

EFFECTO DEL DESCENSO DE TEMPERATURA Y LA FERTILIZACIÓN NITROGENADA SOBRE EL ENDURECIMIENTO DE PLANTAS DE *Pinus halepensis* Mill.

PUÉRTOLAS, J; ALONSO, J; RODRÍGUEZ, M; GIL, L; Y PARDOS, J.A.

U. D. Anatomía, Fisiología y Genética. E.T.S.I. Montes. Ciudad Universitaria s/n. 28040. Madrid. E-mail: mfernandez@montes.upm.es

RESUMEN

Se estudió el proceso de endurecimiento de plantas de una savia de pino carrasco bajo dos regímenes de descenso de las temperaturas y dos tratamientos de fertilización (con y sin aplicación de nitrógeno). La evaluación del grado de endurecimiento se realizó por medio de la observación de la respuesta a una helada de -5°C en diferentes momentos del experimento, cuantificada por el descenso de la relación entre fluorescencia variable y máxima y el daño visible en las plantas.

La temperatura no ejerció gran influencia en el cese del crecimiento en altura, que fue controlado fundamentalmente por el fotoperiodo, pero sí determinó el grado de endurecimiento al frío. La fertilización nitrogenada provocó un mayor crecimiento, y un ligero retraso del endurecimiento, pero una vez cumplidos unos ciertos requerimientos de frío y fotoperiodo corto, esa diferencia se anuló.

P.C.: endurecimiento, fertilización, nitrógeno, fluorescencia de la clorofila, pino carrasco.

SUMMARY

Hardening process was studied in one-year-old Aleppo pine seedlings under two regimes of temperature decrease and two levels of fertilization (with and without nitrogen). Assessment of hardiness degree was made by measuring the seedling response to a frost at -5°C at several times along the experiment. This response was evaluated by the magnitude of the drops in variable to maximum chlorophyll fluorescence rate and visible damage of seedlings.

Temperature had little influence in height growth cessation, which was mainly controlled by photoperiod, but it determined hardiness degree. Nitrogen fertilization lead to greater growth and slight delay of hardiness. Although, those differences dissappeared when requirements in low temperature and short photoperiod were accomplished.

K.W.: hardening, fertilization, nitrogen, chlorophyll fluorescence, Aleppo pine.

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo se enmarca en el estudio de la calidad de planta de *Pinus halepensis*. El grado de endurecimiento de una planta de vivero es un factor esencial a la hora de definir su aptitud para ser trasplantada al campo. Cuanto mayor sea ese grado de endurecimiento, mayor será la capacidad para soportar el estrés producido durante la plantación, el estrés postrasplante y las heladas.

El proceso de endurecimiento viene controlado por factores ambientales como la temperatura y el fotoperiodo (WEISER 1970) difícilmente modificables por el viverista. Sin embargo, existen otros factores como la disponibilidad de agua y nutrientes (especialmente el nitrógeno) que también afectan a dicho proceso (ARNOTT et al. 1993; VAN DEN DRIESCHEN, 1991). Una práctica muy común en los viveros es la reducción del aporte de nitrógeno durante los últimos meses del cultivo para conseguir el endurecimiento de la planta.

El objetivo general del presente trabajo es el de comprobar la hipótesis, sugerida por observaciones en experimentos de fertilización previos, de que el aporte de nitrógeno retrasa el proceso de endurecimiento de las plantas de pino carrasco pero que una vez alcanzados ciertos requerimientos de temperatura y fotoperiodo, las plantas alcanzan un grado aceptable de endurecimiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Plantas de pino carrasco, de procedencia: La Mancha, fueron cultivadas en contenedores de plástico termoconformado (54 alvéolos por contenedor, 200 cm^3 por alvéolo, Arnabat 54/200) rellenos de turba rubia, en un vivero comercial de la provincia de Cuenca, de abril a septiembre. Entonces se trasladaron al laboratorio en la E.T.S.I. Montes de Madrid hasta el comienzo del experimento a finales de octubre.

Las plantas se introdujeron en una cámara de condiciones controladas con dos habitáculos A y B con $21,5^{\circ}\text{C}$ de temperatura en el ciclo diurno, 14°C en el ciclo nocturno, 80% de humedad relativa y 13 horas de fotoperiodo (PAR: $75\text{-}100\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) durante tres semanas. A partir de ese momento se procedió a un descenso progresivo de las temperaturas y el fotoperiodo (tabla 1)

Se efectuó un fertirriego cada 15 días a partir de la segunda semana del experimento. En el tratamiento de

fertilización 1 se aplicaron 110 mg/l de P y 290 mg/l de K; en el tratamiento 2 se añadieron además 40 mg/l de N.

Tabla 1. Condiciones ambientales en ambos habitáculos durante el experimento

Semana	Temperatura A (°C)		Temperatura B (°C)		Hum. (%)	fotoperiodo (horas)
	Día	Noche	Día	Noche		
0-6	21,5	14,0	21,5	14,0	80	13
7-13	21,5	14,0	21,5	14,0	80	13
14-20	21,5	14,0	21,5	14,0	80	13
21-27	21,2	13,4	21	13,0	80	12
28-34	20,9	12,8	20,5	12,0	80	12
35-41	20,6	12,2	20	11,0	80	11
42-48	20,3	11,6	19,5	10,0	80	11
49-55	20,0	11,0	19	9,0	80	10,5
56-62	19,7	10,4	18,5	8,0	80	10,5
63-69	19,4	9,8	18	7,0	80	10
70-76	19,1	9,2	17,5	6,0	80	10
77-83	18,8	8,6	17	5,0	80	9,5
84-90	18,5	8,0	16,5	4,0	80	9,5
91-93	18,5	8,0	16,5	4,0	80	9,5

Se realizaron 5 mediciones de cada uno de los parámetros estudiados durante el experimento. Todas las mediciones fueron realizadas en un intervalo de cuatro días. La semana en la que se realizó cada medición viene reflejada en sombreado en la tabla 1.

Para estimar crecimiento en altura se escogieron al azar, al comienzo del experimento, 20 plantas por tratamiento de fertilización y habitáculo y se midieron periódicamente. Adicionalmente se realizaron cinco cosechas de 12 plantas por tratamiento de fertilización y habitáculo para la determinación de nutrientes (N, P, K)

Para determinar el grado de endurecimiento se realizó periódicamente un test de helada a -5° C. Posteriormente se realizó un barrido durante los seis primeros días del valor Fv/Fm medido con un fluorímetro (Plant Stress Meter, Biomonitor AB, Umea, Suecia). Para contabilizar el daño producido al mes se anotó el índice de daño visible en acículas (IDV) siguiendo la escala: 0 = sin daño, 1= algunas acículas dañadas (<10%), 2 = 10-30% acículas dañadas, 3 = 40-60 % acículas dañadas, 4 = 70-90 % acículas dañadas, 5 = planta muerta.

RESULTADOS

En la tabla 2 se muestra el análisis de la varianza del modelo trifactorial (fecha de medición, tratamiento de nitrógeno y habitáculo) para la tasa de crecimiento relativo (RGR). Todos los factores fueron significativos, además de la interacción fecha de medición x habitáculo. En la figura 1 se comprueba que si bien existieron diferencias entre tratamientos de nitrógeno excepto en la última medición (de ahí la ausencia de significación para la interacción fecha x tratamiento de nitrógeno), las diferencias entre habitáculos sólo se dan en la segunda medición.

El efecto del nitrógeno sobre el crecimiento se mantuvo hasta que el fotoperiodo descendió de las 10 horas, mientras que las temperaturas sólo influyeron durante la fase de mayor crecimiento (fotoperiodo entre 11 y 12 horas).

Los valores inicial y final de la concentración respecto a peso seco de N, P y K en acículas se recogen en la tabla 3. En la tabla 2 se comprueba que no hubo diferencias en concentración de nutrientes entre plantas de diferentes habitáculos, pero sí entre tratamientos de fertilización y entre fechas de medición.

Fuente de variación	RGR	N
Habitáculo (H)	< 0,0001	0,2645
Fertilización (F)	< 0,0001	< 0,0001
Fecha de medición (D)	< 0,0001	0,0029
H x F	0,2415	0,9236
H x D	< 0,0001	0,2629
F x D	0,0517	< 0,000

Tabla 2. Valor de significación (p) obtenida del análisis de la varianza de la tasa de crecimiento relativo (RGR) y la concentración de nitrógeno (N). En negrita, valores de p significativos ($p < 0,05$)

Habitáculo x fertilización	N (%)	P (%)	K (%)
A x 1	1,02 $\pm$ 0,09	0,57 $\pm$ 0,03	1,33 $\pm$ 0,07
A x 2	1,54 $\pm$ 0,02	0,52 $\pm$ 0,04	1,23 $\pm$ 0,05
B x 1	0,99 $\pm$ 0,06	0,52 $\pm$ 0,06	1,33 $\pm$ 0,07
B x 2	1,50 $\pm$ 0,02	0,47 $\pm$ 0,03	1,23 $\pm$ 0,05

Tabla 3. Concentración de N, P y K respecto a peso seco de acículas de plantas de cada combinación habitáculo x tratamiento el día 93. (Media $\pm$ error estándar; n = 4)

El índice de daño visible en acículas descendió en todas las combinaciones tratamiento x habitáculo. Sin embargo el patrón de descenso fue muy diferente según el habitáculo (figura 1). Mientras que en el habitáculo A el descenso el índice de daño quedó con un valor medio por encima de 2 al final del experimento, las plantas del habitáculo B eran totalmente resistentes a la helada provocada ($IDV = 1$). En la tercera medición, el porcentaje de planta dañada ($IDV > 1$) fue considerablemente mayor en las plantas del tratamiento 2 que en el 1 comparando las plantas del habitáculo B.

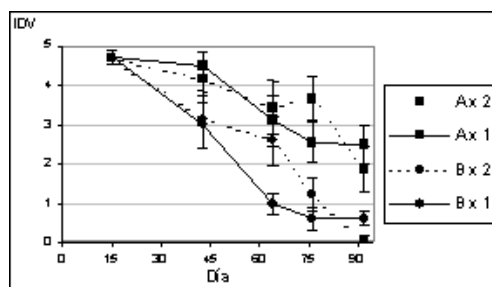


Figura 1. Evolución del índice de daño visible (IDV) en acículas.

En la figura 2 se aprecia la evolución del valor medio del parámetro F_v/F_m en plantas con daño escaso ($IDV < 2$) y con daño más acusado ($IDV \geq 2$) de todas las mediciones realizadas durante el experimento. Se observa que las plantas resistentes sufrieron un pequeño descenso pero a partir de las 36 horas se recuperaron paulatinamente. Sin embargo, F_v/F_m de las plantas no resistentes descendió bruscamente en las primeras 36 horas y luego más lentamente en los días siguientes.

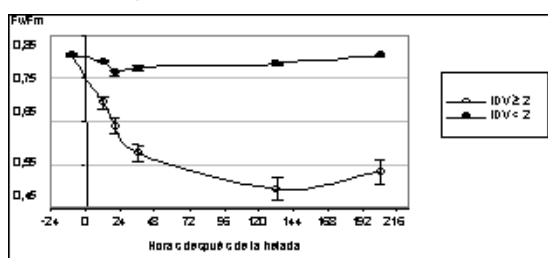


Figura 2. Descenso del valor F_v/F_m tras la helada en plantas con $IDV \geq 2$ y con $IDV < 2$

Los valores medidos muestran una dispersión de datos muy amplia. La distinta amplitud de las barras de error del valor F_v/F_m de las plantas dañadas y de las plantas sin daño, revelan la falta de homocedasticidad al comparar tratamientos. Por tanto se ha recurrido a métodos estadísticos no paramétricos y a diagramas de cajas para poder analizar diferencias en estos datos.

Para simplificar el tratamiento de diferencias entre tratamientos se escogió el parámetro que mejor relación tuvo con el índice de daño final: el valor de descenso de F_v/F_m a las 130 horas respecto al valor anterior a la helada ($\Delta F_v/F_m_{130}$). En la figura 3 se muestran los diagramas de cajas para cada combinación tratamiento x habitáculo en cada una de los cinco días de medición. En esta figura se observa como $\Delta F_v/F_m_{130}$ presenta una mayor proporción de valores altos (descensos grandes de F_v/F_m) en las plantas del habitáculo A en los días 64 y 78. En la tabla 4 se muestra el valor de significación del test de Kruskal-Wallis en cada una de las mediciones de lo que se deduce que en todas las mediciones las diferencias fueron significativas entre tratamientos.

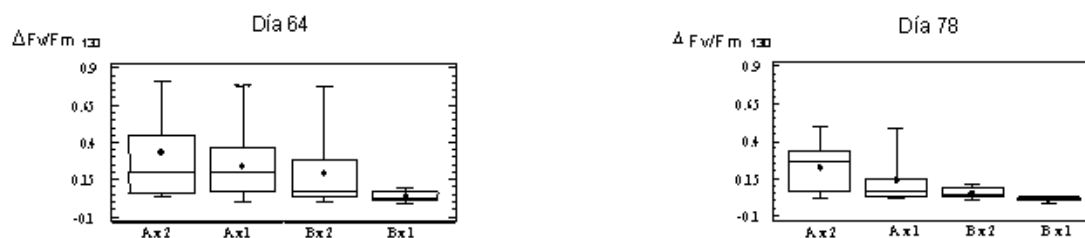


Figura 3. Diagramas de cajas de los resultados de las mediciones de Fv/Fm a las 130 horas de la helada. Las cajas indican el valor de los cuartiles superior e inferior y la mediana. Las barras incluyen el 90 % de los datos. Las medias se representan por puntos.

Tabla 4. Valor de significación del test de Kruskal - Wallis para la variable $\Delta Fv/Fm_{130}$ entre las distintas combinaciones habitáculo x fertilización.

Día de medición	43	64	78	93
Valor de p	0,0023	0,0356	0,0027	0,0197

A medida que avanza el proceso de endurecimiento se observa una “compresión” de los diagramas de cajas, lo que indica una menor proporción de valores altos de $\Delta Fv/Fm_{130}$. Las plantas de B x 1, ya en el día 64, mostraban una dispersión muy baja, indicando que la sensibilidad a la helada provocada era muy baja. Sin embargo, algunas plantas de B x 2 resultaron aún sensibles a la helada. En el día 78 ambos tratamientos eran aún menos sensibles, pero aún se mantenían las diferencias como atestigua el valor de la p al comparar únicamente estos dos tratamientos ($p=0,0141$). Finalmente, en la última medición, a pesar de las diferencias anteriores, ambos tratamientos quedaron igualados ya que las plantas de B x 2 ya no mostraron sensibilidad alguna.

DISCUSIÓN

La tasa de crecimiento descende de forma muy similar en todas las combinaciones. Cuando el fotoperiodo descendió a 10,5 horas, se produjo una parada brusca del crecimiento en todos los tratamientos. El efecto del descenso temperatura no fue significativo excepto en la fase de crecimiento más activo (medición del día 46). BIGRAS et al. (1996) tampoco encontró diferencias de alargamiento del tallo para diferentes regímenes de temperaturas durante el endurecimiento de plantas de *Picea mariana*, mientras que está suficientemente demostrada la relación entre fotoperiodo y cese de crecimiento. El efecto del nitrógeno también resultó significativo al igual que en los resultados obtenidos con dicha especie.

A pesar de que las temperaturas tuvieron escasa influencia en el crecimiento a partir de un fotoperiodo inferior a 12 horas, sí fueron determinantes en el endurecimiento. SALA (2000) encontró que el cese y la duración de la actividad mitótica medidos en material vegetal no juvenil de *Picea abies* únicamente estaba regulado por el fotoperiodo, mientras que el nivel de endurecimiento al frío estaba regulado por igual por el fotoperiodo y la temperatura. En *Chamaecyparis nootkatensis*, el crecimiento del tallo, así como la actividad de intercambio gaseoso también se redujeron más por efecto de fotoperiodos cortos que por temperaturas bajas (PUTONEN y ARNOTT 1994). En el caso de *Pinus halepensis*, el fotoperiodo parece tener una influencia secundaria en la sensibilidad de las acículas al test de la helada: el índice de daño en acículas y el parámetro $\Delta Fv/Fm_{130}$ presentan valores altos y de igual magnitud cuando las temperaturas nocturnas son similares y superiores a 7° C, con independencia de la longitud del fotoperiodo.

El efecto del nitrógeno en el proceso del endurecimiento no está aun claramente determinado. Mientras que algunos estudios indican una reducción del endurecimiento por efecto de altas concentraciones de nitrógeno (VAN DEN DRIESCHE 1991), otros encuentran un retraso del endurecimiento con niveles sub-óptimos de N (BIGRAS et al. 1996). En otros estudios, no se encuentra una influencia del nitrógeno en el desarrollo del endurecimiento (HAWKINS et al. 1995). Esto demuestra las diferencias existentes entre distintas especies y entre diferentes estadios del endurecimiento. Por encima de 7° C de temperatura nocturna no se detectaron diferencias significativas para el valor $\Delta Fv/Fm_{130}$ entre los dos niveles del factor fertilización. Cuando la temperatura descendió sí se

detectó una ligera mayor sensibilidad de las plantas fertilizadas con nitrógeno a la helada. Por tanto, en el pino carrasco, y con los niveles ensayados de aporte de N, la fertilización nitrogenada sólo retrasa algo el proceso de endurecimiento. Al alcanzarse los 4° C de temperatura nocturna, la resistencia de las plantas de ambos tratamientos a la helada de -5° C fue total.

CONCLUSIONES

El cese del crecimiento activo en pino carrasco vino determinado por el descenso del fotoperiodo por debajo de 12 horas, mientras que las temperaturas tuvieron muy poca influencia en este proceso. Sin embargo, el proceso de endurecimiento estuvo marcado principalmente por el efecto de las temperaturas. Cuando las temperaturas descendieron por debajo de los 8° C en el ciclo de noche, las plantas resistieron la helada provocada de -5°C.

La fertilización con nitrógeno tuvo influencia en el crecimiento: las plantas que recibieron nitrógeno crecieron más incluso cuando la fase de crecimiento más activo había terminado. Sin embargo, el endurecimiento se vio muy poco afectado por ese factor. Las plantas fertilizadas con nitrógeno presentaron una ligera mayor susceptibilidad a la helada que las plantas sin nitrógeno únicamente cuando las plantas empezaron a mostrar los primeros síntomas de endurecimiento, pero al alcanzarse los 4°C de temperatura nocturna, las diferencias desaparecieron y ambos tratamientos se mostraron completamente endurecidos.

AGRADECIMIENTOS

A Genfora S.A. por la colaboración prestada en el cultivo de las plantas.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología a través del Programa Nacional de I+D en su apartado de Proyecto Movilizador I+D de Ayuda a la Forestación. También participa en la financiación el Instituto Nacional de Investigación Agraria por medio de una beca predoctoral.

BIBLIOGRAFÍA

- BIGRAS, F.J.; GONZALEZ, A; D'AOUST, A.L.; HÉBERT, C; (1996). *Frost hardiness, bud phenology, and growth of containerized Picea mariana seedlings grown at three nitrogen levels and three temperature regimes*. New Forests 12 (3) pp. 243-259
- ARNOTT, J.T.; GROSSNICKLE, S.C.; PUTTONEN, P.; MITCHELL, A.K.; FOLK R.S; (1993). *Influence of nursery culture on growth, cold hardiness, and drought resistance of yellow cypress*. Can.adian Journal of Forest Research 23 pp 2537-2547.
- HAWKINS, B.J.; DAVRADOU, M.; PIER, D.; SHORTT, R; (1995) *Frost hardiness and winter photosynthesis of Thuja plicata and Pseudotsuga menziensis seedlings grown at three rates of nitrogen and phosphorus supply*. Canadian Journal of Forest Research 25 pp 18-28
- PUTTONEN, P.; ARNOTT, J.T; (1994). *Influence of photoperiod and temperature on growth, gas exchange, and cold hardiness of yellow cypress seedlings*. Canadian Journal of Forest Research 24 pp 1608-1616.
- SALA, E; (2000). *Influencia del fotoperiodo y de la temperatura en la actividad mitótica y en el endurecimiento frente a bajas temperaturas de poblaciones no juveniles de Picea abies (L.) Karst*. Proyecto Fin de Carrera. E.T.S.I. Montes. Universidad Politécnica de Madrid (sin publicar)
- VAN DEN DRIESSCHEN, R; (1991). *Effects of nutrients on stock performance in the forest*. pp 229-260. In: van den Driessche, R. (Ed) Mineral Nutrition of Conifer Seedlings. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- WEISER, C.J.; (1970) *Cold resistance and injury in woody plants*. Science 169 pp:1269-1278.