

IV.- MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 CARACTERIZACIÓN DE LA PLANTA ANTES DE LA PLANTACIÓN.

4.1.1 Descripción del cultivo en vivero.

Los brinzales de *Pinus halepensis* utilizados en el experimento fueron cultivados en El Centro de Mejora Forestal “El Serranillo” durante la primavera de 1999. La semilla utilizada procedía de Maestrazgo (Castellón), región levantina y fue sembrada en bandejas **Arnabat 48C (300 cm³)** con un sustrato compuesto por turba Vapo sin fertilizar. El lote utilizado de semillas presentaba un peso por cada 1000 semillas de 18 g. y un porcentaje de vanas del 1%.

Se realizaron fertilizaciones de germinación durante seis semanas, de crecimiento durante nueve semanas y de endurecimiento durante cuatro semanas, recibiendo cada planta una cantidad total aproximada de:

- 72 mg de nitrógeno
- 57 mg de fósforo
- 120 mg de potasio

La siembra se realizó en el invernadero donde permanecieron hasta transcurridos dos meses, periodo en que se completó el primer desarrollo de la planta, y después se sacaron al área sombreada en donde se mantuvieron hasta el final del cultivo en octubre de 1999. Los riegos se realizaron cada dos o tres días a lo largo de todo el cultivo.

4.1.2 Caracterización morfológica de plantas referencia.

Se tomó una muestra de 30 brinzales dentro del lote previsto situado en el área sombreada del vivero de *Pinus halepensis* cuya altura total, medida desde el cuello de la raíz hasta el punto de inserción de las acículas terminales, estuviese comprendida entre los 10 cm y los 25 cm, y cuyo diámetro, medido en el cuello de la raíz, fuese igual o superior a los 2 mm.

Una vez seleccionados los individuos se trasladaron al laboratorio, donde se agruparon en cinco lotes de seis plantas cada uno y se etiquetaron para su posterior análisis. Como la caracterización morfológica se llevaría a cabo en más de un día, se decidió congelar las plantas por lotes para evitar su posible deterioro, e ir extrayéndolas a medida que se necesitasen para su correcto procesamiento.

- *Altura y Diámetro*

En primer lugar se midió con la regla la altura de cada individuo tomando como referencia el cuello de la raíz y como punto máximo el de la inserción de las acículas terminales. A continuación, se midió con el calibre digital el diámetro en el cuello de la raíz y ambos datos se anotaron en un estadillo.

- Peso Seco de Aéreo (PSA) y Peso Seco Radical (PSR)

Antes de llevar a cabo el registro de estas dos variables se separó la parte radical de la planta de la parte aérea con la ayuda de un bisturí.

A continuación se lavó cuidadosamente la parte aérea de cada individuo con la ayuda de un colador para evitar las posibles pérdidas de muestra por el sumidero. Primero se lavó con agua corriente para eliminar los restos de turba y tierra depositados en el tallo y en las acículas y, posteriormente, con agua destilada para eliminar cualquier resto posible de sales minerales. Finalmente se dejó secar en papel.

Antes de continuar con el proceso, se escogió de cada lote un individuo cuya parte aérea, una vez correctamente lavada, se congelaría para hallar el valor de su superficie foliar y la relación entre dicha superficie foliar y su peso.

Una vez seca, se introdujo en sobres de papel y éstos en una estufa de ventilación forzada donde permanecerían a una temperatura de 50° C durante 48 horas seguidas, a fin de conseguir secar plenamente los tejidos internos de la planta.



Fotografía 1. Estufa de ventilación forzada utilizada en el ensayo.

Transcurrido este tiempo, los sobres fueron extraídos e introducidos en una campana de desecación con el fin de evitar la rehumectación de las muestras. La campana de desecación es de vidrio y está formada por una tapa movible y una base, en cuyo interior se encuentran unos cristales de gel de sílice que absorben la humedad. Tras permanecer en dicha campana un periodo de tiempo mínimo de 30 minutos se procedió a registrar su peso en una balanza digital.



Fotografía 2. Balanza digital utilizada en el ensayo

Una vez elaborada la parte aérea, se continuó con el sistema radical de cada individuo siguiendo los mismos pasos.

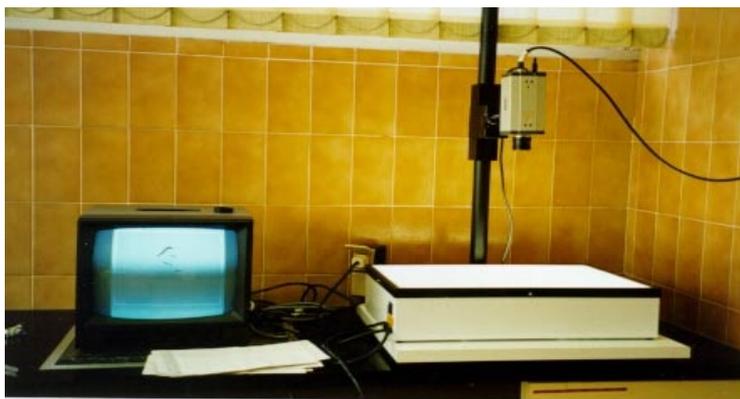
En primer lugar se limpió cuidadosamente el cepellón con la ayuda de unas pinzas seleccionando el número máximo posible de raíces entre la turba deshecha. Posteriormente se lavó, primero con agua corriente y luego con agua destilada para eliminar cualquier resto de turba, tierra o compuesto que pudiera interferir en los análisis de nutrientes y de carbohidratos, dejándolo secar en papel secante. A continuación se introdujo en sobres de papel y en una estufa de ventilación forzada a una temperatura de 50° C durante 48 horas seguidas. Transcurrido este tiempo se introdujo en una cámara de desecación y, transcurrida como mínimo media hora, se procedió a su peso con una balanza digital tal y como se describe en el caso anterior de la parte aérea.

Una vez terminada esta etapa se guardaron tanto las partes aéreas como las radicales en sobres de papel para, más adelante, poder continuar con otras etapas del experimento.

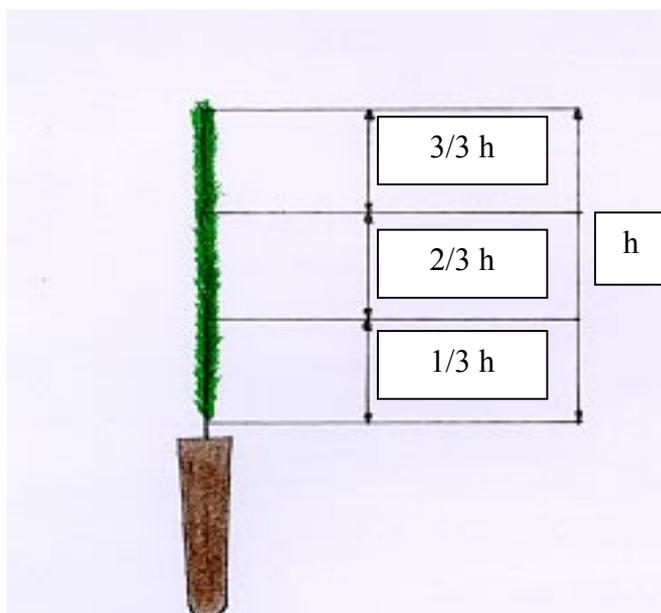
- Superficie foliar

Para hallar la superficie foliar se escogieron 6 individuos, uno de cada lote. Una vez descongelada la parte aérea, se midió la altura total de cada individuo dividiéndola en tres partes iguales. Se separaron las acículas del tallo cuyos restos se guardaron en un sobre de papel. A continuación se utilizó un Analizador de Imágenes, compuesto por un ordenador, una cámara, un monitor y una pantalla luminosa, y que sirve, entre otras cosas, para poder hallar la superficie foliar total de cada individuo.

En primer lugar se depositaron las acículas en una bandeja de metacrilato (o pantalla luminosa) con cuidado de que no se solaparan unas con otras para evitar la posible pérdida de información, ya que el analizador de imágenes sólo registra la sombra de los objetos depositados. La cámara registró la imagen de dichas acículas, que aparecían en el monitor como cuerpos opacos, y el ordenador midió la superficie total ocupada en Pixels lo que hizo necesario un posterior cambio de unidades a cm^2 .



Fotografía 3. Analizador de Imágenes utilizado en el ensayo para medir la superficie foliar.



Dibujo 1. Esquema de las distintas partes en que se dividió el sistema aéreo para hallar la superficie foliar media enterrada en cada tratamiento.

Una vez realizada esta operación se depositaron todas las acículas en los mismos sobres de papel donde se habían depositado los restos del tallo y se introdujeron en la estufa de ventilación forzada, siguiendo los mismos pasos que en el apartado anterior para hallar su peso seco aéreo. Cuando este dato quedó registrado, al igual que el resto de los individuos, se guardaron estas muestras para etapas posteriores del experimento.

Para llevar a cabo la caracterización morfológica de los 30 individuos se utilizaron los siguientes instrumentos y materiales:

- Regla de 30 cm con una precisión de 0.1 cm
- Calibre digital con una precisión de 0.01 mm
- Bisturí

- Colador
- Agua destilada
- Papel secante
- Sobres de papel
- Estufa de ventilación forzada a 50°C de temperatura
- Campana de desecación
- Balanza digital con una precisión de 0.0001 g
- Bolsas de plástico pequeñas
- Analizador Digital de Imágenes

4.1.3 Caracterización de nutrientes y de carbohidratos de reserva

La muestra analizada fue la misma que la utilizada para medir la morfología.

Para un correcto análisis de nutrientes es necesario lavar cuidadosamente los individuos con agua destilada y secarlos en una estufa de ventilación forzada para hacer más fácil su molido.

Una vez realizados los pasos indicados en el apartado “3.1.2 *Peso Seco Aéreo (PSA)* y *Peso seco Radical (PSR)*”, se introdujeron las muestras en el molino especial de una en una separando la parte aérea de la parte radical, y se llevó a cabo esta operación dos veces con cada muestra hasta conseguir el tamaño del molido deseado. Se tuvo la precaución de limpiar cuidadosamente todas las partes del molino con la ayuda de un pincel y de una pistola de aire a presión cada vez que se cambiaba tanto de individuo como de parte aérea a parte radical, para evitar la posible mezcla de material, y de recoger todos los restos que pudieran aparecer tras cada limpieza.

Cuando toda la muestra estuvo molida se volvió a introducir en un sobre de papel, con cuidado de sellar todas las partes de unión con cinta adhesiva para evitar la posible pérdida. Se etiquetó correctamente, en 5 lotes de 6 individuos cada uno, y se envió a analizar al laboratorio Agroalimentarios del M.A.P.A, los nutrientes: nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio y calcio.

Para el análisis de carbohidratos de reserva se tomó una muestra de 1 g de materia seca molida de cada individuo y se mandó analizar a un laboratorio privado de Navarra.

Los materiales utilizados en este apartado fueron:

- Molino especial
- Pincel
- Sobres de papel pequeños
- Cinta adhesiva
- Pistola de aire a presión

A fecha de hoy no se han recibido los resultados del análisis de nutrientes por lo que, aunque hubiera sido muy interesante completar los resultados con dicha información, no nos ha sido posible por causas ajenas a nosotros.

4.2 ENSAYO N°1: En Campo

4.2.1 Diseño

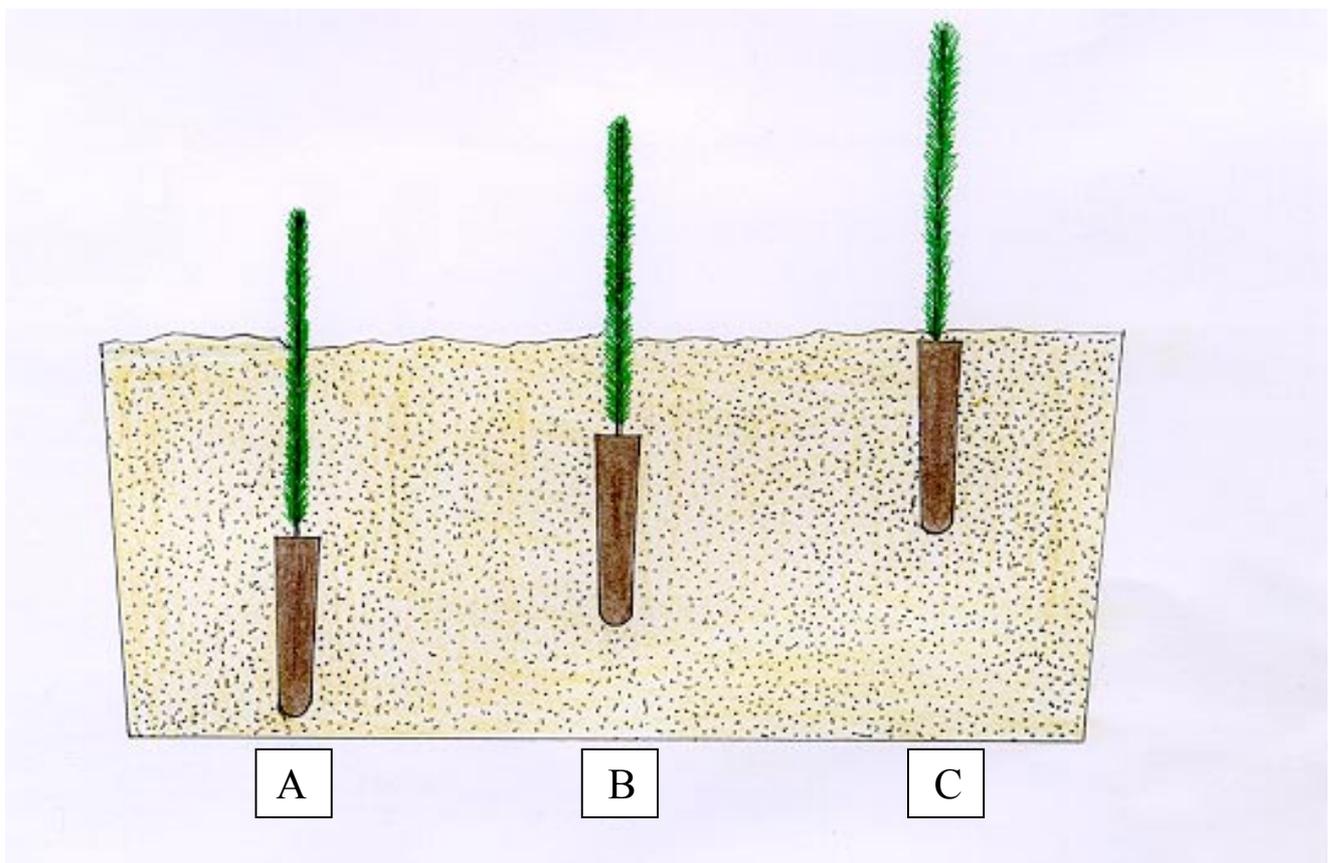
Para realizar el ensayo en campo se seleccionaron en el área sombreada del vivero 375 brinzales de *Pinus halepensis* del lote previsto, con una altura comprendida entre 10 y 25 cm y un diámetro en el cuello de la raíz mayor o igual a 2 mm.

Los tratamientos de profundidad diseñados para el experimento fueron:

Tratamiento A: Plantación profunda. Los individuos se plantaron al nivel de los 2/3 de su altura quedando como parte aérea propiamente dicha 1/3 de su altura.

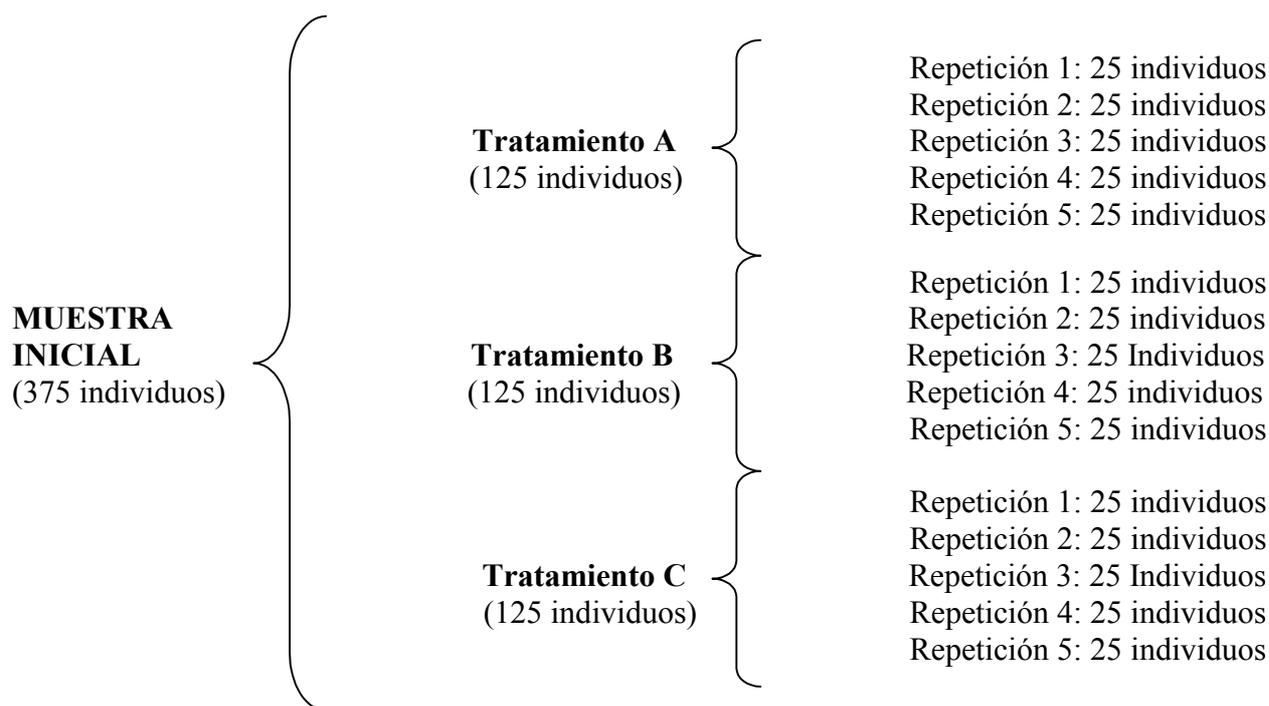
Tratamiento B: Plantación Semiprofunda. Los individuos se plantaron al nivel de 1/3 de altura quedando como parte aérea propiamente dicha los 2/3 de su altura.

Tratamiento C: Plantación a nivel. Los individuos se plantaron a nivel del cuello de la raíz.



Dibujo 2. Diseño de los distintos tratamientos de profundidad de plantación. A: 2/3 enterrada. B: 1/3 enterrada. C: control.

Y el esquema del diseño fue el siguiente:



- *Preparación de la planta*

Seleccionados los 375 individuos, se señaló el punto al que se quería que quedara enterrado cada uno conforme al tratamiento de profundidad de plantación al que pertenecían.

Para ello se midió con la regla la altura total de cada individuo, desde el cuello de la raíz hasta el punto de inserción de las acículas terminales, y se dividió en tres partes iguales y, en función del tratamiento de profundidad, se señaló con laca de uñas el punto de enterramiento.

Los individuos de cada tratamiento fueron agrupados en cinco repeticiones. De cada repetición se seleccionaron al azar 8 brinzales de los cuales se registró en un estadillo su altura total, medida con una regla desde el cuello de la raíz hasta el punto de inserción de las acículas terminales, y su diámetro, medido con un calibre digital en el cuello de la raíz.

Por último, para no perder la identidad de dichos brinzales una vez plantados en campo, se colocó alrededor de la parte baja del tallo un DYMO grapado en el que iba grabado el individuo y el tratamiento de profundidad al que pertenecía, de forma que quedara lo suficientemente holgado para que no dañara a la planta durante su crecimiento.

El instrumental utilizado fue:

- Regla de 30 cm con una precisión de 0.1cm.
- Laca de uñas roja.
- DYMO
- Grapadora
- Calibre digital con una precisión de 0.01 mm

Una vez terminados todos los preparativos, se ordenaron en bandejas todos los individuos según tratamientos de profundidad de plantación y repeticiones para evitar posibles errores en el momento de la plantación.

4.2.2 Descripción de la parcela

- Situación Geográfica y Fisiografía

La parcela utilizada está ubicada dentro de la finca del Centro de Mejora Forestal “El Serranillo”, situado a 2 Km de Guadalajara por la carretera de Fontanar. Sus coordenadas geográficas UTM son: 30TU861 y aparece en las hoja 6-6 del Mapa topográfico Nacional (Escala 1/200000).

Se sitúa en la primera terraza fluvial del río Henares, por lo que tiene escasa pendiente, está expuesta a todos los vientos y presenta una altitud de 635 m sobre el nivel del mar.

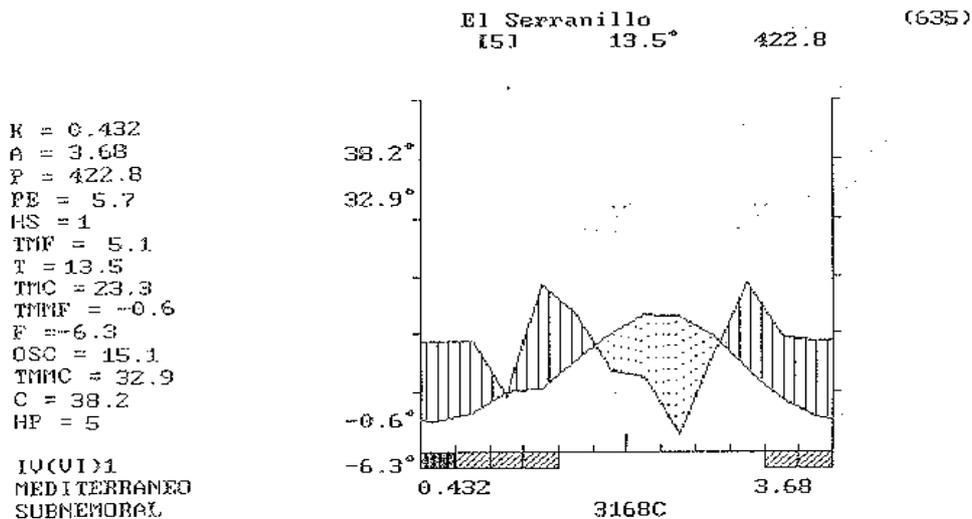
Sus coordenadas son:

3° 10' 10'' Este

40° 40' 06'' Norte

- Climatología

El área de estudio presenta una temperatura media anual de 13.5°C y una precipitación media anual de 422.8 mm. El intervalo de sequía es de 3.5 meses al año y el de helada segura de un mes. Por lo tanto, se puede decir que pertenece al Clima Mediterráneo Templado con respecto a la temperatura, y Mediterráneo Seco con respecto a la humedad.



Dibujo 3. Climodiagrama

Según la clasificación fitoclimática de Allué Andrade, pertenece al subtipo IV(VI)₁ Mediterráneo Subnemoral.

- *Edafología e hidrología*

El tipo de suelo que predomina en la zona estudiada no presenta afloramientos rocosos y el nivel de pedregosidad es prácticamente nulo.

La textura es Arenosa-Franca, con compacidad alta y con una capa superficial de despojos orgánicos escasa. El pH es próximo a 7.5 debido a la caliza existente, por lo que se clasifica como un suelo básico presentando un porcentaje de carbonatos medio-bajo.

Respecto a la riqueza en nutrientes, la presencia de N, K, P es escasa así como la riqueza de materia orgánica y, según el porcentaje de la relación C/N, se clasifica como suelo franco forestal.

La parcela se caracteriza por tener un buen drenaje y escasa erosión hídrica.

- *Vegetación*

Las plantas predominantes son herbáceas características de antiguas tierras de cultivo abandonadas, como gramíneas y leguminosas.

4.2.3 Preparación del terreno

La preparación del terreno se realizó a principios del mes de febrero del año 2000 y consistió en un subsolado lineal con un tractor de 80 C.V. Previamente se realizó un laboreo con el fin de eliminar las posibles aglomeraciones de la tierra así como las malas hierbas, y para airear las capas más superficiales del suelo facilitando la infiltración del agua y consiguiendo así una rápida y correcta instalación de la planta.

4.2.4 Plantación

La plantación se realizó durante la mañana del 16 de febrero de 2000, día en que se dieron las condiciones climáticas adecuadas para llevarla a cabo.

Una vez seleccionada y preparada la parcela donde se iba a realizar el estudio, se trasladaron los individuos en bandejas para evitar la deshidratación del sistema radical, correctamente etiquetados y agrupados por tratamientos de profundidad y repetición, tal y como se ha especificado en el apartado 3.2.1.

- *Procedimiento*

Para facilitar el trabajo y realizarlo en el menor tiempo posible la plantación se realizó con la ayuda de cinco personas de tal forma que, mientras dos iban cavando los agujeros en el suelo donde se iban a instalar las plantas, el resto iba plantándolas.

Los hoyos se realizaron con una pala y un azadón, y con una profundidad variable según el tratamiento. Los individuos se fueron extrayendo de las bandejas a medida que se iban plantando para que sufrieran lo menos posible y se colocaron de tal manera que ni las raíces ni la parte del tallo enterradas quedasen torcidas o dobladas por el peso de la tierra que las cubría, ya que esto podría influir negativamente en su desarrollo. Una vez colocada correctamente la planta, se pisó la tierra de alrededor para compactarla y evitar posibles huecos de aire que pudiesen influir negativamente en el desarrollo del sistema radical.

Los individuos pertenecientes al Tratamiento C fueron cubiertos de tierra hasta el cuello de la raíz, mientras que los de los Tratamientos A y B fueron cubiertos hasta la señal de la laca de uñas. En los tres casos se dejó un margen con respecto al punto al que debería llegar el nivel de la plantación, ya que se consideró que con las lluvias posteriores a ésta, la tierra se asentaría y bajaría de nivel.

- *Distribución espacial*

La plantación se realizó por bloques, correspondiéndose cada bloque con una repetición y quedando por tanto, 5 bloques o repeticiones por tratamiento. Los individuos seleccionados para su posterior extracción fueron distribuidos al azar dentro de cada repetición y, para no perder su identidad, se señalaron con etiquetas de plástico donde quedaban registrados el número de individuo y el tratamiento de profundidad (ANEXO N°1).

El marco de plantación establecido fue de 2×2 m.

El material utilizado en todo el proceso de la plantación fue:

- Pico
- Azada
- Vehículo de transporte
- Bandejas
- Etiquetas de plástico
- Rotulador

4.2.5 Extracción de la planta

La extracción de las plantas de campo se realizó el 30 de noviembre de 2000, transcurridos nueve meses y medio desde el momento de la plantación.

Una vez en la parcela se eligieron para la extracción dos plantas por repetición, es decir, diez plantas por tratamiento de profundidad de plantación y se señalaron con etiquetas de plástico. A continuación, con la ayuda de una retroexcavadora, se extrajo la planta con mucho cuidado y penetrando con el cazo de la máquina hasta una profundidad máxima de 55-65 cm según el tratamiento.

Para no perder parte de la muestra radical, la extracción se realizó en dos tiempos. En un primer momento el cazo extraía un bloque compacto de tierra en el que se encontraba el individuo mientras que tres operarios se encargaban de recoger todas las raíces que podían haber quedado en el terreno o que caían en el momento de la extracción. A continuación, el operario de

la retroexcavadora hacía balancear el cazo para que cayera parte de la tierra que había alrededor de la planta y así facilitar la extracción de ésta. Se tuvo mucho cuidado de no dañar el brinjal así como de conseguir extraer los sistemas radicales prácticamente al completo, rompiéndolos lo menos posible.

Una vez extraído el individuo se introdujo en una bolsa de plástico correctamente etiquetada y se transportó al laboratorio donde se agruparon los individuos por tratamientos de profundidad y se congelaron para su posterior análisis.

Para realizar la extracción de las plantas se utilizó:

- Retroexcavadora de 80 C.V.
- Etiquetas de plástico
- Bolsas de plástico correctamente etiquetadas
- Azadilla
- Guantes

4.2.6 Supervivencia en campo

El conteo de supervivencia se llevó a cabo en tres momentos desde el momento de la plantación: antes del verano (finales de junio), a mediados del verano (principios de agosto) y después del verano (finales de septiembre). Para ello se contó en la parcela el número de marras y se hallaron los porcentajes sobre el total de la población según el tratamiento y la repetición.

$$\% \text{ Supervivencia} = \frac{\text{N}^\circ \text{ Individuos vivos / Tratamiento y repetición}}{\text{N}^\circ \text{ total individuos / Tratamiento y repetición}} \times 100$$

4.2.7 Crecimiento en Campo

La altura y el diámetro de las plantas en campo fueron registrados a mediados del mes de octubre de 2000 en todos los individuos vivos, y en el mes de noviembre del mismo año, tras la extracción, se midió el Peso Seco Aéreo y el Peso Seco Radical.

Las variables que se estudiaron fueron:

- Crecimiento del Diámetro medido en el cuello de la raíz
- Crecimiento en altura
- Número de Ramificaciones, distancia entre nudos y la presencia acículas adultas
- Peso Seco Aéreo (PSA) y Peso Seco Radical (PSR)

- *Crecimiento del diámetro en el cuello de la raíz*

El diámetro en el cuello de la raíz se midió con un calibre manual. Dado que los individuos estaban enterrados a distintas profundidades según tratamientos, fue necesario, en el caso del Tratamiento A y del Tratamiento B, excavar alrededor del tallo con la ayuda de una

azadilla para hallar dicho punto y poder realizar la medición con la máxima precisión. Se tomaron dos medidas por individuo para evitar posibles errores.

El material utilizado en esta fase del ensayo fue:

- Calibre manual con una precisión de 0.01 mm.
 - Azadilla
 - Guantes
- *Crecimiento en altura*

Para medir la altura alcanzada por los brinzales se utilizó una regla y una azadilla, con la que se excavó alrededor del tallo para encontrar la marca realizada con laca de uñas antes de la plantación. La altura fue medida entre dicha marca y el punto de inserción de las acículas terminales.

En algunos individuos la guía terminal aparecía subdividida en dos. En estos casos se tomaba como altura total la comprendida entre la señal de la laca de uñas y el punto de inserción de las acículas terminales del tallo más largo.

El material utilizado fue:

- Regla de 30 cm con una precisión de 0.1 cm.
 - Azadilla
 - Guantes
- *Peso Seco Radical (PSR) y Peso Seco Aéreo (PSA)*

La variable biomasa sólo fue medida en 30 individuos, dos por repetición, elegidos al azar en el momento de la extracción de la planta. Esta fase del ensayo fue elaborada en el laboratorio.

Cuando las plantas estuvieron descongeladas y preparadas para ser procesadas, se separó la parte aérea de la parte radical realizando un corte en el cuello de la raíz con una tijera de podar sobre una bandeja de plástico para no perder parte de la muestra. Después, una vez realizado el conteo del número de ramificaciones y medida la distancia entre éstas, tal y como se ha explicado en el apartado anterior, se procesaron por separado la parte aérea de la radical.

En primer lugar, el sistema aéreo fue lavado con agua corriente encima de un colador para evitar la posible pérdida de muestra por el sumidero. El objetivo principal de este lavado era eliminar los restos de tierra e insectos que pudiesen quedar en la planta después de la extracción.

A continuación se lavó con agua destilada para eliminar todos los restos de sales que pudiesen interferir en los resultados del análisis de nutrientes que se realizaron posteriormente. Para ello, se enjuagó tres veces consecutivas con agua destilada: dos en dos cubos distintos y un tercero, en un vaso de precipitados del laboratorio. Después de dejaron las muestras en papel secante y se introdujeron en sobres de papel correctamente etiquetados. Posteriormente se metieron en una estufa de ventilación forzada, a 50° C de temperatura durante un periodo mínimo de 48 horas con el fin de conseguir que los tejidos internos de la planta se secan.

Transcurrido este tiempo, se extrajeron los sobres de la estufa y se introdujeron en una campana de desecación durante un periodo mínimo de 30 minutos para que perdieran la humedad adquirida en el proceso de secado.

Una vez realizado todo el proceso de secado, se pesaron las partes aéreas de cada individuo en una balanza digital tal y como se describe en el apartado 3.1.2.

En segundo lugar se procesó el sistema radical. Una vez descongelada la planta y separada la parte aérea de la parte radical, se introdujo el cepellón en una bandeja con agua para limpiar la tierra pegada a éste y facilitar la identificación de las raíces objeto de estudio. A continuación se cortaron todas las raíces que sobresalían de la silueta del cepellón original con la ayuda de unas tijeras y unas pinzas y se depositaron en otra bandeja con agua, por lo que sólo se tuvo en cuenta la parte de raíz nueva producida durante el periodo de crecimiento de la planta en campo.

Una vez seleccionadas todas las raíces se lavaron con agua corriente encima de un colador para evitar que se pudiera perder parte de la muestra por el sumidero. Después fueron lavadas con agua destilada para eliminar cualquier resto de sales y se depositaron en papel secante.

A continuación se introdujeron en un sobre de papel correctamente etiquetado y se metieron en una estufa de ventilación forzada, a una temperatura de 50° C durante un periodo de tiempo mínimo de 48 horas. Una vez transcurrido este tiempo se extrajeron de la estufa y se depositaron en un desecador para estabilizar la humedad de la muestra. Las raíces permanecieron en dicha cámara durante un periodo de tiempo mínimo de 30 minutos y la muestra se pesó en una balanza digital, tal y como se explica en el apartado 3.1.2.

Para medir el *PSA* y el *PSR* se utilizaron:

- Tijeras de podar
- Tijeras
- Guantes
- Bandejas de plástico
- Pinzas
- Agua corriente
- Cubos
- Agua destilada
- Colador
- Papel secante
- Sobres de papel etiquetados
- Estufa de ventilación forzada a 50°C de temperatura
- Campana de desecación
- Balanza digital con una precisión de 0.0001 g

4.2.8 Capacidad de Regeneración Radical (CRR)

- *Diseño*

Para estudiar la Capacidad de Regeneración Radical del *Pinus halepensis* Mill. se tomó una muestra de 60 individuos del lote previsto situado en el área sombreada del vivero con una altura que estuviese comprendida entre los 10 cm y los 25 cm, medida desde el cuello de la raíz hasta el punto de inserción de las acículas terminales, y un diámetro mayor o igual a 2 mm, medido en el cuello de la raíz.

La muestra fue dividida en tres grupos que se correspondían con cada uno de los tratamientos de profundidad de plantación propuestos para este proyecto, es decir:

GRUPO 1	TRATAMIENTO A: 2/3 enterrada
GRUPO 2	TRATAMIENTO B: 1/3 enterrada
GRUPO 3	TRATAMIENTO C: Control (a nivel del cuello de la raíz)

- *Descripción de la parcela*

La parcela utilizada estaba situada cerca de la utilizada en el “Ensayo N°1: Campo”, por lo que las características eran muy similares y este apartado se remite al apartado 3.2.2.

- *Preparación del terreno.*

La preparación del terreno consistió en un ahoyado con una barrena helicoidal enganchada a un tractor de 80 C.V.

- *Preparación de la planta*

El estudio de CRR consistió en analizar las raíces nuevas que los brinzales desarrollaron durante el periodo de tiempo en que permanecieron plantados. Es muy importante para ello extraer al completo el sistema radical de los individuos por lo que, en vez de plantarlos directamente sobre el terreno, se decidió plantarlos en unos contenedores que imposibilitaran la rotura y pérdida de parte del sistema radical en el momento de la extracción. Antes de iniciar la plantación de los individuos se prepararon los contenedores.

La forma de los contenedores era tronco-cónica, con diámetro superior de 40 cm, un diámetro inferior de 31.5 cm, una altura de 34.5 cm y un volumen de 35 dm³.

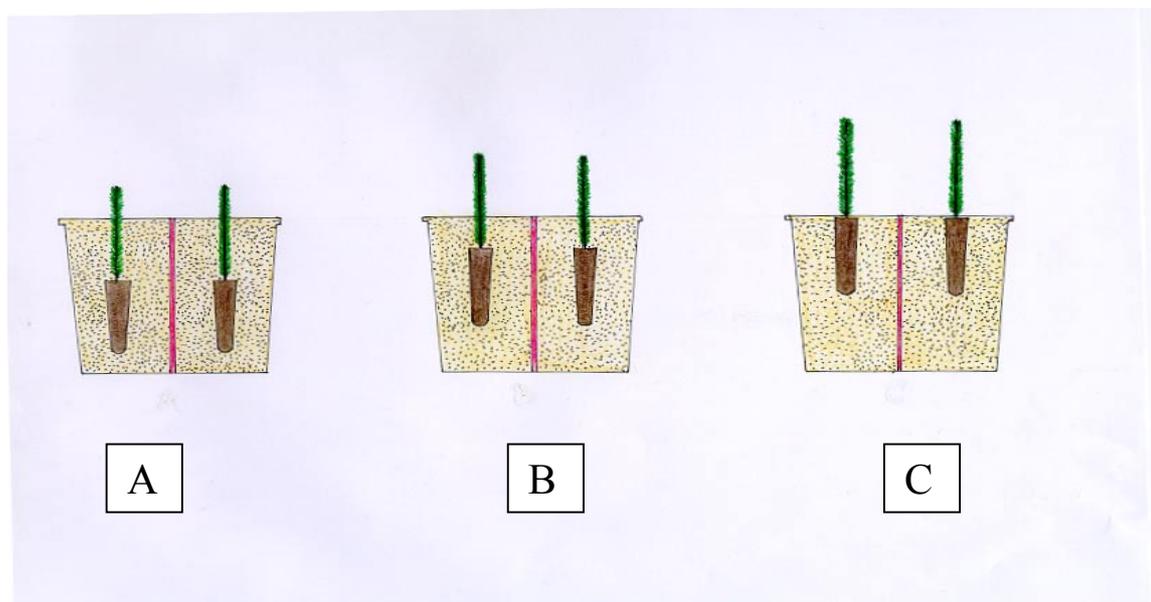


Fotografía 4. Contenedores utilizados en el experimento.

Como los contenedores presentaban en el fondo unos agujeros para facilitar el drenaje, se colocaron unas mallas de plástico que tapasen dichos agujeros para evitar que las raíces nuevas producidas por las plantas pudiesen salir del contenedor y quedarse en el terreno tras la extracción.

Aún así algunos individuos, especialmente los que se correspondían con el Tratamiento A de profundidad de plantación, produjeron raíces que atravesaron estas mallas.

El diseño fue el siguiente:



Dibujo 4. Esquema del diseño de plantación para el test de capacidad de regeneración radical. A: 2/3 enterrada. B: 1/3 enterrada. C: control.

El material utilizado fue:

- 30 Contenedores negros de plástico
- 30 Láminas de plástico rígido
- Malla de plástico

- *Plantación y Distribución espacial.*

La plantación se llevó a cabo el 17 de febrero de 2000. Una vez seleccionada la planta y preparados los contenedores se trasladaron a la parcela donde se iba a desarrollar el trabajo. Como se ha mencionado anteriormente se contaba con 30 contenedores de plástico negro, 10 contenedores por tratamiento, y con 20 individuos por tratamiento es decir, un total de 60 muestras. Se colocaron dos individuos del mismo tratamiento de profundidad de plantación por contenedor.

Los contenedores se introdujeron en los hoyos abiertos por la barrena para que las plantas creciesen con una temperatura, humedad y exposición a la luz lo más parecidas posibles a como si hubiesen sido plantadas directamente en el campo. El sustrato utilizado en la plantación fue el mismo que el de la parcela.

Se llenaron teniendo cuidado de dejar a cada individuo el mismo volumen de tierra y espacio para el desarrollo de las raíces para no modificar el desarrollo natural de la planta.

A medida que se llenaba el contenedor se colocaba la planta de tal forma que el cepellón y la parte aérea quedasen correctamente colocados, evitando que se torcieran por el peso de la tierra o que apareciesen bolsas de aire. Una vez plantados los individuos en los contenedores, se introdujeron en el terreno quedando su parte superior al mismo nivel que el suelo.

Los 30 contenedores se distribuyeron en 5 bloques y cada bloque contenía dos contenedores de cada tratamiento de profundidad de plantación. La distribución espacial de los tratamientos de profundidad dentro de cada bloque se realizó al azar (ANEXO N°2).

Una vez terminada la plantación se realizó un riego de asentamiento sobre toda la parcela y, durante el periodo de tiempo que duró el ensayo, recibieron un riego por inundación una vez por semana, puesto que el hecho de permanecer en los contenedores limitaba la disponibilidad de agua.

Los materiales utilizados durante la plantación fueron:

- Pala
- Azada
- 30 contenedores tronco-cónicos
- Guantes

- *Extracción*

La extracción se realizó transcurrido un mes y medio aproximadamente desde la plantación, los días 29 y 30 de marzo de 2000.

Para ello, se cavó con la ayuda de una azada alrededor de cada contenedor y se extrajeron con la ayuda de dos personas. A continuación se trasladaron con un vehículo a una zona donde el trabajo de extracción de la planta resultara más cómodo.

Para extraer las plantas de los contenedores se inclinaron parcialmente sobre un plástico para que, a medida que se iba sacando la planta, se pudiese depositar la tierra sobre una superficie que nos permitiera recuperar algún resto de raíz en el caso de que se desprendiera del cepellón. Sujetando la parte aérea con una mano, con la otra se fue retirando la tierra que había alrededor de cada planta. Cuando se llegó al sistema radical, el trabajo se hizo más despacio y con mayor cuidado ya que las raíces nuevas son muy sensibles a la rotura. Una vez extraído el cepellón, se volcó el contenedor sobre el plástico colocado en el suelo y se limpió el resto de tierra de los posibles restos de raíz que pudiesen aparecer. Cuando el contenedor estuvo vacío, se extrajeron los trozos de malla colocados en su base y, en el caso de que las raíces los hubiesen atravesado, se recogieron dichos trozos de raíz.

Una vez extraída la planta por completo, se depositó en una bolsa de plástico correctamente etiquetada y se guardó en el congelador hasta el momento en que se pudiera procesar.

Los materiales utilizados fueron:

- Azada
- Pala
- Vehículo de transporte
- Guantes
- Bolsas de plástico etiquetadas
- Plásticos

- *Crecimiento*

Las variables que se midieron en el laboratorio para caracterizar el crecimiento de los individuos fueron:

- Peso seco aéreo
- Longitud de las raíces nuevas
- Peso seco radical (de las raíces nuevas)

Para poder procesar con mayor comodidad cada individuo se separó la parte aérea de la parte radical realizando, sobre una bandeja de plástico, un corte con una tijera de podar a la altura del cuello de la raíz. A continuación se introdujo la parte aérea en una bolsa de plástico correctamente etiquetada y se congeló para su posterior análisis. Como en esta fase del experimento sólo se iban a considerar las raíces nuevas producidas por el individuo durante el periodo de tiempo en el que estuvo plantado, en vez de conservar todo el cepellón para su posterior elaboración sólo se conservaron las raíces nuevas, eliminando el resto del sistema radical. Estas raíces nuevas se introdujeron en bolsas de plástico correctamente etiquetadas y se congelaron para su posterior preparación.

En primer lugar se procesó la parte aérea y, en segundo lugar, la parte radical.

- Peso Seco Aéreo (PSA)

Una vez descongelada la parte aérea se procedió como en el apartado 3.1.2.

Con la ayuda de un colador se lavó con agua corriente la parte aérea de la muestra, evitando que se perdiera parte por el sumidero, y eliminando los posibles restos de tierra y turba que pudieran quedar entre las acículas. A continuación se lavó con agua destilada para eliminar los posibles restos de sales y, una vez limpia, se depositó en papel secante. Después se metió la muestra en un sobre de papel correctamente etiquetado y se introdujo en una estufa de ventilación forzada a una temperatura de 50° C durante un periodo mínimo de 48 horas, para conseguir el completo secado de los tejidos internos de la planta. Transcurrido este tiempo, se extrajo el sobre de la estufa y se depositó en una campana de desecación durante un periodo mínimo de 30 minutos, donde los cristales de gel de sílice absorbieron la humedad. A continuación, se sacó la muestra del sobre y se pesó en una balanza digital de 0.0001 g. de precisión, tal y como se describe en el apartado 3.1.2.

Los materiales utilizados fueron:

- Tijeras de podar
- Guantes
- Bandejas de plástico
- Colador
- Agua corriente
- Agua destilada
- Papel secante
- Sobres de papel etiquetados
- Estufa de ventilación forzada a 50° C de temperatura
- Campana de desecación
- Balanza digital con una precisión de 0.0001 g.

- Longitud de Raíces nuevas

Como se ha mencionado anteriormente sólo se estudiaron las raíces nuevas que produjo la planta durante su crecimiento mientras estuvo enterrada en el contenedor.

El tratamiento del sistema radical se realizó en dos pasos: en primer lugar se extrajeron las raíces nuevas de todos los cepellones producidas por cada individuo y se congelaron y, en segundo lugar, dichas raíces se descongelaron para ser procesadas posteriormente.

Después de separar el sistema aéreo del sistema radical con las tijeras de podar, se sumergió el cepellón en una bandeja con agua para eliminar los restos de tierra y barro que quedaron adheridos después la extracción. Una vez limpio, se traspasó el cepellón a otra bandeja sin agua para extraer con la ayuda de unas tijeras y unas pinzas todas las raíces nuevas producidas. A medida que se fueron extrayendo se iban depositando en la bandeja con agua para evitar su deshidratación. En este caso fue fácil diferenciarlas con respecto al resto de las raíces del cepellón ya que los individuos estuvieron poco tiempo plantados y acababan de producirlas, por lo que aún presentaban un aspecto blanquecino y carnoso desde el punto en que nacían hasta el extremo opuesto.

Después de extraer todas las raíces nuevas y depositarlas en la bandeja con agua, se filtraron con un colador y se lavaron para eliminar todo resto de tierra y barro que pudiera quedar. A continuación se depositaron en un papel secante con la ayuda de unas pinzas durante un breve periodo de tiempo para evitar que se deshidrataran y, tras depositarlas en una bolsa de plástico correctamente etiquetada, se congelaron para ser procesadas más adelante.

Los materiales utilizados en esta primera fase del estudio del sistema radical fueron:

- Tijeras de podar
- Tijeras
- Pinzas
- Guantes
- Bandejas de plástico
- Colador
- Agua corriente
- Papel secante
- Bolsas de plástico

Una vez elaborada la parte aérea se continuó con la segunda parte del estudio del sistema radical, tal y como se ha explicado antes.

En este segundo paso, tras descongelar las raíces nuevas de cada individuo, se introdujeron en un recipiente con agua para evitar que se deshidrataran permaneciendo a la intemperie y, al mismo tiempo, hidratarlas un poco después de la fase de la congelación. Transcurrido un tiempo mínimo de 10 minutos para asegurar dicha hidratación y con la ayuda de unas pinzas, se colocó cada fragmento de raíz uno a continuación del otro manteniéndolos estirados, junto a una regla de forma que su escala nos permitiera hallar la longitud total de las raíces producidas. Había fragmentos que presentaban muchos tramos en curva, en estos casos se cortaban con unas tijeras en trozos más pequeños consiguiendo tramos rectos y se colocaban uno a continuación del otro.



Fotografía 5. Preparación de las raíces nuevas antes de realizar su medición.

Los materiales utilizados fueron:

- Recipiente de plástico
- Agua corriente

- Pinzas
- Tijeras
- Regla de 30 cm con una precisión de 0.1 cm

- *Peso Seco Radical (PSR)*

Al igual que en el ensayo de campo, sólo se consideró el peso de las raíces nuevas producidas por el individuo durante el periodo de tiempo que permaneció plantado.

Una vez acabado el proceso de la medición de la longitud de las raíces nuevas se continuó con la preparación para pesar el sistema radical seco considerado. Las operaciones son iguales a las realizadas en el apartado 3.1.2.

Los materiales utilizados fueron:

- Pinzas
- Guantes
- Colador
- Agua corriente
- Agua destilada
- Papel secante
- Sobres de papel etiquetados
- Estufa de ventilación forzada a 50° C de temperatura
- Campana de desecación
- Balanza digital con una precisión de 0.0001 g

- *Caracterización de Carbohidratos de reserva*

La muestra que se utilizó para la caracterización de carbohidratos de reserva fue la misma que la utilizada para hallar el crecimiento de las plantas.

A la hora de realizar un análisis de hidratos de carbono es necesario lavar la muestra con agua destilada para eliminar restos de sales que puedan interferir en los resultados.

El análisis se realizó tanto en la parte aérea como en la parte radical de cada individuo y, para conseguir el tamaño del grano requerido para dicho análisis, se molió dos veces cada muestra.

Una vez secada y pesada la muestra, se molieron en un molino especial por separado el sistema aéreo del sistema radical de cada individuo, limpiando con precaución y con la ayuda de un pincel todas las partes del aparato cada vez que se realizaba un molido. Cuando se cambiaba de parte radical a parte aérea, se completaba la limpieza con una pistola de aire a presión para evitar que se mezclaran las muestras, recogiendo tras la limpieza todos los posibles restos que hubiesen podido quedar en las distintas partes del molino.

Después se introdujo parte de la muestra en un sobre de papel correctamente etiquetado, que se envió al laboratorio privado de Navarra para ser analizada, y la otra parte de la muestra se introdujo en otro sobre de papel también etiquetado y se guardó como reserva por si ocurría

algún imprevisto en el trayecto desde el Centro de Mejora Forestal “El Serranillo” hasta los laboratorios. Se tuvo la precaución de sellar con cinta adhesiva todas las juntas del sobre para evitar pérdidas de la muestra.

Los materiales utilizados fueron:

- Sobres de papel
- Cinta adhesiva
- Molino especial
- Pincel
- Pistola de aire a presión

4.2.9 Análisis de nutrientes

En esta fase del trabajo se siguieron los mismos pasos que en el apartado 3.1.3. Una vez pesadas correctamente la parte aérea y la parte radical de cada individuo utilizado para medir la morfología, se seleccionaron al azar cinco individuos por tratamiento de profundidad y se molieron en un molino especial.

Después de registrar los datos del peso seco de cada individuo, se introdujo la muestra seca en un molino especial separando la parte aérea de la radical de cada individuo, sin que se perdiera la identidad de cada una. Debido a que los brinzales habían alcanzado un tamaño considerable, fue necesario moler cada muestra tres veces con el fin de conseguir el tamaño del molido necesario para poder realizar correctamente la caracterización de nutrientes.

Cada vez que se molía una muestra seca, tanto de parte aérea como de parte radical, se limpiaban cuidadosamente todas las partes del molino con la ayuda de un pincel para no perder parte del molido y, cuando se cambiaba de individuo o de parte aérea a radical, se limpiaban con aire a presión para evitar la posible mezcla de las distintas muestras.

Una vez molido cada individuo, se introdujo cada muestra en sobres de papel pequeños correctamente etiquetados, manteniendo separadas la parte aérea de la radical en cada individuo, y se enviaron al laboratorio Agroalimentario del M.A.P.A. Previamente los sobres habían sido sellados con cinta adhesiva para evitar la pérdida de la muestra a través de las puntos de unión del papel.

Los nutrientes mandados analizar fueron Nitrógeno, Fósforo, Potasio, Magnesio y Calcio.

Para llevar a cabo esta fase se utilizó como material:

- Molino especial
- Pincel
- Sobres de papel pequeños
- Cinta adhesiva
- Pistola de aire a presión

A fecha del día de hoy no se han recibido los resultados de dichos análisis por lo que, aunque hubiese sido de gran interés, su estudio y relación con los resultados obtenidos en este ensayo no se han podido realizar ni incluir en esta fase del trabajo.

4.3 ENSAYO N°2: En Invernadero

4.3.1 Diseño.

Para realizar el estudio en invernadero se seleccionó, dentro del lote previsto en el área sombreada del vivero, una muestra de 480 brinzales de *Pinus halepensis* con una altura comprendida entre los 10 y los 25 cm, medida desde el cuello de la raíz hasta el punto de inserción de las acículas terminales, y un diámetro medido en el cuello de la raíz mayor o igual a 2 mm. En la plantación se consideraron tres niveles distintos de profundidad que se correspondían con tres tratamientos:

Tratamiento A: Plantación Profunda. Los individuos se plantaron al nivel de los 2/3 de altura quedando como parte aérea propiamente dicha 1/3 de su altura.

Tratamiento B: Plantación Semiprofunda. Los individuos se plantaron al nivel de 1/3 de altura quedando como parte aérea propiamente dicha los 2/3 de su altura.

Tratamiento C: Plantación a nivel. Los individuos se plantaron a nivel del cuello de la raíz.

A su vez, la plantación fue dividida en dos grupos que se correspondían con dos tratamientos de humedad diferentes:

Grupo HÚMEDO: que recibió un riego de asentamiento de 20 l/m² después de realizar la plantación, una dosis cada mes de 10 l/m² desde el momento de la plantación en marzo de 2000 hasta el mes de junio del mismo año y tres riegos estivales de 10 l/m² de dosis distribuidos de la siguiente manera:

- Principios de agosto de 2000
- Mediados de agosto de 2000
- Mediados de septiembre de 2000

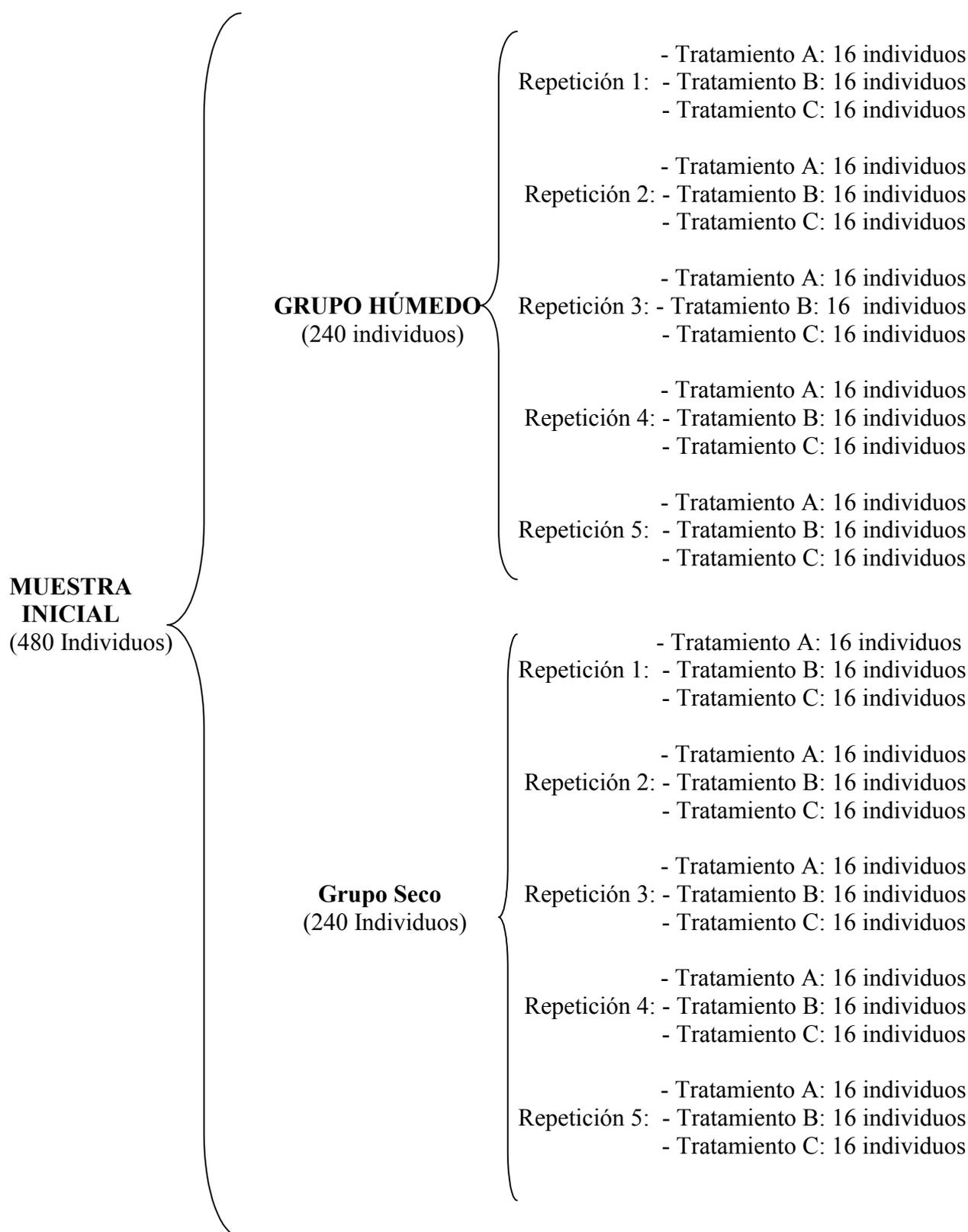
Grupo SECO: que recibió un riego de asentamiento de 20 l/m² en el momento de la plantación y una serie de riegos estivales de 10 l/m² de dosis, distribuidos de la siguiente manera:

- Principios de agosto de 2000
- Mediados de agosto de 2000
- Mediados de septiembre de 2000

Estos riegos estivales fueron necesarios debido a las altas temperaturas alcanzadas dentro del invernadero durante el verano, que llegaron a comprometer la supervivencia de todos los individuos, tanto del tratamiento húmedo como del seco.

Por lo tanto, los 480 individuos de la muestra inicial quedaron subdivididos en dos grupos de humedad. Cada uno de estos grupos de humedad se dividió en cinco repeticiones y cada repetición se dividió, a su vez, en tres grupos que se correspondían con las tres profundidades de plantación distintas diseñadas para este experimento.

Es decir:



Cada Repetición se plantó en un contenedor de 1 m³ de capacidad sobre un sustrato arenoso. La colocación de los tratamientos dentro de cada contenedor se realizó al azar (ANEXO N° 3).

- *Preparación de la planta.*

Las plantas fueron preparadas del mismo modo que las utilizadas en campo.

Una vez seleccionadas y agrupadas correctamente, se midió con una regla la altura total desde el cuello de la raíz hasta el punto de inserción de las acículas terminales y se dividió dicha cantidad en tres partes iguales. Según el tratamiento de profundidad de plantación, se señaló con la laca de uñas en cada individuo el punto de enterramiento que le correspondía, es decir: en el Tratamiento A, a 2/3 de su altura; en el Tratamiento B, a 1/3 de su altura; y en el Tratamiento C, en el cuello de la raíz. A continuación se procedió con su plantación.

El material utilizado fue:

- Regla de 30 cm con una precisión de 0.1 cm
- Laca de uñas

4.3.2 Plantación

La plantación se llevó a cabo el 18 de febrero de 2000 para ello, en primer lugar, se cogieron diez contenedores de plástico, cinco para el grupo húmedo y cinco para el grupo seco, con una capacidad de 1 m³ y se llenaron con arena de río. A continuación, con la ayuda de un cartón de 1 m² de dimensión que contenía 48 agujeros repartidos de forma más ó menos equidistante, y superponiéndolo en la arena, se señalaron los puntos donde se iban a instalar las plántulas, quedando seis filas de ocho agujeros cada una. Por lo tanto la distribución final fue de 16 individuos por tratamiento de profundidad de plantación en cada contenedor, distribuyéndolos en filas de 8 individuos cada una.

Con las etiquetas de plástico pequeñas se señaló qué filas correspondían a cada tratamiento de profundidad y, con la ayuda de un tubo de PVC, se procedió a realizar los agujeros en la arena para poder plantar los individuos. Como los individuos iban a quedar muy próximos entre sí para poder realizar los agujeros con la ayuda de una azadilla, se recurrió a este sistema ya que los tubos eran lo bastante estrechos para que, una vez introducidos en el sustrato, la arena quedase adherida a sus paredes y se pudiese extraer fácilmente, y lo suficientemente anchos para dejar un agujero con un diámetro tal que se pudieran introducir los pinos sin dificultades.

Una vez realizados los agujeros, se fueron tomando los individuos de uno en uno y se fueron plantando cuidadosamente siempre respetando el tratamiento de profundidad al que pertenecía cada uno. Durante esta fase se hizo hincapié en plantar los cepellones correctamente, sin que las partes aéreas enterradas en los tratamientos A y B se torciesen, y sin dejar bolsas de aire tanto alrededor de los tallos enterrados como de los cepellones.

Terminada ya la plantación propiamente dicha, se señalaron al azar cinco contenedores para el Grupo HÚMEDO y otros cinco para el Grupo SECO con etiquetas de plástico grandes, en las que se registró el número de la repetición y el tipo de tratamiento de humedad al que pertenecían, así como la fecha de la plantación. Después se regaron por aspersión todos los contenedores con una dosis de 20 l/m² para que el sustrato quedase bien asentado.

Los materiales utilizados fueron:

- 10 Contenedores con capacidad de 1 m³
- Arena de río
- Cartón de 1 m² con 48 agujeros
- Tubos de PVC con un diámetro de 8 cm
- Guantes
- Etiquetas de plástico grandes y pequeñas
- Rotulador

4.3.3 Potencial Hídrico

El potencial hídrico es una variable que nos indica el estado hídrico de las plantas en los distintos momentos del día. Normalmente se registran dos datos: un máximo, antes del amanecer, y un mínimo, a mediodía.

A lo largo del experimento se realizaron tres medidas: cuando se observó la superficie seca (marzo 2000), antes del verano (junio 2000) y después del verano (septiembre 2000).

El día anterior a la toma de datos se eligió al azar una planta por repetición y tratamiento de profundidad de plantación en cada contenedor (30 plantas en total) y se señaló con unas etiquetas de alambre. También se dejaron etiquetadas unas bolsas pequeñas de plástico y el resto de los materiales preparados para ser utilizados.

El día de la medición se tomaron como muestra tallos situados en la parte baja de los brinzales, cortados limpiamente con un bisturí y antes de la salida del sol para evitar que la planta comenzase a fotosintetizar y modificase el valor máximo de la presión hídrica. Nada más cortar los tallos, se introdujeron rápidamente en unas bolsas de plástico transparentes etiquetadas y se llenaron de vapor, insuflando aire, para crear una atmósfera saturada. A continuación las bolsas se metieron en una bolsa negra opaca y en una nevera portátil, para evitar que les diera la luz y conservarlas adecuadamente antes de llegar al laboratorio. Todo este proceso se realizó lo más rápidamente posible.

Para llevar a cabo estas operaciones se utilizaron:

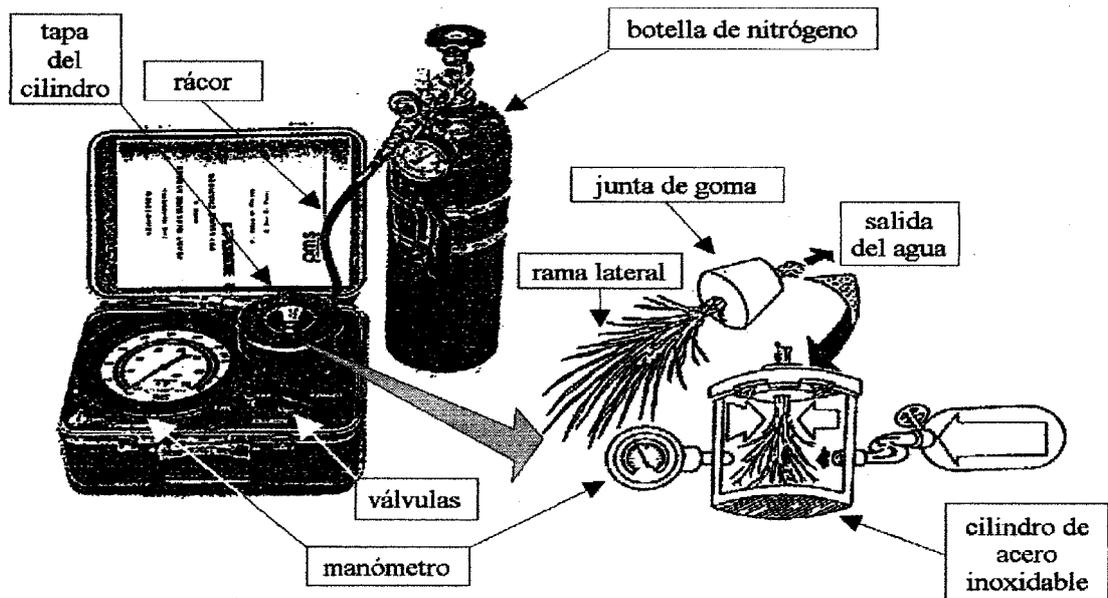
- Bisturí
- Linterna
- Etiquetas con alambre
- Bolsas de plástico etiquetadas
- Bolsa negra opaca
- Nevera
- Cámara de Scholander

Una vez terminada la toma de muestras, se trasladó la nevera al laboratorio y se introdujeron la bolsa opaca, junto con las plantas, en una nevera donde permanecieron a una temperatura de 5°C. Las plantas se fueron sacando de una en una para llevar a cabo la medición.

El potencial hídrico se mide con la Cámara de Scholander que está formada por:

- Botella de Nitrógeno gaseoso (N₂)
- Válvulas de tres vías de escape (apertura, cierre y salida del gas)
- Manómetro

- Rácor
- Reductor en forma de cilindro de acero inoxidable
- Papel humedecido
- Gomas tronco-cónicas
- Tubos metálicos que sirven para enhebrar las muestras en las gomas
- Lámparas auxiliares
- Lupas
- Bisturí



Dibujo 5. Esquema del funcionamiento de la cámara de Scholander.

La cámara de Scholander basa su funcionamiento en la tensión interna de los tejidos de la planta. Por un lado, el N_2 es insuflado en el cilindro de acero y ejerce una presión en el tallo de la planta. Por otro lado, en el interior de dicho tallo el agua está sometida a una tensión distinta, proporcional a su contenido hídrico. Cuando la presión ejercida por el gas se iguala a la tensión de los tejidos internos de la planta, el agua de éstos tiende a salir al exterior a través del xilema del tallo. El valor que alcanza la presión en dicho punto es lo que se conoce como potencial hídrico (Ψ).

Una vez en el laboratorio se abrió la botella de N_2 , que estaba conectada a la cámara mediante un tubo llamado rácor, comprobando que la válvula de escape estaba cerrada. Se utilizó este gas porque es inerte para los seres vivos. Después, se extrajo una muestra de la nevera y se quitaron las acículas más cercanas a su extremo; se tomó uno de los tubos metálicos y se introdujo en una de las gomas tronco-cónicas atravesándola. A continuación se introdujo la muestra por el tallo pelado en dicho tubo y se tiró de él, sacándolo de la goma y dejando la muestra “enhebrada” en la goma para introducirla en la cámara. Entonces se dio un corte fino con el bisturí en el extremo para eliminar los posibles restos de resina y para dar un corte limpio, en el caso de que el anterior no lo fuera. Todos los pasos de manipulación de la planta se realizaron en el menor tiempo posible para evitar la pérdida de agua en la planta, lo que supondría una modificación en los datos obtenidos.

En el fondo del cilindro se colocó un papel mojado para mantener la humedad y se introdujo un cilindro reductor para evitar la excesiva pérdida de gas, provocada al utilizar muestras pequeñas. Seguidamente, se colocó la goma en la tapa del cilindro y se cerró, de tal forma que quedó el corte de la muestra en el exterior de la cámara, permitiéndonos así observar cualquier modificación en su superficie, y el resto de la muestra en el interior del cilindro en contacto directo con el gas. La goma, además de servir para colocar correctamente la muestra, sirvió como junta, impidiendo que el gas se escapara por la tapa del cilindro y permitiendo así que estuviera cerrado herméticamente.

Por lo tanto, una vez colocada la muestra en la tapa de la cámara y cerrado el cilindro, se comenzó a insuflar N₂, abriendo la válvula de entrada, y el manómetro comenzó a reflejar la presión a la que estaba la planta dentro del cilindro. Cuando se observó con la lupa que el xilema comenzaba a cambiar de color y que el agua de los tejidos internos comenzaba a emerger, momento en que la presión exterior ejercida por el gas y la interior de los tejidos se igualaron, se cortó el paso del gas inmediatamente y se leyó la lectura del manómetro, que nos indicaba el valor del potencial hídrico.

Para observar con mayor facilidad este fenómeno, se recurrió a la ayuda de unas lámparas auxiliares y se tuvo la precaución de que, cerca del momento crítico, el gas no entrara a tanta velocidad como al principio, controlando su paso al interior del cilindro con la válvula de entrada.

Una vez terminado todo el proceso, se abrió la válvula de escape y se limpió todo preparándolo para la siguiente muestra.

Para medir el potencial hídrico de mediodía (Ψ_1) se volvieron a tomar muestras de tallos inferiores en los mismos ejemplares que para la medición del potencial hídrico de madrugada (Ψ_0), siguiendo los mismos pasos que en el caso anterior.

El manómetro registraba las medidas de la presión en bares por lo que fue necesario transformarlas en Megapascales (MPa), ya que es la medida oficial de Sistema Internacional para mediciones fisiológicas.

4.3.4 Supervivencia

La supervivencia de los brinzales fue medida en tres momentos a lo largo de la vida del experimento: antes del verano (finales de junio), a mediados del verano (principios de agosto) y después del verano (finales de septiembre). Para ello se contaron las marras y se hallaron los porcentajes sobre el total de la población según tratamiento y grupo.

$$\% \text{ Supervivencia} = \frac{\text{N}^\circ \text{ individuos vivos/ Tratamiento}}{\text{N}^\circ \text{ total individuos/Tratamiento}} * 100$$

4.3.5 Extracción de la planta.

La extracción de la planta se llevó a cabo en el mes de octubre de 2000.

No se pudieron extraer todos los individuos ya que el trabajo era muy complicado pues, al estar enterrados tan próximos entre sí a distintas profundidades y permanecer en un estado de déficit hídrico tan elevado, la posibilidad de realizar la extracción sin dañar a las plantas o sin perder parte de la materia de estudio era mínima. Por lo tanto se decidió extraer un contenedor de cada grupo de humedad, que fueron elegidos teniendo en cuenta el menor número de marras existente y el mejor aspecto físico. Por ello se eligieron el contenedor clasificado como “HÚMEDO 5” y el clasificado como “SECO 1”. Este proceso requirió la ayuda de varias personas y los siguientes materiales:

- Etiquetas con alambre
- Bolsas de plástico etiquetadas
- Sierra de calar
- Guantes
- Manguera con agua

En primer lugar se etiquetaron todas las plantas vivas del contenedor señalando el grupo de humedad, el tratamiento de profundidad y el individuo. Para facilitar la extracción, se decidió cortar con una sierra de calar uno de los laterales del contenedor e ir extrayendo los individuos uno a uno a medida que se retiraba la arena progresivamente con la ayuda de una manguera. Como los individuos estaban muy juntos fue muy complicado conseguir que no se rompieran parte de los sistemas radicales; cuando esto ocurría se recogían y se metían en una bolsa etiquetada con el grupo de humedad, el tratamiento de profundidad y el individuo, para evitar los errores que se pudieran cometer. Una vez extraídos todos los individuos se introdujeron en bolsas de plástico y se depositaron en un congelador hasta el momento en que se pudiesen procesar. Al congelarlos se evitó que la planta se pudiese estropear con el paso del tiempo. No se extrajeron los individuos muertos.

4.3.6 Crecimiento

Para medir el crecimiento, el material utilizado fue:

- Regla de 30 cm con una precisión de 0.1 cm
- Calibre manual con una precisión de 0.01 mm
- Azadilla
- Macetas
- Guantes
- Cuchara de metal

Las variables que se estudiaron en todas las plantas vivas fueron el diámetro en el cuello de la raíz, la altura alcanzada por el sistema aéreo, el peso seco aéreo y el peso seco radical.

- *Crecimiento del Diámetro en el cuello de la raíz*

Esta variable sólo se registró en la medición de después del verano. Para ello fue necesario excavar alrededor de cada individuo con la ayuda de una azadilla, con el fin de encontrar el cuello de la raíz, ya que estaba enterrado a distintas profundidades según el tratamiento. Esta operación se hizo con sumo cuidado de no dañar los sistemas radicales de los individuos en los distintos tratamientos, ni las partes aéreas, que en algunos casos eran

excesivamente vulnerables a la rotura ya que estaban muy secas, así como de volver a tapar las plantas con cuidado de no dejar bolsas de aire ni torcer los tallos enterrados.

Para retirar la arena a la hora de desenterrar la parte aérea se utilizó la cuchara de metal y en algunos casos, para facilitar la medida, se extrajo y se depositó en unas macetas.

Para hallar los valores de los diámetros se utilizó un calibre manual y se llevaron a cabo tres mediciones por individuo para evitar los posibles errores.

- *Crecimiento del Sistema aéreo*

A lo largo del experimento se realizaron tres mediciones de la altura de los brinzales: en el momento de la plantación, a los cuarenta días de la plantación y, la última, en el mes de octubre, después del verano. Para ello fue necesario excavar alrededor del tallo con el fin de hallar la marca de laca de uñas efectuada antes de la plantación y que nos iba a servir como punto de referencia, ya que en este caso la altura se tomaría desde dicho punto hasta la inserción de las acículas terminales.

- *Peso Seco radical (PSR) y Peso Seco Aéreo (PSA)*

Una vez extraídas las plantas del invernadero, octubre de 2000, se procesaron en el laboratorio para hallar el Peso Seco Aéreo (PSA) y el Peso Seco Radical (PSR).

Después de descongelar las plantas se separó la parte aérea de la radical cortando con una tijera de podar a la altura del cuello de la raíz.

El proceso del sistema aéreo fue similar al realizado con las plantas referencia. Primero se lavó con agua corriente, con la ayuda de un colador para evitar la pérdida de parte de la muestra, con el fin de eliminar cualquier resto de insectos, tierra o turba que pudiera haber tras la extracción, y se dejó secar en el papel. A continuación se metió en un sobre de papel que a su vez, fue introducido en la estufa de ventilación forzada durante un periodo mínimo de tiempo de 48 horas, cuyo objetivo era secar los tejidos internos de la planta. Una vez transcurrido este periodo de tiempo, se sacó el sobre de la estufa y se colocó en el interior de una cámara de desecación, para que perdiera la humedad existente debido a las altas temperaturas de la estufa. La planta permaneció como mínimo 30 minutos dentro de dicha cámara y a continuación se pesó en la balanza digital, tal y como se describe en el apartado “3.1.2”

El proceso de la parte de la radical fue un poco más complicado debido a la dificultad a la hora de realizar su extracción y de diferenciar las partes nuevas, producidas por la planta durante el periodo de tiempo en que estuvo en el invernadero, y las partes antiguas del cepellón producidas antes de ser plantado. Tras varios intentos según distintos métodos, se tomó la decisión de cortar todas las raíces que sobresalieran del cepellón y basar los estudios en dichas raíces nuevas.

En primer lugar, una vez descongelada la planta, se lavó superficialmente el cepellón en una bandeja con agua para evitar la pérdida de alguna raíz por el sumidero y para eliminar los restos de mayor tamaño de arena. A continuación, con unas tijeras se cortaron todas las raíces de gran tamaño que sobresalían de la parte inferior del cepellón y, con mucho cuidado y la ayuda de

las pinzas y de las tijeras, se fueron cortando todas las raíces laterales que sobresalían por los cuatro lados del mismo. Todas estas raíces se iban depositando en un recipiente con agua.

Una vez extraídas las raíces nuevas se lavaron con la ayuda de un colador y se depositaron en un papel secante. Después se introdujeron en un sobre de papel y seguidamente en la estufa de ventilación forzada donde permanecieron, al igual que la parte aérea, un periodo de tiempo mínimo de 48 horas. Transcurrido este tiempo se depositaron en una cámara de desecación donde permanecieron como mínimo 30 minutos. Los objetivos de introducir las raíces en la estufa de ventilación forzada y en la cámara de desecación son los mismos que en el caso de la parte aérea. Una vez seca la parte radical nueva, se registró su peso en la balanza digital tal y como se describió en el apartado 3.1.2.

Los materiales utilizados en esta fase fueron:

- Tijeras de podar
- Papel secante
- Colador
- Pinzas
- Tijeras
- Bandejas de plástico
- Guantes
- Sobres de papel etiquetados
- Estufa de ventilación forzada a 50°C de temperatura
- Campana de desecación
- Balanza digital con una precisión de 0.0001 g

4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para conocer las diferencias entre los datos obtenidos tanto en el ensayo realizado en el invernadero como en el realizado en campo, se utilizó el programa SPSS 8.0 para Windows con el que se realizó un análisis exploratorio y un análisis de la varianza (ANOVA).

El análisis exploratorio de los datos sirve principalmente para conocer tanto la homogeneidad de las varianzas como la estadística descriptiva de las muestras. Además permite realizar una depuración de los datos antes de continuar con el ANOVA.

El Análisis de Varianza es un modelo matemático por el que se comparan dos o más medias de forma simultánea, trabajando con una variable dependiente cuantitativa y una o varias variables independientes cualitativas llamadas factores (ÁLVAREZ CÁCERES, 1995).

Se basa en el contraste de dos hipótesis dentro de los valores de una población, siendo dichas hipótesis:

H_0 : todas las medias de todos los grupos de una población son iguales.

H_1 : al menos hay una media μ_i distinta de otra μ_j .

Según este mismo autor, para poder aplicar el ANOVA a un conjunto de datos o población, ésta tiene que presentar una distribución paramétrica, es decir, debe cumplir las siguientes condiciones:

a) Las muestras deben representar al total de la población.

b) Las muestras deben presentar Homocedasticidad, es decir, todas las varianzas de todos los grupos deben ser homogéneas y no se deben detectar diferencias significativas entre ellas

c) Las muestras deben proceder de poblaciones cuyas variables dependientes sigan una distribución Normal.

En los casos en que no se cumplan las condiciones b) y c), se puede realizar una transformación de datos o, si aún así no se soluciona el problema, aplicar un test de estadística no paramétrica. Solamente en el caso de que no se cumpla la condición a), no podremos seguir adelante con ningún tipo de análisis estadístico, ni descriptivo ni no descriptivo.

La primera de las condiciones paramétricas debe cumplirse desde el momento en que se diseña el ensayo, pues si los datos recogidos no representan a la población es absurdo llevarlo a cabo.

La Normalidad de la muestra se puede comprobar rápidamente con una representación gráfica de los datos. Esta condición está asegurada habitualmente si el tamaño de la muestra es mayor de treinta ($n > 30$) o siempre que la distribución de la población siga una distribución Normal (ÁLVAREZ CÁCERES, 1995).

La Homocedasticidad se comprueba con una serie de tests que varían de unos autores a otros y que se aplican en función de las características de la población que estemos estudiando.

Una vez comprobado que la muestra que queremos analizar cumple las condiciones anteriores, aplicamos el ANOVA propiamente dicho. El análisis de varianza descompone la variabilidad de toda la muestra en dos tipos, la variabilidad producida por las diferencias entre grupos y la variabilidad producida por las diferencias dentro de los grupos:

$$SC_{\text{total}} = SC_{\text{entre}} + SC_{\text{intra}}$$

La tabla que obtenemos tras realizar el ANOVA se basa en esta descomposición y nos da el valor de un estadístico F o de una probabilidad p que, en función de un valor de significación determinado α , nos permitirá aceptar o rechazar la Hipótesis Nula, H_0 (FERRÁN ARANAZ, 1996).

En el caso de que el valor de p sea mayor que el valor de α , aceptaremos la Hipótesis nula y no será necesario continuar con el análisis de la varianza. Pero en el caso contrario, en el que el valor de p sea menor que el de α , rechazaremos la Hipótesis nula H_0 aceptando que existen diferencias significativas entre las medias de las variables, y aplicaremos una serie de pruebas de comparación múltiple que nos permitan conocer entre qué medias existen dichas diferencias y su magnitud, pues con el análisis de la varianza sólo podemos aceptar o rechazar las hipótesis propuestas.

El ANOVA puede ser de una vía o de más de una vía en función del número de variables independientes con las que estemos trabajando. En el caso de que sea de más de una vía se denomina Análisis de Varianza Multifactorial.

Para aplicar este tipo de análisis, las muestras estudiadas también deben ser paramétricas y cumplir los siguientes requisitos:

- a) Deben proceder de poblaciones cuyas variables dependientes sigan una distribución Normal.
- b) Deben presentar una Homocedasticidad multivariable.
- c) Debe existir independencia multivariable entre las observaciones.
- d) Las muestras deben tener un tamaño mayor a treinta ($n > 30$).

En el análisis multifactorial también contrastamos hipótesis ($H_0, H_1, H_2...$) y en función de los valores que obtengamos para p relacionados con α , podremos determinar si aceptamos o no la hipótesis nula establecida en un principio. Como en el caso del análisis de una sola vía, no conocemos dónde está y cuál es la magnitud de la diferencia entre medias en el caso de que exista, por lo que tendremos que continuar el estudio aplicando pruebas de comparación múltiple.

En el presente trabajo, antes de aplicar el ANOVA necesario para poder llegar a alguna conclusión, se realizó un Análisis Exploratorio de los datos de cada variable por separado es decir, un estudio de la Estadística descriptiva de la muestra, la comprobación de las premisas que implican que la muestra sea paramétrica y la depuración de datos erróneos.

La prueba utilizada en la mayoría de los casos para determinar la Homocedasticidad de las muestras fue el Test de Levene, que proporciona un valor determinado de p . Si dicho valor era superior al valor de significación establecido ($\alpha=0.05$), aceptábamos la H_0 y considerábamos que no había diferencias significativas entre las varianzas de los tratamientos y que podíamos continuar aplicando el Análisis de Varianza propiamente dicho.

En el caso de que el valor obtenido de la p era menor que el del valor de significación y las transformaciones posibles propuestas por el programa no solucionaban el problema, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis de estadística no paramétrica.

Una vez realizado el ANOVA, tanto de una vía como de dos, se procedió con la comparación múltiple de medias en la que se utilizaron distintos tests en función de las características de las muestras y con los que se obtuvieron los valores finales de las diferencias entre medias. Así, si el tamaño de las muestras era el mismo para los tratamientos se aplicó el test de Tuckey y, si por el contrario, el tamaño de las muestras variaba se aplicó el test de Scheffe (caso de muestras desbalanceadas).

En el ensayo en campo se realizó un ANOVA de una vía puesto que sólo teníamos un factor: el tratamiento de profundidad de plantación. Tras realizar el análisis exploratorio de los datos de la supervivencia y del crecimiento con el que se obtuvo el valor de la estadística descriptiva y se comprobó la normalidad de las muestras, se aplicó el test de Levene para estudiar su homocedasticidad. Salvo en el caso del crecimiento en altura y en diámetro, todas las variables cumplían esta condición. A continuación se aplicó el ANOVA propiamente dicho y para estudiar con mayor precisión entre qué poblaciones existían diferencias significativas se aplicaron los test de comparación de medias. En este caso se aplicó el test de Tukey pues el número de individuos por muestra era el mismo para todos los tratamientos.

Para las variables con falta de homogeneidad de varianzas se aplicó el test de Kruskal-Wallis de estadística no paramétrica para corroborar los datos obtenidos anteriormente en el ANOVA.

En el estudio de la capacidad de regeneración radical y de los análisis de hidratos de carbono se siguieron los mismos pasos que en el apartado anterior. Tras comprobar por Levene que las muestras eran homocedásticas, se aplicó el análisis de varianzas para estudiar la existencia o no de diferencias significativas entre las medias de las muestras y, a continuación, el test de Tukey para estudiar dónde se encontraban y cómo eran estas diferencias.

En el ensayo llevado a cabo en invernadero se aplicó el análisis exploratorio a todos los datos obtenidos para las distintas variables y se comprobó su homocedasticidad mediante el test de Levene. En todos los casos se obtuvo un valor de p superior a 0.05 salvo en el crecimiento en altura medido en el mes de octubre, tanto en el tratamiento seco como en el húmedo, y en la supervivencia registrada en el mes de agosto en el tratamiento húmedo.

Una vez realizado el análisis exploratorio de los datos se procedió con el de varianza propiamente dicho. Puesto que en este experimento se trabajaba con más de un factor se aplicó en primer lugar una ANOVA de una vía, teniendo en cuenta los distintos tratamientos de profundidad de plantación en cada régimen de riego. En los casos en los que no había homocedasticidad de varianzas se aplicó el test de estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis para corroborar los resultados obtenidos en dicho ANOVA. Cuando el valor de p obtenido era menor de 0.05 se aplicó un test de comparación de medias. Para la variable supervivencia se aplicó el test de Tukey y para el resto de variables el test de Scheffe.

Posteriormente se aplicó un ANOVA de dos vías que nos diese a conocer la existencia o no de la interacción entre los tratamientos de profundidad de plantación y los tratamientos de riegos en función de los valores de $p=0.05$.