

# ENDURECIMIENTO EN VIVERO DE ESPECIES LEÑOSAS MEDITERRÁNEAS DESTINADAS A PLANTACIÓN FORESTAL

**Manuel Fernández Martínez**

Universidad de Huelva. Escuela Politécnica Superior. Campus de La Rábida. 21819-PALOS DE LA FRONTERA (Huelva, España). Correo electrónico: manuel.fernandez@dcaf.uhu.es

## INTRODUCCIÓN

El principal objetivo de una plantación forestal es el establecimiento con éxito de ésta. Dicho establecimiento, que en términos generales implica supervivencia y crecimiento, puede definirse de varias formas, pero los impedimentos encontrados en el cumplimiento de este objetivo son bastante comunes a todas ellas (BIRCHLER *et al.*, 1998; NAVARRO *et al.*, 2006), siendo éstos, a grandes rasgos:

- La existencia de factores microambientales desfavorables, específicos del lugar y/o la fecha de plantación.
- La competencia vegetal y los daños producidos por animales.
- El uso de procedimientos de manejo y plantación incorrectos.
- El empleo de plantas genéticamente inadecuadas.
- El empleo de plantas morfológica y fisiológicamente inadecuadas.

Es en el último aspecto señalado donde adquiere importancia la labor de cultivo en el vivero. El viverista debe procurar expedir las plantas con la mayor calidad (morfológica y fisiológica) posible. Esto implicaría la necesidad de definir la *planta de calidad*, así como la mejor manera de evaluarla. El concepto de calidad, no obstante, es relativo pues no sólo la especie, sino el lugar y época de plantación, la preparación del terreno y el objetivo de la plantación marcarán diferencias. Además, la calidad en la planta es efímera, pudiendo perderse en

unos pocos días en el vivero si no se mantienen los cuidados pertinentes, o bien, si el manejo o el transporte hasta el tajo no son los adecuados.

Por tanto, una vez cuidada la calidad genética y morfo-fisiológica del producto final, llegado el caso, serían atribuibles a los factores ambientales y de manejo de las plantas, en gran medida más difíciles de controlar, las principales causas de un posible fracaso de la plantación. Por ello, para centrarnos en el tema que nos ocupa, diremos que, una vez escogida la especie y el genotipo, durante el cultivo en el vivero podemos diferenciar a grandes rasgos tres fases (propagación, crecimiento y endurecimiento), diferenciadas, entre otras cosas, por los cuidados culturales aplicados a las plantas (LANDIS *et al.*, 1998). Es en la última fase del cultivo, el *endurecimiento*, cuando se pretende preparar a las plantas para la fase de despacho y plantación procurando, generalmente, que se ralentice la actividad vegetativa y se logre un mayor grado de resistencia a algún tipo de estrés (estrés hídrico, helada, etc.) tras ser sometida a dosis subletales de ese estrés, al tiempo de modificar en parte su metabolismo, morfología y resistencia a otros tipos de estrés (VILAGROSA *et al.*, 2006). Cabe añadir que el endurecimiento dependerá, además de factores ambientales, del genotipo (FERNÁNDEZ Y PARDOS, 1995; AITKEN & HANNERZ, 2001) y del tipo de tejido analizado (BIGRAS *et al.*, 2001; RITCHIE & LANDIS, 2003).

La ralentización de la actividad vegetativa implica, en primera instancia, inducir el letargo, dormición o reposo vegetativo. Conviene aclarar

que dormición no es sinónimo de endurecimiento, la primera se suele referir a los tejidos meristemáticos, considerándola como dormición de tipo innato en la que los tejidos no crecen aunque se dieran las condiciones ambientales favorables para hacerlo. Mientras que el endurecimiento, por el contrario, es un proceso fisiológico interno que generalmente se desarrolla durante el estado de reposo y que representa un estado de mayor resistencia del conjunto de toda la planta (LANDIS et al., 1998). Dormición y endurecimiento están, no obstante, relacionados puesto que una planta necesita entrar en dormición para completar su proceso de endurecimiento y alcanzar sus niveles más altos de resistencia al estrés. A pesar de tener la posibilidad de adquirir cierto grado de resistencia en tejidos no durmientes (p. ej. *Quercus ilex* puede llegar a soportar  $-7^{\circ}\text{C}$  en la parte aérea en plantas vegetativamente activas).

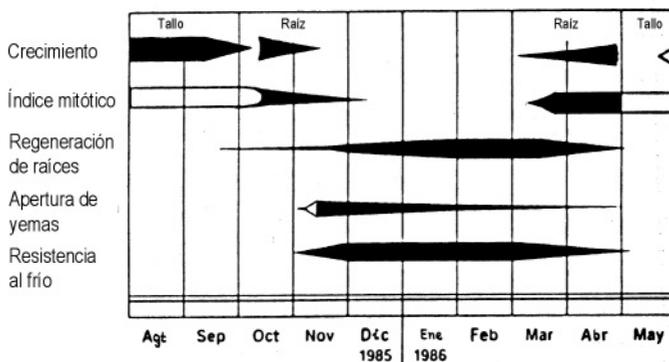
En ambiente mediterráneo, con clima de estaciones bien marcadas, las plantas perennes deben sincronizar su fenología con las condiciones ambientales de cada momento del año, modificando su metabolismo y adaptándose a un amplio rango de regímenes de temperatura y humedad. Esto es lo que se denomina *ciclo de dormición* y para ello anticipan los cambios ambientales empleando pistas fiables como la temperatura o el fotoperiodo, siendo éste un proceso espontáneo en la naturaleza. Este ciclo fue razonablemente descrito por el modelo de grados del estado de crecimiento, desarrollado por Fuchigami y Nee en 1987 (LANDIS et al., 1998).

En él se describe el ciclo anual de crecimiento y su relación con el estado de dormición de los meristemos terminales del tallo, con el grado de endurecimiento y con la resistencia al estrés. En la figura 1 observamos un ejemplo práctico de ello. Sin embargo, no contempla los meristemos laterales ni las raíces, por lo que debe ser utilizado como una guía de referencia pero teniendo presente esta última salvedad.

### DORMICIÓN DE LAS YEMAS

Dentro de los procedimientos más comunes de evaluación de la *dormición* (RITCHIE & LANDIS, 2004), podemos señalar:

- El ensayo de *apertura de yemas*, que es el tiempo requerido (generalmente en días) por la yema terminal de la planta para abrirse una vez puesta en un ambiente favorable (DAY). En especies con requerimientos de frío durante la época de reposo invernal, el tiempo requerido para abrir las yemas se reduce a medida que aumenta la cantidad de *horas de frío acumuladas*. Se puede establecer una buena correlación entre las horas de frío acumuladas y la velocidad de apertura de las yemas para cada especie y ecotipo, lo que nos permitiría conocer el estado de dormición con tan solo llevar un registro de temperaturas en el vivero (Figura 2).
- Para evitar la influencia de las variaciones anuales y estacionales de la temperatura, que



**Figura 1.** Evolución estacional del crecimiento, estado de dormición (medido mediante el índice de actividad mitótico de las yemas y mediante el ensayo de apertura de yemas), potencial de regeneración de raíces y resistencia al frío, de *Picea sitchensis* en Escocia (CANNELL et al., 1990)

altera sensiblemente la correspondencia entre horas-frío y velocidad de apertura de yemas, se propuso el *índice de pérdida de la dormición* (IPD). Éste se define como el cociente entre ( $DAY_{\min}$ ) y DAY, siendo  $DAY_{\min}$  el número medio de días que tardan en abrir las yemas cuando han cubierto totalmente sus requerimientos de frío. Se ha comprobado que la relación entre IPD y las horas-frío acumuladas se mantiene constante entre años, por lo que es más fiable que DAY.

- c) El *índice mitótico* mide la actividad mitótica en las yemas. Ésta disminuye de manera constante durante el otoño, alcanzando un valor cercano a cero en el punto en que las plantas entran en reposo. La principal ventaja sobre los ensayos de apertura de yemas es ser una de las pocas medidas directas de un proceso fisiológico que pueden hacerse con rapidez. La mayor desventaja es que permanece con valor cercano a cero hasta el inicio de la primavera, por lo que no es útil para conocer cómo progresa la dormición.

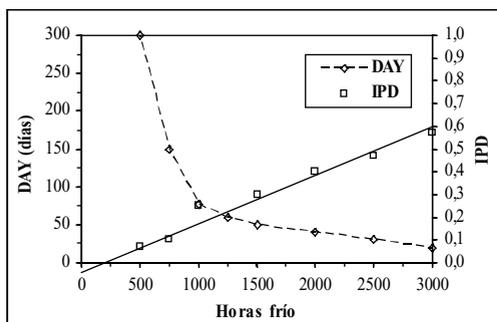
La cuestión del empleo de estas u otras técnicas de medición de la dormición, como método de evaluación del estado vegetativo de las plantas, se centra en si los resultados obtenidos con las yemas se pueden extrapolar a la totalidad de la planta. No obstante, es una herramienta sencilla para estimar el estado vegetativo de las plantas siempre que vaya acompañada de un conocimiento exhaustivo de la historia de éstas en el vivero, o de parámetros indicadores de la composición mineral, las reservas energéticas,

la capacidad de crecimiento, la regeneración de raíces o la resistencia al estrés.

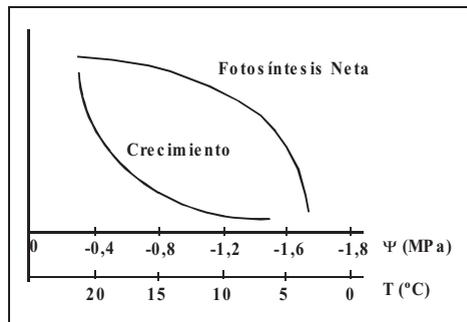
## ENDURECIMIENTO DE ESPECIES MEDITERRÁNEAS

Dicho lo anterior, la fase de endurecimiento en el vivero se puede dividir en dos etapas consecutivas: inducción de la dormición y acondicionamiento al estrés. Son dos etapas distintas tanto en el objetivo a conseguir como en las técnicas culturales a aplicar a las plantas (LANDIS *et al.*, 1998). Las plantas en el vivero pueden comenzar su acondicionamiento al estrés de forma natural, por su exposición a las condiciones ambientales, pero es posible acelerar, mejorar y/o completar dicho proceso modificando convenientemente factores como la temperatura, el fotoperíodo, el riego, la fertilización, la humedad relativa, etc. Factores que conviene aplicarlos a las plantas a dosis moderadas, para no inducir un grado alto de estrés que pueda revertir el proceso. En la figura 3 se puede observar cómo a medida que aumenta el estrés hídrico, o bien desciende la temperatura, el crecimiento cesaría antes que la fotosíntesis, pudiendo utilizarse los excedentes de fotoasimilados como material de reserva o para otras funciones.

Las características de los viveros forestales y de los ambientes de repoblación españoles han dado lugar a que se preste mayor atención al endurecimiento inducido por estrés hídrico, por fertilización y por bajas temperaturas



**Figura 2.** Relación entre las horas-frío acumuladas por debajo de un umbral de temperatura con el número medio de días para la apertura de las yemas (DAY) y con el índice de pérdida de la dormición (IPD)



**Figura 3.** Evolución teórica de la fotosíntesis neta y el crecimiento de una planta en función de la variación del potencial hídrico xilemático o de la temperatura ambiente

(VILAGROSA *et al.*, 2006). Estos últimos autores realizan una revisión exhaustiva del estado actual del conocimiento sobre el endurecimiento de especies leñosas mediterráneas, cuyos principios de funcionamiento no siempre coinciden con los de las coníferas boreales, tradicionalmente más estudiadas. Por tanto, se anima al lector a la lectura de dicho capítulo, así como al capítulo dedicado a la nutrición mineral en el mismo libro (OLIET *et al.*, 2006). Como consecuencia, en lo sucesivo nos centraremos en algunos ejemplos prácticos de evaluación del endurecimiento, con especial énfasis en la resistencia al frío, en función de las variables de cultivo puestas en juego. La justificación de haber escogido la evaluación de la resistencia al frío para la evaluación del endurecimiento se basa en que es uno de los parámetros más utilizados por su gran variedad de aplicaciones (Tabla 1). No obstante, recientemente, se han propuesto sistemas de control de calidad de las plantas más completos, incluso para especies mediterráneas (NAVARRO Y DEL CAMPO, 2006).

### Resistencia al frío

¿Qué ocurre dentro de las plantas cuando están sometidas a temperaturas bajo cero y cómo las pueden tolerar?. La parte viva de los tejidos (simplasto) está delimitada por las membranas celulares, mientras que la parte sin vida (apoplasto) la constituyen las células sin lumen, los elementos xilemáticos, los espacios intercelulares y las paredes celulares. En el apoplasto el agua es casi pura, por lo que su punto de congelación está próximo a 0°C. Sin embargo, en el simplasto, las sales, azúcares, aminoácidos, proteínas y demás sustancias disueltas bajan su punto de congelación, tanto más cuanto mayor sea la con-

centración de éstas. Por tanto, al descender la temperatura, primero se van formando pequeños cristales de hielo en el apoplasto, sin afectar al simplasto, aun siendo su temperatura menor de 0°C. Consecuencia de esto, como el hielo tiene afinidad por el agua, parte del agua del simplasto sale hacia el apoplasto, permaneciendo dentro de la célula las sustancias disueltas por no poder atravesar la membrana citoplasmática, lo que aumenta la concentración de solutos en el simplasto, baja aún más el punto de congelación y se incrementa el grado de resistencia al frío (RITCHIE & LANDIS, 2003). Posteriormente, cuando la temperatura aumenta, el proceso tiene lugar en sentido contrario. Si el tejido no fuese lo suficientemente resistente al frío, los cristales de hielo aumentarían demasiado y se deshidratarían severamente las células, lo que llevaría a una desnaturalización de las proteínas y a la ruptura del plasmalema, liberándose el contenido citoplasmático en el apoplasto.

No obstante, los mecanismos de resistencia al frío que presentan las células son algo más complejos que lo dicho en el párrafo anterior, e interactúan varios factores (SUTINEN *et al.*, 2001; ZWIAZEK *et al.*, 2001), señalando como más relevantes:

- *Acumulación de solutos* (pasiva o activa) en el simplasto. Con ello baja el punto de congelación y tolera bajas temperaturas evitando la formación de cristales de hielo dentro de los protoplastos celulares. Esta propiedad es fácilmente modificable mediante prácticas de cultivo en vivero que permitan la acumulación de solutos (p.ej.: fertilización, reducción de riegos, control del crecimiento). Además, éste es el mismo fenómeno implicado en la resistencia a estrés hídrico

Compañía	Tipos de ensayos ofertados			
	Morfología	CCR	Resistencia al frío	Otros
Roseburg forest products (USA)	X	X	X	X
Nursery technology cooperative (USA)	X		X	
KBM forestry consultants (Canadá)	X	X	X	X
Laboratory for forest soils and environmental quality (Canadá)		X	X	X

**Tabla 1.** Ejemplo de compañías norteamericanas que ofrecen sus servicios para la estimación de la calidad de las plantas y los parámetros que suelen utilizar (modificado de RITCHIE & LANDIS, 2003). CCR = Capacidad de crecimiento de raíces

- (ajuste osmótico) durante el endurecimiento por reducción de riegos.
- Cambios en las *propiedades de las membranas* celulares, haciéndolas más resistentes a la desecación y la ruptura (p.ej. grado de insaturación de los ácidos grasos de la fracción fosfolipídica, relación lípidos-proteínas, dehidrasas, etc.)
  - Capacidad de alcanzar temperaturas por debajo del punto de congelación pero manteniendo líquida el agua (*supercooling*). Esta última es una estrategia de evitación, mientras que las anteriores son de tolerancia, y suele ser habitual en especies que habitan en climas no muy fríos (temperatura mínima > -40°C).

### Métodos de evaluación de la resistencia al frío

Son numerosos los métodos utilizados para evaluar el daño producido por el frío (heladas). Cada uno de ellos con sus ventajas e inconvenientes, en función del tamaño de muestra a emplear, la rapidez y precisión de los resultados, la complejidad técnica para su realización o los costes económicos. Hoy en día están muy extendidos los tests de frío consistentes en someter toda o parte de la planta a temperaturas por debajo de 0°C y posteriormente medir el daño ocasionado. La helada se aplica lentamente (entre 2 y 6°C h<sup>-1</sup>) mediante una cámara frigorífica y un regulador de temperatura y, una vez alcanzada la temperatura mínima (generalmente situada entre -5 y -20°C), se mantiene durante 1 a 3 h. Seguidamente se vuelve a subir lentamente la temperatura hasta temperatura ambiente, pudiendo ser la tasa de subida algo mayor que la de bajada. Posibles métodos son:

- a) Si el test se aplica a toda la planta (*test de frío en planta completa*), las raíces deben ser aisladas durante la aplicación del frío, y las plantas se llevan posteriormente a una cámara de cultivo (o un invernadero) con condiciones favorables para el crecimiento. Pasados de 7 a 15 días se observan visualmente los daños (porcentaje de hojas, yemas y/o cambium necróticos). Para la evaluación de los daños se suele emplear una escala que, con algunas variaciones, podría ser del tipo siguiente: 0 = Sin daños; 1 = Yemas dañadas; 2 = Yemas pueden estar dañadas y 10-30% hojas muertas; 3 = 31-60% de hojas

muertas; 4 = 61-90% de hojas muertas; 5 = Planta muerta.

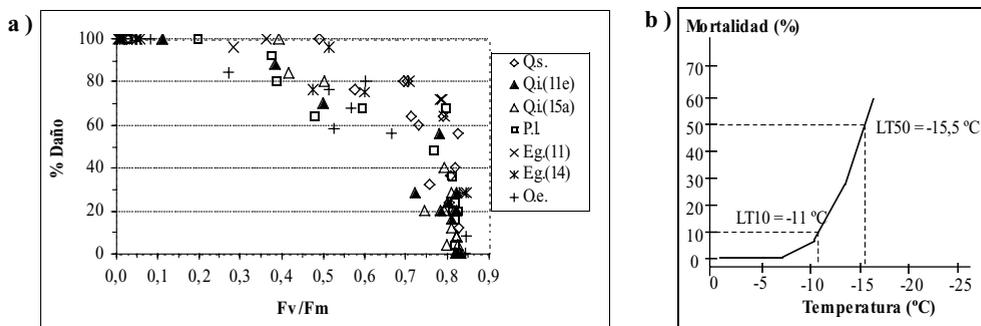
- b) Una variante del test anterior, consiste en someter a las plantas al choque de frío para después (al día siguiente) evaluar los daños causados en las hojas (en el sistema fotosintético) mediante un medidor de *fluorescencia de la clorofila*. Se ha comprobado que, éste último, es un test rápido, fiable y de fácil interpretación, pero necesita de un laboratorio básico y un técnico que interprete los resultados. Esta propiedad de la fluorescencia de la clorofila se ha utilizado ampliamente para el estudio de la fisiología de las hojas sometidas a distintos tipos de estreses ambientales (temperatura elevada, sequía, helada, salinidad, contaminación, deficiencias minerales, herbicidas, etc.) y a la dormición invernal (MOHAMMED et al., 1995). No obstante, este test debe ser calibrado con un test de daños en planta completa (Figura 4a), o con la respuesta en campo, para validar e interpretar los resultados. De todos los parámetros derivados, los más útiles para la estimación de la resistencia al frío y del proceso de endurecimiento invernal han resultado ser Fo, Fv, Fmax y, especialmente, dos parámetros derivados de la combinación de estos (Fv/Fmax y Fv/Fo). Siendo: Fo la fluorescencia mínima, cuando el potencial fotoquímico es máximo, procedente de los pigmentos antena antes de que los excitones alcancen el centro de reacción; Fmax la fluorescencia máxima, emitida cuando todos los centros de reacción están "cerrados"; Fv la fluorescencia variable (Fv = Fmax - Fo); Fv/Fmax es la medida cuantitativa de la eficiencia fotoquímica del fotosistema II (PSII), cuyo valor típico oscila normalmente entre 0,75 y 0,85; Fv/Fo su valor disminuye durante el proceso de endurecimiento hasta aproximarse a cero, y aumenta bruscamente al reanudarse la actividad vegetativa.
- c) Si el test se aplica a parte de una planta (meristemo apical o lateral, trozos de raíces, tallos, hojas, etc.), por sencillez, rapidez y facilidad de interpretación de resultados, se aconseja el método de medición del aumento de la *conductividad eléctrica por libera-*

*ción de electrolitos.* Para ello se mide la conductividad eléctrica de una solución acuosa donde se sumerge el tejido, en la cual hay sustancias electrolíticas disueltas, liberadas por las células dañadas por efecto del frío. Ésta se compara con otra solución acuosa (control) que no fue sometida a la helada, a partir del cálculo del índice de daño (Id), el cual varía entre 0 y 100% y representa el porcentaje de aumento de la conductividad eléctrica de las muestras sometidas al frío respecto de las control. Este ensayo se completa en 3 días, es muy fiable y sencillo de interpretar. Necesita de un laboratorio básico y también necesita ser calibrado con el test de frío en planta completa o con la respuesta en campo (Figura 5).

- d) Existe un alto grado de correlación entre los tres tipos de tests anteriormente expuestos (FERNÁNDEZ *et al.*, 2003; ROYO *et al.* 2003), así como entre estos tests y la respuesta en campo (BURR *et al.*, 2001; RITCHIE & LANDIS, 2006). Asimismo, se puede utilizar una variante que es el *test de hojas sueltas y enteras*, aplicado recientemente con éxito tanto a *Eucalyptus globulus* (FERNÁNDEZ *et al.*, 2007), como a encina. Este último test permite gran rapidez en el muestreo, así como en la obtención de resultados, pudiendo ser evaluados éstos tanto por la observación de daños visuales como por medio de la fluorescencia de la clorofila.

- e) Entre otros métodos, menos usuales, pero también de gran precisión y rapidez, podemos citar el análisis térmico en sus distintas variantes, siendo la más común el análisis térmico diferencial; o la espectroscopia de impedancia eléctrica (BURR *et al.*, 2001). El análisis térmico ha sido aplicado con éxito a especies tan dispares como *Eucalyptus sp.* y *Pinus canariensis* (SCARASCIA-MUGNOZZA *et al.*, 1989; LUIS *et al.*, 2007), obteniéndose, además, buenas correlaciones con otros métodos de medición y con la respuesta posterior de las plantas. Más reciente es la aplicación de las variaciones en la actividad de los genes como estimación del grado de endurecimiento de las plantas (WORDRAGEN *et al.*, 2007). Esta última técnica, según asegura la empresa que la realiza, es rápida (1-2 días desde que reciben las muestras) y está disponible para *Picea abies*, *Pinus sylvestris*, *Fagus sylvatica* y *Pseudotsuga menziesii*. Para aplicarlo a cada especie, debe ser calibrado previamente con uno de los tests de resistencia al frío ya comentados más arriba.

Una vez determinado el test a aplicar, los resultados se expresarán en función de si se ha medido a una o a varias temperaturas mínimas, o de las distintas definiciones de resistencia al frío que podemos encontrar. Ésta se puede definir como la temperatura más baja a la cual se puede exponer una planta sin ser dañada. O también, muy extendida, se define como la tempera-



**Figura 4. a)** Relación entre el porcentaje de daño en hojas (observación visual a los 15 días) y los valores del parámetro Fv/Fm medido al día siguiente del test de frío, para diversas especies forestales arbóreas. Q.s. = *Quercus suber*, Q.i. = *Quercus ilex ssp. ballota* (dos regiones de procedencia), P.l. = *Pistacia lentiscus*, E.g. = *Eucalyptus globulus* (dos clones comerciales), O.e. = *Olea europaea var. sylvestris*. **b)** Ejemplo de cálculo de las temperaturas a las cuales se producen el 50 % (LT50) y el 10 % (LT10) de daños en las plantas. Para ello se deben realizar varios tests de frío a distintas temperaturas y estimar el daño en cada uno de ellos

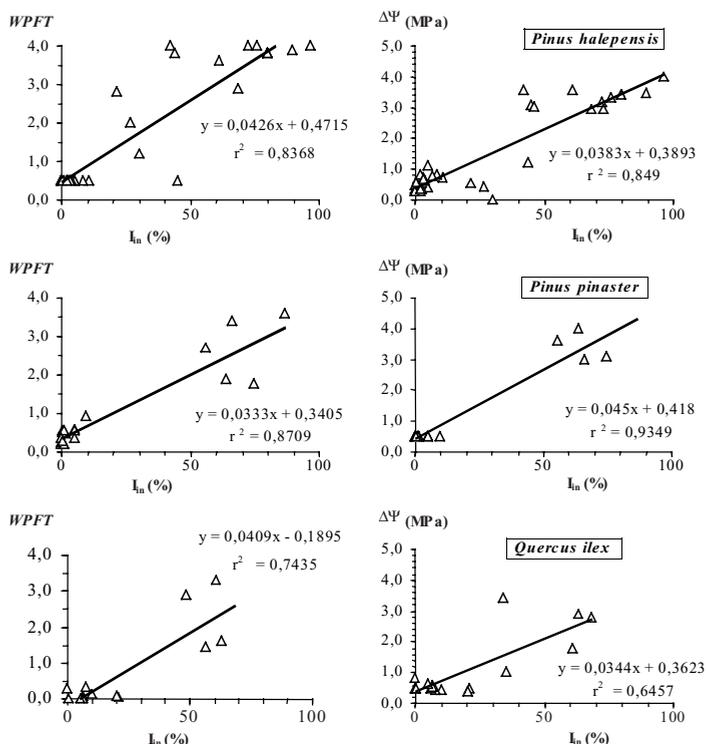
tura mínima a la cual se mueren el 50% de las plantas o se causa el 50% de daños a éstas (temperatura letal 50, LT50); igualmente se podría calcular LT10, etc. (Figura 4.b).

### Variabes de cultivo y resistencia al frío

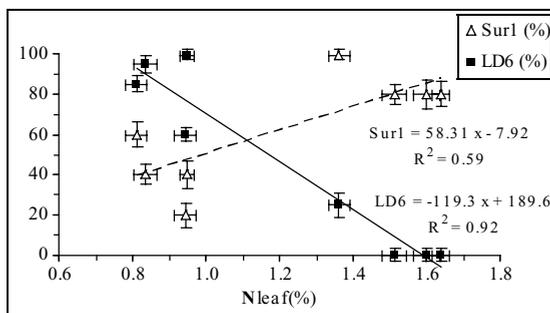
#### Nutrición mineral y carbohidratos no estructurales

Las plantas necesitan mantener unos niveles óptimos de los nutrientes minerales esenciales en sus tejidos. El contenido variará en función de la especie, el tejido, la época del año y el estado de desarrollo. Si el nivel de algún nutriente desciende por debajo de un umbral mínimo se reducirá la capacidad de crecimiento y supervivencia de las plantas. De entre todos los nutrientes minerales, se considera aconsejable el control de las dosis de N, P y K. Siendo, quizás, los análisis foliares de nitrógeno, los que proporcionen una mejor predicción de la respuesta posterior en

campo (Figura 6), por su efecto sobre la maquinaria fotosintética y/o el tipo y cantidad de aminoácidos y proteínas (BIGRAS *et al.*, 1996; FERNÁNDEZ *et al.*, 2007). Mientras que P y K también ejercerán su efecto sobre la respuesta postransplante por su papel en el crecimiento o en los procesos de regulación estomática y de osmolito celular, respectivamente. Asimismo, las ratios K/N y P/N pudieran ser tanto o más importantes que la simple concentración de estos nutrientes en los tejidos (FERNÁNDEZ *et al.*, 2003; WARREN *et al.*, 2005). Se ha constatado que durante el proceso de aclimatación al frío la relación K/N en *Pinus halepensis* varió desde 0,55 hasta superar el valor de 0,68 (FERNÁNDEZ *et al.*, 2003); o bien, que valores menores de 0,6 para *Pseudotsuga menziesii* retrasan la inducción de la dormición (DURYEA & LANDIS, 1984). No obstante, el efecto de la nutrición mineral sobre la



**Figura 5.** Relación entre el porcentaje de aumento de la conductividad eléctrica (índice de daño,  $I_n$ ) y el daño causado a las plantas por el test de frío de planta completa a  $-8\text{ }^\circ\text{C}$  (WPFT, medido a los 15 días; 0 = 0% daños, 4 = más del 75 % de daños), así como con el decremento de potencial hídrico ( $\Delta\psi$ ) a los 15 días de ser transplantado y sin regar (Royo *et al.*, 2003)



**Figura 6.** Porcentaje de supervivencia en campo un año después de la plantación (Sur1) y daños en hojas a  $-6^{\circ}\text{C}$  (LD6) de plantas de *Eucalyptus globulus* con diferente concentración de nitrógeno en los tejidos foliares a la salida del vivero (FERNÁNDEZ et al., 2007)

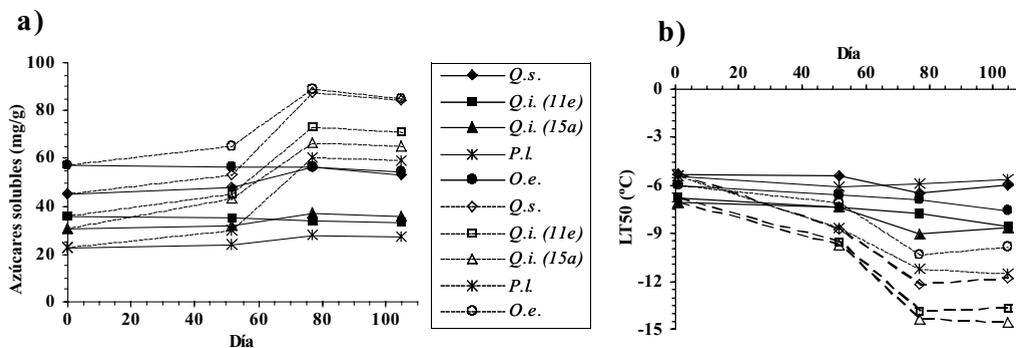
respuesta en campo de los plantones, en numerosas ocasiones, ha dado resultados contradictorios (OLIET et al., 2006), por lo que es objeto de numerosas líneas de investigación actualmente.

Las plantas dependen de sus reservas de carbohidratos, desde que son sacadas del vivero y transplantadas, hasta que los niveles de fotosíntesis son suficientes como para cubrir las demandas exigidas para el crecimiento y la respiración. Cualquier práctica que produzca la reducción de los niveles de carbohidratos antes de la plantación, originará que el potencial de crecimiento y supervivencia de la planta se reduzca. La acumulación de reservas en vivero se puede favorecer por tratamientos que reduzcan el crecimiento en mayor medida que la fotosíntesis (estrés hídrico moderado, deficiencia moderada en nitrógeno, bajas temperaturas e incluso altas iluminaciones o bajas densidades de plantación). Podemos considerar valores óptimos, para coníferas, de carbohidratos totales no estructurales (almidón + azúcares solubles) de 100 a 150  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  en peso seco (MARSHALL, 1985); las frondosas pueden alcanzar sin problemas los 300  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ . En *Pinus halepensis* el contenido debería superar 70  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  (ROYO et al., 1997). Aunque aún no hay datos verdaderamente concluyentes que justifiquen su consideración como parámetros indicadores del estado de calidad de las plantas, sí se han observado acumulaciones de carbohidratos solubles durante el endurecimiento por frío (Figura 7a), o por estrés hídrico atribuibles a procesos de ajuste osmótico (VILLAR-SALVADOR et al., 2004). Esto aumentaría la resistencia al estrés hídrico postraplante, así como reduciría la temperatu-

ra de congelación. Pero no sólo tienen una función osmótica como solutos, sino que también pueden actuar como crioprotectores en las membranas por acción de grupos hidroxilo (ZWIAZEK et al., 2001).

#### Temperatura y fotoperíodo

Como se dijo anteriormente, tanto la temperatura como el fotoperíodo son señales que inducen la entrada en la dormición y, con ello, aumentan la resistencia al frío. Si bien esto es cierto, el papel del fotoperíodo parece estar más relacionado con la activación e inducción del proceso, frenando el crecimiento de la parte aérea. Mientras que serán las bajas temperaturas ( $0-5^{\circ}\text{C}$  para especies de climas fríos;  $0-10^{\circ}\text{C}$  para las de climas cálidos) las que realmente incrementen de forma notable la capacidad de resistencia de las plantas, a medida que se van acumulando horas de frío. Al menos esto se cumplió para las especies de ambiente mediterráneo, en las que alcornoque, encina, lentisco y acebuche necesitaron más de 700 h ( $\leq 8^{\circ}\text{C}$ ) para conseguir su grado máximo de resistencia (FERNÁNDEZ et al., 2005 y Figura 7b). Una excepción podrían ser las especies verdaderamente boreales (p.ej. *Pinus sylvestris*) que pueden llegar a soportar hasta  $-40^{\circ}\text{C}$  tras ser sometidas a días cortos y temperaturas por encima de  $5^{\circ}\text{C}$  (BIGRAS et al., 2001). El fotoperíodo se puede acortar fácilmente en el vivero pero, como podemos ver en la figura 7b, no afectó sensiblemente al proceso de endurecimiento de las especies mediterráneas. Sin embargo, el efecto de las bajas temperaturas sí que es significativo, siendo posible llevar un control de éstas para



**Figura 7. a)** Valores medios de azúcares solubles en hojas desde el 30 de septiembre (día 1) hasta el 12 de enero (día 105). **b)** Efecto sobre la resistencia al frío ( $LT_{50}$ ) de la reducción progresiva del fotoperíodo manteniendo la temperatura constante (símbolos negros y líneas continuas), o de la temperatura manteniendo el fotoperíodo constante (símbolos huecos y líneas discontinuas). *Q.s.* (alcornoque, ●◇), *Q.i.* (encina, dos procedencias, 11e = ■□, 15a = ▲△), *P.l.* (lentisco, ✱✱), *O.e.* (acebuche, ●○). Las horas-frío ( $\leq 8^\circ\text{C}$ ) acumuladas en cada fecha fueron: 0 en el día 1, 288 en el día 52, 888 en el día 77 y 1584 en el día 105

estimar cuándo las plantas han endurecido lo suficiente como para ser llevadas al campo. Como práctica viverística, en los viveros españoles resultaría difícil y económicamente inviable enfriar el aire, pero sí se podría tener en cuenta la evolución de la temperatura ambiente para procurar sincronizar la fenología de los cultivos con la fecha del año, o para elegir apropiadamente la ubicación del vivero (PARDOS *et al.*, 2003; FERNÁNDEZ *et al.*, 2005; MOLLÁ *et al.*, 2006).

#### Estado hídrico

El estado hídrico es un indicador fisiológico del nivel de hidratación celular. Se mide normalmente por el contenido hídrico relativo o, mejor, por el potencial hídrico. El potencial hídrico celular ( $\psi$ ) es la suma de varios componentes, principalmente, el potencial osmótico ( $\psi_s$ ) y el de presión o turgencia ( $\psi_p$ ).  $\psi_s$ , de signo negativo, es consecuencia de los solutos disueltos en el interior celular (iones inorgánicos, azúcares solubles, aminoácidos, etc.) que hacen que el agua tienda a entrar por el fenómeno de ósmosis. El estrés hídrico es un término impreciso y no fácil de definir. No obstante, en términos generales, podemos decir que una planta comienza a estar algo estresada con valores del potencial hídrico de -0,5 a -1,0 MPa, según los casos; que sufre un estrés moderado con potenciales más bajos que éstos pero mayores de -1,2 ó -1,5 MPa; y que el estrés es severo con valores más bajos de -1,5 MPa. En la fase de crecimiento de

las plantas en vivero, éstas deben tener un estado hídrico no estresante, a ser posible mayor de -0,5 MPa medido al amanecer. Mientras que para la fase de aclimatación (endurecimiento controlado) es aconsejable someterlas a dosis moderadas de estrés hídrico (entre -0,8 y -1,5 MPa, según la especie y el momento) para frenar el crecimiento en longitud y favorecer el engrosamiento y la acumulación y concentración de solutos. Por ejemplo, los azúcares solubles acumulados actuarán como agentes osmóticos disminuyendo  $\psi_s$  (ajuste osmótico) y mejorando tanto la tolerancia al estrés hídrico como al frío. Otra consecuencia de la aclimatación mediante estrés moderado es la puesta en marcha de mecanismos de respuesta al estrés hídrico referentes a la vulnerabilidad del xilema (Figura 8), menor en las plantas aclimatadas frente a las no aclimatadas cuando son sometidas a estrés hídrico tras la plantación (FERNÁNDEZ *et al.*, 2000), así como a otras adaptaciones morfológicas y estructurales que hacen a la planta más conservadora en cuanto a la pérdida de agua (VILLAR-SALVADOR *et al.*, 2004). Sin embargo, en el limitado número de estudios con especies leñosas mediterráneas, sobre el efecto del endurecimiento por estrés hídrico en la respuesta en campo de las plantas, se encontraron resultados muy contrastados, por lo que se precisa de mayor investigación en este aspecto (VILAGROSA *et al.*, 2006).

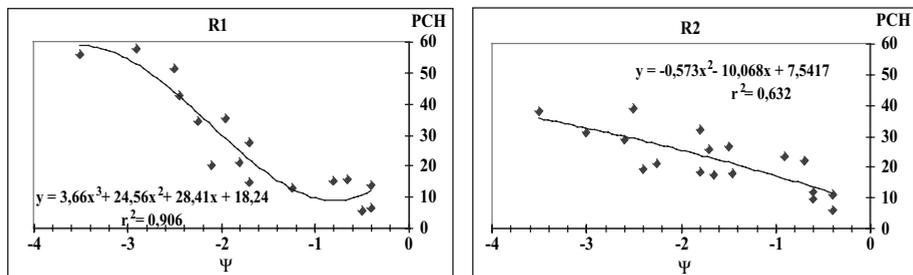


Figura 8. Curvas de vulnerabilidad a la cavitación de *Pinus pinea* L. sometido a dos tratamientos de riego (R1 = no estresado,  $\Psi \geq -0,3$  MPa; R2 = estresado,  $\Psi$  bajo hasta un rango de  $-1,3$  a  $-1,7$  MPa). PCH = pérdida de la conductancia hidráulica. (Fernández et al., 2000)

## BIBLIOGRAFIA

- AITKEN, S.N. & HANNERZ, M.; 2001. Genecology and gene resource management strategies for conifer cold hardiness. In: F.J. Bigras & S.J. Colombo (eds.), *Conifer cold hardiness*: 23-53. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
- BIGRAS, F.J.; GONZALEZ, A.; D'AUUST, 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 For.* 12: 243-259.
- BIGRAS, F.J.; RYYPÖ, A.; LINDSTRÖM, A. & STATTIN, E.; 2001. Cold acclimation and deacclimation of shoots and roots of conifer seedlings. In: F.J. Bigras & S.J. Colombo (eds.), *Conifer cold hardiness*: 57-88. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
- BIRCHLER, T.; ROSE, R.W.; ROYO, A. Y PARDOS, M.; 1998. La planta ideal: revisión del concepto, parámetros definitorios e implementación práctica. *Inv. Agrar., Sist. Rec. For.* 7: 109-121.
- BURR, K.E.; HAWKINS, D.B.; L'HIRONDELLE, S.J.; BINDER, W.D.; GEORGE, M.F. & REPO, T.; 2001. Methods for measuring cold hardiness of conifers. In: F.J. Bigras & S.J. Colombo (eds.), *Conifer cold hardiness*: 369-401. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
- CANNELL, M.G.R.; TABBUSH, P.M.; DENAS, J.D.; HOLLINGSWORTH, M.K.; SHEPPARD, L.J.; PHILLIPSON, J.J. & MURRAY, M.B.; 1990. Sitka spruce and Douglas-fir seedlings in the nursery and in cold storage: root growth potential, carbohydrate content, dormancy, frost hardiness and mitotic index. *Forestry* 63: 9-27.
- DURYEA, M.L. & LANDIS, T.D.; 1984. *Forest nursery manual: production of bareroot seedlings*. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers.
- FERNÁNDEZ, M.; CARVAJAL, F.; ALEJANO, R.; DOMÍNGUEZ, L.; TAPIAS, R. Y ALESSO, S.P.; 2005. Evolución temporal del grado de endurecimiento de plantas de vivero de 4 especies forestales españolas cultivadas en localidades con condiciones climáticas distintas. En: SECF-Gobierno de Aragón (eds.), *Actas del IV Congreso Forestal Español*. Zaragoza. CD-ROM. Imprenta Repes. Zaragoza.
- FERNÁNDEZ, M.; MARCOS, C.; TAPIAS, R.; RUIZ, F. & LÓPEZ, G.; 2007. Nursery fertilisation affects the frost-tolerance and plant quality of *Eucalyptus globulus* Labill. cuttings. *Ann. For. Sci.* 64 (8): 865-873.
- FERNÁNDEZ, M.; MARTÍN, D.; MASEDO, F. Y PARDOS, J.A.; 2000. Efecto del régimen de riego sobre la conductancia hidráulica en tallo hipocotilo de *Pinus pinea* L. En: *Actas del 1er Simposio del pino piñonero (Pinus pinea L.)*. Valladolid.
- FERNÁNDEZ, M. Y PARDOS, J.A.; 1995. Variación estacional de la actividad radical en procedencias de *Pinus pinaster* Ait. *Silva Lusitana* 3(2): 131-143.
- FERNÁNDEZ, M.; ROYO, A.; GIL, L. & PARDOS, J.A.; 2003. Effects of temperature on growth and stress hardening development of phytotron-

- grown seedlings of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.). *Ann. Sci. For.* 60: 277-284.
- LANDIS, T.D.; TINUS, R.W. & BARNETT, J.P.; 1998. *The container tree nursery manual. Volume 6, Seedling propagation.* Agric. Handbk. 674. Washington, DC: USDA Forest Service. ([http://www.rngr.net/Publications/ctnm/Folde\\_r.2003-06-11.2354/vol\\_6\\_chapter\\_4.pdf/file](http://www.rngr.net/Publications/ctnm/Folde_r.2003-06-11.2354/vol_6_chapter_4.pdf/file)).
- LUIS, V.C.; TASCHLER, D.; HACKER, J.; JIMÉNEZ, M.S.; WIESER, G. & NEUNER, G.; 2007. Ice nucleation and frost resistance of *Pinus canariensis* seedlings bearing needles in three different developmental states. *Ann. For. Sci.* 64(2): 177-182.
- MARSHALL, J.D.; 1985. Carbohydrates status as a measure of seedling quality. In: M.L. Duryea (ed.), *Evaluating seedling quality: principles, procedures, and predictive abilities of major tests. Proceedings of the Workshop.* Forest Research Lab. Oregon State University. Corvallis.
- MOHAMMED, G.H.; BINDER, W.D. & GILLIES, S.L.; 1995. Chlorophyll fluorescence: a review of its practical forestry applications and instrumentation. *Scand. J. For. Res.* 10: 383-410.
- MOLLÁ, S.; VILLAR-SALVADOR, P.; GARCÍA-FAYOS, P. & PEÑUELAS, J.L.; 2006. Physiological and transplanting performance of *Quercus ilex* L. (holm oak) seedlings grown in nurseries with different winter conditions. *Forest Ecol. Manage.* 237: 218-226.
- NAVARRO, R.M. Y DEL CAMPO, A.; 2006. Sistema integrado de control de calidad de planta mediante la caracterización del cultivo en viveros forestales y contraste en campo de lotes comerciales. En: J. Cortina, J.L. Peñuelas, J. Puértolas, R. Savé y A. Vilagrosa (coords.), *Calidad de planta forestal para la restauración en ambientes mediterráneos: estado actual de conocimientos:* 161-191. MMA, Organismo Autónomo de Parques Nacionales, Madrid.
- NAVARRO, R.M.; DEL CAMPO, A. Y CORTINA, J.; 2006. Factores que afectan al éxito de una repoblación y su relación con la calidad de planta. En: J. Cortina, J.L. Peñuelas, J. Puértolas, R. Savé y A. Vilagrosa (coords.), *Calidad de planta forestal para la restauración en ambientes mediterráneos: estado actual de conocimientos:* 31-46. MMA, Organismo Autónomo de Parques Nacionales, Madrid.
- OLIET, J.A.; VALDECANTOS, A.; PUÉRTOLAS, J. Y TRUBAT, R.; 2006. Influencia del estado nutricional y el contenido en carbohidratos en el establecimiento de las plantaciones. En: J. Cortina, J.L. Peñuelas, J. Puértolas, R. Savé y A. Vilagrosa (coords.), *Calidad de planta forestal para la restauración en ambientes mediterráneos: estado actual de conocimientos:* 89-117. MMA, Organismo Autónomo de Parques Nacionales, Madrid.
- PARDOS, M.; ROYO, A.; GIL, L. & PARDOS, J.A.; 2003. Effect of nursery location and outplanting date on field performance of *Pinus halepensis* and *Quercus ilex* seedlings. *Forestry* 76(1): 67-81.
- RITCHIE, G.A. & LANDIS, T.D.; 2003. Seedling quality tests: cold hardiness. In: *Forest Nursery Notes. Summer 2003.* USDA Forest Service, R6-CP-TP-04-03.
- RITCHIE, G.A. & LANDIS, T.D.; 2004. Seedling quality tests: bud dormancy. In: *Forest Nursery Notes. Winter 2004.* USDA Forest Service, R6-CP-TP-01-04.
- RITCHIE, G.A. & LANDIS, T.D.; 2006. Seedling quality tests: root electrolyte leakage. In: *Forest Nursery Notes. Winter 2006.* USDA Forest Service, R6-CP-TP-08-05.
- ROYO, A.; FERNANDEZ, M.; GIL, L.; GONZALEZ, E.; PUELLES, A.; RUANO, R. Y PARDOS, J.A.; 1997. La calidad de la planta de vivero de *Pinus halepensis* Mill. destinada a repoblación forestal. Tres años de resultados en la Comunidad Valenciana. *Montes* 50: 29-39.
- ROYO, A.; FERNÁNDEZ, M.; GIL, L. & PARDOS, J.A.; 2003. Assessing the hardiness of Aleppo pine, maritime pine, and holm oak seedlings by electrolyte leakage and water potential methods. *Tree Planters' Notes* 50: 38-43.
- SCARASCIA-MUGNOZZA, G.; VALENTINY, E.; KUZMINSKI, E. & GIORDANO, E.; 1989. Freezing mechanisms, acclimation processes and cold injury in *Eucalyptus* species planted in the Mediterranean region. *Forest Ecol. Manage.* 29: 81-94.
- SUTINEN, M.L.; ARORA, R.; WISNIEWSKI, M.; ASHWORTH, E.; STRIMBECK, R. & PALTA, J.; 2001. Mechanisms of frost survival and fre-

- eze-damage in nature. In: F.J. Bigras & S.J. Colombo (eds.), *Conifer cold hardiness*: 89-120. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
- VILAGROSA, A.; VILLAR-SALVADOR, P. Y PUÉRTOLAS, J.; 2006. El endurecimiento en vivero de especies forestales mediterráneas. En: J. Cortina, J.L. Peñuelas, J. Puértolas, R. Savé y A. Vilagrosa (coords.), *Calidad de planta forestal para la restauración en ambientes mediterráneos: estado actual de conocimientos*: 119-140. MMA, Organismo Autónomo de Parques Nacionales. Madrid.
- VILLAR-SALVADOR, P.; PLANELLES, R.; OLIET, J.; PEÑUELAS-RUBIRA, J.L.; JACOBS, D.F. & GONZÁLEZ, M.; 2004. Drought tolerance and transplanting performance of holm oak (*Quercus ilex*) seedlings after drought hardening in the nursery. *Tree Physiol.* 24: 1147-1155.
- WARREN, C.R.; MCGRATH, J.F. & ADAMS, M.A.; 2005. Differential effects of N, P and K on photosynthesis and partitioning of N in *Pinus pinaster* needles. *Ann. For. Sci.* 62: 1-8.
- WORDRAGEN, M.F.; BALK, P. & HAASE, D.; 2007. Successful trial innovative cold NSure test on Douglas-fir seedlings. In: *Forest Nursery Notes. Summer 2007*. USDA Forest Service, R6-CP-TP-04-2007.
- ZWIAZEK, J.; RENAULT, S.; CROSER, C.; HANSEN, J. & BECK, E.; 2001. Biochemical and biophysical changes in relation to cold hardiness. In: F.J. Bigras & S.J. Colombo (eds.), *Conifer cold hardiness*: 165-186. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.