

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. LOCALIZACIÓN DE LOS ENSAYOS

La parte experimental fue realizada en uno de los invernaderos de la Estación Experimental Agroalimentaria “Tomás Ferro”, perteneciente a la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica de la Universidad Politécnica de Cartagena; ubicada en el municipio de La Palma (37° 40’N; 0° 59’W). Este trabajo duró desde el 7 de Noviembre de 2005 hasta el 17 de Julio de 2006.

3.2. MATERIAL VEGETAL UTILIZADO

Se utilizaron 225 plantas silvestres de mirto (*Myrtus communis*) y otras tantas de madreselva (*Lonicera implexa*), que fueron recibidas ya enraizadas del vivero, en bandejas de plástico negro. El material vegetal se encontraba en condiciones idóneas; sin semillas de malas hierbas ni plantas de otras especies, homogeneidad genética, sin enfermedades ni ningún tipo de problema fitosanitario ni fisiológico, sin ningún tipo de residuo tóxico.



Figura 1. Plantas de madreselva recién recibidas, antes de ser transplantadas



Figura 2. Plantas de mirto recién recibidas, antes de ser transplantadas

3.3. FASE DE VIVERO

3.3.1. TRANSPLANTE

El día 7 de Noviembre, el total de las 450 plantas fueron transplantadas manualmente en macetas (una por maceta), con un sustrato que era mezcla de 1/3 de turba; 1/3 de arena y 1/3 de tierra. La mezcla se realizó en una hormigonera eléctrica. La utilización de arenas en pequeñas cantidades para la preparación de sustratos es muy corriente en mezclas para aumentar el peso y mejorar la estructura. El grano no debe desagregarse fácilmente ni ser demasiado grueso.

Las macetas eran rectangulares, de polietileno negro y con volumen de 2500 ml. El transplante se realizó colocando los cepellones a ras del sustrato y cuidando que el cuello de la planta quedara por encima para prevenir de ciertos riesgos fitosanitarios.

Todas las macetas se trasladaron a un invernadero frío y se dispusieron en 12 filas (4 filas en cada uno de los 3 sectores de riego), cada una de ellas con una mitad de plantas de mirto y otra mitad de madreSelva. En estas condiciones, las plantas crecieron durante un mes para aclimatarse antes de ser sometidas a los diferentes tratamientos de riego y paclobutrazol.



Figura 3. Disposición de las macetas dentro del invernadero

3.3.2. CONTROL FITOSANITARIO

El único problema fitosanitario fue el oidio que apareció en las plantas de madreseña pocos días después de la plantación y que condicionó su crecimiento y desarrollo, en especial en algunos ejemplares. Para combatirlo se les aplicaron 2 fungicidas: Topsin 70 metil-tiofanato (0,05-0,1%) y Ortene 75 acefato (0,05-0,15%).



Figura 4. Ejemplar de madreseña con claros síntomas de oidio

3.3.3. PINZADO

El 15 de Diciembre se pinzaron las plantas de madreseña cuyo tallo principal había crecido en exceso para favorecer el crecimiento de brotes laterales.

3.3.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AGUA DEL SUSTRATO UTILIZADO

Para determinar el contenido de agua del sustrato se utilizó el método gravimétrico, para lo cual se pesó una maceta llena de sustrato y saturada de agua y se metió en una estufa a 60° C, donde se dejó 24 horas para volver a pesarla completamente seca y así obtener, mediante diferencia de pesos, la cantidad de agua que tenía la maceta saturada.

3.3.5. ESTUDIO DE LA VARIACIÓN DEL CONTENIDO DE AGUA DEL SUSTRATO TRAS SATURACIÓN Y SU RELACIÓN CON EL POTENCIAL HÍDRICO

Con el objetivo de poder establecer criterios de riego basados en los valores del potencial hídrico del sustrato, medido con sondas Watermark, se estudió la variación en el contenido de agua del sustrato tras su saturación y la relación entre contenido de agua del sustrato y potencial hídrico. Para ello se cogieron 3 macetas vacías y se rellenaron de sustrato, pero sin planta, se le colocó una sonda Watermark a cada una y se regaron a saturación, midiendo su potencial y peso.

Cada día se volvieron a pesar y a medir su potencial hasta que hubieron perdido todo el agua, pudiendo calcularse así la variación del contenido de agua y del potencial hídrico respecto al tiempo y la relación entre potencial hídrico y contenido de agua.



Figura 5. Las tres macetas con las sondas Watermark para medirles el potencial hídrico

3.3.6. TRATAMIENTO DE RIEGO

Durante el mes de aclimatación todas las plantas tuvieron el mismo riego, aplicándose de forma manual. A primeros de diciembre se aplicó el tratamiento diferencial de riego, control y deficitario, mediante goteros autocompensantes de los cuales salían 2 emisores por planta. Los goteros tenían un caudal teórico de 2 litros/hora, aunque se realizó una prueba de campo para comprobar con exactitud el verdadero caudal. Para ello se abrió el riego durante 10 minutos y se vertió el caudal de 3 goteros en un vaso cada uno; se midieron y se comprobó que los 3 eran de 370 mililitros. Se calculó que según el caudal teórico, en 10 minutos tendrían que haberse recogido 333,33 ml, en lugar de 370, con lo que mediante una regla de tres se obtuvo que había un error de un 11% de exceso sobre lo previsto, con lo que se pudo deducir que el caudal verdadero de los emisores era de 2,2 l/h.

En cuanto a las dosis de riego, se comenzó regando con 700 ml a las plantas control, para mantener un drenaje del 20% del riego aplicado; y con 300 a las de riego deficitario (43% que a las control), para posteriormente, una vez que las plantas control hubieran perdido 350 ml, regarlas con dicha cantidad, y a las deficitarias con 150 ml. Para saber cuándo habrían perdido esa cantidad de agua y por tanto habría que volver a regar, cada 2 días se pesaban 10 macetas de riego control, para poder calcular el agua que iban perdiendo y estimar qué día habrían perdido aproximadamente 350 ml; estas 10 macetas eran siempre las mismas y fueron elegidas el primer día de forma aleatoria. Finalmente se observó que tardaban una semana en perder la dosis indicada, por lo que se estableció regar los jueves. Antes de regar volvían a pesarse las 10 macetas para regar las plantas control exactamente con la misma cantidad de agua que hubieran perdido en esa semana, y las deficitarias con un 43%. También se pesaban 10 macetas de cada línea antes y después de regar para comprobar que se había regado con la dosis deseada.

Otro criterio que se utilizó para conocer cuando se tenían que regar las macetas fue el valor del potencial hídrico del sustrato. Para ello, se colocaron sondas Watermark en 18 macetas, una sonda por maceta, a unos 10 cm de profundidad para medir la tensión del agua en el sustrato.

Una vez colocadas las sondas, se tomaron datos de dicha tensión cada 2 días, los mismos en que se pesaban las macetas para determinar la cantidad de agua perdida, y poder así establecer una relación entre la variación de la cantidad de agua en ml y la

variación del potencial hídrico. Los días que tocaba regar, también se medía el potencial hídrico antes y después del riego.

3.3.7. TRATAMIENTO CON PACLOBUTRAZOL

El día 7 de Diciembre se dio la primera aplicación de paclobutrazol a la mitad de las macetas, dejando la otra mitad como plantas control. El producto comercial empleado fue Cultar (paclobutrazol 25% p/v). Con él se preparó un caldo que contenía 3 ml de Cultar en 1,5 litros de agua para el mirto; y 6 ml de Cultar en 1,5 litros de agua para la madreSelva; en ambos casos se aplicaron 10 ml de caldo por maceta; por tanto la dosis aplicada de paclobutrazol fue de 5 mg/maceta al mirto y de 10 mg/maceta a la madreSelva. Los efectos del PBZ fueron insignificantes, por lo que se optó por aumentar la dosis.

La siguiente aplicación se dio el 15 de Febrero, en este caso cada 800 ml de caldo contenían 9,6 ml de Cultar; aplicando 30 ml de caldo por maceta. La dosis aplicada fue por tanto de 30 mg/maceta de paclobutrazol.

El último tratamiento con PBZ fue el día 23 de Marzo, la proporción de Cultar era de 36 ml en 900 ml de caldo; con una dosis de 5 ml de caldo por maceta, que contenía 50 mg de paclobutrazol. La aplicación del caldo con PBZ era directa al sustrato utilizando una micropipeta.

3.3.8. MEDIDA DE PARÁMETROS DE ENDURECIMIENTO

A mediados de Mayo se dio por finalizada la fase de vivero, por lo que en ese momento se midieron los principales parámetros de endurecimiento de las plantas. Las plantas en las que se midieron medir dichos parámetros fueron seleccionadas de forma aleatoria.

3.3.8.1. PARÁMETROS FISIOLÓGICOS

Los parámetros hídricos fueron medidos sobre 4 ejemplares de cada tratamiento. El potencial hídrico foliar al mediodía (Ψ_{hmd}), usando una cámara de presión (Soil Moisture Equipment Co., Santa Barbara, CA, USA) (Scholander et al., 1965). El

potencial osmótico actual y a saturación (Ψ_{omd} , Ψ_{osat}) fueron medidos con un osmómetro de presión de vapor (Wescor 5520, Wescor Inc., Logan, UT, USA), según Gucci et al. (1991). El potencial de presión al mediodía (Ψ_{pmd}) se estimó por diferencia entre el Ψ_{h} y Ψ_{o} . La conductancia estomática (g_s) y fotosíntesis neta (P_n) fueron medidas sobre hojas expuestas al sol utilizando un aparato de intercambio gaseoso portátil, LI-6400.

La caracterización estomática se midió mediante la observación de los estomas, para lo cual se tomaron 20 muestras de hojas de cada especie (5 por tratamiento) en las que se mediría su densidad y apertura estomática. Éstas fueron llevadas al laboratorio donde fueron tratadas para su posterior observación. Para ello, primero fueron limpiadas con alcohol etílico. El siguiente proceso fue la deshidratación: el primer paso fue tener las hojas en distintas soluciones de acetona al 30, 50, 70, 90 y 100%, 15 minutos en cada una de ellas. Posteriormente, aún en acetona al 100% se llevaron a la cámara de deshidratación, cuyo funcionamiento es el siguiente: se le transfiere CO_2 a la muestra, se enfría hasta los 10°C y se llena y vacía de CO_2 6 veces, volviendo a llenarlo para dejarlo así; se vuelve a subir la temperatura hasta que a 20°C comienza a caer el nivel de líquido. El punto crítico del CO_2 se alcanza a unos $33\text{-}40^\circ\text{C}$ y 87 bar. Sale el CO_2 , y se ajusta el regulador, bajando la presión hasta alcanzar la presión atmosférica en 10 minutos. Una vez concluido este proceso, las muestras estaban preparadas para el último paso, la metalización: las muestras se sometieron al vacío, descendiendo la presión hasta alcanzar el valor adecuado, se les inyectó un gas y fueron cubiertas de oro. La metalización duró 60 segundos, en unas condiciones de 2,2 KV y 15 mA.

Una vez metalizadas las muestras, se fueron colocando en un microscopio electrónico para el análisis de las superficies foliares. Para su observación hubo que ajustar el voltaje a 5 KV. Durante la observación se capturaron, a través de un equipamiento informático conectado al microscopio electrónico, 8 imágenes de cada hoja, 4 de ellas a 500 aumentos (para medir la densidad estomática) y las otras 4 a 2000 aumentos (para medir las dimensiones y apertura de los estomas).

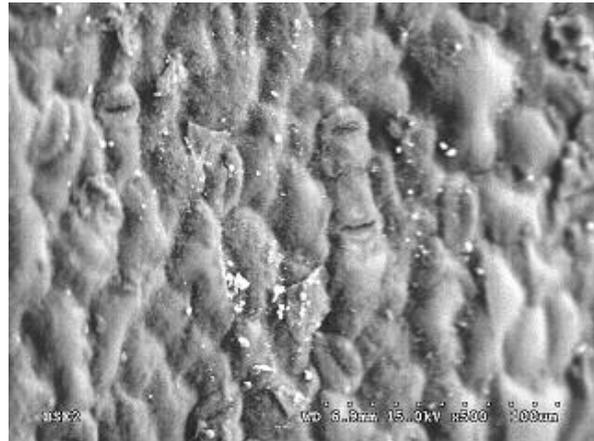


Figura 6. Imagen del haz de una hoja de madreselva donde pueden observarse los estomas

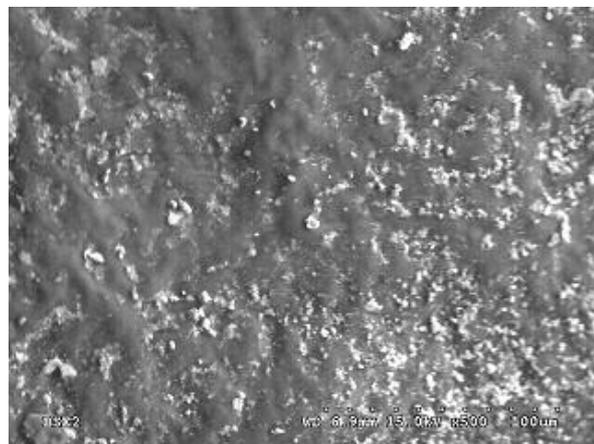


Figura 7. Imagen del envés de una hoja de madreselva donde pueden observarse los estomas

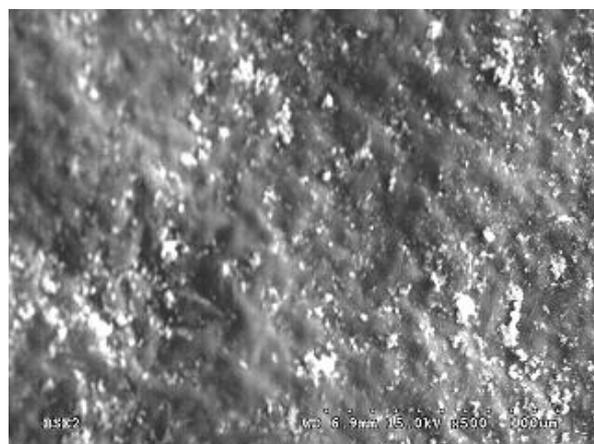


Figura 8. Imagen del haz de una hoja de mirto donde pueden observarse los estomas

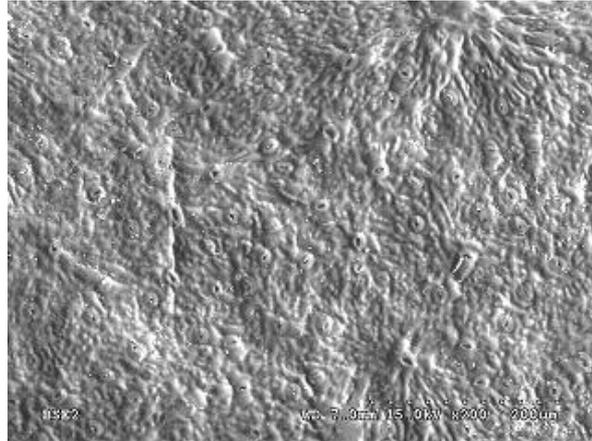


Figura 9. Imagen del envés de una hoja de mirto donde pueden observarse los estomas

3.3.8.2. PARÁMETROS MORFOLÓGICOS DE DESARROLLO AÉREO

Los parámetros de desarrollo aéreo se determinaron en 20 plantas por tratamiento, excepto el área foliar que se determinó en 4 plantas por tratamiento.

Para el mirto se midieron la altura de la planta (cm); la longitud de los entrenudos (cm); el diámetro del tallo (mm); el número de tallos, y a su vez los brotes secundarios de cada uno; el área foliar; el peso fresco y el peso seco aéreo.

Para la madreelva se midieron el número de tallos, y a cada uno de ellos su longitud (cm), diámetro (mm) y número de brotes secundarios; el área foliar; el peso fresco y el peso seco aéreo.

En las 20 plantas por tratamiento también se midió el contenido relativo de clorofila en 3 hojas (CRC) determinado con un medidor DELTA-T.

El área foliar sólo se determinó en 4 plantas por tratamiento de cada especie (16 en total para mirto y otras 16 en total para madreelva); para ello se defoliaba cada uno de los ejemplares en los cuales se iba a tomar la medida y se colocaban las hojas, intentando que quedaran lo menos dobladas posible, en la base de un medidor de área foliar DELTA-T, previamente calibrado, que instantáneamente obtenía el área total.



Figura 10. Medidor de área foliar DELTA-T

Los pesos aéreos se midieron en todas las plantas seleccionadas de mirto, y sólo en 4 por tratamiento de madreSelva. Primero se medía el peso fresco, con una báscula de precisión; después el material vegetal se colocaba en una estufa donde se mantenía 24 horas para que perdiera todo el agua y poder medirle el peso seco.

3.3.8.3. PARÁMETROS MORFOLÓGICOS DE DESARROLLO RADICAL

Los parámetros relacionados con la morfología radical se determinaron en 4 plantas por tratamiento (las mismas 4 plantas de cada tratamiento que habían sido elegidas para medir el área foliar). Las raíces primero se lavaron bien para eliminar toda la tierra y una vez limpias se utilizaron para varias mediciones; para el peso fresco y el peso seco se siguió el mismo procedimiento que con la parte aérea.

Para medir en las raíces su longitud total y su diámetro, éstas fueron separadas de la planta y lavadas utilizando agua a baja presión para evitar pérdidas de raíces principalmente secundarias. La fragilidad del sistema radical hace que su análisis sea más complicado.

Una vez limpia la raíz, sin ningún resto de tierra se introducía en una placa, con un poco de agua, a un escáner conectado a un ordenador, que disponía de un programa

de análisis del sistema radicular (WINRHIZO); capaz de determinar longitudes, diámetros, ramificaciones, volumen, densidad, áreas, etc.

3.4. FASE DE ESTABLECIMIENTO EN CAMPO

3.4.1. TRANSPLANTE AL ESTABLECIMIENTO DEFINITIVO

El 18 de mayo se realizó el transplante a macetas de polietileno negro de 6 litros de capacidad, con un sustrato compuesto de 2 partes de tierra, 1 de arena y 1 de turba rubia. Las macetas se colocaron en 4 filas en el interior del mismo invernadero utilizado en la fase de vivero, en el cual en los meses de verano se alcanzan valores muy elevados de temperatura, para simular lo que habría sido el establecimiento en campo en condiciones ambientales adversas.

Se regaron durante 2 horas y después con la manguera. A la semana siguiente, el día 25, se volvieron a regar durante una hora, e igual se hizo el día 5 de Junio; para darles el día 7 un último riego de 25 minutos. A partir de ahí no se vuelven a regar más, para poder ir comprobando cómo pierden agua y cómo van muriendo.

En el invernadero, durante el tiempo de ensayo se llegaron a alcanzar máximas de temperatura de 48°C y humedad relativa del 11%.

3.4.2. MEDIDA DE LA PÉRDIDA DE AGUA POR EVAPOTRANSPIRACIÓN DESPUÉS DEL ÚLTIMO RIEGO

De cada tratamiento se separaron 3 macetas, con sustrato + planta, en las cuales se pretendió calcular la pérdida de agua producida por la evapotranspiración, por lo que fueron pesadas cada 2 días a partir del último riego, para observar la cantidad de agua que iban perdiendo, en estas condiciones, los ejemplares que habían recibido cada tratamiento.

Para conocer la cantidad total de agua que contenía el sustrato utilizado regado a saturación, se pesó una maceta llena de sustrato y saturada de agua y se metió en una estufa a 60° C durante 48 horas, volviéndose a pesar transcurrido ese tiempo y estando la maceta completamente seca. La diferencia de pesos sería la cantidad total de agua que puede acumular ese volumen de sustrato.

3.4.3. MEDIDA DE LA MORTALIDAD

Una vez que las plantas dejaron de regarse se quedaron en condiciones que simulaban su transplante en campo en condiciones semiáridas. Cada 3-4 días se hizo un recuento de las plantas de cada tratamiento que habían muerto, dando por finalizado el ensayo el día 17 de julio.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los valores de los diferentes parámetros medidos, tanto fisiológicos como morfológicos, fueron sometidos a un estudio estadístico mediante un ANOVA bifactorial utilizando el programa informático Statgraphics Plus versión 2.1. Las diferencias significativas fueron determinadas por el Test de Duncan con un nivel de significancia del 95%.

Asimismo, los datos obtenidos en la fase de establecimiento de la pérdida de agua después del último riego también fueron sometidos a un ANOVA utilizando el programa informático Statgraphics Plus versión 2.1.