

Influencia del endurecimiento por estrés hídrico y la fertilización en algunos parámetros funcionales relacionados con la calidad de la planta de *Pinus pinea*

Pedro Villar Salvador, Juan L. Peñuelas Rubira, Inmaculada Carrasco Manzano

Centro Nacional de Mejora Forestal “El Serranillo”, Ministerio de Medio Ambiente, Apdo. 249, 19080 Guadalajara. España. serranillo@dgcn.mma.es

Resumen

En este trabajo se ha analizado el efecto combinado de diferentes niveles de fertilización nitrogenada y de endurecimiento por estrés hídrico sobre la calidad funcional de los brinzales de *Pinus pinea*, y su desarrollo en campo. El incremento de la fertilización nitrogenada produjo plantas más grandes, con mayor concentración de N radical ($[N_R]$) y contenido total de N en la planta (N_{Total}). El endurecimiento causó la reducción del tamaño de las plantas, pero aumentó tanto la concentración de N en tallos ($[N_A]$) y raíz como N_{Total} . No obstante, el efecto del endurecimiento sobre estas variables presentó una interacción con la fertilización, de tal modo que el incremento de N en los tejidos sólo se observó en plantas altamente fertilizadas, pero no en las pobremente fertilizadas. El potencial osmótico en saturación ($\Psi\pi_{100}$), la conductancia estomática (Gs), la transpiración residual (T_R) y la capacidad de regeneración radical (CRR) de las plantas no fue afectada significativamente por la fertilización. En cambio, el endurecimiento si redujo Gs, T_R y CRR, no induciendo cambios de $\Psi\pi_{100}$. En campo, la mortandad fue muy baja no observándose diferencias significativas entre tratamientos. El crecimiento, especialmente en diámetro, fue positivamente afectado por la fertilización de vivero pero negativamente por el endurecimiento.

P.C.: ajuste osmótico, calidad, crecimiento radical, endurecimiento, fertilización, nitrógeno

Summary

In this study the combined effect of different nitrogen fertilization and water stress conditioning levels on the functional quality and performance of *Pinus pinea* (Stone pine) was analyzed. High N fertilization produced larger seedlings and increased root N concentration ($[N_R]$) and total plant N content (N_{Total}). Drought conditioning reduced plant size but enhanced all shoot N concentration ($[N_A]$), $[N_R]$ and N_{Total} . However, the effect of drought conditioning on plant N levels exhibited an interaction with fertilization, so the increase of N in plant tissue was only observed in the heavily fertilized plants but not on the poorly fertilized ones. The osmotic potential at full turgor ($\Psi\pi_{100}$), stomatal conductance (Gs), minimum transpiration (T_R), and the root growth capacity (CRR) were not affected by fertilization. On the contrary, water stress conditioning did reduce Gs, T_R and CRR but did not influence $\Psi\pi_{100}$. One year after plantation, mortality of the different treatments was low and no significant differences were found among them. Field growth, was positively affected by nursery fertilization but negatively by water stress conditioning.

K.W.: fertilization, nitrogen, osmotic adjustment, *Pinus pinea*, plant quality, root growth capacity, water stress conditioning

Introducción

La calidad de la planta juega un papel fundamental en el desarrollo de las plantaciones (Grossnickle *et al.*, 1991). Dicha calidad está en gran medida condicionada según como sea producida la planta durante la fase de vivero. Entre los distintos aspectos del cultivo, la fertilización, especialmente el aporte de N, es uno de los que más influyen en la calidad morfológica y fisiológica de la planta y por tanto en su capacidad de medra en campo. Concentraciones elevadas de N en los tejidos, especialmente en el follaje, se han correlacionado positivamente con la supervivencia y velocidad de crecimiento de las plantas en campo, incluso bajo condiciones adversas de disponibilidad hídrica (Van den Driessche, 1992; Oliet *et al.*, 1997). Sin embargo, la excesiva fertilización de las plantas puede conducir a la formación de plantas muy grandes, que bajo determinadas condiciones, podrían quizá ser más vulnerables a la sequía.

La falta de agua en las plantas ocasiona una reducción de su crecimiento al inhibirse la elongación de las células y el aporte de azúcares de la fotosíntesis (Hsiao, 1973). Por tanto, el endurecimiento por estrés hídrico aplicado de una manera controlada en el vivero podría constituir una herramienta para frenar, que no detener, el excesivo crecimiento de las plantas inducido por una elevada fertilización nitrogenada. Además, el precondicionamiento por estrés hídrico moderado puede activar o acentuar los mecanismos de resistencia de las plantas a situaciones de estrés, especialmente la sequía, y no reduce la concentración de nutrientes en la planta (Zwiazek & Blake, 1989; Villar-Salvador *et al.*, 1999).

En este trabajo presentamos los resultados de un estudio sobre el efecto combinado de diferentes niveles de fertilización nitrogenada con varios niveles de endurecimiento por estrés hídrico, sobre algunos parámetros morfológicos y fisiológicos de los brinzales de *Pinus pinea* relacionados con su calidad y su resistencia al estrés hídrico. Nuestro objetivo final era producir una planta de talla media, con alta concentración de N en sus tejidos y con una elevada capacidad de resistencia a situaciones de estrés, especialmente al hídrico.

Material y métodos

Semillas de la procedencia de La Mancha fueron sembradas en abril de 1997 en contenedores ®Forest Pot 300 con turba rubia sin fertilizar. Una vez que las plantas aéreas estuvieron mínimamente desarrolladas las bandejas fueron aleatoriamente distribuidas a los diferentes tratamientos. Se planteó un diseño factorial de dos factores (endurecimiento y fertilización) en cuatro bloques completos al azar. Se establecieron dos niveles de fertilización nitrogenada (alta, los brinzales recibieron 100 mg N /planta en todo el cultivo y baja, las plantas recibieron sólo 10 mg N/ planta), que se cruzaron con tres niveles de endurecimiento por estrés hídrico: control (plantas bien regadas), nivel bajo y nivel moderado de estrés hídrico. El número de tratamientos considerados fue, por tanto, seis (Tabla 2). La aplicación de los tratamientos de fertilización fue realizada entre el 1 de junio y el 15 de noviembre de 1997, con una cadencia semanal, excepto en los últimos tres meses, que fue mensual. La cantidad de P y K que recibieron las plantas de todos los tratamientos fue la misma, siendo 20 y 40 mg de P y K por planta en todo el ensayo, respectivamente. Para estos dos elementos minerales se utilizó un preparado comercial de fosfato potásico (P₂O₅K₂) enriquecido con un preparado de oligoelementos. El nitrógeno se suministró en forma de nitrato amónico. La mezcla de fertilizante fue suministrada a las plantas individualmente por medio de una jeringa veterinaria.

Los tratamientos de endurecimiento empezaron a ser aplicados a mediados de agosto. Hasta entonces las plantas habían sido regadas diariamente o cada dos días. La diferenciación de los niveles de endurecimiento se basó en la pérdida de peso de las bandejas conforme el siguiente criterio:

- 1- Control: plantas regadas cada 1 ó 2 días. El potencial hídrico al alba (Ψ_{alba}) de dichas plantas estuvo entorno a $-0,2$ y $-0,3$ MPa.
- 2- Nivel bajo de endurecimiento: plantas regadas cuando las bandejas perdieron entre 43-45% de su peso con respecto a su peso máximo en saturación. El Ψ_{alba} de las plantas varió entre -0.8 y -1 MPa en los momentos de riego.
- 3- Nivel moderado de endurecimiento: plantas regadas cuando las bandejas perdieron entre el 47 y 50% de su peso con respecto a su peso máximo en saturación. El Ψ_{alba} de las plantas varió entre -1.2 y $-1,4$ MPa en los momentos de riego.

Al finalizar el ensayo (18 noviembre de 1997), se separaron las plantas para realizar evaluaciones de sus características funcionales y para ser plantadas en el campo. En 28 plantas por tratamiento, se determinó el peso seco de los tallos y los sistemas radicales, así como la concentración de N en ambas partes ($[N_A]$ y $[N_R]$). Con los datos de biomasa y concentración de N, se calculó el contenido total de N por planta (N_{Total}). También se estudiaron parámetros relacionados con la economía hídrica de las plantas. En concreto, se calculó el potencial osmótico en saturación ($\Psi\pi_{100}$) en 8 plantas/tratamiento, por medio de curvas P-V (Robichaux, 1984) y se midió la transpiración residual (T_R) de tallos completos, siguiendo el procedimiento descrito por Villar-Salvador *et al.* (1999) en 10 plantas por tratamiento. Igualmente se midió la conductancia estomática máxima (G_S), medida con un porómetro LI-1600 (n=5 plantas) en el interior de un invernadero bajo condiciones estables de temperatura y radiación fotosintéticamente activa.

Como medida del vigor de las plantas de los tratamientos se cuantificó su capacidad de regeneración radical (CRR) en 16 individuos por tratamiento. Para ello se transplantaron los brinzales a contenedores de 3L con perlita y se dejaron en un invernadero durante 21 días. Pasado dicho tiempo, se extrajo las plantas y todas las raíces nuevas blancas superiores a 1 cm de longitud proyectadas fuera del cepellón, fueron seccionadas y contabilizadas. Durante el test de CRR las plantas fueron regadas cada dos días y la temperatura del invernadero mantenida entre 15 y 25°C.

Al finalizar el periodo de cultivo en vivero y con el fin de evaluar el desarrollo de los tratamientos en campo, se realizó una plantación en una parcela del Centro Nacional de Mejora Forestal “El Serranillo”. El diseño espacial de la parcela fue en cuatro bloques al azar, respetándose los mismos bloques del vivero. El desarrollo de la plantación después de un año se evaluó como el porcentaje de marras y el crecimiento de las plantas. Como medida de crecimiento hemos optado por presentar el incremento de volumen, que integra el incremento en altura y diámetro del tallo, asumiendo que los tallos son troncocónicos.

El efecto de los factores fertilización y endurecimiento fue evaluado por medio de análisis de varianza (ANOVA), después de controlar la normalidad y homocedasticidad de los datos. En los ANOVA significativos, la comparación múltiple de medias se realizó mediante el test de la menor diferencia significativa (LSD).

Resultados

La fertilización nitrogenada y el endurecimiento por estrés hídrico tuvieron un efecto significativo sobre el crecimiento, de los brinzales de *P. pinea* (Tabla 1). En concreto, el empleo de altas dosis de N incrementó el peso total de las plantas, $[N_R]$ y N_{total} (Tabla 2). A pesar de que las plantas más fertilizadas mostraron tendencia clara a presentar una $[N_A]$ más alta, la diferencia con los menos fertilizados no fue estadísticamente significativa (Tabla 1). El endurecimiento redujo el tamaño de las plantas, respuesta que fue patente incluso en los niveles bajos de estrés hídrico. No se observaron diferencias de crecimiento entre los dos niveles de endurecimiento (Tabla 2). El endurecimiento incrementó $[N_R]$, $[N_A]$ y N_{total} . Sin embargo, el incremento dependió del régimen de fertilización al que habían sido sometidas las plantas, es decir, se registró una interacción entre la fertilización y el endurecimiento (Tabla 1), de tal modo que el endurecimiento solo incrementó el contenido y concentración de N en las plantas altamente fertilizadas pero no en las poco fertilizadas (Tabla 2).

Con respecto a las variables relacionadas con la economía hídrica de la planta, el $\Psi\pi_{100}$ no fue influenciado ni por el endurecimiento ni por el régimen de fertilización (Tabla 1 y 2). En cambio, el estrés hídrico sí afectó a G_s y a T_R , midiéndose valores más bajos entre las plantas endurecidas que en las plantas control (Tabla 2). Entre los niveles de endurecimiento no se hallaron diferencias significativas de G_s y T_R . La fertilización no tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre estas dos variables si bien se apreció una tendencia a que las plantas más fertilizadas mostraran valores de G_s y T_R mayores (Tabla 2).

La CRR fue reducida por el endurecimiento pero no se vio afectada por el régimen de fertilización, siendo las plantas control y altamente fertilizadas las que mayor CRR presentaron (Tabla 1 y 2).

Después de un año en campo los tratamientos no mostraron diferencias de supervivencia, siendo la mortandad en todos los casos inferior al 10% (datos nos mostrados). En cambio, sí se registraron diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento (Figura 1). Así, la fertilización afectó ($P=0,007$) positivamente el incremento en volumen de las plantas, mientras que el endurecimiento lo hizo negativamente ($P<0,001$). Entre ambos factores existió una interacción significativa ($P<0,001$) que se tradujo en que la reducción del crecimiento debida al endurecimiento se dio entre las plantas altamente fertilizadas pero no entre las poco fertilizadas (Figura 1).

Se observó una interrelación entre la velocidad de crecimiento en campo, el tamaño inicial al salir del vivero y la CRR de las plantas de *P. pinea*. Así, los brinzales que más crecieron en campo fueron los más grandes al salir del vivero y los que mostraron mayor capacidad de regenerar un nuevo sistema radical (Figura 2).

Discusión

Al igual que en otras especies (Van den Driessche, 1992; Oliet *et al.*, 1997), el aumento del aporte de N a los brinzales de *P. pinea* durante el cultivo, incrementó su tamaño y la concentración y contenido de N en sus tejidos. En el caso del pino piñonero, el aumento de concentración se dio principalmente al nivel de las raíces. Por el contrario, y tal como esperábamos, la aplicación de estrés hídrico en la última fase del cultivo produjo una reducción del tamaño de las plantas con respecto al control. Esta merma del crecimiento se produjo incluso con niveles bajos de endurecimiento. Ello sugiere que las plantas de piñonero

cesan su crecimiento a potenciales hídricos relativamente altos. En *P. halepensis*, Leshem (1970) observó que las raíces cesaban completamente su crecimiento a potenciales hídricos inferiores a $-0,75$ MPa. Un efecto muy interesante del endurecimiento observado en este estudio, es que incrementó los niveles de N en los tejidos, un fenómeno que ya constatamos en *P. halepensis* (Villar-Salvador *et al.*, 1999). Por lo tanto, el resultado de combinar una alta fertilización de N y el endurecimiento por estrés hídrico fue la producción de plantas de talla media, pero con una elevada concentración y contenido total de N. Esta respuesta es muy interesante ya que permite la producción de plantas morfológicamente equilibradas y alta potencialidad productiva. La aplicación de estrés hídrico desde el principio del cultivo probablemente hubiera producido planta muy pequeña, un efecto que tampoco es deseable ya que dichas plantas presentan menor desarrollo en campo (Villar Salvador *et al.*, 2000).

El endurecimiento afectó a algunas variables relacionadas con la resistencia al estrés hídrico. En concreto, afectó a variables relacionadas con los mecanismos de evitación de la sequía, es decir G_s y T_R , pero no a los mecanismos de tolerancia a la sequía, es decir a $\Psi\pi_{100}$. Así, la aplicación controlada de estrés hídrico indujo que las plantas, al volver a disponer de condiciones óptimas de agua, presentaran menor G_s y T_R que las plantas control. Esta respuesta, unido a su menor tamaño, hace esperable que las plantas endurecidas de *P. pinea* presenten menores tasas de transpiración y, por tanto, ante episodios de sequía inmediatamente después de la plantación, consumirán más lentamente las reservas de agua del suelo. El hecho de que las plantas de *P. pinea* no presenten ajustes osmóticos (reducción de $\Psi\pi_{100}$) frente al estímulo de la sequía, pero si reduzcan G_s y T_R , coincide plenamente con la estrategia seguida por *P. halepensis* frente al estrés hídrico (Villar-Salvador *et al.*, 1999).

La capacidad de regeneración de raíces también se vio reducida por el endurecimiento. Dicha capacidad ha sido considerada como una medida del vigor de las plantas (Simpson & Ritchie, 1997). Así, plantas dañadas, enfermas o poco resistentes a situaciones de estrés tienden a presentar menor CRR. Si el estrés hídrico que sufre una planta es muy intenso puede quedar dañada y en consecuencia afectar a su CRR (Tinus, 1996; Villar-Salvador *et al.*, 1999). Sin embargo pensamos que este no ha ocurrido en este experimento, ya que por un lado el nivel más severo de estrés hídrico aplicado (tratamiento moderado) no fue muy fuerte y estuvo muy por debajo de los valores de potencial hídricos letales en esta especie (datos no publicados). El endurecimiento redujo la CRR de las plantas a través de su efecto sobre el tamaño de las plantas. En *P. pinea*, la CRR está estrechamente relacionada con el tamaño de las plantas (ver Figura 2). De hecho, si se efectúa un análisis de covarianza en el que el tamaño de las plantas es introducido como covariable, el efecto del endurecimiento sobre la CRR desaparece (datos no mostrados), siendo significativo el efecto de la fertilización.

La supervivencia de las plantas en campo no difirió entre tratamientos. En cambio si se produjeron diferencias significativas de crecimiento, siendo las plantas más fertilizadas y no endurecidas las que mejor desarrollo mostraron. A pesar de que las plantas endurecidas presentaron mayor contenido y concentración de N, no crecieron más deprisa. Ello se explica por el hecho de que el mayor crecimiento de las plantas en campo estuvo estrechamente relacionado con el tamaño inicial de las plantas, pero no con la concentración de N. Es decir, las plantas más grandes, que son las que mayor CRR presentaron y que fueron cultivadas con un aporte elevado de N y sin endurecer, son las que más crecieron en campo.

A la luz de los resultados de este trabajo, podemos concluir que el endurecimiento por estrés hídrico no maximiza el desarrollo de las plantas de *P. pinea* en campo, a pesar de que favorece el desarrollo equilibrado de su morfología, incrementa el contenido de N en sus tejidos y acentúa determinados mecanismos de resistencia frente a la sequía. En cambio, la

fertilización alta con N, combinada con niveles óptimos de riego durante todo el cultivo produjo las plantas más grandes y, fueron éstas las que mejor evolución tuvieron en campo.

Bibliografía

GROSSNICKLE, S.C., MAJOR, J.E., ARNOTT, J.T y LEMAY, V.M. (1991). *Stock quality assessment through an integrated approach*. New Forests 5: 77-91.

HSIAO, T.C. (1973). *Plant response to water stress*. Annu. Rev. Plant Physiol. 24: 519-570.

LESHEM, B. (1970). *Resting roots of Pinus halepensis: structure, function and reaction to water stress*. Bot. Gaz. 131: 99-104.

OLIET J.; PLANELLES R.; LOPEZ M. y ARTERO F. (1997) *Efecto de la fertilizacion en vivero sobre la supervivencia en plantacion de Pinus halepensis*. Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales 4: 69-79.

ROBICHAUX, R. (1984). *Variation in tissue water relations of two sympatric Hawaiian – Dubautia species and their natural hybrid*. Oecologia 65: 75-81.

SIMPSON, D.G. y RITCHIE, G.A. (1997). *Does RGP predict field performance? A debate*. New For. 13: 253-277.

TINUS, R.W. (1996). *Root growth potential as an indicator of drought stress history*. Tree Physiol. 795-799.

VAN DEN DRIESSCHE, R. (1992). *Changes in drought resistance and root growth capacity of container seedlings in response to nursery drought, nitrogen, and potassium treatments*. Can. J. For. Res. 22: 740-749.

VILLAR-SALVADOR, P.; OCAÑA, L.; PEÑUELAS, J. y CARRASCO, I. (1999). *Effect of water stress conditioning on the water relations, root growth capacity, and the nitrogen and non-structural carbohydrate concentration of Pinus halepensis Mill. (Aleppo pine) seedlings*. Ann. For. Sci. 56: 459-465.

VILLAR SALVADOR, P.; DOMÍNGUEZ LERENA, S.; PEÑUELAS RUBIRA, J.L.; CARRASCO MANZANO, I.; HERRERO SIERRA, N.; NICOLÁS PERAGÓN, J.L. y OCAÑA BUENO, L. (2000). *Plantas grandes y mejor nutridas de Pinus pinea L. Tienen mejor desarrollo en campo*. Actas del 1^{er} Simposio del Pino Piñonero. 22-24 febrero 2000, Valladolid.

ZWIAZEK, J.J. y BLAKE, T.J. (1989). *Effects of preconditioning on subsequent water relations, stomatal sensitivity, and photosynthesis in osmotically stressed black spruce*. Can. J. For. Res. 67: 2240-2244.

Tabla 1.- Efecto del endurecimiento, la fertilización y la interacción entre ambos factores en la respuesta de las variables analizadas en brinzales de *Pinus pinea*. Se representan los datos de probabilidad derivada del ANOVA. $[N_A]$ y $[N_R]$ = concentración de nitrógeno en parte aérea y radical, respectivamente; N_{Total} = contenido total de N en planta; $\Psi\pi_{100}$ = potencial osmótico en saturación; Gs = conductancia estomática; Tr = transpiración residual; CRR= nº raíces nuevas > 1 cm formadas en el test de capacidad de regeneración radical.

Factores	Peso planta	$[N_A]$	$[N_R]$	N_{Total}	$\Psi\pi_{100}$	Gs	Tr	CCR
Endurecimiento	<0,001	0,06	<0,001	<0,001	0,26	0,039	<0,001	0,005
Fertilización	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,56	0,057	0,057	0,93
Endurec. x Fertiliz.	0,082	0,056	0,02	0,007	0,79	0,63	0,45	0,004

Tabla 2.- Datos medios de las diferentes variables funcionales analizadas en plantas de *Pinus pinea* sometidas a diferentes tratamientos combinados de endurecimiento por estrés hídrico y fertilización nitrogenada. Medias en una variable con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas ($P \geq 0,05$). El significado de las rótulos de las variables está en la Tabla 1. Las unidades de Gs y Tr son $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Tratamientos (endurec.-fertiliz.)	Peso planta (g)	$[N_A]$ (mg g^{-1})	$[N_R]$ (mg g^{-1})	N_{Total} (mg)	$\Psi\pi_{100}$ (MPa)	Gs	Tr	CCR (nº raíces)
Control - N_{100}	5,02 a	10,87 b	7,99 b	50.5 b	-1,42 a	83,3 a	0,362 a	32,2 a
Control - N_{10}	4,04 b	8,85 c	7,45 c	33.0 c	-1,54 a	78,7 ab	0,356 a	22,4 b
Bajo - N_{100}	3,56 c	11,55 ab	9,22 a	26.9 a	-1,64 a	75,2 a	0,288 b	16,5 b
Bajo - N_{10}	3,28 cd	8,92 c	7,97 b	39.1 c	-1,61 a	54,4 b	0,260 bc	20,2 b
Moderado - N_{100}	3,67 bc	12,07 a	9,30 b	41.1 a	-1,44 a	66,6 ab	0,319 ab	18,41 b
Moderado - N_{10}	3,11 d	8,82 c	7,87 a	25.7 c	-1,51 a	50,7 b	0,253 c	22,2 b

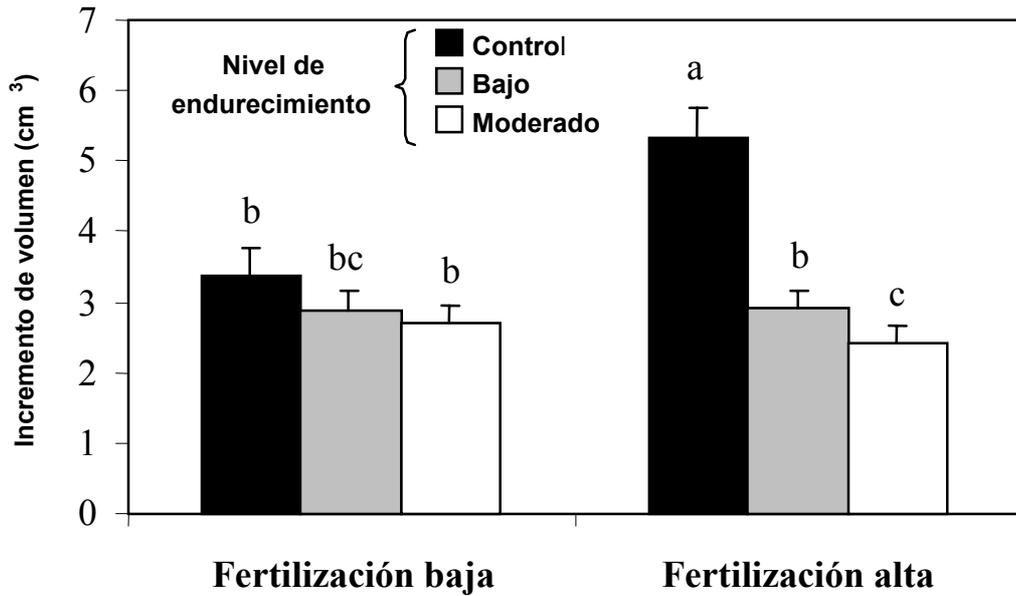


Figura 1.- Crecimiento en campo 1 año después de la plantación, medido como incremento de volumen, de plantas de *Pinus pinea* sometidas a diferentes tratamientos de fertilización y endurecimiento. Las orquillas son un error estándar. Medias con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas ($P \geq 0,05$).

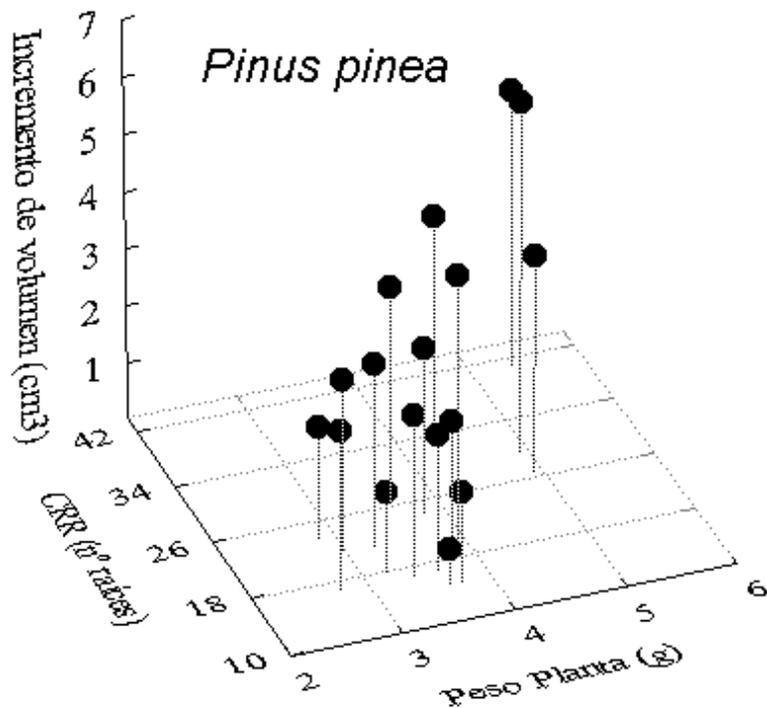


Figura 2.- Relación entre el crecimiento en campo (incremento de volumen) de plantas de *Pinus pinea* y su tamaño y capacidad de regeneración de raíces al salir del vivero.