ambiental contribuye a aumentar la proporción de

plantas de comportamiento anual (Capítulo 3). Aunque *Oenothera biennis* puede ser vernalizada desde estadíos tempranos (semilla germinada), el período de exposición a bajas temperaturas durante el establecimiento (figura 5.2a) pudo haber resultado insuficiente para satisfacer la respuesta a la vernalización de los individuos de mayores requerimientos. La promoción del comportamiento anual por fertilización, en individuos no vernalizados de bienales que responden al frío, ha sido reportada en *Daucus carota*, *Scabiosa columbaria* (Verkaar y Schenkeveld 1984) y *Carlina vulgaris* (Klinkhamer *et al.* 1991), entre otras especies, aunque los mecanismos involucrados en esta respuesta no han sido esclarecidos.

Respecto al posible efecto de altas temperaturas, Vince-Prue (1975) sostiene que muchas plantas de día largo, aún en presencia de fotoperíodos inductivos, permanecen en estado vegetativo si son expuestas a temperaturas nocturnas elevadas. Asumiendo que las plantas que manifestaron comportamiento bienal eventualmente iban a ser las últimas en iniciar la reproducción, cabe la posibilidad de que al momento de adquirir competencia para hacerlo, la exposición a las altas temperaturas de diciembre haya impedido su inducción fotoperiódica. Si bien hay pocos antecedentes que atribuyan la inhibición de la reproducción al efecto de altas temperaturas (Windauer *et al.* 2004) este factor aparece como un candidato para explicar la mayor incidencia de bianualidad en fechas de siembra tardías. Esta discusión se retomará en el Capítulo 6.

Los experimentos no sólo difirieron respecto a la incidencia de individuos de comportamiento bianual sino, además, en la magnitud del efecto de los tratamientos sobre la fenología de los individuos de comportamiento anual. La extensión fotoperiódica aceleró la tasa de desarrollo a **ET1** en los dos experimentos (figuras 5.4 y 5.5), aunque las diferencias entre los niveles del tratamiento se hicieron más evidentes en **Exp.FP2** donde el contraste entre los fotoperíodos naturales (**FPN**) y los extendidos (**FP15** y **FP18**) fue mayor (figura 5.2).

La existencia de diferencias fenológicas entre **FPN** y **FP15** en **Exp.FP1** sugiere que, al menos al inicio del tratamiento fotoperiódico, **FPN** (aprox. 13.9 hrs.luz/día) fue menor que el requerido para inducir la respuesta, por lo que el fotoperíodo crítico para la inducción floral de *Oenothera biennis* estaría entre 14 y 15 hrs.luz/día. Sin embargo, en **Exp.FP2** las plantas de **FPN** iniciaron la reproducción con fotoperíodos menores, de 12-12.5 hrs.luz/día (principio de septiembre). En concordancia con los resultados de **Exp.FP2**, Picard (1965, citado en Clough *et al.* 2001) sostiene que la floración de *O. biennis* var. *sulfurea* ocurre con fotoperíodo ≥ 12 hs. luego de un tratamiento de vernalización de más de 10 semanas de duración. Es probable que las diferencias entre experimentos, en cuanto al fotoperíodo crítico o la forma de la respuesta fotoperiódica, se deban precisamente a diferencias en la satisfacción del requerimiento de vernalización. Se ha reportado que la vernalización puede incrementar la sensibilidad al fotoperíodo, ya sea variando el fotoperíodo crítico (Kasperbauer *et al.* 1962; Lang 1965 citado en Erwin 2007; Runkle *et al.* 1999) o reduciendo la cantidad de días necesarios para lograr la inducción (Gianquinto 1997). También se han reportado variaciones en el fotoperíodo crítico por efecto de temperaturas no vernalizantes (Heide y Sønsteby 2007) e incluso cambios en el carácter de la respuesta fotoperiódica (cualitativo o cuantitativo) por efecto de la vernalización (Runkle *et al.* 1999) y/o la temperatura (Vince-Prue 1975). Futuros experimentos en condiciones controladas son necesarios para lograr una caracterización más completa de la respuesta fotoperiódica de *Oenothera biennis* y de cómo ésta varía en respuesta a la vernalización y /o la temperatura.

Finalmente, los resultados de **Exp.FP1** sugieren que el efecto fotoperiódico no sólo regula el desarrollo hasta **ET1**, sino que influye además sobre la sub-fase siguiente,

ET1-FL1 (figura 5.4). La extensión del fotoperíodo condujo a un acortamiento de la duración de la fase **ET1-FL1** en **Exp.FP1** que no pudo registrarse en **Exp.FP2**, dadas las diferencias en el ambiente térmico explorado durante esta sub-fase por los tratamientos **FP15** y **FP18** (**ET1-FL1**: mediados de Julio a mediados de Octubre) vs. **FPN** (**ET1-FL1**: Septiembre a Noviembre). En este caso, la exposición de **FPN** a temperatura más elevada sería la causa de su mayor tasa de desarrollo entre **ET1** y **FL1**. Por otra parte, el hecho de que en **Exp.FP1** **ET1** haya ocurrido en el mismo momento en tratamientos con (**FP15 N0** y **FP18 N0**) y sin extensión fotoperiódica (**FPN N120**, figura 5.4) permite inferir que la reducción en la duración de esta fase se debe a un efecto fotoperiódico legítimo ya que estas combinaciones de tratamientos no presentaron diferencias en el ambiente (térmico) explorado. El efecto de la fertilización, por su parte, sólo influyó en el desarrollo hasta **ET1**, en concordancia con los resultados del capítulo anterior (figura 4.4).

Resumiendo, el inicio de la reproducción de *Oenothera biennis*, en respuesta a fotoperíodos inductivos, parece estar más asociado a la tasa de crecimiento de las plantas que al tamaño o la edad de los individuos al inicio de las condiciones inductivas. Al depender del tamaño, la tasa de crecimiento es un mejor indicador que éste de la condición endógena de las plantas ya que no sólo refleja su historia previa sino la que presentan durante la exposición a los estímulos ambientales que promueven la floración (fotoperíodo y probablemente vernalización). La insatisfacción del requerimiento de vernalización y/o la exposición a temperaturas elevadas durante el período de condiciones naturales fotoinductivas, aparecen como posibles candidatos para explicar la mayor incidencia de comportamiento bienal en fechas de siembra tardía.

El principal mensaje de lo expuesto en este capítulo reside en el planteo de que la capacidad de respuesta de *Oenothera biennis* a fotoperíodos inductivos estaría condicionada en buena medida por la tasa de crecimiento de las plantas durante las condiciones promotoras de la floración, pero la incidencia de otros factores del ambiente podría influir positiva (vernalización) o negativamente (altas temperaturas) en esta relación. Estos, y los principales hallazgos encontrados a lo largo de esta tesis, serán considerados en forma integrada en el próximo capítulo. Esta información, se complementará con los resultados de algunos experimentos anexos que, si bien no formaron parte de ninguno de los objetivos específicos inicialmente propuestos en esta tesis, contribuyen en gran medida al objetivo general de incrementar el conocimiento de los factores que determinan el comportamiento bienal facultativo de *Oenothera biennis* y aportar herramientas para el entendimiento de la fisiología reproductiva de las especies monocárpicas perennes.

CAPITULO 6: DISCUSIÓN GENERAL

Las especies bienales facultativas suelen presentar una amplia variabilidad en el momento de su reproducción, pudiendo florecer en la primer estación de crecimiento luego de su emergencia (comportamiento anual), en la segunda (comportamiento bienal) o incluso en años posteriores (comportamiento monocárpico cortamente perenne) (Baskin y Baskin 1979a; Kelly 1985; Klinkhamer *et al.* 1987 a, b; Lacey 1988; Prins 1990; Wesselingh y de Jong 1995; Bloom *et al.* 2003). Esta variabilidad constituye una limitante para la explotación comercial de cultivos, tanto en especies hortícolas en las que se cosechan órganos vegetativos (ej. repollo, remolacha, zanahoria) y es deseable el comportamiento bienal (Amasino 2005), como en especies de grano como *Oenothera biennis* donde se procura que el cultivo tenga un comportamiento anual (Horrobin y Lapinskas 1993; Lapinskas 1999).

Buena parte de la incertidumbre asociada al comportamiento reproductivo de estas especies puede ser reducida si se determinan las bases fisiológicas que gobiernan el control de su floración (Klinkhamer *et al.* 1987b). La gran mayoría de los antecedentes coinciden en atribuir el comportamiento bianual facultativo a la variabilidad en la duración de la fase juvenil de estas especies, durante la cual las plantas son incapaces de responder a los factores ambientales que desencadenan la reproducción *i.e.* vernalización y fotoperíodo. A su vez, la duración de esta fase juvenil estaría determinada por el ambiente explorado; numerosos trabajos han propuesto que la adquisición de competencia para florecer dependería fundamentalmente de la biomasa acumulada por las plantas y no de su edad fisiológica (Werner 1975; Werner y Caswell 1977; Baskin y Baskin 1979 a, b; Gross 1981; Lacey 1986a; de Jong *et al.* 1998; Simons y Johnston 2000; Metcalf *et al.* 2003).

Desde que Werner (1975) estableció que las rosetas de *Dipsacus fullonum* deben superar un determinado tamaño crítico (*i.e.* tamaño mínimo ó tamaño umbral) para florecer, numerosos trabajos se han llevado a cabo para determinar cuál es el tamaño mínimo que permite a las diferentes bienales facultativas responder a las señales ambientales que inician la reproducción, y por encima del cuál la probabilidad de florecer se incrementa con el tamaño (Gross 1981; Kachi y Hirose 1983; Reinartz 1984; Kachi y Hirose 1985; Hirose y Kachi 1986; Lacey 1986b; Wesselingh y de Jong 1995; Wesselingh *et al.* 1997; de Jong *et al.* 2000; Bloom *et al.* 2002).

Hasta la fecha, la mayoría de los antecedentes se han limitado a analizar, en términos probabilísticos, el efecto del tamaño y de diferentes factores ambientales sobre la proporción de plantas florecidas en una estación de crecimiento determinada (Baskin y Baskin 1979a; Van der Meijden y Van der Waals-Kooi 1979; de Jong *et al.* 1986 ;Prins *et al.* 1990; Klinkhamer *et al.* 1991; Wesselingh y Klinkhamer 1996; Wesselingh *et al.* 1997; de Jong *et al.* 1998; Bender *et al.* 2002a; Sletvold y Grindeland 2007). Esta información resultó de utilidad para explicar y/o predecir la dinámica poblacional de muchas de estas especies en condiciones ambientales diferentes de su hábitat natural. Sin embargo, son escasos los trabajos que se han propuesto caracterizar cuantitativamente el efecto de estos factores sobre la tasa de desarrollo de los individuos dentro del ciclo anual, con miras a la puesta en cultivo de alguna de estas especies para la producción de granos.

La originalidad de este trabajo residió, precisamente, en intentar integrar parte de los conceptos surgidos de los modelos ecológicos-demográficos de poblaciones naturales de especies bienales facultativas con el abordaje ecofisiológico empleado para explicar el control del desarrollo de los cultivos tradicionales. De esta manera, se

procuró avanzar en el conocimiento del control de la floración de *Oenothera biennis*, no sólo en términos de la determinación de su comportamiento reproductivo (anual ó bienal), sino además en la regulación de su fenología en respuesta a algunos factores del ambiente.

En este contexto, la realización de esta tesis resultó en dos importantes contribuciones para el entendimiento del control de la floración de las especies bienales facultativas, y de *Oenothera biennis* en particular. En primer lugar, se generó información sobre las variables intervinientes en la regulación del momento de floración de los individuos de comportamiento anual. Si bien *Oenothera biennis* se produce a escala extensiva en muchos países, hasta la fecha no existían antecedentes que hayan analizado, en forma integrada, el efecto de los principales factores del ambiente sobre el desarrollo fenológico de esta especie. En segundo lugar, se contribuyó a la identificación de posibles factores involucrados en la determinación del comportamiento bienal facultativo una característica que, pese al mejoramiento, sigue siendo una limitante para la producción en varios países del mundo (Deng *et al.* 2000; Ghasemnezhad 2007; Król 2007).

En relación con la primera contribución arriba mencionada, se encontraron efectos cuantitativos sobre la tasa de desarrollo a floración de los individuos de comportamiento anual, producto de los principales factores analizados: **vernalización** (Capítulo 3), **fotoperíodo** (Capítulo 5) y **fertilización** (Capítulos 4 y 5) y se ubicaron las ventanas temporales en que intervendrían algunos de estos factores. Adicionalmente, se realizó una caracterización preliminar del efecto de la temperatura sobre la tasa de desarrollo pre-floración (Anexo VI) que, si bien no había sido propuesta explícitamente en el planteo original de la tesis, contribuye a la interpretación de varios de los resultados obtenidos.

Un primer hallazgo relevante de esta tesis fue que la **vernalización** de *Oenothera biennis* no requiere del logro de un tamaño mínimo, como lo sugería la bibliografía (Gross 1981), o al menos que este requerimiento no se presenta en todos los genotipos de esta especie. Conforme a lo postulado en **H₁**, se encontró que plántulas vernalizadas en estadíos pre-cotiledonales (antes de la expansión de los cotiledones) responden cuantitativamente al tratamiento de frío adelantando la floración (Figuras 3.4 y 3.6). De esta manera, al menos para la respuesta a la vernalización, el genotipo estudiado de *Oenothera biennis* no presenta una fase inicial de insensibilidad como se había reportado en otros trabajos (Chouard 1960; Picard 1965 citado en Urbano Terrón 1992).

El **fotoperíodo** fue, de los factores estudiados, el tratamiento que cuantitativamente tuvo mayor efecto sobre la tasa de desarrollo a floración de los individuos anuales. La extensión artificial del fotoperíodo resultó en un adelanto del momento de floración, respecto al tratamiento testigo con fotoperíodo natural, de entre 15 y 30 días en promedio según las condiciones ambientales (Figuras 5.4 y 5.5). Aparentemente los días largos no sólo reducen la duración de la fase vegetativa (estimada en esta tesis como la fase previa a **ET1**) sino que además aceleran el desarrollo luego de la iniciación floral, por lo menos durante la fase reproductiva previa a floración (**ET1-FL1**).

El hecho de que la **disponibilidad de nutrientes minerales** también intervenga en la regulación del desarrollo fenológico a floración (aunque con un impacto menor que el del fotoperíodo) representa otro hallazgo relevante de esta tesis. Este hecho concuerda con lo predicho en **H₂** ya que, bajo las mismas condiciones experimentales, plantas con menor disponibilidad de nutrientes (ej. sin fertilización agregada, **N0**)

retrasan el inicio de floración (en promedio 5 días respecto al tratamiento **N120**; figuras 4.4, 5.4 y 5.5). A diferencia de la respuesta fotoperiódica, la aceleración de la tasa de desarrollo en respuesta a la fertilización se ha observado en la fase vegetativa (**Tr-ET1**), pero no en la fase reproductiva temprana (**ET1-FL1**, figura 4.4).

El efecto de la nutrición mineral sobre el momento de reproducción no parece estar asociado, en forma directa, al logro de un determinado tamaño umbral para la floración, como sugieren los antecedentes (Gross 1981; Reekie *et al.* 1997), pero sí a alguna otra variable asociada al crecimiento. En este sentido, la tasa de crecimiento durante la exposición a fotoperíodos inductivos mostró una mayor asociación con la tasa de desarrollo a **ET1** (figura 5.10) que el tamaño o la edad de las plantas (*i.e.* número de hojas; figura 5.7) y permitió explicar cuantitativamente parte de la variabilidad en el momento en que inician la reproducción plantas creciendo en ambientes térmicos y lumínicos similares (**Exp.FP2**). Conforme a lo predicho en **H₃**, cuanto mayor la tasa de crecimiento de los individuos más temprano ocurre el inicio de la reproducción (*i.e.* **ET1**) bajo un fotoperíodo determinado. Windauer *et al.* (2007) también encontraron que la tasa de crecimiento de las plantas regula el momento de floración en *Lesquerella mendocina*, otra especie bienal facultativa. Estos autores sugieren que el logro de una determinada tasa de crecimiento sería la señal primaria que desencadena la reproducción en esta especie, ya que su desarrollo fenológico hasta iniciación floral no responde a ninguno de los factores reguladores tradicionales (temperatura, fotoperíodo o vernalización). Distinto es el caso de *Oenothera biennis* donde el cambio de fase de vegetativo a reproductivo sí está regulado por estos factores por lo que la tasa de crecimiento podría influir sobre el desarrollo, ya sea directamente como una señal (como en *Lesquerella*), o bien indirectamente proveyendo las condiciones necesarias para que se exprese la reproducción en respuesta a otras señales inductoras de la floración (Erwin 2007). Experimentos futuros permitirán esclarecer los mecanismos funcionales implicados en la relación entre la tasa de crecimiento y la tasa de desarrollo a **ET1** de *Oenothera biennis*.

En cuanto a la segunda contribución de esta tesis, los tres factores propuestos como posibles determinantes del comportamiento reproductivo de esta especie (**vernalización, fotoperíodo y disponibilidad de nutrientes**), además de los citados efectos cuantitativos sobre la tasa de desarrollo de los individuos de comportamiento anual, han contribuido a reducir la incidencia de individuos de comportamiento bienal. Si bien los resultados de **Exp.Vn2** (Capítulo 3) sugieren que la **vernalización** no sería un requerimiento obligado para la floración de *Oenothera biennis*, al menos en alguna fracción de la población, la aplicación del tratamiento de frío en semillas pre-germinadas redujo la proporción de individuos bienales de 16% a 6% en **Exp.Vn1** (figura 3.3) y de 66% a 44% en **Exp.Vn2** (figura 3.5). Por su parte, tanto la **extensión fotoperiódica** como la **fertilización NPK** redujeron la incidencia de comportamiento bienal del 25% al 5% de los individuos de **Exp.FP1** y la acción combinada de estos factores tuvo un efecto sinérgico que logró un 100% de individuos anuales (figura 5.3).

Independientemente de la magnitud del efecto que hayan tenido los factores estudiados sobre el comportamiento reproductivo de *Oenothera biennis*, el análisis de los tratamientos testigo (*i.e.* sin aplicación de tratamientos de Vn, FP o fertilización) de los diferentes experimentos de esta tesis parece indicar que la incidencia de comportamiento bienal aumentaría con el retraso de la fecha de siembra, o más concretamente, de trasplante a campo (figura 6.1). Aumentos en la proporción de individuos de comportamiento bienal por retrasos en la fecha de siembra también han

sido reportados en trabajos previos con ésta (Król 2007) y otras bienales facultativas (Prins *et al.* 1990). Para avanzar en el análisis de cómo la fecha de siembra modula el comportamiento reproductivo de *Oenothera biennis* en esta discusión fueron incluidos, además de los experimentos analizados previamente, algunos experimentos complementarios de reciente realización que se han presentado como anexos.

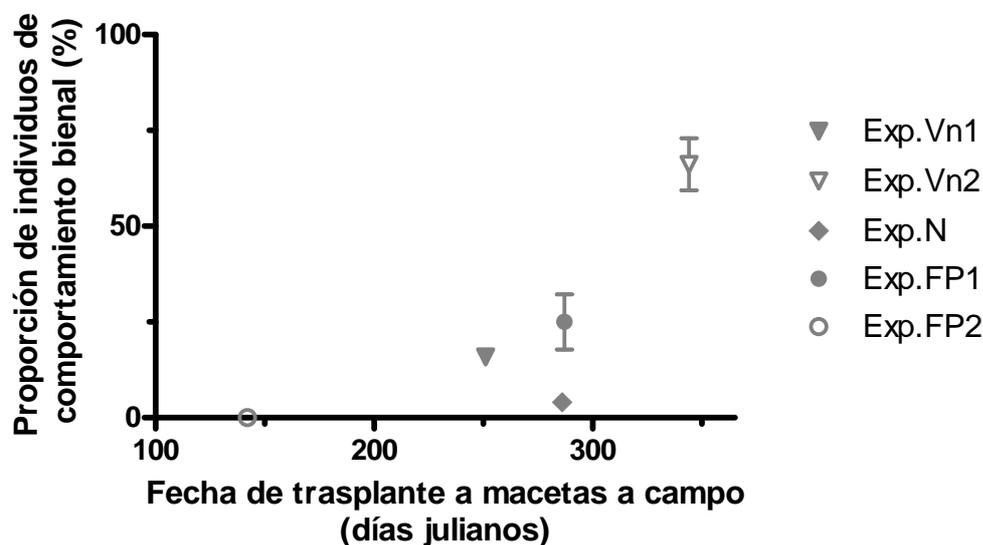


Figura 6.1: Proporción de individuos de *Oenothera biennis* de comportamiento bienal, en función de la fecha de trasplante de los diferentes experimentos de esta tesis. Para este análisis sólo se consideraron los tratamientos “testigo” de los experimentos correspondientes a los objetivos específicos de este trabajo: **Exp.Vn1**, **Exp.Vn2** (Objetivo 1), **Exp.N** (Objetivo 2), **Exp.FP1** y **Exp.FP2** (Objetivo 3).

El comportamiento bienal de otras especies en siembras tardías se ha atribuido frecuentemente a la insatisfacción del requerimiento de vernalización y/o un mayor potencial de devernalización por parte del ambiente (de Jong *et al.* 1987; Klinkhamer *et al.* 1987a; Wesselingh y de Jong 1995; Bender *et al.* 2002a). Si la vernalización fuera una condición necesaria para la floración, los individuos que no hubieran cubierto sus requerimientos de frío serían incapaces de florecer independientemente de las condiciones posteriores al período invernal (o al tratamiento artificial de frío; Bender *et al.* 2002a). Sin embargo, el **Exp.Vn2** (Capítulo 3) revela que la vernalización no es un requerimiento obligado para la floración de *Oenothera biennis*. Este hecho representa otro hallazgo importante de esta tesis que pudo ser comprobado mediante la realización de un experimento anexo sembrado en época estival (Anexo IV). En este experimento, casi todos los individuos sometidos a extensión fotoperiódica iniciaron la reproducción (**ET1**) sin exponerse a vernalización alguna (Figura IV.1). Dado que la vernalización no es condición *sine qua non* para la floración (Capítulo 3 y Anexo IV), otros factores ambientales y/o endógenos serían los determinantes del comportamiento bienal en fechas de siembra tardías.

La incapacidad de responder a fotoperíodos inductivos por no haberse alcanzado un hipotético tamaño o tasa umbral de crecimiento, tampoco parece ser la causa de la bianualidad en fechas de siembra tardías. Por un lado, se registraron individuos anuales que iniciaron su reproducción con tamaños relativamente pequeños (ej. $AR_{ET1} \approx 40\text{cm}^2$ en algunos individuos de **Exp.FP2**; datos no presentados), lo que indicaría que, de haber un tamaño mínimo para la reproducción, este sería fácilmente alcanzable en las

condiciones en que se desarrollaron los experimentos. Por otro lado, en diferentes experimentos se registraron individuos bienales de alta tasa de crecimiento (Figuras IV.2 y V.1, Anexos IV y V) y/o gran tamaño (Figura III.1, Anexo III), aún en tratamientos con suplementación lumínica. De esta manera, el logro de un tamaño ó tasa de crecimiento determinados durante la ocurrencia de fotoperíodos inductivos tampoco sería condición suficiente para asegurar la floración y el comportamiento anual de los individuos.

A partir de lo anteriormente expuesto surge como posibilidad que el comportamiento bienal de *Oenothera biennis* no sea producto de la insatisfacción de requerimientos supuestamente obligados de vernalización, fotoperíodo o tamaño para la reproducción, sino quizás, el resultado de la incidencia de algún otro factor, mayormente asociado a fechas de siembra tardías, que tenga efectos inhibitorios sobre la reproducción. Las altas temperaturas durante el período en que ocurriría la iniciación floral podrían ser ese factor (Lang 1952; Vince-Prue 1975; Erwin 2007). Se ha observado que *Lesquerella mendocina*, otra herbácea bienal facultativa, presenta una respuesta cualitativa a la temperatura supra-óptima, en la que la reproducción no ocurre con temperaturas mayores a 20°C (Windauer *et al.* 2004). La exposición a altas temperaturas ($T \geq 25-28^{\circ}\text{C}$) también inhibe la elongación del tallo y la floración en la planta de día largo *Eustoma grandiflorum* (Harbaugh *et al.* 1992) lo que explicaría su comportamiento bienal cuando la germinación ocurre en verano (Harbaugh 2007).

Algunos análisis preliminares aportan elementos en favor de la hipótesis de que las altas temperaturas pueden inhibir la reproducción de *Oenothera biennis* (Anexos V y VI). Aparentemente, la ocurrencia de temperaturas medias diarias mayores a 25°C y/o temperaturas máximas mayores a 30 °C alrededor de la determinación de **ET1**, aumentarían la incidencia de individuos de comportamiento bienal, aún en condiciones fotoperiódicas inductivas y con altas tasas de crecimiento (Anexo V). Cuanto mayor la exposición a temperaturas elevadas, mayor sería la cantidad de individuos que retrasan su reproducción para el año siguiente (Figura VI.3b; Anexo VI). Estos valores de temperatura se encontrarían por encima de la temperatura óptima para la fase vegetativa de esta especie y estarían próximos a la temperatura máxima fisiológica a la cual la tasa de desarrollo se hace nula (Figura VI.1; Anexo VI). Si bien se requieren experimentos futuros en condiciones controladas para corroborar esta hipótesis, la confirmación de la misma constituiría un hallazgo clave para entender el comportamiento bienal facultativo de *Oenothera biennis*, fundamentalmente, en fechas de siembra tardías.

A la luz de los resultados presentados, surge la necesidad de desarrollar un modelo conceptual alternativo para explicar el comportamiento bienal facultativo de *Oenothera biennis*. A continuación se contrastan dos posibles modelos para interpretar el comportamiento reproductivo de esta especie: a) el modelo anterior a esta tesis, confeccionado a partir de la recopilación de los antecedentes de la bibliografía y b) un modelo surgido de esta tesis, producto de las nuevas evidencias encontradas. La representación gráfica de éstos se muestra en la figura 6.2.

Antes de la realización de este trabajo, los principales factores propuestos como determinantes de la anualidad/bianualidad de esta especie eran un requerimiento obligado de vernalización (**V_{nobl}**; Chouard 1960) y un umbral de biomasa (**ARu**) que las plantas tendrían que superar para responder a la misma (Gross, 1981). Los días largos (**DL**) también se consideraban un requerimiento obligado para la floración, pero fácilmente alcanzable una vez satisfecho el requerimiento de vernalización (Picard, 1965). La probabilidad de florecer en la primera estación de crecimiento según este modelo dependería, entonces, de la época de emergencia de las plántulas, de la

intensidad y duración del período invernal y de la disponibilidad de recursos del sitio (**N**) que, a través de la tasa de crecimiento de las plantas previa al invierno (**TC**), determinarían el logro o no del tamaño umbral para la vernalización (Figura 6.2a). Sólo las plantas que superaban **ARu** podían vernalizarse en invierno e iniciar la reproducción (**ET1**) en respuesta a los días largos (**DL**) de primavera-verano.

El modelo conceptual alternativo que se propone en esta tesis involucra, en términos generales, las mismas variables que el anterior pero incluye un nuevo factor potencialmente inhibitorio: las altas temperaturas antes de **ET1** ($\uparrow T^{\circ}$, Figura 6.2b). A diferencia del modelo inicial, la vernalización (**Vn_{fac}**) promueve el desarrollo a **ET1** pero no constituye un requerimiento obligado para la floración. A su vez, la percepción ó respuesta de las plantas al frío no depende del logro de un determinado umbral de biomasa (**ARu**). La capacidad de responder a fotoperíodos largos (**DL**) tampoco requeriría del logro de un **ARu** dado (o si así fuera, sería un **ARu** muy bajo), aunque la respuesta a **FP** sí estaría condicionada por el tamaño (**AR**, área de roseta) alcanzado por las plantas al momento de la fotoinducción. Esto es así ya que la tasa de crecimiento (**TC**), que depende de **AR** y de la disponibilidad de recursos (entre ellos **N**), sería un indicador de cuán propicias son las condiciones, endógenas y exógenas, para que inicie la reproducción (**ET1**) en respuesta a **FP** inductivos. Cuanto mayor es **TC** durante la exposición a **DL**, más rápido ocurre **ET1**. El fotoperíodo además acelera el desarrollo después de **ET1**, adelantando el inicio de floración (**FL1**). Como en la mayoría de los cultivos, la temperatura regularía la duración de todas las etapas fenológicas previas a la floración, aumentando la tasa de desarrollo con incrementos de la temperatura en el rango subóptimo y reduciéndola dentro del rango supraóptimo.

En este nuevo modelo, **Vn** y **TC** tienen un efecto cuantitativo sobre el desarrollo de *Oenothera biennis* mientras que **FP** tendría un efecto cualitativo (hay antecedentes en la bibliografía y evidencias no presentadas en esta tesis que sostienen esta suposición aunque harían falta experimentos en condiciones más controladas para demostrarla). Sin embargo, la definición del comportamiento reproductivo, anual o bienal, dependería fundamentalmente de la probabilidad de ocurrencia de un período de temperaturas elevadas cerca de **ET1** (y/o posiblemente de la iniciación floral). En la medida en que los factores promotores de la floración (**Vn**, **TC** y **FP**) aceleren el desarrollo y ubiquen este estadio antes de la exposición a las altas temperaturas de verano, las plantas iniciarán su reproducción y florecerán en esa misma estación de crecimiento. Si, por el contrario, las plantas son expuestas a un período de temperaturas elevadas alrededor de **ET1** (*i.e.* cuando las primeras plantas de la población están iniciando la reproducción), muchos individuos no elongarán la vara floral ni florecerán hasta la estación de crecimiento siguiente. La coincidencia estacional en la ocurrencia de altas temperaturas inhibitorias y fotoperíodos largos promotores de la floración explicaría porqué en fechas de siembra tardías, con buenas condiciones para el crecimiento de las plantas y fotoperíodos inductivos, se registra la mayor proporción de individuos bianuales.

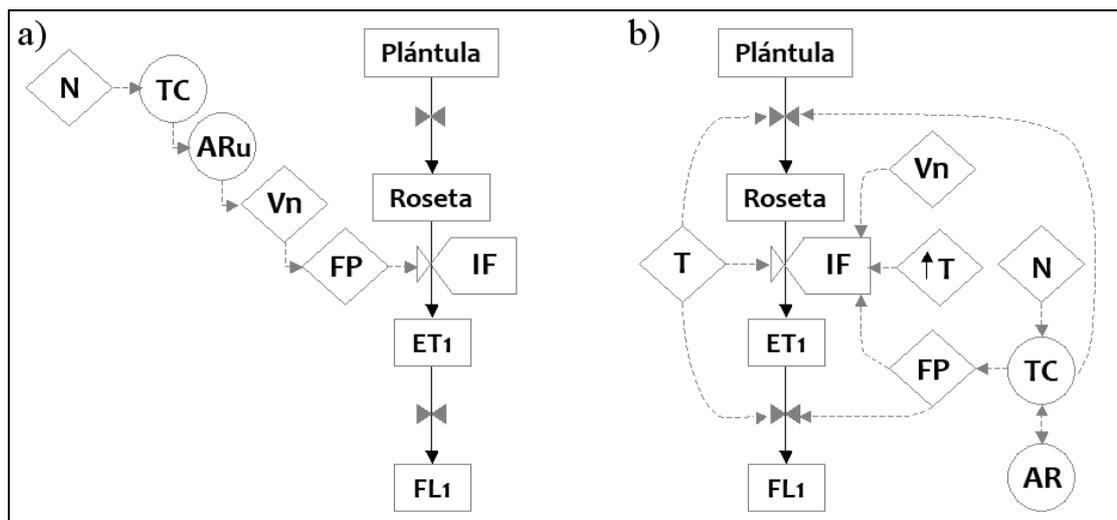


Figura 6.2: Modelos conceptuales para explicar el control del desarrollo a floración de *Oenothera biennis*. **a)** Modelo sugerido a partir de la recopilación de antecedentes; **b)** Modelo alternativo propuesto en esta tesis. Para su diagramación se empleó la simbología propuesta por Forrester (Haefner 2005): Las cajas rectangulares representan 4 estadios fenológicos de los individuos de una población de *Oenothera biennis*: plántula, roseta, inicio de reproducción (ET1) e inicio de floración (FL1); las flechas enteras indican el flujo de individuos que pasa de un estadio a otro, cuya regulación está representada por una válvula (►◄). La válvula mayor, labelada “IF” (i.e. iniciación floral), regula la proporción de individuos que pasan del estado vegetativo (“roseta”) al reproductivo (“ET1”). Los rombos representan los factores del ambiente implicados en la regulación del desarrollo en cada modelo (N: disponibilidad de nutrientes, Vn: vernalización, FP: fotoperíodo, T: temperatura, ↑T: temperatura elevada) y los círculos, variables auxiliares que varían con el tiempo y/o por efecto de algún factor del ambiente (TC: tasa de crecimiento, AR: área de roseta). Tanto los factores del ambiente como las variables auxiliares influyen sobre la tasa con la que los individuos pasan de un estadio a otro mediante flujos de información (flechas punteadas).

En el modelo **a)** la proporción de individuos que alcanzan la reproducción (FL1) depende de la satisfacción de una serie de requerimientos obligados que se suceden secuencialmente: En primer lugar, las plantas deben alcanzar un área de roseta umbral (ARu) para poder responder a Vn. El logro de ARu antes del invierno depende, a su vez, de TC, que es regulada por N. Vn, por su parte, es un requerimiento obligado para que se produzca la IF, que ocurre únicamente en respuesta a FP largos.

En el modelo **b)** los factores que determinan la proporción de plantas que llegan a FL1 en la primera estación de crecimiento son: Vn, FP, N, T y ↑T. A diferencia de en **a)**, estos factores no actúan en tándem, ya que la acción de uno no depende de la satisfacción de los otros: Vn no depende de ARu, por lo que la vernalización es posible desde Plántula. La respuesta a FP largos no requiere de la satisfacción de Vn, pero varía cuantitativamente con TC, de modo tal que cuanto mayor es TC, mayor es la tasa de desarrollo a ET1 en respuesta a FP inductivos. FP largos, además, aceleran la tasa de desarrollo después de IF, acortando la duración de la fase ET1-FL1. N interviene indirectamente sobre la tasa de desarrollo a través de TC, la cual también depende del AR alcanzado. T regula el desarrollo a través de dos vías diferentes: i) acortando la duración de las etapas fenológicas con el aumento de T en el rango subóptimo (respuesta universal) y ii) inhibiendo la reproducción de una fracción de la población cuando las condiciones fotoinductivas coinciden con un período de alta temperatura (↑T).

Sobre la base de lo anterior, la interpretación integrada de los resultados obtenidos en esta tesis provee elementos clave, desde el punto de vista de la factibilidad agrícola, para llevar a cabo el cultivo anual de esta especie. En primer lugar, se pudo establecer que algunos de los requerimientos que se consideraban obligados para la floración, como la vernalización o la necesidad de alcanzar un tamaño umbral para responder al frío, no lo son. Existe la posibilidad de que el requerimiento de días largos tampoco sea cualitativo pero para lograr una caracterización precisa de la respuesta fotoperiódica son necesarios nuevos experimentos en condiciones controladas. La demostración de que *Oenothera biennis* no requiere vernalización ni un tamaño demasiado grande para iniciar la reproducción simplifica la realización de futuros experimentos en cámaras climáticas orientados a este fin.

En segundo lugar, se detectaron efectos cuantitativos sobre la tasa de desarrollo a floración, producto no sólo de las principales señales reguladoras del desarrollo, *i.e.* vernalización y fotoperíodo, sino también de un factor asociado al crecimiento: la nutrición mineral. Si bien este último no es considerado un factor regulador del desarrollo en los modelos fenológicos convencionales de los cultivos anuales, sí se le ha atribuido un rol importante en el control de la floración en las referencias de la bibliografía de especies bienales facultativas. La nutrición mineral (y probablemente la disponibilidad de recursos en general) no constituiría una señal inductora de la floración *per se*, sino un factor que favorecería la expresión de la respuesta plantas a la señal fotoperiódica.

En tercer lugar, se postuló a la alta temperatura como uno de los factores determinantes del comportamiento bienal. Pese a la mayor incidencia de individuos bienales en fechas de siembra tardía, este factor no había sido considerado anteriormente para explicar el comportamiento bienal facultativo de *Oenothera biennis*. La corroboración del efecto inhibitorio de la reproducción por altas temperaturas tendría importantes implicancias para el manejo del cultivo. Así, para minimizar la incidencia de individuos bienales debería evitarse la realización de siembras tardías. Ante retrasos inevitables en la fecha de siembra, deberían considerarse aquellas herramientas que aceleren cuantitativamente la tasa de desarrollo a **ET1** a fin de evadir la exposición a altas temperaturas, entre ellas, la fertilización (ó potencialmente cualquier otra práctica que acelere la tasa de crecimiento de los individuos) y la vernalización artificial de plántulas.

La realización de esta tesis constituyó un primer paso para la caracterización de los posibles factores reguladores del desarrollo de *Oenothera biennis* desde un abordaje ecofisiológico. Si bien las condiciones semi-controladas en que fueron realizados los ensayos de este trabajo no permitieron lograr una caracterización “pura” (*i.e.* sin interacciones) del efecto de cada uno de los factores involucrados en el control de la floración de esta especie, los resultados obtenidos permitieron: i) avanzar hacia el logro de un modelo integrado del control del desarrollo de esta especie, tanto en lo que hace a su comportamiento bienal facultativo, como la determinación del momento de floración de los individuos de comportamiento anual y ii) proveer nuevas hipótesis (ej. acerca del efecto de las altas temperaturas) a evaluar en futuros experimentos bajo condiciones controladas.

Por todo lo expuesto, es fundamental que las líneas de investigación a seguir contemplen la realización de experimentos en cámaras climáticas para lograr una caracterización más precisa del efecto de los factores reguladores del desarrollo estudiados en esta tesis. Concretamente, los próximos experimentos a realizar deberían estar dirigidos a:

- i) Caracterizar la respuesta a la temperatura de *Oenothera biennis* a fin de determinar las temperaturas cardinales de la especie y responder a la hipótesis de que la exposición a altas temperaturas puede tener un efecto inhibitorio sobre el inicio de la reproducción. Partiendo de la información reunida en el Anexo VI, los experimentos deberían emplear cámaras con condiciones fotoperiódicas inductivas (15hs.luz/día ó más) y temperaturas en un rango térmico entre 5 y 35°C.
- ii) Caracterizar el efecto del fotoperíodo hasta **ET1** para determinar el tipo (cuantitativo ó cualitativo) y los parámetros de la respuesta. Deberían emplearse cámaras a temperatura constante (preferentemente 20-22°C) con diferente duración del día (rango de 10 a 18 hrs.luz/día, en lo posible). La posibilidad de vernalizar semillas (Capítulo 3 de la tesis) permitirá, además, analizar posibles interacciones entre la vernalización y el fotoperíodo.
- iii) Validar el modelo conceptual propuesto en la figura 6.2 con diferentes genotipos y ambientes. Posiblemente exista amplia variabilidad intraespecífica entre genotipos de distinta procedencia, no sólo en términos de la respuesta a las principales señales desencadenantes de la floración, vernalización y fotoperíodo, sino además en la sensibilidad a posibles factores inhibitorios de la reproducción como las altas temperaturas. Por lo tanto, la determinación del comportamiento bienal de diferentes genotipos podría estar ligada a factores distintos. La confirmación del modelo presentado en esta tesis en otros genotipos, o bien su refutación e identificación de controles del comportamiento reproductivo de mayor peso relativo en otros cultivares permitirán establecer bases funcionales para reducir la bianualidad, no sólo a partir del manejo del cultivo, sino también del mejoramiento genético.

ANEXOS

ANEXO I : Requerimientos para la floración de algunas especies bienales facultativas.

	Req vernalización	Vern semilla	Req Fotoperiodo	Tamaño umbral	Referencias
<i>Apium graveolens</i>	Obligado	NO			Engelen-Eigles & Erwin, 1997
<i>Arabis laevigata</i>	Obligado	NO	Neutro	Pre-Vn	Bloom, 2003
<i>Brassica oleracea var gemmifera</i>	Obligado	NO	Neutro		Stokes, 1951 citado en Urbano Terrón, 1992
<i>Beta vulgaris</i>	Obligado/Facultativo/Nulo	SI	DL, Obligado		Chouard, 1960 / Crosthwaite & Jenkins, 1993 / Van Dijk, 1997
<i>Campanula medium</i>	Facultativo (DC)	NO	DL, Obligado		Chouard, 1960
<i>Carduus nutans</i>	Obligado		DL, Obligado	Pre-Vn	Medd & Lovett, 1978 (citado en Klinkhamer <i>et al.</i> , 1991)
<i>Carlina vulgaris</i>	Facultativo		DL	Pre-Vn y Post-Vn	Klinkhamer 1991
<i>Cichorium intybus</i>	Facultativo	NO	DL, Obligado	Pre-FP	Gianquinto, 1997
		SI			Dielen <i>et al.</i> , 2005
<i>Cirsium vulgare</i>	Obligado	NO		Pre-FP	Klinkhamer 1987 / Klinkhamer & De Jong, 1993
<i>Cynoglossum officinale</i>	Obligado*			Pre-Vn	De Jong <i>et al.</i> , 1986 / Wesselingh & De Jong, 1995 / De Jong 1998
<i>Daucus carota</i>	Obligado	NO		Pre-Vn	Gross, 1981
<i>Digitalis purpurea</i>	Obligado				Sletvold 2006
<i>Dipsacus fullonum</i>	Obligado			Pre-Vn	Werner, 1975
<i>Dipsacus sylvestris</i>	Obligado	NO		Pre-Vn	Werner & Caswell, 1977
<i>Grindelia lanceolata</i>	Obligado	NO	Neutro	Pre-Vn	Baskin & Baskin 1979
<i>Hyoscyamus niger</i>	Obligado	NO	DL, Obligado		Chouard, 1960
<i>Lobelia inflata</i>	No	-	DL, Obligado	Variable según época del año	Simons & Johnston, 2003
<i>Lunaria biennis</i>	Obligado				Engelen-Eigles & Erwin, 1997
<i>Oenothera biennis</i>	Obligado	NO	DL, Obligado	Pre-Vn	Chouard, 1960/Gross, 1981
	Facultativo	SI	DL, Obligado		Vince-Prue, 1975
<i>Oenothera fruticosa</i>	Obligado		DL, Cuantitativo		Clough, <i>et al.</i> , 2001
<i>Oenothera lamarckiana/glazioviana/erythrosepala</i>	Obligado/facultativo		DL, Obligado	Pre-FP	Chouard, 1960 / Kachi & Hirose 1983
<i>Oenothera longiflora</i>	Facultativo		DL, Obligado		Chouard, 1960
<i>Oenothera parviflora</i>	Obligado		DL, Obligado		Chouard, 1960
<i>Oenothera suaveolens</i>	Facultativo		DL, Obligado		Chouard, 1960
<i>Oenothera stricta</i>	Facultativo		DL, Obligado		Chouard, 1960
<i>Pastinaca sativa</i>	Obligado	NO	DL, cuantitativo	Pre-Vn	Baskin & Baskin 1979
<i>Polymnia canadensis</i>	Obligado		Neutro	Post-Vn	Bender <i>et al.</i> , 2002
<i>Raphanus sativus</i>	Obligado	SI			Engelen-Eigles & Erwin, 1997
<i>Scabiosa columbaria</i>				Pre-Vn	Verkaar & Schennekeveld, 1984
<i>Senecio jacobaea</i>	Obligado			Pre-Vn y Pre-FP	Lacey, 1988 / Prins, <i>et al.</i> , 1990 / Wesselingh 1996
<i>Tragopogon dubius</i>	Obligado			Pre-Vn	Gross, 1981
<i>Verbascum thapsus</i>	Obligado			Pre-Vn	Gross, 1981

Tabla I.1: Requerimientos para la floración de algunas especies bienales facultativas. *DL*: requerimiento de fotoperíodo largo; *Pre-Vn*: tamaño umbral para la respuesta a la vernalización; *Post-Vn*: tamaño umbral para condiciones ambientales posteriores al invierno, *Pre-FP*: tamaño umbral para la respuesta fotoperiódica. Las celdas vacías indican que no se consigna información en la bibliografía respecto al requerimiento de la especie en cuestión. * *La vernalización es requerida para la elongación del tallo de esta especie, no para la iniciación floral.*

ANEXO II

Estimación de biomasa a partir de variables biométricas no-destructivas

El tamaño de las plantas varía significativamente entre individuos de una población y puede variar, independientemente de su edad cronológica, debido a diferencias en la tasa de crecimiento (Qi *et al.* 1996). En muchas especies bienales, entre ellas *Oenothera biennis*, el momento de reproducción está determinado por el tamaño de los individuos más que por su edad cronológica (ver referencias en Kachi y Hirose 1985). Por lo tanto, el tamaño de las plantas durante la fase vegetativa puede ser un buen indicador de su comportamiento reproductivo futuro (de Jong *et al.* 1998). Para asociar el tamaño de las plantas en un momento dado, con su probabilidad de florecer ese mismo año, es necesario contar con estimadores biométricos no destructivos (Qi *et al.* 1996). Entre los indicadores más frecuentes en la literatura para estimar la biomasa de plantas bienales se encuentran: el área de roseta (**AR**), el diámetro de roseta (**DR**), el diámetro de corona (**DC**), el número de hojas expandidas (**NH**) y la longitud de la hoja más larga (**LH**) (Tabla II.1).

Gross (1981) encontró que **DR** es un adecuado estimador del peso seco total ($r=0.946$, $p<0,001$, $n=30$) de plantas vegetativas de *Oenothera biennis*, aunque no especifica cómo midió este parámetro. Otros autores, calcularon **DR** como la media geométrica del ancho máximo y mínimo de las rosetas de la especie emparentada *Oenothera erythrosepala* (Kachi y Hirose 1983). Sin embargo, como esta determinación es ocasionalmente dificultosa debido a la disposición helicoidal de las hojas de *Oenothera biennis*, en esta tesis se optó por la utilización de un estimador biométrico alternativo.

Especie	Estimador de biomasa	Referencia
<i>Arabis laevigata</i>	DR, NH, DC	Bloom <i>et al.</i> 2002
<i>Carlina vulgaris</i>	LH DR * NH	Rose <i>et al.</i> 2002 Klinkhamer <i>et al.</i> , 1991
<i>Cirsium vulgare</i>	LH	Klinkhamer <i>et al.</i> , 1987a
<i>Cynoglossum officinale</i>	DR, LH, NH, DC	de Jong <i>et al.</i> 1986 ; de Jong <i>et al.</i> 1998
<i>Daucus carota</i>	DC	Gross 1981 Lacey 1986
<i>Digitalis purpurea</i>	LH	Sletvold y Grindeland 2007
<i>Dipsacus fullonum</i>	DR	Werner 1975
<i>Oenothera biennis</i>	DR	Gross 1981
<i>O. glazioviana/erythrosepala</i>	DR	Kachi y Hirose 1983
<i>Onopordum illyricum</i>	AR	Rees <i>et al.</i> 1999
<i>Pastinaca sativa</i>	DC	Baskin y Baskin 1979
<i>Scabiosa columbaria</i>	LH	Verkaar y Schennkeveld 1984
<i>Senecio jacobaea</i>	DR	Van der Meijden y Van der Waals-Kooi 1979
<i>Tragopogon dubius</i>	DC	Gross 1981
<i>Verbascum thapsus</i>	DR	Gross 1981; Reinartz 1984

Tabla II.1: Estimadores de biomasa utilizados en diferentes especies bienales facultativas. DR: diámetro de roseta, NH: número de hojas, DC: diámetro de corona, LH: longitud de hoja más larga, AR: área de roseta.

Se analizaron **AR**, **NH**, **HL** y **DC** como posibles indicadores biométricos de la biomasa aérea (**PS parte aérea**) y/o total de *Oenothera biennis* (**PS total** = **PS raíz** + **PS parte aérea**), secada en estufa a 70°C por 48 horas. **AR** (cm²) representa la superficie de suelo cubierta por la parte aérea de la planta; **NH**, la cantidad acumulada de hojas aparecidas de longitud mayor a 1cm; **HL**, la longitud (cm) de la hoja más larga y **DC** el diámetro del cuello de la planta (cm) justo debajo del punto de inserción de las hojas (Bloom *et al.* 2002, figura II.1a). Para la determinación de **AR** se tomó una fotografía digital a cada roseta, junto a una referencia de longitud conocida, y luego se midió el área de cobertura de la planta mediante un software de análisis y procesamiento de imágenes (Image Tool 3.00, UTHCSA, 2002). La relación entre cada indicador y **PS total** (figura II.1) ó **PS parte aérea** (figura II.2) se ajustó a una función no-lineal (modelo sigmoidal de Boltzmann).

En términos generales, **AR** y **DC** resultaron estimadores más precisos de la biomasa que **NH** y **HL** (figura II.1 y II.2). Sin embargo, **AR** se consideró como la mejor opción ya que su determinación implica un menor riesgo de daño de las rosetas medidas y es más preciso que **DC** para estimar la biomasa en estadíos tempranos.

El modelo para la estimación de biomasa de *Oenothera biennis* a partir de **AR** se puso a prueba con un set de plantas independientes (n=101) que incluyó plantas transplantadas a macetas y plantas que crecieron espontáneamente en el suelo del campo experimental. Debido a que sólo se cosechó la parte aérea de las plantas destinadas para la validación, ésta sólo pudo hacerse para **PS parte aérea** (figura II.3). La relación entre PS parte aérea medida y PS parte aérea estimada tuvo un ajuste significativo ($p < 0.0001$) con una pendiente apenas inferior a 1. Aunque esta relación estaría indicando una ligera sobreestimación del peso predicho en las plantas de menor tamaño y una subestimación del peso en las plantas de tamaño mayor, el área de roseta resultó ser, en términos generales, un adecuado estimador de la biomasa aérea de *Oenothera biennis*.

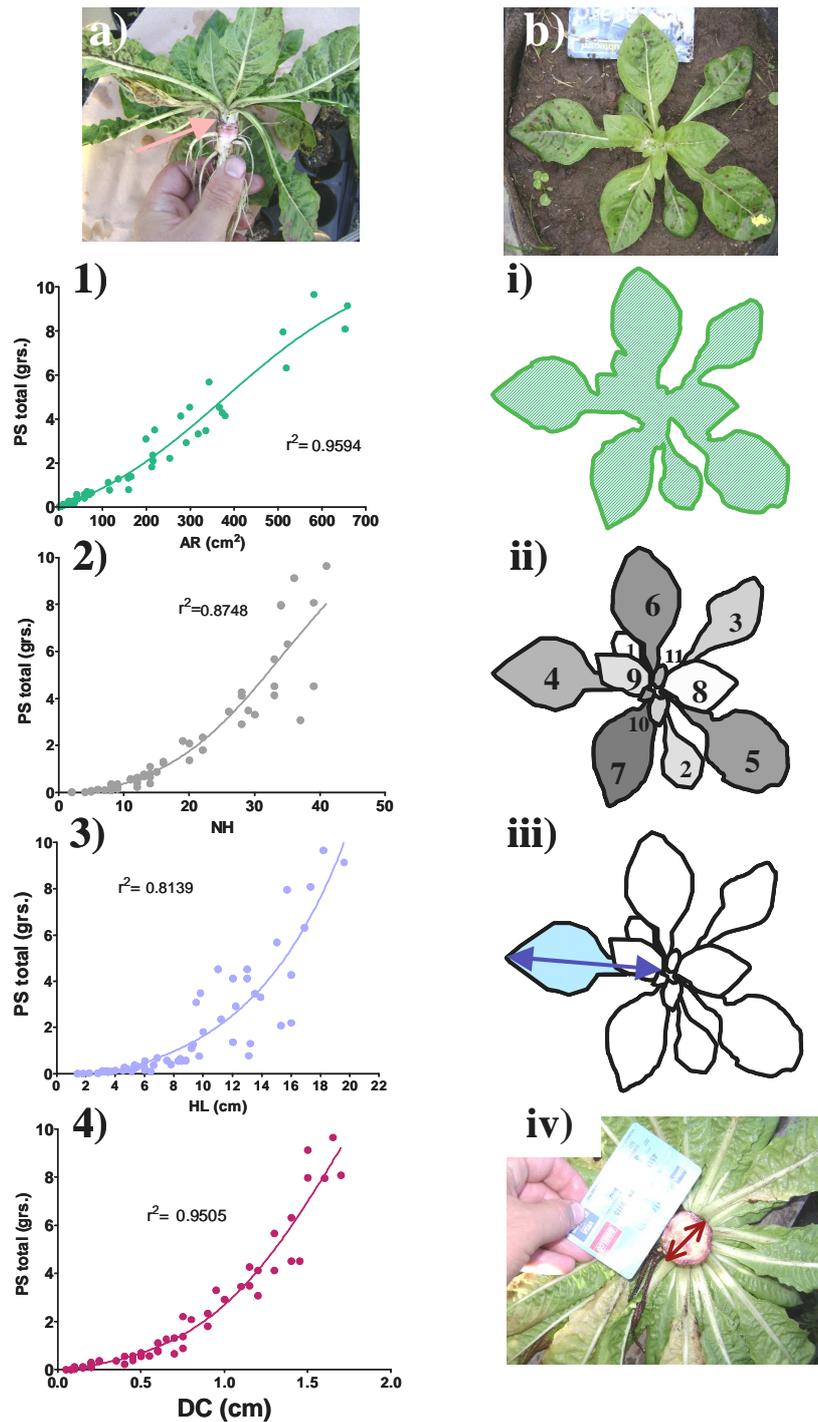


Figura II.1: Foto trasversal (a) y en planta (b) de una roseta de *Oenothera biennis*. Relación entre **PS total** (grs./pl) y diferentes estimadores biométricos. **1) AR:** área de roseta; **2) NH:** número de hojas; **3) HL:** longitud de hoja más larga; **4) DC:** diámetro de corona. Líneas enteras indican el ajuste de las observaciones al modelo sigmoideal de Boltzmann ($n=69$). Los números romanos (i a iv) indican el esquema correspondiente a cada parámetro. La flecha en a) indica la ubicación de la corona.

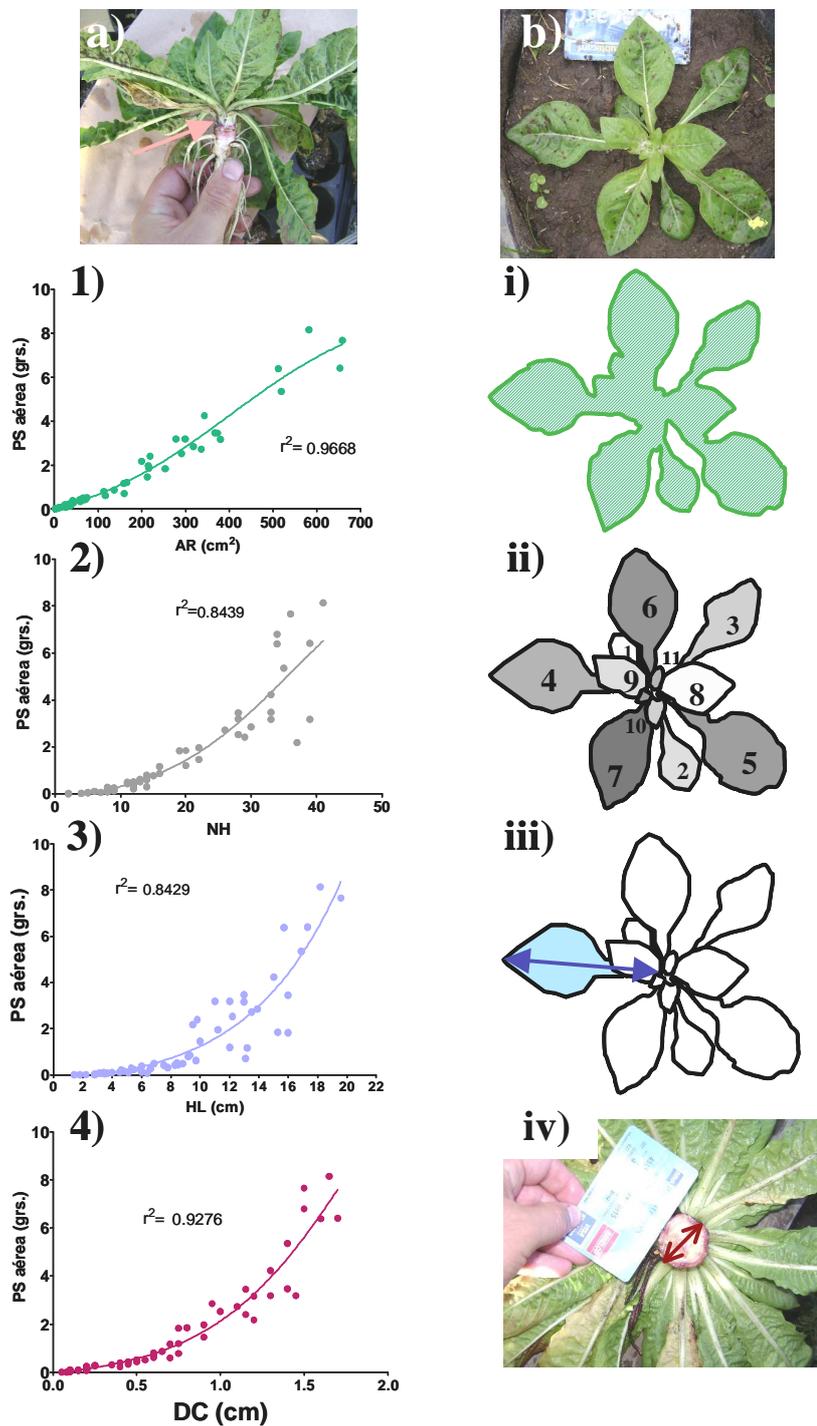


Figura II.2: Foto trasversal (a) y en planta (b) de una roseta de *Oenothera biennis*. Relación entre **PS parte aérea** (grs./pl) y diferentes estimadores biométricos. **1) AR:** área de roseta; **2) NH:** número de hojas; **3) HL:** longitud de hoja más larga; **4) DC:** diámetro de corona. Líneas enteras indican el ajuste de las observaciones al modelo sigmoideal de

Boltzmann (n=69). Los números romanos (i a iv) indican el esquema correspondiente a cada parámetro. La flecha en a) indica la ubicación de la corona.

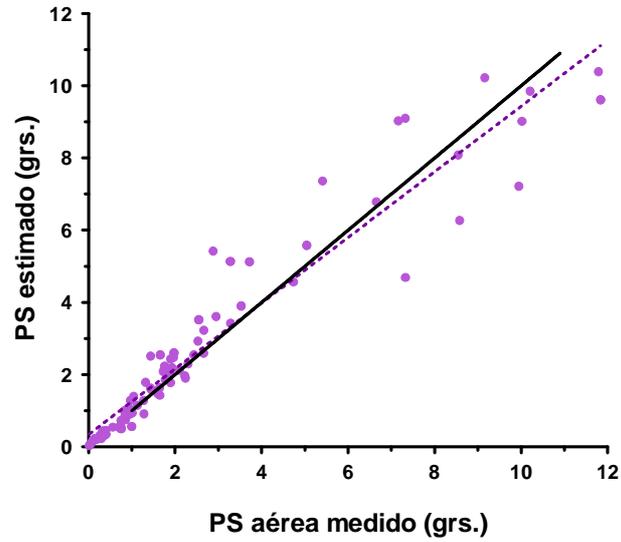


Figura II.3: Validación del modelo de estimación de biomasa aérea a partir del área de roseta (n=101), la línea negra entera marca la relación 1:1 entre PS aérea estimado y medido, la línea violeta punteada indica el mejor ajuste entre PS parte aérea estimado y PS parte aérea medido ($y = 0.9092x + 0.3394$; $r^2 = 0.92$)

ANEXO III: Fotos ilustrativas de plantas de *Oenothera biennis* de diferente comportamiento reproductivo



Figura III.1: Plantas de *Oenothera biennis* de diferente comportamiento reproductivo: bianual (izquierda) o anual (derecha). Foto tomada el 10 de mayo de 2009, a los 94 días del trasplante.



Figuras III.2 y III.3: Planta de comportamiento iteróparo, con floración a partir de la elongación de tallos florales laterales. Los tallos laterales madurarán y morirán en el primer año pero la planta permanecerá en estado de roseta hasta la elongación del tallo principal que ocurrirá en la estación de crecimiento siguiente. Foto tomada el 10 de mayo de 2009, a los 170 días del trasplante.

ANEXO IV

Experimento preliminar en condiciones ambientales no-vernalizantes

A principios de 2009, se realizó un experimento exploratorio con dos objetivos principales: i) establecer si *Oenothera biennis* puede florecer en ausencia absoluta de condiciones de vernalización, y ii) verificar si la disponibilidad de nutrientes no tiene efecto sobre la tasa de desarrollo de las plantas después de **ET1**. Para los fines de este Anexo sólo se presentará información concerniente al primer objetivo.

El experimento se inició con la siembra de semillas de *Oenothera biennis* en bandejas de germinación bajo invernáculo. Las plántulas establecidas (2 a 3 hojas verdaderas expandidas) fueron trasplantadas a macetas de 23 lts (tierra-arena 5:4) y se agruparon en microparcels de 20 macetas cada una (n =3). Las parcelas se sometieron a extensión fotoperiódica de 18 hs.luz/día, y a cada planta se le asignó, aleatoriamente, uno de dos tratamientos de fertilización alternativos:

- **N+** : Aplicación semanal de fertilizante foliar N-P-K (10-2-6) + micronutrientes, desde el trasplante hasta **ET1** (5-6 aplicaciones de 40ml solución/pl., dosis:25ml fertilizante/litro de agua).
- **N-** : Sin agregado de fertilizante.

El cronograma de las principales actividades efectuadas para la realización de este experimento se detalla en la tabla IV.1

	FP18 N+	FP18 N-
Siembra en bandejas (bajo invernáculo)	18-Ene	18-Ene
Trasplante a macetas a campo	5-Feb	5-Feb
Inicio tratamiento fotoperiódico	14-Feb	14-Feb
Inicio tratamiento fertilización	19-Feb	-

Tabla IV.1: Cronograma de las principales actividades desarrolladas para lograr los tratamientos **FP18N+** y **FP18N-**.

Todas las plantas de **N+** y casi todas las de **N-** (93.3%) tuvieron un comportamiento anual (figura IV.1a). No hubo diferencias entre tratamientos en cuanto al momento en que las plantas iniciaron la reproducción (**ET1**₍₅₀₎: 31 vs. 31.7 días desde el trasplante para **N+** y **N-**, respectivamente) o la floración (**FL1**₍₅₀₎: 63.3 vs.63.7 días desde el trasplante para **N+** y **N-**, respectivamente). Como tampoco se registraron diferencias en la tasa de crecimiento entre tratamientos, **N+** y **N-**, en lo sucesivo éstos se analizarán conjuntamente.

El rango térmico explorado permite establecer que la vernalización no es un requerimiento obligado para *Oenothera biennis*, dado que se registró casi un 100% de anualidad en ausencia de frío (incluso la temperatura mínima fue siempre superior al rango térmico de 0 a 10°C que generalmente se asume como efectivamente vernalizante; figura IV.1b).

El comportamiento bienal, que presentaron sólo dos individuos en el experimento, no sería atribuible a un efecto del tratamiento **N-**, al menos, no en términos de diferencias en crecimiento. Si bien la tasa de crecimiento durante la ocurrencia de condiciones inductivas de fotoperíodo (**TC** _{FP-ET1(1)}) se asoció

positivamente con la tasa de desarrollo hasta el inicio de la reproducción (TD_{FP-ET1}) de los individuos de comportamiento anual, los individuos bienales, a pesar de presentar elevadas tasas de crecimiento, no iniciaron la reproducción (figura IV.2).

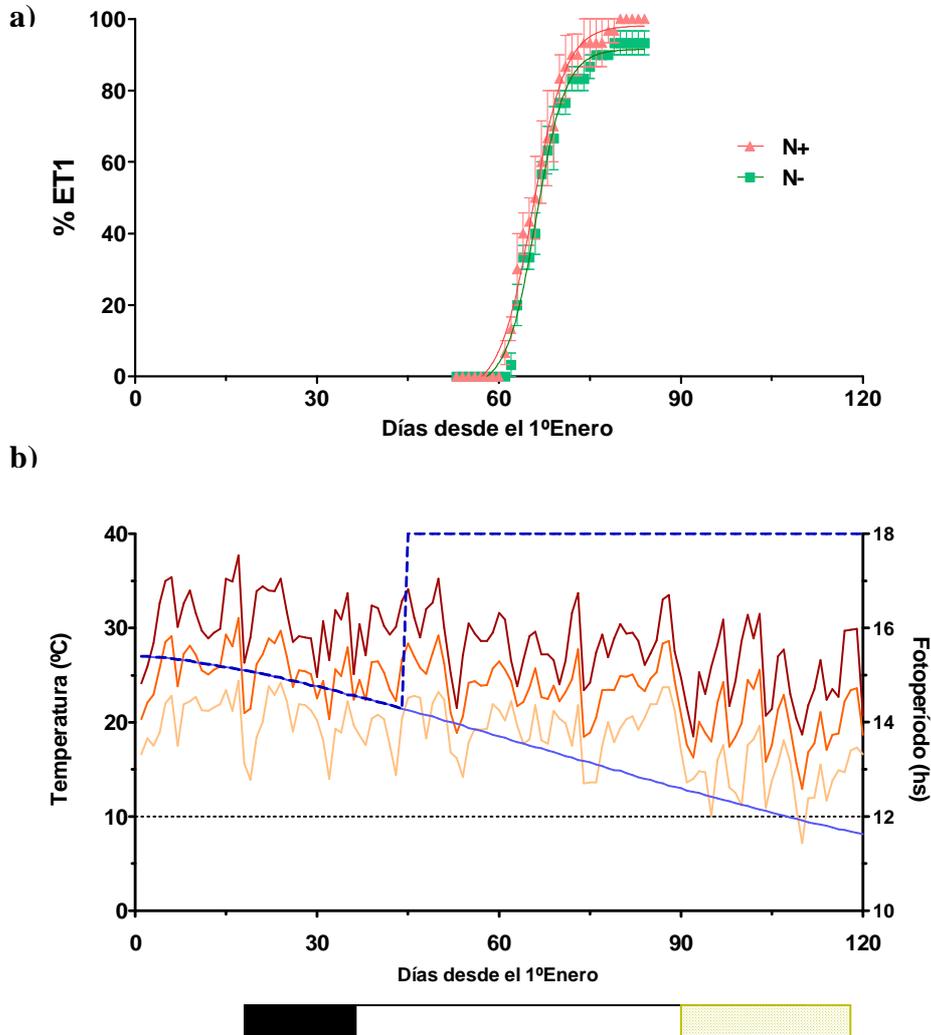


Figura IV.1: a) Dinámica del inicio de floración ($ET1$) de plantas de *Oenothera biennis* fertilizadas ($N+$) y sin fertilizar ($N-$) sometidas a extensión fotoperiódica de 18hs. Las barras indican el error estándar de las observaciones ($n=3$) y la línea entera el ajuste a una función sigmoidea (Boltzmann). b) Ambiente fototermal explorado durante el experimento. Las líneas de tonalidad anaranjada representan las condiciones térmicas ($T^{\circ}máx$: oscura, $T^{\circ}media$: intermedia, $T^{\circ}mín$: clara) y las de tonalidad azul las condiciones fotoperiódicas (entera: FP natural, partida: FP extendido). Las barras de la parte inferior del gráfico indican los períodos en que ocurrieron las fases de establecimiento de plántulas en bandejas bajo invernáculo (barra gris) y de crecimiento de plantas en macetas en condiciones de campo (barra blanca). La barra amarilla señala el período de inicio de floración ($FL1$) considerando las plantas de los dos tratamientos. La línea punteada indica el límite superior del rango térmico generalmente considerado como vernalizante.

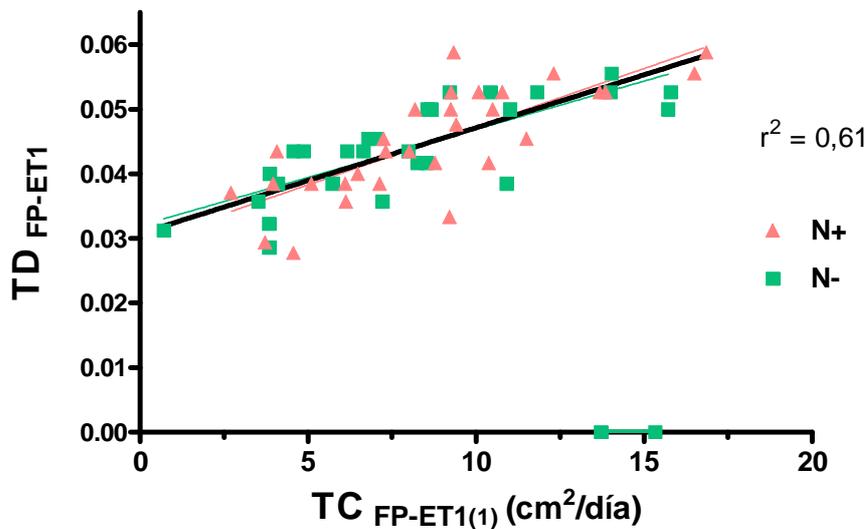


Figura IV.2: : Relación entre la tasa de desarrollo a **ET1** (TD_{FP-ET1}) y la tasa de crecimiento durante la fase vegetativa ($TC_{FP-ET1(1)}$) de plantas de *Oenothera biennis*, fertilizadas (**N+**) y sin fertilizar (**N-**), expuestas a fotoperíodos extendidos artificialmente. Cada punto representa una planta individual. La línea indica el ajuste de las observaciones correspondientes a todas las plantas de comportamiento anual ($n = 58$). Las plantas de $TD_{FP-ET1} = 0$, presentaron comportamiento bienal.

Estos resultados indican que el comportamiento anual no depende de la vernalización pero que buenas condiciones para el crecimiento de las plantas durante la incidencia de fotoperíodos inductivos tampoco son suficientes para asegurar la floración de todos los individuos en la primera estación de crecimiento. Algún otro factor aun no identificado, endógeno (probablemente genético) o exógeno, estaría determinando el comportamiento bienal de estos individuos.

ANEXO V

¿Efecto de temperaturas elevadas sobre el comportamiento reproductivo?

A fines de 2008 - principios de 2009 se realizó un experimento exploratorio con el fin de analizar si la inducción floral de *Oenothera biennis* por acción de fotoperíodos largos se ve afectada por las condiciones de alta temperatura de la época estival. Plántulas vernalizadas en estado de semilla pre-germinada, se trasplantaron a macetas de 7 lts. que se agruparon en microparcels de 12 plantas (n=3) en condiciones de campo. A cada microparcels se le asignó uno de dos tratamientos fotoperiódicos:

- i) **FP18**: Extensión fotoperiódica artificial a 18 hs.luz/día
- ii) **FPN**: Tratamiento sin extensión

El número final de plantas por tratamiento fue de 32 y 31 plantas para **FPN** y **FP18**, respectivamente. El cronograma de las principales actividades realizadas se presenta en la tabla V.1.

	FP18	FPN
Pre-germinación cámara 20-30°C	2-Sept	2-Sept
Inicio tratamiento Vn en cámara 5°C	5-Sept	5-Sept
Repique a bandejas (bajo invernáculo)	6-Oct	6-Oct
Trasplante a macetas a campo	11-Nov	11-Nov
Inicio tratamiento fotoperiódico	11-Nov	-

Tabla V.1: Cronograma de las principales actividades desarrolladas, para los tratamientos **FP18** y **FPN** durante el experimento estival de 2008-2009.

No se registraron diferencias significativas en el momento en que las plantas con comportamiento anual iniciaron su reproducción (**ET1**₍₅₀₎: 36.7 ± 1.7 vs. 35 ± 2 días desde el trasplante para **FPN** y **FP18** respectivamente, $P > 0.05$) ni en la proporción final de plantas de comportamiento anual, la cual fue baja en los dos tratamientos ($29,4 \pm 11,2\%$ vs. $29,7 \pm 8,1\%$, para **FPN** y **FP18** respectivamente, $P > 0.05$). Todas las plantas que alcanzaron el estado **ET1** florecieron, sin registrarse diferencias significativas en el momento en que los tratamientos iniciaron la floración (**FL1**₍₅₀₎: 67 ± 1.5 vs. 64.3 ± 1.3 días desde el trasplante para **FPN** y **FP18** respectivamente, $P > 0.05$).

Si bien la tasa de crecimiento durante la fase vegetativa (**TC**_{FP-ET1(1)}) explicó parte de la variabilidad en la tasa de desarrollo a **ET1** de las plantas de comportamiento anual, este parámetro no parece tener un efecto determinante sobre la definición del comportamiento anual o bienal de *Oenothera biennis* ya que hubo individuos anuales y bienales prácticamente en todo el rango explorado de **TC**_{FP-ET1(1)} (figura V.1). Aún así, la proporción de plantas de comportamiento anual tendió a ser mayor en las plantas de mayor **TC**_{FP-ET1(1)} (Figura V.2).

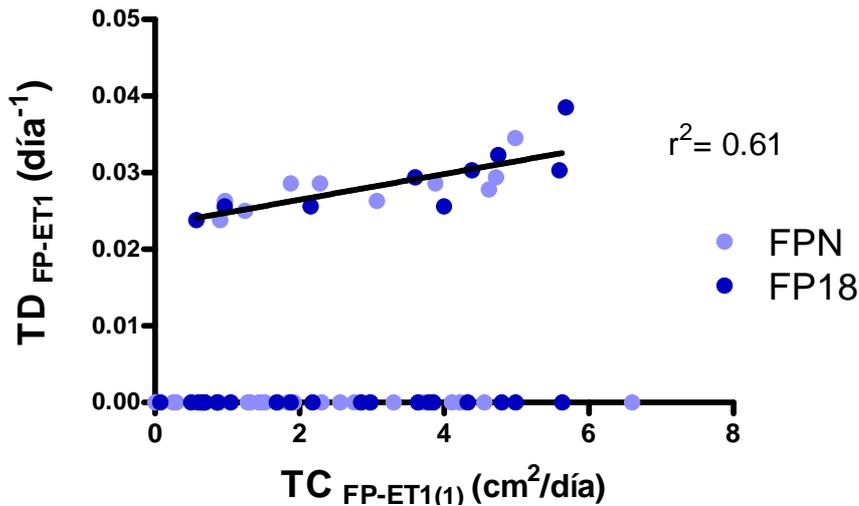


Figura V.1: Relación entre la tasa de desarrollo a **ET1** (TD_{FP-ET1}) y la tasa de crecimiento durante la fase vegetativa ($TC_{FP-ET1(1)}$) de plantas de *Oenothera biennis* expuestas a fotoperíodos naturales (**FPN**) o extendidos artificialmente (**FP18**). Cada punto representa una planta individual. La línea indica el ajuste de las observaciones correspondientes a todas las plantas de comportamiento anual ($n = 20$). Las plantas de $TD_{FP-ET1} = 0$, presentaron comportamiento bienal.

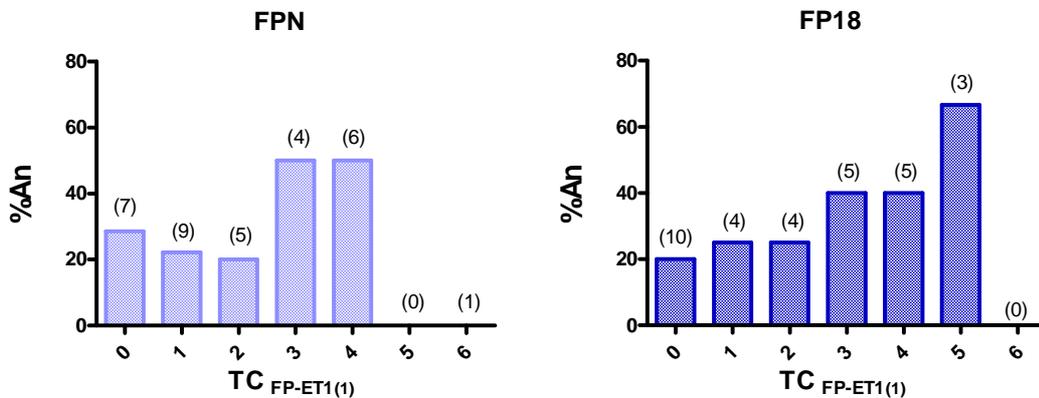


Figura V.2: Histogramas. Proporción de individuos de comportamiento anual ($\%An$) según categorías de tasa de crecimiento ($TC_{FP-ET1(1)}$), para los tratamientos **FPN** (izq.) y **FP18** (der.). Cada valor del eje x representa el rango correspondiente a su unidad (ej: 0 representa el rango abarcado entre 0.01 a 0.99). Los números entre paréntesis ubicados encima de las barras indican la cantidad de observaciones que presentó cada categoría.

Como la vernalización no es una condición necesaria para la reproducción (Anexo IV), la alta incidencia de comportamiento bienal no sería producto de un probable efecto de devernalización por altas temperaturas. Tampoco las condiciones fotoperiódicas serían limitantes para estimular la floración en la primera estación de crecimiento, al menos no para el tratamiento **FP18**, que ha

sido efectivo para inducir la reproducción en experimentos que exploraron distintas condiciones ambientales (Capítulo 5 y Anexo IV).

Habiendo descartado, entonces, a la tasa de crecimiento, a la vernalización y al fotoperíodo como posibles factores candidatos para explicar el comportamiento bienal de *Oenothera biennis* en siembras tardías, se sugiere la hipótesis de que otro factor ambiental, posiblemente la exposición a altas temperaturas, esté impidiendo la reproducción.

Si bien no son frecuentes los antecedentes que atribuyan a las altas temperaturas un rol principal en la definición del comportamiento reproductivo de las especies bienales facultativas, existen al menos dos casos concretos, *Lesquerella mendocina* (Windauer *et al.* 2004) y *Eustoma grandiflorum* (Harbaugh 2007), en los que la exposición de las plantas a temperaturas elevadas inhibe la elongación de los tallos florales y la floración.

En este experimento, las plantas de *Oenothera biennis* estuvieron expuestas a temperaturas potencialmente inhibitorias de la floración (*i.e.* medias ≥ 25 °C y máximas ≥ 30 °C) antes y durante la ocurrencia de **ET1** (figura V.3). Se ha observado que el aumento de la temperatura media de 20 a 25°C tiene un efecto negativo sobre la tasa de aparición de hojas, la que tendría una temperatura máxima de 30-32°C (ver Anexo VI). Si otros procesos fisiológicos, como el cambio de estado del meristema apical, tuvieran una respuesta a la temperatura similar, o incluso más sensible que la de la tasa de aparición de hojas, entonces las temperaturas exploradas en este experimento podrían ser inhibitorias para la iniciación floral. Si bien hacen falta experimentos en condiciones controladas para poner a prueba esta hipótesis, la verificación de la misma serviría para explicar el alto porcentaje de individuos bienales reportado en **Exp.Vn2** (figuras 3.4 y 3.5) donde el rango térmico explorado entre el trasplante y **FL1** presentó varios episodios con temperaturas similares a las de este experimento.

Como todas las plantas que alcanzaron el estadio **ET1** florecieron normalmente, explorando condiciones térmicas similares a las que ocurrieron durante la definición de **ET1**, el efecto inhibitorio de las altas temperaturas se ejercería sobre la iniciación floral (o algún estadio muy cercano), pero no en estadios posteriores a **ET1**. La mayor tolerancia térmica de *Oenothera biennis* durante la etapa **ET1-FL1** puede apreciarse en la figura VI.2 (Anexo VI) donde la tasa de desarrollo se ve poco afectada por temperaturas medias de alrededor de 25°C. No se descarta la posibilidad de que esta mayor tolerancia resulte de una aclimatación al estrés térmico experimentado previamente por las plantas, durante la definición del estadio **ET1**.

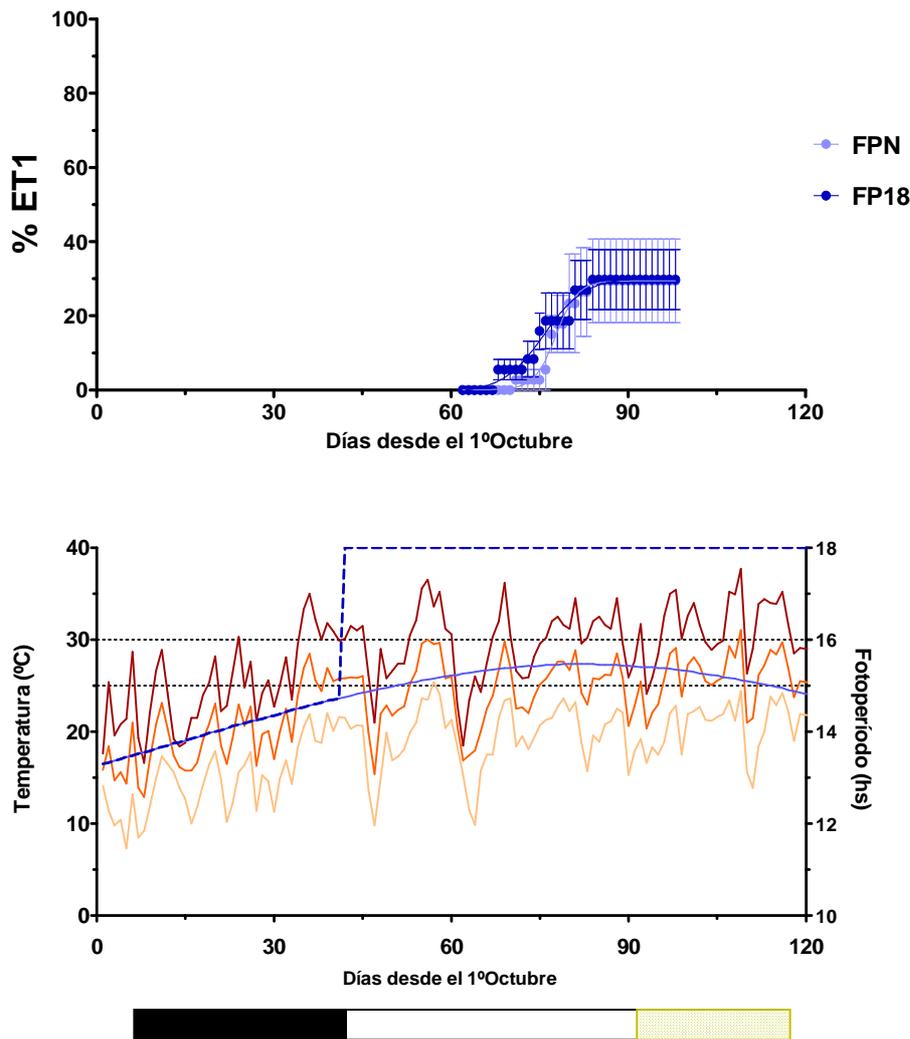


Figura V.3: a) Dinámica del inicio de floración (**ET1**) de plantas de *Oenothera biennis* vernalizadas artificialmente, sometidas a extensión fotoperiódica de 18hs (**FP18**) ó condiciones fotoperiódicas naturales (**FPN**). Las barras indican el error estándar de las observaciones ($n=3$) y la línea entera el ajuste a una función sigmoidea (Boltzmann). **b)** Ambiente fototermal explorado durante el experimento. Las líneas de tonalidad anaranjada representan las condiciones térmicas ($T^{\circ}\text{máx}$: oscura, $T^{\circ}\text{media}$: intermedia, $T^{\circ}\text{mín}$: clara) y las de tonalidad azul las condiciones fotoperiódicas (entera: FP natural, partida: FP extendido). Las barras de la parte inferior del gráfico indican los períodos en que ocurrieron las fases de establecimiento de plántulas en bandejas bajo invernáculo (barra gris) y de crecimiento de plantas en macetas en condiciones de campo (barra blanca). La barra amarilla señala el período de inicio de floración (**FL1**) considerando las plantas de los dos tratamientos. Las líneas punteadas sirven para ubicar los momentos en que $T^{\circ}\text{media}$ tiene valores superiores a 25°C y $T^{\circ}\text{máx}$ supera los 30°C .

ANEXO VI

Caracterización preliminar de la respuesta a la temperatura en *Oenothera biennis*

En el marco de esta tesis se condujeron experimentos en diferentes fechas de siembra que exploraron un amplio rango de temperaturas. La mayoría de estos experimentos tuvieron como objetivo evaluar cómo varía el desarrollo en respuesta a la vernalización, el fotoperíodo y la disponibilidad de nutrientes. Sin embargo, el análisis de los resultados permitió identificar variaciones en el comportamiento reproductivo de las plantas que no pudieron interpretarse en términos de éstos factores, y que asocian la disminución en la proporción de plantas de comportamiento anual a fechas de siembra tardías (ej. **Exp.Vn2**, Capítulo 3; **Exp.FP1**, Capítulo 5; Anexo V). Estos resultados llevaron a considerar como hipótesis *ad hoc* que las altas temperaturas de primavera-verano podrían estar implicadas en la determinación del comportamiento bienal de una proporción de los individuos.

El rango de temperaturas explorado permite, además, evaluar preliminarmente la respuesta de la tasa de desarrollo de *Oenothera biennis* a la temperatura, y obtener valores aproximados de las temperaturas cardinales (temperaturas base, óptima y máxima) para el desarrollo pre-floración de esta especie. En este anexo se presenta un análisis conjunto de los resultados de diferentes experimentos para: a) estimar valores de las temperaturas cardinales para las fases vegetativa (previa a **ET1**) y reproductiva temprana (desde **ET1** hasta **FL1**) y b) analizar la posible asociación entre la temperatura y la proporción de individuos de comportamiento anual.

Dado que la tasa de desarrollo durante la fase vegetativa (hasta **ET1**) está modulada por numerosos factores (entre ellos, la vernalización, el fotoperíodo y la tasa de crecimiento) no resulta posible utilizar el momento de ocurrencia del estadio **ET1** para caracterizar la respuesta a la temperatura *Oenothera biennis* en condiciones de campo. En su reemplazo se optó por utilizar la tasa de aparición de hojas, variable que depende fuertemente de la temperatura (Kiniry, *et al.* 1991, Jamieson *et al.*, 1995, Wilhelm y McMaster 1995). El número de hojas aparecidas y su tasa de aparición están fuertemente relacionados con la fenología de varios cultivos. Estos parámetros han sido utilizados por muchos investigadores para caracterizar el desarrollo durante la fase vegetativa, en parte, gracias a su fácil determinación (Kiniry *et al.* 1991). Para evitar efectos de variaciones en la tasa de aparición de hojas con la ontogenia, se utilizó el intervalo entre la aparición de la 7° y la 12° hoja (**V_{7-V₁₂}**) para caracterizar la respuesta a la temperatura durante la fase vegetativa. Este intervalo se consideró lo suficientemente largo como para absorber buena parte del error experimental producto de imprecisiones en la medición, y lo suficientemente corto como para no ser afectado, en gran medida, por otras señales del ambiente diferentes de la temperatura. Con la elección de la 7° hoja se procuró evadir un posible retraso en el desarrollo inicial a causa del trasplante, mientras que con la elección de la 12° hoja, se procuró evitar una probable aceleración en la tasa de aparición de las hojas a causa del inicio de la reproducción (**ET1**).

Para mayor precisión, sólo se utilizaron los datos de experimentos en los que se registró el número de hojas con una frecuencia relativamente alta (*i.e.* una

vez por semana ó mayor, según la temperatura). Se emplearon finalmente seis fechas de siembra que abarcaron un rango térmico, para el intervalo considerado, de 9 a 26 °C. En todos los casos, el momento de aparición de la 7ª y la 12ª hoja se obtuvo por interpolación de funciones no lineales del número de hojas aparecidas en función del tiempo. Para analizar la tasa de desarrollo de la fase vegetativa (estimada a partir de la función inversa del intervalo V_7-V_{12}) en función de la temperatura, se empleó un modelo bi-lineal (Gilmore y Rogers 1958; figura VI.1).

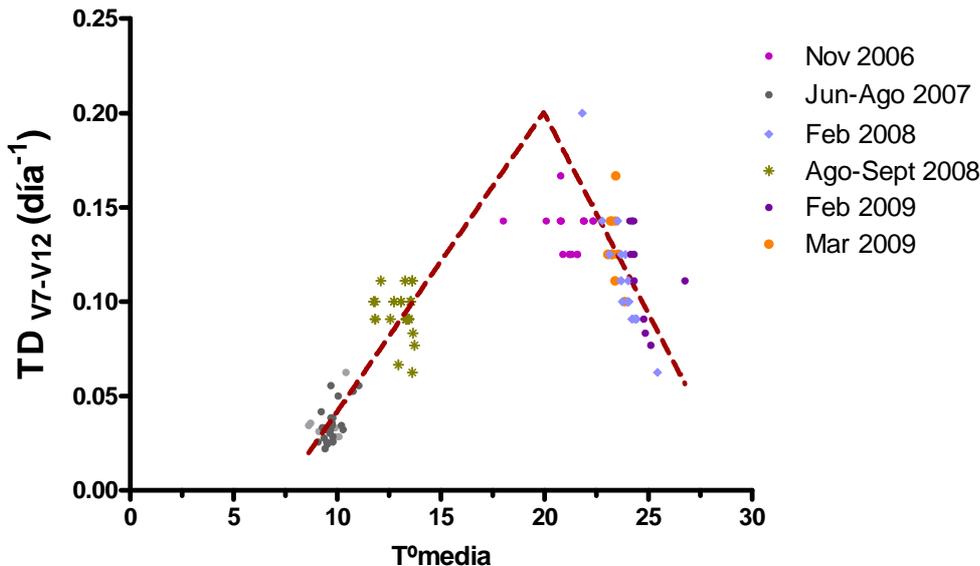


Figura VI.1: Tasa de desarrollo (1/día) entre la aparición de la 7ª y la 12ª hoja (TD_{V7-V12}) de rosetas de *Oenothera biennis* creciendo en macetas en condiciones de campo de diferente temperatura media. En la leyenda se da una aproximación al momento en que se realizaron las mediciones. Cada punto representa una planta individual. La línea cortada muestra el mayor ajuste a una función bi-lineal (n=118).

Durante la fase vegetativa (figura VI.1), la tasa de desarrollo aumenta linealmente con la temperatura media desde una temperatura base (T_b) de alrededor de 7 °C hasta una temperatura óptima (T_{opt}) de aproximadamente 20 °C. Con temperaturas superiores a T_{opt} la tasa de desarrollo decrece con el aumento de temperatura hasta una temperatura máxima ($T_{máx}$) de alrededor de 30 °C, a la cual la tasa de aparición foliar sería mínima.

Para caracterizar la respuesta a la temperatura durante la fase reproductiva temprana (desde el inicio de la elongación del tallo floral, **ET1**, hasta el inicio de floración, **FL1**) se utilizó una aproximación similar a la anterior. En este caso, se empleó el intervalo entre los estadios fenológicos **ET1** y **FL1**. Experimentos previos habían demostrado que la duración de la fase fenológica **ET1-FL1** no se ve afectada por la disponibilidad nutricional (Figuras 4.6, 5.4 y 5.5) pero sí por efecto del fotoperíodo (Figuras 5.4 y 5.5). Por lo tanto, para este análisis sólo fueron considerados los tratamientos con extensión fotoperiódica a 18 hrs. luz/día (**FP18**) de diferentes experimentos. Este tratamiento permitió explorar condiciones térmicas de diferentes épocas del año sin variaciones en el régimen

fotoperiódico. En este caso se utilizaron datos de nueve fechas de siembra abarcando un rango térmico para el intervalo **ET1-FL1** desde 13 hasta 26 °C. La respuesta general a la temperatura de la tasa de desarrollo **ET1-FL1**, se presenta en la figura VI.2.

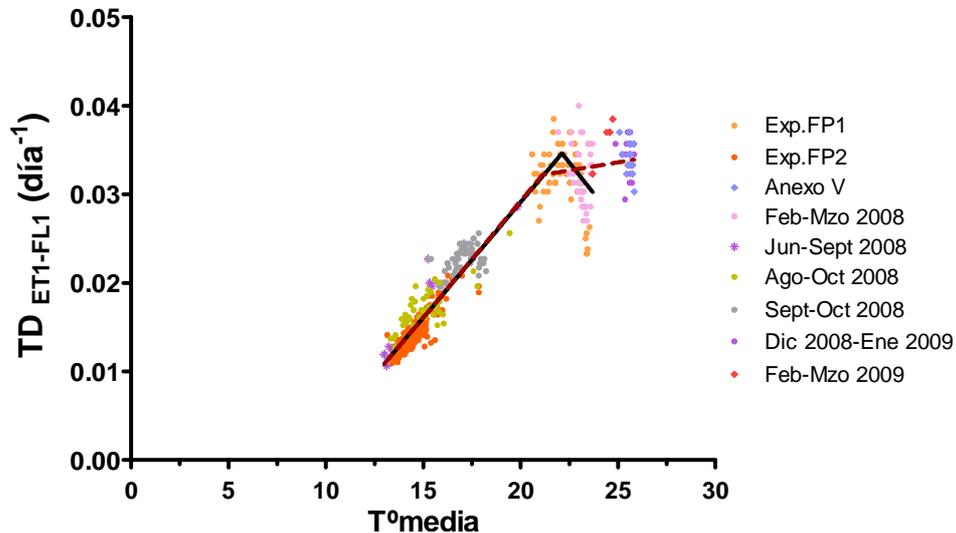


Figura VI.2: Tasa de desarrollo (1/día) entre la aparición de los estadios fenológicos **ET1** y **FL1** ($TD_{ET1-FL1}$) de plantas de *Oenothera biennis* con comportamiento anual sometidas a extensión fotoperiódica en condiciones de campo de diferente temperatura media (en las referencias se detalla el período en que ocurrió **ET1-FL1** y/o el experimento del cual se tomaron los datos). Intervalo **ET1-FL1**: **Exp.FP1**: Nov-Dic 2006; **Exp.FP2**: Jul-Oct 2007; **Anexo V**: Dic 2008-Ene 2009. Cada punto representa una planta individual. Las líneas representan el ajuste a una función bi-lineal sin considerar (entera, $n=453$) ó considerando (cortada, $n=500$) $T^{\circ}media > 24^{\circ}C$.

Durante la fase reproductiva temprana (figura VI.2), la tasa de desarrollo desde el inicio de elongación de la vara floral (**ET1**) hasta que ocurre la apertura de la primera flor (**FL1**), en condiciones de fotoperíodo constante, respondió linealmente a la temperatura en el rango subóptimo, desde una temperatura base de aproximadamente 8 °C hasta una óptima de 21-22 °C. Estos valores apenas difirieron (*i.e.* 1-2 °C) de los estimados para la fase vegetativa de esta especie (figura VI.1). La respuesta a la temperatura en el rango supraóptimo, sin embargo, no siguió un patrón determinado (hubo plantas en las que se redujo la tasa de desarrollo con temperaturas supraóptimas y otras en las que parece no haberse afectado la tasa), por lo que no pudo estimarse la $T_{máx}$ para la fase **ET1-FL1**.

Si bien se requieren experimentos futuros en condiciones controladas para confirmar estos valores preliminares para las temperaturas cardinales de *Oenothera biennis*, la aproximación de la respuesta a la temperatura lograda en este Anexo provee herramientas útiles para explicar la fenología de esta especie, en diferentes ambientes.

En relación a la posible asociación entre altas temperaturas y el comportamiento reproductivo de *Oenothera biennis*, los resultados que se muestran en la Figura VI.3 respaldan la hipótesis de que la exposición a temperaturas elevadas en algún momento determinado del ciclo (en este

caso alrededor de la ocurrencia de **ET1**), puede inhibir la reproducción de una fracción variable de la población determinado su comportamiento bienal. Considerando el período de 2 semanas posterior al momento en que el primer individuo de un tratamiento/experimento alcanzó el estadio **ET1**, la proporción de individuos de comportamiento anual (**%An**) cae considerablemente con el aumento de la temperatura máxima promedio por encima de los 25-26°C (Figura VI.3a) y/o con la cantidad de días con temperatura máxima mayor a 30°C (Figura VI.3b). Esta respuesta se evidenció de manera similar tanto en experimentos/tratamientos con fotoperíodos naturales como en aquellos sometidos a extensión fotoperiódica artificial a 18 hrs.luz/día. Dado que en todos los experimentos de esta tesis las plantas que alcanzaron el estadio **ET1** florecieron posteriormente, se plantea la posibilidad de que exista una ventana temporal de sensibilidad a las altas temperaturas cuya ubicación deberá determinarse en futuras líneas de investigación.

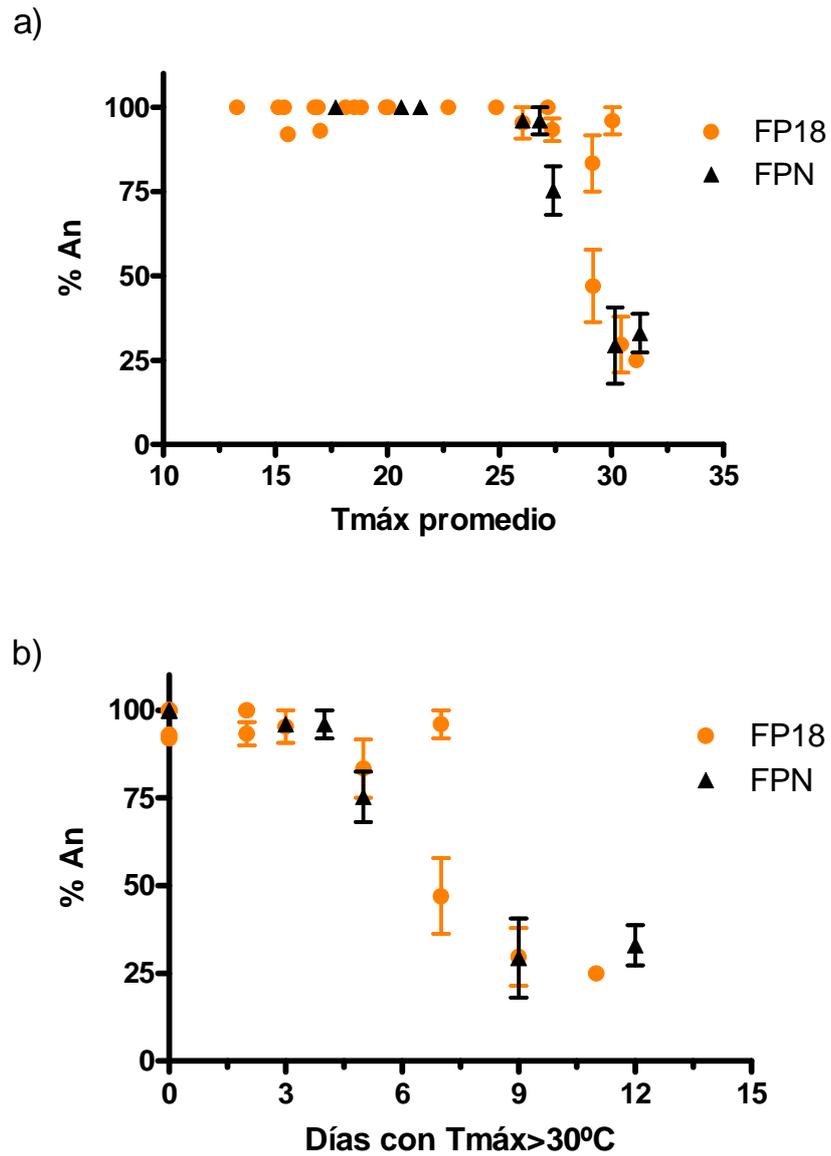


Figura VI.3: Proporción de individuos anuales (%An) en función de **a)** la temperatura máxima diaria (Tmáx) promedio y **b)** la cantidad de días con temperaturas diarias máximas mayores a 30°C; considerando los 15 días posteriores al primer registro del estadio ET1 en cada tratamiento. Los círculos naranjas representan tratamientos con suplementación fotoperiódica a 18 hrs. luz/día (**FP18**) y los triángulos negros representan tratamientos sin extensión fotoperiódica (fotoperíodo natural, **FPN**). Los datos provienen de tratamientos de diferentes experimentos, algunos de los cuales contaron con repeticiones verdaderas (n=3) y otros no. Los segmentos representan el error estándar de las medias de los tratamientos con repeticiones.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams SR, Pearson S, Hadley P (2001) Improving quantitative flowering models through a better understanding of the phases of photoperiod sensitivity. *Journal of Experimental Botany* **357**(52), 655-662.
- Adams SR, Pearson S, Hadley P, Patefield WM (1999) The effects of temperature and light integral on the phases of photoperiod sensitivity in *Petunia x hybrida*. *Annals of Botany* **83**, 263-269.
- Amasino R (2004) Historical perspective essay: vernalization, competence, and the epigenetic memory of winter. *The plant cell* **16**, 2553-2559.
- Amasino RM (2005) Vernalization and flowering time. *Current opinion in biotechnology* **16**, 154-158.
- Arisnabarreta S, Miralles DJ (2004) The influence of fertilizer nitrogen application on development and number of reproductive primordia in field-grown two- and six-rowed barleys. *Australian Journal of Agricultural Research* **55**, 357-366.
- Atkinson D, Porter JR (1996). Temperature, crop development and crop yields. *Trends in Plant Science* **1**, 119-124.
- Ausín I, Alonso-Blanco C, Martínez-Zapater JM (2005) Environmental regulation of flowering. *International Journal of Developmental Biology* **49**, 689-705.
- Baker JT, Reddy VR (2001) Temperature effects on phenological development and yield of muskmelon. *Annals of botany* **87**, 605-613.
- Baloch DM, Karow RS, Marx E, Kling JG, Witt MD (2003) Vernalization studies with Pacific Northwest wheat. *Agronomy Journal* **95**, 1201-1208.
- Baskin JM, Baskin CC (1979a) Studies on the autoecology and population biology of the weedy monocarpic perennial, *Pastinaca sativa*. *Journal of ecology* **67**, 601-610.
- Baskin JM, Baskin CC (1979b) Studies on the autoecology and population biology of the monocarpic perennial *Grindelia lanceolata*. *American Midland Naturalist* **102**, 290-299.
- Baskin JM, Baskin CC (1984) The ecological life cycle of *Campanula americana* in northcentral Kentucky. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **111**, 329-337.
- Bazzaz FA, Ackerly, DD (1992). Reproductive allocation and reproductive effort in plants. In 'Seeds: the Ecology of Regeneration in Plant Communities' (Ed. M Fenner), pp. 1-26. (C.A.B. International, Wallingford, Oxon, UK).
- Bender MH, Baskin JM, Baskin CC (2002a) Flowering requirements of *Polymnia Canadensis* (Asteraceae) and their influence on its life history variation. *Plant Ecology* **160**, 113-124.
- Bender MH, Baskin JM, Baskin CC (2002b) Phenology and common garden and reciprocal transplant studies of *Polymnia canadensis* (Asteraceae), a monocarpic species of the North American Temperate Deciduous Forest. *Plant Ecology* **161**, 15-39.
- Bernier G, Kinet JM, Sachs RM (1981). *The Physiology of Flowering Vols. 1 and 2*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Bernier G, Havelange A, Houssa, C, Petitjean A, Lejeune P (1993) Physiological signals that induce flowering. *The plant cell* **5**, 1147-1155.

- Bernier G, Perilleux C (2005) A physiological overview of the genetics of flowering time control. *Plant Biotechnology Journal* **3**, 3–16.
- Bloom TC, Baskin JM, Baskin CC (2003) Scientific note: Physiological determinants of bolting/flowering in the facultative woodland biennial *Arabis laevigata* var. *laevigata* (Brassicaceae). *Castanea. Journal of the Southern Appalachian Botanical Society*. Mar, 2003.
- Bloom TC, Baskin JM, Baskin, CC (2002) Ecological life history of the facultative woodland biennial *Arabis laevigata* var. *laevigata* (Brassicaceae): Reproductive phenology and fecundity. *Journal of the Torrey Botanical Society*. Jan-Mar 2002.
- Böhlenius H, Huang T, Charbonnel-Campaa L, Brunner AM, Jansson S, Strauss SH, Nilsson O (2006) *CO/FT* Regulatory Module Controls Timing of Flowering and Seasonal Growth Cessation in Trees. *Science* **312**, 1040-1043.
- Bonser SP, Aarsen LW (2009) Interpreting reproductive allometry: Individual strategies of allocation explain size-dependent reproduction in plant populations. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **11**(1), 31-40.
- Borchert R (1983) Phenology and control of flowering in tropical trees. *Biotropica* **15**(2), 81-89.
- Boss PK, Bastow RM, Mylne JS, Dean C (2004) Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting and resetting. *The plant cell* **16**, S18-S31.
- Boudry P, McCombie H, Van Dijk H (2002) Vernalization requirement of wild *Beta vulgaris* ssp. *maritima*: among population variation and its adaptive significance. *Journal of Ecology* **90**, 693-703.
- Bünning E (1936) Die endonome Tagesrhythmik als Grundlage der photoperiodischen Reaktion. *Ber. Deutsch Bot. Ges.* **54**, 590–607.
- Burd M, Read J, Sanson GD, Jaffré T (2006) Age-size plasticity for reproduction in monocarpic plants. *Ecology* **87**(11), 2755-2764.
- Chakravarti SC (1964) Vernalization and growth. *Indian Agriculture* **8**, 68-70.
- Childs DZ, Rees M, Rose KE, Grubb PJ, Ellner SP (2003) Evolution of complex flowering strategies: an age- and size-structured integral projection model. *Proceedings of the Royal Society of London B* **270**, 1829–1838.
- Childs DZ, Rees M, Rose KE, Grubb, PJ, Ellner SP (2004) Evolution of size-dependent flowering in a variable environment: construction and analysis of a stochastic integral projection model. *Proc. R. Soc. Lond. B* **271**, 425-434. (published online).
- Chouard P (1960) Vernalization and its relation to dormancy. *Annual review of Plant Physiology* **11**, 191-238.
- Clarkson NM, Russell JS (1975) Flowering responses to vernalization and photoperiod in annual medics (*Medicago* spp.) *Australian Journal of Agricultural Research* **26**, 831-838.
- Clough EA, Cameron AC, Heins RD, Carlson WH (2001) Growth and development of *Oenothera fruticosa* is influenced by vernalization duration, photoperiod, forcing temperature, and plant growth regulators. *J. Amer. Soc. Hort. Sci* **126**(3), 269-274.

- Cohen D (1976) The optimal timing of reproduction. *The American Naturalist* **110**, 801–807.
- Colasanti J, Sundaresan V (2000) ‘Florigen’ enters the molecular age: long-distance signals that cause plants to flower. *Trends in Biochemical Sciences* **25**(5), 236-240.
- Collins CD, Scarisbrick DH (1994) The effect of the plant growth retardant RSW0411 on assimilate distribution in evening primrose. *Field Crops Research* **36**, 59-67.
- Corbesier L, Coupland G (2005) Photoperiodic flowering of *Arabidopsis*: integrating genetic and physiological approaches to characterization of the floral stimulus. *Plant, cell and Environment* **28**, 54-66.
- Corbesier L, Coupland G (2006) The quest for florigen: a review of recent progress. *Journal of Experimental Botany* **57**(13), 3395-3403.
- Counce PA, Keisling TC, Mitchell AJ (2000) A uniform, objective, and adaptive system for expressing rice development. *Crop Science* **40**, 436-443.
- Couvet D, Mihaliak CA, Lincoln DE (1990) Genetic and environmental effects on life-history of a facultative biennial. *Oikos* **57**(2), 161-166.
- Crosthwaite SK, Jenkins GI (1993) The Role of Leaves in the Perception of Vernalizing Temperatures in Sugar Beet. *Journal of Experimental Botany* **44**(4), 801-806.
- De Jong TJ, Klinkhamer PGL, Prins AH (1986) Flowering behaviour of the monocarpic perennial *Cynoglossum officinale* L. *New Phytologist* **103**, 219-229.
- De Jong TJ, Klinkhamer PGL, Nell HW, Troesla SR (1987) Growth and nutrient accumulation of the biennials *Cirsium vulgare* and *Cynoglossum officinale* under nutrient-rich environments. *Oikos* **48**, 62-72.
- De Jong TJ, Goosen-De Roo L, Klinkhamer PGL (1998) Is the threshold size for flowering in *Cynoglossum officinale* fixed or dependent on environment?. *New Phytologist* **138**(3), 489-496.
- De Jong TJ, Klinkhamer, PGL, de Heiden, JLH (2000) The evolution of generation time in metapopulations of monocarpic perennial plants: some theoretical considerations and the example of the rare thistle *Carlina vulgaris*. *Evolutionary ecology* **14**, 213-231.
- Deng YC, Hua HM, Li J, Lapinskas P (2001) Studies on the cultivation and uses of evening primrose (*Oenothera* spp.) in China. *Economic Botany* **55**(1), 83-92.
- Dielen V, Notté C, Lutts S, Debavelaere V, Van Herck JC, Kinet JM (2005) Bolting control by low temperatures in root chicory (*Cichorium intybus* var. *sativum*). *Field crops research* **94**, 76-85.
- Dole JM, Wilkins HF (1999) Floriculture: Principles and species. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Ellis RH, Collinson ST, Hudson D, Patefield WM (1992) The Analysis of Reciprocal Transfer Experiments to Estimate the Durations of the Photoperiod-sensitive and Photoperiod-insensitive Phases of Plant Development: An Example in Soya Bean. *Annals of Botany* **70**, 87-92.
- Ellis RH, Roberts EH, Summerfield RJ, Cooper JP (1988) Environmental control of flowering in barley (*Hordeum vulgare* L.).II. Rate of development as a

- function of temperature and photoperiod and its modification by low-temperature vernalization. *Annals of Botany*, **62**, 145-158.
- Engelen-Eigles G, Erwin JE (1997) A model plant for vernalization studies. *Scientia Horticulturae* **70**, 197-202.
- Engelmann W (2007) Chapter 9: How Plants Identify the Season by Using a Circadian Clock. In 'Rhythms in Plants: Phenomenology, Mechanisms, and Adaptive Significance'. (Eds. S Mancuso, S Shabala) pp 181-198. (Springer-Verlag Berlin Heidelberg).
- Erwin, J (2007). Chapter 1: Factors Affecting Flowering in Ornamental Plants. In 'Flower Breeding and Genetics Issues, Challenges and Opportunities for the 21st Century'. (Ed. NO Anderson) pp. 7-48. (Springer Netherlands).
- Erwin J, Warner RM, Smith AG (2002) Vernalization, photoperiod and GA₃ interact to affect flowering of Japanese radish (*Raphanus sativus* Chinese Radish Jumbo Scarlet). *Physiologia plantarum* **115**, 298-302.
- Erwin J, Mattson N, Warner R (2003) Fundamentals of flowering. *Greenhouse grower*, Jul 2003 (published online).
- Erwin J, Warner R, Rohwer C, Mattson N (2005) Fundamentals of flowering. *Greenhouse grower*, Mar. 2005. (published online at www.greenhousegrower.com/grower_tools/html)
- Evans LT (1971) Flower induction and the florigen concept. *Annual Review of Plant Physiology* **22**, 365-394.
- Filek W, Koscielniak J, Grzesiak S (2000) The Effect of Seed Vernalization and Irradiation on Growth and Photosynthesis of Field Bean Plants (*Vicia faba* L. *minor*) and on Nitrogenase Activity of Root Nodules. *Journal of Agronomy & Crop Sciences* **185**, 229-236.
- Flood RG, Halloran GM (1983) Development responses in tetraploid wheat (*Triticum turgidum*). *Canadian Journal of Botany* **61**, 2539-2545.
- Frank AB, Bauer A (1982) Effect of temperature and fertiliser N on apex development in spring wheat. *Agronomy Journal* **74**, 504-509.
- Garner WW, Allard HA (1920) Effect of the relative length of day and night and other factors on growth and reproduction in plants. *Journal of Agricultural Research* **18**, 553-606.
- Ghasemnezhad A (2007) Investigations on the effects of harvest methods and storage conditions on yield, quality and germination of evening primrose (*Oenothera biennis* L.) seeds. Dissertation Submitted for the degree of Doctor of Agricultural Science (Dr. agr.) to the Faculty of Agricultural Sciences, Nutritional and Environmental Management Justus Liebig University Giessen. 92 pág.
- Ghasemnezhad A, Honermeier B (2007) Seed yield, oil content and fatty acid composition of *Oenothera biennis* L. affected by harvest date and harvest method. *Industrial Crops and Products* **25**, 274-281.
- Ghasemnezhad A, Honermeier B (2008) Yield, oil constituents, and protein content of evening primrose (*Oenothera biennis* L.) seeds depending on harvest time, harvest method and nitrogen application. *Industrial Crops and Products* **28**, 17-23.
- Gianquinto G (1997) Morphological and physiological aspects of phase transition in radicchio (*Cichorium intybus* L. var. *silvestre* Bisch.): influence of

- daylength and its interaction with low temperature. *Scientia Horticulturae* **71**, 13-26.
- Gilmore EC, Rogers JS (1958) Heat units as a method of measuring maturity in corn. *Agronomy Journal* **50**, 611-615.
- Goodspeed MJ (1975) Computer routines for solar position, daylength and related qualities. Tech. Mem. No. 75/11. CSIRO, Division of Land Use Research, Canberra, Australia.
- González FG, Slafer GA, Miralles DJ (2002) Vernalization and photoperiod responses in wheat pre-flowering reproductive phases. *Field Crops Research* **74**, 183-195.
- Grignac P (1988) Pratique agricole: La culture de l'onagre. *Oléagineux* **43**(3), 99-126.
- Gross KL (1981) Prediction of fate from rosette size in 4 biennial plant species: *Verbascum thapsus*, *Oenothera biennis*, *Daucus carota* and *Tragopogon dubius*. *Oecologia* **20**, 197-201.
- Gross KL, Kromer ML (1986) Seed weight effects on growth and reproduction in *Oenothera biennis* L. *Journal of the Torrey Botanical Club* **113**(3), 252-258.
- Gross KL, Werner PA (1982) Colonizing abilities of "biennial" plant species in relation to ground cover: implications for their distributions in a successional sere. *Ecology* **63**(4), 921-931.
- Haefner JW (2005). Chapter 3: Qualitative model formulation. In 'Modeling biological systems: Principles and Applications'. Pp. 32-57. Springer.
- Hall IV, Steiner E, Threadgill P, Jones RW (1988) The biology of Canadian weeds. 84. *Oenothera biennis* L. *Canadian Journal of Plant Sciences* **68**, 163-173.
- Hand JJ, Atherton JG (1987) Curd initiation in the cauliflower. I. Juvenility. *Journal of Experimental Botany* **38**(197), 2050-2058.
- Harbaugh BK (1992) Rosetting of Lisianthus Cultivars Exposed to High Temperatures. *HortScience* **27**(8), 885-887.
- Harbaugh BK (2007) Chapter 24: Lisianthus, *Eustoma grandiflorum*. In 'Flower Breeding and Genetics Issues, Challenges and Opportunities for the 21st Century'. (Ed. NO Anderson) pp. 645-663. (Springer Netherlands).
- Harper JL, Ogden J (1970) The Reproductive Strategy of Higher Plants: I. The Concept of Strategy with Special Reference to *Senecio Vulgaris* L. *Journal of Ecology* **58**(3), 681-698.
- Heide OM (1994) Control of flowering and reproduction in temperate grasses. *New Phytologist* **128**, 347-362.
- Heide OM, Sønsteby A (2007) Interactions of temperature and photoperiod in the control of flowering of latitudinal and altitudinal populations of wild strawberry (*Fragaria vesca*). *Physiologia Plantarum* **130**, 280-289.
- Henderson IR, Shindo C, Dean C (2003) The need for winter in the switch to flowering. *Annual Review of Genetics* **37**, 371-392.
- Herrera Sepúlveda CS (2004) Variación en los componentes del rendimiento en distintas fechas de siembra de onagra (*Oenothera biennis* L.) en Chillán. Memoria presentada a la Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Disponible en línea en:

http://www.bibliodigital.udec.cl/sdx/udec/tesis/2004/herrera_c/html/index-frames.html

- Hirose T, Kachi N (1982) Critical plant size for flowering in biennials with special reference to their distribution in a sand dune system. *Oecologia* (Berl) **55**, 281-284.
- Hirose T, Kachi N (1986) Graphical analysis of the life history evolution of *Oenothera glazioviana* Micheli. *Oecologia* **68**, 490-495.
- Hodges, T (1991). Chapter 3: Temperature and water stress – Effects on phenology. In 'Predicting crop phenology' (Ed. T Hodges) pp. 7-13. (CRC Press, USDA-ARS).
- Hodgson AS (1978) Rapeseed Adaptation in Northern New South Wales. I Phenological Responses to Vernalization, Temperature and Photoperiod by Annual and Biennial Cultivars of *Brassica campestris* L., *Brassica napus* L. and Wheat cv. Timgalen. *Australian Journal of Agricultural Research* **29**, 693-710.
- Horrobin DF, Lapinskas P (1993) Chapter 9: Opportunities and markets in the pharmaceutical and health food industry. In 'New crops for temperate regions'. (Eds. KRM Anthony, J Meadley, G Röbbelen) pp. 80-90. (Chapman and Hall, London).
- Imaizumi T, Kay A (2006) Photoperiodic control of flowering: not only by coincidence. *Trends in plant science* **11**(11), 550-558.
- Jackson SD (2009) Plant responses to photoperiod. *New Phytologist* **181**, 517-531.
- Jackson SD, Thomas B (1999) Chapter 29: The photoperiodic control of plant reproduction. In 'Concepts in photobiology, photosynthesis and photomorphogenesis'. (Eds. GS Singhal, G Renger, SK Sopory, KD Irrgang and Govindjee) pp. 868-897. (Narosa Publishing House, New Delhi, India).
- Jaeger KE, Graf A, Wigge PA (2006) The control of flowering in time and space. *Journal of Experimental Botany* **57**(13), 3415–3418.
- Jansson S, Douglas CJ (2007) *Populus*: A Model System for Plant Biology. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 435-458
- Jarillo JA, del Olmo I, Gómez-Zambrano A, Lázaro A, López-González L, Miguel E, Narro-Diego L, Sáez D, Piñeiro M (2008) Review. Photoperiodic control of flowering time. *Spanish Journal of Agricultural Research* **6**, 221-244.
- Johnson MTJ (2006) Genotype-by-environment interactions leads to variable selection on life-history strategy in Common Evening Primrose (*Oenothera biennis*). *The author* **20**, 190-200.
- Kachi N (1990) Evolution of size-dependent reproduction in biennial plants: A demographic approach. In 'Biological approaches and evolutionary trends in plants'. (Ed. S Kawano) pp. 367–385. (Academic Press, London).
- Kachi N, Hirose T (1983) Bolting induction in *Oenothera erythrosepala* Borbás in relation to rosette size, vernalization and photoperiod. *Oecologia* (Berlin) **60**, 6-9.
- Kachi N, Hirose T (1985) Population dynamics of *Oenothera glazioviana* in a sand-dune system with special reference to the adaptative significance of size-dependent reproduction. *Journal of Ecology* **73**, 887-902.

- Kasperbauer MT, Gardner RP, Loomis WE (1962) Interaction of photoperiod and vernalisation in flowering of sweet clover (*Melilotus*). *Plant Physiology* **37**, 165–170.
- Kelly D (1985) On strict and facultative biennials. *Oecologia* **67**, 292-294.
- Khudairi AK, Hamner KC (1954) The relative sensitivity of *Xanthium* leaves of different ages to photoperiodic induction. *Plant Physiology* **29**(3), 251-257.
- Kinet JM (1993) Chapter 7: Environmental, chemical, and genetic control of flowering. *Horticultural Reviews*. **15**: 279-305.
- Kiniry JR, Rosenthal WD, Jackson BS, Hoogenboom G (1991) Chapter 5: Predicting leaf development of crops plants. In 'Predicting crop phenology'. (Ed. T Hodges) pp. 30-39. (CRC Press, USDA-ARS).
- Klinkhamer PGL, de Jong TJ, Meelis E (1987a) Delay of flowering in the "biennial" *Cirsium vulgare*: size effects and devernalization. *Oikos* **49**, 303-308.
- Klinkhamer PGL., de Jong TJ, Meelis E (1987b) Life-history variation and the control of flowering in short-lived monocarps. *Oikos* **49**, 309-314.
- Klinkhamer PGL, de Jong TJ, Meelis E (1991) The control of flowering in the monocarpic perennial *Carlina vulgaris*. *Oikos* **61**, 88-95.
- Klinkhamer PGL, de Jong TJ, de Heiden JLH (1996) An eight-year study of population dynamics and life-history variation of the "biennial" *Carlina vulgaris*. *Oikos* **75**(2), 259-268.
- Król B (2007) Growth, development and yielding of biennial evening primrose (*Oenothera biennis* L.) depending on sowing date on two different soils. *Herba Polonica* **53**(3): 191-196.
- Król B, Berbéc S (2004) Effect of mineral fertilization on development and seed yield of evening primrose (*Oenothera biennis* L.). *Annales UMCS, Sec. E.* **59**(4): 1731-1737.
- Lacey EP (1986a) Onset of reproduction in plants: size versus age-dependency. *Trends in Ecology Evolution* **1**, 72-75.
- Lacey EP (1986b) The genetic and environmental control of reproductive timing in a short-lived monocarpic species *Daucus carota* (Umbelliferae). *Journal of ecology* **74**, 73-86.
- Lacey EP (1988) Latitudinal variation in reproductive timing of a short-lived monocarp, *Daucus carota* (Apiaceae). *Ecology* **69**(1), 220-232.
- Lang A (1952) Physiology of flowering. *Annual Review of Plant Physiology* **3**, 265-306.
- Lang A (1965) Physiology of flower initiation. In 'Encyclopedia of plant physiology'. Vol. 15. (Ed. W Ruhland) pp. 1380–1536. (Springer-Verlag, Berlin).
- Lapinskas P (1982) Evening Primrose - Origins and Cultivation. Presented at: Leatherhead Food Research Association, 9 November 1982. Available online at: <http://www.lapinskas.com>
- Lapinskas P (1999) The development of gamma-linolenic acid (GLA) as a pharmaceutical product. Presented at: Speciality chemicals for the 21st century (International seminar), 19-17 September, Valbonne, France. Available online at: <http://www.lapinskas.com>
- Levy YY, Dean C (1998) The transition to flowering. *The plant cell* **10**, 1973-1989.

- Little TM; Hills FJ (1975) Statistical methods in agricultural research. University of California Press, Davis.
- Longnecker N, Robson A (1994). Leaf emergence of spring wheat receiving varying nitrogen supply at different stages of development. *Annals of Botany* **74**, 1-7.
- Lyndon RF (1992) The environmental control of reproductive development. In 'Fruit and seed production: aspects of development, environmental physiology, and ecology'. (Eds. C Marshall, J Grace) pp. 8-32. (Cambridge University Press).
- Ma Q, Longnecker N, Dracup M (1997) Nitrogen Deficiency Slows Leaf Development and Delays Flowering in Narrow-leafed Lupin. *Annals of Botany* **79**, 403-409.
- Major DJ (1980) Photoperiod response characteristics controlling flowering of nine crop species. *Canadian Journal of Plant Science* **60**, 777-784.
- Major DJ, Kiniry JR (1991) Chapter 4: Predicting daylength effects on phenological processes. In 'Predicting crop phenology' (Ed. T Hodges) pp. 15-28. (CRC Press, USDA-ARS).
- Marks MK, Prince SD (1979) Induction of flowering in wild lettuce (*Lactuca Serriola* L.) II. Devernalization. *New Phytologist* **82**, 357-363.
- Martínez-Zapater JM, Coupland G, Dean C, Koornneef M (1994) Chapter 16: The transition to flowering in *Arabidopsis*. In: 'Arabidopsis' (ed. EM Meyerowitz) pp. 403-434. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Martínková J, Klimešová J, Mihulka S (2004) Resprouting after disturbance: an experimental study with short-lived monocarpic herbs. *Folia Geobotanica* **39**, 1-12.
- Mattson NS, Erwin JE (2005) The impact of photoperiod and irradiance on flowering of several herbaceous ornamentals. *Scientia horticultrae* **104**, 275-292.
- Medd RW, Lovett JV (1978) Biological studies of *Carduus nutans* (L.) ssp. *nutans* I. Germination and light requirements of seedlings. *Weed Research* **18**(6), 363-367.
- Meilan R (1997) Floral induction in woody angiosperms. *New Forests* **14**, 179-202.
- Metcalf JC, Rose KE, Rees M (2003) Evolutionary demography of monocarpic perennials. *Trends in ecology and evolution* **18**(9), 471-480.
- Michaels SD, Amasino RM (2000) Memories of winter: vernalization and the competence to flower. *Plant, cell and environment* **23**, 1145-1153.
- Miralles DJ, Windauer, LB, Gómez, NV (2003). Factores que regulan el desarrollo de los cultivos de granos. En: 'Producción de granos. Bases funcionales para su manejo'. (Ed. AJ Pascale) pp 61-71 (FAUBA).
- Mouradov A, Cremer F, Coupland G. (2002) Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. *The plant cell* S111-S130.
- Nordborg M, Bergelson J (1999) The effect of seed and rosette cold treatment on germination and flowering time in some *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) ecotypes. *American Journal of Botany* **86**(4), 470-475.
- Obeso JR (2002) Tansley review no. 139: The costs of reproduction in plants. *New phytologist* **155**, 321-348.

- Perilleux C, Bernier G (2002) The control of flowering: do genetical and physiological approaches converge. In: `Plant reproduction, Annual Plant Reviews, Vol. 6'. (Eds. SD O'Neill, JA Roberts) pp. 1–32 (Sheffield: Academic Press).
- Picard C (1965) Contribution a la connaissance de la vernalisation, de ses particularités et de sa signification chez *Oenothera biennis* L. var. *Sulfurea* De Vries. *Annales des Sciences Naturelles, Botanique* **6**, 197-314.
- Picard C (1967) Action du CCC et du B995 sur la mise à fleur d'une plante bisannuelle, l'*Oenothera biennis*. *Planta* (Berl.) **74**, 302-312.
- Poethig, RS (1990) Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. *Science* **250**, 923-930.
- Prins AH, Vrieling K, Klinkhamer PGL, de Jong TJ (1990) Flowering behaviour of *Senecio jacobaea*: effects of nutrient availability and size-dependent vernalization. *Oikos* **59**, 284-252.
- Qi M, Upadhyaya K, Turkington R (1996) Reproductive behaviour of natural populations of meadow salsify (*Tragopogon pratensis*). *Weed Science* **44**, 68-73.
- Reekie EH (1997) Chapter 8: Tradeoffs between reproduction and growth influence time of reproduction. In `Plant resource allocation'. (Ed. FA Bazzaz) pp: 191-209. (Academic Press, New York).
- Reekie EG, Bazzaz FA (1992) Cost of reproduction as reduced growth in genotypes of two congeneric species with contrasting life histories. *Oecologia* **90**, 21-26.
- Reekie E, Parmiter D, Zebian K, Reekie J (1997) Trade-offs between reproduction and growth influence time of reproduction in *Oenothera biennis*. *Canadian Journal of Botany* **75**, 1897-1902.
- Reekie EG, Reekie JYC (1991) The effect of reproduction on canopy structure, allocation and growth in *Oenothera biennis*. *Journal of Ecology* **79**, 1061-1071.
- Rees M, Rose KE (2002) Evolution of flowering strategies in *Oenothera glazioviana*: an integral projection model approach. *The Royal Society* 02PB0034.1-02PB0034.7 (published online).
- Rees M, Sheppard A, Briese D, Mangel M (1999) Evolution of Size-Dependent Flowering in *Onopordum illyricum*: A Quantitative Assessment of the Role of Stochastic Selection Pressures. *American Naturalist* **154**, 628-651.
- Reeves PH, Coupland G (2000) Response of plant development to environment: control of flowering by daylength and temperature. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 37-42.
- Reid JB, Murfet IC (1977) Flowering in *Pisum*: the effect of genotype, plant age, photoperiod, and number of inductive cycles. *Journal of Experimental Botany*, **28**(105), 811-819.
- Reinartz JA (1984) Life history variation of common mullein (*Verbascum thapsus*). I. Latitudinal differences in population dynamics and timing of reproduction. *Journal of ecology* **72**, 897-912.
- Roberts EH, Summerfield RJ (1987) Chapter 2: Measurement and prediction of flowering in annual crops. In `Manipulation of flowering'. (Ed. JG Atherton) pp. 17-50. (Butterworths, London).

- Robertson MJ, Watkinson AR, Kirkegaard JA, Holland JF, Potter TD, Burton W, Walton GH, Moot DJ, Wratten N, Farre I, Asseng S (2002) Environmental and genotypic control of time to flowering in canola and Indian mustard. *Australian Journal of Agricultural Research* **53**, 793-809.
- Rodríguez D, Pomar MC, Goudriaan J (1998) Leaf primordia initiation, leaf emergence and tillering in wheat (*Triticum aestivum* L.) grown under low-phosphorus conditions. *Plant and soil* **202**, 149-157.
- Rose KE, Rees M, Grubb PJ (2002) Evolution in the real world: stochastic variation and the determinants of fitness in *Carlina vulgaris*. *Evolution* **56**(7), 1416-1430.
- Runkle ES, Heins RD, Cameron AC, Carlson WH (1999) Photoperiod and cold treatment regulate flowering of *Rudbeckia fulgida* 'Goldsturm'. *Hortscience* **34**(1), 55-58.
- Samach A, Coupland G (2000) Time measurement and the control of flowering in plants. *BioEssays* **22**, 38-47.
- Saulnier TP, Reekie EG (1995) Effect of reproduction on nitrogen allocation and carbon gain in *Oenothera biennis*. *Journal of Ecology* **83**, 23-29.
- Searle I, Coupland G (2004) Induction of flowering by seasonal changes in photoperiod. *The EMBO Journal* **23**, 1217-1222.
- Simons AM, Johnston MO (2003) Suboptimal timing of reproduction in *Lobelia inflata* may be a conservative bet-hedging strategy. *Journal of Evolutionary Biology* **16**, 233-243.
- Simons AM, Johnston MO (2000) Plasticity and the genetics of reproductive behaviour in the monocarpic perennial, *Lobelia inflata* (Indian tobacco). *Heredity* **85**, 356-365.
- Simpson GG, Dean C (2002) Arabidopsis, the Rosetta Stone of Flowering Time? *Science* **296**, 285-289.
- Simpson MJA (1994) A description and code development of evening primrose (*Oenothera* spp.). *Annals of Applied Biology* **125**(2), 391-397.
- Slafer GA, Rawson HM (1994) Sensitivity of wheat phasic development to major environmental factors: a re-examination of some assumptions made by physiologist and modelers. *Australian Journal of Plant Physiology* **21**, 393-426.
- Slafer GA, Rawson HM (1995) Photoperiod \times temperature interactions in contrasting wheat genotypes: Time to heading and final leaf number. *Field Crops Research* **44**, 73-83.
- Sletvold N (2002) Effect of plant size on reproductive output and offspring performance in the facultative biennial *Digitalis purpurea*. *Journal of Ecology* **90**, 958-966.
- Sletvold N, Grindeland JM (2007) Fluctuating selection on reproductive timing in *Digitalis purpurea*. *Oikos* **116**, 473-481.
- Stinchcombe JR, Caicedo AL, Hopkins R, Mays C, Boyd EW, Purugganan MD, Schmitt (2005) Vernalization sensitivity in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae): the effects of latitude and FLC variation. *American Journal of Botany* **92**, 1701-1707.
- Stokes P, Verkerk (1951) Flower formation in Brussels sprouts. *Meded. Landbouwhogeschool Wageningen* **50**, 141-160.

- Suge H, Rappaport L (1968) Role of gibberellins in stem elongation and flowering in radish. *Plant Physiology* **43**, 1208-1214.
- Summerfield RJ, Asumadu H, Ellis RH, Qi A (1998) Characterization of the photoperiodic response of post-flowering development in maturity isolines of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] 'Clark'. *Annals of Botany* **82**, 765-771.
- Summerfield RJ, Roberts, EH, Ellis RH, Lawn RJ (1991) Towards the reliable prediction of time to flowering in six annual crops: I. The development of simple models for fluctuating field environments. *Experimental Agriculture* **27**, 11-31.
- Summerfield RJ, Roberts EH, Erskine W, Ellis RH (1985) Effects of temperature and Photoperiod on Flowering in Lentils (*Lens culinaris Medic.*) *Annals of Botany* **56**, 659-671.
- Sung S, Amasino RM (2004) Vernalization and epigenetics: how plants remember winter. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 4-10.
- Sung S, Amasino RM (2005) Remembering winter: toward a molecular understanding of vernalization. *Annual review of plant biology* **56**, 491-508.
- Tan FC, Swain SM (2006) Genetics of flower initiation and development in annual and perennial plants. *Physiologia Plantarum* **128**(1), 8-17.
- Taiz L, Zeiger E (1998) Chapter 24: The control of flowering. In 'Plant physiology 2nd edition'. Pp. 691-724. (Sinauer Associated, Inc. Sunderland, Massachusetts).
- Thomas B, Carré I, Jackson S (2006) Chapter 1: Photoperiodism and flowering. In 'The molecular biology and biotechnology of flowering' (Ed. BR Jordan) pp. 3-26. (CABI).
- Thomas B, Vince-Prue D (1997) Chapter 6: The physiology of photoperiodic floral induction. In: Thomas B, Vince-Prue D (Eds.) Photoperiodism in plants 2nd Edition. Academic Press. Pp: 143-180.
- Thompson K, Stewart AJA (1981) The measurement and meaning of reproductive effort in plants. *The American Naturalist* **117**, 205-211.
- Urbano Terrón P (1992) Capítulo III: El frío estimulador. En 'Tratado de fitotecnia general' pp. 37-54. (Mundi-Prensa Libros).
- Van der Meijden E, Van der Waals-Kooi RE (1979) The population ecology of *Senecio jacobaea* in a sand dune system I. Reproductive strategy and the biennial habit. *Journal of Ecology* **67**, 131-153.
- Van Dijk H, Boudry P, Mc Combie H, Vernet P (1997) Flowering time in wild beet (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) along a latitudinal cline. *Acta Oecologica* **18**(1), 47-60.
- Verkaar HJ, Schenkeveld AJ (1984) On the ecology of short-lived forbs in chalk grasslands: semelparity and seed output of some species in relation to various levels of nitrogen supply. *New Phytologist* **98**, 673-682.
- Vince-Prue D (1975) Vernalization. In 'Photoperiodism in plants' pp. 263-291 (Mc Graw Hill, London).
- Wang R (2007) Flowering-time control and perennialism in *Arabis alpina*, a perennial relative of *Arabidopsis thaliana*. Inaugural-Dissertation Zur Erlangung des Doktorgrades Der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät Der Universität zu Köln. 147 pág.

- Wang E, Engel T (1998) Simulation of Phenological Development of Wheat Crops. *Agricultural Systems* **58**(1), 1-24
- Wang SY, Ward RW, Ritchie JT, Fischer RA, Schulthess U (1995) Vernalization in wheat I. A model based on the interchangeability of plant age and vernalization duration. *Field Crops Resesarch* **41**, 91-100.
- Weiner J (1990). Chapter 11: The influence of competition on plant reproduction. In 'Plant reproductive ecology: patterns and strategies' (Eds. J Louvett Doust, L. Louvett Doust) pp. 228-246 (Oxford University Press US).
- Werner PA (1975) Predictions of fate from rosette size in teasel (*Dipsacus fullonum* L.). *Oecologia* (Berl.) **20**, 197-201.
- Werner PA, Caswell H (1977) Population growth rates and age versus stage-distribution models for teasel (*Dipsacus sylvestris* Huds.). *Ecology* **58**, 1103-1111.
- Wesselingh RA, de Jong TJ, Klinkhamer PGL, Van Dijk MJ, Schlatmann EGM (1993). Geographical variation in threshold size for flowering in *Cynoglossum officinale*. *Acta Botanica Neerlandica* **42**(1), 81-91
- Wesselingh RA, De Jong TJ (1995) Bidirectional selection on threshold size for flowering in *Cynoglossum officinale* (hound's tongue). *Heredity* **74**, 415-424.
- Wesselingh RA, Klinkhamer, PGL (1996) Threshold size for vernalization in *Senecio jacobaea*: Genetic variation and response to artificial selection. *Functional Ecology*. **10**(2), 281-288.
- Wesselingh RA, Klinkhamer PGL, De Jong TJ, Boorman, LA (1997) Threshold size for flowering in different habitats: effects of size-dependent growth and survival. *Ecology* **78**(7), 2118-2132.
- Wilhelm W, McMaster GS (1995) Symposium on the phyllochron: importance of the phyllochron in studying development and growth in grasses. *Crop science* **35**, 1-3.
- Wilkie JD, Sedgley M, Olesen T (2008) Regulation of floral initiation in horticultural trees. *Journal of Experimental Botany* **59**(12), 3215-3228.
- Wilkins H, Anderson NO (2007). Chapter 2: Creation of new floral products. In Flower Breeding and Genetics Issues, Challenges and Opportunities for the 21st Century. (Ed. NO Anderson) pp. 49-64 (Springer Netherlands).
- Windauer LB, Ploschuk EL, Benech-Arnold RL (2007) ¿Es el cambio de tasa de crecimiento el factor determinante de la inducción floral en *Lesquerella mendocina*? En: Actas del Workshop internacional: Ecofisiología Vegetal Aplicada al Estudio de la Determinación del Rendimiento y la Calidad de los Cultivos de Granos. Primer Encuentro Red Raíces de Ecofisiología SECyT. Mar del Plata, 6 y 7 de septiembre.
- Windauer LB, Slafer GA, Ravetta DA (2004) Phenological Responses to Temperature of an Annual and a Perennial *Lesquerella* Species. *Annals of Botany* **94**, 139-144.
- Whyte RO (1948) History of research in vernalization. In 'Vernalization and photoperiodism'. (Eds. AE Murneek., RO Whyte) pp. 1-38. (Waltham, M.A.: Chronica Botanica Company).
- Yan W, Wallace DH (1998) Simulation and prediction of plant phenology for five crops based on photoperiod x temperature interaction. *Annals of Botany* **81**, 705-716.

- Yanovski MJ, Kay SA (2002) Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. *Nature* **419**, 308-312.
- Yanovski MJ, Kay SA (2003) Living by the calendar: how plants know when to flower. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**, 265-276.
- Young TP (1985) *Lobelia telekii* herbivory, mortality, and size at reproduction: variation with growth rate. *Ecology* **66**(6), 1879-1883.
- Zaccai M, Edri N (2002) Floral transition in lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). *Scientia horticultrae* **95**, 333-340.