

# FERTILIZACIÓN NITROGENADA Y CONCENTRACIÓN DE CARBOHIDRATOS EN PLÁNTULAS DE *Pinus palustris* Mill. PRODUCIDAS A RAÍZ DESNUDA

## NITROGEN FERTILIZATION AND CARBOHYDRATE CONCENTRATION OF BARE-ROOT PRODUCED *Pinus palustris* Mill. SEEDLINGS

Dante A. Rodríguez-Trejo<sup>1</sup>, Mary L. Duryea<sup>2</sup>, Timothy L. White<sup>3</sup>

<sup>1</sup>División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. 56230. Chapingo, Estado de México. (dantearturo@yahoo.com). <sup>2,3</sup>School of Forest Resources and Conservation, 359 Newins Ziegler Hall. P. O. Box 110410, University of Florida, Gainesville, FL 32611-0410. (mld@gnv.ifas.ufl.edu, tlwhite@ufl.edu)

### RESUMEN

Se estudió el efecto de la aplicación adicional de nitrógeno en la dinámica de carbohidratos en *Pinus palustris* Mill. Se realizaron 0, 2 y 4 aplicaciones quincenales de 57 kg de N ha<sup>-1</sup> como nitrato de amonio, durante el otoño, en plántulas producidas a raíz desnuda en Florida. Se analizó la concentración de carbohidratos mediante el procedimiento con antrona. Al término del ciclo productivo las plántulas tuvieron una mayor concentración de almidones en las raíces laterales y en la raíz principal que en la parte aérea. A niveles bajos de nitrógeno la planta almacenó más almidones en la raíz, contando con más reservas como estrategia para establecerse en el sitio.

**Palabras clave:** *Pinus palustris*, carbohidratos, nitrógeno, raíz desnuda.

### INTRODUCCIÓN

El ecosistema de *Pinus palustris* Mill. es muy rico en diversidad de especies. Aparte de los trópicos, es uno de los ecosistemas con mayor biodiversidad, encontrándose en algunas localidades 140 especies por hectárea, incluyendo especies con estatus y especies endémicas (Peet y Allard, 1993). Este tipo de ecosistema abarcaba 37 millones de hectáreas en el sureste de los Estados Unidos antes de la llegada del hombre europeo, y se ha reducido a 1.5 millones por el cambio de uso de la tierra, talas, explotaciones resineras, apertura de líneas ferroviarias y por la supresión de incendios forestales (Landers *et al.*, 1995).

La restauración del ecosistema de *Pinus palustris* es uno de los principales objetivos de conservación en los EE.UU. La producción anual de esta especie se ha incrementado en los viveros forestales, alcanzando hasta 65 millones de plántulas, de las cuales 41.2% corresponden a raíz desnuda (Longleaf Pine Alliance, 1998).

Muchos factores inciden en la producción exitosa de plántulas de esta especie. Por ejemplo, la exposición de

### ABSTRACT

This research was conducted to study the effect of additional nitrogen fertilization on carbohydrate dynamics of *Pinus palustris* Mill. Biweekly applications of 57 kg ha<sup>-1</sup> (0, 2 and 4 extra, as ammonium nitrate) were done during the fall in bare-rooted *Pinus palustris* Mill., in Florida. Carbohydrate concentration was determined using the anthrone procedure. At the end of the productive cycle, plants had a larger starch concentration in tap and lateral roots, than in stem and needles. At low nitrogen levels, the seedling stored more starch in the root, having more reserves as strategy to get established in the site.

**Key words:** *Pinus palustris*, carbohydrates, nitrogen, bare-root.

### INTRODUCTION

The *Pinus palustris* Mill. ecosystem is one of the most species-rich ecosystems in the world outside of the tropics, with up to 140 species per hectare, in some areas, including endangered and endemic species (Peet and Allard, 1993). Originally longleaf ecosystems covered 37 million hectares in Southeastern United States but after colonization, change in land use, land clearing, logging, turpentine operations, construction of railroads, and fire suppression, its area was reduced to 1.5 million hectares (Landers *et al.*, 1995).

Restoration of *Pinus palustris* ecosystems is one of the main conservation objectives in the United States. Annual production of this specie in forest nurseries has increased reaching 65 million seedlings annually, of which 41.2% is bare-root. (Longleaf Pine Alliance, 1998).

Many factors contribute to successful nursery production of longleaf seedlings. For instance, exposure of roots during lifting should be minimized, packing should be carefully done, and the seedlings stored for only short periods (Barnett and Pesacreta, 1990). Low quality seedlings are the major reason for plantation failure (Barnett and McGilvray, 1997).

The most critical factors to produce bare-root longleaf pine seedlings include sowing in the fall, at a density of

Recibido: Septiembre, 2001. Aprobado: Octubre, 2002.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 36: 683-691. 2002.

las raíces durante la extracción debe ser mínima, además deben ser empacadas cuidadosamente y almacenadas por cortos periodos (Barnett y Pesacreta, 1990). La baja calidad de las plántulas es la principal causa de falla en las plantaciones (Barnett y McGilvray, 1997).

Los factores críticos para la producción de este pino a raíz desnuda incluyen: siembra en el otoño, a una densidad de 86 a 161 plantas  $m^{-2}$  (idealmente 108 a 129), para prevenir la competencia. También se usa el acolchado para reducir el salpicamiento. La poda vertical de raíces en el verano o a inicios del otoño promueve la fibrosidad. Se inocula con micorrizas (*Pisolithus tinctorius*), se trata a las raíces con Benomyl<sup>®</sup>, y fertilización a lo largo de la temporada de crecimiento y riego según sea necesario (Cordell *et al.*, 1990).

El desarrollo foliar profuso de esta especie produce sombra, por lo que parte del follaje debe ser podado, para permitir que la radiación solar alcance las acículas más bajas y para reducir la humedad y prevenir enfermedades (Brisette *et al.*, 1991).

Las plántulas de alta calidad son aquellas que exhiben buena supervivencia y crecimiento en un sitio en particular (Duryea, 1985). Este concepto involucra características morfológicas (forma y estructura) y fisiológicas (funciones y procesos vitales) (Johnson y Cline, 1991). En el caso de *Pinus palustris*, varios estudios muestran una correlación directa entre supervivencia y tamaño de la plántula en los primeros años después de plantar (Kais, 1980). Las características que indican una planta de calidad de esta especie, producida a raíz desnuda, son: diámetro del cuello de la raíz igual o mayor a 1 cm; por lo menos seis raíces laterales primarias con 2 mm o más de diámetro; sistema radical fibroso; 25% o más con ectomicorriza; una raíz principal con 15 cm o más de longitud y una yema bien desarrollada (Cordell *et al.*, 1990).

La información sobre las demandas nutricionales de *P. palustris* es escasa (Brisette *et al.*, 1990), aunque el nitrógeno (N) se aplica comúnmente en los viveros para aumentar el tamaño de la plántula (Fisher y Mexal, 1984). Existen resultados contradictorios. Hinesley y Maki (1980) encontraron que la fertilización en otoño aumentó el peso anhidro total, la relación biomasa aérea:biomasa subterránea y la concentración de nutrientes en plántulas de un año, sin afectar la supervivencia. Sin embargo, Schomaker (1969) refiere que el mismo tratamiento redujo la supervivencia al año de la plantación.

Concentraciones de azúcares de 2.5 a 4.6% se asocian con buenas supervivencias en campo (Barnett, 1984). Sin embargo, los intentos para correlacionar la concentración de azúcares y almidones en diferentes partes de la planta, han tenido poco éxito (Duryea y McClain, 1984; Johnson y Cline, 1991).

86 to 161 (108 to 129 is ideal) plants  $m^{-2}$  for preventing competition. After sowing, mulching is used to prevent sand splash. Vertical pruning of lateral roots by summer or early fall promotes root fibrosity. *Pisolithus tinctorius* (mycorrhizae) inoculation, treating the roots with Benomyl<sup>®</sup>, fertilizing throughout the growing season, and watering as necessary are also recommended (Cordell *et al.*, 1990).

The massive needle development of this species produces shade, so upper needle clipping is common to allow better exposure of lower needles to light, and to reduce humidity and disease (Brisette *et al.*, 1991).

High quality seedlings are those that exhibit good survival and growth on a particular site (Duryea, 1985). High quality involves interrelated morphological (shape and structure) and physiological (functions and vital processes) traits (Johnson and Cline, 1991). In the case of *Pinus palustris* several studies reveal a direct correlation between size of the seedlings and survival during the first year(s) after planting (Kais, 1980). Seedling characteristics resulting in good field performance of bare-root stock are: root collar diameter larger or equal to 1 cm; at least six primary lateral roots larger or equal to 2 mm in diameter; a fibrous root system; 25% or more of total feeder root ectomycorrhizae; a tap root larger or equal to 15 cm length, and a well-developed bud (Cordell *et al.*, 1990).

The information on the nutritional demands of *P. palustris* is scarce (Brisette *et al.*, 1990), yet in the nurseries nitrogen (N) is applied commonly to increase seedling size (Fisher and Mexal, 1984). Fall fertilization effects on longleaf pine are contradictory. In one study, fall fertilization increased seedling dry weight, shoot:root ratio, and nutrient concentrations in one year old seedlings, without any effect on survival (Hinesley and Maki, 1980). However, Schomaker (1969) indicated that the same treatment reduced first year survival.

Sugar concentrations from 2.5 to 4.6% are associated with acceptable field survival (Barnett, 1984b). However, attempts to correlate, sugar concentration and starch in different parts of the plant, have had little success (Duryea and McClain, 1984; Johnson and Cline, 1991).

Besides, there is variability in the starch and sugars concentrations from season to season, in several species, with the peaks by the end of winter, just before new growth in *P. elliotii* var. *elliotii* (Gholz and Cropper, 1991) and *P. taeda* (Birk and Matson, 1986).

The objectives of this research were: to determine the concentration and distribution of carbohydrates in different seedling parts; and to evaluate if the relationship between nitrogen availability, expressed as foliar nitrogen concentration and carbohydrate concentration, in the different seedling parts, could influence seedling establishment.

Asimismo, existe variabilidad en las concentraciones de almidones y azúcares en diferentes épocas del año, en varias especies, con los máximos a fines del invierno, poco antes del nuevo crecimiento, como se encontró en *P. elliottii* var. *elliottii* (Gholz y Cropper, 1991), y en *P. taeda* L. (Birk y Matson, 1986).

Los objetivos del presente trabajo fueron: determinar la concentración y distribución de carbohidratos en las diferentes partes de la planta; y si existe alguna relación entre la disponibilidad de nitrógeno, expresado como concentración foliar, y la concentración de carbohidratos en las diferentes partes de la planta, que puedan influir en su establecimiento.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Producción de plántulas y diseño experimental

La semilla se recolectó en un bosque de la compañía International Paper, cerca de Bainbridge, al sur del estado de Georgia, Estados Unidos (lote ICHLL93). El experimento se instaló en octubre de 1996 en el vivero Andrews, de la División Forestal de Florida, en el centro del Estado. Los suelos del vivero son casi planos, arenosos, bien drenados, profundos, con una capa arenosa delgada sobre un subsuelo limoso café a amarillo-rojizo, y una capa arcillo-limosa entre los 150 y 310 cm de profundidad, con pH de 4.5 a 6.0. Corresponden a la serie La Hogue, clasificados como argiudoles méxicos ácuicos, suborden Udoles, orden Molisoles (USDA Soil Conservation Service, 1986).

En el vivero no se hacen análisis de N en el suelo, pues se considera (empíricamente) que es mucho menor al requerido para producir árboles a raíz desnuda, además de la dificultad para interpretar cuánto está disponible. También se estima que no es necesario aplicar P, por estar disponible en niveles adecuados. El promedio de dos análisis llevados a cabo en el área del experimento fue el siguiente: pH=6.7, 0.9% de materia orgánica; y los siguientes contenidos de nutrimentos ( $\text{mg kg}^{-1}$ ): 50.5 de P, 28.5 de K, 541.5 de Ca, 39.5 de Mg, 14.5 de S, 0.65 de B, 0.9 de Cu, 162 de Fe, 86.5 de Mn, 2 de Zn, y 22.5 de Na.

Las semillas se sembraron mecánicamente, a una densidad de 100 por  $\text{m}^2$  y se acolcharon con aserrín. Las plántulas se fertilizaron varias veces (Cuadro 1), y se podó su follaje a 20-23 cm el 30 de mayo y el 23 de julio de 1997, a 28-30 cm el 8 de octubre de 1997, y a 15-18 cm el 20 de noviembre de 1997. También se les hicieron podas horizontales de raíz, a 20-23 cm el 22 de mayo y el 24 de septiembre de 1997; y poda lateral de raíz el 30 de julio de 1997. Las plantas fueron extraídas para su evaluación el 2 de febrero de 1998.

En el campo se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar, usando cinco camas de crecimiento como repeticiones. En cada cama (bloque) se tuvieron tres tratamientos, correspondientes a tres niveles de fertilización nitrogenada adicional, consistentes en 0, 2 y 4 aplicaciones quincenales de N ( $57 \text{ kg ha}^{-1}$ ), como nitrato de amonio durante el otoño de 1997. Cada unidad experimental tenía 600 plantas y 5 m de longitud por 1.2 m de anchura, con una zona de amortiguamiento de 0.6 m entre unidades experimentales. La longitud de cada bloque fue 17.4 m. Se utilizaron 9000 plántulas que correspondieron a los tres tratamientos y cinco bloques.

## MATERIALS AND METHODS

### Production of seedlings and experimental design

Seed was collected from International Paper Co. longleaf pine forests near Bainbridge, southern Georgia (seed lot ICHLL93). The experiment was installed in October 1996 at the Andrews forest nursery, Florida Division of Forestry in north central Florida. The soils in the nursery are nearly level, sandy, well drained and deep, with a thin dark colored sandy surface layer over a strong brown and a yellowish red loamy subsoil layer. The sandy clay loam is between 150 and 310 cm. The pH ranges from 4.5 to 6.0 for depths from 0 to 185 cm. These soils correspond to the Hogue series, and they are classified as acuc mesic, suborder udols, order mollisols (Soil Conservation Service, 1986).

Soil N analyses are not a common nursery practice because N levels are considered too low to produce bare-root seedlings and are difficult to interpret as to the amount available. The application of phosphorous is considered not necessary. The average of two soil analyses performed in the site was as follow: pH=6.7, 0.9% of organic matter; plus nutrient contents ( $\text{mg kg}^{-1}$ ): P 50.5, K 28.5, Ca 541.5, Mg 39.5, S 14.5, B 0.65, Cu 0.9, Fe 162, Mn 86.5, Zn 2, and Na 22.5.

Seeds were mechanically sown and covered with mulch. Seedling density was 100 per square meter. The seedlings were fertilized (Table 1), clipped at 20 to 23 cm on May 30 and July 23, 1997, at 28 to 30 cm on October 8, 1997, and at 15 to 18 cm on November 20, 1997. Also seedlings were root-pruned at 20 to 23 cm on May 22 and September 24, 1997, and vertical root pruned on July 30, 1997. The seedlings were lifted and evaluated on February 2<sup>nd</sup>, 1998.

The experiment was established along five contiguous beds in a randomized complete block experimental design, with five blocks and three N treatments. Each bed (block) had three treatment plots consisting of randomly assigned 0, 2, or 4 biweekly applications of N ( $57 \text{ kg ha}^{-1}$ ) as ammonium nitrate, applied in the fall 1997. Each experimental unit had 600 seedlings, 5 m long and 1.2 m wide, with a 0.6 m wide buffer zone among them. The length of each block was equal to 17.4 m. In total 9000 seedlings were produced, and corresponded to the three treatments and five blocks.

### Measurements

Eight seedlings per N treatment, block and stock type, for a total of 120 seedlings were sampled at the end of the nursery production cycle (October 1996 to February 1998). Each plant was separated into four components: needles, stem and bud, tap and lateral roots, for a total of 480 samples for sugar and starch measurement.

The N and P foliage concentration was determined (Table 2) from eight samples per experimental unit, for a total of 120 samples. Nitrogen was determined according to the micro Kjeldahl method (Bremner and Mulvaney, 1982). For P determination the Murphy-Riley (1962) method was used.

The sugar and starch extractions and measurement were according to the anthrone procedure (Yemm and Willis, 1954). For sugar determination, samples were dried, ground. Ethyl alcohol (80%) was

### Mediciones

Al término de la estancia en el vivero (octubre de 1996 a febrero de 1998), se tomaron ocho plántulas por unidad experimental (120 en total). Cada una fue separada en acículas, tallo y yema, raíz principal y raíces laterales (480 muestras), en las que se hicieron las determinaciones de azúcares y almidones.

La concentración de N y de P se obtuvo sólo para follaje (Cuadro 2), en ocho muestras por unidad experimental, para un total de 120 muestras. Se usó el método micro Kjeldahl para N (Bremner y Mulvaney, 1982) y el de Murphy-Riley (1962) para determinar P.

La extracción y determinación de azúcares y almidones se hizo con el procedimiento antrona (Yemm y Willis, 1954). Para la determinación de azúcares, las muestras fueron deshidratadas, molidas, se les aplicó alcohol etílico (80%) y fueron centrifugadas e incubadas alternativamente tres veces, recolectando los sobrenadantes cada ocasión. A éstos se les aplicó reactivo antrona y se les puso a hervir durante 15 min, para luego de ser enfriados proceder a hacer lecturas en espectrofotómetro. Se utilizó como referencia glucosa estándar.

Para los almidones se usaron los tejidos de los que se extrajeron los sobrenadantes. Se les aplicó agua deionizada y se pusieron a hervir durante 30 min. Luego se les aplicó enzima amiloglucosidasa, para ser incubadas por dos horas, a 37 °C. Nuevamente se les puso en agua hirviendo para detener la acción enzimática. Los extractos fueron filtrados al vacío, se les puso agua destilada, se les agregó reactivo antrona y fueron puestos a hervir por 15 min. Luego de ser enfriados se hicieron las lecturas en espectrofotómetro. Se emplearon como referencia estándares de glucosa a diferentes concentraciones.

### Modelos estadísticos y procesamiento de datos

Para la concentración de nutrimentos se usó el modelo de bloques completos al azar, y para el análisis de carbohidratos se incorporó el factor parte de la planta.

Los cálculos estadísticos se realizaron en SAS (SAS Institute, 1997 versión 6.12 para microcomputadora). Se utilizó el procedimiento Mixto (Proc Mixed). Los grados de libertad fueron determinados con la opción Satterthwaite (ddfm=satterth). Los errores estándar se obtuvieron mediante la instrucción lsmeans. (Littell *et al.*, 1999). Se utilizaron contrastes ortogonales para determinar la tendencia de la concentración de carbohidratos a diferentes niveles de N.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con base en criterios morfológicos, la planta utilizada fue de calidad. No hubo diferencias significativas en el diámetro de los tallos entre los tres tratamientos (13.8, 14.2 y 14.4 mm; para 0, 2 y 4 aplicaciones de N). Tampoco hubo diferencias en número de raíces laterales (21.7, 23.1 y 22.8), ni en la biomasa de la raíz (8.0, 7.9, 8.4 g).

### Nitrógeno y fósforo

Las concentraciones de N en follaje aumentaron con la fertilización nitrogenada (Cuadro 2). Ésta es una

**Cuadro 1. Fertilización de las plántulas de *Pinus palustris* producidas a raíz desnuda.**

**Table 1. Fertilization of bare-root produced *Pinus palustris* seedlings.**

Fecha	Fuente	Forma <sup>†</sup>	Dosis (kg ha <sup>-1</sup> )	N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
15 Oct 96	Azufre a 50%	Granular	560	-	-
16 Oct 96	Fosfato diamónico	Granular	224	40	108
16 Oct 96	Sul-Po-Mag	Granular	560	-	-
17 Oct 96	Nitro form	Granular	336	128	-
13 Mar 97	Sulfato de amonio	Granular	224	47	-
20 May 97	Sul-Po-Mag	Granular	224	-	-
13 Jun 97	Solución de nitrato (Uran) <sup>¶</sup>	Líquido	46.8 <sup>§</sup>	17	-
16 Jun 97	Sulfato de amonio	Granular	168	35	-
2 Jul 97	Sul-Po-Mag	Granular	168	-	-
15 Jul 97	Solución de nitrato (Uran) <sup>¶</sup>	Líquido	46.8 <sup>§</sup>	17	-
23 Jul 97	Boro soluble (Sol-U-Bor)	Granular	11	-	-
25 Jul 97	Solución de nitrato (Uran) <sup>¶</sup>	Líquido	37 <sup>§</sup>	13	-
7 Ago 97	Nitrato de amonio	Granular	168	55	-
29 Sep 97	Muriato de potasio	Granular	112	-	-

<sup>†</sup> Los fertilizantes líquidos se aplicaron con el sistema de riego ♦ Liquid fertilizers were applied with the irrigation system.

<sup>¶</sup> Peso específico = 1.28 kg L<sup>-1</sup> ♦ Specific weight = 1.28 kg L<sup>-1</sup>.

<sup>§</sup> L ha<sup>-1</sup>.

**Cuadro 2. Concentración de N y P foliar (%) y relación P:N de brinzales de *Pinus palustris*, por tratamiento de nitrógeno.**

**Table 2. Concentration of foliar N and P (%) and P:N ratio for *Pinus palustris* seedlings, by nitrogen treatment.**

Nutriente	Tratamiento con nitrógeno <sup>†</sup>			p
	0	2	4	
N	0.81a <sup>¶</sup>	0.97ab	1.11b	0.0011
P	0.097a	0.111b	0.115b	0.0026
Relación P:N	0.120a	0.114ab	0.104b	0.0310

<sup>†</sup> Número de aplicaciones adicionales de N ♦ Number of N additional applications.

<sup>¶</sup> Cifras seguidas de letras distintas en la misma línea, son estadísticamente diferentes (p≤0.05) ♦ Values with different letters in the same row are statistically different (p≤0.05).

added and then samples were incubated and centrifuged alternately three times. The liquid sample (supernatant) with the extracted sugars was collected each time. Anthrone reagent was added and then samples were placed in a boiling water bath for 15 minutes. The samples were then cooled and immediately read with a spectrophotometer. A glucose standard was used as a reference.

The remnant tissue from the sugar extractions was used to extract starches. Deionized water was added and the samples were placed in a boiling water bath for 30 minutes. Then the enzyme amyloglucosidase was added, and the samples were left incubating at 37 °C in a water

respuesta común (Hinesley y Maki, 1980; Entry *et al.*, 1998). Parte del N foliar es un componente de la enzima rubisco (ribulosa 1, 5-bifosfato carboxilasa-oxigenasa), que cataliza la incorporación inicial de CO<sub>2</sub> en azúcar, y la cual representa más de 20% del N en algunas especies (Margolis y Brand, 1990). El N extra acumulado en el follaje representa una ventaja, pues los árboles recientemente trasplantados dependen de los nutrimentos que tienen almacenados en tanto se establecen (Landis, 1985). Por ejemplo, entre 50 y 90% de las necesidades de N y P son proporcionadas por el follaje senescente (Landsberg y Gower, 1997).

Los niveles foliares de N encontrados en la presente investigación no alcanzaron los niveles óptimos reportados en otras coníferas (1.7 a 2.3%), según Duryea y McClain (1984).

Para P se observó una tendencia similar a la del N, aunque menos acentuada, ya que la relación P:N fue menor a mayor fertilización nitrogenada (Cuadro 2). Reich y Schoettle (1988) puntualizan que se han encontrado relaciones positivas, neutrales e incluso negativas entre la concentración de N foliar y la capacidad fotosintética neta en diferentes especies. Por lo anterior, la eficiencia en el uso de N en la fotosíntesis y el crecimiento subsecuente son directamente dependientes de una suficiente disponibilidad de otros nutrimentos, particularmente P. Los autores citados señalan que las relaciones P:N menores al intervalo 0.10 a 0.14% en *P. strobus* L. resultan en P insuficiente para un uso eficiente del N. En el presente experimento, la relación P:N fue mayor a 0.10 en todos los niveles de N; además, la concentración de P fue mayor que 0.08%, valor mínimo necesario para *P. palustris* adultos (Mills y Jones, 1996). Entonces, el P parece no limitar el crecimiento.

### Azúcares y almidones

No se presentaron efectos principales de las dosis de N en la concentración de azúcares, aunque sí interacción significativa entre los tratamientos con N y las partes de la plántula (Cuadro 3). Solamente los tallos mostraron diferencias, con menores concentraciones de azúcares a mayores niveles de N. Las mayores concentraciones se tuvieron en las partes subterráneas (Cuadro 4).

No se encontraron diferencias significativas ( $p=0.2099$ ), en la concentración de almidones entre los niveles de N (47.7, 44.3 y 28.0 mg g<sup>-1</sup>, para 0, 2 y 4 aplicaciones de N), aunque sí las hubo ( $p=0.0001$ ) entre diferentes partes de las plántulas (Figura 1). Las mayores concentraciones se presentaron en la raíz principal (61 mg g<sup>-1</sup>) y en las raíces laterales (52.2 mg g<sup>-1</sup>), seguidas del tallo (27.2 mg g<sup>-1</sup>) y acículas (21.2 mg g<sup>-1</sup>). Esto evidencia que en el invierno la raíz cuenta con más reservas que la parte aérea. Analizando cada parte de la plántula de

bath for two hours. Once the incubation was completed, the samples were placed in a boiling water bath, to stop the enzyme reaction. The extracts were vacuum filtered, and then deionized water was applied.

Anthrone reagent was added and samples were placed in a boiling water bath for 15 min. After that time, samples were left to cool. The next step was to read the samples in the spectrophotometer. Glucose standards at different concentrations were utilized as reference.

### Statistical models and data processing

A randomized complete block model was used. For the case of carbohydrates, the factor part of plant was included.

The statistical analyses were performed using SAS (SAS Institute, 1997, version 6.12 for microcomputers), specifically the mixed procedure (Proc Mixed). The degrees of freedom were determined with the Satterthwaite option (ddfm=satterth), and the standard errors were obtained with lsmeans (Littell *et al.*, 1999). Orthogonal contrasts were applied to determine if a trend for carbohydrate concentration existed among the N treatments.

## RESULTS AND DISCUSSION

According to morphological criteria, the seedlings used in this experiment were high quality. There were no differences in stem diameter among the three treatments (13.8, 14.2 and 14.4 mm; for 0, 2 and 4 N applications). Similarly, there was no difference in number of lateral roots (21.7, 23.1 and 22.8), nor in the root biomass (8.0, 7.9, 8.4 g).

### Nitrogen and phosphorous

Foliar N concentration increased with increasing levels of fertilization (Table 2). This is a common response (Hinesley and Maki, 1980; Entry *et al.*, 1998). Part of the foliar N is a component of the rubisco enzyme (ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase-oxygenase), that catalyzes the initial incorporation of CO<sub>2</sub> into sugar, and that alone can account for over 20% of leaf N in some species (Margolis and Brand, 1990). The extra supply of N accumulated in foliage is advantageous, because recently planted seedlings must rely on a supply of stored nutrients until they get established (Landis, 1985). For example, 50 to 90% of the N and P needs are supplied from senescent foliage (Landsberg and Gower 1997).

The foliar N levels found in the present research did not reach the optimum levels reported for other conifers (1.7 to 2.3%) by Duryea and McClain (1984).

Although less pronounced, the trend for P was similar to the N trend. The P:N ratio was lower at higher nitrogen fertilization (Table 2). Reich and Schoettle (1988) indicate that there are positive, neutral and even negative relationships between leaf N and net photosynthetic capacity in different species. Therefore the relative use efficiency of N in photosynthesis, and the subsequent

**Cuadro 3. Concentración de azúcares (mg g<sup>-1</sup> de peso anhidro) por tratamiento de nitrógeno y parte de la plántula.**  
**Table 3. Sugar concentration (mg g<sup>-1</sup> dry weight) by N fertilization treatment and seedling part.**

Nitrógeno (N):	0	2	4	p	
	117.12a	106.22a	113.34a	0.5355	
Parte (P):	RP	RL	T	A	p
	163.7a	136.95b	104.57c	43.64d	0.0001
Interacción N x P	0.0244				

0, 2, 4 = Aplicaciones quincenales de 57 kg ha<sup>-1</sup> de N extra ♦ 0, 2, 4 = Biweekly applications of 57 kg ha<sup>-1</sup> of extra N.

RP=raíces principales, RL=raíces laterales, T=tallos, A=acículas ♦ RP=tap roots, RL=lateral roots, T=stems, A=needles.

**Cuadro 4. Concentración de azúcares (mg g<sup>-1</sup> de peso anhidro) para las partes de las plántulas y tratamientos con N.**  
**Table 4. Sugar concentration (mg of sugar g<sup>-1</sup> of dry weight) for the parts of the seedlings and N treatments.**

Parte	Tratamiento con nitrógeno <sup>†</sup>			p
	0	2	4	
Raíces laterales	143.2a <sup>‡</sup>	129.6a	138.1a	0.5335
Acículas	45.3a	42.4a	43.1a	0.7437
Tallos	111.8a	103.0ab	98.9b	0.0001
Raíces principales	168.2a	149.9a	173.3a	0.1067

<sup>†</sup> Número de aplicaciones adicionales de N ♦ Number of additional N applications.

<sup>‡</sup> Cifras seguidas de letras distintas en la misma línea, son estadísticamente diferentes (p≤0.05) ♦ Values followed by different letters in the same row, are statistically different (p≤0.05).

manera individual, hubo un efecto significativo (p=0.0124) del tratamiento con N en la concentración de almidones en las raíces laterales, con las mayores concentraciones correspondiendo a los niveles más bajos de N. La raíz principal tendió (p=0.1253) a un comportamiento semejante, pero sí hubo contraste ortogonal lineal (p=0.0594). Las acículas y tallos no alcanzaron significancia estadística.

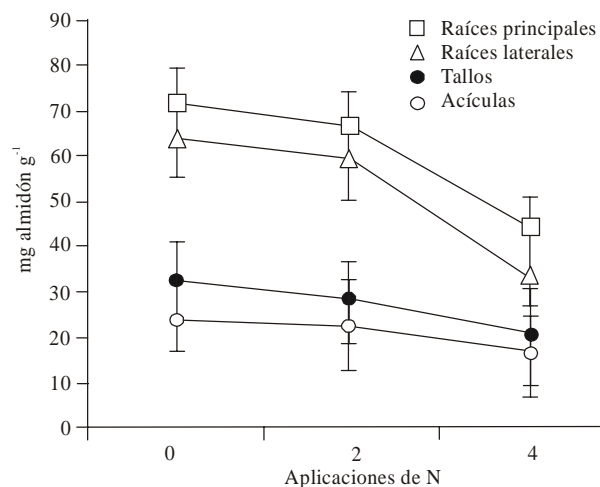
Una reducción moderada en la disponibilidad de nutrientes puede resultar en acumulación de almidones, mientras que una mayor disponibilidad puede reducir la acumulación de reservas. Por ejemplo, en *P. taeda* L. conforme la provisión de N familiar aumenta, la concentración de almidones en follaje y raíces se abate, aunque la hexosa aumenta (Green *et al.*, 1994). Asimismo, la concentración foliar de almidones aumentó cuando el N o el agua fueron limitativas en plántulas de *P. contorta* var. *latifolia* (Stewart y Lieffers, 1993). Lambers *et al.* (1998) refieren que cuando hay poco N disponible hay una menor tasa de síntesis de citocininas, que se refleja en una baja capacidad fotosintética y en un bajo desarrollo foliar. En las hojas (con alta concentración de azúcares) hay

growth are directly dependent upon the sufficient availability of other nutrients, particularly P. Such authors consider for *P. strobus* L. that a P:N ratio below the range 0.10% to 0.14% implies lack of P for an efficient utilization of N. In the present experiment, P:N ratio was higher than 0.10 for all of N levels; besides, P concentration was higher than 0.08%, which is the minimum value for adult *P. palustris* (Mills and Jones, 1996). So, apparently P is not limiting growth.

### Sugars and starches

There were no differences for sugar concentration among N levels, but there was a significant interaction of starch concentration among N treatments and the different parts of the seedlings (Table 3). Only stems showed differences, with lower sugar concentrations at higher N levels. The largest concentrations were found in roots (Table 4).

No difference (p=0.2099) was found in starch concentration among the N levels (47.7, 44.3 and 28.0 mg g<sup>-1</sup>, for 0, 2 and 4 N applications), but there was difference (p=0.0001) among plant parts (Figure 1). The higher concentrations were found at the tap root (61 mg g<sup>-1</sup>) and lateral roots (52.2 mg g<sup>-1</sup>), followed by stem (27.2 mg g<sup>-1</sup>) and needles (21.2 mg g<sup>-1</sup>). This shows that during the winter roots have more reserves than shoots. Analyzing individually every part of the plant, there was an effect (p=0.0124) of N treatment on the starch concentration in lateral roots, with the higher concentrations at the lower N levels. There was a similar trend (p=0.1253) for tap roots; however, there was a lineal orthogonal contrast (p=0.0594). Needles and stems had no differences.



**Figura 1. Concentración de almidones en cada parte de la plántula, en función de dosis crecientes de N.**  
**Figure 1. Starch concentration in seedlings parts and N treatments.**

poco consumo de fotosintatos, los cuales se exportan en gran cantidad a las raíces, que tienden a crecer más. Con una elevada disponibilidad de N, hay mayor síntesis de citocininas, las cuales aumentan la capacidad fotosintética y desarrollo foliar y, por ende, un mayor consumo de azúcares y un menor aporte de éstos hacia la raíz, la que crecerá menos. Lo anterior sugiere que plántulas bajo estrés por N pueden destinar una mayor proporción de carbono fijado para almacenamiento, y menor cantidad para abastecer las funciones metabólicas (Green *et al.*, 1994).

Sobre los efectos del N en almidón debido a la influencia de otros factores hay resultados contradictorios. Al estudiar los efectos del CO<sub>2</sub> y el N en plántulas de *P. palustris* producidas en contenedor, Entry *et al.* (1998) reportan que con elevados niveles de N hubo un incremento de almidones y otros carbohidratos en las raíces gruesas y finas. También encontraron que con bajos niveles de N la concentración de almidones en la raíz principal fue mayor, a niveles ambientales de CO<sub>2</sub>, en comparación con un suministro doble de CO<sub>2</sub>.

La acumulación de azúcares es beneficiada por cualquier factor que favorezca la fotosíntesis (Marshall, 1985). Sin embargo, en esta investigación, la concentración de azúcares del tallo se correlacionó negativamente con la dosis de N. Las respuestas en concentración de azúcares son más variables que las de los almidones. En *P. taeda* L., la concentración de azúcares en la raíz aumentó al elevar los niveles de N (Green *et al.*, 1994). En contraste, Sung *et al.* (1997) determinaron, para la misma especie, que el metabolismo del azúcar no se afectó por la fertilización con N en otoño. Las diferentes respuestas entre azúcares y almidones son de esperarse, debido a que la sucrosa y el almidón son enzimáticamente interconvertibles. Elevadas concentraciones de sucrosa favorecen la síntesis de almidón, mientras que bajas concentraciones favorecen el rompimiento de los almidones (Johnson y Cline, 1991).

## CONCLUSIONES

La concentración de nitrógeno en las acículas de las plántulas aumentó con mayores aplicaciones de N, lo cual representa una cantidad extra para las plántulas si son trasplantadas en suelos pobres. El fósforo no resultó limitativo para aprovechar el nitrógeno, dadas las relaciones P:N, el P disponible en el suelo (50.5 mg kg<sup>-1</sup>) y la concentración foliar de P testigo (0.097%).

Las plántulas almacenaron más almidón en las raíces que en la parte aérea. La concentración de almidones en las raíces laterales y en la raíz principal se redujo en respuesta a mayores niveles de N, por lo que en ambientes pobres en N (testigo, con 0.81% de N foliar), la plántula acumula más reservas en las raíces.

Moderate nutrient deficiencies may result in starch accumulation, while an improved availability may reduce the accumulation of reserves. For instance, in *P. taeda* L. as N supply increased, foliar and root starch concentrations decreased, while hexose concentration increased (Green *et al.*, 1994). Also, foliar starch concentration increased when N or water was limiting in *P. contorta* var. *latifolia* seedlings (Stewart and Lieffers, 1993). Lambers *et al.* (1998) suggest that under low N, there is a lower rate of cytokinins synthesis; therefore, both photosynthetic capacity and leaf expansion are reduced. Few photosynthates are consumed in leaves (with high concentration of sugars), and large amounts are exported to roots for growth. In a high N environment, roots produce vast amounts of cytokinins, which enhance photosynthetic capacity and leaf expansion; most of the photosynthates are consumed in leaves and few sugars are sent to the roots, which will grow less. According to Green *et al.* (1994), this suggests that under N stress, seedlings may allocate a higher percentage of fixed carbon to storage and less to transport for metabolic functions.

There have been contradictory findings of the relationship between N and starch because of the influence of other factors. In a study on the effects of CO<sub>2</sub> and N on longleaf pine seedlings, Entry *et al.* (1998) found that with high N levels, there was an increase of starch and other carbohydrates in roots and fine roots of *P. palustris* produced in containers. They also found that at low N levels, starch concentration in tap roots was greater, at ambient CO<sub>2</sub> levels, in comparison with twice the ambient CO<sub>2</sub> levels.

Sugar accumulation is favored by anything that favors photosynthesis (Marshall, 1985). However in the present study, sugar concentration of the stem was negatively related to the amount of N applied. Responses are more variable for sugar concentration than for starch concentration. In *P. taeda* L., root sugar concentration increased with increasing N levels (Green *et al.*, 1994). In contrast, in the same species, Sung *et al.* (1997) found that sugar metabolism was not affected by N fall fertilization. The different responses among sugars and starches can be expected, because sucrose and starch are enzymatically interconvertible. High sucrose concentrations favor the synthesis of starch, and low concentrations favor starch breakdown (Johnson and Cline, 1991).

## CONCLUSIONS

Nitrogen concentration in longleaf pine seedling needles increased with high N treatments, and this may represent an extra supply for seedlings after planting, particularly in poor soils. Phosphorous was not limiting, because of the P:N ratio, available P in soil (50.5 mg kg<sup>-1</sup>)

### AGRADECIMIENTOS

A los Dres. Robert Mitchell, Henry Gholz y Doria Gordon, por sus valiosos comentarios que mejoraron este trabajo sustantivamente; al Sr. Steven Gilly, por su apoyo en la producción de la planta; al CONACYT, la DICIFO y la UACH, por su apoyo durante los estudios de doctorado del primer autor; al FAES, IFAS, UF, por la ayuda financiera para realizar este trabajo.

### LITERATURA CITADA

Barnett, J. P. 1984. Relating seedling physiology to survival and growth in container-grown southern pines. *In*: Duryea, M. L. and G. N. Brown (eds.). *Seedling Physiology and Reforestation Success*. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht. pp: 157-176.

Barnett, J. P. and J. M. McGilvray. 1997. Practical guidelines for producing longleaf pine seedlings in containers. Gen. Tech. Rep. SRS-14. USDA, FS, Southern Res, Stat. New Orleans. 28 p.

Barnett, J. P. and T. C. Pesacreta. 1990. Preparing longleaf pine seeds for nursery sowing. *In*: Proceedings Southern Forest Nursery Association. Biloxi, MS. July 23-26 1990. pp: 54-64.

Birk, E. M., and P. A. Matson. 1986. Site fertility effects seasonal carbon reserves in loblolly pine. *Tree physiol.* 2:17-27.

Bremner, J. M., and C. S. Mulvaney. 1982. Nitrogen-total. *In*: Page, A. L., R. H. Miller, and K. R. Kenny (eds.). *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. 2nd ed. Series Agronomy No. 9. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin, USA. pp: 595-624.

Brissette, J. C., M. Elliott, and J. P. Barnett. 1990. Producing container longleaf pine seedlings. *In*: Farrar, R. M. (ed.). *Proceedings Symposium on the Management of Longleaf Pine*. Long Beach, Mississippi, April 4-6, 1989. USDA, FS, Southern Forest Experiment Station. Gen. Tech. Rep. SO-75. pp: 52-70.

Brissette, J. C., J. P. Barnett, and T. D. Landis. 1991. Container seedlings. *In*: Duryea, M. L. and P. M. Dougherty (eds.). *Forest Regeneration Manual*. Kluwer. Dordrecht. pp: 117-141.

Cordell, Ch. E., G. E. Hatchell, and D. H. Marx. 1990. Nursery culture for bare-root longleaf pine seedlings. *In*: Farrar, R. M. (ed.). *Proceedings Symposium Management of Longleaf Pine*. Long Beach, Mississippi, April 4-6, 1989. USDA, FS, Southern Forest Experiment Station. Gen. Tech. Rep. SO-75. pp: 38-51.

Duryea, M. L. 1985. Evaluating seedling quality: importance to reforestation. *In*: Duryea, M. L. (ed.). *Evaluating seedling quality: principles, procedures, and predictive abilities of major tests*. Oregon State University. Corvallis, Oregon. pp: 1-4.

Duryea, M. L. and K. M. McClain. 1984. Altering seedling physiology to improve reforestation success. *In*: Duryea, M. L. and G. N. Brown (eds.). *Seedling Physiology and Reforestation Success*. Dordrecht. Martinus Nijhoff. pp: 77-114.

Entry, J. A., G. B. Runion, S. A. Prior, R. J. Mitchell, and H. H. Rogers. 1998. Influence of CO<sub>2</sub> enrichment and nitrogen fertilization on tissue chemistry and carbon allocation in longleaf pine seedlings. *Plant and Soil* 200:3-11.

Fisher, J. T. and J. G. Mexal. 1984. Nutrition management: a physiological basis for yield improvement. *In*: Duryea, M. L. and G. N. Brown, (eds.). *Seedling Physiology and Reforestation Success*. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers. Dordrecht. pp: 271-299.

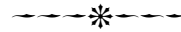
Gholz, H. L. and W. P. Cropper Jr. 1991. Carbohydrate dynamics in mature *Pinus elliottii* var. *elliottii* trees. *Can. J. Forest Res.* 21(12):1742-1747.

Green, T. H., R. J. Mitchell, and D. H. Gjerstad. 1994. Effects of nitrogen on the response of loblolly pine to drought. *New Phytologist* 128:145-152.

for using nitrogen, and foliar P concentration in control (0.097%).

The seedlings stored more starch in roots than in shoots. Starch concentration in lateral roots and tap roots was lower at higher N levels, so in low N environments (control, 0.81% foliar N), the seedling accumulates more reserves in the roots.

—End of the English version—



Hinesley, L. E. and T. E. Maki. 1980. Fall fertilization helps longleaf pine nursery stock. *South. J. Appl. For.* 4:132-135.

Johnson, J. D. and M. L. Cline. 1991. Seedling quality of southern pines. *In*: Duryea, M. L. and P. M. Dougherty (eds.). *Forest Regeneration Manual*. Kluwer. Netherlands. pp: 143-159.

Kais, A. G. 1980. Longleaf pine production: a cooperative endeavor. *In*: Proceedings. Southern Nursery Conference. September 2-4, 1980. Lake Barkley, KY. USDA, FS, Southeastern Area. Technical Publication SA-TP17. pp: 73-85.

Lambers, H., F. S. Chapin III, and T. L. Pons. 1998. *Plant Physiological Ecology*. Springer. New York. 540 p.

Landers, J. L., D. H. van Lear and W. D. Boyer. 1995. The longleaf pine forests of the southeast: requiem or renaissance? *J. Forestry* 93(1): 39-44.

Landis, T. D. 1985. Mineral nutrition as an index of seedling quality. *In*: Duryea, M. L. (ed.). *Proceedings: Evaluating seedling quality: principles, procedures and predictive abilities of major tests*. October 16-18, Forest Research Laboratory, Oregon State University, Corvallis. pp: 29-48.

Landsberg, J.J. and S.T. Gower. 1997. *Applications of Physiological Ecology to Forest Management*. A. P. San Diego. 354 p.

Littell, R. C., G. A. Milliken, G. A., W. W. Stroup and R. D. Wolfinger. 1999. SAS System for Mixed Models. SASI. Cary. 633 p.

Longleaf Pine Alliance. 1998. Longleaf seedling production and the longleaf nursery list. *Longleaf Alliance Newsletter* 2(1): 2-3.

Margolis, H. A. and D. G. Brand. 1990. An ecophysiological basis for understanding plantation establishment. *Can. J. Forest Res.* 20: 375-390.

Marshall, J. D. 1985. Carbohydrate status as a measure of seedling quality. *In*: Duryea, M. L., (ed.). *Evaluating seedling quality: principles, procedures and predictive abilities of major tests*. Forest Research Laboratory, Oregon State University. pp: 49-58.

Mills, H. A. and J. B. Jones Jr. 1996. *Plant Analysis Handbook II*. MicroMacro Pub. Co. Athens. 422 p.

Murphy, J. and J. P. Riley. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 27:31-36.

Peet, R. K. and D. J. Allard. 1993. Longleaf pine-dominated vegetation of the southern Atlantic and eastern Gulf Coast Region. *In*: Herman, S. M. (ed.). *Proceedings 18th Tall Timbers Fire Ecology Conference*. Tall Timbers Research Station. Tallahassee. pp: 45-81.

Reich, P. B. and A. W. Schoettle. 1988. Role of phosphorous and nitrogen in photosynthetic and whole plant carbon gain and nutrient use efficiency in eastern white pine. *Oecologia* 77: 25-33.

Schomaker, C. E. 1969. Growth and foliar nutrition of white pine seedlings as influenced by simultaneous changes in moisture and nutrient supply. *Soil Science Soc. Amer. Proceedings* 33:614-618.

Stewart, J. D. and V. J. Lieffers. 1993. Preconditioning effects of nitrogen relative addition rate and drought stress on container grown lodgepole pine seedlings. *Can. J. Forest Res.* 23(8):1663-1671.

- Sung, S. S., C. C. Black, T. L. Kormanik, S. J. Zarnoch, P. P. Kormanik, and P. A. Counce. 1997. Fall fertilization and the biology of *Pinus taeda* seedling development. *Can. J. Forest Res.* 27(9):1406-1412.
- USDA (United States Department of Agriculture). 1986. Soil survey of Baker and Mitchell counties. Soil Conservation Service. Albany. 53 p.
- Yemm, E. C. and A. J. Willis. 1954. Estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical J.* 57:508-514.