

Proyecto de Fin de Master
Master Oficial en Restauración de Ecosistemas

**Crecimiento y concentración de nutrientes en
plántulas de *Quercus ilex* y *Pinus halepensis*
cultivadas con diferentes fuentes de nitrógeno**



M^a MERCEDES USCOLA FERNÁNDEZ

Departamento de Ecología, Universidad Alcalá

DIRECTORES DE PRACTICUM:

Pedro Villar Salvador

Departamento de Ecología, Universidad Alcalá.

Juan Oliet Palá

Departamento de Silvopascicultura, ETSI de Montes, Universidad Politécnica de Madrid.



Universidad de Alcalá
Universidad Politécnica de Madrid
Universidad Complutense de Madrid
Universidad Rey Juan Carlos

Proyecto de Fin de Máster
Máster Oficial en Restauración de Ecosistemas
2ª edición: curso 2007/2009

**“Crecimiento y concentración de nutrientes en
plántulas de *Quercus ilex* y *Pinus halepensis*
cultivadas con diferentes fuentes de nitrógeno”**

Alumna: M^a Mercedes Uscola Fernández
Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias
Universidad Alcalá, 28871, Alcalá de Henares
mercedes.uscola@uah.es



Vº Bº Pedro Villar Salvador
Departamento de Ecología
Facultad de Ciencias
Universidad Alcalá, 28871
Alcalá de Henares
pedro.villar@uah.es

Vº Bº Juan Oliet Palá
Departamento de Silvopascicultura
ETSI de Montes
Universidad Politécnica de Madrid
Ciudad universitaria s/n, 28040, Madrid
juan.oliet@upm.es

En Alcalá de Henares, a 6 de Febrero de 2009.

Índice

Resumen	2
Introducción.....	3
Material y métodos.....	6
Cultivo de la planta y diseño experimental	6
Medición de parámetros morfológicos	8
Medición de clorofila	8
Concentración de nutrientes minerales.....	9
Análisis estadísticos	10
Resultados	11
Morfología.....	11
Clorofila.....	17
Nutrientes minerales	19
Discusión	24
Efectos de la concentración y de la fuente de N	24
Efecto de la fertilización foliar	26
Implicaciones para la revegetación	27
Conclusiones.....	29
Futuros estudios sobre fuentes de N.....	30
Crecimiento con diferentes fuentes de N en plantas mediterráneas.....	30
Medidas de fotosíntesis, conductancia estomática y pigmentos fotosintéticos.....	30
Medida del pH y la concentración de amonio y nitrato de la solución del sustrato	30
Comparación de las tasas de absorción de distintas fuentes de N.....	30
Agradecimientos	32
Bibliografía	33

Resumen

Antecedentes: El establecimiento, supervivencia y crecimiento de las repoblaciones forestales dependen de la calidad de planta empleada. La fertilización en vivero, especialmente la nitrogenada, influye enormemente en la calidad de planta. La preferencia por diferentes fuentes de N inorgánico (NH_4^+ y NO_3^-) y el efecto de dichas fuentes de N sobre el desarrollo de la planta difiere entre especies. Estas diferencias suelen reflejar una adaptación de las plantas a las fuentes de N más abundantes en su hábitat natural y permiten reducir la competencia entre especies. En comparación con otros biomas, existe escasa información sobre la preferencia por las fuentes de N inorgánico en especies forestales mediterráneas. Dicho conocimiento es importante para optimizar el cultivo en vivero de estas especies.

Objetivo: Analizar la incidencia de la fuente de N, su concentración y la fertilización foliar con aminoácidos sobre el desarrollo de *Quercus ilex* (encina) y *Pinus halepensis* (pino carrasco).

Metodología: Se cultivaron ambas especies durante seis meses con dos concentraciones de N en el fertilizante (1mM y 10mM) y diferentes proporciones de fuentes de N (sólo NO_3^- , sólo NH_4^+ , igual proporción de NO_3^- y NH_4^+ [N+A]). Además, se definió un tratamiento aislado de fertilización foliar con aminoácidos, que sólo se aplicó a plantas fertilizadas con N+A 1mM N. Se midió la masa de las distintas fracciones de la planta, la concentración de clorofila y de macronutrientes (N y P).

Resultados: La respuesta de ambas especies a las fuentes de N fue distinta, dependiendo de la concentración de N aplicado. A 1mM N solo la concentración de P difirió entre fuentes de N siendo menor en las plantas cultivadas con NO_3^- en ambas especies. A 10mM N las dos especies respondieron de manera distinta a las fuentes de N. En ambas especies, el NH_4^+ redujo el crecimiento y la producción de raíces finas de las plantas e incremento las concentraciones de N y P. En *Q. ilex* 10mM de N+A, también produjo estos resultados, mientras que 10mM NO_3^- no generó diferencias morfológicas con las plantas cultivadas a 1mM, aunque si una mayor concentración de clorofila y N. En *P. halepensis*, 10mM NO_3^- incrementó el crecimiento y la concentración de clorofila mientras que 10mM N+A no produjo diferencias con las plantas 1mM N si bien se redujo la producción de raíces finas y aumentó la concentración de clorofila. La proporción entre la masa aérea y radical (PA/PR) se redujo con el incremento de la fertilización de N. La producción de raíces finas se redujo con la fertilización con contenidos en NH_4^+ a 10mM N. En *P. halepensis* la reducción de la biomasa de raíces finas fue especialmente notable con N+A 10mM. La fertilización foliar no afectó el desarrollo de *Q. ilex*, pero en *P. halepensis* aumentó la concentración de clorofila y ligeramente la masa radicular, reduciendo así el ratio PA/PR.

Conclusión: El NH_4^+ en alta concentración genera toxicidad en ambas especies. En ambas especies la planta de mejor calidad se consigue utilizando NO_3^- en elevada concentración. En el caso del *P. halepensis* la fertilización foliar con aminoácidos puede complementar la fertilización convencional.

Palabras clave: amonio, NH_4^+ , nitrato, NO_3^- , fertilización foliar, aminoácido, *Quercus ilex*, *Pinus halepensis*

Introducción

El éxito de las repoblaciones forestales, medido como establecimiento, supervivencia y crecimiento de los plantones, dependen en gran medida de la calidad de planta empleada (Oliet *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2006). La fertilización es una de las herramientas de cultivo más eficaces para modelar la calidad final de los plantones producidos en los viveros, ya que determina su composición en nutrientes y su morfología (Landis *et al.*, 1985). El N, P y K son los macronutrientes que más influyen en la morfología y fisiología de las plantas (Marschner, 1995). Las plantas más fertilizadas tienen mayor tamaño y mayor concentración de nutrientes, y estas plantas, habitualmente, tienen mayor crecimiento y supervivencia en campo (Villar-Salvador *et al.*, 2004).

El N es uno de los nutrientes más importantes en cantidad y funciones en las plantas. La capacidad fotosintética suele correlacionarse positivamente con la concentración de N en las hojas (Warren & Adams, 2004). Sin embargo, un exceso de N en la fertilización puede promover un desequilibrio morfológico y/o nutricional en las plantas (Peuke *et al.*, 1998), lo cual puede perjudicar su establecimiento en campo, especialmente en condiciones áridas (Oliet *et al.*, 2008a). Tanto fertilizaciones elevadas como deficientes de N pueden retrasar y reducir la aclimatación de las plantas a distintos factores de estrés (Villar-Salvador *et al.*, 2005; Vilagrosa *et al.*, 2006).

Las plantas usan distintas fuentes de N (amonio: NH_4^+ , nitrato: NO_3^- , N orgánico: proteínas, aminoácidos y péptidos) para nutrirse y las diferentes especializaciones morfofisiológicas de la raíz influyen en la asimilación de las distintas fuentes de N (Cruz *et al.*, 1997). Mientras que algunas especies presentan mejor desarrollo al ser fertilizadas sólo con NH_4^+ (*Ceratonia siliqua* – Cruz *et al.*, 1993; *Pinus pinaster* – Plassard *et al.*, 2000), otras se desarrollan mejor sólo con NO_3^- (*Deschampsia flexuosa* – Persson *et al.*, 2003; *Pinus sylvestris* – Öhlund & Näsholm, 2001) o mezclas equimolares de NH_4^+ y NO_3^- (*Picea abies*– *Vaccinium myrtillus* – Persson *et al.* 2003). Las especies que presentan mayores crecimientos con NH_4^+ , presentan los menores crecimientos en NO_3^- y viceversa (Falkengren-Grerup, 1995). Algunas plantas también son capaces de absorber directamente aminoácidos y éstos constituyen una fuente importante de N en ambientes donde la mineralización de la materia orgánica está limitada (Näsholm & Persson, 2001).

El conocimiento del patrón de utilización de las fuentes de N es importante para entender la distribución de las plantas a lo largo de gradientes edáficos de N inorgánico y orgánico, la diferenciación de nichos ecológicos y la sucesión de las comunidades de plantas. El NO_3^- suele dominar en suelos básicos, mientras que en suelos ácidos, donde la nitrificación está muy limitada, el

NH_4^+ es la fuente principal de N (Rothstein & Creg, 2005). Los suelos muy evolucionados contienen grandes cantidades de aminoácidos, baja tasa de nitrificación y el NH_4^+ predomina sobre el NO_3^- (Kielland *et al.*, 2006). En estas condiciones dominan especies de etapas tardías de la sucesión, con baja capacidad de competencia por el N (Tilman, 1987). Los suelos con alto grado de alteración y campos agrícolas abandonados presentan altas concentraciones de NO_3^- siendo ocupados por especies colonizadoras adaptadas a esta fuente de N (Vitousek *et al.*, 1979). Se ha sugerido que localmente, las diferencias topográficas de distribución de las fuentes de N en el suelo podrían explicar los patrones de distribución de árboles en bosques caducifolios templados, siendo el NO_3^- más abundante en la parte alta de las laderas, mientras que en la parte baja es más abundante el NH_4^+ (Tateno & Takeda, 2003). Las distintas preferencias entre especies por las fuentes de N reflejan, diferencias de adaptación fisiológica como de aclimatación de los individuos a las condiciones locales (Kielland *et al.*, 2006).

La fuente de N empleada tiene una gran influencia en la calidad de planta ya que condiciona el crecimiento y el almacenamiento de nutrientes en las plantas (Habib *et al.*, 1993). La fertilización con distintas fuentes de N genera diferencias morfológicas en las plantas (Warren & Adams, 2002). Aparte de las preferencias de cada especie, la presencia de NO_3^- y NH_4^+ parece generar sinergias y/o inhibiciones en la absorción del resto de fuentes de N y de otros nutrientes minerales (Lang & Kaiser, 1994). La absorción de las distintas fuentes de N parece estar condicionada por el pH del sustrato, la temperatura (Sotiropoulos *et al.*, 2005) y por la intensidad lumínica (Fredeen & Field, 1992), factores que son controlables durante el cultivo en vivero.

Generalmente, en los cultivos agrícolas se utilizan altas concentraciones de N, y la principal fuente de N es el NO_3^- . Se evita la fertilización con NH_4^+ ya que, a altas concentraciones, suele reducir el crecimiento, la absorción de cationes, produce daños en las plantas y aumenta su mortalidad (Öhlund & Näsholm, 2001). Para paliar los efectos negativos del NH_4^+ se usan mezclas equimolares de NO_3^- y NH_4^+ (Baker & Mills, 1980), proporción usada mayoritariamente en los viveros forestales (Landis *et al.*, 1989). Por otro lado, el NO_3^- es un anión móvil y lixivia fácilmente, pudiendo causar problemas de contaminación en los acuíferos, donde tiene una larga residencia (Raven *et al.*, 1992). Para conseguir una elevada eficiencia de utilización de los fertilizantes y prevenir los problemas de contaminación de N, es necesario fertilizar a cada especie con la fuente y concentración de N que maximice su crecimiento y absorción de nutrientes.

La fertilización foliar permite, en determinadas fases de su desarrollo, aportar a la planta los nutrientes que no pueden ser adquiridos del suelo, optimizando la capacidad productiva e

incrementando la concentración en N en la planta (Lea-Cox & Syvertsen, 1995; Trinidad & Aguilar, 1999). La fertilización foliar se ha propuesto como una alternativa para reducir los lixiviados de NO_3^- en los cultivos (Council for Agricultural Science and Technology, 1985). Sin embargo, existe poca información sobre su eficacia en especies forestales (Landis *et al.*, 1989). Concretamente, la fertilización foliar con aminoácidos es una práctica relativamente reciente y con escasa experiencia.

Quercus ilex y *Pinus halepensis* son las especies más utilizadas en los programas de repoblación de España. El uso de *Q. ilex* se ha fomentado por la Directiva UE 2080/92 tanto como plantaciones monoespecíficas como mixtas, de las que destacan las masas mixtas con *P. halepensis* (Plan Forestal Español, 2002). *P. halepensis* ha sido y es una de las especies más utilizadas por su capacidad de adaptación (De Miguel, 1999; Balboa *et al.*, 2006). Sin embargo, existe todavía poca información sobre las necesidades nutritivas de la mayor parte de las especies mediterráneas, por lo que la investigación en esta área es necesaria para mejorar la calidad de la planta forestal y hacer un uso más eficiente de los fertilizantes (Oliet *et al.*, 2006).

El **objetivo** de este trabajo es analizar la incidencia de la fuente de N (NH_4^+ y NO_3^-), su concentración y la fertilización foliar con aminoácidos sobre el crecimiento y la concentración de nutrientes y clorofila de las especies forestales mediterráneas, *Q. ilex* y *P. halepensis*. Se han testado las siguientes hipótesis:

- 1) El desarrollo de ambas especies será mayor a alta fertilización de N que a baja fertilización de N, siendo mayor la respuesta en *P. halepensis* que en *Q. ilex* debido a la gran dependencia de las reservas de la semilla de *Q. ilex* (ver Heredia *et al.*, 2008).
- 2) El desarrollo de *P. halepensis* se verá más afectado por la fertilización con NO_3^- que con NH_4^+ por ser una especie colonizadora, mientras que *Q. ilex*, se verá más afectado por la fertilización con NH_4^+ que por la de NO_3^- o mezclas equimolares de NO_3^- y NH_4^+ por ser una especie de etapas tardías en la sucesión.
- 3) La fertilización foliar afectará poco el desarrollo de ambas especies debido al gran desarrollo de sus cutículas, siendo mayor el efecto en *P. halepensis* que en *Q. ilex* por tener hojas anfiestomáticas.

Material y métodos

Cultivo de la planta y diseño experimental

Se sembraron semillas de *Q. ilex* (procedencia Región leonesa /Sayago-Salamanca ES01b - cosecha 2007) y *P. halepensis* (procedencia Región Alcarria ES07 - cosecha 2003/2004) el 18 de febrero de 2008, en contenedores TMSuperleach frondosas de 305ml de volumen, rellenos con turba rubia sin fertilizar (Kekkilä B0, Kekkilä Oyi, Finlandia). Se realizó un diseño experimental factorial de cultivo en vivero, siendo los factores:

- Especie (*P. halepensis* y *Q. ilex*);
- Concentración de N en el fertilizante (Baja fertilización-1mM y alta fertilización-10mM);
- Proporción de fuentes de N (sólo NO₃⁻, sólo NH₄⁺, e igual proporción de NO₃ y NH₄⁺ - [N+A]).

Además, se establecieron dos tratamientos más (uno por especie) consistentes en la aplicación de un abonado foliar a plantas que recibieron por fertirrigación 1mM de N+A.

La composición y la concentración de las soluciones fertilizantes usadas en las tres proporciones de NO₃⁻ y NH₄⁺ se recogen en la Tabla 1. La proporción de los macronutrientes en las soluciones se ha diseñado manteniendo un equilibrio entre ellos, basado en las recomendaciones de Ingestad (1979) y Landis (1989).

Los micronutrientes se añadieron a partir de una mezcla comercial (Hortrilon, Compo, Barcelona, Spain) en una concentración de 0,1g.l⁻¹.

Tabla 1

Composición de las soluciones fertilizantes con distintas fuentes de N 1mM. Para las soluciones 10mM N, la concentración de los diferentes compuestos se obtiene multiplicando por 10. La concentración se especifica en mM.

Compuesto	Sólo NH ₄ ⁺	NH ₄ ⁺ + NO ₃ ⁻	Sólo NO ₃ ⁻
KNO ₃		0,5	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,33	0,168	
NH ₄ Cl	0,33	0,168	
CaHPO ₄			0,33
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0,25	0,25	0,25
CaSO ₄ * H ₂ O			0,25
K ₂ HPO ₄	0,33		
KH ₂ PO ₄		0,33	
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,58	0,58	
KCl	0,33	0,17	

El pH y la conductividad de las disoluciones fertilizantes empleadas se midieron una vez al mes. El pH de las disoluciones fue neutro, sin diferencias entre los tratamientos (Tabla 2). La conductividad eléctrica de las disoluciones 1mM N se mantuvo en el rango de 300-400 μ S.cm⁻¹, y 2000-3000 μ S.cm⁻¹ en las disoluciones 10mM N. En ambas fertilizaciones (alta y baja) el valor menor de conductividad eléctrica fue en las disoluciones de NO₃⁻.

Tabla 2

Valores de pH y conductividad eléctrica de las disoluciones fertilizantes. Los datos son medias \pm errores estandar.

Concentración de N	Baja fertilización (1mM N)			Alta fertilización (10mM N)			
	Fuente de N	Sólo NO ₃ ⁻	NO ₃ ⁻ + NH ₄ ⁺	Sólo NH ₄ ⁺	Sólo NO ₃ ⁻	NO ₃ ⁻ + NH ₄ ⁺	Sólo NH ₄ ⁺
pH		6,87 \pm 0,07	7,12 \pm 0,25	7,11 \pm 0,13	7,11 \pm 0,11	6,94 \pm 0,07	6,89 \pm 0,16
Conductividad (μ S.cm ⁻¹)		317 \pm 25	391 \pm 29	416 \pm 34	2048 \pm 235	2850 \pm 122	2940 \pm 236

Se cultivaron 25 plantas por tratamiento en un invernadero y las bandejas de cultivo se dispusieron al azar, rotándose periódicamente, con el fin de minimizar los posibles efectos microclimáticos dentro del invernadero. La fertilización se inició el 11 de marzo de 2008 y se realizó aplicando el mismo volumen de solución fertilizante a cada planta con un dispensador (Figura 1). El volumen de la disolución fertilizante empleado varió en función de las necesidades de agua de la planta (aprox. 20-40ml.riego⁻¹) realizándose dos aplicaciones semanales y evitándose la producción de lixiviados. No obstante, con el fin de evitar la posible salinización del sustrato, cada dos semanas se forzó la lixiviación por medio de una fertirrigación con un volumen de solución fertilizante superior a 50ml.

La fertilización foliar se realizó una vez a la semana, fumigándose sobre 25 plantas 2,6ml de una mezcla comercial de aminoácidos (Welgro Amino, Massó S.A, Barcelona, España, AA libres: 10% p/p, Nitrógeno: 8,8% p/p) con una concentración de N en la disolución de 10mM. El experimento finalizó el 23 de julio de 2008, con lo que el cultivo duró aproximadamente seis meses.



Figura 1
Condiciones de cultivo y cronograma de la fase de cultivo.

Medición de parámetros morfológicos

Se cosecharon al azar 15 plantas por tratamiento que fueron congeladas hasta su procesamiento. Una vez descongeladas, el sistema radical se separó del sustrato, el cual se reservó para ulteriores determinaciones (ver página 30). Finalmente, el sistema radical se lavó con agua de grifo repetidamente, para eliminar el sustrato restante.

Todas las fracciones se lavaron con agua jabonosa, posteriormente se aclararon con agua de grifo y finalmente se enjuagaron con agua destilada. Posteriormente las plantas se dividieron en cuatro fracciones: raíz gruesa, raíz fina, tallo y hojas. Se consideraron raíces finas aquellas con diámetro menor de 2 mm. Todas las fracciones se secaron en estufa a 60°C durante 48 horas y se pesaron por separado. A partir de las masas de algunas fracciones se determinó el ratio PA/PR (masa parte aérea / masa parte radicular) y la fibrosidad de las raíces (masa raíces finas / masa total raíces).

Medición de clorofila

El 21 de julio de 2008 se estimó la concentración de clorofila mediante un analizador portátil (Chlorophyll Content Meter CCM-200, Opti-Science, USA) de todas las plantas del experimento. En *Q. ilex*, se midieron cuatro hojas maduras de la zona superior de la planta correspondientes a la misma medida, realizándose dos medidas en cada hoja. En *P. halepensis* se midió la concentración de clorofila en el penacho final de acículas, tomando tres medidas por planta (Figura 2).

El analizador de clorofila realiza mediciones de la transmisión de la luz en la hoja a 653 y 931 nm. Proporciona el Índice de Concentración de Clorofila (CCI) que es el ratio entre la transmisión de la

luz a ambas longitudes de ondas. No tiene unidades, varía entre 0 y 200 y se correlacionan positivamente con la concentración de clorofila en cada especie.



Figura 2
Mediciones del Índice de Concentración de Clorofila (CCI) con el CCM-200 en *Q. ilex* (izquierda de la imagen) y en *P. halepensis* (derecha de la imagen).

Concentración de nutrientes minerales

Se determinó la concentración de N y P por separado en las raíces (gruesas + finas) y en la parte aérea (tallos + hojas), en muestras compuestas. Cada muestra compuesta se hizo agrupando al azar el material de tres plantas, obteniéndose cinco réplicas por tratamiento. Posteriormente, las muestras se molieron en un molino de bolas (PM100, Retsch Haan, Alemania) (Figura 3a).

Para el análisis de nutrientes, se digirieron fracciones de 0,05 g del material molido con 2 ml de H_2SO_4 al 96% y catalizador Kjeldahl (potasio, sulfato+cobrell, sulfato+selenio) en un digestor (Foss tecator DS-40, FOSS, Dinamarca) a 415 °C durante 90 minutos (Figura 3b). Posteriormente se enrasó a 100 ml con agua destilada. Los valores de concentración de N y P se obtuvieron en el mismo paso, mediante el análisis de alícuotas de 50 ml en un autoanalizador de nutrientes de flujo segmentado (SAN ++, Skalar, Netherlands) (Figura 3c).

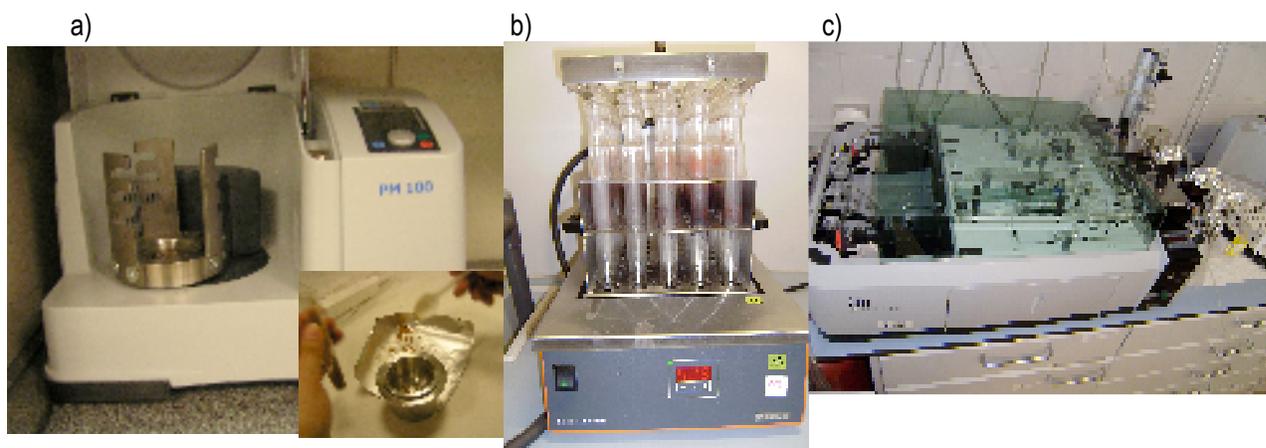


Figura 3
Instrumental analítico utilizado para la determinación de macronutrientes: a) molino de bolas (PM100) y polvo de molienda; b) digestor (Foss tecator DS-40); y c) autoanalizador de nutrientes (SAN++).

Análisis estadísticos

Los datos de clorofila obtenidos se promediaron para cada individuo, previamente a su análisis estadístico. Los efectos de la fuente de N y la concentración de N en el fertilizante se evaluaron con ANOVA de dos vías (factores: concentración en N en el fertilizante y fuente de N) en los que se incluyó la fertilización foliar como un control aislado. La especie no se incluyó como variable independiente debido a la gran diferencia de escala de los dos conjuntos de datos en todas las variables estudiadas, lo que generaba una distribución bimodal, dificultando el análisis estadístico.

La homocedasticidad se comprobó mediante el test de Levene. La mayoría de las variables se transformaron para conseguir su homocedasticidad. La comparación múltiple de medias se realizó con el test posthoc de LSD-Fisher. Las diferencias entre la fertilización foliar y los restantes tratamientos se realizó por medio de comparaciones planeadas. Para aquellas variables en las que no se consiguió la homocedasticidad, se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para analizar las diferencias entre tratamientos.

Resultados

Morfología

En ambas especies, la fuente de N y la concentración de N en el fertilizante afectaron a casi todas las variables. No obstante, las diferencias debidas a la concentración de N dependieron de la fuente de N considerada (interacción fuente de N \times concentración de N en el fertilizante, Tabla 3 y Figura 8).

En *Q. ilex*, la masa de casi todas las fracciones de la planta y la masa total fueron mayores en las plantas cultivadas con 1mM N que en las cultivadas con 10mM N, excepto para las plantas cultivadas con NO_3^- . Todas las fracciones de las plantas cultivadas con NH_4^+ y N+A, tuvieron un menor desarrollo que las fracciones de las plantas cultivadas con NO_3^- . No obstante, este efecto sólo fue evidente a 10mM N pero no entre las plantas cultivadas a 1mM N (interacción fuente de N \times concentración de N en el fertilizante, Tabla 3, Figura 4, Figura 8a). Las plantas cultivadas con 10mM de NH_4^+ presentaron disminución del crecimiento, necrosis foliar y un 32% de mortalidad (Figura 6a). En el resto de los tratamientos no hubo mortandad, ni necrosis foliar. Los plantones cultivados con 10mM N+A presentaron también una reducción del crecimiento con respecto a los plantones producidos a 1mM. Los plantones cultivados con 10mM NO_3^- no presentaron diferencias con los tratamientos a 1mM. Las plantas cultivadas con 10mM de N presentaron menor masa total de raíces y raíces finas que las plantas de los tratamientos 1mM N (Figura 4b; Figura 8a). La fibrosidad de las raíces no se vio afectada ni por la concentración ni por la fuente de N (Tabla 4). Finalmente, el ratio PA/PR fue más alto en las plantas cultivadas con 10mM N que en las cultivadas a 1mM N, no siendo afectado por la fuente de N (Tabla 4).

La fertilización foliar en *Q. ilex* no generó diferencias con ningún tratamiento cultivado con 1mM N ni con el de 10mM de NO_3^- . En *Q. ilex* las plantas de fertilización foliar presentaron en general, mayor desarrollo que las plantas cultivadas con 10mM de NH_4^+ y de N+A (Figura 4; Figura 7a).

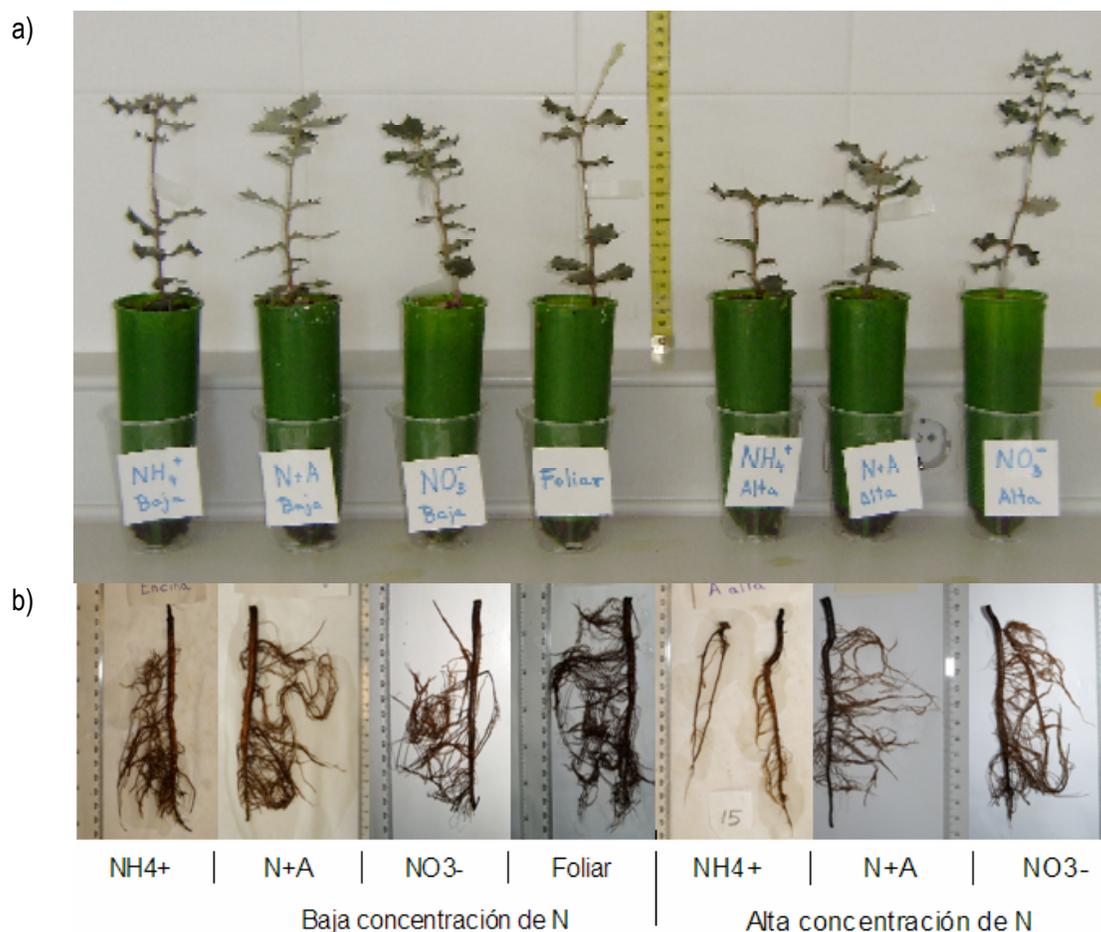


Figura 4

Efecto de diferentes fuentes (sólo NH_4^+ , N+A: NO_3^- y NH_4^+ en la misma proporción, y sólo NO_3^-) y concentración de N en el fertilizante (alta fertilización: 10mM y baja fertilización: 1mM), así como la fertilización foliar con aminoácidos sobre a) la morfología y b) sistema radical, de plántulas de *Q. ilex*.

A diferencia de *Q. ilex*, en *P. halepensis* las plantas cultivadas con 10mM NO_3^- presentaron mayor masa total, masa de raíces gruesas, ratio PA/PR, y masa aérea (Tabla 3; Figura 5; Figura 8b; Kruskal-Wallis: $H_{6,101}=49,2$ $p<0,001$ para masa aérea) que las cultivadas con 1mM N. Este efecto se observó en menor medida en las plantas 10mM N+A, pero no en las fertirrigadas con 10mM NH_4^+ , que tuvieron valores inferiores o iguales al de los tratamientos cultivados con 1mM N (interacción fuente de N \times concentración de N en el fertilizante; Tabla 3; Figura 5; Figura 8b). En *P. halepensis* la fertilización con 10mM de NH_4^+ también produjo necrosis foliar, y una mortandad del 8%, mientras que en el resto de tratamientos, no se observaron individuos muertos, ni necrosis foliar (Figura 6b). Las plantas cultivadas con 10mM NH_4^+ presentaron los valores más bajos de masa total de raíces y masa de raíces

finas, de todos los tratamientos, mientras que las cultivadas con 10mM NO_3^- y 10mM N+A mostraron valores superiores o semejantes al de los tratamientos cultivados con 1mM N, y sin diferencias entre sí (Figura 5; Kruskal-Wallis: $H_{6,101}=49,6$ $p < 0,001$ para raíz total y $H_{6,101}=45,7$ $p < 0,001$ para raíz fina). La fertilización con 10mM N redujo la fibrosidad de las raíces, si bien esto se observó entre las plantas cultivadas con N+A y, especialmente, NH_4^+ , pero no entre las fertilizadas con NO_3^- (Tabla 4). Así, la fibrosidad de las raíces más elevada se observó en las tratadas con 1mM NO_3^- , mientras que las de menor fibrosidad fueron las fertirrigadas con 10mM NH_4^+ (Tabla 4). Los tratamientos con N+A, independientemente de la concentración de N en el fertilizante, presentaron valores intermedios de fibrosidad.

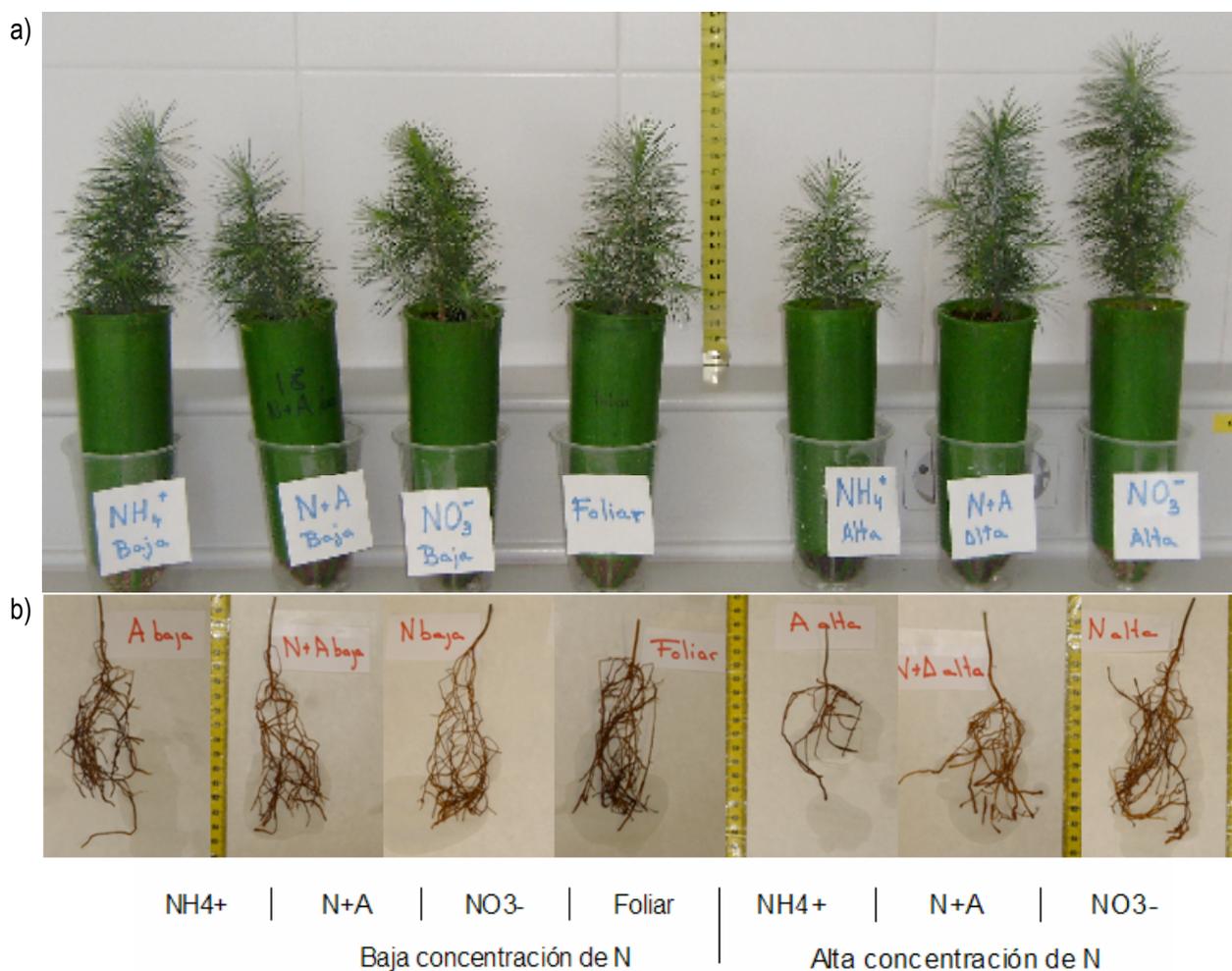


Figura 5

Efecto de diferentes fuentes (sólo NH_4^+ , N+A: NO_3^- y NH_4^+ en la misma proporción, y sólo NO_3^-) y concentración de N en el fertilizante (alta fertilización: 10mM y baja fertilización: 1mM), así como la fertilización foliar con aminoácidos sobre a) morfología y b) sistema radical, de plantones de *P. halepensis*.

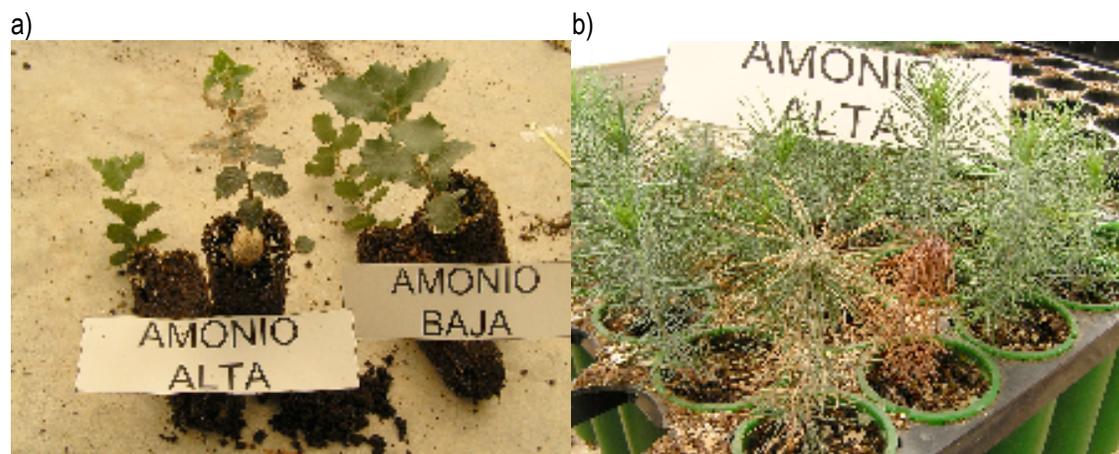


Figura 6
Efectos tóxicos del NH_4^+ a 10mM: disminución del crecimiento, necrosis foliar, y mayores incidencias de mortalidad en a) *Q. ilex* b) *P. halepensis*.

Tabla 3

Resultados del ANOVA sobre el efecto de la fuente y la concentración de N en el fertilizante en el crecimiento y la morfología de plántulas de *Q. ilex* y *P. halepensis*. La fibrosidad de las raíces es el ratio masa raíces finas/masa total radicular. PA/PR es el ratio masa aérea/masa radical.

	Fuente de N	Concentraciones de N	Fuente de N × Conc. de N
<i>Quercus ilex</i>			
Masa total	$F_{2,94}=7,25^{**}$	$F_{1,94}=45,26^{***}$	$F_{2,94}=12,39^{***}$
Masa aérea	$F_{2,94}=9,93^{***}$	$F_{1,94}=4,65^{**}$	$F_{2,94}=7,86^{***}$
Masa radicular	$F_{2,94}=1,45$ n.s.	$F_{1,94}=75,49^{***}$	$F_{2,94}=7,78^{***}$
Masa radicular fina	$F_{2,94}=4,57^{**}$	$F_{1,94}=33,67^{***}$	$F_{2,94}=7,98^{***}$
Masa radicular gruesa	$F_{2,94}=0,49$ n.s.	$F_{1,94}=58,91^{***}$	$F_{2,94}=4,88^{**}$
Ratio PA/PR	$F_{2,94}=0,76$ n.s.	$F_{1,94}=40,64^{***}$	$F_{2,94}=1,06$ n.s.
Fibrosidad raíces	$F_{2,94}=2,64$ n.s.	$F_{1,94}=0,16$ n.s.	$F_{2,94}=1,93$ n.s.
<i>Pinus halepensis</i>			
Masa total	$F_{2,94}=7,28^{**}$	$F_{1,94}=13,71^{***}$	$F_{2,94}=21,62^{***}$
Masa aérea ¹			
Masa radicular ¹			
Masa radicular fina ¹			
Masa radicular gruesa	$F_{2,94}=4,60^{**}$	$F_{1,94}=5,67^{**}$	$F_{2,94}=31,92^{***}$
Ratio PA/PR	$F_{2,94}=12,15^{***}$	$F_{1,94}=86,86^{***}$	$F_{2,94}=4,06^{**}$
Fibrosidad raíces	$F_{2,94}=22,64^{***}$	$F_{1,94}=46,90^{***}$	$F_{2,94}=26,85^{***}$

¹ Variables analizadas mediante el test de Kruskal Wallis al no conseguirse la homocedasticidad de los datos. Véase el texto. *: $P \leq 0,05$; **: $P \leq 0,01$; ***: $P \leq 0,001$; n.s.: $P > 0,05$.

En *P. halepensis*, la fertilización foliar generó plantas con un ratio PA/PR menor al resto de los tratamientos (Tabla 4). Con respecto a los tratamientos cultivados con 1mM N, la fertilización foliar produjo plantas con mayor masa total, aérea y de raíces gruesas que los tratamientos 1mM N+A y NO_3^- . Con respecto a las plantas cultivadas con 10mM N, las plantas complementadas con fertilización foliar fueron más grandes que las NH_4^+ , semejantes a las N+A y con parte aérea y total más pequeña que las cultivadas con NO_3^- (Figura 5; Figura 7b; Figura 8b).

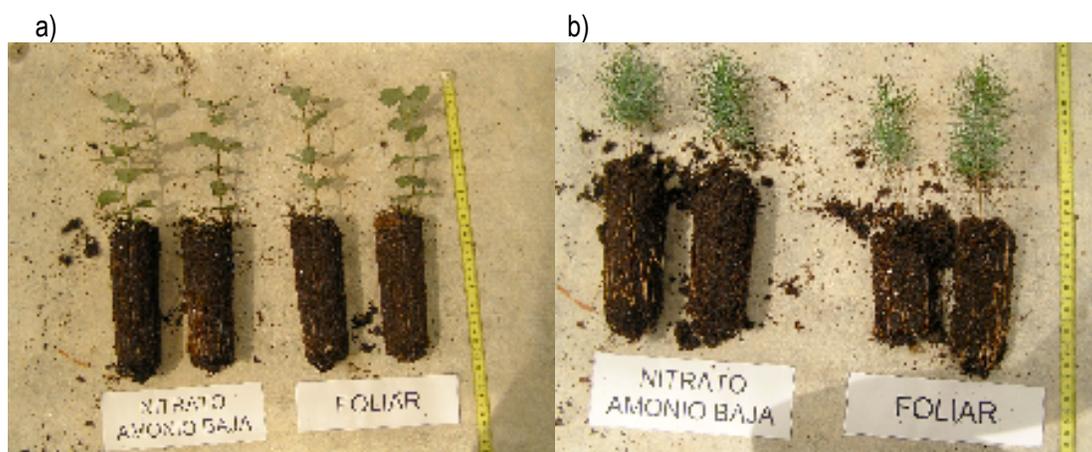


Figura 7

Efecto de la fertilización foliar con aminoácidos en la morfología de plantones de a) *Q. ilex* y b) *P. halepensis*. La comparación se ha establecido con plantones cultivados con 1mM N en mezcla equimolar de NH_4^+ y NO_3^- .

Tabla 4

Efecto de diferentes fuentes (sólo NH_4^+ , N+A: NO_3^- y NH_4^+ en la misma proporción, y sólo NO_3^-) y concentración de N en el fertilizante (alta fertilización: 10mM y baja fertilización: 1mM), así como la fertilización foliar con aminoácidos en el ratio PA/PR y la fibrosidad radical en plantones de *Q. ilex* y *P. halepensis*. Los datos son medias \pm errores estándar. Para cada ratio los tratamientos que difieren significativamente no comparten la misma letra minúscula.

		Fibrosidad		PA/PR	
		<i>Q. ilex</i>	<i>P. halepensis</i>	<i>Q. ilex</i>	<i>P. halepensis</i>
Baja concentración (1mM)	NH_4^+	0,17 \pm 0,01 b	0,61 \pm 0,02 c	0,77 \pm 0,03 a	2,46 \pm 0,09 cd
	N+A	0,21 \pm 0,02 ab	0,68 \pm 0,01 ab	0,84 \pm 0,03 b	2,19 \pm 0,09 de
	NO_3^-	0,20 \pm 0,02 ab	0,69 \pm 0,01 a	0,97 \pm 0,08 b	2,24 \pm 0,14 d
	Foliar	0,22 \pm 0,03 ab	0,67 \pm 0,01 ab	0,93 \pm 0,11 b	1,86 \pm 0,08 e
Alta concentración (10mM)	NH_4^+	0,23 \pm 0,02 a	0,61 \pm 0,02 c	1,45 \pm 0,15 a	4,03 \pm 0,22 a
	N+A	0,16 \pm 0,02 a	0,48 \pm 0,01 d	1,45 \pm 0,18 a	3,41 \pm 0,08 b
	NO_3^-	0,16 \pm 0,02 b	0,65 \pm 0,01 b	1,29 \pm 0,08 a	2,59 \pm 0,05 c

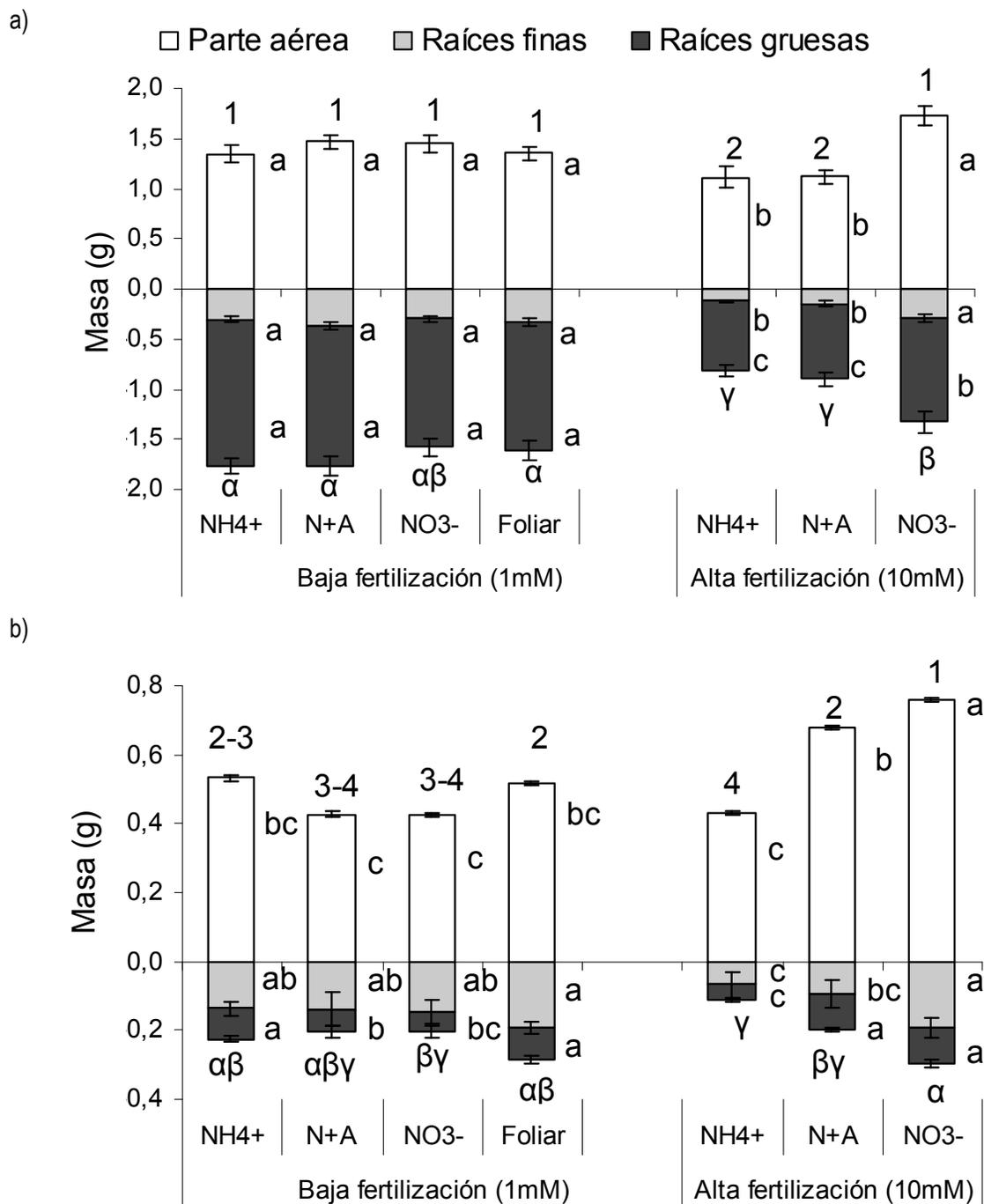


Figura 8

Efecto de diferentes fuentes (sólo NH_4^+ , N+A: NO_3^- y NH_4^+ en la misma proporción, y sólo NO_3^-) y concentración de N en el fertilizante (alta fertilización: 10mM y baja fertilización: 1mM), así como la fertilización foliar con aminoácidos en la masa de diversas partes de plantones de a) *Q. ilex* y b) *P. halepensis*. Los datos son medias y los corchetes son errores estándar. Para cada parte de la planta, los tratamientos que difieren significativamente no comparten la misma letra minúscula. Las diferencias de masa total entre tratamientos se indican con números. Las diferencias de peso radicular total se indican con letras griegas.

Clorofila

Ambas especies respondieron de manera distinta tanto a la fuente como a la concentración de N en el fertilizante.

En *Q. ilex* la concentración de N en el fertilizante incrementó los valores de CCI, ($F_{1,148}=51,35$; $p\leq 0,001$), no observándose ningún efecto de la fuente de N ($F_{2,148}=1,44$; $p>0,05$., Figura 9a). La fertilización foliar tampoco produjo diferencias en los valores CCI con respecto a los demás tratamientos cultivados a 1mM N y valores inferiores a los obtenidos en plantas cultivadas a 10mM N.

En *Pinus halepensis*, los valores de CCI se incrementaron con la concentración de N en el fertilizante ($F_{1,156}=48,34$; $p\leq 0,001$; Figura 9b). A 1mM N no se observaron diferencias entre las fuentes de N ($F_{2,156}=1,83$; $p>0,05$). Sin embargo, 10mM NO_3^- mostró los valores más altos de CCI, mientras que no se observaron diferencias entre NH_4^+ y N+A (interacción fuente de N x concentración de N, $F_{2,156}=7,22$; $p\leq 0,001$). La fertilización foliar con aminoácidos incrementó los valores de CCI con respecto a los restantes tratamientos a 1mM N, pero fueron iguales a los de 10mM NH_4^+ y N+A e inferiores a los obtenidos en las plantas 10mM NO_3^- .

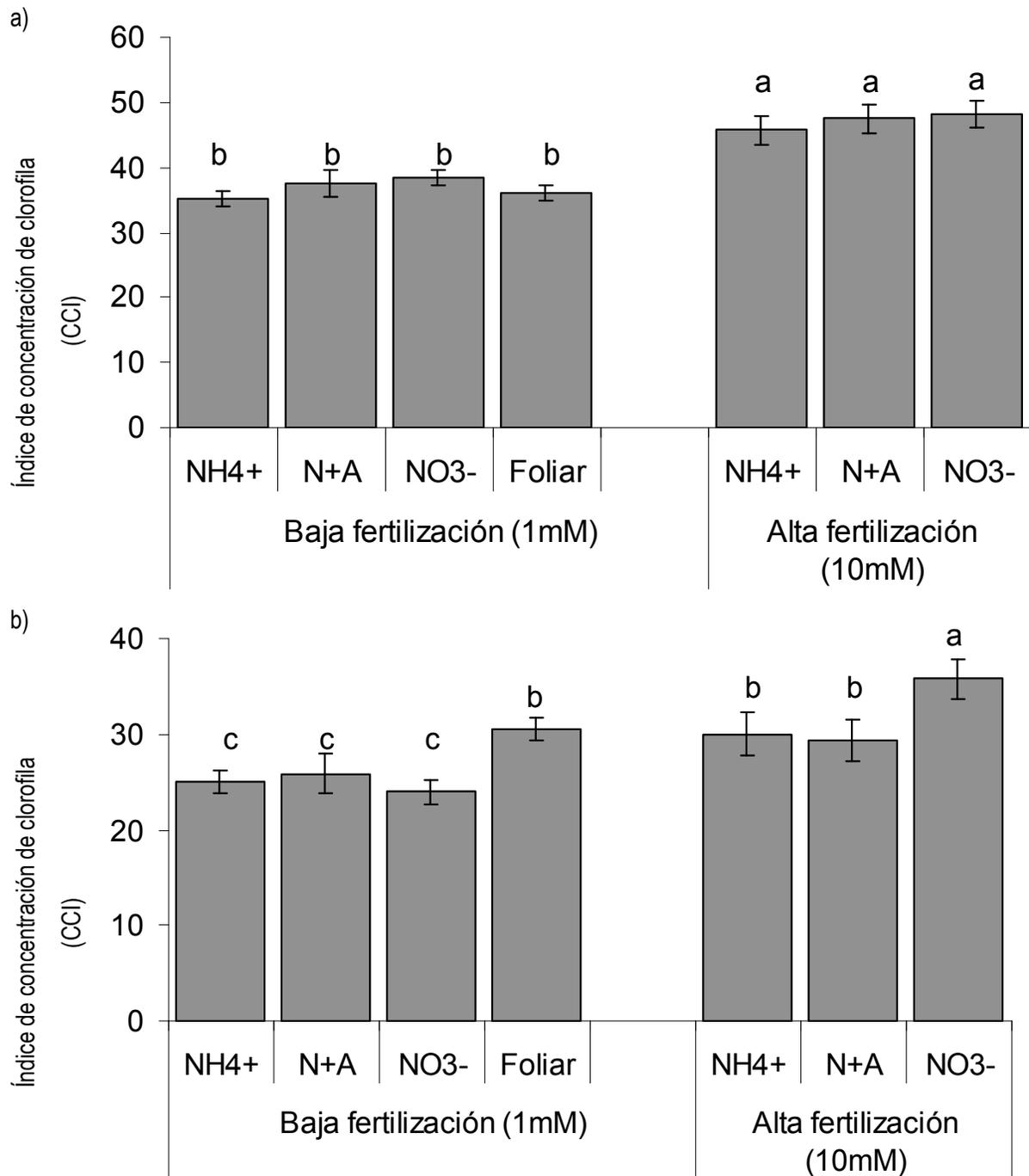


Figura 9

Efecto de diferentes fuentes (sólo NH_4^+ , N+A: NO_3^- y NH_4^+ en la misma proporción, y sólo NO_3^-) y concentración de N en el fertilizante (alta fertilización: 10mM y baja fertilización: 1mM), así como la fertilización foliar con aminoácidos en el Índice de Concentración de Clorofila (CCI) foliar de plantones de a) *Q. ilex* y b) *P. halepensis*. Dicho índice es una proxy de la concentración de clorofila. Los datos son medias y los corchetes son errores estándar. Los tratamientos que difieren significativamente no comparten la misma letra minúscula.

Nutrientes minerales

En ambas especies la fuente y la concentración de N en el fertilizante afectaron a todas las variables estudiadas relacionadas con la concentración de nutrientes. Sin embargo, en *Q. ilex* las diferencias debidas a la concentración de N en el fertilizante dependieron de la fuente de N considerada (interacción fuente de N \times concentración de N en el fertilizante, Tabla 5, Figura 10a) mientras que en *P. halepensis* la concentración de N tuvo un efecto aditivo a los efectos de la fuente de N.

Tabla 5

Resultados del ANOVA sobre el efecto de la fuente y la concentración de N en el fertilizante sobre la concentración de macronutrientes (N y P) en distintos órganos parte aérea (hojas+ tallo) y parte radicular (raíces finas + raíces gruesas) y en el conjunto de la planta de plántulas de *Q. ilex* y *P. halepensis*.

	Fuente de N	Concentración de N	Fuente de N \times Conc. de N
<u><i>Quercus ilex</i></u>			
N aéreo	F _{2,28} = 1,480 n.s.	F _{1,28} = 85,850***	F _{2,28} = 0,112 n.s.
N radicular	F _{2,28} = 5,472 **	F _{1,28} = 162,895 ***	F _{2,28} = 6,853 **
N planta	F _{2,28} = 4,248 *	F _{1,28} = 214,352 ***	F _{2,28} = 3,969 *
P aéreo	F _{2,28} = 49,261 ***	F _{1,28} = 29,718 ***	F _{2,28} = 17,028 ***
P radicular	F _{2,28} = 19,290 ***	F _{1,28} = 144,250 ***	F _{2,28} = 4,81 *
P planta	F _{2,28} = 45,087 ***	F _{1,28} = 98,475 ***	F _{2,28} = 14,726 ***
<u><i>Pinus halepensis</i></u>			
N aéreo ¹			
N radicular	F _{2,28} = 11,083**	F _{1,28} = 14,189**	F _{2,28} = 1,744 n.s.
N planta ¹			
P aéreo	F _{2,28} = 36,078***	F _{1,28} = 9,670**	F _{2,28} = 3,143 n.s.
P radicular	F _{2,28} = 30,124***	F _{1,28} = 37,725***	F _{2,28} = 1,819 n.s.
P planta	F _{2,28} = 57,771***	F _{1,28} = 34,261***	F _{2,28} = 1,420 n.s.

¹ Variables analizadas mediante el test de Kruskal Wallis al no conseguirse la homocedasticidad de los datos. Véase el texto. *: $P \leq 0,05$; **: $P \leq 0,01$; ***: $P \leq 0,001$; n.s.: $P > 0,05$.

En *Q. ilex*, la acumulación de N en raíces y en el conjunto de la planta se incrementó al aumentarse la concentración de N en el fertilizante (Figura 10a). A 1mM N no se apreciaron diferencias entre las fuentes de N en la concentración de N ni en los distintos tejidos ni a nivel de planta. Sin embargo, a 10mM de N las plantas cultivadas con NH_4^+ y N+A presentaron mayor N radicular y N a nivel de planta que las cultivadas con NO_3^- (interacción Fuente de N \times Concentración N en el fertilizante; Tabla 5), no observándose diferencias en la concentración de N de la parte aérea.

Las plantas tratadas con el fertilizante foliar mostraron concentraciones de N equivalentes a las de las plantas fertirrigadas a 1mM N e inferiores a las fertirrigadas con 10mM N.

En *P. halepensis* la concentración de N en el fertilizante tuvo un efecto aditivo sobre el efecto de la fuente de N (Tabla 5; Figura 10b). Las concentraciones de N más bajas se obtuvieron en las plantas cultivadas con NO_3^- y lo fueron a nivel de raíz. Los valores más altos de N en todas las fracciones de la planta se obtuvieron en las plantas cultivadas con NH_4^+ , (parte aérea y a nivel de planta: Kruskal-Wallis test, $H_{6,35}=26,9$; $p=0,0001$, Tabla 5). Las plantas cultivadas con N+A presentaron un comportamiento intermedio entre las cultivadas con NO_3^- y NH_4^+ .

La fertilización foliar no afectó la concentración de N en la planta en comparación con las plantas fertilizadas con 1mM de N, y fue menor que la concentración de N de las plantas cultivadas con NH_4^+ y N+A 10mM.

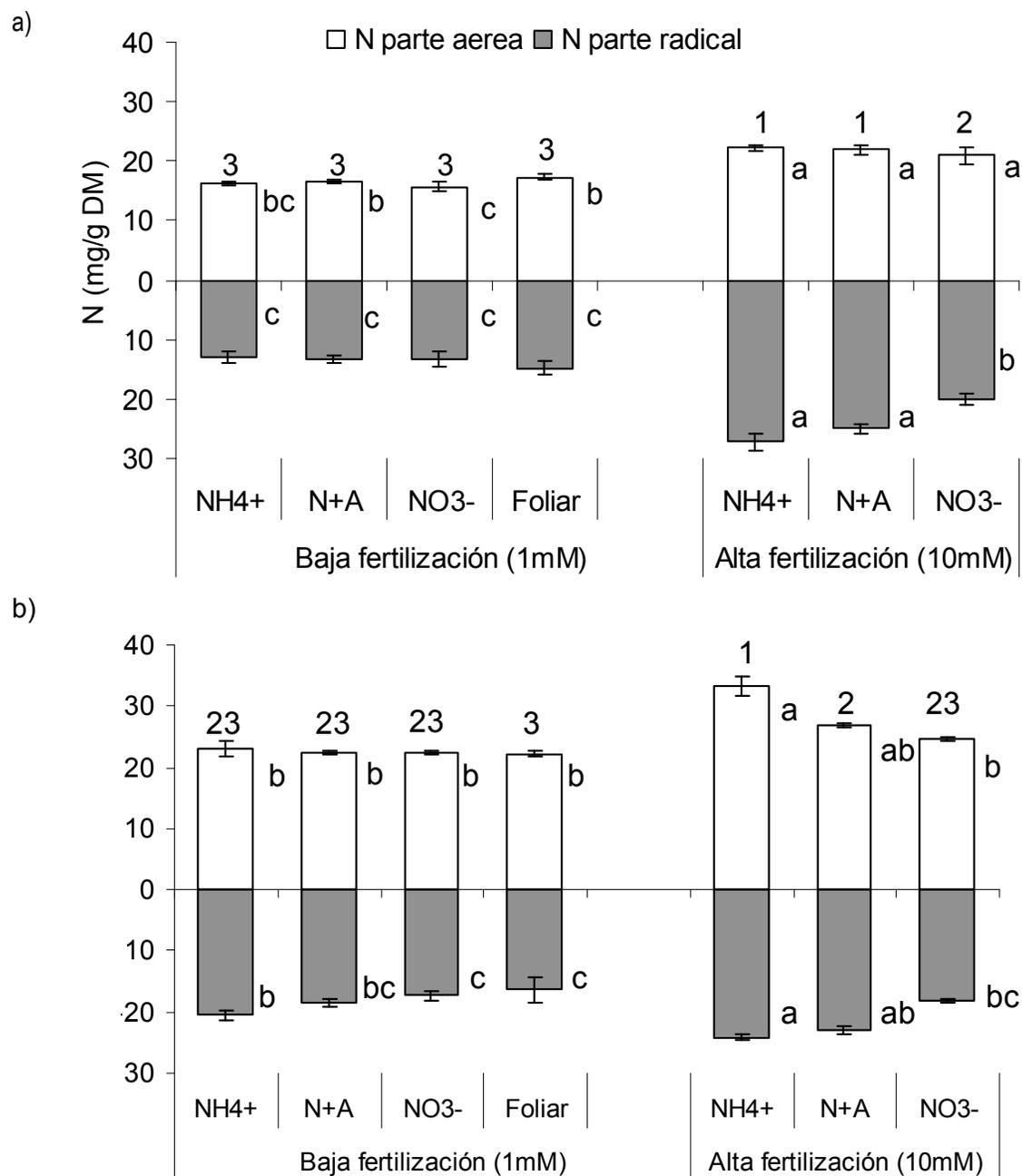


Figura 10

Efecto de diferentes fuentes (sólo NH_4^+ , N+A: NO_3^- y NH_4^+ en la misma proporción, y sólo NO_3^-) y concentración de N en el fertilizante (alta fertilización: 10mM y baja fertilización: 1mM), así como la fertilización foliar con aminoácidos en la concentración de N en los diversos órganos de plantones de a) *Quercus ilex* y b) *Pinus halepensis*. Los datos son medias aritméticas y los corchetes son errores estándar. Para cada tejido, los tratamientos que difieren significativamente no comparten la misma letra, mientras que a nivel de planta se indica con números.

En *Q. ilex*, la concentración de P en los distintos tejidos se incrementó con la concentración de N en el fertilizante en las plantas cultivadas con N+A y NH_4^+ , pero no en las plantas cultivadas con NO_3^- (interacción fuente de N \times concentración de N en el fertilizante, Tabla 5 y Figura 11a). Además, a 1mM N, las plantas cultivadas con N+A tendieron a mostrar igual o mayor concentración de P que las cultivadas con NH_4^+ y NO_3^- . En cambio a 10mM N, las plantas cultivadas con NH_4^+ mostraron una concentración de P mayor que las cultivadas con N+A y NO_3^- .

El tratamiento foliar presentó concentraciones de P equivalentes a las plantas cultivadas a 1mM N de N+A y NH_4^+ , pero superiores a los cultivados con NO_3^- . En cambio, fueron inferiores a la concentración de P de las plántulas fertilizadas con 10mM NH_4^+ y N+A.

En *P. halepensis* la concentración de P se incrementó con la fertilización N y fue mayor entre las plantas cultivadas con NH_4^+ que en las cultivadas con NO_3^- e intermedio en las tratadas con N+A (Tabla 5; Figura 11b).

La fertilización foliar afectó levemente a la concentración de P al compararse con los tratamientos fertilizados con 1mM N, siendo únicamente mayor que las plantas fertilizadas con 1mM NO_3^- ; igual a las plantas cultivadas a 1mM N+A y 10mM NO_3^- e inferior al resto de tratamientos.

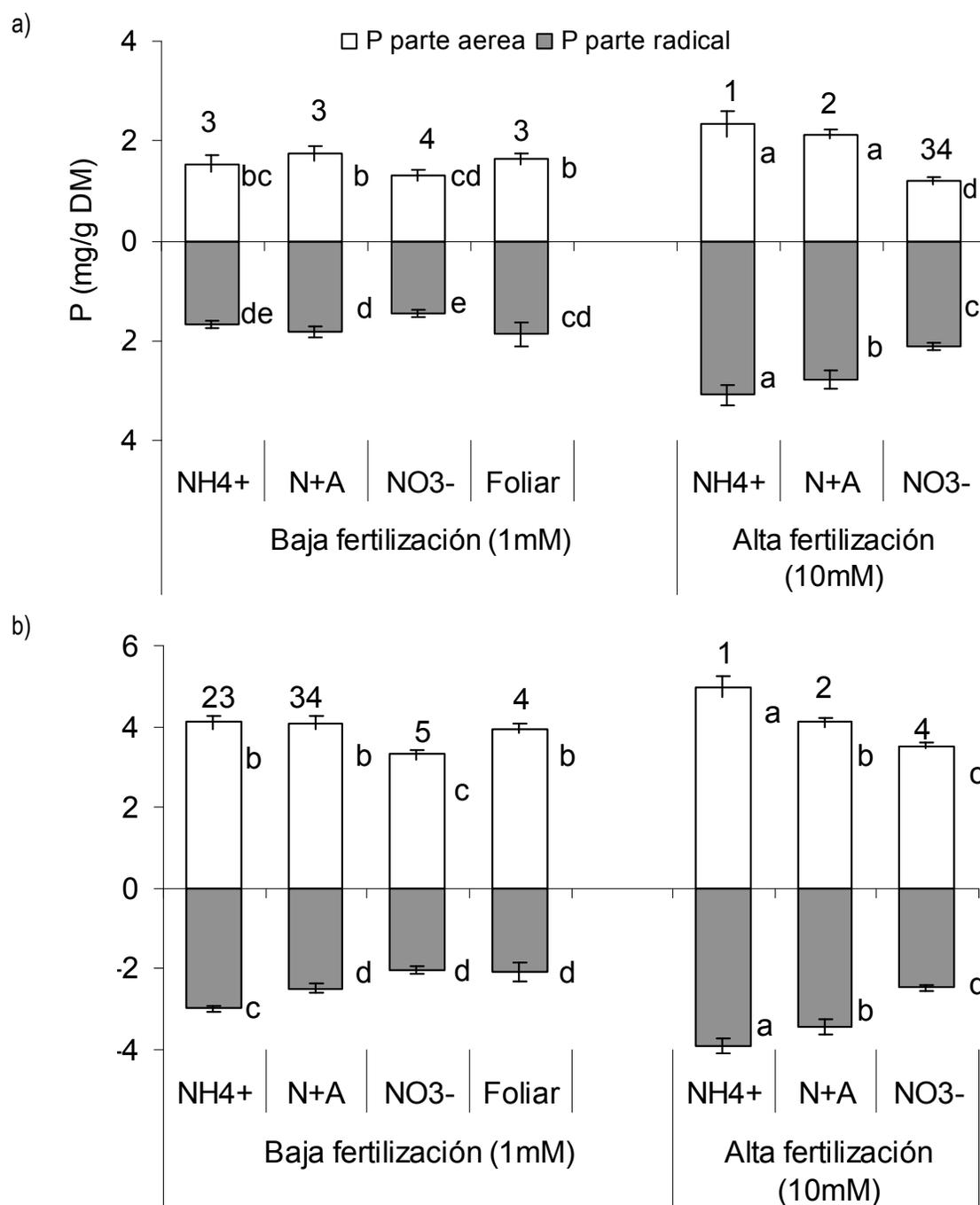


Figura 11

Efecto de diferentes fuentes (sólo NH_4^+ , N+A: NO_3^- y NH_4^+ en la misma proporción, y sólo NO_3^-) y concentración de N en el fertilizante (alta fertilización: 10mM y baja fertilización: 1mM), así como la fertilización foliar con aminoácidos en la concentración de P en los diversos órganos de plantones de a) *Q. ilex* y b) *P. halepensis*. Los datos son medias aritméticas y los corchetes son errores estándar. Para cada tejido, los tratamientos que difieren significativamente no comparten la misma letra minúscula mientras que a nivel de planta se indica con números.

Discusión

Efectos de la concentración y de la fuente de N

Los atributos funcionales de *Q. ilex* y *P. halepensis* no sólo dependieron de la cantidad de N con la que crecieron sino también de la fuente de N. El efecto de la fuente de N sobre el desarrollo de las plantas dependió en gran medida de su concentración en la solución fertilizante y la respuesta de ambas especies fue distinta.

A baja fertilización, las fuentes de N no afectaron ni a la morfología ni a la concentración de N y clorofila de ambas especies. Ello sugiere que 1mM N es una concentración de N muy baja para inducir una respuesta en ambas especies. Este resultado concuerda con lo observado por Warren y Adams (2002) en *P. pinaster*, en el que si la concentración de N en la solución del suelo es inferior a 2mM las diferencias de crecimiento entre fuentes de N son muy pequeñas o nulas. Estos valores, 2mM o inferiores, son los encontrados normalmente en suelos forestales.

A alta concentración de N en el fertilizante las especies respondieron de modo muy distinto a las fuentes de N. En el caso de *Q. ilex*, altas fertilizaciones no incrementaron el crecimiento en ninguna de las fuentes de N e incluso se redujo en presencia de NH_4^+ (tanto sólo como en mezcla equimolar con NO_3^-). En *P. halepensis* la fertilización con 10mM NH_4^+ también inhibió el crecimiento, pero 10mM NO_3^- la estimuló muy significativamente. Estos resultados no apoyan nuestra primera hipótesis ya que demuestran que un aumento de la concentración de N en el fertilizante no induce necesariamente un incremento en el desarrollo de la planta, sino que depende de la fuente de N. La baja respuesta de *Q. ilex* indicaría que tiene una baja plasticidad morfológica frente a la disponibilidad de nutrientes (Valladares *et al.*, 2000), lo que posiblemente sea debido a su gran dependencia de la bellota durante las primeras etapas de desarrollo (Heredia *et al.*, 2008). Sin embargo, la alta fertilización de N aumentó la concentración de clorofila y de nutrientes en los plantones fertirrigados con NH_4^+ . Lo cual demuestra que esta especie es más plástica en sus atributos fisiológicos que en los morfológicos, siendo siempre mayor su respuesta al resto de parámetros ambientales que a la disponibilidad de nutrientes (Valladares *et al.*, 2000). *P. halepensis* es una especie pionera en la sucesión forestal por lo que el mayor crecimiento y concentración de clorofila, en esta especie, a altas concentraciones de NO_3^- , si apoya nuestra segunda hipótesis de que las especies tempranas de la sucesión tienen un mejor desarrollo en presencia de NO_3^- que de NH_4^+ (Rothstein & Cregg, 2005).

Además de la inhibición del crecimiento, la alta fertilización con NH_4^+ produjo necrosis foliar y un cierto nivel de mortalidad (8% en *P. halepensis* y 32% en *Q. ilex*). Estos efectos no se observaron

en el resto de tratamientos lo que sugiere que el NH_4^+ a 10mM produce toxicidad en ambas especies. La inhibición del crecimiento por altas concentraciones de NH_4^+ también se ha descrito en otras especies (*P. sylvestris* y *Picea abies* - Öhlund & Näsholm, 2001; *Abies fraseri* - Rothstein & Cregg, 2005). En el caso de *Q. ilex*, la falta de diferencias entre fuentes de N a 1mM y el efecto negativo del NH_4^+ a elevadas concentraciones contradice nuestra hipótesis de que *Q. ilex* vería favorecido su desarrollo con NH_4^+ por ser una especie tardía en la sucesión. Los efectos negativos del NH_4^+ son conocidos como “síndrome del amonio” e incluyen acidificación de la rizosfera, menor absorción de cationes, incremento en el contenido de aniones, cambios en el metabolismo y menor crecimiento (Peuke *et al.* 1998). Creemos que la reducción del crecimiento obtenida en alta fertilización de NH_4^+ puede atribuirse principalmente a cambios en el pH del sustrato, aspecto que está pendiente de medirse en este estudio. La absorción del NO_3^- aumenta el pH del medio, pero el NH_4^+ genera una excreción de H^+ y un enriquecimiento de aniones en la superficie de la raíz, con lo que la toxicidad del NH_4^+ está relacionada con la bajada del pH (Öhlund & Näsholm, 2001; Sotiropoulos *et al.*, 2005).

Las plantas cultivadas con elevada concentración de NH_4^+ presentaron los valores más altos de N en los tejidos. Creemos que este resultado es consecuencia de la toxicidad del NH_4^+ . Si la planta crece más lentamente que la velocidad con la que el N se absorbe se produce su acumulación en los tejidos. El NH_4^+ es tóxico en los tejidos por lo que la planta debe asimilarlo rápidamente una vez que se absorbe (Warren & Adams, 2002). Por lo tanto, la elevada concentración de N obtenida en nuestras plantas junto con la necrosis foliar son evidencias de acumulación de NH_4^+ .

En ambas especies la alta fertilización nitrogenada produjo cambios importantes en el desarrollo de las raíces. Principalmente redujo su crecimiento. Esta es una respuesta bien conocida entre las plantas, que responden a la baja disponibilidad de N en el medio priorizando el crecimiento radicular sobre el aéreo (Rothstein & Cregg, 2005). Una de las consecuencias de la reducción del crecimiento radical ha sido un incremento del ratio PA/PR. En el caso de *P. halepensis* este efecto se acentuó por el mayor crecimiento de la parte aérea en presencia de NO_3^- . Por otro lado, concentraciones altas de NH_4^+ y N+A redujeron de manera importante la producción de raíces finas, es decir, la fibrosidad del sistema radical (ver Figura 4; Figura 5; Figura 8). La nutrición con NH_4^+ reduce la producción de auxina que es la responsable de la formación de raíces laterales (Cruz *et al.*, 1997). La absorción del NH_4^+ es activa en raíces finas, y pasiva en las raíces gruesas. Por ello, un sistema radical con pocas raíces finas es más efectivo para reducir la absorción y acumulación de NH_4^+ que un sistema radicular fibroso (Cruz *et al.*, 1997).

La fuente de N influye en la tasa de absorción de otros nutrientes. Cuando la nutrición está basada en el NO_3^- se observan bajas concentraciones de aniones pero altas de cationes en los tejidos

(Lang & Kaiser, 1994). El efecto es inverso si la nutrición es con NH_4^+ y es especialmente patente con el P (Rothstein & Cregg, 2005; Sotiropoulos *et al.*, 2005). En consonancia con ello, las plantas cultivadas con NH_4^+ presentaron mayores concentraciones de P que las demás fuentes de N, mientras que el NO_3^- produjo los valores de P más bajos en ambas especies.

Las plantas cultivadas con mezclas equimolares de NH_4^+ y NO_3^- a 10mM presentaron mayor similitud en sus atributos a las plantas cultivadas con NH_4^+ que a las cultivadas con NO_3^- . El NH_4^+ inhibe la absorción de NO_3^- , (Öhlund & Näsholm, 2001) y además su absorción es más barata en términos energéticos para la planta (Cruz *et al.*, 1993), por lo que su efecto se impone al del NO_3^- en mezclas equimolares.

Efecto de la fertilización foliar

La fertilización foliar con aminoácidos tiene la ventaja de que la planta los absorbe y transloca rápidamente a otros órganos de la planta, reduciendo el gasto energético en la síntesis de proteínas (Hsu, 1986). En nuestro caso, la fertilización foliar con aminoácidos incrementó ligeramente el crecimiento y la concentración de clorofila en *P. halepensis*, no afectando al desarrollo de *Q. ilex*, lo que apoya nuestra tercera hipótesis. Una de las consecuencias del incremento de clorofila es que puede aumentar la capacidad fotosintética de la planta (Warren & Adams, 2004; Sotiropoulos *et al.*, 2005).

La efectividad de la fertilización foliar depende de la resistencia a la difusión de la epidermis. La falta de respuesta en *Q. ilex* o la baja respuesta en *P. halepensis* puede deberse a que sus hojas tienen una baja capacidad de intercambio catiónico y/o que presentan epidermis muy impermeables debido a una elevada cutinización y acumulación de ceras (Swietlik y Faust, 1984). En comparación con la absorción radicular, la tasa de absorción foliar de fuentes inorgánicas de N es solo del orden del 3-7% (Peuke *et al.* 1998). Pueden esperarse tasas de absorción foliar de aminoácidos incluso más bajas debido a sus mayores pesos moleculares.

La efectividad de la fertilización foliar también depende de la diferencia de concentración de N entre el interior de la hoja y el fertilizante. Por ejemplo, la absorción foliar de aminoácidos en *Tillandsia paucifolia* ocurre cuando la concentración de aminoácidos en la solución fertilizante es 10^4 mayor que la del interior de la hoja (Nyman *et al.*, 1987). De esto se desprende que la absorción efectiva de aminoácidos y otras fuentes de N depende del estado nutricional de la planta, reduciéndose considerablemente si la planta no tiene deficiencias nutricionales (Wójcik, 2004).

La mayoría de los fertilizantes foliares comerciales de aminoácidos se aplican a unas concentraciones bajas, pensadas para especies hortícolas y frutales (Saborío, 2002). Dichas concentraciones son probablemente muy bajas para especies forestales de hojas escleromorfas con menor permeabilidad foliar que las hojas malacófilas (Larcher, 1995). En coníferas boreales, que presentan hojas muy escleromorfas, la aplicación de urea por vía foliar aumenta el crecimiento y el N foliar (*Pseudotsuga menziesii* - Miller, 1981; *P. ponderosa* - Montville *et al.* 1996). En *P. ponderosa* los mejores resultados de fertilización foliar con urea se obtienen a una concentración de 972 ppm (70mM), observándose los primeros efectos positivos a 324 ppm (23 mM) (Montville *et al.* 1996). Estos valores son muy superiores a los 150 ppm N (10mM) utilizados en nuestro experimento. Por ello, los futuros trabajos que se diseñen deberían analizar los efectos de mayores concentraciones y mayor frecuencia de aplicación de la fertilización foliar con aminoácidos.

Implicaciones para la revegetación

La morfología y las características fisiológicas de los plantones en el momento de la plantación influyen en su capacidad de crecimiento y supervivencia en campo (Villar-Salvador, 2003). La arquitectura radical y la capacidad de formación de nuevas raíces son atributos especialmente importantes para la supervivencia de las plantaciones en ambientes secos y pobres en nutrientes (Grossnickle, 2005).

Independientemente de los efectos tóxicos, las plantas cultivadas a alta concentración de NH_4^+ no presentan un adecuado desarrollo morfológico para ser usadas en plantaciones forestales. Éstas presentan un escaso desarrollo de su sistema radical fino y, en el caso del *P. halepensis*, presentan un fuerte desequilibrio entre el tamaño de la parte aérea y la radical (valores altos de PA/PR). El ratio PA/PR proporciona una idea del equilibrio hídrico potencial de una planta y valores muy altos pueden reducir la supervivencia en situaciones de estrés hídrico (Lloret *et al.*, 1999). En el caso de *P. halepensis*, Navarro *et al.* (2006) sugieren valores óptimos de PA/PR entre 1.5 y 2 los cuales son ampliamente superados por las plantas cultivadas con NH_4^+ y N+A a 10mM (ver Tabla 4). La reducción del sistema radical y la fibrosidad causado por NH_4^+ puede disminuir el volumen de suelo explorado y la absorción de nutrientes y agua (Cruz *et al.*, 1997; Rothstein, & Cregg, 2005).

La removilización de las reservas de nutrientes permite a las plantas suministrar una buena parte de los recursos necesarios para el crecimiento de nuevos órganos y ser independiente de la disponibilidad de nutrientes en el suelo (Millard 1996; Cherbuy *et al.*, 2001). La removilización de las reservas de N puede aportar entre un 50% y un 80% del N de los nuevos órganos. En suelos

oligotrofos cuánto mayores sean las reservas de nutrientes en las plantas de vivero mejor suele ser el crecimiento y supervivencia post-transplante (Salifu & Timmer, 2003).

En *P. halepensis* valores de N foliar de 20 mg.g⁻¹ se relacionan con elevada supervivencia en campo (Oliet *et al.* 2006). Van den Driessche (1988) encuentra la máxima supervivencia en campo para *Pseudotsuga menziessi* entre 19 y 24 mg.g⁻¹ de N, mientras que valores más altos la reducen. Un rango de concentración de N óptimo para *Q. ilex* sería entre 12 y 20 mg.g⁻¹ (Villar-Salvador *et al.*, 2004; Oliet *et al.*, 2008a). En nuestro estudio, a excepción de las plantas cultivadas con NH₄⁺, que supera dicho rango con amplitud, todos los tratamientos produjeron concentraciones de N que se mantienen en estos rangos óptimos de N.

El P, junto con el N, condiciona el desarrollo de la planta ya que forma parte de numerosas moléculas esenciales para el metabolismo de la planta. (Salisbury & Ross, 1994). El P también favorece la capacidad de producción de nuevas raíces una vez la planta es transplantada en campo (Villar-Salvador *et al.*, 2004; Oliet *et al.*, 2006). El P suele ser el elemento más limitante en suelos mediterráneos, especialmente en suelos básicos (Sardans *et al.*, 2004), por lo que el papel que desempeñan las reservas de este nutriente en la planta de vivero también es fundamental para la respuesta post-trasplante (Oliet *et al.*, 2008a). Oliet *et al.* (2008b) encuentra valores óptimos de supervivencia y crecimiento de *P. halepensis* con concentraciones foliares de P de 4mg.g⁻¹, no recomendándose valores inferiores a 1mg.g⁻¹. En *Q. ilex* las concentraciones superiores a 0.4 mg.g⁻¹ de P se relacionan con niveles altos de supervivencia y crecimiento (Villar-Salvador *et al.*, 2004; Oliet *et al.*, 2006). Según estos valores de referencia todos los tratamientos ensayados en este estudio tienen concentraciones de P adecuadas.

Teniendo en cuenta que la mayoría de las especies Mediterráneas perennifolias dependen de la fotosíntesis del momento para la producción de nuevas raíces (Moreno *et al.*, 2005), las técnicas de cultivo en vivero deben orientarse a promover la capacidad fotosintética de las plántulas. Tal como se ha mencionado previamente, la concentración de clorofila es un indicador de la capacidad fotosintética de la planta. Por tanto, es esperable que los plantones de ambas especies producidos a 10mM NO₃⁻ y los plantones de *P. halepensis* fertilizados por vía foliar con aminoácidos presentarán la mayor capacidad de enraizamiento.

Como consejo práctico para el cultivo de ambas especies y teniendo en cuenta el conjunto de los resultados recomendamos que ambas especies sean cultivadas con NO₃⁻ a altas concentraciones.

Conclusiones

1. La fuente de N afecta al desarrollo de *P. halepensis* y *Q. ilex*, pero este efecto es muy patente a alta concentración (10mM) y muy poco perceptible a baja concentración (1mM).
2. Los menores ratios PA/PR se obtienen siempre a bajas concentraciones debido principalmente a un mayor desarrollo del sistema radical.
3. La fertilización sólo con NH_4^+ a 10mM genera toxicidad en ambas especies ya que produce síntomas de necrosis e inhibe el crecimiento. Dicha inhibición se traduce en una elevada concentración de N y P en los tejidos.
4. El NH_4^+ , especialmente a altas concentraciones, reduce la formación de raíces finas en ambas especies.
5. El NO_3^- a 10mM promueve el crecimiento y la concentración de clorofila en *P. halepensis*. En *Q. ilex* el NO_3^- a 10mM no afecta al crecimiento.
6. La mezcla equimolar de NO_3^- y de NH_4^+ promueve respuestas intermedias entre el NH_4^+ y el NO_3^- , si bien en el caso de *Q. ilex* las respuestas son más parecidas a las del NH_4^+ que a las del NO_3^- .
7. La fertilización foliar con aminoácidos no produce ninguna respuesta en *Q. ilex*. En *P. halepensis* se estimula ligeramente el crecimiento y el contenido de clorofila con modificaciones más notorias en el ratio PA/PR.
8. Se recomienda cultivar ambas especies con NO_3^- como fuente principal de N a alta concentración.
9. Para validar definitivamente los resultados de este estudio es recomendable aplicar los mismos tratamientos bajo condiciones operativas de cultivo estándar e introducir valores intermedios de concentración de N. Igualmente, se recomienda testar los efectos de la fertilización foliar a concentraciones superiores a 300ppm de N (21mM N).

Futuros estudios sobre fuentes de N

Crecimiento con diferentes fuentes de N en plantas mediterráneas

Para entender el papel que tienen las fuentes de N en el funcionamiento de *Pinus halepensis* y *Quercus ilex* sería recomendable profundizar en algunos aspectos que a continuación se detallan, algunos de los cuales se han abordado o se están abordando en la actualidad.

Medidas de fotosíntesis, conductancia estomática y pigmentos fotosintéticos

Es importante conocer si la posible toxicidad del NH_4^+ es debida a una reducción de la capacidad fotosintética de la planta. La capacidad fotosintética se mide con un IRGA y se infiere por la concentración de clorofila y carotenoides. Igualmente la reducción de la fibrosidad del sistema radical puede generar reducciones en la capacidad de absorción de agua lo cual podría detectarse con mediciones de la conductancia estomática. La reducción de raíces finas puede incrementar la resistencia hidráulica de la planta lo que se traduciría en nuevas reducciones de la conductancia estomática y la tasa neta de fotosíntesis.

Medida del pH y la concentración de amonio y nitrato de la solución del sustrato

La toxicidad del NH_4^+ podría estar ligada a la excesiva acidez del sustrato. Por ello es importante comparar el pH de la solución de los tratamientos tras la absorción radical y analizar si las dos fuentes de N están en concentraciones muy elevadas como para generar salinidad. Del mismo modo, estos análisis, permiten conocer la evolución y transformación de las distintas fuentes de N en el sustrato durante el periodo de cultivo.

Comparación de las tasas de absorción de distintas fuentes de N

El cultivo de las plantas con diferentes fuentes de N no demuestra directamente la preferencia de absorción de las distintas fuentes de N. Las diferencias de desarrollo pueden ser debidas a otros factores independientes de la preferencia de absorción por una fuente concreta de N. Para analizar la preferencia de absorción se debe medir la tasa de absorción. Con este objetivo se ha realizado un experimento corto con NH_4^+ y NO_3^- marcados con ^{15}N con el fin de determinar la tasa de absorción a concentraciones edáficas parecidas a las que ocurren en suelos pobres.

Se han acumulado evidencias en otros biomas que las fuentes orgánicas de N constituyen también una parte significativa del N que absorben las plantas. Ello abre una nueva perspectiva para

entender la competencia entre especies y el ensamblaje de las comunidades de plantas. Estos aspectos no son conocidos en especies mediterráneas. Por ello, además de las dos fuentes de N inorgánico, también consideramos importante medir la capacidad de absorción de N orgánico, como aminoácidos, de *Pinus halepensis* y de *Quercus ilex*.

Agradecimientos

Agradecemos la colaboración desinteresada de
Arantzazu Aguirre, Sergio A. Salinas y Paloma Ruiz.

Agradecemos la ayuda y facilidades dadas por Real Jardín Botánico Juan Carlos I de la Universidad de
Alcalá para la realización de este trabajo.

Agradecemos la colaboración y material vegetal facilitado por el Centro de Mejora Forestal Nacional del
Serranillo.

El estudio se ha financiado con fondos de los proyectos:

AGL2006-12609-C02-01/FOR,
REMEDINAL S-0505/AMB/0335
y CGL2007-60533/BOS.

Bibliografía

- Baker, A.V. & H.A., Mills. 1980. Ammonium and nitrate nutrition of horticulture crops. *Horticultural Review* 2: 395-423.
- Balboa, M., R. Rodríguez-Soalleiro, A. Merino & J.G. Álvarez-González. 2006. Temporal variations and distribution of carbon stocks in aboveground biomass of radiata pine and maritime pine pure stands under different silvicultural alternatives. *Forest Ecology and Management* 237: 29-38.
- Cherbuy, B., R. Joffre, D. Gillon & S. Rambal. 2001. Internal remobilisation of carbohydrates, lipids, nitrogen and phosphorus in the Mediterranean evergreen oak *Quercus ilex*. *Tree Physiology* 21: 9-17.
- Council for Agricultural Science and Technology. 1985. Agriculture and ground water quality. Report No. 103. Ames, Iowa.
- Cruz, C., S.H. Lips, and M.A. Martins-Loução. 1993. Interactions between nitrate and ammonium during uptake by carob seedlings and the effect of the form of earlier nitrogen nutrition. *Physiologia Plantarum* 89: 554-551.
- Cruz, C., S.H. Lips, & M.A. Martins-Loução. 1997. Changes in the morphology of roots and leaves of carob seedlings induced by nitrogen source and atmospheric carbon dioxide. *Annals of Botany* 80: 817-823.
- De Miguel, S. 1999. Crecimiento y supervivencia de las repoblaciones forestales sobre terrenos agrícolas con *Pinus halepensis* Mill. y *Pinus pinea* L. producidos en vivero sobre diferentes sustratos e inoculados con *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th. M. Fr. Tesis Doctoral Universidad de Lleida. 77 pp.
- Falkengren-Grerup, U. 1995. Interspecific differences in the preference of ammonium and nitrate in vascular plants. *Oecologia* 102: 305-311.
- Fredeen, A.L. & C.B. Field. 1992. Ammonium and nitrate uptake in gap, generalist and understory species of the genus *Piper*. *Oecologia* 92: 207-214.
- Grossnickle, S. 2005. Importance of root growth in overcoming planting stress. *New Forests* 30:273-294.
- Habib, R., P. Millard & M.F. Proe. 1993. Modeling the seasonal nitrogen partitioning in young sycamore (*Acer pseudoplatanus*) trees in relation to nitrogen supply. *Annals of Botany* 71:453-459.
- Heredia, N., P. Villar-Salvador, P. Millard, J. Cuadrado y M. Uscola. 2008. La disponibilidad de N en el suelo no influye en la cantidad de N removilizado de la bellota en las primeras etapas del

- desarrollo de plántulas de *Quercus ilex*. Actas del congreso: XII Simposio Ibérico Sobre Nutrición Mineral de las Plantas. Nutriplant 2008.
- Hsu, H. 1986. Chelates in plant nutrition. In: Foliar feeding of plants with aminoacids chelates. California. (eds): Ashmead, H. DeWayne. NAL/USDA (USA). pp 209-216.
- Ingestad, T. 1979. Mineral nutrient requirement of *Pinus silvestris* and *Picea abies* seedlings. *Physiologia Plantarum* 45:373-380.
- Kielland, K., J. McFarland & K. Olson. 2006. Amino acid uptake in deciduous and coniferous taiga ecosystems. *Plant and Soil* 288:297-307.
- Landis, T.D. 1985. Mineral nutrition as an index of seedling quality. In: Evaluating seedling quality: principles, procedures and predictive abilities of major tests. Forest Research Laboratory. Oregon State University pp 29-48.
- Landis, T., R. Tinus, A.J.S. McDonald & J.P. Barnett. 1989. Formulating liquid fertilizer solutions In: The Container Tree Nursery Manual (4) Seedling nutrition and irrigation. Eds. T.D. Landis, R.W. Tinus, S.E. McDonald, J.P. Barnett. Agricultural handbok. Department of Agriculture, Forest Service. United States of America. Pp 35-50.
- Lang, B. & W.M. Kaiser. 1994. Solute content and energy status of roots of barley plants cultivated at different pH on nitrate or ammonium-nitrogen. *New Phytologist* 128: 451-459.
- Larcher, W. 1995. *Physiological Plant Ecology*. Springer, Berlin. 506 pp.
- Lea-Cox, J.D. & J.P. Syvertsen. 1995. Nitrogen uptake by citrus leaves. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 120: 505-509.
- Lloret, F., C. Casanovas & J. Peñuelas. 1999. Seedling survival of Mediterranean shrubland species in relation to root:shoot ratio, seed size and water and nitrogen use. *Functional Ecology* 13: 210-216.
- Marschner, H. 1995. *Mineral nutrition of higher plants*. 2nd Ed. Academic Press, New York.
- Millard, P. 1996. Ecophysiology of the internal cycling of nitrogen for tree growth. *Zeitschrift für Pflanzenernahrung und Bodenkunde* 159:1-10.
- Miller, R.E. 1981. Response of Douglas-fir to foliar fertilization. In: Process of forest fertilizer conf., Eds. S.P. Gessell. Institute of forestry Resources Contribution. N° 40, University of Washington, Seattle 62-68.
- Montville, M.E., D.L. Wenny & R.K. Dumroese. 1996. Foliar Fertilization during bud initiation improves container-grown ponderosa pine seedling viability. *Western Journal of Applied Forestry* 11(4):114-119.

- Moreno, S., P. Villar-Salvador y J.L. Peñuelas Rubira. 2005. Dependencia del crecimiento radical de la fotosíntesis del momento en especies perennifolias mediterráneas. Implicaciones para las repoblaciones. IV Congreso Forestal Español. Zaragoza (España) Publicado en CD-ROM.
- Näsholm, T. & J. Persson. 2001. Plant acquisition of organic nitrogen in boreal forests. *Physiologia Plantarum* 111:419-426.
- Navarro R.F., P. Villar-Salvador & A. del Campo. 2006. Morfología y establecimiento de los plantones. En: Calidad de planta forestal para la restauración en ambientes mediterráneos. Estado actual de conocimientos. Eds J. Cortina, J.L. Peñuelas, J. Puértolas, R. Savé & A. Milagrosa. OAPN-MMA (España). Pp 67-88.
- Nyman, L.P., J.P. Davis, S.J. O'Dell, J. Arditto, G.C. Stephens & D.H. Benzing. 1987. Active uptake of amino acids by leaves of an Epiphytic vascular plant, *Tillandsia paucifolia* (Bromeliaceae). *Plant physiology* 83: 681-684.
- Öhlund, J. & T. Näsholm. 2001. Growth of conifer seedlings on organic and inorganic nitrogen sources. *Tree Physiology* 21:1319-1326.
- Oliet, J.A., A. Valdecantos, J. Puértolas & R. Trubat. 2006. Influencia del estado nutricional y el contenido en carbohidratos en el establecimiento de las plantaciones. En: Calidad de planta forestal para la restauración en ambientes mediterráneos. Estado actual de conocimientos. Eds J. Cortina, J.L. Peñuelas, J. Puértolas, R. Savé & A. Milagrosa. OAPN-MMA (España). Pp 89-117.
- Oliet, J.A., E. Robredo, J.M. Salazar & R. Villar. 2008a. Fertilización otoñal de encina en vivero: efectos sobre la morfología, nutrientes, potencial de enraizamiento y respuesta post-trasplante. Actas del congreso: XII Simposio Ibérico Sobre Nutrición Mineral de las Plantas. Nutriplant 2008.
- Oliet, J., R. Planelles, F. Artero, R. Valverde, D.F. Jacobs & M.L. Segura. 2008b. Field performance of *Pinus halepensis* planted in Mediterranean arid conditions: relative influence of seedling morphology and mineral nutrition. *New Forests* DOI 10.1007/s11056-008-9126-3.
- Plassard, C., B. Bonafos & B. Touraine. 2000. Differential effects of mineral and organic N sources, and of ectomycorrhizal infection by *Hebeloma cylindrosporum*, on growth and N utilization in *Pinus pinaster*. *Plant, Cell and Environment* 23:1195-1205.
- Persson, J., P. Högberg, A. Ekblad, M.N. Högberg, A. Nordgreen & T. Näsholm. 2003. Nitrogen acquisition from inorganic and organic sources by boreal forest plants in the field. *Oecologia* 137: 252-257.

- Peuke, A.D., W.D. Jeschke, L. Schreiber, K.J. Dietz & W. Hartung. 1998. Foliar application of nitrate or ammonium as sole nitrogen supply in *Ricinus communis*. I. Carbon and nitrogen uptake and inflows. *New Phytologist* 138: 675-687.
- Plan Forestal Español. 2002-2032. Aprobado por Consejo de Ministros el 5 de julio de 2002. Ministerio de Medio Ambiente.
- Raven, J.A., B. Wollenweber & L.L. Handley. 1992. A comparison of ammonium and nitrate sources for photolithotrophs. *New Phytologist* 121:19-32.
- Rothstein, D.E. & B.M. Cregg. 2005. Effects of nitrogen form on nutrient uptake and physiology of Fraser fir (*Abies fraseri*). *Forest Ecology and Management* 219:69-80.
- Saborío, F. 2002. Bioestimulantes en fertilización foliar. En: Fertilización foliar. Principios y aplicaciones. Eds. G. Meléndez y E. Molina. UCR- CIALSF. Costa Rica pp 107-125.
- Salifu, K.F. & V.R. Timmer. 2003. Nitrogen retranslocation response of young to nitrogen-15 supply. *Soil Science Society of America Journal* 67: 309-317.
- Salisbury, F.B. & C.W. Ross. 1994. Fisiología vegetal. Editorial Iberoamericana. 759 pp.
- Sardans, J., F. Rodá & J. Peñuelas. 2004. Phosphorus limitation and competitive capacities of *Pinus halepensis* and *Quercus ilex* ssp. *rotundifolia* on different soils. *Plant Ecology* 174: 307-319.
- Sotiropoulos, T.E., G.N. Mouhtaridou, T. Thomidis, V. Tsirakoglou, K.N. Dimassi & I.N. Therios. 2005. Effects of different N-sources on growth, nutritional status, chlorophyll content, and photosynthetic parameters of shoots of the apple rootstock MM106 cultured in vitro. *Biologia Plantarum* 49(2):297-299.
- Swietlik, D. & Y. Faust. 1984. Foliar nutrition of fruit crops. *Horticultural Reviews* 6:287-355.
- Tateno, R. & H. Takeda. 2003. Forest structure and tree species distribution in relation to topography-mediated heterogeneity of soil nitrogen and light at the forest floor. *Ecological Research* 18: 559-571.
- Tilman, D. 1987. Secondary succession and the pattern of plant dominance along experimental nitrogen gradients. *Ecological Monographs* 57:189-214.
- Trinidad, A. & D. Aguilar. 1999. Fertilización foliar, un respaldo importante en el rendimiento de los cultivos. *Terra Latinoamericana* 17(003): 247-255.
- Valladares, F., E. Martínez-Ferri, L. Balaguer, E. Pérez-Corona & E. Manrique. 2000. Low leaf-level response to light and nutrients in Mediterranean evergreen oaks: a conservative resource-use strategy?. *New Phytologist*. 148:79-91.

- Van den Driessche, R. 1988. Nursery growth of conifer seedlings using fertilizers of different solubilities and application time, and their forest growth. *Canadian Journal of Forestry Research* 18:172-180.
- Vilagrosa, A., P. Villar-Salvador & J. Puértolas. 2006. El endurecimiento en vivero de especies forestales mediterráneas. En: *Calidad de planta forestal para la restauración en ambientes mediterráneos. Estado actual de conocimientos*. Eds J. Cortina, J.L. Peñuelas, J. Puértolas, R. Savé & A. Milagrosa. OAPN-MMA (España) pp 89-117.
- Villar-Salvador, P. 2003. Importancia de la calidad de la planta en los proyectos de revegetación. En: *Restauración de Ecosistemas en Ambientes Mediterráneos*. Eds. J.M. Rey-Benayas, T. Espigares Pinilla & J.M. Nicolau Ibarra. Universidad de Alcalá Asociación Española de Ecología Terrestre pp 65-86.
- Villar-Salvador, P., R. Planelles, E. Enríquez & J. Peñuelas Rubira. 2004. Nursery cultivation regimes, plant functional attributes, and field performance relationships in the Mediterranean oak *Quercus ilex* L. *Forest Ecology and Management* 196:257-266.
- Villar-Salvador, P., J. Puértolas, J.L. Peñuelas & R. Planelles. 2005. Effect of nitrogen fertilization in the nursery on the drought and frost resistance of Mediterranean forest species. *Investigaciones Agrarias: sistemas y recursos forestales* 14(3): 408-418.
- Vitousek, P.M., J.R. Gosz, C.C. Grier, J.M. Melillo, W.A. Reiners & R.L. Todd. 1979. Nitrate losses from disturbed ecosystems. *Science* 204:469-474.
- Warren, C.R. & M.A. Adams. 2002. Possible causes of slow growth of nitrate-supplied *Pinus pinaster*. *Canadian Journal of Forest Research* 32: 569-580.
- Warren, C.R. & M.A. Adams. 2004. Evergreen trees do not maximize instantaneous photosynthesis. *Trends in Plant Science* 9(6):270-274.
- Wójcik, P. 2004. Uptake of mineral nutrients from foliar fertilization (review). *Orchard management in sustainable fruit production* 12: 201-218.