

Universidad de Huelva

Departamento de Ciencias Agroforestales



Efecto de la fertilización otoñal en vivero sobre parámetros de calidad de planta de encina (*Quercus ilex* *L. ssp ballota*)

**Memoria para optar al grado de doctor
presentada por:**

Enrique Andivia Muñoz

Fecha de lectura: 4 de marzo de 2011

Bajo la dirección de los doctores:

**Manuel Fernández Martínez
Francisco Javier Vázquez Piqué**

Huelva, 2011

ISBN: 978-84-15147-55-8

D.L.: H 61- 2011



TESIS DOCTORAL

ENRIQUE ANDIVIA MUÑOZ

EFEECTO DE LA FERTILIZACIÓN OTOÑAL EN
VIVERO SOBRE PARÁMETROS DE CALIDAD DE
PLANTA DE ENCINA (*Quercus ilex* L. ssp *Ballota*)

TESIS DOCTORAL



ENRIQUE ANDIVIA MUÑOZ

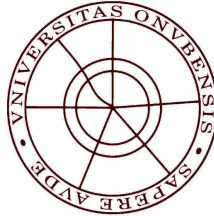
DIRECTORES:

MANUEL FERNÁNDEZ MARTÍNEZ

Fco. JAVIER VAZQUEZ PIQUÉ

HUELVA, 2011

Universidad de Huelva
Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Dpto. Ciencia Agroforestales



**Universidad
de Huelva**

**EFECTO DE LA FERTILIZACIÓN OTOÑAL EN
VIVERO SOBRE PARÁMETROS DE CALIDAD DE
PLANTA DE ENCINA (*Quercus ilex* L. ssp *ballota*)**

Memoria presentada por Enrique Andivia Muñoz, Licenciado en Ciencias Ambientales, para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Huelva.

Doctorando:

Enrique Andivia Muñoz

Directores:

Dr. Manuel Fernández Martínez

Dr. Fco. Javier Vázquez Piqué

AGRADECIMIENTOS

Es irremediable echar la vista atrás a la hora de escribir este último apartado, doy cuenta de que han sido cuatro años llenos de trabajo e ilusión pero también han sido cuatro años de mi vida que culminan no solo con la obtención de un grado académico sino también con un crecimiento personal que llevaré conmigo. Son muchas las personas que han contribuido a ello y espero no dejarme atrás a ninguna de ellas, si lo hago espero que sepan perdonarme y que se sientan igualmente partícipes.

En este momento no puedo dejar de pensar en Rocío porque ella ha soportado lo mejor y lo peor de estos años y siempre ha estado ahí, siempre ha estado ahí dándome todo su apoyo, comprensión y complicidad por ello es justo decir que esta tesis tiene una gran parte de ella y que te compensaré todo tu esfuerzo. También quiero hacer referencia muy especial a mis padres, Enrique y María José, porque el que esté hoy aquí es fruto de su esfuerzo y sacrificio y por último a mis abuelos Paco, Loli, Manolo y Leo por todo lo que me dieron cuando era pequeño y porque me hace feliz saber que hoy serían quienes estarían más orgullosos, en especial a mi Lela Loli por continuar aquí conmigo.

Debo dar mi más profundo agradecimiento a mis directores de tesis Manolo y Javi, primero porque confiaron en mí y me dieron esta oportunidad pero también por su cercanía, ayuda, consejos, amabilidad y tiempo que han “perdido” conmigo, ha sido un placer tenerlos como jefes y espero poder desarrollar todo lo que me han inculcado. También dar las gracias por toda la ayuda y apoyo prestado a los profesores y profesoras Reyes, Guti, Juan

Domingo, Raúl e Inma. Mención especial para Belén Márquez y el profesor Paco Córdoba del Departamento de Biología Ambiental, por poner a mi disposición su conocimiento, su tiempo, sus técnicas y su laboratorio para llevar a cabo los ensayos de estrés oxidativo, además de su ayuda en la revisión y discusión de los resultados.

No puedo dejar pasar la oportunidad de agradecer al Institut National de la Recherche Agronomique de Bordeaux (Francia) por permitirme trabajar junto a ellos durante tres meses, en especial a los miembros del grupo TCEM Sylvain Pellerin, Laurent Augusto, Mark Bakker, Maya González, Anne Gallet-Budynek y Frida Andreasson quienes me trataron como un miembro más del grupo, gracias también a Rakesh Mehra por todas las barbacoas que me ayudaron a sobrellevar el estar lejos de casa.

He de acordarme también de todos mis compañeros con los que he trabajado codo con codo durante estos años. Agradecerle muy especialmente a Arantza toda su ayuda y apoyo, gracias por todos los cafés, charlas y consejos durante este tiempo y que espero continúen. Gracias a mi compañero chileno, el ya doctor Felipe Carevic, no solo por su apoyo en las tareas de campo y laboratorio sino también por todos los ratos que pasamos charlando. Acordarme de Celia con quien compartí laboratorio los primeros meses y que me enseñó como funcionaba todo. A mis compañeros de despacho, laboratorio e invernadero Isa y Juanjo perdón por las molestias causadas; a Carmen de agrícola gracias por toda su ayuda; a Paco, Álvaro, Dani, Isidro y Rytas gracias por todo; a mis compañeras de edafología Eva y Rocío gracias por prestarme siempre el material que tan eficientemente habían descontaminado y a Manoli y Esperanza gracias por cuidarme durante todo este tiempo.

A mis amigos de toda la vida Jesús, Eloy y David gracias por aguantarme no solo estos cuatro años sino desde que me conocen, espero

devolverles el tiempo que no he pasado con ellos especialmente durante estos últimos meses. A mi otra gente de fuera a Pomares, a David Díaz, a mi hermano Ale, a mi felizmente reciente hermanita Laura, a mis cuñadas Este, Cristi y Emi, a mi tito Jesús, tita Lola y a todos esos amigos y familiares con los que he compartido los últimos cuatro años.

Por último debo agradecer la financiación que he recibido durante estos cuatro años, los dos primeros años fueron financiados mediante una beca predoctoral del Plan Propio de Investigación de la Universidad de Huelva, los dos últimos años disfruté de una beca FPU del Ministerio de Investigación e Innovación. Agradecer especialmente a Juan Oliet, investigador principal del proyecto de investigación ENCINUT en cuyo marco se ha llevado a cabo este trabajo así como a los demás investigadores del proyecto. Dar las gracias al equipo del CIDERTA de la Universidad de Huelva por llevar a cabo los análisis de nutrientes y en especial a María Jesús Vílchez por su comunicación y predisposición.

ÍNDICE

i. ABREVIATURAS	3
ii. RESUMEN	5
iii. ABSTRACT	9
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 La encina importancia y problemática en la Península Ibérica	13
1.2 La calidad de planta producida en vivero y el éxito de las repoblaciones	14
1.3 La fertilización otoñal como herramienta para mejorar la calidad de planta	16
1.4 Las heladas y sequías como factores ambientales estresantes	17
1.5 El efecto de la procedencias de las semillas en el cultivo de encina	19
2. OBJETIVOS GENERALES	21
3. CAPÍTULO 1: Efecto de la fertilización otoñal en vivero sobre la morfo-fisiología y el establecimiento en campo de plantas de encina	25
3.1 Resumen	27
3.2 Introducción	28
3.3 Material y métodos	30
3.3.1 Condiciones de cultivo de las plantas	30
3.3.2 Estado morfo-fisiológico al final del cultivo en vivero	33
3.3.3 Tolerancia al frío y capacidad de crecimiento de las raíces	34
3.3.4 Establecimiento en campo	36
3.3.5 Análisis de datos	38
3.4 Resultados	41
3.4.1 Morfología y estado fitosanitario de las plantas	41
3.4.2 Tolerancia al frío y capacidad de crecimiento radical	45
3.4.3 Establecimiento en campo	48
3.5 Discusión	50
3.6 Conclusiones	57

4. CAPÍTULO 2: Efecto de la fertilización otoñal en vivero sobre la tolerancia al frío en dos procedencia ibéricas de encina	59
4.1 Resumen	61
4.2 Introducción	62
4.3 Material y métodos	64
4.3.1 Material vegetal y condiciones de cultivo	64
4.3.2 Estado morfológico y nutricional	67
4.3.3 Tolerancia al frío y capacidad de crecimiento de las raíces	68
4.3.4 Análisis de datos	70
4.4 Resultados	71
4.4.1 Morfología y estado nutricional de las plantas	71
4.4.2 Tolerancia al frío y capacidad de crecimiento radical	73
4.5 Discusión	76
4.6 Conclusiones	82
5. CAPÍTULO 3: Efecto de la fertilización otoñal nitrogenada sobre el estado nutricional y la resistencia a estreses abióticos de plantas de encina	83
5.1 Resumen	85
5.2 Introducción	86
5.3 Material y métodos	88
5.3.1 Material vegetal y condiciones de cultivo	88
5.3.2 Estado morfológico y nutricional al final del cultivo en vivero	90
5.3.3 Tolerancia al frío	91
5.3.4 Capacidad de regeneración radicular y resistencia a la sequía	95
5.3.5 Análisis de datos	96
5.4 Resultados	98
5.4.1 Morfología y estado nutricional de las plantas	98
5.4.2 Tolerancia al frío	100
5.4.3 Capacidad de regeneración radicular y resistencia a la sequía	102
5.5 Discusión	103
5.6 Conclusiones	109
6. DISCUSIÓN GENERAL	111
7. CONCLUSIONES	121
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127

i - ABREVIATURAS

AAT	Actividad antioxidante total
Abs	Absorbancia
ALC	Alcarria (procedencia semillas de encina)
AsA	Ácido ascórbico total
ASC	Ácido ascórbico reducido
CCI	Índice de contenido en clorofila
CHR _{ppt}	Contenido hídrico relativo en el punto de pérdida de la turgencia
<i>D</i>	Diámetro del tallo
DDT	Ditiotreitol
DHA	Ácido ascórbico oxidado
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picrihidrazilo
EROs	Especies reactivas del oxígeno
F ₀	Fluorescencia mínima clorofilas complejo antena fotosistema II
F _m	Fluorescencia máxima
F _v	Fluorescencia variable
F _v /F _m	Estimador rendimiento cuántico máximo proceso fotoquímico
FRW	Peso seco de raíces finas
GLM	Modelo lineal general
<i>H</i>	Altura de la planta
HI	Tasa de incremento de altura
HU	Sierra Morena occidental (procedencia semillas de encina)
LWD	Peso seco de hojas
MDA	Malondealdehído
NEM	N-etilmaleimida
NSC	Carbohidratos no estructurales
RDW	Peso seco de raíces
RGC	Capacidad de crecimiento radical
S _{ppt}	Contenido relativo agua simplástica en punto pérdida turgencia
SDI	Tasa de incremento del diámetro de tallo
ShDW	Peso seco parte aérea
SRDW	Ratio parte aérea parte radicular en peso seco
SS	Azúcares solubles
St	Almidón
StDW	Peso seco del tallo
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TE	Equivalentes de trolox
ThDW	Peso seco de raíces gruesas
VD	Daño visual
π_o	Potencial osmótico a plena turgencia
π_{ppt}	Potencial osmótico en el punto de pérdida de la turgencia
Ψ	Potencial hídrico (medido al amanecer)

ii - RESUMEN

La encina (*Quercus ilex* ssp. *ballota* [Desf.] Samp.) es un árbol de hoja perenne ampliamente distribuido por el oeste de la cuenca mediterránea convirtiéndose en una especie emblemática debido a su gran interés económico ambiental y social. Las formaciones vegetales donde se encuentra, en gran parte alteradas por la acción del hombre, suelen presentar una deficiente regeneración natural de esta especie, por lo que ha sido ampliamente usada en programas de restauración forestal en la Península Ibérica, especialmente durante los últimos 10 años. Sin embargo, estos programas han obtenido un éxito limitado, debido a que la encina es un árbol muy vulnerable a las condiciones de estrés, especialmente durante sus primeros años de vida. Una baja calidad de las plantas utilizadas en repoblaciones puede dar lugar a características morfológicas y fisiológicas que impedirían un correcto establecimiento de las mismas. Una de las herramientas más poderosas para la modificación de la calidad de planta producida en vivero es la manipulación de la disponibilidad de nutrientes. Sin embargo, el conocimiento del efecto de la fertilización en la calidad de la planta de encina y en su respuesta postransplante es escaso. Esta tesis analiza el efecto que la fertilización otoñal tiene sobre los parámetros de calidad de planta de encina y su establecimiento en campo.

En el capítulo 1 se han combinado dos dosis distintas de cada nutriente N-P-K, elevada y reducida, aplicadas durante el otoño (30,0 y 1,5 mg N, 13,1 y 0,3 mg P y 24,9 y 0,5 mg K, respectivamente). La aplicación otoñal de las dosis elevadas, especialmente con N, mejoró el crecimiento, el estado nutricional de las plantas, la tolerancia al frío y la capacidad de crecimiento de

las raíces sin disminuir los estándares de calidad de las mismas o la respuesta frente al estrés hídrico. Sin embargo, la fertilización otoñal sólo tuvo un pequeño efecto en la respuesta postransplante en campo, afectada únicamente por la fertilización con K, probablemente debido al adecuado estado nutricional de N y P en todas las plantas y a las condiciones de clima templado de la parcela de estudio. Se recomienda, al menos en zonas con inviernos templados, la plantación en campo a finales de otoño ya que resultó más efectiva que la plantación a mediados del invierno.

Un aspecto importante a tener en cuenta en los programas de restauración forestal es la procedencia de las semillas ya que diferentes respuestas fisiológicas de distintas poblaciones a los factores de estrés ambiental a los que la planta es sometida tendrían un efecto práctico en la elección del material para repoblación. Sin embargo, el conocimiento sobre la plasticidad fisiológica y adaptabilidad de esta especie es a menudo contradictorio. En el capítulo 2 se evaluó el efecto de dos procedencias de semillas de encina, una más fría (Alcarria, *ALC*) y otra más cálida (Sierra Morena occidental, *HU*) en la tolerancia al frío de las plantas, además de estudiar la respuesta de las mismas a diversas dosis de fertilización otoñal en vivero. Los resultados indicaron una diferente asimilación y/o acumulación de nutrientes entre distintas regiones de procedencia de las semillas, además de que aspectos fisiológicos como la tolerancia al frío parecen depender de aspectos genéticos relacionados con la adaptación de las plantas a las condiciones climáticas de sus regiones de procedencia, al ser las plantas de la procedencia más fría más tolerantes que las de la procedencia cálida.

Por último, en el capítulo 3 y en base a la influencia de la fertilización otoñal con nitrógeno en todos los parámetros estudiado se han ensayado cuatro dosis distintas de N (dos reducidas 0,0 y 1,5 mg N y dos elevadas 30 y 60 mg N) en el cultivo de las plantas. Los resultados han corroborado los encontrados

en el capítulo 1 ya que las plantas cultivadas con dosis elevadas de N han presentado mayor tamaño, mejor estado nutricional y mayor tolerancia al frío sin disminuir su resistencia a la sequía. En este capítulo también se ha estudiado el estrés oxidativo provocado por la exposición de las plantas a una helada de -12 °C, constatando la importancia que las moléculas antioxidantes tienen en el proceso de protección de las plantas frente a este factor de estrés.

Todos los resultados obtenidos, junto a las experiencias previas con esta especie, permiten ir ajustando la dosis óptima de fertilización nitrogenada en vivero, situándola en torno a los 100 mg de N durante el cultivo anual (30 mg en la fase de endurecimiento otoñal). Dosis por debajo de ésta disminuiría el crecimiento y acumulación de nutrientes, además de empeorar la tolerancia a situaciones de estrés como el frío; mientras que dosis mayores, a pesar de aumentar el tamaño y acumulación de nutrientes podrían disminuir la tolerancia al frío o la capacidad de crecimiento radicular respecto de la dosis anterior, por lo que el éxito de las plantaciones sobre todo en zonas desfavorables podría verse reducido.

iii - ABSTRACT

Holm oak (*Quercus ilex* ssp. *ballota* [Desf.] Samp.) is an evergreen tree widely distributed in the western Mediterranean Basin. Holm oak has a poor natural regeneration, because of this it has been widely used in forest restoration programs in the Iberian Peninsula, especially in the last 10 years. However, these programs have enjoyed only limited success due to Holm oak is very vulnerable to stress conditions, especially during their first stages of life. Poor seedlings quality used in reforestation can have morphological and physiological characteristics that would impede a proper field performance. Manipulation of nutrient availability is one of the most powerful tools modifying plant characteristics. However, it still remains uncertain its effect on seedling quality and field performance of Mediterranean Holm oak. This thesis analyzes the effect of autumn fertilization on Holm oak seedling quality parameters and field performance.

In Chapter 1 two different doses of each nutrient NPK, high and low, have been applied in autumn (30.0 and 1.5 mg N, 13.1 and 0.3 mg P and 24.9 and 0.5 mg K, respectively). Autumn application of high doses, especially with N, improved growth, nutritional status of plants, cold tolerance and root growth capacity without compromising quality standards or the response for water stress. However, autumn fertilization had only a small effect on field performance, only affected by fertilization with K, probably due to the adequate nutritional status of N and P in plants and temperate climatic conditions of the plot study. Late autumn field planting is recommended, at least in areas with mild winters, as it proved more effective than mid-winter planting.

Provenance of seeds is an important aspect to be considered in forest restoration programs, different physiological responses can be expected from

different populations to environmental stress factors. However, the knowledge of physiological plasticity and adaptability of this species is contradictory. In Chapter 2 the effect of Holm oak acorn provenances has been studied. Two different provenances have been selected, a cooler (Alcarria, *ALC*) and a warmer (Western Sierra Morena, *HU*), and the response of them to cold tolerance and different doses of autumn fertilization applied in the nursery have been evaluated. Results showed a different absorption and/or accumulation of nutrients between different provenances of acorns, in addition physiological aspects, like cold tolerance, seem to depend on genetic aspects related to plant adaptation to climatic conditions of the regions of origin, being seedlings from colder provenance more tolerant to cold stress than seedlings from warm provenance.

Finally, in Chapter 3 and based on previous influence of autumn nitrogen fertilization in all parameters studied, four different doses of N were tested (two small 0.0 and 1.5 mg N and two elevated 30 and 60 mg N). Results corroborated those found in Chapter 1, seedlings growing with high doses of N are higher, had better nutritional status and increased tolerance to cold without reducing its resistance to drought. This chapter also examined the oxidative stress caused by exposure of plants to cold (-12 ° C), noting the importance of the antioxidant molecules in plant protection against this stress factor.

Results suggest that the optimal dose of nitrogen fertilization is around 100 mg of N during the growing phase (30 mg in the autumn hardening phase). Doses under these values would reduce growth and accumulation of nutrients, reducing tolerance to stresses such as cold, while higher doses, despite increasing the size and accumulation of nutrients, may reduce cold tolerance, root growth capacity and therefore field performance especially in unfavorable areas.

1 - INTRODUCCIÓN

1.1 - La encina: importancia y problemática en la Península Ibérica

La encina (*Quercus ilex* L.) es un árbol perennifolio, de hoja esclerófila perteneciente a la familia de las fagáceas. Es una de las especies arbóreas más importantes de las comunidades forestales del oeste de la cuenca mediterránea, creciendo en un amplio rango de ambientes, desde zonas cálidas y áridas a zonas frías y secas (Ruiz de la Torre, 2006).

Entre las formaciones forestales en las que se encuentra, la encina forma parte de una de las más representativas y valiosas de la Península Ibérica, las dehesas. Las dehesas son sistemas agroforestales, creados por el hombre mediante el clareo de las masas, orientado a la producción simultánea y combinada de ganado (porcino, vacuno y ovino), leña, carbón y otros bienes agrosilvopastorales (Joffre et al., 1988; Olea y San Miguel-Ayanz, 2006). En España las dehesas ocupan una superficie aproximada de 2,5 millones de ha (García-Mozo et al., 2007; Pulido et al., 2005), principalmente ocupadas por *Quercus ilex* L ssp. *ballota* (Desf.) Samp. aunque también se encuentra asociada a otras especies como *Quercus suber* L. y *Quercus faginea* Lamk. Las dehesas poseen un inestimable valor ambiental, jugando un importante papel como nicho ecológico de numerosas especies de fauna emblemáticas además de poseer unos intrínsecos valores estéticos como paisaje característico de gran parte de la Península Ibérica (Díaz et al., 1997; Moreno et al., 2007). Desde el punto de vista económico, la dehesa ha evolucionado desde sistemas de aprovechamiento tradicionales basados en la rusticidad y extensificación a una situación bien distinta donde el aprovechamiento de la bellota por parte del cerdo ibérico en el suroeste de la Península Ibérica se ha convertido en una actividad rentable sobre la que se sostiene el resto de aprovechamientos propios de la dehesa. Solamente el comercio de jamones en España supone una facturación anual de 130 millones de euros (MARM, 2008). Los beneficios

económicos de la explotación agrícola, ganadera y cinegética, así como las funciones ecológicas y sociales de la especie, sitúan a la encina como un árbol emblemático, sobre todo en el sur de la Península Ibérica dónde su distribución coincide con regiones donde escasean otras fuentes de ingreso y empleo.

Sin embargo, los encinares y en particular las dehesas están sufriendo en las últimas épocas procesos de decaimiento forestal, deterioro y mortandad por toda la Península Ibérica. Las causas de este decaimiento son producto de la interacción de numerosos factores, principalmente el envejecimiento del arbolado, la escasa regeneración natural, la inapropiada gestión del ganado y el dramático efecto de la “seca de la encina” (Díaz et al., 1997) que está dando lugar a una generalizada disminución del vigor y aumento de la mortandad de la especie. Es por tanto necesario la puesta en práctica de políticas de repoblación con esta especie basadas en criterios científicos que permitan la correcta regeneración de las masas.

1.2 - La calidad de planta producida en vivero y el éxito de las repoblaciones

La encina, al ser una especie que presenta una deficiente regeneración natural, en parte debido a una mala gestión de sus masas y a la excesiva carga ganadera, ha sido ampliamente usada en programas de restauración forestal en la Península Ibérica (Rodà et al., 1999). Su uso en estos programas se ha visto intensamente incrementado en los últimos 10 años llegando a superar a las especies de *Pinus*, las cuales fueron las más utilizadas en el pasado (Villar-Salvador et al., 2004a). Sin embargo, en comparación con otras especies forestales mediterráneas, las plantaciones de encinas presentan una elevada mortalidad (Baeza et al., 1991; Bocio et al., 2001), indicando que es una especie vulnerable a factores estresantes durante los primeros estadios de vida, particularmente en sitios con condiciones climáticas desfavorables (Pausas et al., 2004) y especialmente en áreas continentales e interiores (Ruiz de la Torre,

2006) o con una marcada sequía estival (Villar-Salvador et al., 2004a). El pobre éxito de las repoblaciones de encinas ha sido atribuido a varios factores: el estrés hídrico (Villar-Salvador et al., 2004a,b), la baja fertilidad de los suelos (Pardos et al., 2005; Sanz-Pérez et al., 2007; Valdecantos et al., 2006) y la pobre calidad de las plantas producidas en vivero (del Campo et al., 2010; Villar-Salvador et al., 2004a).

La calidad de la planta forestal se define como la capacidad de una planta forestal para alcanzar las expectativas de supervivencia y crecimiento de una estación particular (Duryea, 1985). Esta capacidad es reflejo de una serie de características morfológicas, nutricionales y de resistencia a estrés que dependerán tanto de la especie como de las condiciones de la zona que se repuebla (Cortina et al., 2006). Una baja calidad de las plantas utilizadas en repoblaciones puede dar lugar a características morfológicas y fisiológicas que impedirían un correcto establecimiento de las mismas, sobre todo bajo condiciones de estrés. Una de las herramientas más poderosas para la modificación de la calidad de la planta producida en vivero es la manipulación de la disponibilidad de nutrientes (Landis, 1989; Salifu y Timmer, 2003). Una correcta sobrecarga nutricional de las plantas en el vivero aumentaría las reservas de estos nutrientes cuya posterior retranslocación en campo mejoraría el crecimiento y supervivencia de las mismas (Salifu y Timmer, 2003; Timmer y Aidelbaum, 1996). Sin embargo, la mayoría de la literatura científica sobre optimización de la nutrición mineral en plantas durante su producción en vivero ha sido desarrollada para especies de coníferas (McAlister y Timmer, 1998). A pesar de que los principios operativos son los mismos, la relación específica entre calidad de planta y establecimiento en campo debe ser verificada y refinada para las frondosas (Colombo, 2001). Para *Quercus ilex* L. se han descrito distintos efectos de la fertilización sobre los atributos morfo-fisiológicos de las plantas y el establecimiento en campo: un efecto positivo de

la fertilización sobre los atributos de las plantas (Oliet et al., 2009) y sobre el establecimiento en campo (Sanz-Pérez et al., 2007; Sardans et al., 2006; Villar-Salvador et al., 2004a), un efecto negativo (Broncano et al., 1998), o también un efecto positivo entre esos atributos y el establecimiento en campo (del Campo et al., 2009) o una ausencia de efecto (Palacios et al., 2009). A pesar de la existencia de algunas evidencias que sugieren que una correcta fertilización de las plantas de encina en vivero pudiera mejorar su establecimiento en campo, aún quedan viveristas que suministran una escasa cantidad de fertilizante bajo la creencia de que las plantas poco fertilizadas son más resistentes a las condiciones climáticas del clima mediterráneo y que el aporte de nutrientes de la bellota es suficiente para los requerimientos nutritivos de la encina durante la fase de vivero (Peñuelas y Ocaña, 1996).

1.3 - La fertilización otoñal como herramienta para mejorar la calidad de planta

La fase de endurecimiento de las plantas en vivero se produce durante el último periodo de cultivo (otoño en viveros mediterráneos). Durante esta fase distintos factores ambientales (principalmente las temperaturas frías y el acortamiento del fotoperiodo) inducen la dormición de las plantas, las cuales maduran sus tejidos e incrementan su resistencia a factores de estrés (Colombo, 1997; Colombo et al., 2003; Fernández et al., 2008; Villar-Salvador et al., 2004a). Para mejorar el endurecimiento, las prácticas de cultivo se han caracterizado por una disminución del riego y la fertilización (Rikala y Repo, 1997). Sin embargo, muchos estudios han mostrado que durante esta fase existe un considerable crecimiento, especialmente en las raíces, produciéndose un efecto de dilución de los nutrientes en los tejidos y una disminución de la concentración de los mismos si no se adicionan cantidades adicionales (Boivin et al. 2002, 2004). La aplicación de fertilizante durante esta fase de endurecimiento otoñal tiene como objetivo impedir la dilución de los nutrientes

en los tejidos, manteniendo o incrementando los niveles de reservas sin alterar significativamente la morfología de las plantas (Rikala et al., 2004). Existen muchos estudios en otras especies que muestran los efectos beneficiosos que tiene en la formación de reservas de nutrientes continuar con la fertilización durante la fase de endurecimiento (Boivin et al., 2002, 2004; Folk y Grossnickle, 2000; Puértolas et al., 2003; Rikala et al. 2004), mejorando en algunos casos el establecimiento de las plantas (Irwin et al., 1998; Puértolas et al., 2003; South y Donald, 2002) aunque también existen casos en los que, a pesar de mejorar las reservas nutricionales, no se observó mejora en la respuesta postransplante (Birchler et al. 2001; Grassi et al. 2003).

El nitrógeno, el fósforo y el potasio son los macronutrientes principales que se suministran en la producción de las plantas. Su aplicación durante el cultivo pueden mejorar, entre otras cosas: en el caso del nitrógeno la eficiencia fotosintética, el crecimiento radical y la eficiencia en el uso del agua (Lambers et al., 1990; Fernández et al. 2006); en el caso del fósforo el crecimiento radical postransplante (Oliet et al., 2005); y en el caso del potasio el control estomático, el ajuste osmótico y la resistencia a la sequía y heladas (Bogeat-Triboulot y Lévg, 1998). Es pues importante estudiar el efecto del suministro de estos nutrientes durante la fase de endurecimiento otoñal y la respuesta a factores de estrés de plantas cultivadas con distintas dosis y combinaciones de las mismas, ya que algunos trabajos han sugerido que las dosis relativas entre nutrientes pudieran ser más importantes que las dosis totales de los mismos (Fernández et al., 2003).

1.4 - Las heladas y sequías como factores ambientales estresantes

La encina ha demostrado ser una especie muy vulnerable a condiciones ambientales de estrés durante sus primeros años de vida (Navarro-Cerrillo et al., 2005). Como se ha comentado anteriormente, los programas de

restauración forestal en la Península Ibérica con esta especie han obtenido un éxito limitado. El clima mediterráneo está caracterizado por una pronunciada estacionalidad e imprevisibilidad de las lluvias y de las temperaturas extremas (Oliveira y Peñuelas, 2004; Valladares et al., 2002a, 2002b), siendo la sequía y las heladas los principales factores de estrés limitantes de la distribución, abundancia, supervivencia y crecimiento de esta especie (Larcher, 2000).

Tanto el estrés provocado por la sequía como por la exposición a heladas provocan como efecto final la deshidratación de las células de las plantas expuestas a dicho estrés (Welbaum et al., 1997). Además las estrategias de resistencia de las plantas implican determinadas características morfológicas y fisiológicas como el ajuste osmótico que pueden resultar comunes. Los sistemas de defensa frente a la exposición a la sequía implican cambios en el intercambio gaseoso, el área foliar, la apertura de los estomas y el ajuste osmótico (Ogaya y Peñuelas, 2003; Savé et al., 1999; Tognetti et al., 1998). Por su parte, la tolerancia a las heladas implica mecanismos destinados a preservar la integridad de las membranas (Zwiazek et al., 2001), la presencia de sustancias anticongelantes (Sung et al., 2003; Welling et al., 1997) y el ajuste osmótico mediante la acumulación intracelular de solutos para evitar la deshidratación celular (Cavender-Bares et al., 2005; Lennartson, 2003).

La utilización de plantas de encina con mayor resistencia a la sequía y heladas mejoraría la respuesta postransplante de las mismas aumentando su supervivencia. Resulta pues importante el estudio de la tolerancia a estos factores de estrés de las plantas cultivadas en vivero, así como del efecto de la aplicación de técnicas culturales, como la fertilización otoñal, que mejorarían dicha resistencia.

1.5 - El efecto de la procedencia de las semillas en el cultivo de encina

Las prácticas llevadas a cabo en el vivero, las condiciones ambientales y los factores genéticos influyen en las características funcionales de las plantas y en su capacidad de establecimiento en campo (Birchler et al., 1998). Las especies desarrollan distintas estrategias, no excluyentes, para adaptar su nivel de resistencia a las condiciones ambientales (Weiser, 1970). Dos de estas estrategias son aumentar la plasticidad fenológica (Valladares et al., 2007) o desarrollar adaptaciones a unas determinadas condiciones climáticas (Kawecki y Ebert, 2004; Savolainen et al., 2007).

La amplia distribución de la encina, unida a la heterogeneidad de los ambientes que coloniza, implica una alta plasticidad fenotípica a nivel morfo-fenológico (Gratani, 1995; Sabatè et al., 1999), y una gran adaptabilidad (Valladares et al., 2000). En este sentido la existencia de diferentes respuestas fisiológicas de distintas poblaciones a los factores de estrés ambiental a los que la planta es sometida (generalmente bajas temperaturas y sequía) tendrían un efecto práctico en la elección del material para repoblación. Las heladas son uno de los principales agentes estresantes de las plantas de encina durante su establecimiento y limita la distribución en altitud de la especie (Terradas y Savé, 1992) siendo, por tanto, muy importante para el éxito de una repoblación conocer si existe una adaptación de las diferentes poblaciones a las condiciones climáticas de su región de procedencia.

2 - OBJETIVOS GENERALES

El objetivo principal de la tesis es evaluar el efecto de la fertilización otoñal sobre los parámetros de calidad de planta de encina (*Quercus ilex* ssp. *ballota* [Desf.] Samp.) cultivada en vivero y su capacidad de establecimiento en campo.

Para alcanzar dicho objetivo principal se han tenido en cuenta una serie de objetivos parciales:

1- Estudiar el efecto combinado de diferentes dosis de N-P-K aplicadas durante la fase de endurecimiento otoñal en: i) los atributos de calidad de planta producida en vivero, ii) su estado nutricional y iii) su establecimiento posterior en campo.

2- Evaluar el efecto de dicha fertilización otoñal sobre la resistencia de las plantas a los principales factores de estrés que podrían influir en el éxito de las repoblaciones con esta especie: las heladas y la sequía.

3- Comprobar el efecto que distintas dosis de nitrógeno tendrían sobre parámetros morfo-fisiológicos y la resistencia a factores de estrés ambiental de las plantas cultivadas en vivero.

4- Entender el efecto que la región de procedencia de las semillas podría tener sobre la asimilación de nutrientes y la tolerancia a las heladas de las plantas producidas en vivero.

Capítulo 1: Efecto de la fertilización otoñal en vivero sobre la morfo-fisiología y el establecimiento en campo de plantas de encina.*



**El contenido de este primer capítulo ha sido aceptado, el 20 de julio de 2010, para su publicación en la revista Annals of Forest Science*

3 - Efecto de la fertilización otoñal en vivero sobre la morfo-fisiología y el establecimiento en campo de plantas de encina.

3.1 - RESUMEN

La encina (*Quercus ilex* ssp. *ballota* [Desf.] Samp.) es un árbol de hoja perenne ampliamente distribuido por el oeste de la cuenca mediterránea. Los programas de restauración forestal llevados a cabo con esta especie han obtenido un éxito limitado y el conocimiento del efecto de la fertilización en la calidad de la planta y en su respuesta postransplante son escasos. En nuestro estudio se evaluó el efecto de la fertilización otoñal en vivero, bajo clima mediterráneo templado-cálido con influencia atlántica, sobre la morfo-fisiología de las plantas y su establecimiento en campo, usando diferentes dosis de nitrógeno, fósforo y potasio (70,0 mg N, 30,5 mg P and 58,1 mg K para todas las plantas durante la fase de crecimiento; y 30,0 vs 1,5 mg N, 13,1 vs 0,3 mg P and 24,9 vs 0,5 mg K durante la fase otoñal de endurecimiento). La fertilización otoñal, especialmente con N, mejoró el crecimiento y el estado nutricional de las plantas, la tolerancia al frío y la capacidad de crecimiento de las raíces sin disminuir los estándares de calidad de las mismas. Sin embargo, la fertilización otoñal sólo tuvo un pequeño efecto en la respuesta postransplante en campo, afectada únicamente por la fertilización con K, probablemente debido al adecuado estado nutricional de N y P en todas las plantas y a las condiciones de clima templado de la parcela de estudio. En nuestra ubicación, con inviernos templados, la plantación en campo a finales de otoño fue más efectiva que la plantación a mediados del invierno.

Palabras clave: encina; fertilización en vivero; tolerancia al frío; estado nutricional; establecimiento en campo

3.2 - INTRODUCCIÓN

Quercus ilex L. (encina) es un árbol de sucesión tardía y hoja perenne que domina muchos tipos de bosques en el oeste de la cuenca mediterránea (Ruiz de la Torre, 2006) y es ampliamente usado para la restauración forestal en dichos bosques (Rodà et al., 1999). Sin embargo, esta especie muestra un pobre establecimiento en campo en comparación con otras especies mediterráneas, particularmente en lugares con condiciones climáticas desfavorables (Pausas et al., 2004). Este hecho ha sido atribuido a condiciones de estrés hídrico (Villar-Salvador et al., 2004a,b), baja fertilidad de los suelos (Pardos et al., 2005; Sanz-Pérez et al., 2007; Valdecantos et al., 2006) y a una deficiente calidad de las plantas (del Campo et al., 2010). Todo esto indica que la encina puede verse muy afectada por condiciones ambientales de estrés durante sus primeros años de vida, y es especialmente cierto para *Q. ilex* ssp. *ballota* (Desf.) Samp., que aparece principalmente en zonas continentales y de interior (Ruiz de la Torre, 2006), con cambios estacionales muy marcados y sequía estival acusada.

Las prácticas culturales en vivero, las condiciones ambientales y los factores genéticos afectan a las características funcionales de las plantas y a su establecimiento en campo una vez transplantadas (Birchler et al., 1998). En este sentido la manipulación de la disponibilidad de nutrientes en vivero es una herramienta poderosa para la modificación de las características de las plantas (Puttonen, 1997). Sin embargo, los efectos de la variación en la dosificación, formulación y aplicación de nutrientes sobre la calidad de la planta y el establecimiento en campo de especies del género *Quercus* es aún incierto

(Broncano et al., 1998; Oliet et al., 2009a; Trubat et al., 2010; Villar-Salvador et al., 2004a, 2005).

Durante la fase de endurecimiento en vivero, los factores ambientales (incluyendo las bajas temperaturas, el fotoperiodo corto, el riego y la fertilización) pueden inducir el letargo en las plantas y mejorar su endurecimiento (Colombo et al., 2003; Fernández et al., 2008). Por ejemplo, en plantas de encina se han alcanzado valores de tolerancia al frío (temperatura que causa el 50% de daño en los tejidos foliares) de entre -13° y -19° C, dependiendo de las condiciones de crecimiento y la región de procedencia de las semillas (Fernández et al., 2008; Heredia et al., 2009; Mollá et al., 2006). Morin et al. (2007) alcanzaron el 50 % de daño en los tejidos a -27° C, pero fue medido en segmentos de tallo, no en tejidos foliares. Algunos estudios han encontrado un considerable crecimiento en el cámbium y en las raíces durante la fase de endurecimiento, causando dilución de nutrientes en los tejidos de las plantas si no se suministraba cantidades adicionales de los mismos (Boivin et al. 2002). Por tanto, la fertilización durante esta fase podría incrementar los niveles de reserva de nutrientes en las plantas sin alterar significativamente la morfología de las mismas, pues se frena o detiene el crecimiento en altura, mejorando probablemente su respuesta en campo tras el transplante (Puértolas et al., 2003; Rikala et al. 2004), aunque también hay estudios cuyos resultados no concuerdan con lo anteriormente expuesto (Birchler et al. 2001).

Nitrógeno, fósforo y potasio son tres principales macronutrientes de las plantas pudiendo mejorar, respectivamente, aspectos como la tasa fotosintética neta, el crecimiento de las raíces y la eficiencia en el uso del agua (Fernández et al. 2006; Lambers et al.; 1990), el crecimiento radical en campo (Oliet et al., 2005) o el control estomático, el ajuste osmótico y la tolerancia a la sequía y a las heladas (Bogeat-Triboulot y Lévg, 1998). Algunos trabajos han sugerido que las proporciones relativas de estos nutrientes entre sí podrían ser más

importantes que las cantidades totales en los tejidos, a la hora de afectar el proceso de endurecimiento (Fernández et al., 2003).

El presente estudio con plantas de vivero de *Quercus ilex* ssp. *ballota*, sometidas durante el otoño de su primera savia a diferentes dosis de N-P-K, tiene como principales objetivos determinar: **(i)** el estado morfológico y nutricional a la finalización del periodo de cultivo en vivero **(ii)** el efecto de la fertilización otoñal sobre la tolerancia al frío y la capacidad de crecimiento de raíces en dos fechas (finales de otoño y mitad del invierno) y, **(iii)** el efecto de los cambios en las características de las plantas debidos a la fertilización otoñal sobre la capacidad de establecimiento en campo de las mismas.

3.3 - MATERIAL Y MÉTODOS

3.3.1 - Condiciones de cultivo de las plantas

Durante el otoño-invierno de 2006-07, se recogieron y se conservaron en arena húmeda a 2°C, previamente lavadas y desinfectadas, bellotas de *Quercus ilex* ssp. *ballota* (Desf.) Samp. de la región de procedencia *Sierra Morena Occidental*. Posteriormente, en los primeros días de febrero de 2007, se pusieron unas 2500 bellotas sobre perlita húmeda y se introdujeron en una cámara de cultivo a 20°C con el fin de inducir la pregerminación. Con ello se pretendía acortar el tiempo de germinación y conseguir una germinación más uniforme entre las bellotas. En la tercera semana de febrero, la gran mayoría de las bellotas sanas habían germinado y se seleccionaron aleatoriamente 1395 bellotas para su transplante a contenedores Plasnor® de 300 cm³ (completarían un total de 31 bandejas con 45 contenedores por bandeja) usando como substrato turba rubia Kekkilä® B0 (con el pH corregido a 6,0 usando Dolokal®). Las plantas crecieron en invernadero hasta mayo de 2007, cuando

se llevaron a un vivero bajo una malla que reducía la radiación un 50%. Todas las bandejas estuvieron bien regadas y fueron movidas y rotadas semanalmente durante todo el periodo de crecimiento para evitar posibles efectos del microambiente.

Durante las primeras 28 semanas, se aplicó un régimen de fertilización constante usando el fertilizante soluble en agua Peters professional® 20-20-20 en una solución de 125 ppm N, 54 ppm P y 104 ppm K, con cada planta recibiendo semanalmente una dosis de 2,500 mg N (el 20 % del fertilizante comercial se distribuye en 3,94% de nitrógeno amoniacal, 6,05% de nitrógeno nítrico y 10,01% de nitrógeno en forma de urea), 1,088 mg P y 2,075 mg K (fosfato monoamónico, fosfato monopotásico y nitrato potásico). En consecuencia, cada planta recibió 70,0 mg N, 30,5 mg P y 58,1 mg K durante el periodo de 28 semanas. Cada planta recibió el fertilizante disuelto en agua destilada en una sola fertilización por semana. Entre dos fertilizaciones consecutivas las plantas fueron regadas con agua del grifo según necesidad, procurando evitar un exceso de lavado por lixiviación en el agua de riego. Al final de estas primeras 28 semanas, los parámetros morfológicos y nutricionales de las plantas fueron: altura ($15,23 \pm 0,87$ cm), diámetro del tallo ($3,03 \pm 0,16$ cm), peso seco de la parte aérea ($1,74 \pm 0,13$ g), peso seco de la raíz ($4,02 \pm 0,26$ g), ratio parte aérea raíz ($0,43 \pm 0,03$) y concentraciones foliares de nutrientes de 0,93 %N, 0,09 %P y 0,56 %K.

En las siguientes 12 semanas (desde la primera semana de octubre hasta la tercera semana de diciembre de 2007), durante la fase de endurecimiento, las dosis de N, P y K fueron modificadas siguiendo un diseño factorial completo con tres factores (*N*, *P*, *K*) con dos niveles cada uno: *N* (N_1 , $N_{1/20}$), *P* (P_1 , $P_{1/50}$), y *K* (K_1 , $K_{1/50}$). Por lo tanto se utilizaron 8 tratamientos de fertilización distintos (Tab. 1), cada uno aplicado a 120 plantas (30 plantas por tratamiento y bandeja) que fueron aleatoriamente seleccionadas. Las plantas mostraron

nuevos brotes desde finales de verano hasta finales de octubre, sin diferencias significativas en el número de plantas con brotes nuevos entre tratamientos. Desde principios de noviembre en adelante las plantas no mostraron signos visuales de crecimiento de la parte aérea. Las dosis de nutrientes N_1 , P_1 , y K_1 fueron las mismas que las usadas durante las primeras 28 semanas de cultivo, y próximas a aquellas típicamente recomendadas para encinas durante la fase de crecimiento en vivero (Navarro-Cerillo et al., 2009), aunque los programas de fertilización en vivero para esta especie deben ser aún afinados (Jacobs et al., 2009). Las dosis bajas ($N_{1/20}$, $P_{1/50}$, $K_{1/50}$) fueron aplicadas para evitar una total privación de nutrientes (Boivin et al., 2002) pero aplicando unas dosis significativamente menores que las otras (nuestras experiencias previas con esta especie, no publicadas, mostraron que dosis entre $1/5$ y $1/10$ para N y entre $1/5$ y $1/20$ para P y K no afectaban significativamente el crecimiento y el estado nutricional de las hojas de las plantas).

Tabla 1: Cantidad total de N, P y K aplicada a cada planta durante las 12 semanas que duró la fase de endurecimiento en este estudio.

Tratamiento				mg últimas 12 semanas		
				N	P	K
1	N_1	P_1	K_1	30,0	13,1	24,9
2	N_1	$P_{1/50}$	K_1	30,0	0,3	24,9
3	N_1	P_1	$K_{1/50}$	30,0	13,1	0,5
4	N_1	$P_{1/50}$	$K_{1/50}$	30,0	0,3	0,5
5	$N_{1/20}$	P_1	K_1	1,5	13,1	24,9
6	$N_{1/20}$	$P_{1/50}$	K_1	1,5	0,3	24,9
7	$N_{1/20}$	P_1	$K_{1/50}$	1,5	13,1	0,5
8	$N_{1/20}$	$P_{1/50}$	$K_{1/50}$	1,5	0,3	0,5

3.3.2 - Estado morfo-fisiológico al final del cultivo en vivero

A finales de diciembre de 2007, 12 plantas por tratamiento fueron aleatoriamente seleccionadas (3 plantas por bandeja) para evaluar su estado morfológico y nutricional. El brote principal fue cortado en el punto de inserción de los cotiledones, las hojas y el tallo fueron separados y las raíces limpiadas. Se midió la altura de la planta y el diámetro del tallo, este último 0,5 cm por encima del punto de inserción de los cotiledones. Posteriormente todas las muestras fueron lavadas con agua destilada y puestas a secar en un horno con ventilación a 65°C. Una vez que no se apreció reducción en el peso de las muestras, se evaluó el peso seco de hojas (LDW), de tallos (StDW) y de raíces (RDW). Con estos datos se calculó el peso seco de la parte aérea (ShDW = LDW + StDW) y la ratio parte aérea raíz (SRDW = ShDW/RDW).

Para obtener una cantidad suficiente de muestra para el análisis de nutrientes, se agruparon las 12 plantas de cada tratamiento en cuatro grupos (muestras compuestas de tres plantas por grupo) que posteriormente fueron molidas (diámetro de rejilla de 0,8 mm). Para los análisis de N se utilizó un analizador elemental (Termo Finnigan 1112 Series EA, Milan, Italy). Para los análisis de P y K, las muestras secas y molidas fueron sometidas a 550° C durante 7 horas, seguido de una digestión ácida en HCl 5M, posteriormente se analizaron con ICP-OES (Jobin Yvon Ultima 2, Tokio, Japan). También se determinaron los carbohidratos no estructurales (NSC): los azúcares solubles (SS) fueron determinados mediante una extracción hidroalcohólica seguida de una colorimetría con antrona (Spiro, 1966) (usando un espectrofotómetro; UV-1601, Shimadzu ®, Tokyo, Japan), mientras que el almidón (St) se determinó mediante una hidrólisis ácida seguida de una colorimetría con antrona (Rose et al., 1991). Los contenidos en nutrientes minerales (N, P, K) y en NSC (expresados en mg) fueron calculados multiplicando la concentración (%) por

el peso seco (g). Los análisis de nutrientes y NSC se llevaron a cabo con el mismo material vegetal.

Asimismo, en tres plantas por tratamiento, se llevaron a cabo mediciones de intercambio gaseoso, contenido foliar de clorofila y se construyeron curvas isotermas de presión-volumen, con el fin de completar el análisis del estado fitosanitario de las plantas y analizar las posibles diferencias entre tratamientos. El intercambio gaseoso se midió con un analizador de gases por infrarrojos portátil (LCi, ADC, UK), tanto en diciembre como en febrero, a 27-30 °C y 800-1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de flujo de fotones fotosintéticos; la estimación del contenido en clorofilas se hizo con un medidor portátil (CCM-200, ADC, UK) en ambas fechas de medición, mediante un índice de concentración de clorofila (CCI) que calcula el equipo mediante algoritmos empíricos incorporados al software interno midiendo a 653 y 931 nm durante 2 s; mientras que las curvas presión-volumen se realizaron sólo en diciembre, usándose una cámara de presión (Modelo 1000; PMS Instruments, Corvallis, OR, USA) y siguiendo la metodología descrita por Koide et al. (1989). Mediante las curvas presión-volumen se caracterizaron los parámetros siguientes: potencial osmótico en el punto de pérdida de turgencia (π_{ppt}), potencial osmótico a plena turgencia (π_0), contenido hídrico relativo en el punto de pérdida de turgencia (CHR_{ppt}) y el contenido relativo de agua simplástica en el punto de pérdida de turgencia (S_{ppt})

3.3.3 - Tolerancia al frío y capacidad de crecimiento de las raíces

Para evaluar la tolerancia al frío se utilizó un ensayo de hoja suelta, tal y como fue descrito para *Eucalyptus globulus* L (Fernández et al., 2007). Este método permite la obtención de datos sin sacrificar la planta completa, por lo que nos permite llevar a cabo varios ensayos con diferentes temperaturas usando hojas de la misma planta. Las hojas seleccionadas, una vez arrancadas,

fueron introducidas en tubos de ensayo (2,2 cm de diámetro y 15 cm de longitud) y llevadas hasta un congelador doméstico al que se ha acoplado un programador de temperaturas (West ® 4400; ISE Inc., Cleveland, OH). El congelador contaba con dos ventiladores internos que distribuyen el aire en el interior de forma uniforme. Cada ensayo comenzó a 12 °C y la temperatura iba descendiendo a razón de 3 °C/hora hasta la mínima temperatura evaluada. La temperatura mínima se mantenía durante 3 horas y posteriormente ascendía hasta 12 °C, a razón de 5 °C/hora. Un ciclo completo solía durar entre 14 y 16 horas. Una vez terminado el ciclo de temperatura, los tubos de ensayo se sacaban del congelador y se les añadía a cada tubo agua destilada ($\leq 2 \text{ cm}^3$) hasta cubrir el pequeño peciolo. Las muestras se mantenían en una cámara de cultivo (25 °C día/17 °C noche; fotoperiodo de 12 h; $\geq 70\%$ de humedad relativa y $350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de flujo de fotones fotosintéticos).

El daño a las hojas era visualmente evaluado a las 4 y a las 24 horas después de la finalización del ensayo de frío mediante la estimación del porcentaje de la hoja que sufrió un daño visualmente apreciable (VD), causado por la lisis celular. Dicho daño se reconocía por un particular oscurecimiento y/o amarronamiento de la hoja después del ensayo. Simultáneamente y en las mismas hojas se midieron parámetros de fluorescencia de la clorofila usando un fluorímetro portátil (Fim 1500; ADC, London, UK). Previamente a la medición de estos últimos parámetros las hojas fueron mantenidas en oscuridad durante 20 minutos. Los parámetros estimados fueron: fluorescencia mínima de los pigmentos antenas (F_0), fluorescencia máxima (F_m), fluorescencia variable ($F_v = F_m - F_0$) y la ratio F_v/F_m .

Los ensayos se llevaron a cabo en dos fechas: la tercera semana de diciembre de 2007 y la primera semana de febrero de 2008. En diciembre de 2007 se utilizaron dos hojas completamente desarrolladas (una de la parte media-alta del tallo y otra de la parte media-baja del mismo) por planta y

temperatura de ensayo. Se utilizaron 4 plantas por tratamiento en cada ensayo y las temperaturas mínimas evaluadas fueron -6 °C, -7 °C, -8 °C y -10 °C. En febrero de 2008 se utilizaron 2 hojas por planta y 3 plantas por tratamiento, siendo las temperaturas mínimas evaluadas -7 °C, -8 °C y -10 °C. El número de horas de frío (≤ 8 °C) acumuladas por las plantas en el vivero fueron 425 en diciembre y 950 en febrero.

La capacidad de crecimiento de raíces (RGC) fue evaluada en diciembre de 2007 (12 plantas por tratamiento) y febrero de 2008 (8 plantas por tratamiento). Las plantas fueron cuidadosamente sacadas de sus contenedores, manteniendo el cepellón intacto, y transplantadas a contenedores forestales de 2,5 L rellenando el volumen sobrante con perlita húmeda. Previamente al trasplante se cortaron todas aquellas raíces blancas que sobresalían del cepellón. Los contenedores forestales fueron aleatoriamente distribuidos en una mesa calentadora (20° C) en el interior de un invernadero durante un periodo de 4 semanas. Las plantas fueron regadas cada 2-3 días y no fueron fertilizadas en ningún momento. Una vez finalizadas las 4 semanas, las plantas fueron cuidadosamente sacadas de los contenedores, limpiadas de perlita y las nuevas raíces fueron cortadas del cepellón. Las raíces fueron clasificadas en raíces finas (raíces < 2 mm diámetro) y raíces gruesas (raíces > 2 mm diámetro), se secaron en estufa a 65° C hasta peso constante y se pesaron para obtener su peso seco (FRW y ThRW, respectivamente).

3.3.4 - Establecimiento en campo

La plantación se realizó en una parcela experimental de la Universidad de Huelva (37°12'N, 6°54'W; 10 m sobre el nivel del mar) en dos fechas, el 22 de diciembre de 2007 y el 15 de febrero de 2008, usando 20 plantas aleatoriamente escogidas por tratamiento de fertilización y fecha de plantación. La parcela era aparentemente homogénea y las plantas se plantaron en 10

líneas con una separación de 1 m entre plantas y de 2 m entre líneas. En cada línea se plantaron aleatoriamente 2 plantas por tratamiento y fecha de plantación. Durante el periodo de estudio, la temperatura media en la parcela fue de 16,5 °C, siendo la temperatura media de las máximas en el mes más cálido y la temperatura media de las mínimas en el mes más frío de 29,9 °C y 4,8 °C respectivamente. La precipitación media anual fue de 484 mm, con un periodo de sequía estival que se extendió durante 4 meses. Una vez plantadas, la altura y el diámetro del tallo fueron medidos en 5 fechas distintas a lo largo de 2 años consecutivos. También se caracterizó el estado de vigor de las plantas usando una escala del 0 al 3 (0, planta muerta; 1, planta con más del 50% de defoliación u hojas secas; 2, plantas con menos del 50% de defoliación u hojas secas; y 3, plantas completamente sanas), en dos fechas distintas, una antes del periodo seco (4 de julio de 2008) y otra varios meses después del fin del periodo seco (2 de diciembre de 2008). Para caracterizar el crecimiento de las plantas se usaron los parámetros de tasa de incremento del diámetro de tallo (SDI) y tasa de incremento de la altura (HI). SDI y HI se calcularon como el diámetro y la altura medidos en una fecha particular divididos por el número de días que transcurrieron entre fechas de medición consecutivas. También se caracterizó el potencial hídrico al amanecer (Ψ) en dos fechas (15 de julio y 10 de septiembre de 2008), una cercana a la mitad del primer verano y otra a la finalización del mismo ya que representan la época más estresante para las plantas. Para su medición se utilizó una cámara de presión (Modelo 1000; PMS Instruments, Corvallis, OR, USA) y se utilizaron 4 plantas, elegidas al azar, por tratamiento de fertilización y fecha de plantación, midiendo el potencial hídrico en 2 hojas por planta que fueron tomadas de la parte central del tallo principal. La parcela no fue regada durante todo el periodo de estudio y las herbáceas fueron eliminadas de forma manual.

3.3.5 - Análisis de datos

El efecto de la fertilización otoñal en la morfología y el estado nutricional de las plantas fue evaluado usando el siguiente modelo lineal general (GLM)

$$y_{ijkl} = \mu + N_i + P_j + K_k + NP_{ij} + NK_{ik} + PK_{jk} + NPK_{ijk} + e_{ijkl} \quad (1)$$

donde y_{ijkl} es el valor de la variable dependiente en la planta l fertilizada con la dosis i de N ($i = 1, 2$), la dosis j de P ($j = 1, 2$), y la dosis k de K ($k = 1, 2$); μ es la media general; N , P , y K son los efectos fijos de los nutrientes; los términos dobles y triples representa la interacción entre los mismos; y e es el término de error con hipótesis inicial $e_{ijkl} \sim N(0, \sigma_e^2)$. Cuando la variable dependiente era un porcentaje, se usó la transformación $\arcsen\sqrt{\text{var}(\%)/100}$. Las diferencias significativas entre los distintos efectos fueron evaluadas mediante el test de Tukey's HSD, con $\alpha = 0,05$. Para el análisis de datos de los ensayos de RGC se siguió el mismo GLM, pero incluyendo como factor fijo la fecha de medición (diciembre, febrero) y las interacciones con los términos del modelo 1.

Para evaluar la relación entre VD y el parámetro F_v/F_m se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson. La influencia de la fertilización en VD fue estimada mediante el siguiente modelo mixto:

$$y_{ijklmnoq} = \mu + \alpha_j + d_k + t_l + h_m + N_n + P_o + K_q + th_{lm} + NP_{no} + NK_{nq} + PK_{oq} + tN_{ln} + tP_{lo} + tK_{lq} + tNP_{lno} + tNK_{lnq} + tPK_{loq} + thN_{lmn} + thP_{lmo} + thK_{lmq} + e_{ijklmnoq} \quad (2)$$

donde $y_{ijklmnoq}$ es el $\arcsen\sqrt{VD(\%)/100}$ de la hoja i de la planta j , evaluado en la fecha k (diciembre, febrero), a la temperatura l , medido después de m horas (4 h, 24 h), con la dosis n de N, la dosis o de P, y la dosis q de K; μ es la media general; α es el efecto aleatorio de la planta; d es el efecto fijo de la fecha del ensayo; t es el efecto fijo de la temperatura; h es el efecto fijo del tiempo que pasa hasta que se realiza la medición; N , P , y K son los efectos fijos de los nutrientes; y e es el término de error. Los otros términos describen las interacciones entre los efectos principales. La estructura inicial de varianza-covarianza considera diferente la varianza entre observaciones a distintas temperaturas y fechas de medición, y también considera que la covarianza entre observaciones de la misma hoja a diferentes tiempos de medición no es nula y es diferente para cada temperatura.

El estado de vigor de las plantas en campo se analizó considerándola una variable dependiente nominal, que sigue una distribución multinomial. Para ello se empleó el siguiente modelo lineal fijo generalizado, que incorpora una función de enlace de tipo logit acumulativa:

$$\log\left(\frac{\Pr(y_{ijklmn}) \leq t}{\Pr(y_{ijklmn}) > t}\right) = \mu + \alpha_i + d_j + m_k + N_l + P_m + K_n + NP_{lm} + NK_{ln} + PK_{mn} + dN_{kl} + dP_{km} + dK_{kn} + dNP_{lm} + dNK_{ln} + dPK_{mn} + dm_{jk} + e_{ijklmn}$$

(3)

donde y_{ijklmn} es el estado de vigor (escala de 0, 1, 2, ó 3) de la planta i plantada en la fecha j (diciembre, febrero) evaluada en la fecha k (julio, diciembre) con la dosis l de N, la dosis m de P, y la dosis n de K; t es el estado de vigor (escala de 0, 1, 2, ó 3); α es el efecto aleatorio de la planta; d es el efecto fijo de la fecha de plantación; m es el efecto fijo de la fecha de evaluación del estado de

vigor; N , P , y K son los efectos fijos de los nutrientes; y e es el término del error.

El análisis del crecimiento en altura y diámetro de las plantas en campo fue evaluado usando el siguiente modelo:

$$y_{ijklmn} = \mu + d_i + m_j + N_k + P_l + K_m + NP_{kl} + NK_{km} + PK_{lm} + mN_{jk} + mP_{jl} + mK_{jm} + dm_{ij} + mNP_{jkl} + mNK_{jkm} + mPK_{jlm} + e_{ijklmn}$$

(4)

donde y_{ijklmn} es el SDI o el HI de la planta n plantada en la fecha i (diciembre, febrero) y medida en la fecha j (cinco medidas) con una dosis k de N, una dosis l de P, y una dosis m de K; d es el efecto fijo de la fecha de plantación; m es el efecto fijo de la fecha de medición; N , P , y K son los efectos fijos de los nutrientes; y e es el término de error. La matriz inicial de varianza-covarianza se consideró no estructurada para observaciones dentro de la misma planta.

El efecto de la fertilización en el estado hídrico de las plantas fue evaluado tal y como se describe en el modelo 1, pero considerando también la fecha de plantación (diciembre, febrero) y la fecha de medición (julio, septiembre) como efectos fijos, además de considerar la interacción de estos efectos con los efectos recogidos en el modelo 1. La influencia de la fertilización en los parámetros deducidos de las curvas presión-volumen se evaluó mediante el modelo 1, el cual fue también usado para evaluar el efecto sobre el intercambio gaseoso y el contenido en clorofila, aunque considerando la fecha de medición (diciembre, febrero) como factor fijo.

3.4 - RESULTADOS

3.4.1 - Morfología y estado fitosanitario de las plantas

La fertilización otoñal con nitrógeno tuvo un efecto significativo en todos los parámetros morfológicos estudiados (Tab. 2). La tabla 2 también muestra cómo las dosis K_1 incrementaron significativamente tanto la altura como el peso de la parte aérea en las plantas. Los valores de SRDW disminuyeron durante la fase de endurecimiento para todos los tratamientos estudiados, posiblemente relacionado con un mayor incremento relativo de RDW (26-56 %) respecto de ShDW (6-34 %). No obstante, a pesar de esa disminución, N_1 , P_1 , y K_1 mantuvieron valores de SRDW más altos que $N_{1/20}$, $P_{1/50}$, y $K_{1/50}$. Las interacciones entre nutrientes no resultaron significativas ($p > 0,05$) para ninguno de los parámetros estudiados

Tabla 2: Valores de los parámetros morfológicos de las plantas (en diciembre de 2007) cultivadas con diferentes dosis de N (N_1 y $N_{1/20}$), P (P_1 y $P_{1/50}$), K (K_1 y $K_{1/50}$). Para cada parámetro y nutriente, las letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre dosis de nutrientes.

	<i>N</i>		<i>P</i>		<i>K</i>	
	N_1	$N_{1/20}$	P_1	$P_{1/50}$	K_1	$K_{1/50}$
H (cm)	18,62 a	14,77 b	16,49 a	16,90 a	17,66 a	15,73 b
D (mm)	3,95 a	2,97 b	3,37 a	3,55 a	3,46 a	3,45 a
ShDW (g)	2,33 a	1,49 b	1,84 a	1,78 a	2,05 a	1,78 b
RDW (g)	6,27 a	5,04 b	5,66 a	5,64 a	5,85 a	5,46 a
SRDW	0,38 a	0,30 b	0,35 a	0,32 b	0,35a	0,32 b

Las tablas 3 y 4 muestran que la fertilización otoñal con dosis mayores de P y K incrementó significativamente la concentración de N en hojas (1,03 %N [P_1], 0,88 %N [$P_{1/50}$]; 1,06 %N [K_1], 0,86 %N [$K_{1/50}$]) y que la fertilización con mayor dosis de N elevó la concentración en hojas de P (0,15 %P [N_1], 0,11 %P [$N_{1/20}$]). La media general para el resto de las concentraciones de nutrientes en los diversos tejidos, no diferentes significativamente entre tratamientos, fueron: 0,75 %K para hojas; 0,47 %N, 0,11 %P y 0,65 %K para raíces; y 0,44 %N, 0,09 %P y 0,46 %K para tallos.

La fertilización otoñal con dosis mayores de N y K incrementó significativamente los contenidos de N, P y K en hojas, mientras que la fertilización con mayor dosis de P incrementó solamente el contenido en hojas de N (Tab. 3 y 4). La fertilización con dosis mayores de N y K incrementó significativamente el contenido de N en raíces (28,4 mg N [N_1], 23,8 mg N [$N_{1/20}$]; 27,8 mg N [K_1], 24,5 mg N [$K_{1/50}$]). En el tallo, solo la fertilización con mayor dosis de N tuvo un efecto significativo en los contenidos en nutrientes, aumentando significativamente los contenidos en N (3,7 mg N [N_1], 2,2 mg N [$N_{1/20}$]) y en P (0,7 mg P [N_1], 0,4 mg P [$N_{1/20}$]). La media general, no significativamente distinta entre tratamientos, para el resto de los contenidos de nutrientes en los diversos tejidos fueron: 6,0 mg P y 36,0 mg K para raíces y 3,1 mg K para tallos. Por lo tanto, considerando los contenidos en hojas, tallos y raíces, el contenido total de N por planta fue aproximadamente de 48 mg para la dosis N_1 y 35 mg para la dosis $N_{1/20}$.

Tabla 3: Valores de p obtenidos del modelo lineal general que evalúa el efecto de la fertilización (N , P y K) en la concentración y el contenido de nutrientes, en hojas (L), raíces (R) y tallo (S), de las plantas de *Quercus ilex* en diciembre de 2007.

	N			P			K		
	L	R	S	L	R	S	L	R	S
[N]	0,145	0,276	0,528	0,028	0,896	0,312	0,009	0,187	0,706
[P]	0,014	0,226	0,467	0,304	0,697	0,788	0,262	0,383	0,848
[K]	0,276	0,162	0,851	0,279	0,815	0,847	0,105	0,742	0,490
N cont	<0,001	0,006	0,007	0,001	0,961	0,936	<0,001	0,041	0,120
P cont	<0,001	0,516	0,035	0,194	0,683	0,468	0,038	0,136	0,184
K cont	0,001	0,989	0,061	0,153	0,824	0,611	0,012	0,491	0,364

Tabla 4: Valores de concentración y contenido en nutrientes foliares de las plantas de *Quercus ilex* en diciembre de 2007 cultivadas con diferentes dosis de N (N_1 y $N_{1/20}$), P (P_1 y $P_{1/50}$) y K (K_1 y $K_{1/50}$). Para cada parámetro y nutriente, las letras diferentes en una misma fila muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre dosis de nutrientes.

	N		P		K	
	N_1	$N_{1/20}$	P_1	$P_{1/50}$	K_1	$K_{1/50}$
[N] (%)	1,01 a	0,91 a	1,03 a	0,88 b	1,06 a	0,86 b
[P] (%)	0,15 a	0,11 b	0,14 a	0,12 a	0,14 a	0,12 a
[K] (%)	0,82 a	0,67 a	0,82 a	0,68 a	0,87 a	0,63 a
N cont (mg)	15,53 a	9,08 b	13,73 a	11,14 b	14,78 a	10,27 b
P cont (mg)	2,31 a	1,09 b	1,83 a	1,64 a	1,98 a	1,50 b
K cont (mg)	12,64 a	6,74 b	10,83 a	8,81 a	12,19 a	7,58 b

En relación a las interacciones entre nutrientes, las interacciones N·P y P·K resultaron únicamente significativas para la concentración y el contenido de N en las hojas de las plantas ($0,001 \leq p \leq 0,027$). La interacción N·K tuvo un efecto significativo en la concentración de N en hojas ($p < 0,001$) y en raíces ($p = 0,029$); además de para el contenido de N en hojas, raíces y tallo

($0,001 \leq p \leq 0,010$). El efecto significativo de estas interacciones es atribuible al efecto de las dos dosis aplicadas de cada nutriente, siendo el efecto de N siempre mayor que el efecto de P y K (Tab. 3 muestra un ejemplo de ello). Como resultado, las interacciones N·P y N·K indicaron que es necesario aplicar altas dosis de ambos nutrientes ($N_1 P_1$ o $N_1 K_1$, respectivamente) para obtener un incremento en la concentración y contenido de N en hojas. Por lo tanto la fertilización con P y K también afectó a la concentración y contenido de N en hojas. La concentración de N en hojas se vio también afectada por la interacción P·K, las plantas con menores dosis de ambos nutrientes ($P_{1/50} K_{1/50}$) tuvieron los valores más bajos, siendo significativamente menores que las plantas que recibieron P_1 y K_1 , P_1 y $K_{1/50}$ o $P_{1/50}$ y K_1 .

Sólo la fertilización con N tuvo un efecto significativo ($p = 0,003$) en la concentración de SS en raíces y hojas, ambas fueron mayores en plantas que recibieron las dosis $N_{1/20}$ (5,05 % y 3,16 %, respectivamente) que N_1 (3,60 % y 2,08 %, respectivamente). Asimismo, sólo el contenido de St en raíces fue significativamente mayor ($p = 0,006$) después de adicionar la dosis N_1 (1423,3 mg) frente a la dosis $N_{1/20}$ (1064,2 mg). No se apreció ningún efecto significativo sobre los contenidos de SS y St en hojas (30,81 mg y 1233,95 mg, respectivamente) ni sobre la concentración de St en hojas y raíces (8,85 % y 22,17 %, respectivamente). Los efectos de P y K y de todas las interacciones entre nutrientes no resultaron significativas ($p > 0,120$) para ninguno de los parámetros de carbohidratos estudiados.

Respecto a las mediciones de intercambio gaseoso y contenido en clorofila, no se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos ni entre fechas de medición para la transpiración ($1,68 \pm 0,08 \text{ mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), para la conductancia estomática ($86,0 \pm 6,5 \text{ mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) ni para el índice de contenido en clorofila (CCI) ($27,4 \pm 0,62$). La tasa fotosintética neta tampoco

se diferenció entre tratamientos pero sí entre fechas de medición ($p = 0,010$; $5,51 \pm 0,35 \mu\text{mol}_{\text{CO}_2} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ [diciembre] y $3,94 \pm 0,46 \mu\text{mol}_{\text{CO}_2} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ [febrero]). El mismo comportamiento tuvo la eficiencia en el uso del agua (fotosíntesis neta / transpiración), con $p < 0,001$ y valores más altos en diciembre ($3,57 \pm 0,20 \mu\text{mol}_{\text{CO}_2}/\text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}}$) que en febrero ($2,08 \pm 0,13 \mu\text{mol}_{\text{CO}_2}/\text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}}$). Sin embargo, aunque no significativo para un α de 0,05, este último parámetro estuvo próximo a la significación entre tratamientos de N ($p = 0,064$), presentando valores más altos N_I que $N_{I/20}$ ($3,17 \pm 0,20$ y $2,70 \pm 0,25$, respectivamente). Respecto a los parámetros derivados de las curvas presión-volumen, CHR_{ppt} y S_{ppt} no mostraron diferencias significativas entre dosis de nutrientes ($92,08 \pm 3,19 \%$; $20,51 \pm 7,45 \%$, respectivamente), sin embargo se obtuvieron diferencias significativas entre dosis de N para π_{ppt} ($-2,98 \pm 0,15 \text{ MPa}$ [N_I] y $-2,76 \pm 0,15 \text{ MPa}$ [$N_{I/20}$]) y π_o ($-1,86 \pm 0,27 \text{ MPa}$ [N_I] y $-1,65 \pm 0,21 \text{ MPa}$ [$N_{I/20}$]), siendo en ambos casos menores (más negativos) los valores para las plantas N_I que para las $N_{I/20}$.

3.4.2 - Tolerancia al frío y capacidad de crecimiento radical

Se obtuvo una correlación lineal negativa significativa entre F_v/F_m y VD para ambas fechas estudiadas (diciembre y febrero) y para ambos tiempos de medición después de la finalización del ensayo (4 h y 24 h). Estas correlaciones fueron mejores a 24 h ($r = -0,924$, $p < 0,001$, $n = 400$) que a 4 h ($r = -0,894$, $p < 0,001$, $n = 400$). Los resultados a las 24 h mostraron que para $F_v/F_m \leq 0,64$, VD fue siempre $\geq 50\%$; para $F_v/F_m \geq 0,77$, VD fue $\leq 50\%$; y para $0,64 < F_v/F_m < 0,77$, los valores de VD fueron impredecibles pero siempre iguales o menores al 60% (Fig. 1). Los demás parámetros de fluorescencia de la clorofila medidos (F_0 , F_v y F_m) no mostraron correlación significativa con la estimación del daño visual (VD).

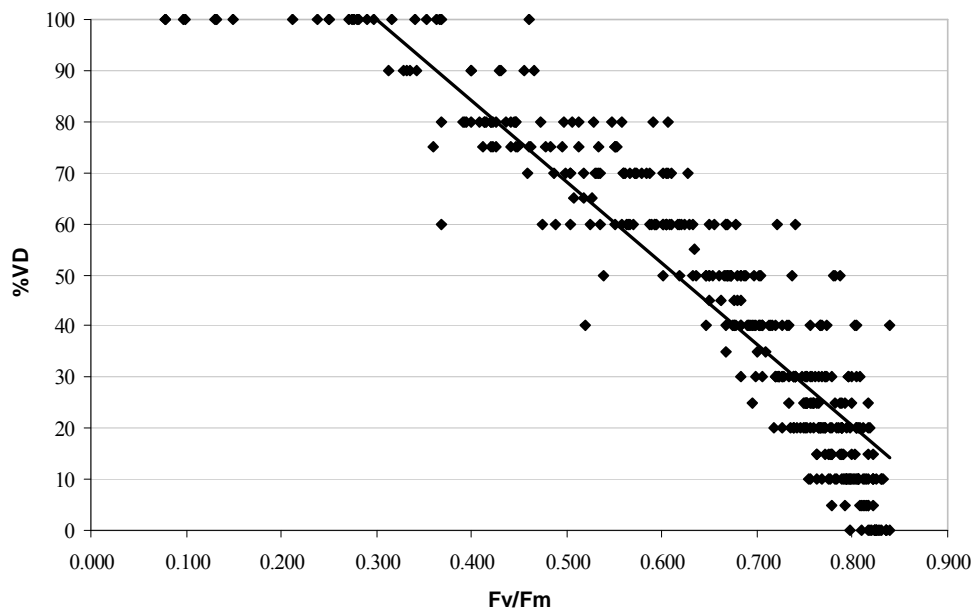
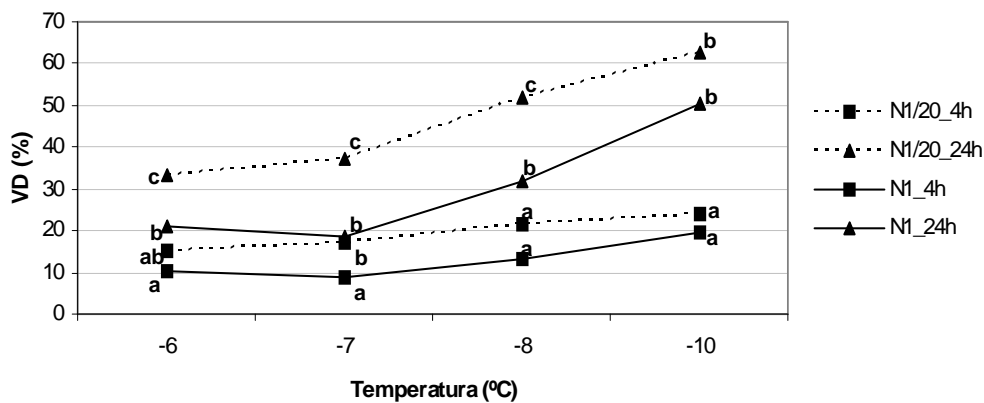


Figura 1: Relación entre el daño visual (VD) y F_v/F_m medidos 24 horas después de la finalización de los ensayos de frío. El análisis de la correlación lineal se realizó mediante el coeficiente de correlación de Pearson ($r = -0,924$, $p < 0,001$, $n = 400$).

El análisis de los datos mostró diferencias significativas en VD entre todas las temperaturas estudiadas, excepto entre -6°C y -7°C , siendo los valores de VD mayores en los ensayos de temperatura más baja. VD fue mayor en diciembre que en febrero (30,4% y 22,0% respectivamente), mientras que las medidas realizadas 24 h después de la finalización del ensayo mostraron valores mayores que las realizadas a las 4 h (37,8 % y 15,8 % respectivamente). La interacción entre la temperatura y el tiempo de medición también resultó significativa ($p < 0,001$), siendo el incremento del daño entre las mediciones a las 4 y 24 h más evidente a -7°C y -8°C que a -6°C y -10°C . El N fue el factor nutricional que más afectó a VD, las plantas tratadas con N_1 tuvieron valores de VD significativamente menores (20,0 %) que aquellas tratadas con $N_{1/20}$ (32,2%) (Fig. 2). También se encontraron diferencias

significativas en función de la dosis de P ($p = 0.003$), aunque solo a -8°C , a dicha temperatura las plantas tratadas con $P_{1/50}$ sufrieron más daños que aquellas tratadas con P_1 .

Figura 2: Daño visual (VD) en relación con las diferentes dosis de N aplicadas, para cada temperatura de ensayo y tiempo de medición. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre diferentes dosis de N y tiempo de medición para cada temperatura ensayada.

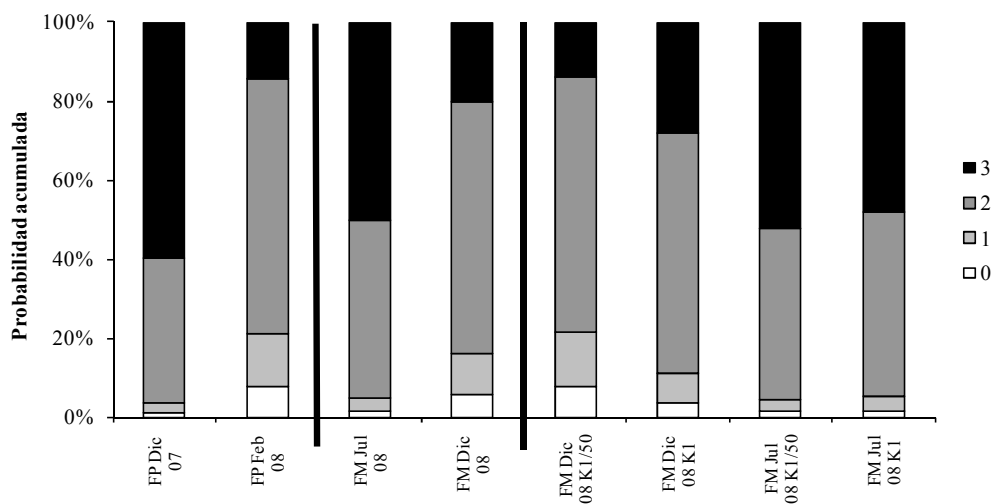


Respecto a la capacidad de crecimiento radical (RGC) ensayada, las plantas tratadas con dosis N_1 produjeron significativamente más raíces nuevas que las plantas tratadas con $N_{1/20}$ ($p < 0,05$). Los valores de las variables estudiadas en función de la dosis de N fueron: 33,7 mg ThRW (N_1), 23,1 mg ThRW ($N_{1/20}$), 8,8 mg FRW (N_1), y 4,9 mg FRW ($N_{1/20}$). En el ensayo de diciembre estas diferencias fueron encontradas en todos los parámetros estudiados mientras que en el ensayo de febrero, dichas diferencias sólo fueron significativas para FRW. Respecto al efecto de la fecha de ensayo, sólo se encontraron diferencias significativas entre fechas para FRW ($p = 0,034$), siendo mayores los valores de diciembre que los de febrero.

3.4.3 - Establecimiento en campo

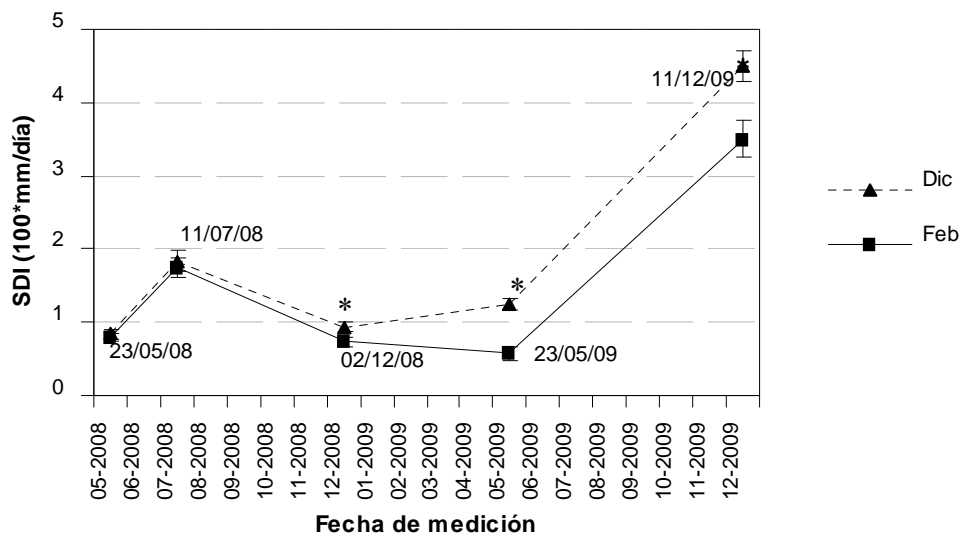
El primer año después de la plantación, las plantas plantadas en diciembre de 2007 presentaron un mejor vigor que aquellas plantadas en febrero de 2008; a su vez las plantas presentaron mejor estado de vigor en la medición realizada en julio de 2008 que en la de diciembre de 2008. Además la interacción entre la fecha de medición y la dosis de K aplicada fue significativa, en diciembre de 2008 las plantas tratadas en vivero con dosis K_1 mostraron mejor estado de vigor que aquellas tratadas con dosis $K_{1/50}$ (Fig. 3). Las plantas plantadas en diciembre de 2007 también tuvieron en diciembre de 2008 unos valores significativamente mayores de SDI que aquellas plantadas en febrero de 2008 (Fig. 4). Sin embargo, para HI no se encontraron diferencias significativas entre plantas plantadas en distintas fechas.

Figura 3: Probabilidad acumulada estimada (%) de pertenecer a una de las categorías consideradas para evaluar el estado de vigor: 0 plantas muertas, 1 plantas con una defoliación mayor del 50%, 2 plantas con una defoliación menor del 50%, y 3 plantas completamente sanas. Solo están representados factores o interacciones que resultaron estadísticamente significativos. El modelo ha probado ser significativo para la fecha de plantación (DP), fecha de medición (DM) y la interacción entre DM y la dosis de K.



Al principio de la primera estación seca (julio de 2008), las plantas plantadas en diciembre de 2007 tuvieron un potencial hídrico significativamente mayor que aquellas plantadas en febrero de 2008 ($\Psi = -2,19 \pm 0,15$ MPa y $\Psi = -2,62 \pm 0,17$ MPa, respectivamente). Sin embargo, una vez finalizado este periodo (septiembre de 2008) no se encontraron estas diferencias significativas entre fechas de plantación, siendo el valor medio del potencial hídrico $\Psi = -3,53 \pm 0,08$ MPa.

Figura 4: Tasa de crecimiento en diámetro del tallo (SDI) (\pm S.E.) estimado para cada fecha de plantación durante el periodo de estudio. * muestra diferencias significativas ($p < 0,05$) entre fecha de plantación para una determinada fecha de medición.



3.5 - DISCUSIÓN

Nuestros resultados indican que altas dosis de fertilización otoñal nitrogenada (N_1) resultaron más efectivas que dosis bajas ($N_{1/20}$) para el incremento de los parámetros morfológicos (ShDW, RDW y SRDW) al final del periodo de crecimiento en vivero de las plantas de encina. El tamaño y el peso de las plantas estuvieron dentro del rango de las plantas comerciales de encina normalmente producidas en esta región, de acuerdo también a las regulaciones estatales actualmente en vigor (del Campo et al., 2010; Navarro-Cerrillo et al., 2009). Los mayores valores de ShDW y SRDW estuvieron en concordancia con resultados de estudios previos llevados a cabo con esta especie (Broncano et al., 1998; Villar-Salvador et al., 2004a). Sin embargo, algunos estudios (Oliet et al., 2009a; Villar-Salvador et al., 2004a) no encontraron un aumento en el crecimiento de las raíces sometidas a distintos tratamientos de fertilización con N. Esta diferencia puede ser explicada porque nuestra fertilización se extendió hasta mediados de diciembre, mientras que en los estudios citados la fertilización concluyó a principios de otoño por lo que pudo no ayudar de forma directa al crecimiento de las raíces y a la actividad cambial durante el otoño, o bien a las temperaturas templadas-cálidas de nuestro vivero que permiten una mayor actividad vegetativa otoñal. También hemos encontrado que la fertilización con P y K mejoró SRDW; en particular la fertilización con K incrementó significativamente el crecimiento del tallo. En este sentido Oliet et al. (2009b) también encontraron un incremento en el crecimiento del tallo en las plantas fertilizadas con N y K. Este elevado crecimiento del tallo puede ser atribuible a un mayor contenido foliar de K y P de las plantas más fertilizadas y en particular a la mayor concentración y contenido foliar de N en las plantas fertilizadas con mayores dosis de P y K.

Las concentraciones de nutrientes al final del periodo de vivero fueron similares a las encontradas en otros estudios para plantas de encina (del Campo

et al., 2010; Navarro-Cerrillo et al., 2009; Oliet et al., 2009a). La fertilización con N fue el principal factor que afectó al contenido en nutrientes de las plantas: mayor suplemento otoñal de N incrementó significativamente tales contenidos, principalmente debido a la mayor biomasa de las plantas y a una elevada concentración de P en las hojas. Oliet et al. (2009a) encontraron mayores concentraciones de N, P, y K en plantas fertilizadas que en plantas no fertilizadas, pero no encontraron un efecto significativo de las diferentes dosis de N, entre las fertilizadas, para las concentraciones ensayadas, incluso siendo las diferencias entre dosis de N aplicadas mayores que las presentes en este estudio y habiendo aplicado los diferentes tratamientos de fertilización durante todo el periodo de crecimiento en vivero. En el caso de las raíces, no hemos encontrado diferencias significativas en las concentraciones de N, P, y K, en contraste con otros estudios en encina (Oliet et al., 2009a; Villar-Salvador et al., 2004a) donde se encontraron mayores niveles de N, P, y K en las plantas fertilizadas. Estas diferencias pueden ser debidas a la “dilución” de los nutrientes por el crecimiento de nuevas raíces y a la acumulación de éstos durante las 40 semanas del periodo de crecimiento, no sólo en la fase de endurecimiento. Teniendo en cuenta que una bellota de esta región de procedencia puede contener unos 30 mg de N en su interior (Oliet et al., 2009a), a finales de diciembre las plantas sólo mantuvieron entre el 34% [$N_{1/20}$] y el 37% [N_I] del N disponible en la bellota más el N aplicado al medio de cultivo. El efecto positivo de la fertilización con P y K en la concentración de N en hojas puede ser debido a varias razones (Marschner, 1995): **(i)** al requerimiento de estos nutrientes para la síntesis de ácidos nucleicos, para la respiración de las raíces, la cual es una precondición para la absorción del N, o para el metabolismo fotosintético; **(ii)** a la relación directa entre el nivel de P y el metabolismo energético celular, en particular como fuente de ésteres fosfóricos y fosfatos ricos en energía (por ejemplo, ATP) necesarios para la

reducción de NO_3^- a NH_4^+ ; **(iii)** al papel de K en la activación de numerosas enzimas y ATPasas requeridas para la síntesis de proteínas.

Nuestros resultados indican que la concentración de SS en raíces y hojas fueron escasamente menores en las plantas que recibieron dosis N_I que en aquellas que recibieron dosis $N_{I/20}$. Esto es probablemente debido a un mayor consumo de carbono en las plantas N_I , que crecieron más vigorosamente que las $N_{I/20}$, ya que la concentración de SS puede estar determinada por el balance entre la actividad de la fuente y la demanda para el metabolismo celular, de acuerdo a la fenología del crecimiento (Fernández et al., 2008; Palacio et al., 2008; Sanz-Perez et al., 2007). Los mayores contenidos de St de las plantas tratadas con dosis N_I , en comparación con las tratadas con dosis $N_{I/20}$, indican que no hubo un efecto de dilución evidente en la concentración de St en raíces, incluso aunque las plantas N_I incrementaron en mayor proporción la biomasa de las raíces durante la etapa otoñal.

Los valores de intercambio gaseoso invernales medidos a las plantas están dentro del rango propio de la especie, teniendo en cuenta que las tasas fotosintéticas netas no llegaron a los máximos descritos para esta especie por una más que probable inhibición invernal de la fotosíntesis (García-Plazaola et al., 1999; Juárez-López et al., 2008), más acusado cuanto más avanzó el invierno desde diciembre hasta febrero. Asimismo, los valores obtenidos de los parámetros derivados de las curvas presión-volumen están dentro del rango mostrado por otros autores para la especie (Serrano et al., 2005; Villar-Salvador et al., 2004b). En ambos casos, intercambio gaseoso y relaciones hídricas, las plantas que recibieron mayor dosis de N en otoño (N_I) se comportaron mejor que las de dosis reducida ($N_{I/20}$), aunque con diferencias pequeñas en valores absolutos. Cabría señalar los valores más negativos de π_{ppt} y π_0 de las plantas N_I , lo que podría indicar una mayor acumulación de solutos

intracelulares en estas plantas respecto de las del tratamiento $N_{1/20}$, contribuyendo a mejorar la tolerancia al frío.

Estudios previos han evaluado el efecto del estrés por frío en la eficiencia fotosintética de la encina, basándose en mediciones de la fluorescencia de la clorofila (Oliveira y Peñuelas, 2004). La medición del parámetro F_v/F_m es un método no destructivo, sencillo y rápido para evaluar el daño inducido por la helada en la planta. La alta correlación existente entre el parámetro F_v/F_m y los daños por helada después de un ensayo de frío han sido previamente mostrados en otras especies (Fernández et al., 2007, 2008). Por tanto, las mediciones de F_v/F_m podrían ser muy útiles para evaluar los daños por heladas de una forma cuantitativa en vez de un método subjetivo como es el método visual (VD). No obstante, en dicha correlación existe un intervalo de valores de F_v/F_m con cierta incertidumbre en su predicción que invita a no aparcar las mediciones visuales del daño ocasionado hasta que el ensayo de frío no esté perfectamente afinado. Los valores menores de VD en los ensayos de febrero en relación con los ensayos de diciembre, podrían ser debidos a la mayor acumulación de horas de frío que habrían mejorado la tolerancia a las heladas (Fernández et al., 2008). Estudios previos han encontrado diferentes efectos (incremento, descenso o no efecto) de la fertilización con N en dicha tolerancia (literatura citada en Fernández (2008) y Vilagrosa et al., 2006). En nuestro estudio, la fertilización otoñal con N aumentó la tolerancia al frío, aunque no se llegó a un alto grado de endurecimiento pues a -10°C se alcanzó el umbral de 50% de VD. En otros estudios realizados en el mismo vivero con plantas de encina de otra región de procedencia, o en un vivero de clima más frío con la misma región de procedencia que la de este estudio, siempre utilizando similar tipo de contenedor y medio de cultivo se obtuvieron valores de 50% de VD en torno a -13°C (Fernández et al., 2005). Estas diferencias podrían ser explicadas por la variación de temperatura durante la fase de vivero

y por caracteres adaptativos de las distintas poblaciones empleadas. Con estos datos, la respuesta postransplante en zonas con inviernos más fríos resultaría impredecible para plantas procedentes de un vivero sometido a un clima templado-cálido.

Distintos estudios han encontrado una asociación positiva entre la concentración de SS y la tolerancia al frío en varias especies de *Quercus* (Fernández et al., 2008; Mollá et al., 2006; Morin et al., 2007). Por el contrario, en nuestro estudio se ha encontrado que las plantas con mayor tolerancia al frío (tratamientos con N_1) tuvieron menores valores de concentración de SS que aquellas tratadas con $N_{1/20}$. Sin embargo, las diferencias de contenido en SS entre plantas que recibieron distintas dosis de N fue pequeña y las concentraciones de SS también fueron relativamente bajas (3,60-5,05 %) en comparación a las citadas en otros estudios (5,00-9,50 %). Debido a que las membranas celulares son los sitios primarios de lesión durante las heladas, la mayoría de las alteraciones celulares durante el período de endurecimiento están destinadas a preservar la integridad de las mismas (Zwiasek et al., 2001). Por lo tanto, aunque la acumulación de SS puede mejorar la tolerancia al frío por sus propiedades criogénicas y osmóticas, la elevación de los niveles de otros solutos incluyendo los lípidos, aminoácidos, proteínas (proteínas que tienen actividad apoplástica anticongelante, proteínas crioprotectores, dehidrinas, etc), ácidos orgánicos, glucósidos, y sales orgánicas también pueden mejorar dicha tolerancia (Larcher, 2000; Zwiasek et al., 2001). Esto podría explicar el efecto positivo de la fertilización nitrogenada sobre la tolerancia al frío en el presente trabajo. Sin embargo, la relación entre la tolerancia al frío y la composición de estos compuestos orgánicos aún debe ser definida para ésta y otras especies mediterráneas. Además, una medición con mayor frecuencia de la tolerancia al frío y del contenido en SS que en el presente estudio, desde finales de verano hasta el otoño y durante el invierno

(Colombo et al., 2003), sería la única manera de entender realmente cómo la nutrición afecta el desarrollo de la tolerancia al frío en la planta.

También hemos encontrado que la fertilización con N incrementó el contenido foliar de K, el cual juega un papel fundamental en la osmorregulación (Hsiao y Läuchli, 1986), estando el daño por heladas inversamente relacionado con el contenido de K de las hojas (Marschner, 1995). Hemos encontrado un efecto positivo de la fertilización con P en la tolerancia al frío sólo para las plantas expuestas al ensayo a -8°C , este efecto fue menor en comparación con el de la fertilización con N y, probablemente, estuvo relacionado con el incremento de la concentración de N en las hojas de las plantas como consecuencia de la fertilización con P.

RGC está considerada como una medida del vigor de las plantas y proporciona una buena evaluación de la eficiencia fotosintética y de la cantidad de carbohidratos almacenados (Ritchie, 1985). Nosotros hemos encontrado que la fertilización con N (N_I) incrementó RGC, el crecimiento de la parte aérea y el contenido en almidón, debido probablemente al mayor tamaño de estas plantas que afectó a su capacidad de asimilación (Villar-Salvador et al., 2004a). RGC ha sido usado para predecir la capacidad de establecimiento postransplante de las especies forestales y está frecuentemente correlacionado con la tolerancia al frío (Simpson y Ritchie, 1996). En nuestro estudio, la fertilización con N (N_I) no sólo incrementó RGC sino también la tolerancia al frío, resultado que concuerda con los obtenidos por Mollá et al. (2006). Sin embargo, no tuvo efecto en el establecimiento en campo. Esto pudo ser atribuido a las buenas condiciones ambientales de la parcela de plantación durante el periodo de estudio: la mayoría de nuestras plantas sobrevivieron, registrando valores de sólo un 2% de mortalidad para las plantas plantadas en diciembre de 2007 y un 8% para las plantadas en febrero de 2008. Además, los potenciales hídricos durante el primer verano no bajaron de $-3,5\text{ MPa}$, no

llegando pues a $-4,0$ MPa, valores típicos de años donde el periodo de sequía es severo (Villar-Salvador et al., 2004b).

En el transcurso de nuestro periodo de estudio, las plantas plantadas en diciembre de 2007 tuvieron mejor estado de vigor que las plantadas en febrero de 2008. Palacios et al. (2009) también encontraron que el establecimiento en campo de plantas de encina estaba fuertemente afectado por la fecha de plantación. Como confirman nuestros resultados, el verano (la estación seca) fue la estación más estresante, mostrando las plantas mejores estados de vigor antes que inmediatamente después del verano. En verano, las raíces necesitan tomar el agua de las partes más profundas del suelo (Palacios et al., 2009). En nuestra parcela de estudio, las plantas plantadas en diciembre presumiblemente desarrollaron un sistema radicular más extenso durante el suave invierno, periodo en el que los brotes aéreos permanecieron dormidos. De hecho, nuestros datos confirman que en mitad del verano los potenciales hídricos de las plantas plantadas en diciembre fueron más altos que los de aquellas plantadas en febrero. Además, la tasa de incremento en diámetro (SDI) después de la primera estación seca fue mayor en las plantas plantadas en diciembre que aquellas plantadas en febrero, presumiblemente debido a la relación positiva entre crecimiento y estado hídrico. La variación en SDI entre plantas plantadas a distintas fechas, se incrementó después del segundo año en campo.

Como hemos dicho anteriormente, estudios previos han encontrado distintos efectos de la fertilización en vivero sobre el establecimiento en campo de encinas y otras especies mediterráneas. En el presente estudio, sólo la fertilización con K afectó al vigor de las plantas, posiblemente debido al rol de K en el control de la apertura de los estomas y el ajuste osmótico (Hsiao y Läubli, 1986). Del Campo et al. (2010) también encontraron un efecto positivo del K en la respuesta de las plantas en campo (supervivencia), especialmente en años secos. Sin embargo, aunque nosotros no encontramos

variaciones en las concentraciones de K entre plantas que recibieron distintos tratamientos de fertilización con K, existieron variaciones entre tratamientos en los contenidos totales de K en las hojas. Además, encontramos que la fertilización con N mejoró la tolerancia al frío, el crecimiento y el estado nutricional de las plantas al final del periodo en vivero, pero no afectó al establecimiento en campo. Esto puede ser debido a la baja plasticidad de las plantas de encina con respecto a la disponibilidad de nutrientes, a la aplicación de N por un breve período de tiempo (durante las últimas 12 semanas en el vivero) o, en general, a las condiciones favorables de crecimiento en nuestra parcela de campo durante el período de estudio, que derivaron en que todas nuestras plantas tuvieran suficientes reservas de este elemento para obtener un rendimiento óptimo en campo. En condiciones más desfavorables y estresantes es posible esperar diferentes resultados del efecto de la fertilización nitrogenada sobre el rendimiento en campo, pero no ha sido constatado en este estudio.

3.6 - CONCLUSIONES

Las plantas cultivadas registraron valores morfo-fisiológicos dentro del rango de los estándares comerciales de esta especie. En particular la fertilización nitrogenada con dosis N_1 (100 mg N durante toda la fase de vivero, 30 mg de ellos durante la fase de endurecimiento otoñal) aumentó el crecimiento, el contenido en nutrientes, la tolerancia al frío y la capacidad de crecimiento de raíces de las plantas respecto de la dosis reducida (71,5 mg N, 1,5 mg de ellos durante el otoño). La mayor fertilización otoñal con P y K también mejoró algunos aspectos morfo-fisiológicos y de estado nutricional de las plantas.

Sin embargo la mejora de dichos parámetros morfo-fisiológicos por efecto de la mayor fertilización no se tradujo en una mejor respuesta en campo tras el transplante, probablemente a consecuencia de las buenas condiciones edafoclimáticas de la parcela de estudio. Sólo la fertilización con K tuvo un efecto positivo en el establecimiento en campo, posiblemente debido a la acción osmorreguladora de K que favoreció a las plantas más fertilizadas durante la época de sequía estival. Resultan necesarios, pues, más estudios para afinar el programa de fertilización óptimo en encina para la mejora del establecimiento en campo de las plantas.

Nuestros resultados, una vez más, recomiendan la plantación temprana de encinas en áreas mediterráneas con inviernos suaves ya que podría favorecer el crecimiento radicular y por lo tanto aumentar las probabilidades de supervivencia de las plantas durante la estación seca estival.

Capítulo 2: Efecto de la fertilización otoñal en vivero sobre la tolerancia al frío en dos procedencias ibéricas de encina.



4 - Efecto de la fertilización otoñal en vivero sobre la tolerancia al frío en dos procedencias ibéricas de encina

4.1 - RESUMEN

La amplia distribución que presenta la encina por la cuenca mediterránea y el éxito limitado que se ha logrado a través de los programas de restauración forestal llevados a cabo con esta especie, hacen que se tenga en consideración la procedencia de las semillas a la hora de producir plantas destinadas a repoblación forestal. Diferentes respuestas fisiológicas de distintas poblaciones a los factores de estrés a los que la planta es sometida (generalmente bajas temperaturas y sequía) tendrían un efecto práctico en la elección del material para repoblación, sin embargo el conocimiento sobre la plasticidad fisiológica de esta especie es escaso y a menudo contradictorio. En nuestro estudio se evaluó el efecto de dos procedencias de semilla de clima contrastado (Alcarria y Sierra Morena Occidental) en la tolerancia al frío de las plantas, además de estudiar la respuesta de las mismas a diversas dosis de fertilización otoñal en vivero. La fertilización otoñal, especialmente con N, mejoró el crecimiento, la capacidad de crecimiento de raíces, la tolerancia al frío y el estado nutricional de las plantas sin disminuir la calidad de planta de las mismas. Se detectó una diferente asimilación y/o acumulación de nutrientes entre distintas regiones de procedencia de las semillas, además de que aspectos fisiológicos como la tolerancia al frío parecen depender de aspectos genéticos relacionados con la adaptación de las plantas a las condiciones climáticas de sus regiones de procedencia, al ser las plantas de la procedencia más fría más tolerantes que las de la procedencia cálida.

Palabras clave: encina; región de procedencia; nutrición mineral; adaptación.

4.2 - INTRODUCCIÓN

Quercus ilex L. (encina) es un árbol de hoja perenne y esclerófila ampliamente distribuido por la cuenca mediterránea (Barbero et al., 1992). A pesar de ser considerablemente usado para restauración forestal en dichos bosques (Rodà et al., 1999) muestra un pobre establecimiento en campo en comparación con otras especies mediterráneas, particularmente en lugares con condiciones climáticas desfavorables (Pausas et al., 2004). Uno de los aspectos a los que es atribuido este escaso éxito de las repoblaciones es a la baja calidad de las plantas (del Campo et al., 2010). La encina es un árbol muy vulnerable a condiciones ambientales de estrés durante sus primeros años de vida, especialmente en el caso de *Q. ilex* ssp. *ballota* (Desf.) Samp., que aparece principalmente en zonas continentales y de interior (Ruiz de la Torre, 2006).

La amplia distribución de la encina, unida a la heterogeneidad de los ambientes que coloniza, implica una alta plasticidad fenotípica a nivel morfo-fenológico (Gratani, 1995; Sabatè et al., 1999), lo cual indica una gran capacidad de adaptabilidad (Valladares et al., 2000). Diferentes respuestas fisiológicas de distintas poblaciones a los factores de estrés a los que la planta es sometida (generalmente bajas temperaturas y sequía) tendrían un efecto práctico en la elección del material para repoblación. En los estudios realizados sobre plasticidad fisiológica en encina (Gimeno et al., 2009; Gratani et al., 2003; Laureano et al., 2008; Morin et al., 2007; Pesoli et al., 2003; Sánchez-Vila y Retuerto, 2007) existen discrepancias en cuanto a si predomina la aclimatación (alta plasticidad intrapoblacional) o la adaptación a las condiciones de su región de procedencia (plasticidad interpoblacional). Las heladas son uno de los principales agentes estresantes de las plantas de encina durante su establecimiento y limita la distribución en altitud de la especie (Terradas y Savé, 1992) siendo, por tanto, muy importante para el éxito de una

reoblación conocer si existen diferencias entre regiones de procedencia en cuanto a resistencia a diferentes tipos de estrés.

Las prácticas en vivero, las condiciones ambientales y los factores genéticos afectan a las características funcionales de las plantas y a su establecimiento en campo una vez transplantadas (Birchler et al., 1998). En este sentido la manipulación de la disponibilidad de nutrientes es una herramienta útil para la modificación de las características de las plantas (Puttonen, 1997). Sin embargo, los efectos de la manipulación de la disponibilidad de nutrientes en la calidad de planta y el establecimiento en campo de especies del género *Quercus* es aún incierto (Broncano et al., 1998; Oliet et al., 2009a; Trubat et al., 2010; Villar-Salvador et al., 2004a, 2005). Además, por lo que sabemos hasta el momento, el conocimiento del efecto de la fertilización sobre el estado nutricional de plantas de encina de distintas procedencias y su relación con la resistencia a estrés es prácticamente nulo.

Nitrógeno y potasio son dos de los principales macronutrientes en plantas. Su aporte puede mejorar, respectivamente, aspectos como la tasa fotosintética, el crecimiento radical y la eficiencia en el uso del agua (Fernández et al., 2006; Lambers et al., 1990); o el control estomático, el ajuste osmótico y la tolerancia a la sequía y a las heladas (Bogeat-Triboulot y Lévg, 1998). En nuestro estudio, teniendo en cuenta los datos proporcionados en el capítulo 1, hemos sometido a las plantas a distintas dosis de N y K, por ser los nutrientes que más efecto produjeron sobre los parámetros estudiados, prescindiendo en este ensayo del efecto del fósforo.

El presente estudio, con plantas de dos procedencias de *Quercus ilex* ssp. *ballota*, una de clima frío continental (Alcarria, *ALC*) y otra de clima más cálido con influencia atlántica (Sierra Morena Occidental, *HU*), sometidas durante el período de fertilización otoñal a diferentes dosis de N-K, tiene como

principales objetivos determinar: **(i)** el estado morfológico y nutricional a la finalización del periodo de vivero de las plantas de cada procedencia, **(ii)** corroborar el efecto de la fertilización otoñal sobre la tolerancia al frío y la capacidad de crecimiento de raíces y, **(iii)** estudiar si existe un distinto comportamiento en la capacidad de tolerancia a estrés por bajas temperaturas de plantas de procedencias de clima contrastado.

4.3 - MATERIAL Y MÉTODOS

4.3.1 - Material vegetal y condiciones de cultivo

Las bellotas de encina se recolectaron durante el otoño de 2008 en dos localidades de condiciones climáticas diferentes, en 25 árboles por localidad separados entre sí más de 80 m, a razón de 300 semillas por árbol. Una de las localidades (*ALC*) está situada en Guadalajara, correspondiente a la región de procedencia La Alcarria y Serranía de Cuenca (39°25' - 41°20' N, 1°40' - 3°15' W) mientras que la otra está localizada en la Sierra de Huelva (*HU*), correspondiente a la región de procedencia Sierra Morena Occidental (37°30' - 38°20' N, 4°30' - 7°30' W). La primera región de procedencia se ubica a una altitud de entre 800 y 1000 m, sobre cambisoles cálcicos, con una precipitación media anual de 628 mm. La temperatura media anual es de 13,3 °C, la temperatura media de las máximas en el mes más cálido es de 34,6 °C mientras que la temperatura media de las mínimas en el mes más frío es de -2,8 °C llegando a alcanzar mínimas de -20 °C en años muy fríos (Jiménez-Sancho et al., 1996). La segunda región de procedencia se halla entre 200 y 700 m de altitud, sobre regosoles y cambisoles pedregosos, con una precipitación media anual de 842 mm. La temperatura media anual es de 16,2 °C, la temperatura media de las máximas en el mes más cálido es de 38,5 °C mientras que la temperatura media de las mínimas en el mes más frío es de 1,5 °C (Jiménez-

Sancho et al., 1996). Esta región, a diferencia de la anterior, no presenta períodos de helada segura, aunque las temperaturas mínimas absolutas pueden alcanzar -5°C en enero.

A principios de 2009, se tomaron de forma aleatoria 300 bellotas por procedencia (12 por árbol) y se pusieron a pregerminar sobre perlita húmeda en una cámara de cultivo a 20°C con el fin de reducir el tiempo y la variabilidad intrapoblacional en la germinación. En la tercera semana de febrero, se plantaron 120 bellotas sanas de cada procedencia escogidas al azar de entre las que habían pregerminado satisfactoriamente. Las bellotas fueron distribuidas aleatoriamente en 6 bandejas de contenedores Plasnor® de 300 cm^3 (1 bandeja contiene 45 contenedores), de forma que en cada bandeja había 20 plantas de cada procedencia y se utilizó como sustrato turba rubia Kekkilä® B0 (con el pH corregido a 6,0 usando Dolokal®). Las plantas crecieron en vivero bajo una malla que reducía la radiación un 50%. Todas las bandejas estuvieron bien regadas y fueron movidas y rotadas semanalmente durante todo el periodo de crecimiento para evitar el efecto de la posición.

Durante las primeras 28 semanas, se aplicó un régimen de fertilización constante usando el fertilizante soluble en agua Peters professional® 20-20-20 en una solución de 125 ppm N, 54 ppm P y 104 ppm K, con cada planta recibiendo semanalmente una dosis de 2,500 mg N (el N del fertilizante se distribuía en 3,94% nitrógeno amoniacal, 6,05% nitrógeno nitrato y 10,01% nitrógeno urea), 1,088 mg P y 2,075 mg K (fosfato monoamónico, fosfato monopotásico y nitrato potásico), correspondiente a 70,0 mg N, 30,5 mg P, y 58,1 mg K por planta durante el periodo de 28 semanas. Cada planta recibió el fertilizante disuelto en agua destilada con una periodicidad semanal y entre dos fertilizaciones consecutivas las plantas fueron regadas con agua del grifo según necesidad. Al final de las primeras 28 semanas, los parámetros morfológicos y

nutricionales fueron: altura ($9,45 \pm 0,44$ cm), diámetro del tallo ($2,38 \pm 0,07$ cm), peso seco de la parte aérea ($1,19 \pm 0,07$ g), peso seco de la raíz ($2,46 \pm 0,28$ g), ratio parte aérea raíz ($0,58 \pm 0,04$) y concentraciones foliares de nutrientes de 0,99 %N, 0,09 %P, 0,63 %K.

Transcurridas las 28 semanas (octubre de 2009), se tomaron 80 plantas por procedencia al azar y se distribuyeron aleatoriamente en bandejas a razón de 20 plantas por procedencia en cada bandeja. En las siguientes 12 semanas (desde la primera semana de octubre a la tercera semana de diciembre), durante la fase de endurecimiento, las dosis de N y K fueron modificadas siguiendo un diseño factorial completo con dos factores (*N* y *K*) con dos niveles cada uno: *N* (N_1 , $N_{1/20}$) y *K* (K_1 , $K_{1/50}$) y dejando la dosis de P constante (denominada P_1 en el capítulo 1). Por lo tanto se experimentaron 4 tratamientos de fertilización distintos (Tab. 1), cada uno aplicado a una bandeja que contenía 20 plantas por procedencia (40 plantas por tratamiento). Las plantas mostraron nuevos brotes desde finales de verano hasta finales de octubre, sin diferencias significativas en el número de plantas con brotes nuevos entre tratamientos o procedencias. De principios de noviembre en adelante las plantas no mostraron signos visuales de crecimiento del tallo. Las dosis de nutrientes N_1 , P_1 , y K_1 fueron las mismas que las usadas durante las primeras 28 semanas de cultivo, coincidentes con las aplicadas en el capítulo 1 y dentro del rango de aquellas típicamente recomendadas para encinas durante la fase de crecimiento en viveros (Navarro-Cerillo et al., 2009). Las dosis bajas ($N_{1/20}$ y $K_{1/50}$) fueron aplicadas para evitar una total privación de nutrientes (Boivin et al., 2002) pero aplicando unas dosis significativamente menores a las N_1 y K_1 .

Tabla 1: Cantidad total de N, P y K aplicada a cada planta durante las 12 semanas que duró la fase de endurecimiento otoñal en este estudio.

Tratamiento				mg últimas 12 semanas		
				N	P	K
1	N_1	P_1	K_1	30,0	13,1	24,9
3	N_1	P_1	$K_{1/50}$	30,0	13,1	0,5
5	$N_{1/20}$	P_1	K_1	1,5	13,1	24,9
7	$N_{1/20}$	P_1	$K_{1/50}$	1,5	13,1	0,5

4.3.2 - Estado morfológico y nutricional

A finales de diciembre de 2009, seis plantas por tratamiento y procedencia fueron aleatoriamente seleccionadas para evaluar su estado morfológico y nutricional. El brote principal se cortó en el punto de inserción de los cotiledones, las hojas y el tallo fueron separados y las raíces limpiadas. Se midió la altura de la planta y el diámetro del tallo, este último 0,5 cm por encima del punto de inserción de los cotiledones. Posteriormente todas las muestras fueron lavadas con agua destilada y puestas a secar en un horno a 65 °C. Una vez que no se apreció reducción en el peso de las muestras, se evaluó el peso seco de hojas (LDW), de tallos (StDW) y de raíces (RDW), también se calculó el peso seco de la parte aérea (ShDW = LDW + StDW) y la ratio parte aérea raíz (SRDW = ShDW/RDW).

Para obtener una cantidad suficiente de muestra de hojas para el análisis de nutrientes y carbohidratos no estructurales, se agruparon las 6 plantas en tres grupos de muestras por tratamiento y procedencia (dos plantas en cada grupo) que posteriormente fueron molidas usando un molino con un diámetro de rejilla de 0,8 mm. Para los análisis de N se utilizó un analizador elemental (Termo Finnigan 1112 Series EA, Milan, Italy). Para los análisis de P y K, las muestras secas y molidas fueron sometidas a 550 °C durante 7 horas, seguido

de una digestión ácida en HCl 5M, posteriormente se analizaron con ICP-OES (Jobin Yvon Ultima 2, Tokio, Japan). También se determinaron en hojas los carbohidratos no estructurales (NSC): para la determinación de los azúcares solubles (SS) se realizó una extracción hidroalcohólica seguida de una colorimetría con antrona (Spiro, 1966) usando un espectrofotómetro (UV-1601, Shimadzu ®, Tokyo, Japan), mientras que el almidón (St) se determinó mediante una hidrólisis ácida seguida de una colorimetría con antrona (Rose et al., 1991). Los contenidos en nutrientes minerales y en NSC (expresados en mg) fueron calculados multiplicando la concentración (%) por el peso seco (g). Todos los nutrientes y NSC fueron determinados en las mismas muestras de hojas.

4.3.3 - Tolerancia al frío y capacidad de crecimiento de las raíces

Para evaluar la tolerancia al frío se utilizaron los ensayos de hoja suelta, tal y como fue descrito para *Eucalyptus globulus* L. (Fernández et al., 2007) y en el capítulo 1. Las hojas seleccionadas fueron separadas de las plantas e insertadas en tubos de ensayo (2,2 cm de diámetro y 15 cm de longitud), posteriormente se llevaron a un arcón congelador al que se acopló un programador de temperaturas (West ® 4400; ISE Inc., Cleveland, OH). El congelador contaba con dos ventiladores internos que distribuían el aire en el interior de una forma uniforme. El ensayo comenzaba a 12 °C y la temperatura iba descendiendo a razón de 3 °C/h hasta la mínima temperatura evaluada. La temperatura mínima era mantenida durante 3 horas y posteriormente se elevaba ésta hasta 12 °C, a razón de 5 °C/h, siendo la duración de un ciclo completo de entre 14 y 16 horas. Una vez terminado el ciclo de temperatura, los tubos de ensayo eran sacados del congelador y se les añadía agua destilada ($\leq 2 \text{ cm}^3$ por tubo) hasta cubrir el peciolo. Seguidamente, las muestras se mantenían en una cámara de cultivo a 25 °C día/17 °C noche, fotoperiodo de 12 h , $\geq 70\%$ de humedad relativa y $350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de flujo de fotones fotosintéticos.

El daño a las hojas fue visualmente evaluado mediante la estimación del porcentaje de la hoja que sufrió un daño visualmente apreciable (VD) a 4, 24, 48 y 96 h después de la finalización del ensayo de frío. Dicho daño visual, causado por la lisis celular se reconocía por un particular oscurecimiento y/o amarronamiento de la superficie afectada.

Los ensayos se llevaron a cabo en la tercera semana de diciembre de 2009 y se utilizaron dos hojas completamente desarrolladas por planta y temperatura de ensayo (una de la parte media-alta del tallo y otra de la parte media-baja del mismo), utilizando 4 plantas por tratamiento y procedencia en cada ensayo. Las temperaturas mínimas evaluadas fueron -8 °C, -10 °C, -12 °C y -14 °C. El número de horas de frío ($\leq 8^{\circ}\text{C}$) acumuladas por las plantas en el vivero fue de 239 h en el momento de las mediciones.

La capacidad de crecimiento de raíces (RGC) se evaluó también en diciembre, usando 6 plantas por tratamiento y procedencia. Las plantas fueron cuidadosamente sacadas de sus contenedores y transplantadas a contenedores forestales de 2,5 L rellenando el volumen sobrante con perlita húmeda. Previamente al trasplante se cortaron todas aquellas raíces blancas que sobresalían del cepellón. Los contenedores fueron aleatoriamente distribuidos en una mesa calentadora (20 °C) en el interior de un invernadero durante un periodo de 4 semanas. Las plantas fueron regadas cada 2-3 días y no fueron fertilizadas en ningún momento. Una vez finalizadas las 4 semanas, las plantas fueron cuidadosamente sacadas de los contenedores, limpiadas de perlita y las nuevas raíces fueron cortadas del cepellón. Las raíces se secaron en estufa a 65° C hasta peso constante y se pesaron para obtener su peso seco pero previamente fueron clasificadas en raíces finas (FRW; < 2 mm diámetro) y raíces gruesas (ThRW; > 2 mm diámetro).

4.3.4 - Análisis de datos

El efecto de la fertilización otoñal y la procedencia en la morfología y el estado nutricional de las plantas fue evaluado usando el siguiente modelo lineal general (GLM)

$$y_{ijkl} = \mu + N_i + K_j + PROC_k + NK_{ij} + NPROC_{ik} + KPROC_{jk} + NKPROC_{ijk} + e_{ijkl} \quad (1)$$

donde y_{ijkl} es el valor de la variable dependiente en la planta l fertilizada con la dosis i de N ($i = 1, 2$), la dosis j de K ($k = 1, 2$) y perteneciente a la procedencia k ($k = 1, 2$); μ es la media general; N , K y $PROC$ son los efectos fijos de los nutrientes y la procedencia; los términos dobles y triples representan la interacción entre los mismos; y e es el término de error bajo la hipótesis $e_{ijkl} \sim N(0, \sigma_e^2)$. Cuando la variable dependiente era un porcentaje, se usó la transformación $\arcsen\sqrt{\text{var}(\%)/100}$. Las diferencias significativas entre los distintos efectos fueron evaluadas mediante el test de Tukey's HSD, con $\alpha = 0,05$. Para el análisis de datos de los ensayos de RGC se siguió el mismo GLM.

La influencia de la fertilización y la procedencia en VD fue estimada mediante un modelo mixto:

$$y_{ijklmno} = \mu + \alpha_j + t_k + h_l + N_m + K_n + PROC_o + th_{kl} + NK_{mn} + NPROC_{mo} + KPROC_{no} + tN_{km} + tK_{kn} + tPROC_{ko} + tNK_{kmn} + tNPROC_{kmo} + tKPROC_{kno} + thN_{klm} + thK_{kln} + thPROC_{klo} + e_{ijklmnoq} \quad (2)$$

donde $y_{ijklmno}$ es el $\arcsen\sqrt{VD(\%)/100}$ de la hoja i de la planta j , a la temperatura k , medido después de l horas (24 h, 48 h, 72 h, 96 h), con la dosis m de N, la dosis n de K y la procedencia o ; μ es la media general; α es el efecto aleatorio de la planta; t es el efecto fijo de la temperatura; h es el efecto

fijo del tiempo que pasa hasta que se realiza la medición; N , K y $PROC$ son los efectos fijos de los nutrientes y la procedencia; y e es el término de error. Los otros términos describen las interacciones entre los efectos principales. La estructura inicial de la matriz de varianzas-covarianzas considera diferente la varianza entre observaciones a distintas temperaturas, y que la covarianza entre observaciones de la misma hoja a diferentes tiempos de medición no es nula y es distinta para cada temperatura.

4.4 - RESULTADOS

4.4.1 - Morfología y estado nutricional de las plantas

La fertilización otoñal con nitrógeno tuvo un efecto significativo en todos los parámetros morfológicos estudiados a excepción de la ratio SRDW (Tab. 2). La tabla 2 también muestra cómo la región de procedencia resultó significativa para el diámetro y para SRDW, además de existir diferencias significativas ($p = 0,031$) en la biomasa de hojas entre ambas procedencias (HU 1,17 g; ALC 1,02 g). Por su parte la fertilización otoñal con potasio no tuvo un efecto significativo ($p > 0,05$) para ninguno de los parámetros estudiados, al igual que todas las interacciones entre los efectos contemplados.

Tabla 2: Valores de los parámetros morfológicos de las plantas (en diciembre de 2009) en función de la dosis de N (N_1 y $N_{1/20}$) y la localidad de procedencia (ALC y HU). Para cada parámetro también se muestra el nivel de significación obtenido (p).

	<i>N</i>			<i>PROC</i>		
	N_1	$N_{1/20}$	p	<i>ALC</i>	<i>HU</i>	p
<i>H</i> (cm)	14,43	11,61	<0,001	12,53	13,41	0,153
<i>D</i> (mm)	3,15	2,68	<0,001	3,14	2,69	<0,001
ShDW (g)	1,71	1,33	0,007	1,45	1,58	0,395
RDW (g)	3,43	2,79	0,002	3,20	3,01	0,284
SRDW	0,51	0,48	0,253	0,46	0,53	0,005

Las tablas 3 y 4 muestran que la mayor fertilización otoñal con N incrementó significativamente, en hojas, tanto la concentración como el contenido de nutrientes (N, P y K). Además se han obtenido diferencias en las concentraciones de P y contenidos de N y K en función de la región de procedencia. Sin embargo no se ha encontrado un efecto significativo de la fertilización otoñal con K ni sobre las concentraciones ni sobre el contenido en nutrientes.

Tabla 3: Valores de p obtenidos del modelo lineal general que evaluó el efecto de la fertilización (factores N y K) y el efecto de la región de procedencia sobre la concentración y el contenido de nutrientes en hojas de las plantas de *Quercus ilex* en diciembre de 2009.

	N	K	$PROC$	$N-K$	$N-PROC$	$K-PROC$	$N-K-PROC$
[N]	0,003	0,322	0,229	0,970	0,995	0,238	0,758
[P]	0,006	0,060	0,007	0,812	0,012	0,119	0,749
[K]	0,037	0,070	0,073	0,039	0,715	0,300	0,446
N cont	<0,001	0,395	0,005	0,550	0,449	0,102	0,500
P cont	<0,001	0,125	0,266	0,966	0,005	0,140	0,257
K cont	0,003	0,176	0,023	0,191	0,913	0,037	0,324

Tabla 4: Valores de concentración y contenido en nutrientes foliares de las plantas de *Quercus ilex* en diciembre de 2009 cultivadas con diferentes dosis de N (N_1 y $N_{1/20}$), y perteneciente a distintas regiones de procedencia (ALC y HU). Para cada parámetro y factor, las letras diferentes muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre dosis de nutriente o región de procedencia.

	N		$PROC$	
	N_1	$N_{1/20}$	ALC	HU
[N] (%)	1,53 a	1,31 b	1,38 a	1,46 a
[P] (%)	0,17 a	0,15 b	0,17 a	0,15 b
[K] (%)	0,92 a	0,88 b	0,88 a	0,91 a
N cont (mg)	18,54 a	12,83 b	14,29 a	17,04 b
P cont (mg)	2,04 a	1,47 b	1,76 a	1,75 a
K cont (mg)	11,24 a	8,73 b	9,16 a	10,81 b

En relación a las interacciones entre nutrientes y región de procedencia, la interacción N·K tuvo un efecto significativo en la concentración de K en hojas, siendo necesario aplicar las dosis más altas de ambos nutrientes (N_I y K_I) para obtener un incremento significativo de la concentración de K, el cual no se conseguía con la aplicación independiente de la dosis alta de cada nutriente por separado. La interacción N·PROC resultó significativa tanto para la concentración como para el contenido de P, siendo la combinación de dosis alta de nitrógeno (N_I) con la región de procedencia *ALC* la que presentó valores mayores de concentración y contenido de P. También resultó significativa la interacción K·PROC para el contenido en K, obteniéndose los valores mayores para la combinación de dosis alta de potasio (K_I) y región de procedencia *HU*.

No hubo ningún efecto significativo de la fertilización en las concentraciones foliares de SS ni de St (4,97 % y 25,05 %, respectivamente) ni en sus contenidos (56,40 mg y 276,45 mg, respectivamente). Sí hubo diferencias significativas en el contenido foliar en SS entre procedencias ($p = 0,043$), siendo los contenidos encontrados en las plantas de la procedencia *HU* mayores que en las de la procedencia *ALC* (69,21 mg y 43,60 mg, respectivamente).

4.4.2 - Tolerancia al frío y capacidad de crecimiento radical

El análisis de los datos mostró diferencias significativas en VD entre todas las temperaturas estudiadas, excepto entre -10 °C y -12 °C, siendo los valores de VD mayores cuanto menor fue la temperatura ensayada. Asimismo, VD fue aumentando significativamente conforme aumentaba el tiempo de espera entre la finalización del ensayo y la medición (24, 48, 72 y 96 h). Tanto la fertilización nitrogenada como la región de procedencia fueron factores que

afectaron los valores de VD, mientras que la dosis de K no presentó ningún efecto significativo sobre los daños por frío. Para N, las plantas que recibieron una dosis menor de fertilizante ($N_{1/20}$) presentaron valores de VD mayores que las plantas que recibieron una dosis alta (N_1) para todas las temperaturas ensayadas, excepto para -14 °C (Fig. 1). Por otra parte, las plantas de la región de procedencia *HU* presentaron valores de VD mayores que las plantas de la procedencia *ALC*, esta diferencia fue patente a las temperaturas de -10 y -12 °C (Fig. 2).

Figura 1: Daño visual (VD) estimado en función de las diferentes dosis de N aplicadas y la temperatura de ensayo. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre diferentes dosis de N para cada temperatura ensayada.

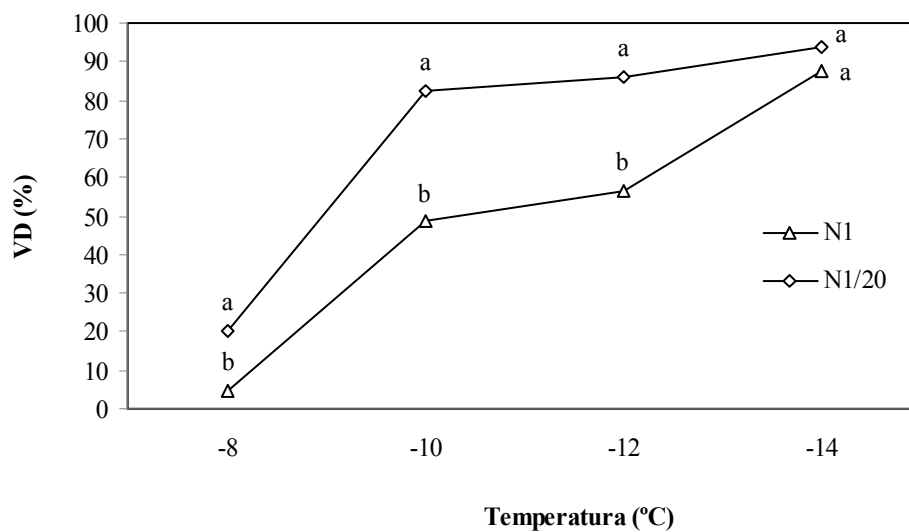
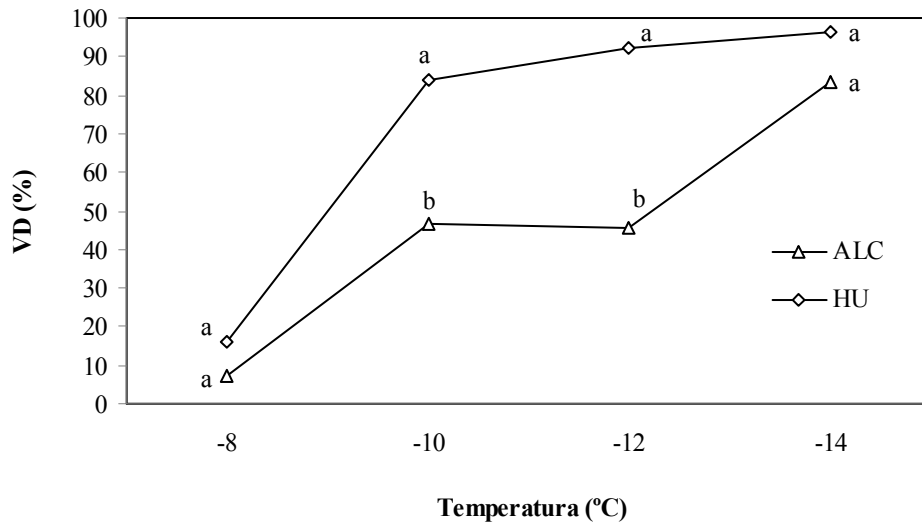


Figura 2: Daño visual (VD) en función de las diferentes regiones de procedencia (ALC y HU) y la temperatura de ensayo. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las regiones de procedencia para cada temperatura ensayada.



Los datos de la capacidad de crecimiento radical mostraron que las plantas tratadas con dosis N_1 tuvieron significativamente más raíces nuevas que las plantas tratadas con $N_{1/20}$ ($p < 0,05$) una vez finalizó el ensayo de RGC. Los valores de las variables estudiadas en función de la dosis de N fueron: 59,8 mg ThRW (N_1), 20,8 mg ThRW ($N_{1/20}$), 7,6 mg FRW (N_1) y 4,2 mg FRW ($N_{1/20}$). No se encontraron diferencias significativas en función de la dosis de K, la región de procedencia o las interacciones entre factores para los parámetros estudiados.

4.5 - DISCUSIÓN

La fertilización otoñal nitrogenada ha resultado ser una herramienta efectiva en el incremento otoñal de los parámetros morfológicos H , D , $ShDW$ y RDW . Los valores obtenidos de estos parámetros fueron de alrededor del 20 % mayores en la dosis N_I respecto a la dosis $N_{I/20}$, al final del periodo de crecimiento en vivero de las plantas de encina. Los mayores valores de H , D , $ShDW$ y $SRDW$ estuvieron en concordancia con estudios previos (Broncano et al., 1998; Villar-Salvador et al., 2004a). Sin embargo, algunos estudios (Oliet et al., 2009a; Villar-Salvador et al., 2004a), como comentamos en el capítulo anterior, no encontraron un aumento en el crecimiento de raíces por la fertilización con N. Este aumento en el crecimiento radicular también ha sido encontrado en el capítulo 1 de este estudio por lo que daría consistencia a la hipótesis de que esta diferencia podría ser explicada porque la fertilización en nuestros ensayos se extendió hasta mediados de diciembre, mientras que en los estudios citados la fertilización concluyó a principios de otoño o por el efecto de la temperatura ambiente, algo más cálida en nuestro vivero de Huelva.

La región de procedencia resultó significativa para el diámetro de las plantas y para $SRDW$, presentando las plantas de ALC valores mayores de diámetro y menores de $SRDW$ que las de HU . Respecto a las diferencias entre procedencias en caracteres morfológicos, algunos estudios han mostrado que en plantas de *Quercus ilex* parámetros morfológicos como el tamaño de la planta estaría relacionada con las condiciones climáticas de la región de procedencia (Gratani et al., 2003). Ello es debido en parte a que las bellotas de procedencias donde las condiciones climáticas (sequía, bajas temperaturas) no suponen un excesivo estrés para los árboles son mayores en tamaño que aquellas procedentes de zonas muy frías o con una sequía estival acusada (Gimeno et al., 2009). En nuestro estudio las plantas de la procedencia más fría mostraron valores mayores de diámetro, mientras que el peso seco total de la

planta fue similar en ambas procedencias. Es pues necesaria la realización de nuevos estudios tomando en consideración un mayor número de procedencias con un amplio rango climático para esclarecer el efecto que la procedencia pueda tener sobre parámetros morfológicos.

La fertilización con N fue el principal factor que afectó tanto a las concentraciones como al contenido en nutrientes de las plantas: mayor suplemento otoñal de N incrementó significativamente ambos. Recordamos de nuevo que Oliet et al. (2009a) encontraron mayores concentraciones de N, P, y K en plantas fertilizadas que en plantas no fertilizadas, pero no encontraron un efecto entre las diferentes dosis de N dentro de las fertilizadas, para las concentraciones ensayadas, incluso siendo las diferencias entre dosis de N aplicadas mayores que las presentes en este estudio. Sin embargo, al igual que en nuestros ensayos, sí encontraron diferentes contenidos en nutrientes en función de la dosis de N aplicada, de modo que las plantas más fertilizadas tuvieron mayores contenidos en N, P y K, principalmente debido a un incremento en la biomasa de las plantas fertilizadas.

Sí se obtuvieron diferencias entre procedencias en la concentración de P y los contenidos foliares de N y K. Las plantas de la procedencia *ALC* mostraron concentraciones mayores de P que las de *HU*, aunque esta diferencia no se tradujo en un mayor contenido en este nutriente debido a la mayor biomasa en hojas de las plantas de la procedencia *HU*. Este hecho, unido a un ligero incremento, aunque no significativo, en la concentración de N y K en las hojas de las plantas de la procedencia *HU* supuso que las plantas de esta procedencia tuvieran mayores contenidos de estos nutrientes. Las interacciones entre fertilización y procedencia muestran que en el caso de las plantas de *ALC* la concentración y el contenido de P en las hojas aumentaron considerablemente al aplicar altas dosis de N; por su parte las plantas de *HU* aumentaron su contenido en K cuando recibieron altas dosis de este nutriente.

Estos datos sugieren una diferencia de comportamiento en la acumulación de nutrientes entre diferentes regiones de procedencia sobre todo en el caso de P y K. El fósforo es un importante constituyente de los fosfolípidos que forman parte y dan estabilidad a las membranas celulares (Marshner, 1995), siendo estas membranas celulares el primer lugar donde se produce el daño inducido por heladas (Heino y Palva, 2003; Kaminska-Rozek y Pukacki, 2005; Pukacki et al., 1991). El endurecimiento frente a este estrés está asociado a la fluidez de la membrana y la transición de temperatura entre la fase sólida y gel (Levitt, 1980) que están relacionados con los ratios entre fosfolípidos saturados e insaturados, fosfolípidos y proteínas y fosfolípidos y esteroides (Kalberer et al., 2007; Livonen et al., 2004; Yoshida, 1986). El potasio juega un importante papel en el control de la apertura de los estomas y el ajuste osmótico intracelular (del Campo et al., 2010; Hsiao y Läuchli, 1986), siendo las plantas que poseen un adecuado estado nutricional en K menos susceptibles a episodios de sequía (Lindhauer, 1985).

El análisis de carbohidratos indicó que, a pesar del mayor crecimiento de las plantas *N_I*, las concentraciones y contenido de NSC no presentaron diferencias entre las distintas dosis de fertilización aplicadas. La aplicación de fertilizante evitó el efecto dilución en la concentración de NSC en las hojas de las plantas a pesar de que la demanda de carbohidratos para su crecimiento y mantenimiento sería mayor en las plantas más grandes (Fernández et al., 2008; Palacio et al., 2008; Sanz-Perez et al., 2007). El análisis de los datos de NSC en función de la procedencia mostró que las plantas de la procedencia *HU* tuvieron mayores contenidos de SS que las de la procedencia *ALC*, siendo esta diferencia debida a la combinación de una mayor biomasa foliar con una ligera mayor concentración de azúcares ($p = 0,122$) en las plantas de *HU*. Estos datos podrían reflejar también un diferente comportamiento entre procedencias en la respuesta a la acumulación y/o asimilación de estos azúcares.

Estudios previos en otras especies (Fernández et al., 2007, 2008), así como los datos presentados para encina en el capítulo 1, han mostrado que la medición de VD de las hojas es un método eficaz para evaluar los daños que presenta la planta después de someterse a una helada. Aunque existe cierta discrepancia en cuanto al efecto que la fertilización con N puede tener sobre la tolerancia a heladas (literatura citada en Fernández, 2008 y Vilagrosa et al., 2006), nuestros datos muestran que la fertilización otoñal con N mejoró sustancialmente la capacidad de tolerancia al frío de plantas de encina cultivadas en vivero. Diversos estudios demuestran un efecto positivo de la concentración de SS en la tolerancia al frío en varias especies de *Quercus* (Fernández et al., 2008; Mollá et al., 2006; Morin et al., 2007). Sin embargo nuestros datos muestran unas concentraciones y contenidos similares de SS entre distintas dosis de nitrógeno, aunque la aplicación de N mejoró la tolerancia al frío de las plantas. Como ha quedado de manifiesto en el anterior capítulo la acumulación de SS no es el único aspecto que puede prevenir el daño por heladas, existiendo otras moléculas y solutos que pueden tener un papel importante en la tolerancia al frío (Larcher, 2000; Zwiazek et al., 2001). Como componente de estos solutos podría encontrarse K, cuyo contenido está inversamente relacionado con el daño por heladas, o P, el cual forma parte de los fosfolípidos que confieren estabilidad a las membranas celulares (Marschner, 1995), que son las primeras estructuras dañadas por agentes ambientales estresantes como las bajas temperaturas (Eltner, 1982). Tanto K como P han presentado mayores contenidos en las plantas N_l cuya tolerancia al frío también fue mayor.

La región de procedencia ha resultado ser un factor significativo en la tolerancia de las plantas a las heladas en las temperaturas intermedias ensayadas (-10 y -12° C) donde estas plantas se han encontrado al límite de su capacidad de tolerancia. Las plantas de la procedencia más fría (*ALC*) han

sostenido valores de VD en torno al 40%, mientras que las plantas procedentes de una procedencia más cálida han presentado valores en torno al 80-90%, es decir apreciándose necrosis casi completa de los tejidos foliares. Nuestros datos parecen indicar una adaptación a las condiciones climatológicas predominantes en la región de procedencia de las semillas. La protección frente a heladas se logra a través de una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos dependiente de la expresión de los genes sensibles a bajas temperaturas (Novillo et al., 2004; Suping et al., 2005). Las adaptaciones fisiológicas entre procedencias han sido estudiadas para otras especies: *Pinus taeda* (Bongarten y Teskey, 1986), *Picea abies* (Oleksyn et al., 1998), *Pinus sylvestris* (Palmroth et al., 1999), *Fagus sylvatica* (Peuke et al., 2002) pero para especies de frondosas esclerófilas mediterráneas la literatura es escasa y algo contradictoria. Algunos estudios en *Quercus ilex* (Gratani et al., 2003; Sánchez-Vilas y Retuerto, 2007) y en *Quercus suber* (Ramirez-Valiente et al., 2009) han encontrado una adaptación de plantas de procedencia xéricas a la sequía, mientras que para la tolerancia al frío se ha demostrado que las plantas procedentes de regiones frías muestran un mejor comportamiento frente a heladas en distintas especies de *Quercus* (Aranda et al., 2005; Morin et al., 2007). Por el contrario Gimeno et al. (2009) concluyeron que las respuestas fisiológicas a la sequía y a las heladas dependían más de la aclimatación a condiciones de estrés que de la adaptación propia de las plantas a las condiciones de su región de procedencia. Las diferencias encontradas entre nuestro estudio y el de Gimeno et al. (2009), donde no se obtienen diferencias en la tolerancia al frío entre procedencias, pudieran ser debidas a una distinta exposición a temperaturas bajas. La aclimatación al frío por la exposición a temperaturas subóptimas (dependiendo de la especie) es un mecanismo conocido (Thomashow, 1999). El periodo de tiempo en el que se cultivaron las plantas en nuestro vivero fue excepcionalmente cálido, el número de horas acumuladas durante el cultivo en el que la temperatura bajó de 8° C fue de solo 239 h, por lo que la aclimatación

de las plantas fue menor que en un vivero de condiciones más frías. No obstante existen evidencias de un importante grado de heterogeneidad en la constitución genética de las distintas regiones de procedencia de encina que explicaría variaciones en atributos funcionales y estructurales entre poblaciones (Sánchez-Vilas y Retuerto, 2007). El mayor contenido en SS, N y K de las plantas de la procedencia *HU* con respecto a las de la procedencia *ALC* no se tradujo en una mayor tolerancia al frío. La tolerancia a las heladas involucra muchos procesos fisiológicos y moleculares (Larcher, 2000) como la acumulación de azúcares, la síntesis de proteínas protectoras o el aumento de la transcripción de mRNA (Novillo et al., 2004; Suping et al., 2005). Es necesario pues esclarecer la relación entre la tolerancia al frío, determinados procesos fisiológicos y la composición de diversos compuestos orgánicos. Una medida con mayor periodicidad de la tolerancia al frío, el análisis de SS desde finales de verano hasta el otoño y durante el invierno (Colombo et al., 2003) y el estudio de más regiones de procedencia cultivadas en diferentes condiciones climáticas, ayudaría a comprender el proceso de endurecimiento al frío en esta especie.

RGC está considerada como una medida del vigor de las plantas y proporciona una buena evaluación de la eficiencia fotosintética y de la cantidad de carbohidratos almacenados (Ritchie, 1985). En nuestro caso la fertilización con N (N_I) incrementó RGC y el crecimiento de la planta. RGC está frecuentemente correlacionado con la tolerancia al frío (Simpson y Ritchie, 1996). Nuestro estudio está en concordancia con Mollá et al. (2006) ya que encontramos que la fertilización con N (N_I) incrementó RGC y la tolerancia al frío. No se ha encontrado ningún efecto de la procedencia en la capacidad de regeneración radical.

4.6 - CONCLUSIONES

La fertilización otoñal con nitrógeno, en dosis de 100 mg de N por planta, ha demostrado ser una herramienta útil para modificar la morfología de la encina en vivero. Además el aumento del tamaño de la planta está acompañado con un aumento tanto de las concentraciones y contenidos de N-P-K y de una mejora de aspectos fisiológicos como la tolerancia al frío o la capacidad de regeneración radicular.

Nuestros datos sugieren una diferente asimilación y/o acumulación de nutrientes entre distintas regiones de procedencia de la semilla. Esto es especialmente cierto para N, K y SS. Aspectos fisiológicos como la tolerancia al frío parecen depender de aspectos genéticos relacionados con la adaptación de las plantas a las condiciones climáticas de sus regiones de procedencia, aunque un estudio más detallado y con mayor número de procedencias y condiciones de cultivo es necesario para establecer el efecto de la plasticidad intra e inter poblacional en éste y otros aspectos fisiológicos.

Capítulo 3: Efecto de la fertilización otoñal nitrogenada sobre el estado nutricional y la resistencia a estreses abióticos de plantas de encina.



5 - Efecto de la fertilización otoñal nitrogenada sobre el estado nutricional y la resistencia a estreses abióticos de plantas de encina.

5.1 - RESUMEN

La encina (*Quercus ilex* ssp. *ballota* [Desf.] Samp) es una de las especies más importante en las comunidades forestales del oeste de la cuenca mediterránea, siendo un árbol muy vulnerable a condiciones ambientales de estrés durante sus primeros años de vida. Las principales condiciones de estrés son la sequía estival y las heladas invernales. En este sentido la fertilización otoñal con nitrógeno es una herramienta útil para la mejora de la calidad de las plantas en vivero y su posterior éxito postransplante. La aplicación de 30 y 60 mg N durante 12 semanas de fertilización otoñal (incluidas respectivamente en tratamientos de aplicación total de 100 y 130 mg N durante las 40 semanas de cultivo en vivero), mejoraron el crecimiento, la capacidad de crecimiento de raíces, la tolerancia al frío y el estado nutricional de las plantas, respecto a las dosis reducidas (0 y 1,5 mg N de aplicación otoñal), además de no afectar negativamente a la respuesta de las plantas ante situaciones de estrés hídrico. La aplicación otoñal de distintas dosis de N mostró que algunos parámetros morfológicos, como el diámetro del tallo (*D*) y el peso de la parte aérea (ShDW), son susceptibles de ser modificados mediante pequeños incrementos en el aporte de N durante el cultivo. La mayor dosis de N aplicada (60 mg N otoñales) supuso un aumento del contenido de nutrientes en las hojas, sin producirse una disminución en sus concentraciones por un efecto de dilución, pero se apreció una tendencia hacia menor tolerancia al frío respecto de la dosis de 30 mg N. .

Palabras clave: encina; estrés hídrico; fisiología; tolerancia al frío; estrés oxidativo.

5.2 - INTRODUCCIÓN

La encina (*Quercus ilex* ssp. *ballota*) es una de las especies más importantes en las comunidades forestales del oeste de la cuenca mediterránea (Palacios et al., 2009). El uso de esta especie esclerófila y de hoja perenne para repoblación ha aumentado considerablemente en los últimos diez años (MAPA, 2006). Sin embargo, esta especie muestra un pobre establecimiento en campo en comparación con otras especies mediterráneas, particularmente en lugares con condiciones climáticas no favorables (Pausas et al., 2004). Uno de los aspectos a los que es atribuido este escaso éxito de las repoblaciones es a la baja calidad de la planta producida en vivero (del Campo et al., 2010).

La encina es un árbol muy vulnerable a condiciones ambientales de estrés durante sus primeros años de vida (Navarro-Cerrillo et al., 2005). El clima mediterráneo está caracterizado por una pronunciada estacionalidad e imprevisibilidad de las lluvias y de las temperaturas extremas (Oliveira y Peñuelas, 2004; Valladares et al., 2002a, 2002b), siendo la sequía y las heladas los principales factores limitantes de la distribución, abundancia, supervivencia y crecimiento de esta especie (Larcher, 2000). Condiciones de estrés como la sequía, las heladas o el exceso o déficit de nutrientes puede conducir a la formación de especies reactivas del oxígeno (EROs) provocando situaciones de estrés oxidativo (Mittler, 2002). El estrés oxidativo puede provocar daños a las membranas, a las proteínas y en los casos más severos al ADN, por lo que la planta presenta diferentes mecanismos para defenderse de éste (Márquez-

Gracia, 2009). En general estos mecanismos se basan en tres tipos: i) la presencia de agentes reductores, como el ácido ascórbico, el glutatión, el tocoferol o la coenzima Q entre otros (Blokhina et al, 2003); ii) la actividad de sistemas enzimáticos que catalicen la eliminación de EROs (Clijster et al, 1999); y iii) el mantenimiento de un estado redox adecuado en la célula (Clijster et al, 1999).

La manipulación de la disponibilidad de nutrientes en vivero puede modificar las características morfo-fisiológicas de las plantas producidas (Puttonen, 1997), aunque la respuesta posterior en campo sigue siendo incierta para especies del género *Quercus* (Broncano et al., 1998; Oliet et al., 2009a; Trubat et al., 2010; Villar-Salvador et al., 2004a, 2005). El aporte de nitrógeno puede mejorar aspectos como la tasa fotosintética, el crecimiento radical y la eficiencia en el uso del agua (Fernández et al., 2006; Lambers et al., 1990). Además, teniendo en cuenta los datos proporcionados en el capítulo 1 y 2, de los tres macronutrientes ensayados (N, P y K) el nitrógeno ha sido el nutriente que más efecto produjo sobre los parámetros estudiados, como por ejemplo la tolerancia a las heladas.

Los objetivos de este capítulo son: **(i)** estudiar el efecto de distintas dosis de N aportados durante la fertilización otoñal en las características morfológicas y nutricionales de las plantas cultivadas; y **(ii)** caracterizar el efecto de las distintas dosis de N sobre los principales factores de estrés en las plantas: sequía y heladas.

5.3 - MATERIAL Y MÉTODOS

5.3.1 - Material vegetal y condiciones de cultivo

Durante el otoño de 2008 se recolectaron bellotas de la región de procedencia La Alcarria y Serranía de Cuenca (39°25' - 41°20' N, 1°40' - 3°15' W). Posteriormente, a principios de 2009, 600 bellotas fueron pregerminadas sobre perlita húmeda en una cámara de cultivo a 20 °C con el fin de mejorar la uniformidad de la germinación. En la tercera semana de febrero, se plantaron 360 bellotas escogidas al azar de entre todas las que habían pregerminado satisfactoriamente. Las bellotas fueron distribuidas aleatoriamente en 8 bandejas de contenedores Plasnor® de 300 cm³ (1 bandeja contiene 45 contenedores), usando como sustrato turba rubia Kekkilä® B0 (con el pH corregido a 6,0 usando Dolokal®). Las plantas crecieron en vivero bajo una malla que reducía la radiación un 50%. Todas las bandejas estuvieron bien regadas y fueron movidas y rotadas semanalmente durante todo el periodo de crecimiento para evitar un posible efecto de la posición de las bandejas en el crecimiento de las plantas.

Durante las primeras 28 semanas, se aplicó un régimen de fertilización constante usando el fertilizante soluble en agua Peters professional® 20-20-20 en una solución de 125 ppm N, 54 ppm P y 104 ppm K, con cada planta recibiendo semanalmente una dosis de 2,500 mg N (composición del fertilizante de 3,94% nitrógeno amoniacal, 6,05% nitrógeno nítrico, 10,01% nitrógeno en forma de urea), 1,088 mg P y 2,075 mg K (fosfato monoamónico, fosfato monopotásico y nitrato potásico). Esta dosis de aplicación supuso 70,0 mg N, 30,5 mg P, y 58,1 mg K durante un periodo de 28 semanas. Cada planta recibió el fertilizante disuelto en agua destilada en una sola aplicación con una periodicidad semanal. Entre dos fertilizaciones consecutivas las plantas fueron regadas con agua del grifo según necesidad, procurando evitar un exceso de

lavado por lixiviación en el agua de riego. Al final de las primeras 28 semanas, los parámetros morfológicos y nutricionales fueron: altura ($9,37 \pm 0,74$ cm), diámetro del tallo ($2,51 \pm 0,11$ cm), peso seco de la parte aérea ($1,21 \pm 0,09$ g), peso seco de la raíz ($2,53 \pm 0,34$ g), ratio parte aérea raíz ($0,59 \pm 0,03$) y concentraciones minerales de 1,01 %N, 0,09 %P, 0,61 %K en hojas. Posteriormente se tomaron al azar 270 plantas sanas y se distribuyeron aleatoriamente en 6 bandejas (45 plantas en cada bandeja). En las siguientes 12 semanas (desde la primera semana de octubre a la tercera semana de diciembre), durante la fase de endurecimiento otoñal, las dosis de N fueron modificadas ensayándose 4 dosis distintas (N_0 , $N_{1/20}$, N_1 y N_2) dejándose la dosis de P y K constantes (iguales a las primeras 28 semanas y coincidentes con las denominadas P_1 y K_1 en el capítulo 1 y 2). Por lo tanto se ensayaron 4 tratamientos de fertilización distintos (Tab. 1), cada uno aplicado a media bandeja, utilizando 67-68 plantas por tratamiento. Desde principios de noviembre en adelante las plantas no mostraron signos visuales de crecimiento del tallo. Como apuntábamos en los capítulos anteriores, las dosis de nutrientes N_1 , P_1 , y K_1 están dentro del rango de aplicación recomendadas para encinas durante la fase de crecimiento en viveros (Navarro-Cerrillo et al., 2009). La dosis $N_{1/20}$ fue aplicada para evitar una total privación de nutrientes (Boivin et al., 2002) pero aplicando unas dosis significativamente menor a N_1 , mientras que la privación total de N durante el otoño se ensayó con la dosis N_0 . La dosis N_2 se utilizó para aplicar una dosis otoñal sensiblemente mayor a N_1 pero dentro del rango recomendado para esta especie (Jacobs et al., 2009).

Tabla 1: Cantidades totales de N, P y K aplicadas a cada planta durante las 12 semanas que duró la fase de endurecimiento otoñal en este estudio y durante el periodo de crecimiento completo.

Tratamiento			mg últimas 12 semanas		
			N	P	K
N_0	P_1	K_1	0,0	13,1	24,9
$N_{1/20}$	P_1	K_1	1,5	13,1	24,9
N_1	P_1	K_1	30,0	13,1	24,9
N_2	P_1	K_1	60,0	13,1	24,9

5.3.2 - Estado morfológico y nutricional al final del cultivo en vivero

Una vez finalizado el cultivo (finales de diciembre de 2009), se seleccionaron al azar 6 plantas por tratamiento de fertilización con el fin de evaluar el estado morfológico y nutricional de las mismas. Se separaron hojas, raíces y tallo, midiendo previamente la altura y el diámetro de la planta, se limpiaron con agua destilada y se secaron en estufa a 65° C. Una vez que no se apreció reducción en el peso de las muestras, se evaluó el peso seco de hojas (LDW), de tallos (StDW) y de raíces (RDW), también se calculó el peso seco de la parte aérea (ShDW = LDW + StDW) y la ratio parte aérea raíz (SRDW = ShDW/RDW).

Para obtener una cantidad suficiente de muestra de hojas para el análisis de nutrientes, se formaron tres grupos de muestras por tratamiento (dos plantas en cada grupo) que posteriormente fueron molidas (diámetro de rejilla 0,8 mm). Los análisis de N se realizaron directamente sobre el material molido mediante un analizador elemental (Termo Finnigan 1112 Series EA, Milan, Italy), mientras que para los análisis de P y K las muestras molidas fueron sometidas a 550° C durante 7 horas, seguido de una digestión ácida en HCl 5M, para posteriormente ser analizadas con un ICP-OES (Jobin Yvon Ultima 2,

Tokio, Japan). También se determinaron en hojas los carbohidratos no estructurales (NSC), la determinación de los azúcares solubles (SS) se realizó mediante una extracción hidroalcohólica seguida de una colorimetría con antrona (Spiro, 1966) (usando un espectrofotómetro; UV-1601, Shimadzu ®, Tokyo, Japan), mientras que el almidón (St) se determinó mediante una hidrólisis ácida seguida de una colorimetría con antrona (Rose et al., 1991). Los contenidos en nutrientes y NSC (expresados en mg) fueron calculados multiplicando la concentración (%) por el peso seco (g). Todos los nutrientes y los NSC fueron determinados en las mismas muestras.

5.3.3 - Tolerancia al frío

La evaluación de la tolerancia al frío se realizó mediante dos métodos, en primer lugar se usaron los ensayos de hoja suelta, tal y como fue descrito para *Eucalyptus globulus* L (Fernández et al., 2007) y además se evaluó el estrés oxidativo producido por la exposición a heladas en plantas enteras. Para la simulación de los ciclos de frío en ambos ensayos se usó un congelador doméstico con un programador de temperaturas (West ® 4400; ISE Inc., Cleveland, OH), el congelador contaba con dos ventiladores internos que distribuían el aire en el interior de una forma uniforme. El ensayo comenzaba a 12 °C y la temperatura iba descendiendo a razón de 3 °C/h hasta la mínima temperatura evaluada. La temperatura mínima era mantenida durante 3 horas y posteriormente se iba elevando la temperatura hasta los 12 °C, a razón de 5° C/h, un ciclo completo solía durar entre 14 y 16 horas.

Los ensayos de hoja suelta se realizaron siguiendo la misma metodología de los capítulos anteriores, las hojas seleccionadas fueron insertadas en tubos de ensayo (2,2 cm de diámetro y 15 cm de longitud), y llevadas al congelador, una vez terminado el ciclo de temperatura, los tubos de ensayo eran sacados del congelador y se les añadía a cada tubo agua destilada

($\leq 2 \text{ cm}^3$) hasta cubrir el corto peciolo. Las muestras se mantenía en una cámara de cultivo (25 °C día/17 °C noche; fotoperiodo de 12 h ; $\geq 70\%$ de humedad relativa y $350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de flujo de fotones fotosintéticos). El daño a las hojas fue visualmente evaluado mediante la estimación del porcentaje de la hoja que sufrió un daño visualmente apreciable (VD) a 4, 24, 48 y 96 horas después de la finalización del ensayo de frío. VD fue estimado como el porcentaje de superficie foliar que sufre lisis celular (reconocida como un particular oscurecimiento y/o amarronamiento de la hoja) después del ensayo. Los ensayos se llevaron a cabo en la tercera semana de diciembre de 2009 y se utilizaron dos hojas completamente desarrolladas (una de la parte media-alta del tallo y otra de la parte medio-baja del mismo) por planta y temperatura de ensayo, utilizando 4 plantas por tratamiento y procedencia en cada ensayo. Las temperaturas mínimas evaluadas fueron -8 °C, -10 °C, -12 °C y -14 °C. El número de horas de frío ($\leq 8 \text{ °C}$) acumuladas por las plantas en el vivero fue de 239 h.

A finales de enero de 2010 se seleccionaron al azar otras 6 plantas por tratamiento (tratamientos $N_0, N_{1/20}, N_1$) para la evaluación del estrés oxidativo provocado por heladas. En este caso, el tratamiento N_2 no fue ensayado en base a los datos obtenidos en el ensayo previo de diciembre, con hojas sueltas. El número de horas de frío ($\leq 8 \text{ °C}$) acumuladas por las plantas en el vivero en esta fecha fue de 493 h. De las 18 plantas seleccionadas 12 de ellas (4 por tratamiento) fueron sometidas a un ciclo de helada hasta la temperatura mínima de -12 °C, mientras que las otras 6 plantas (2 por tratamiento) no fueron sometidas a dicha helada, por lo que se tomaron como controles manteniéndolas en cámara de cultivo (bajo las mismas condiciones que en los ensayos de hoja suelta). Las plantas se introdujeron en una bandeja de plástico Plasnor® de 300 cm^3 y a su vez en una caja de cartón rellena de granos de poliestireno con el fin de aislar las raíces para evitar su congelación. Una vez

finalizado el ciclo de helada, las plantas fueron mantenidas en la cámara de cultivo, junto a las controles, durante 24 horas tras las cuales se procedió al muestreo de las 18 plantas. Las hojas fueron cortadas, se les eliminó el nervio central e inmediatamente fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C hasta la realización de los análisis pertinentes. Los parámetros analizados para caracterizar el estrés oxidativo producido por la helada fueron: peroxidación lipídica (MDA), ácido ascórbico total (AsA) y actividad antioxidante total (AAT).

La peroxidación lipídica fue estimada como la cantidad de malondialdehído (MDA) usando el método descrito por Hodges et al. (1999). Para ello, las hojas congeladas fueron homogenizadas en un mortero junto a nitrógeno líquido y etanol 80%, el extracto resultante fue centrifugado a 4 °C y 3000 G durante 10 min. Posteriormente se mezcló 1 cm³ de sobrenadante con 1 cm³ de la solución *a*), denominada -TBA y compuesta por 20% de ácido tricloroacético y 0,01% de hidroxitolueno butilado; y 1 cm³ del sobrenadante con la solución *b*), denominada +TBA y que contenía lo mismo que la solución *a*) más 0,65% de ácido tiobarbitúrico (TBA). Las muestras se mezclaron y calentaron a 95 °C durante 25 min, posteriormente se enfriaron y se volvieron a centrifugar en frío a 3000 G durante 10 min. Finalmente se midió la absorbancia a 440 nm (Abs440), 532 nm (Abs532) y 600 nm (Abs600), usando un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 800, y se calculó la concentración de MDA equiv (nmol·ml⁻¹) como:

$$[MDA] = 10^3 \cdot [(A - B) / 157]$$

Siendo:

$$A = (Abs532_{+TBA} - Abs600_{+TBA}) - (Abs532_{-TBA} - Abs600_{-TBA})$$

$$B = 0,0571 \cdot (Abs440_{+TBA} - Abs600_{+TBA})$$

El ácido ascórbico total se cuantificó por el método del biperidilo (Knörzer et al., 1996) tal y como se describe a continuación. Las hojas congeladas fueron homogenizadas en un mortero junto a nitrógeno líquido y 1 cm³ de una disolución de ácido metafosfórico al 5%. Posteriormente la mezcla se centrifugó a 4 °C y 10.000 G durante 30 min y se extrajo el sobrenadante. 20 mm³ de cada sobrenadante fueron mezclados con 105 mm³ de ácido metafosfórico al 5%, neutralizados con 25 mm³ de 1,5 M trietanolamina, posteriormente se le añadió 150 mm³ del tampón 150 mM fosfato sódico y 75 mm³ de 10 mM ditioneitol (DTT) y se incubaron las muestras durante 15 min en oscuridad y a temperatura ambiente. De esta forma se obtuvo la cantidad total de ácido ascórbico, suma de oxidado (DHA) y reducido (ASC). No obstante, para obtener la cantidad de cada forma por separado, se añadieron 75 mm³ de N-etilmaleimida (NEM) al 0,5 % para detener la reacción y a continuación 300 mm³ de ácido tricloroacético (TCA) al 10 %, 300 mm³ de ácido ortofosfórico al 44 %, 300 mm³ de biperidina al 4 % disuelto en etanol al 70 % y 150 mm³ de cloruro de hierro (III) al 3%. Para la medida de las formas reducidas del ácido ascórbico se añadieron 150 mm³ de agua desionizada, en vez de DTT, y NEM continuando el resto del protocolo tal como se describe arriba. Las muestras se incubaron durante 1 h a 37 °C y se midió la absorbancia a 525 nm. Las formas oxidadas del ácido ascórbico (DHA) se obtuvieron restando las formas reducidas a la concentración total.

La actividad antioxidante total (AAT) fue calculada siguiendo el método del 1,1-difenil-2-picril-hidracil (DPPH) descrito por Brand-Williams (1995), con algunas modificaciones (Leong and Shui, 2002; Wong et al., 2006). Para ello, las hojas congeladas fueron homogenizadas en un mortero junto a nitrógeno líquido y metanol al 30%. Posteriormente, y para cada muestra, se mezclaron 40 mm³ del sobrenadante y 3 cm³ de 0,1 mM DPPH disuelto en metanol al 30 %. Se homogeneizó la muestra y se dejó reposar 30

min antes de medir su absorbancia a 515 nm. La recta de calibrado se realizó con distintas concentraciones de trolox por lo que la actividad antioxidante está expresada en μ moles de trolox equivalentes (TE) por mg de peso seco de hoja.

5.3.4 - Capacidad de regeneración radicular y resistencia a la sequía

La capacidad de crecimiento de raíces (RGC) fue evaluada en diciembre usando 6 plantas por tratamiento. Las plantas fueron cuidadosamente sacadas de sus contenedores sin dañar el cepellón y transplantadas a contenedores forestales de 2,5 L rellenando el volumen sobrante con perlita húmeda. Previamente al trasplante se cortaron todas aquellas raíces blancas que sobresalían del cepellón. Las macetas fueron aleatoriamente distribuidas en una mesa calefactora (20 °C) en el interior de un invernadero durante un periodo de 4 semanas. Las plantas fueron regadas cada 2-3 días y no fueron fertilizadas en ningún momento. Una vez finalizadas las 4 semanas (finales de enero), las plantas fueron cuidadosamente sacadas de los contenedores, limpiadas de perlita y las nuevas raíces fueron cortadas del cepellón. Las raíces fueron clasificadas en raíces finas (raíces < 2 mm diámetro) y raíces gruesas (raíces > 2 mm diámetro), se secaron en estufa a 65° C hasta peso constante y se pesaron para obtener su peso seco (FRW y ThRW, respectivamente).

Para evaluar la resistencia al estrés hídrico se tomaron 8 plantas por tratamiento y se distribuyeron al azar entre dos cajas de poliestireno con un volumen de 50 L cada una. Las cajas fueron rellenas de una mezcla de perlita y vermiculita (1:1) siendo las plantas transplantadas el 30 de marzo de 2010. Posteriormente las cajas fueron situadas en el interior del invernadero donde permanecieron un mes sin regar. En el instante de su trasplante se caracterizó la altura y el número de hojas de cada una de las plantas utilizadas. A partir de la segunda semana (9 de abril) se comenzó a medir cada 2-4 días el potencial hídrico al amanecer de dichas plantas. Para su medición se utilizó una

cámara de presión (Modelo 1000; PMS Instruments, Corvallis, OR, USA) midiéndose en cada fecha una hoja de la parte central del tallo por planta.

5.3.5 - Análisis de datos

El efecto de la fertilización otoñal en la morfología y el estado nutricional de las plantas fue evaluado usando el siguiente modelo lineal general (GLM)

$$y_{ij} = \mu + N_i + e_{ij} \quad (1)$$

donde y_{ij} es el valor de la variable dependiente en la planta j fertilizada con la dosis i de N ($i = 1, 2, 3, 4$); μ es la media general; N es el efecto fijo de la fertilización nitrogenada y e es el término de error para la hipótesis $e_{ij} \sim N(0, \sigma_e^2)$. Cuando la variable dependiente era un porcentaje, se usó la transformación $\arcsen\sqrt{\text{var}(\%)/100}$. Las diferencias significativas entre los distintos efectos fueron evaluadas mediante el test de Tukey's HSD, con $\alpha = 0,05$. Para el análisis de datos de los ensayos de RGC se siguió el mismo GLM.

La influencia de la fertilización nitrogenada en el VD fue estimado mediante un modelo mixto:

$$y_{ijklm} = \mu + \alpha_j + t_k + h_l + N_m + th_{kl} + tN_{km} + thN_{klm} + e_{ijklm} \quad (2)$$

donde y_{ijklm} es el $\arcsen\sqrt{VD(\%)/100}$ de la hoja i de la planta j , evaluado a la temperatura k , medido después de l horas (24 h, 48 h, 72 h, 96 h), con la dosis m de N ($m = 1, 2, 3, 4$); α es el efecto aleatorio de la planta; t es el efecto fijo de la temperatura; h es el efecto fijo del tiempo que pasa hasta que se realiza la medición; N es el efecto fijo de la fertilización nitrogenada; y e es el término de error. Los otros términos describen las interacciones entre los efectos

principales. La estructura inicial de varianza-covarianza considera diferente la varianza entre observaciones a distintas temperaturas, y también que la covarianza entre observaciones de la misma hoja a diferentes tiempos de medición no es nula y es distinta para cada temperatura.

El efecto de la fertilización otoñal nitrogenada en los parámetros relacionados con el estrés oxidativo (MDA, AAT y AsA) fue evaluado usando el siguiente modelo lineal general (GLM)

$$y_{ijk} = \mu + N_i + T_j + NT_{ij} + e_{ijk} \quad (3)$$

donde y_{ijk} es el valor de la variable dependiente en la planta k fertilizada con la dosis i de N ($i = 1, 2, 3$) y pasada por el tratamiento de frío j ($j = 1, 2$); μ es la media general; N es el efecto fijo de la fertilización nitrogenada; T es el efecto fijo de haber pasado o no por el ciclo de helada y e es el término de error bajo hipótesis $e_{ijk} \sim N(0, \sigma_e^2)$. El término doble representa la interacción entre la dosis de N y el tratamiento de frío. Las diferencias significativas entre los distintos efectos fueron evaluadas mediante el test de Tukey's HSD, con $\alpha = 0,05$.

Los datos correspondientes al ensayo de resistencia a la sequía fueron analizados mediante el siguiente modelo mixto:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + H_i + m_i + F_j + N_k + FN_{jk} + e_{ijk} \quad (4)$$

donde y_{ijk} es el potencial hídrico de la planta i , evaluado en la fecha j , con la dosis k de N ($n = 1, 2, 3, 4$); α es el efecto aleatorio de la planta; H es el efecto de la covariable altura de la planta; m es el efecto de la covariable número de hojas de la planta; N es el efecto fijo de la fertilización nitrogenada; F es el efecto fijo de la fecha de medición; y e es el término de error. El término doble describe la interacción entre la dosis de nitrógeno y la fecha de

medición. Se ha considerado la posible existencia de correlación entre las observaciones dentro de una misma planta y la posible heterogeneidad de la varianza. Para ello se han analizado distintas estructuras de la matriz de varianzas-covarianzas asociadas a la planta que incluyen hipótesis de correlación entre observaciones dependiente de la separación entre fechas de medición y varianzas heterogéneas para las distintas fechas.

5.4 - RESULTADOS

5.4.1 - Morfología y estado nutricional de las plantas

La fertilización otoñal con nitrógeno tuvo un efecto significativo en todos los parámetros morfológicos estudiados a excepción de la ratio SRDW (Tab. 2), de modo que las plantas que recibieron dosis más altas de N (N_1 y N_2) presentaron valores mayores que las plantas que recibieron dosis más reducidas (N_0 y $N_{1/20}$). Sólo hubo diferencias significativas entre ambas dosis reducidas y ambas dosis altas para los parámetros D (N_0 y $N_{1/20}$) y ShDW (N_1 y N_2), siendo dichos parámetros mayores en las plantas que recibieron dosis mayores de N.

Tabla 2: Valores de los parámetros morfológicos de las plantas (en diciembre de 2009) en función de la dosis de N (N_0 , $N_{1/20}$, N_1 y N_2). Para cada parámetro, distintas letras en una misma fila significan diferencias significativas entre dosis de nitrógeno ($p < 0,05$).

	N_0	$N_{1/20}$	N_1	N_2
<i>H</i> (cm)	11,23 a	12,47 a	13,95 b	15,37 b
<i>D</i> (mm)	2,71 a	2,91 b	3,53 c	3,97 c
ShDW (g)	1,09 a	1,20 a	1,61 b	2,27 c
RDW (g)	2,53 a	2,71 a	3,73 b	4,85 b
SRDW	0,45 a	0,45 a	0,44 a	0,47 a

La tabla 3 muestra que la fertilización otoñal con N incrementó significativamente, en hojas, la concentración de N y P así como los contenidos de N, P y K, siendo mayores en las plantas fertilizadas con las dosis más altas de N (N_1 y N_2). No existieron diferencias significativas en ningún parámetro entre las dosis más reducidas, sin embargo los contenidos de todos los nutrientes fueron mayores en las plantas fertilizadas con dosis N_2 que en las que recibieron dosis N_1 .

Tabla 3: Valores de concentración y contenido en nutrientes en hojas de las plantas de *Quercus ilex* en diciembre de 2009 cultivadas con diferentes dosis de N (N_0 , $N_{1/20}$, N_1 y N_2). Para cada parámetro las letras diferentes en una misma fila muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre dosis de nitrógeno.

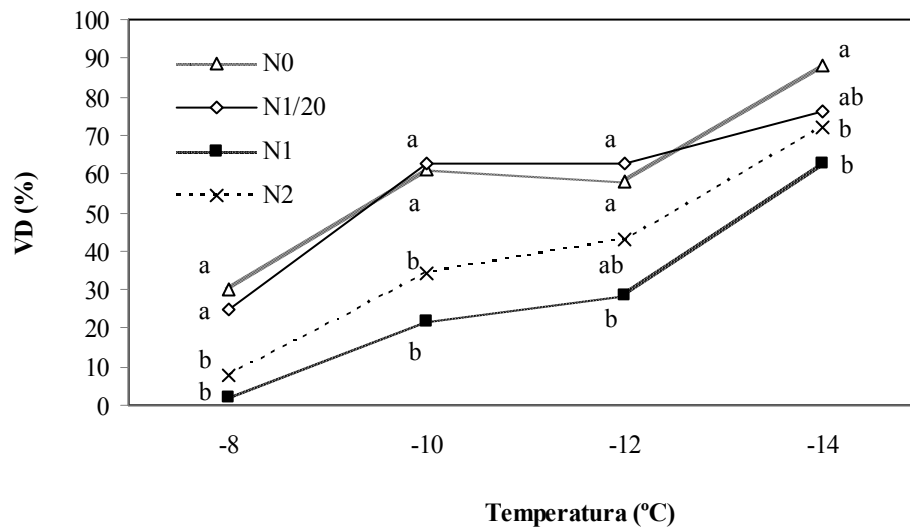
	N_0	$N_{1/20}$	N_1	N_2
[N] (%)	1,24 a	1,33 a	1,57 b	1,86 b
[P] (%)	0,15 a	0,15 a	0,17 b	0,17 b
[K] (%)	0,87 a	0,87 a	0,91 a	0,94 a
N cont (mg)	9,96 a	10,85 a	17,22 b	30,84 c
P cont (mg)	1,19 a	1,30 a	1,91 b	2,88 c
K cont (mg)	6,97 a	7,34 a	10,07 b	15,57 c

No hubo ningún efecto significativo de la fertilización nitrogenada en las concentraciones foliares de SS y St (4,45 % y 27,87 %, respectivamente) pero sí en sus contenidos en hojas. Las plantas que recibieron la dosis N_2 tuvieron significativamente más contenido en SS (72,03 vs 36,92 mg) y en St (512,60 vs 212,74 mg) que las plantas que recibieron las dosis N_0 y $N_{1/20}$, mientras que las plantas que recibieron la dosis N_1 se mantuvieron en valores intermedios.

5.4.2 - Tolerancia al frío

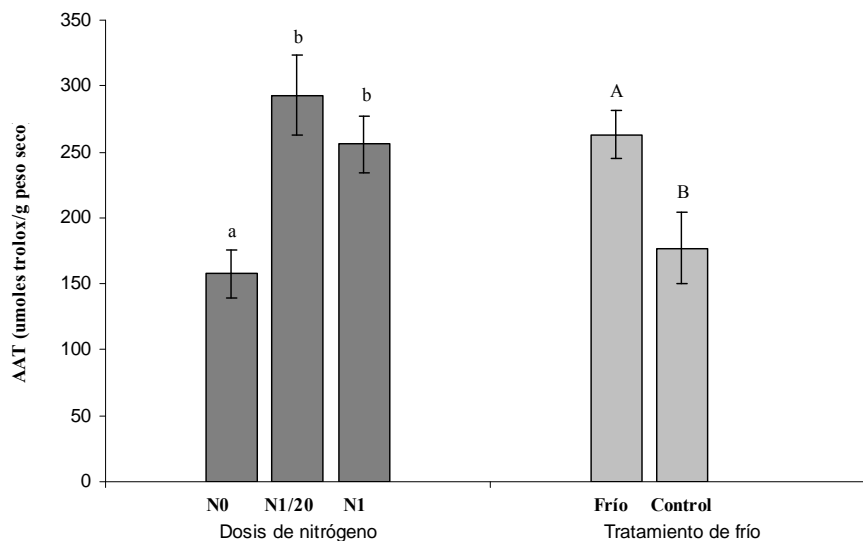
El análisis de los datos mostró diferencias significativas en VD entre todas las temperaturas estudiadas, excepto entre -10°C y -12°C , siendo los valores de VD mayores en los ensayos a menos temperatura. VD fue aumentando significativamente conforme aumentaba el tiempo de espera antes de la cada medición, tal y como se observó en el capítulo 2. La fertilización otoñal nitrogenada afectó a VD: las plantas que recibieron una dosis menor de fertilizante (N_0 y $N_{1/20}$) presentaron valores de VD significativamente mayores que las plantas que recibieron una dosis más alta (N_1 y N_2) para todas las temperaturas ensayadas, excepto para -12°C y -14°C , temperaturas a las cuales las dosis intermedias de nitrógeno presentaron ciertas similitudes (Fig. 1).

Figura 1: Daño visual (VD) en relación con las diferentes dosis de N aplicadas, para cada temperatura de ensayo. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre diferentes dosis de N para cada temperatura ensayada.



En general, los parámetros indicadores de estrés oxidativo mostraron pequeñas o nulas diferencias significativas entre dosis de nitrógeno, o entre los controles y las plantas sometidas a frío. Los valores medios de los parámetros fueron de 12,18 nmol MDA g⁻¹ (peso fresco) para la peroxidación lipídica; 129,58 μmol AsA g⁻¹ (peso fresco) de ácido ascórbico total; y 126,19 μmol AsA g⁻¹ (peso fresco) de ácido ascórbico reducido. Si embargo, sí hubo diferencias significativas para AAT (Fig 2) entre plantas controles y tratadas, las plantas sometidas al ciclo de frío presentaron valores de AAT mayores que aquellas usadas como controles. Además las plantas que recibieron la dosis N_0 presentaron valores de AAT significativamente menores que aquellas plantas fertilizadas con dosis $N_{1/20}$ y N_1 .

Figura 2: Valores en función de la dosis de N (N_0 , $N_{1/20}$ y N_1) y del tratamiento de frío (frío o control) de la actividad antioxidante total (AAT) expresados en μmoles de trolox equivalentes (TE) por g de peso seco de hoja. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre diferentes dosis de N (letras minúsculas) y entre tratamiento de frío (letras mayúsculas).



5.4.3 - Capacidad de regeneración radical y resistencia a la sequía

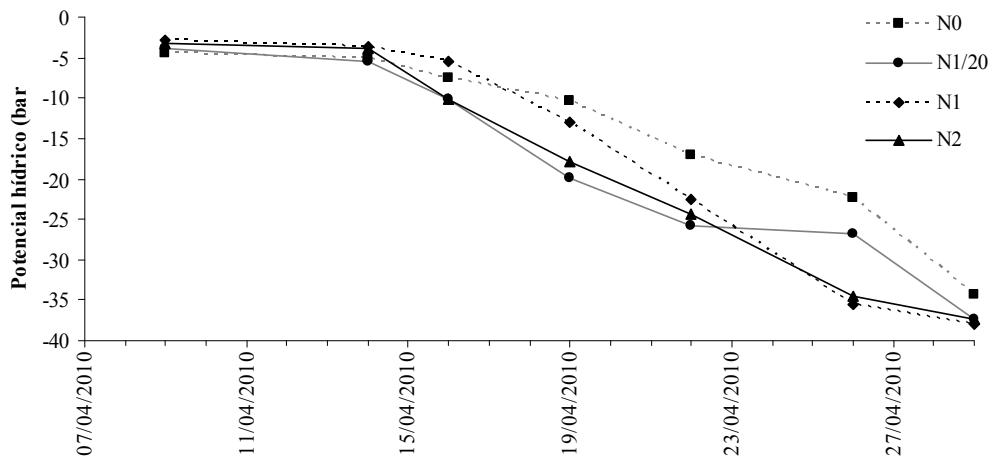
Los datos de la capacidad de crecimiento radical mostraron que las plantas tratadas con dosis N_1 y N_2 tuvieron, en total, significativamente más raíces nuevas que las plantas tratadas con N_0 y $N_{1/20}$ ($p < 0,05$) una vez finalizó el ensayo de RGC. No hubo diferencias significativas entre las dos dosis menores ni entre las dos dosis más altas. Los valores de las variables estudiadas en función de la dosis de N están representados en la tabla 4.

Tabla 4: Valores de generación de raíces nuevas en febrero de 2010 en las plantas de *Quercus ilex* cultivadas con diferentes dosis de N (N_0 , $N_{1/20}$, N_1 y N_2). FRW peso de raíces finas < 2 mm diámetro; ThRW peso de raíces gruesas > 2 mm diámetro y TRW peso total de raíces FRW + ThRW. Para cada parámetro las letras diferentes en una misma fila muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre dosis de nitrógeno.

	N_0	$N_{1/20}$	N_1	N_2
FRW (mg)	2,37 a	5,98 a	9,48 a	7,30 a
ThRW (mg)	9,82 a	18,33 a	77,27 b	71,00 b
TRW (mg)	12,19 a	24,31 a	86,75 b	78,30 b

El análisis de los datos del ensayo de resistencia a la sequía no mostró diferencias significativas entre plantas fertilizadas con distintas dosis de N (Fig 3), siendo únicamente significativo el factor fecha de medición.

Figura 3: Valores de potencial hídrico en función de la dosis de N (N_0 , $N_{1/20}$ y N_I) y de la fecha de medición.



5.5 - DISCUSIÓN

La fertilización otoñal nitrogenada incrementó los parámetros morfológicos H , D , $ShDW$ y RDW en concordancia con otros estudios (Broncano et al., 1998; Villar-Salvador et al., 2004a) y con los capítulos anteriores. Las plantas que recibieron dosis de nitrógeno más reducidas (N_0 y $N_{1/20}$) mostraron valores de estos parámetros inferiores a las plantas que recibieron las dosis N_1 y N_2 . Para algunos parámetros se produjeron también diferencias entre las dos dosis menores y entre las dos dosis mayores (D y $ShDW$, respectivamente) siendo en ambos casos mayores los valores de estos parámetros en las dosis donde se aportaba mayor cantidad nitrógeno. Aunque el incremento del crecimiento y la respuesta nutricional de plantas de encinas a la fertilización con nitrógeno ha sido informado en estudios previos (Oliet et al., 2009a; Sanz-Pérez et al., 2007; Villar-Salvador et al., 2004a) las diferencias encontradas entre dosis en el presente estudio indica que algunos parámetros morfológicos son sensibles a pequeñas modificaciones en el aporte de

nitrógeno durante la fase de endurecimiento otoñal, al menos para un vivero situado en una zona templado-cálida como el de este estudio. Algunos estudios (Oliet et al., 2009a; Villar-Salvador et al., 2004a) no encontraron un aumento en el crecimiento de raíces por la fertilización con N. Este aumento en el crecimiento radicular también ha sido constatado en los anteriores capítulos de este estudio por lo que daría consistencia a la hipótesis de que esta diferencia puede ser explicada a las suaves temperaturas otoñales de Huelva y/o porque nuestra fertilización se extendió hasta mediados de diciembre, mientras que en los estudios citados la fertilización concluyó a principios de otoño, por lo que pudo no ayudar al incremento de la actividad cambial de las raíces durante el otoño.

La fertilización otoñal afectó tanto a las concentraciones como al contenido en nutrientes de las plantas: mayor suplemento otoñal de N incrementó significativamente ambos, a excepción de la concentración de K. Tanto la concentración de N como la de P fueron mayores en las plantas que recibieron dosis más altas de nitrógeno (N_1 y N_2) frente a las que recibieron dosis reducida o nula (N_0 y $N_{1/20}$). Lo mismo ocurrió en el caso de los contenidos de N, P, K en las hojas, sin embargo en estos parámetros existieron también diferencias entre las dosis N_1 y N_2 , siendo mayores los contenidos en la dosis N_2 . Este aspecto probablemente sea debido a la mayor biomasa de estas plantas como corrobora el hecho de que existan diferencias entre ambas dosis para el parámetro morfológico ShDW. Jacobs et al. (2009) encontraron mayores contenidos de N, P, y K en las plantas más fertilizadas, observando que estos contenidos crecían exponencialmente con las dosis de N suministradas, siendo la dosis de 150 mg a la que se estabilizaban los contenidos de P y K, aunque los de N continuaban incrementándose pero a menor ritmo. En ese mismo estudio se ensayaron dosis de 200 mg de N sin presentar las plantas síntomas de toxicidad aunque parámetros como el

volumen radical, que podría predecir una buena respuesta postransplante, disminuía a partir de 100 mg de N. En nuestro estudio la dosis N_2 (130 mg de N) aumentó ShDW y la acumulación de nutrientes en las plantas sin disminuir su respuesta frente a los estreses ensayados. Sin embargo, se apreció una tendencia, no significativa, hacia un menor desarrollo del sistema radical y un empeoramiento de la tolerancia al frío en las plantas del tratamiento N_2 respecto del N_1 . Así pues, teniendo en cuenta estos resultados y los publicados por Jacobs et al. (2009) se recomendaría el uso de dosis entre 100 y 150 mg N durante el cultivo en vivero de la encina. No obstante, la dosis a utilizar variará en función del objetivo a conseguir o del destino de las plantas, por lo que serán necesarios más estudios en los que se incluyan dosis mayores de N y se compruebe la efectividad de estos tratamientos en el establecimiento postransplante, sobre todo en zonas árida.

El análisis de carbohidratos indica que a pesar del mayor crecimiento de las plantas que recibieron dosis altas de N las concentraciones de NSC no presentaron diferencias entre las distintas dosis de nitrógeno aplicadas. La aplicación de fertilizante evitó el efecto dilución en la concentración de NSC en las hojas de las plantas a pesar de que la demanda de carbohidratos para su crecimiento y mantenimiento sería mayor en las plantas más grandes (Fernández et al., 2008; Palacio et al., 2008; Sanz-Perez et al., 2007). Además, en el caso de los contenidos en NSC, las plantas N_2 presentaron contenidos mayores que aquellas que recibieron dosis reducidas (N_0 y $N_{1/20}$), debido al hecho de que a pesar de tener valores mayores de biomasa no hubo una disminución apreciable de las concentraciones de NSC.

Tal y como se ha expuesto en capítulos anteriores existe cierta discrepancia en cuanto al efecto que la fertilización con N puede tener sobre la tolerancia a heladas (literatura citada en Fernández, 2008 y Vilagrosa et al., 2006), nuestros datos muestran que la fertilización otoñal con N mejoró

sustancialmente la capacidad de tolerancia al frío de plantas de encina cultivadas en vivero, respecto de las poco o nada fertilizadas. Distintos estudios han encontrado una asociación positiva entre la concentración de SS y la tolerancia al frío en varias especies de *Quercus* (Fernández et al., 2008; Mollá et al., 2006; Morin et al., 2007). Nuestros datos muestran unas concentraciones y contenidos similares de SS entre distintas dosis de nitrógeno, sin embargo la tolerancia al frío de las plantas tratadas con dosis más altas (N_1 y N_2) fue mayor que la de las plantas que recibieron las dosis menores (N_0 y $N_{1/20}$). Tal y como se ha explicado en los anteriores capítulos, aunque la acumulación de SS puede mejorar la tolerancia al frío por sus propiedades criogénicas y osmóticas, la elevación de los niveles de otras moléculas y solutos incluyendo los lípidos, aminoácidos, proteínas (proteínas que tienen actividad apoplástica anticongelante, proteínas crioprotectores, dehidrinas, etc), ácidos orgánicos, glucósidos y sales orgánicas también pueden mejorar dicha tolerancia (Larcher, 2000; Zwiazek et al., 2001). Además, también hemos encontrado que la fertilización con N incrementó la concentración de P y el contenido de K y P en las hojas de las plantas. K juega un papel fundamental en la osmorregulación (Hsiao y Läuchli, 1986), estando el daño por heladas inversamente relacionado con el contenido en K de las hojas (Marschner, 1995).

La ausencia de diferencias para la peroxidación lipídica y los contenidos de AsA entre las plantas sometidas al tratamiento de frío y las plantas usadas como control nos indican que el ensayo realizado a $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ no fue suficiente como para producir daños importantes a las plantas. Las reacciones de peroxidación lipídica que provocan la pérdida de estabilidad en las membranas pueden detenerse si la planta posee antioxidantes que impidan estas reacciones (Blokhina et al., 2003; Briat, 2002; Shaw et al., 2004). Uno de los antioxidantes que juega un papel relevante en la prevención del estrés

oxidativo es AsA (Foyer, 1993; Smirnov, 1996, 1998, 2000). AsA se encuentra en las células en forma reducida y oxidada, aumentando las formas oxidadas cuando hay un aumento del estrés oxidativo. En plantas sanas predominan las formas reducidas sobre las oxidadas, siendo la forma reducida aproximadamente el 90 % del AsA total (Foyer, 1993; Smirnov, 1996). En nuestro estudio las formas reducidas supusieron aproximadamente un 97 % del AsA total, lo que unido a los datos de peroxidación lipídica corroboran el hecho de que las plantas no sufrieron un estrés suficientemente fuerte durante el ensayo. Sin embargo las plantas sometidas al ciclo de helada presentaron valores de AAT mayores que las plantas controles indicando que las plantas sí estuvieron sometidas a un cierto estrés durante el ensayo. Este estrés debió ser combatido mediante otros mecanismos de detoxificación distintos al AsA, tal y como apuntaron nuestros resultados. Las plantas presentan distintas moléculas antioxidantes hidrofílicas (AsA y glutatión) o lipofílicas (tocoferoles y carotenoides) que pueden actuar contra las especies reactivas del oxígeno, el β -caroteno puede desactivar el oxígeno singlete o prevenir la formación del estado excitado de la clorofila (Young et al., 1997) mientras que el α -tocoferol puede también desactivar el oxígeno singlete además de reducir el radical superóxido, terminando así con las reacciones que provocan peroxidación lipídica (Polle y Runnenberg, 1994). En este sentido, García-Plazaola et al. (1999) encontraron en *Quercus ilex* ssp. *ballota* un incremento de α -tocoferol y β -caroteno durante los meses de más frío pero también de la cantidad de AsA, aunque el análisis de las variaciones diarias de estas moléculas arrojó que las primeras moléculas objetivo del estrés oxidativo provocado por las heladas son las moléculas antioxidantes lipofílicas (α -tocoferol y β -caroteno) estando en concordancia con otros estudios (Walker y McKersie, 1993; Wise y Naylor, 1987). Nuestros datos muestran que las plantas que fueron privadas de nutrientes durante la fase de endurecimiento otoñal (N_0) mostraron una capacidad antioxidante menor que las otras plantas de los tratamientos $N_{1/20}$ y

N_1 , lo que indicaría que un pequeño aporte de nutrientes durante esta fase podría ser suficiente para que la planta desarrolle su sistema de lucha contra el estrés oxidativo provocado por las heladas. No obstante estos resultados no dejan de ser preliminares y en futuros estudios donde se evalúe el estrés oxidativo producido por someter plantas a ciclos de frío será necesaria la realización de ensayos a temperaturas menores además de ampliar el rango de moléculas antioxidantes evaluadas, como el glutatión, carotenoides, tocoferoles así como las actividades de las enzimas implicadas en la lucha contra el estrés oxidativo. También se recomienda realizar los ensayos de frío en condiciones de alta luminosidad, puesto que la combinación de bajas temperaturas y alta luminosidad aumentaría la producción de especies reactivas del oxígeno en los cloroplastos debido a que estas especies reactivas son generadas en el sistema fotosintético de transporte de electrones (Foyer et al., 1994).

En nuestro estudio la fertilización con N incrementó RGC en concordancia con otros estudios realizados (Mollá et al., 2006) y con los datos presentados en los capítulos anteriores. Las plantas que recibieron dosis más altas (N_1 y N_2) de nitrógeno presentaron mayor regeneración radical que las plantas que recibieron las dosis más reducidas (N_0 y $N_{1/20}$). Además esta regeneración aumentó conforme se aumentaba la dosis de nitrógeno excepto entre las dosis N_1 y N_2 en la cual disminuyó aunque no de forma significativa, posiblemente debido a un mayor desvío de recursos hacia la parte aérea.

Respecto al efecto de la fertilización otoñal nitrogenada en el estrés hídrico, no hemos encontrado diferencias en la evolución del potencial hídrico entre las distintas dosis ensayadas. Harvey y Van den Driessche (1999) concluyeron que las plantas altamente fertilizadas son más vulnerables al estrés hídrico que las poco fertilizadas, debido a un mayor incremento relativo de la parte aérea respecto de la raíz y a la transpiración. Aunque las plantas más fertilizadas mostraron un mayor tamaño, lo que puede suponer una mayor

pérdida de agua por transpiración (Hernández et al., 2009), en nuestro estudio la fertilización nitrogenada supuso un incremento en la biomasa de la parte aérea y en las raíces sin provocar diferencias en la ratio parte aérea-raíz. Además, puesto que las plantas de todos los tratamientos disponían de la misma cantidad de agua en el sustrato al estar colocadas juntas en el mismo contenedor, todas ellas fueron capaces de seguir captando agua de éste con igual eficiencia a medida que disminuía el grado de humedad. Similares valores de la ratio parte aérea-raíz en plantas pueden suponer una respuesta similar al estrés hídrico estacional en ecosistemas mediterráneos (Cortina et al., 2008; Lloret et al., 1999).

5.6 - CONCLUSIONES

La fertilización otoñal nitrogenada mejoró la calidad de planta de encina producida, aumentó el crecimiento, el contenido y concentración en nutrientes, la tolerancia al frío y la capacidad de crecimiento de raíces de las plantas además de no suponer un hándicap en la respuesta al estrés hídrico.

La aplicación de distintas dosis de N mostró que algunos parámetros morfológicos, como D y $ShDW$, son susceptibles a pequeños incrementos en el aporte de N. Además se constató que la mayor dosis de N aplicada supuso un aumento del contenido en nutrientes de las hojas de las plantas sin producirse una disminución en sus concentraciones por un efecto dilución, siendo las concentraciones de N mayores conforme se fue incrementando la dosis del mismo.

Nuestros datos confirman resultados encontrados en otros estudios donde se puso de manifiesto que la encina puede ser sobrecargada nutricionalmente en el vivero mediante el suministro de dosis altas de N. En

este sentido la aplicación de dosis de 100 mg N (30 mg durante el otoño) dio lugar a plantas con unos parámetros de calidad no inferiores a las cultivadas con 130 mg N (60 mg N durante el otoño). Deberá, no obstante, seguir estudiándose y afinando las pautas de fertilización de la encina en vivero en función de las características del producto final deseado a la salida de éste.

6 - DISCUSIÓN GENERAL

La fertilización otoñal ha resultado ser una herramienta eficaz para la modificación de los parámetros morfológicos de las plantas de encina cultivadas en vivero. El nitrógeno, frente a P y K, fue el nutriente cuyo aporte tuvo más influencia en la modificación morfológica de las plantas. La fertilización otoñal nitrogenada incrementó los parámetros morfológicos H , D , $ShDW$ y RDW , de forma que aquellas plantas que recibieron las dosis de nitrógeno reducidas mostraron valores de estos parámetros inferiores a las plantas que recibieron las dosis más elevadas. Incluso para algunos parámetros (D y $ShDW$) se produjeron también diferencias entre las distintas dosis de nitrógeno estudiadas en el capítulo 3. Por ejemplo, en el caso de D , las plantas $N_{1/20}$ presentaron valores significativamente mayores que las plantas N_0 indicando que algunos parámetros morfológicos pueden ser sensibles a pequeñas modificaciones en el aporte de nitrógeno durante la fase de endurecimiento otoñal. Los mayores valores de los parámetros morfológicos estudiados en las plantas más fertilizadas estuvieron en concordancia con estudios previos (Broncano et al., 1998; Villar-Salvador et al., 2004a). Sin embargo, otros estudios (Villar-Salvador et al., 2004a; Olier et al., 2009a) no encontraron un aumento en el crecimiento de raíces por la fertilización con N. Este aumento en el crecimiento radicular, encontrado en los tres ensayos realizados en nuestro estudio podría ser explicado porque nuestra fertilización se extendió hasta mediados de diciembre, mientras que en los estudios citados la fertilización concluyó a principios de otoño y por las temperaturas suaves otoñales de nuestro vivero. Durante el otoño se puede dar un considerable crecimiento y actividad cambial, especialmente en las raíces (Boivin et al. 2002, 2004). El aporte extra de nutrientes durante esta fase unido al clima templado reinante en la localidad donde se situó el vivero ayudaron al crecimiento de las raíces de las plantas más fertilizadas. El tamaño y el peso de las plantas producidas estuvieron dentro del rango de las plantas comerciales

de encina normalmente producidas en esta región, de acuerdo también a las regulaciones estatales actualmente en vigor (del Campo et al., 2010; Navarro-Cerrillo et al., 2009). Sin embargo las plantas producidas durante el primer ensayo presentaron tamaños algo mayores que las plantas producidas en los dos siguientes ensayos. Esta diferencia pudo ser debida a que las plantas del primer ensayo crecieron durante los tres primeros meses en invernadero para luego ser trasladadas al vivero mientras que en los demás ensayos las plantas crecieron íntegramente en vivero. El crecimiento en invernadero favoreció el crecimiento de la parte aérea, explicando las diferencias encontradas en los ensayos entre los tamaños de las plantas y en la ratio SRDW.

Durante el primer ensayo también se constató una influencia positiva de la fertilización con P y K sobre algunos parámetros morfológicos. Este hecho ha sido previamente constatado en otros estudios (Oliet et al., 2009b) y podría ser atribuible a un mayor contenido foliar de K y P de las plantas más fertilizadas y en particular a la mayor concentración y contenido foliar de N en las plantas fertilizadas con mayores dosis de P y K.

En nuestro estudio se contrastaron dos procedencias distintas de las semillas, una de procedencia más fría (Alcarria, *ALC*) y otra de procedencia más cálida (Sierra Morena occidental, *HU*). La región de procedencia tuvo su influencia en algunos parámetros morfológicos como el diámetro del tallo y la ratio SRDW, presentando las plantas de *ALC* valores mayores de diámetro y menores de SRDW que las de *HU*. Algunos estudios han mostrado que en plantas de *Quercus ilex* parámetros morfológicos como el tamaño de la planta estaría relacionada con las condiciones climáticas de la región de procedencia (Gratani et al., 2003) o con el tamaño de la bellota (Gimeno et al., 2009). En nuestro estudio, a pesar de las diferencia en *D* y SRDW, el peso total o la altura no se diferenciaron significativamente entre ambas procedencias, es pues necesaria la realización de nuevos estudios tomando en consideración un

mayor número de procedencias con un amplio rango climático para esclarecer el efecto que la procedencia pueda tener sobre las tasas de crecimiento y la distribución de estas.

Las concentraciones de nutrientes al final del periodo de vivero fueron similares a las encontradas en otros estudios para plantas de encina (del Campo et al., 2010; Navarro-Cerrillo et al., 2009; Oliet et al., 2009a). Entre los factores tenidos en cuenta en el diseño experimental, la fertilización con N fue el principal factor que afectó al contenido en nutrientes de las plantas: mayor suplemento otoñal de N incrementó significativamente tales contenidos, principalmente debido a la mayor biomasa de las plantas. En los ensayos de los capítulos 2 y 3 también se constató un incremento en las concentraciones foliares de los nutrientes en las plantas fertilizadas con las dosis más elevadas de nitrógeno. Este efecto sobre las concentraciones no se observó en el primer ensayo probablemente por el mayor crecimiento de las plantas en el mismo lo que provocó una dilución de los nutrientes en los tejidos. La aplicación de cuatro dosis distintas otoñales de N en el tercer ensayo (0, 1,5, 30 y 60 mg N) constató el incremento de los contenidos en nutrientes con el aumento de la dosis de N suministrada principalmente debido al aumento de la biomasa unido al mantenimiento de concentraciones altas de los nutrientes. En este sentido dosis entre 100 y 130 mg N aplicados durante toda la fase de cultivo (de ellos entre 30 y 60 mg N durante el otoño) mejorarían el estado nutricional de las plantas antes de su transplante, al menos en un vivero con las condiciones climáticas parecidas a las de Huelva. Estas dosis de N deben ser acompañadas de dosis suficientes de P y K tal y como constata el efecto positivo de la fertilización con P y K encontrado en la concentración de N en hojas, debido principalmente al requerimiento de estos nutrientes para numerosos procesos fisiológicos necesarios para la mejora del estado nutricional de las plantas (Marschner, 1995). El análisis de los carbohidratos indica que, a pesar del

mayor crecimiento de las plantas más fertilizadas las concentraciones y contenido de NSC no presentaron diferencias entre las distintas dosis de nitrógeno aplicadas, a excepción del primer ensayo donde las plantas más fertilizadas presentaron menores concentraciones de azúcares solubles probablemente debido de nuevo al mayor tamaño que las plantas alcanzaron en este ensayo. La aplicación de fertilizante evitó pues el efecto de dilución en la concentración de NSC en las hojas de las plantas a pesar de que la demanda de carbohidratos para su crecimiento y mantenimiento sería mayor en las plantas más grandes (Fernández et al., 2008; Palacio et al., 2008; Sanz-Perez et al., 2007). El estado nutricional y la respuesta a la fertilización de las plantas también presentaron diferencias entre las regiones de procedencia estudiadas. Estas diferencias sugieren un diferente comportamiento en la acumulación de nutrientes entre las distintas regiones de procedencia, sobre todo en el caso de P y K. Estas diferencias podrían estar asociadas a adaptaciones a las condiciones de estrés predominantes en las localidades de origen de las semillas.

Aunque existe cierta discrepancia en cuanto al efecto que la fertilización con N puede tener sobre la tolerancia a heladas (literatura citada en Fernández, 2008 y Vilagrosa et al., 2006), nuestros datos muestran que la fertilización otoñal con N mejoró sustancialmente la capacidad de tolerancia al frío de plantas de encina cultivadas en vivero. Bajo las condiciones de nuestro vivero y en nuestro estudio, las dosis de 100 y 130 mg de N durante el periodo de cultivo (30 y 60 mg en otoño respectivamente) dieron los mejores valores de tolerancia al frío. No obstante, el empleo de la dosis mayor (N_2), como en el caso de N_2 (130 mg de N) aunque mejoró el contenido en nutrientes de la planta no mejoró la tolerancia al frío de las mismas e incluso se pudo apreciar una tendencia a reducir la tolerancia respecto de las plantas cultivadas con dosis N_1 . Nuestros datos muestran que, a pesar de existir evidencias previas de

que la tolerancia al frío es mejorada por un aumento de las concentraciones de SS (Fernández et al., 2008; Mollá et al., 2006; Morin et al., 2007), la mayor tolerancia al frío de las plantas más fertilizadas con N no fue acompañada por un aumento en las concentraciones de SS, al menos para los niveles de endurecimiento (50 % VD) conseguidos en este estudio, los cuales no fueron muy altos (entre -10 y -13 °C). Sin embargo sí se encontró un aumento en los contenidos y concentraciones de P y K, por lo que la mejora de la tolerancia al frío también pudiera asociarse también a la acumulación de otras moléculas y solutos distintos a los SS (Larcher, 2000; Zwiazek et al., 2001). Como componente de estas moléculas y solutos podría encontrarse K, cuyo contenido está inversamente relacionado con el daño por heladas o P, el cual forma parte de los fosfolípidos que confieren estabilidad a las membranas celulares (Marschner, 1995) que son las primeras estructuras dañadas por factores ambientales de estrés como las bajas temperaturas (Eltner, 1982). Además tal y como se ha constatado en las medidas de estrés oxidativo realizadas, las plantas que recibieron algún aporte de N durante la fase de endurecimiento otoñal presentaron mayor capacidad antioxidante que aquellas que fueron privadas de aportes adicionales de N. Las plantas presentan distintas moléculas antioxidantes hidrofílicas (AsA y glutatión) o lipofílicas (tocoferoles y carotenoides) que pueden actuar contra las especies reactivas del oxígeno (Young et al., 1997), por tanto el abanico de moléculas implicadas en evitar el daño producido por heladas es muy amplio, no pudiendo atribuir una mejora del sistema de protección frente a heladas únicamente a un grupo de moléculas. La tolerancia al frío sí se ha visto fuertemente influida por la región de procedencia de las semillas. Las plantas de la procedencia más fría (*ALC*) han sostenido valores de daño en torno al 40% a temperaturas de entre -10 °C y -12 °C, mientras que las plantas procedentes de una procedencia más cálida (*HU*) han presentado valores en torno al 80-90% para esas mismas temperaturas. Nuestros datos parecen indicar una adaptación a las condiciones climatológicas

predominantes en la región de procedencia de las semillas. Sin embargo existe cierta discrepancia en la literatura respecto a la adaptación o aclimatación de las especies del género *Quercus* a las condiciones ambientales de estrés. Algunos estudios con *Quercus ilex* L. (Gratani et al., 2003; Sánchez-Vilas y Retuerto, 2007) y con *Quercus suber* L. (Ramirez-Valiente et al., 2009) han encontrado una adaptación de plantas de procedencia xéricas a la sequía. Respecto a la tolerancia al frío se ha demostrado que las plantas procedentes de regiones frías muestran un mejor comportamiento frente a heladas en distintas especies de *Quercus* (Aranda et al., 2005; Morin et al., 2007). Por el contrario Gimeno et al. (2009) concluyeron que las respuestas fisiológicas a la sequía y a las heladas dependían más de la aclimatación a condiciones de estrés que de la adaptación propia de las plantas a las condiciones de su región de procedencia. Es necesario pues esclarecer la relación entre la tolerancia al frío, determinados procesos fisiológicos y la composición de diversos compuestos orgánicos. Un seguimiento estacional con medidas más frecuente de la tolerancia al frío y del análisis de SS, desde finales de verano hasta el otoño y durante el invierno (Colombo et al., 2003) y el estudio de más regiones de procedencia cultivadas en diferentes condiciones climáticas, ayudaría a comprender el proceso de endurecimiento al frío en esta especie.

En nuestro estudio la fertilización con N incrementó RGC en concordancia con otros estudios realizados (Mollá et al., 2006), parámetro utilizado para predecir la capacidad de establecimiento postransplante de las especies forestales (Simpson y Ritchie, 1996). Además esta regeneración de raíces aumentó conforme se aumentaba la dosis de nitrógeno excepto entre las dosis N_1 y N_2 , para la cual disminuyó respecto de N_1 , aunque no significativamente, posiblemente debido a un mayor consumo de recursos asignados a un mayor crecimiento de las plantas por lo que el crecimiento radicular durante esta fecha fue menor..

La sequía estival es el principal factor que limita el éxito del establecimiento en campo de plantas de encinas en el área mediterránea. En este sentido nuestros datos auguran mejores posibilidades de establecimiento de las plantas más fertilizadas (sobre todo con dosis de N en torno a los 100 mg) debido principalmente al aumento de los parámetros de calidad de planta, a la similar respuesta al estrés hídrico y al aumento de la capacidad de regeneración radical. Sin embargo sólo la fertilización con K afectó al vigor de las plantas, posiblemente debido al rol de K en el control de la apertura de los estomas y en el ajuste osmótico (Hsiao y Läuchli, 1986). Este hecho está en concordancia con del Campo et al. (2010) quienes también encontraron un efecto positivo de K en la respuesta de las plantas en campo (supervivencia), especialmente en años secos. La ausencia de efecto significativo de N sobre el establecimiento en campo, a pesar de ser el factor más influyente en todos los parámetros de planta estudiados, pudo ser debido a las condiciones favorables de crecimiento en nuestra parcela de campo durante el período de estudio. La mayoría de nuestras plantas sobrevivieron, registrando valores de sólo un 2% de mortalidad para las plantas plantadas en diciembre de 2007 y un 8% para las plantadas en febrero de 2008. Además, los potenciales hídricos durante el primer verano no bajaron de -3,5 MPa, no llegando pues a -4,0 MPa, valores típicos de años donde el periodo de sequía es severo (Villar-Salvador et al., 2004b). Estas buenas condiciones climáticas derivaron en que todas nuestras plantas probablemente tuvieran suficientes reservas de este elemento como para obtener un rendimiento satisfactorio en campo. Sí hemos constatado una influencia de la fecha de plantación en el éxito de la repoblación: las plantas plantadas en diciembre de 2007 tuvieron mejor estado de vigor que las plantadas en febrero de 2008. Palacios et al. (2009) también encontraron que el establecimiento en campo de plantas de encinas estaba fuertemente afectado por la fecha de plantación. Probablemente esto es debido a que las plantas plantadas en diciembre desarrollaron un sistema radicular más extenso y

profundo durante el suave invierno, periodo en el que los brotes aéreos permanecieron dormidos, pudiendo acceder a reservas de agua más profundas. De hecho, nuestros datos confirman que en mitad del verano los potenciales hídricos de las plantas plantadas en diciembre fueron más altos que el de aquellas plantadas en febrero. Además, la tasa de incremento en diámetro (SDI) después de la primera estación seca fue mayor en las plantas plantadas en diciembre que en las plantadas en febrero, presumiblemente debido a la relación positiva entre crecimiento y estado hídrico.

7 - CONCLUSIONES

- 1- La fertilización otoñal ha resultado ser una herramienta eficaz para la modificación de los parámetros morfológicos y el estado nutricional de las plantas de encina cultivadas en vivero.
- 2- El nitrógeno suministrado durante la fertilización otoñal ha sido el principal nutriente que ha influido en los parámetros morfo-fisiológicos estudiados. La fertilización otoñal nitrogenada (100 mg N durante el cultivo, 30 de ellos en la fase otoñal) mejoró la calidad de planta de encina producida, aumentó el crecimiento, el contenido y concentración en nutrientes, la tolerancia al frío y la capacidad de crecimiento de raíces de las plantas además de no suponer un hándicap en la respuesta al estrés hídrico. La aplicación de 130 mg N durante el cultivo (60 de ellos en la fase otoñal) no mejoró los estándares de calidad frente a la de 100 mg N.
- 3- La mejora de la calidad de planta producida por la fertilización otoñal nitrogenada no se tradujo en un mejor establecimiento en campo. Sólo la fertilización con K tuvo un efecto positivo en el establecimiento en campo, posiblemente debido a la acción osmorreguladora de este nutriente que favoreció el éxito de la repoblación durante la época de sequía estival.
- 4- Nuestros resultados, recomiendan la plantación temprana de encinas (finales de otoño) en áreas mediterráneas con inviernos suaves ya que aumenta las probabilidades de supervivencia de las plantas durante la estación seca.
- 5- La región de procedencia de las semillas de encina es un factor a tener en cuenta en la elección del material para repoblación. Nuestros datos sugieren que aspectos fisiológicos como la resistencia al frío parecen

depender de aspectos relacionados con la adaptación de las plantas a las condiciones climáticas de sus regiones de procedencia. Además se ha constatado distintas respuestas, en función de la región de procedencia, a la acumulación de nutrientes aportados durante la fertilización.

En cumplimiento del artículo 58 del Reglamento de Estudios Oficiales de Posgrado de la Universidad de Huelva, para la obtención de la mención de doctorado europeo la tesis consta de una versión inglesa del resumen y las conclusiones de la misma..

- 1 - Autumn Fertilization has proved an effective tool for the modification of morphological parameters and nutritional status of Holm oak seedlings grown in a nursery.
- 2 - Autumn nitrogen fertilization has been the main factor that influenced the morpho-physiological parameters studied. Autumn nitrogen fertilization (100 mg N during growing phase, 30 of them applied in the hardiness phase) improved the quality of Holm oak grown in a nursery and increased growth, nutrient content and concentration, cold tolerance and the root growth capacity, without compromising the response to water stress. The application of 130 mg N during the growing phase (60 of them in the hardiness phase) did not improve the standards of plant quality compared to 100 mg N.
- 3 - The improvement of quality of Holm oak grown in a nursery did not translate into a better field performance. Only K fertilization had a positive effect on field performance, possibly due to osmoregulatory role of K that favored the response of plants to summer drought.

- 4 - Our results recommend early planting of Holm oak in Mediterranean areas with mild winters because it might allow for root growth, so that plants can better survive the dry summer season.

- 5 – Provenance of acorns is a factor to be considered in choosing the material for forest restoration. Our data suggest that physiological aspects, such as cold tolerance, seem to depend on plant adaptation to climatic conditions in their regions of provenance. Different responses to stress tolerance and accumulation of nutrients can be expected depending of the provenance of acorns.

8 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A

Aranda, I., Castro, L., Alía, R., Pardos, J.A., Gil, L., 2005. Low temperature during winter elicits differential responses among populations of the Mediterranean evergreen cork oak (*Quercus suber*). *Tree Physiol.* 25: 1085-1090.

B

Baeza, M.J., Pastor, A., Martín, J., Ibáñez, M., 1991. Mortalidad post-implantación en repoblaciones de *Pinus halepensis*, *Quercus ilex*, *Ceratonia siliqua* y *Tetraclinis articulata* en la provincia de Alicante. *Studia Oecol.* 8: 139-146.

Barbero, M., Loisel, R., Quézel, P., 1992. Biogeography ecology and history of Mediterranean *Quercus ilex* ecosystems. *Vegetatio.* 99-100: 19-34.

Birchler, T., Rose, R.W., Royo, A., Pardos, M., 1998. La planta ideal: revisión del concepto, parámetros definitorios e implementación práctica. *Inv. Agrar-Sist. Rec. F.* 7: 109-121.

Birchler, T.D., Rose, R., Haase, D.L., 2001. Fall fertilization with nitrogen and potassium: effects on Douglas-fir seedling quality and performance. *West. J. App. For.* 16: 71-79.

Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V., 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot-London.* 91: 179-194.

Bocio, I., de Simón, E., Navarro, F.B., Ripoll, M.A., 2001. Efecto de diferentes procedimientos de preparación del suelo en la aforestación de tierras agrarias. En: Sociedad Española de Ciencias Forestales (ed) *Actas III Congreso Forestal Español*, vol 3, Granada, Spain, pp 317-322.

Bogeat-Triboulot, M.B., Lévy, G., 1998. Contribution of different solutes to the cell osmotic pressure in tap and lateral roots of maritime pine seedlings: effects of a potassium deficiency and of an all-macronutrient deficiency. *Ann. Sci. For.* 55: 315-327.

Boivin, J.R., Miller, B.D., Timmer, V.R., 2002. Late-season fertilization of *Picea mariana* seedlings under greenhouse culture: biomass and nutrient dynamics. *Ann. For. Sci.* 59: 255-264.

- Boivin, J.R., Salifu, F., Timmer, V.R., 2004. Late-season fertilization of *Picea mariana* seedlings: intensive loading and outplanting response on greenhouse bioassays. *Ann. For. Sci.* 61: 737–745.
- Bongarten, B.C., Teskey, R.O., 1986. Water relations of loblolly pine seedlings from diverse geographic origins. *Tree Physiol.* 1: 265- 276.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food. Sci. Technol-LEB.* 28: 25-30.
- Briat, J.F., 2002. Metal ion-activated oxidative stress and its control. En: Inzé, D. and Montagu, M. (eds) *Oxidative stress in plants*. Taylor and Francis, London, pp 171-189.
- Broncano, M.J., Riba, M., Retana, J., 1998. Seed germination and seedling performance of two Mediterranean tree species, holm oak (*Quercus ilex* L.) and Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.): a multifactor experimental approach. *Plant Ecol.* 138: 17-26.

C

- del Campo, A.D., Navarro-Cerillo, R.M., Ceacero, C.J., 2010. Seedling quality and field performance of comercial stocklots of containerized holm oak (*Quercus ilex*) in Mediterranean Spain: an approach for establishing a quality standard. *New For.* 39: 19-37.
- Cavender-Bares, J., Cortes, P., Rambal, S., Joffre, R., Miles, B., Rocheteau, A., 2005. Summer and winter sensitivity of leaves and xylem to minimum freezing temperatures: a comparison of co-occurring Mediterranean oaks that differ in leaf lifespan. *New Phytol.* 168: 597-612.
- Clijsters, H., Cuypers, A., Vangronsveld, J., 1999. Physiological responses to heavy metals in higher plants: defence against oxidative stress. *Z. Naturforsch C.* 54: 730-734.
- Colombo, S.J., 1997. Frost hardening spruce container stock for overwintering in Ontario. *New For.* 13: 449-467.
- Colombo, S.J., 2001. How to improve the quality of broadleaved seedlings produced in tree nurseries. En: Ciccarese, L., Lucci, S., Mattsson, A. (eds) *Nursery production and stand establishment of broadleaves to promote sustainable forest management*. IUFRO, Rome, pp 41-55.

- Colombo, S.J., Glerum, C., Webb, D.P., 2003. Daylength, temperature and fertilization effects on desiccation resistance, cold hardiness and root growth potential of *Picea mariana* seedlings. *Ann. For. Sci.* 60: 307-317.
- Cortina, J., Green, J.J., Baddeley, J.A., Watson, C.A., 2008. Root morphology and water transport of *Pistacea lentiscus* seedlings under contrasting water supply: a test of the pipe stem theory. *Environ. Exp. Bot.* 62: 343-350.
- Cortina, J., Peñuelas, J.L., Puértolas, J., Savé, R., Vilagrosa, A., 2006. Calidad de planta forestal para la restauración en ambientes mediterráneos. MMA, Madrid, 191 pp.

D

- Díaz, M., Campos, P., Pulido, F.J., 1997. The Spanish dehesas: a diversity in land-use and wildlife. En: Pain, D.J., Pienkowski, M.W. (eds) *Farming and birds in Europe. The common agricultural policy and its implications for bird conservation.* Academic Press, San Diego, pp 178–209.
- Duryea, M.L., 1984. Nursery cultural practices: Impacts on seedling quality. En: Duryea, M.L., Landis, T.D. (eds.) *Forest nursery manual: production of bareroot seedlings.* The Hague: Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk publishers, for forest research laboratory, Oregon State University, Corvallis, pp 143-164.

E

- Elstner, E.F., 1982. Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33: 73-96.

F

- Fernández, M., 2008. Endurecimiento en vivero de especies leñosas mediterráneas destinadas a plantación forestal. *Cuad. Soc. Esp. Cienc. For.* 28: 13-24.
- Fernández, M., Alejano, R., Domínguez, L., Tapias, R., 2008. Temperature controls cold hardening more effectively than photoperiod in four Mediterranean broadleaf evergreen species. *Tree For. Sci. Biotech.* 2: 43-49.

- Fernández, M., Carvajal, F., Alejano, R., Domínguez, L., Tapias, R., Alesso, S.P., 2005. Evolución temporal del grado de endurecimiento de plantas de vivero de 4 especies forestales españolas cultivadas en localidades con condiciones climáticas distintas. En: SECF-Gobierno de Aragón (eds.) Actas IV Congreso Forestal Español, Vol 3, Zaragoza, Spain.
- Fernández, M., Marcos, C., Tapias, R., Ruiz, F., López, G., 2007. Nursery fertilisation affects the frost-tolerance and plant quality of *Eucalyptus globulus* Labill. cuttings. Ann. For. Sci. 68: 865-873.
- Fernández, M., Novillo, C., Pardos, J.A., 2006. Effects of water and nutrient availability in *Pinus pinaster* Ait. open pollinated families at an early age: growth, gas exchange and water relations. New For. 31: 321-342.
- Fernández, M., Royo, A., Gil, L., Pardos, J.A., 2003. Effects of temperature on growth and stress hardening development of phytotron-grown seedlings of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.). Ann. For. Sci. 60: 277-284.
- Folk, R.S., Grossnickle, S.C., 2000. Stock-type patterns of phosphorus uptake, retranslocation, net photosynthesis and morphological development in interior spruce seedlings. New For. 19: 27-49.
- Foyer, C.H., 1993. Ascorbic acid. En: Alscher, E.G., Hess, J.L (eds) Antioxidants in higher plants. CRC Press, Florida, pp 32-54.
- Foyer, C.H., Lelandais, M., Kunert, K.J., 1994. Photooxidative stress in plants. Physiol. Plantarum. 92: 696-717.

G

- García-Mozo, H., Gómez-Casero, M., Domínguez, E., Galán, C., 2007. Influence of pollen emission and weather-related factors on variations in holm-oak (*Quercus ilex* ssp. *ballota*) acorn production. Environ. Exp. Bot. 61: 35-40.
- García-Plazaola, J.I., Artetxe, U., Becerril, J.M., 1999. Diurnal changes in antioxidant and carotenoid composition in the Mediterranean sclerophyll tree *Quercus ilex* (L.) during winter. Plant Sci. 143: 125-133.
- Gimeno, T.E., Pías, B., Lemos-Filhos, J.P., Valladares, F., 2009. Plasticity and stress tolerance override local adaptation in the response of Mediterranean holm oak seedlings to drought and cold. Tree Physiol. 29: 87-98.

- Grassi, G., Millard, P., Gioacchini, P., Tagliavini, M., 2003. Recycling of nitrogen in the xylem of *Prunus avium* trees starts when spring remobilization of internal reserves declines. *Tree Physiol.* 23: 1061-1068.
- Gratani, L., 1995. Structural and ecophysiological plasticity of some evergreen species of the Mediterranean maquis in response to climate. *Photosynthetica.* 31: 335-343.
- Gratani, L., Meneghini, M., Pesoli, P., Crescente, M.F., 2003. Structural and functional plasticity of *Quercus ilex* seedlings of different provenances in Italy. *Trees.* 17: 515-521.

H

- Harvey, H.P., Van den Driessche., 1999. Nitrogen and potassium effects on xylem cavitation and water-use efficiency in poplars. *Tree Physiol.* 19: 943-950.
- Heino, P., Palva, E.T., 2003. Signal transduction in plant cold acclimation. En: Hirt, H., Shinozaki, K. (eds) *Plant responses to abiotic stress.* Top. Curr. Gen. Vol 4. Springer, Berlin, pp 151-185.
- Heredia, N., Torres, J., Oliet, J., Villar-Salvador, P., Benito, L.F., Peñuelas, J.L., 2009. Influencia de la fertilización y del régimen térmico durante el cultivo en la aclimatación al frío de *Quercus ilex* L. En: Sociedad Española de Ciencias Forestales, Junta de Castilla y León (eds) *Actas V Congreso Forestal Español, Vol 1, Ávila, Spain, 12 pp.*
- Hernández, E.I., Vilagrosa, A., Luis, V.C., Llorca, M., Chirino, E., Vallejo, V.R., 2009. Root hydraulic conductance, gas exchange and leaf water potential in seedling of *Pistacea lentiscus* L. and *Quercus suber* L. grown under different fertilization and light regimes. *Environ. Exp. Bot.* 67: 269-276.
- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F., Prange, R.K., 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta.* 207: 604-611.
- Hsiao, T.C. y Läuchli, A., 1986. Role of potassium in plant-water relations. En: Tinker B., Läuchli A. (eds.) *Advances in plant nutrition, Vol. II.* Praeger Scientific, New York, pp. 281-312.

I

Irwin, K.M., Duryea, M.L., Stone, E.L., 1998. Fall applied nitrogen improves performance of 1-0 slash pine nursery seedlings after outplanting. *South. J. Appl. For.* 22: 111-116.

J

Jacobs, D.F., Salifu, K.F., Oliet, J.A., 2009. Sobrecarga exponencial de nutrientes para la optimización de la fertilización en vivero de plantas de *Quercus ilex* L. En: Sociedad Española de Ciencias Forestales, Junta de Castilla y León (eds) *Actas V Congreso Forestal Español*, Vol 1. Ávila, Spain, 11 pp.

Jiménez-Sancho, P., Díaz-Fernández, P.M., Iglesias-Sauce, S., deTuero, M., Gil, L., 1996. Regiones de procedencia de *Quercus ilex* L. ICONA, Madrid, 93 pp.

Joffre, F., Vahar, J., de las Llamas, G., Long, G., 1988. The dehesa: an agrosilvopastoral system of the Mediterranean region with special reference to the Sierra Morena of Spain. *Agroforest. Syst.* 6: 71-96.

Juárez-López, F.J., Escudero, A., Mediavilla, S., 2008. Ontogenic changes in stomatal and biochemical limitations to photosynthesis of two co-occurring Mediterranean oaks differing in leaf life span. *Tree Physiol.* 28: 367-374.

K

Kalberer, S.R., Leyva-Estrada, N., Krebs, S.L., Arora, R., 2007. Frost dehardening and rehardening of floral buds of deciduous azaleas are influenced by genotypic biogeography. *Environ. Exp. Bot.* 59: 264-275.

Kaminska-Rozek, E., Pukacki, P.M., 2005. Effect of freezing desiccation on cold hardiness, ROS, membrane lipid levels antioxidant status in spruce seedling. *Acta Soc. Bot. Pol.* 3: 219-228.

Kawecki, T.J., Ebert, T., 2004. Conceptual issues in local adaptation. *Ecol. Lett.* 7: 1225-1241.

Knörzer, O.C., Durner, J., Boger, P., 1996. Alterations in the antioxidative system of suspension cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress. *Physiol. Plantarum.* 97: 388-396.

Koide, R.T., Robichaux, R.H., Morse, S.R., Smith, C.M., 1989. Plant water status, hydraulic resistance and capacitance. En: Percy, R.W., Ehleringer J.R., Mooney H.A., Rundel P.W. (eds.) Plant physiological ecology: field methods and instrumentation. Chapman and Hall, London, pp 161-184.

L

Lambers, H., Cambridge, M.L., Konings, H., Pons, T.L., 1990. Causes and consequences of variation in growth rate and productivity of higher plant. SPB Academic Publishing, Amsterdam, 363 pp.

Landis, T.D., 1989. Mineral nutrients and fertilization. En: Landis, T.D., Tinus, R.W., McDonald, S.E., Barnett, J.P. (eds) The container tree nursery manual, Vol 4. Forest Service, U.S. Dep. of Agric. pp 1-70.

Larcher, W., 2000. Temperature stress and survival ability of Mediterranean sclerophyllous plants. *Plant Biosyst.* 134: 279-295.

Laureano, R.G., Lazo, Y.O., Linares, J.C., Luque, A., Martínez, F., Seco, J.I., Merino, J., 2008. The cost of stress resistance: construction and maintenance costs of leaves and roots in two populations of *Quercus ilex*. *Tree Physiol.* 28: 1721-1728.

Lennartsson, M., 2003. Cold hardening and dehardening in *Salix*. Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Science, Umea, 39 pp.

Leong, L.P., Shui, G., 2002. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem.* 76: 69-75.

Levitt, J., 1980. Responses of plants to environmental stresses. Academic Press, New York, 497 pp.

Lindhauer, M.G., 1985. Influence of K nutrition and drought on water relations and growth of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 148: 654-669.

Livonen, S., Saranpää, P., Sutinen, M.L., Vapaavuori, E., 2004. Effects of temperature and nutrient availability on plasma membrane lipid composition in Scots pine roots during growth initiation. *Tree Physiol.* 24: 437-446.

Lloret, F., Casanovas, C., Peñuelas, J., 1999. Seedlings survival of Mediterranean shrubland species in relation to root: shoot ratio, seed size and water and nitrogen use. *Funct. Ecol.* 13: 210-216.

M

- MARM, 2008. Datos de las denominaciones de origen protegidas (D.O.P) e indicaciones geográficas protegidas (I.G.P) de productos agroalimentarios. MARM, Madrid, 114 pp.
- MAPA, 2006. Forestación de tierras agrícolas. Ministerio de Agricultura y Pesca, Madrid, 373 pp.
- Márquez-García, B., 2009. Mecanismos de resistencia a metales pesados en *Erica andevalensis*. Tesis Doctoral, Universidad de Huelva, Huelva, 276 pp.
- Márquez-García, B., Fernández, M.A., Córdoba, F., 2009. Phenolics composition in *Erica* sp. differentially exposed to metal pollution in the Iberian Southwestern Pyritic Belt. *Bioresource Technol.* 100: 446-451.
- Marschner, H., 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press limited, London, 889 pp.
- McAlister, J.A., Timmer, V.R., 1998. Nutrient enrichment of white spruce seedlings during nursery culture and initial plantation establishment. *Tree Physiol.* 18:195-202.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405-410.
- Mollá, S., Villar-Salvador, P., García-Fayos, P., Peñuelas-Rubira, J.L., 2006. Physiological and transplanting performance of *Quercus ilex* L. (holm oak) seedlings grown in nurseries with different winter conditions. *For. Ecol. Manage.* 237: 218-226.
- Moreno, G., Obrador, J., García, E., Cubera, E., Montero, M., Pulido, F., Dupraz, C., 2007. Driving competitive and facilitative interactions in oak dehesas through management practices. *Agroforest. Syst.* 70: 25-40.
- Morin, X., Ameglio, T., Ahas, R., Kurz-Besson, C., Lanta, V., Lebourgeois, F., Miglietta, F., Chuine, I., 2007. Variation in cold hardiness and carbohydrates concentration from dormancy induction to bud burst among provenances of three European oak species. *Tree Physiol.* 27: 817-825.

N

- Navarro-Cerillo, R.M., Frageiro, B., Ceaceros, C., del Campo, A., de Prado, R., 2005. Establishment of *Quercus ilex* L. subsp. *ballota*. Desf. Samp. using different weed control strategies in Southern Spain. *Ecol. Eng.* 25: 332-342.
- Navarro-Cerillo, R.M., Pemán, J., del Campo, A.D., Moreno, J., Lara, M.A., Díaz, J.L., Pousa, F., Piñón, F.M., 2009. Manual de especies para la forestación de tierras agrarias en Andalucía. Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca, Sevilla, 395 pp.
- Novillo, F., Alonso, J.M., Ecker, J.E., Salinas, J., 2004. CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 3985-3990.

O

- Ogaya, R., Peñuelas, J., 2004. Phenological patterns of *Quercus ilex*, *Phillyrea latifolia* and *Arbutus unedo* growing under field experimental drought. *Ecoscience.* 11: 263-270.
- Olea, L., San Miguel-Ayanz, A., 2006. The Spanish dehesa. A traditional Mediterranean silvopastoral system linking production and nature conservation. *Grassland Sci. Eur.* 11: 3–13.
- Oleksyn, J., Modrzyński, J., Tjoelker, M.G., Zytkowski, R., Reich, P.B., Karolewski, P., 1998. Growth and physiology of *Picea abies* populations from elevational transects: common garden evidence for altitudinal ecotypes and cold adaptation. *Funct. Ecol.* 12: 573-590.
- Oliet, J.A., Planelles, R., Artero, F., Jacobs, D., 2005. Nursery fertilization and tree shelters affect long-term field response of *Acacia salicina* Lindl. planted in mediterranean semiarid conditions. *For. Ecol. Manage.* 215: 339-351.
- Oliet, J.A., Tejada, M., Salifu, K.F., Collazos, A., Jacobs, D.F., 2009a. Performance and nutrient dynamics of holm oak (*Quercus ilex* L.) seedlings in relation to nursery nutrient loading and post-transplant fertility. *Eur. J. Forest Res.* 128: 253-263.

Oliet, J.A., Torres, J., Cuadros, S., Abellanas, B., 2009b. Efectos combinados de la fertilización con nitrógeno y fósforo en vivero sobre la respuesta post-trasplante de *Quercus ilex* L. En: Sociedad Española de Ciencias Forestales, Junta de Castilla y León (eds) Actas V Congreso Forestal Español Vol 1, Ávila, Spain, 9 pp.

Oliveira, G., Peñuelas, J., 2004. Effects of winter cold stress on photosynthesis and photochemical efficiency of PSII of the Mediterranean *Cistus albidus* L. and *Quercus ilex* L. *Plant Ecol.* 175: 179-191.

P

Palacio, S., Milla, R., Albuixech, J., Pérez-Rontomé, C., Camarero, J.J., Maestro, M., Montserrat-Martí, G., 2008. Seasonal variability of dry matter content and its relationship with shoot growth and non-structural carbohydrates. *New Phytologist* 180: 133-142.

Palacios, G., Navarro-Cerrillo, R.M., del Campo, A., Toral, M., 2009. Site preparation, stock quality and planting date effect on early establishment of Holm oak (*Quercus ilex* L.) seedlings. *Ecol. Eng.* 35: 38-46.

Palmroth, S., Berninger, F., Nikinmaa, E., Lloyd, J., Pulkkinen, P., Hari, P., 1999. Structural adaptation rather than water conservation was observed in Scots pine over a range of wet to dry climates. *Oecologia.* 121: 302-309.

Pardos, M., Royo, A., Pardos, J.A., 2005. Growth, nutrient, water relations, and gas exchange in holm oak plantation in response to irrigation and fertilization. *New For.* 30: 75-94.

Pausas, J.G., Blade, C., Valdecantos, A., Seva, J.P., Fuentes, D., Alloza, J.A., Vilagrosa, A., Bautista, S., Cortina, J., Vallejo, R., 2004. Pines and oaks in the restoration of Mediterranean landscapes of Spain: New perspectives for an old practice – a review. *Plant Ecol.* 171: 209-220.

Peñuelas, J.L., Ocaña, L., 1996. Cultivo de plantas forestales en contenedor. Mundi Prensa, MAPA, Madrid, 190 pp.

Pesoli, P., Gratani, L., Larcher, W., 2003. Response of *Quercus ilex* from different provenances to experimentally imposed water stress. *Biol. Plant.* 46: 577-581.

Peuke, A.D., Schrami, C., Hartung, W., Rennenberg, H., 2002. Identification of drought-sensitive beech ecotypes by physiological parameters. *New Phytol.* 154: 373-387.

- Polle, A., Rennenberg, H., 1994. Photooxidative stress in trees. En: Foyer, C.H., Mullineaux, P.M. (eds) Causes of photooxidative stress and amelioration of defence systems in plants. CRC, London, pp 199–218.
- Puertolas, J., Gil, L., Pardos, J.A., 2003. Effects of nutritional status and seedling size on field performance of *Pinus halepensis* planted on former arable land in the Mediterranean basin. *Forestry* 76: 159-168.
- Pukacki, P.M., Kendall, E.J., McKersey, B.D., 1991. Membrane injury during freezing stress to winter wheat (*Triticum aestivum* L.) crown. *J. Plant Physiol.* 138: 516-521.
- Pulido, F.J., García, E., Obrador, J., Montero, M., 2005. Effects of management on acorn production and viability in holmoak dehesas. En: Proceedings of Silvopastoralism and Sustainable Management International Congress. CAB International, Lugo, Spain, pp 180–181.
- Puttonen, P., 1997. Looking for the "silver-bullet" - can one test do it? *New For.* 13: 9-27.

R

- Ramírez-Valiente, J.A., Valladares, F., Gil, L., Aranda, I., 2009. Population differences in juvenile survival under increasing drought are mediated by seed size in cork oak (*Quercus suber* L.). *Forest Ecol. Manag.* 257: 1676-1683.
- Rikala, R., Heiskonen, J., Lahty, M., 2004. Autumn fertilization in the nursery affects growth of *Picea abies* container seedlings after transplanting. *Scan. J. Forest Res.* 19: 405-414.
- Rikala, R., Repo, T., 1997. The effect of late summer fertilization on the frost hardening of second-year Scots pine seedlings. *New For.* 14: 33-44.
- Ritchie, G.A., 1985. Root growth potential: principles, procedures and predictive ability. En: Duryea, M. L. (ed) Proceedings Evaluating seedling quality: principles, procedures, and predictive abilities of major tests. Forest Research Laboratory, Oregon State University, Corvallis, 93-105 pp.
- Rodà, F., Retana, J., Gracia, C., Bellot, J., 1999. Ecology of Mediterranean evergreen oak forests. Springer, Berlin. 373 pp.

Rose, R., Rose, C.L., Omi, S.K., Forry, K.R., Durrall, D.M., Bigg, W.L., 1991. Starch determination by perchloric acid vs enzymes: Evaluating the accuracy and precision of six colorimetric methods. *J. Agric. Food Chem.* 39: 2-11.

Ruiz de la Torre, J., 2006. Flora mayor. Organismo Autónomo Parques Nacionales, Madrid, 1756 pp.

S

Salifu, K.F., Timmer, V.R., 2003. Optimizing nitrogen loading in *Picea mariana* seedlings during nursery culture. *Can. J. For. Res.* 33: 1287-1295.

Sánchez-Vilas, J., Retuerto, R., 2007. *Quercus ilex* shows significant among-population variability in functional and growth traits but maintains invariant scaling relations in biomass allocation. *Int. J. Plant Sci.* 168: 973-983.

Sanz-Pérez, V., Castro-Díez, P., Valladares, F., 2007. Growth versus storage: response of Mediterranean oak seedlings to changes in nutrient and water availabilities. *Ann. For. Sci.* 64: 201-210.

Sardans, J., Peñuelas, J., Roda, F., 2006. Plasticity of leaf morphological traits, leaf nutrient content, and water capture in the Mediterranean evergreen oak *Quercus ilex* subsp. *ballota* in response to fertilization and changes in the competitive conditions. *Ecoscience.* 13: 256-270.

Savaté, S., Sala, A., Gracia, C.A., 1999. Leaf traits and canopy organisation. En: Rodà, F., Retana, J., Gracia, C.A., Bellot, J. (eds) *Ecology of Mediterranean evergreen oak species*. Springer, Berlin, pp 121-133.

Savé, R., Terradas, J., Castell, C., 1999. Gas exchange and water relations. En: Rodà, F., Retana, J., Gracia, C.A., Bellot, J. (eds) *Ecology of Mediterranean evergreen oak forests*. Springer, Berlin, pp 135-147.

Savolainen, O., Pyhajarvi, T., Knurr, T., 2007. Gene flow and local adaptation in trees. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 38: 595-619.

Serrano, L., Peñuelas, J., Ogaya, R., Savé, R., 2005. Tissue-water relations of two co-occurring Evergreen Mediterranean species in response to seasonal and experimental drought conditions. *J. Plant Res.* 118: 263-269.

- Shaw, B.P., Sahu, S.K., Mishra, R.K., 2004. Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants. En: Prasad M.N.V. (ed) Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystem. Springer, Berlín, pp 84-126.
- Simpson, D.G., Ritchie, G.A., 1996. Does RGP predict field performance? A debate. *New For.* 13: 249–273.
- Smirnoff, N., 1996. Botanical briefing: the function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Ann. Bot-London.* 78: 661-669.
- Smirnoff, N., 1998. Plant resistance to environmental stress. *Curr. Opin. Biotech.* 9: 214-219.
- Smirnoff, N., 2000. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 229-235.
- South, D.B., Donald, D.G.M., 2002. Effect of nursery conditioning treatments and fall fertilization on survival and early growth of *Pinus taeda* seedlings in Alabama, U.S.A. *Can. J. For. Res.* 32:1171–1179.
- Spiro, R.G., 1966. Analysis of sugars found in glycoproteins. En: Neufeld, E.F., Ginsburg, V. (eds.) *Methods in enzymology*. Vol. VIII, Complex carbohydrates. Academic Press, New York, pp 3-26.
- Sung, D., Kaplan, F., Lee, K., Guy, C.L., 2003. Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends Plant Sci.* 8: 179–187.
- Suping, Z., Sauv e, R.J., Mmbaga, M.T., 2005. Adaptation of *Pachysandra terminalis* Sieb. & Zucc. to freezing temperatures by the accumulation of mRNA and cold-induced proteins. *Hort. Science.* 40: 346-347.

T

- Terradas, J., Sav e, R., 1992. The influence of summer and winter stress and water relationships on the distribution of *Quercus ilex* L. En: Romane, F., Terradas, J., (eds) *Quercus ilex* L. ecosystems: function, dynamics and management. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 137-145.
- Thomashow, M.F., 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 571-599.
- Timmer, V.R., Aidelbaum, A.S., 1996. Manual for exponential nutrient loading of seedlings to improve outplanting performance on competitive forest sites. Technical Report No. TR-25. NODA/NFP, Ministry of Natural Resource of Ontario, Ontario, 23 pp.

Tognetti, R., Longobucco, A., Miglietta, F., Raschi, A., 1998. Transpiration and stomatal behaviour of *Quercus ilex* plants during the summer in a Mediterranean carbon dioxide spring. *Plant Cell Environ.* 21: 613–622.

Trubat, R., Cortina, J., Milagrosa, B., 2010. Nursery fertilization affects seedling traits but not field performance in *Quercus ilex* L. *J. Arid. Environ.* 74: 491-497.

V

Valdecantos A., Cortina J., Vallejo, V.R., 2006. Nutrient status and field performance of tree seedlings planted in Mediterranean degraded areas. *Ann. For. Sci.* 63:249-256.

Valladares, F., Balaguer, L., Martínez-Ferri, E., Pérez-Corona, E., Manrique, E., 2002a. Plasticity, instability and canalization: is the phenotypic variation in seedlings of sclerophyll oaks consistent with the environmental unpredictability of Mediterranean ecosystems? *New Phytol.* 156: 457.

Valladares, F., Chico, J.M., Aranda, I., Balaguer, L., Dizen-Gremel, P., Manrique, E., Dreyer, E., 2002b. Greater high light seedling tolerance of *Quercus robur* over *Fagus sylvatica* is linked to a greater physiological plasticity. *Trees Struct. Funct.* 16: 395-403.

Valladares, F., Gianoli, E., Gómez, J.M., 2007. Ecological limits to plant phenotypic plasticity. *New Phytol.* 176: 749-763.

Valladares, F., Martínez-Ferri, E., Balaguer, L., Pérez-Corona, E., Manrique, E., 2000. Low leaf-level response to light and nutrients in Mediterranean evergreen oaks: a conservative resource-used strategy? *New Phytol.* 148: 79-91.

Vilagrosa, A., Villar-Salvador, P., Puértolas, J., 2006. El endurecimiento en vivero de especies forestales mediterráneas. En: Cortina, J., Peñuelas, J.L., Puértolas, J., Savé, R., Vilagrosa, A. (eds) *Calidad de planta forestal para la restauración en ambientes mediterráneos: estado actual de conocimientos*. MMA, Organismo Autónomo de Parques Nacionales, Madrid, pp 119-140.

Villar-Salvador, P., Planelles, R., Enriquez, E., Peñuelas-Rubira, J.L., 2004a. Nursery cultivation regimes, plant functional attributes, and field performance relationships in the Mediterranean oak *Quercus ilex* L. *For. Ecol. Manage.* 196: 257-266.

- Villar-Salvador, P., Planelles, R., Oliet, J., Peñuelas-Rubira, J.L., Jacobs, D.F., González, M., 2004b. Drought tolerance and transplanting performance of holm oak (*Quercus ilex* L.) seedlings after drought hardening in the nursery. *Tree Physiol.* 24: 1147-1155.
- Villar-Salvador, P., Puértolas, J., Peñuelas, J.L., Planelles, R., 2005. Effect of nitrogen fertilization in the nursery on the drought and frost resistance of Mediterranean forest species, *Invest. Agrar.: Sist. Recur. For.* 14: 408–418.
- W**
- Walker, M.A., McKersie, B.D., 1993. Role of the ascorbate–glutathione antioxidant system in chilling resistance of tomato. *J. Plant Physiol.* 141: 234–239.
- Weiser, C.J., 1970. Cold resistance and injury in woody plants. *Science.* 169: 1269-1278.
- Welbaum, G.E., Bian, D., Hill, D.R., Grayson, R.L., Gunatilaka, M.K., 1997. Freezing tolerance, protein composition, and abscisic acid localization and content of pea epicotyl, shoot, and root tissue in response to temperature and water stress. *J. Exp. Bot.* 48: 643-654.
- Welling, A., Kaikuranta, P., Rinne, P., 1997. Photoperiodic induction of dormancy and freezing tolerance in *Betula pubescens*. Involvement of ABA and dehydrins. *Physiol. Plant.* 100: 119-125.
- Wise, R.R., Naylor, A.W., 1987. Chilling-enhanced photooxidation: evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigment and endogenous antioxidants. *Plant Physiol.* 83: 278–282.
- Wong, S.P., Leong, L.P., Koh, J.H.W., 2006. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Che.* 99: 775-783.

Y

- Yoshida, S., 1986. Reverse changes in plasma membrane properties upon deacclimation of mulberry trees (*Morus bombycis* Koidz.). *Plant Cell Physiol.* 27: 83–89.
- Young, A.J., Phillip, D., Savill, J. 1997. Carotenoids in higher plant photosynthesis. En: Pessaraki, M., Dekker, M. (eds) *Handbook of Photosynthesis*. CRC Press, New York, pp 575–596.

Z

Zwiazek, J., Renault, S., Croser, C., Hansen, J., Beck, E., 2001. Biochemical and biophysical changes in relation to cold hardiness. En: Bigras, F.J., Colombo, S.J. (eds.) Conifer cold hardiness. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 165-186.

