

T. Prov. 22/33

UNIVERSIDAD DE GRANADA

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad de Ciencias  
Fecha 4.12.98  
ENTRADA NUM. 5430

T  
16  
90



FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL

**EFFECTO DE LAS CUBIERTAS PLANAS FLOTANTES  
SOBRE LAS FORMAS, PARÁMETROS E  
INDICADORES BIOQUÍMICOS DE LOS  
MACRONUTRIENTES EN PLANTAS DE COL CHINA.**

**TESIS DOCTORAL**

**GREGORIA PULGAR LÓPEZ**

**GRANADA, 1998**

**BIBLIOTECA UNIVERSITARIA**  
GRANADA  
Nº Documento 019687461  
Nº Copia 121239289

El presente trabajo de investigación titulado: **“Efecto de las Cubiertas Planas Flotantes sobre las Formas, Parámetros e Indicadores Bioquímicos de los Macronutrientes en plantas de Col China.”**, para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, presentado por la Licenciada **Gregoria Pulgar López**, ha sido realizado en el Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, bajo la dirección del profesor Dr. Luis M<sup>a</sup> Romero Monreal.



Dr. LUIS M<sup>a</sup> ROMERO MONREAL  
Director de la Tesis



GREGORIA PULGAR LÓPEZ  
Aspirante al grado de Doctor

Granada, Noviembre de 1.998

**ÍNDICE**

	Pág.
1.- <b>Objetivos</b> .....	3
2.- <b>Introducción</b> .....	7
2.1.- El cultivo protegido .....	7
2.2.- Cubiertas flotantes .....	8
2.3.- Materiales de cubierta .....	9
2.3.1.- Naturaleza química .....	9
2.3.2.- Láminas .....	10
2.3.3.- Velos .....	12
2.3.4.- Mallas .....	13
2.4.- Microclima generado bajo las cubiertas .....	13
2.4.1.- Radiación .....	14
2.4.2.- Temperatura .....	18
2.4.3.- Humedad .....	21
2.4.4.- Otros parámetros climáticos .....	22
2.5.- Efecto sobre los cultivos de las cubiertas flotantes .....	23
2.6.- Colocación y utilización de las cubiertas flotantes .....	25
2.7.- Planta utilizada: Col China .....	28
2.7.1.- Morfología y características .....	28
2.7.2.- Fisiología del desarrollo .....	31
3.- <b>Material y Métodos</b> .....	39
3.1.- Siembra y transplante .....	39
3.2.- Características de las parcelas experimentales .....	39
3.3.- Ensayos realizados .....	40
3.4.- Fertilización aplicada .....	40
3.5.- Estudio climático .....	42
3.5.1.- Temperatura .....	42
3.5.2.- Humedad relativa .....	43
3.5.3.- Radiación solar .....	43
3.6.- Análisis de los materiales de cubierta .....	43

	Pág.
3.7.- Análisis de suelo .....	44
3.8.- Análisis del agua de riego .....	44
3.9.- Especie vegetal utilizada .....	47
3.10.- Toma de muestras vegetales y su preparación .....	47
3.10.1.- Análisis del material vegetal fresco .....	49
3.10.1.1.- Proteínas y Aminoácidos solubles .....	50
3.10.1.2.- Hidratos de Carbono no Estructurales .....	51
3.10.1.3.- Prolina .....	51
3.10.1.4.- Pigmentos .....	52
3.10.1.4.1.- Clorofilas .....	52
3.10.1.4.2.- Carotenos .....	52
3.10.1.4.3.- Antocianinas y Licopenos .....	53
3.10.1.5.- Acidez iónica y valorable .....	53
3.10.1.6.- Ácido ascórbico .....	54
3.10.1.7.- Actividad Nitrato Reductasa .....	54
3.10.1.7.1.- Actividad Nitrato Reductasa "in vivo" o endógena .....	54
3.10.1.7.2.- Actividad Nitrato reductasa inducida con NO <sub>3</sub> K .....	55
3.10.1.7.3.- Actividad Nitrato reductasa infiltrada con NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> y Mo .....	55
3.10.1.7.4.- Actividad Nitrato Reductasa "in vitro" .....	55
3.10.1.8.- Actividad Nitrito Reductasa "in vitro" .....	56
3.10.1.9.- Actividad Piruvato-Kinasa .....	56
3.10.1.9.1.- Actividad Piruvato-Kinasa endógena .....	57
3.10.1.9.2.- Actividad Piruvato-Kinasa en presencia de Mg <sup>2+</sup> .....	57
3.10.1.9.3.- Actividad Piruvato-Kinasa en presencia de K <sup>+</sup> .....	57
3.10.1.9.4.- Actividad Piruvato-Kinasa en presencia de Ca <sup>2+</sup> .....	58
3.10.1.10.- Actividad Fosfatasa Ácida Foliar .....	58
3.10.2.- Análisis del material vegetal seco .....	59
3.10.2.1.- Mineralización por vía húmeda con sulfúrico .....	59
3.10.2.1.1.- Nitrógeno orgánico .....	60
3.10.2.1.2.- Fósforo .....	60

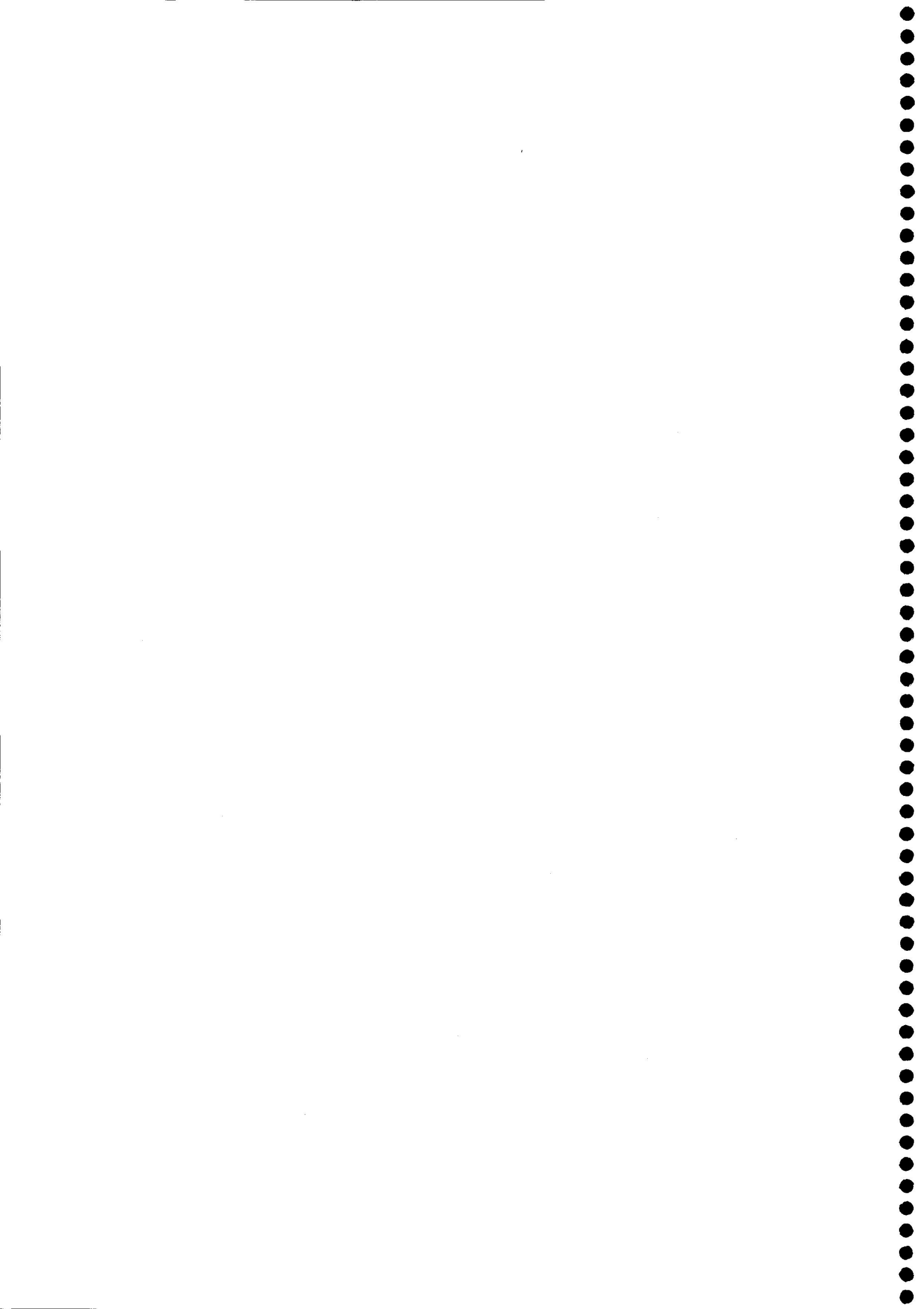
	Pág.
3.10.2.1.3.- Sodio y Potasio .....	60
3.10.2.1.4.- Calcio y Magnesio .....	61
3.10.2.2.- Mineralización por vía húmeda con Nitrico-Perclórico .....	61
3.10.2.2.1.- Azufre orgánico .....	61
3.10.2.3.- Extracc. de las formas solubles de los nutrientes en medio acuoso ...	62
3.10.2.3.1.- Nitratos .....	62
3.10.2.3.2.- Amonio .....	62
3.10.2.3.3.- Sulfatos .....	63
3.10.2.3.4.- Cloruros .....	63
3.10.2.3.5.- Fósforo inorgánico .....	63
3.10.2.3.6.- Fósforo orgánico soluble .....	63
3.10.2.3.7.- Sodio y Potasio solubles .....	64
3.10.2.3.8.- Calcio y Magnesio solubles .....	64
3.11.- Análisis estadístico .....	64
<b>4.- Resultados y Discusión .....</b>	<b>67</b>
4.1.- Parámetros Ambientales.....	67
4.1.1.- Temperaturas .....	67
4.1.2.- Humedad Relativa .....	72
4.1.3.- Radiación Solar Puntual .....	74
4.1.4.- Análisis óptico de los materiales de cubierta .....	75
4.1.5.- Análisis del suelo de cultivo .....	77
4.1.5.1.- Análisis físico .....	78
4.1.5.2.- Análisis químico .....	79
4.1.6.- Análisis del agua de riego .....	81
4.2.- Parámetros de crecimiento y Producción .....	86
4.3.- Nitrógeno e Indicadores bioquímicos.....	91
4.3.1.- Actividad Nitrato Reductasa .....	97
4.3.2.- Actividad Nitrito Reductasa “in vitro” .....	101
4.3.3.- Cloruros .....	102
4.3.4.- Azufre, formas .....	103

---

	Pág.
4.4.- Fósforo, formas e indicadores bioquímicos .....	107
4.5.- Actividad Piruvato Kinasa y Cationes .....	112
4.5.1.- Actividad Piruvato Kinasa .....	112
4.5.2.- Cationes .....	116
4.5.2.1.- Cationes divalentes .....	116
4.5.2.2.- Cationes monovalentes .....	121
4.6.- Hidratos de Carbono NO Estructurales .....	128
4.7.- Pigmentos Clorofilico y accesorios .....	132
4.7.1.- Pigmentos Clorofilicos .....	132
4.7.2.- Pigmentos Accesorios .....	136
4.8.- Balance Iónico .....	139
<b>5.- Bibliografía .....</b>	<b>145</b>



## ***1.- OBJETIVOS***





## **1.- OBJETIVOS**

En las comarcas costeras y de vega del sur español, la creciente evolución de los costes de cultivo en invernadero se ha traducido en una reciente estabilización de la superficie, limitando las opciones de especies hortícolas a cultivar en ellos. La técnica de semiforzado "cubiertas planas flotantes" podría ser de interés para la producción de especies hortícolas de porte bajo, a costes inferiores a los de invernadero, haciéndolas más competitivas.

Las técnicas de semiforzado permiten, entre otros fines, ampliar los calendarios de cultivo y producción en épocas en las que al aire libre no es viable (técnica o económicamente). También permite un ahorro de los aportes hídricos, escasos muchas veces en nuestras zonas de cultivo, y paralelamente permite una reducción en los aportes de abonado nitrogenado. Además, con la utilización de materiales no tejidos se puede proteger a los cultivos frente al ataque de plagas, sin tener que utilizar o disminuyendo el empleo de pesticidas, consiguiendo que el impacto medioambiental sea casi nulo.

La técnica de semiforzado con "cubiertas planas flotantes", consiste en la colocación de una lámina de material plástico de forma horizontal, apoyado sobre el cultivo o bien sustentado entre dos caballones, que permite crear un microclima en el recinto protegido, en el que las condiciones térmicas se mejoran notablemente, sin necesidad de elementos estructurales que encarezcan su implantación. La posibilidad de mecanizar la colocación de las cubiertas y la ausencia de manipulación para ventilar reducen, notablemente, los costes de cultivo.

## *Objetivos*

---

El uso en España de dicha técnica es meramente testimonial, mientras que los países centroeuropeos apuestan por esta técnica como método de semiforzado de bajo coste, sobre todo, para conseguir una producción regular de hortalizas de alta calidad y elevado valor añadido.

La col china es, en la actualidad, un cultivo poco extendido y destinado fundamentalmente a la exportación. Existe un periodo en el que el mercado se encuentra parcialmente desabastecido de este producto, pero es difícil que, bajo las condiciones climáticas de la Vega de Granada, pueda planificarse una producción, sin apoyo de técnicas de semiforzado, para suministrar el mercado durante dicho periodo. El bajo porte de la col china hace que su cultivo sea posible bajo cubierta plana flotante.

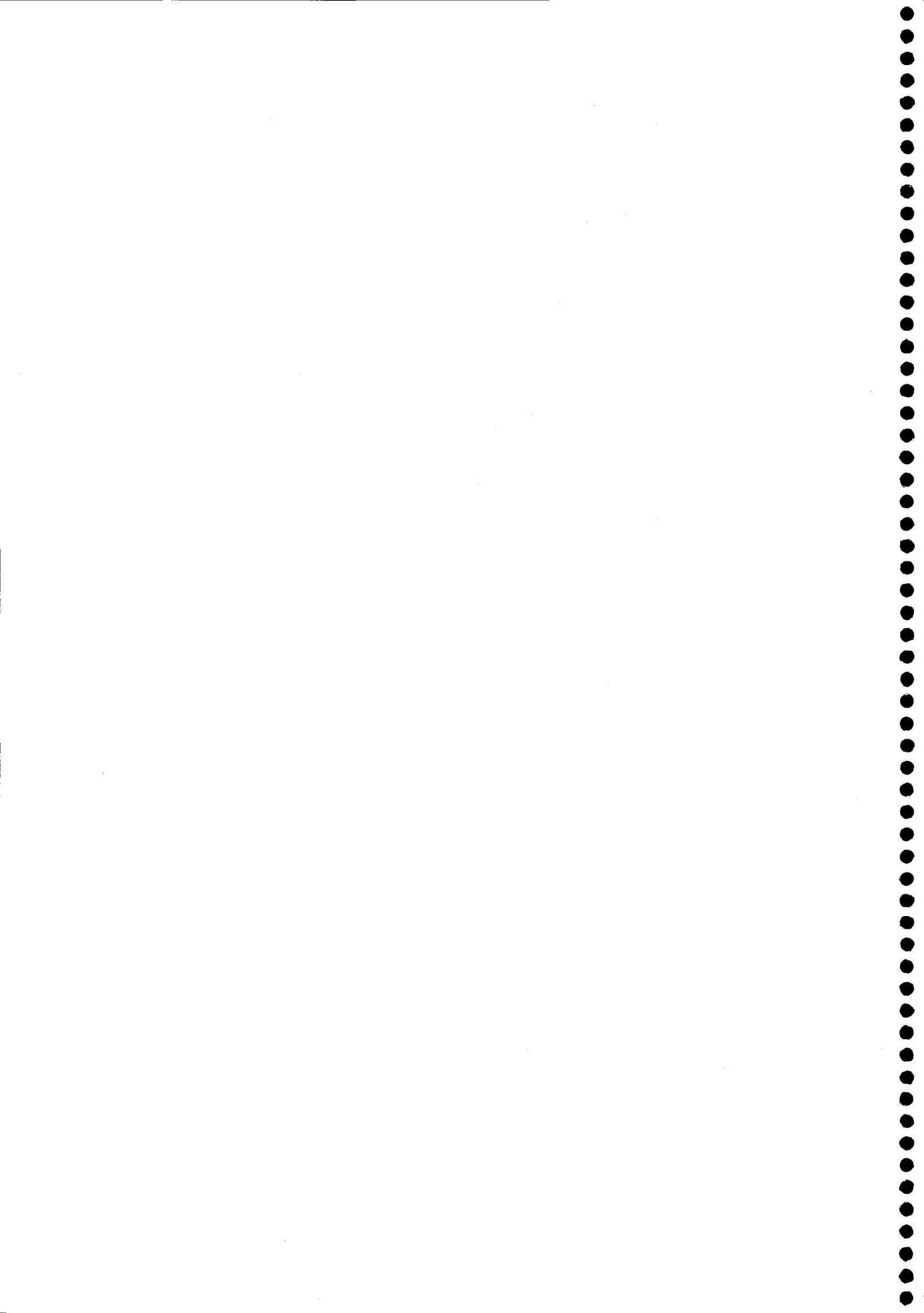
Es conocido que la técnica de semicubiertas planas flotantes varía las condiciones de temperatura, humedad, radiación, induciendo un desarrollo más rápido, pero no como afectan estos cambios a la nutrición del cultivo, por lo que nuestros objetivos fueron:

- Estudiar las posibilidades de cultivo de la col china en ciclo de primavera en la Vega de Granada y analizar la influencia de las cubiertas flotantes sobre el crecimiento, desarrollo y producción de este cultivo.

- Estudiar la influencia de la técnica de cubiertas planas flotantes sobre la nutrición mineral de la col china y más concretamente sobre las concentraciones de macronutrientes, sus indicadores fisiológicos y bioquímicos.



## ***2.- INTRODUCCIÓN***



## **2.- INTRODUCCIÓN**

### **2.1.- El cultivo protegido**

Aunque el término forzado o protegido implica la producción por conductos distintos a los naturales, dentro de los cuales podría incluirse desde la aplicación de fitorreguladores hasta el cultivo sobre substratos distintos al suelo convencional, en general este término suele restringirse a aquellas técnicas de protección climática que posibilitan una cosecha más precoz o más tardía (Maroto, 1993).

Cuando este sistema de protección se aplica solamente en algunas fases del cultivo se habla de semiforzado. Habitualmente, el cultivo es protegido en sus primeros estadios de desarrollo, cuando se pretende adelantar su ciclo cultural normal (natural) pero también puede utilizarse en etapas más adelantadas cuando lo que se pretende es alargar o retrasar dichos ciclos.

Según Wittwer y Castilla (1995), la técnica de protección consiste en la colocación de una pantalla o cubierta que altera los intercambios energéticos entre las plantas y el medio circundante. Según la posición de esta pantalla respecto al cultivo pueden diferenciarse 4 tipos de semiforzado:

- Acolchado de suelos: Cubiertas sobre suelo, bajo las partes aéreas de las plantas.
- Cortavientos: Pantalla lateral al cultivo.
- Pequeño túnel: Cubierta sobre el cultivo, sin entrar en contacto con él.
- Cubierta flotante: Cubierta sobre el cultivo, entrando en contacto con él.

## **2.2.- Cubiertas flotantes**

Una definición simplificadora es la expresada por Wells y Loy (1985) según la cual se trata de una cubierta flexible y transmisiva a la radiación, instalada sobre una o múltiples líneas de cultivo, soportada o no por arquillos, para mejorar el crecimiento y rendimiento de las plantas.

Esta definición incluiría a las cubiertas flotantes (direct cover o floating mulch) y al pequeño túnel (row cover o low tunnel) en función o presencia de elementos de soporte o arquillos.

Una definición más amplia es la que define a las cubiertas flotantes como la colocación sobre un cultivo de una lámina flexible de plástico perforado, velo permeable o malla, que altera las condiciones microclimáticas del entorno protegido, al generar efectos túnel (ver apartado temperatura) y cortavientos (ver otros parámetros climáticos). La lámina puede estar apoyada por el cultivo, que la eleva con su crecimiento o bien puede adoptar una disposición plana, fijándola en caballones y dejando una pequeña cámara de cultivo de 15-20 cm de altura (Hernández y Castilla, 1993).

El uso de esta técnica se inició en Alemania en 1971 (Benoit et al., 1986) pero no fue aplicado a gran escala hasta 1978 (Benoit y Ceustermans, 1985). En los países del área mediterránea es una técnica poco extendida, salvo en el caso de Francia, donde alcanza 8.000 Ha (Castilla y Hernández, 1994), precisamente lejos del litoral mediterráneo, siendo su uso más común en países de Centro y Este de Europa así como en Inglaterra, donde la superficie cubierta con esta técnica fue

cifrada en más de 8.000 Ha en 1988 (Greenfield, 1989). En España su utilización es muy escasa en el cultivo al aire libre, siendo utilizada fundamentalmente en semilleros e invernaderos para limitar los ataques de insectos, especialmente de los vectores de virosis (áfidos, trips, etc.). Gerst (1993) estimó, para 1990, una superficie europea de 40.500 Ha, similar a la citada por Wittwer y Castilla (1995).

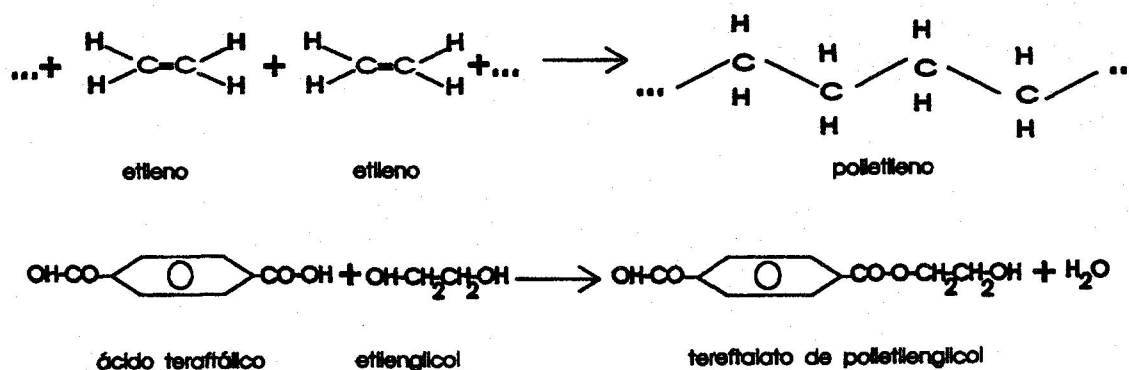
### **2.3.- Materiales de cubierta**

#### **2.3.1.- Naturaleza química**

Los principales materiales de cubierta utilizados se agrupan en 4 familia:

- Poliolefinas (Polietileno -PE- y polipropileno -PP- fundamentalmente).
- Polímeros vinílicos (EVA).
- Poliamidas (Poliamida 6; 6-6; 6-10, 11, 12).
- Poliesteres saturados o lineales (tereftalato de polietilenglicol -PET-).

La síntesis de las dos primeras familias se realiza por un proceso de polimerización según la cual los monómeros se unen sin eliminar ningún residuo de síntesis y las dos siguientes sufren un proceso de policondensación o poliadicción mediante el cual se unen grupos funcionales diferentes que generan como residuo agua, amoníaco, ácido clorhídrico, etc. (Macca, 1992). Un ejemplo de ambos procesos puede ser la polimerización del PE y la policondensación del PET:



Los polímeros pueden constituirse en 3 tipos de materiales: láminas, velos y mallas.

### 2.3.2.- Láminas

En cubierta flotante se usan fundamentalmente el polietileno de baja densidad y el copolímero de acetato de vinilo (EVA).

El PE obtenido por la polimerización del etileno mediante la aplicación de presión, temperatura y un catalizador (que rompe el doble enlace monomérico), es transformado en gránulos o granzas que es el punto de partida para la fabricación de las láminas mediante un proceso industrial denominado extrusión. La granza es comprimida y fundida en una extrusora. Una fuerte corriente de aire forma una burbuja tubular de éste fundido, que es elevada, recogida y cortada a lo largo de una generatriz. Durante el proceso pueden coextruirse varias láminas con distintos tipos de PE y/u otros polímeros dando láminas multicapa que aúnan las ventajas de los distintos materiales de los que están compuestas. El PE puede ser aditivado mediante la adición de antioxidantes, pigmentos, estabilizadores de luz, agentes minerales, etc., que mejoran sus características iniciales.



El desarrollo del PE de baja densidad lineal, conseguido mediante la polimerización del etileno con otro monómero (buteno, hexeno, octeno, etc.) ha permitido reducir los espesores de las láminas utilizadas ya que este material tiene una mayor resistencia mecánica (Robledo y Martín, 1988).

El copolímero EVA es el resultado de la introducción de un segundo monómero, el acetato de vinilo, en la polimerización de PE. Este monómero, de naturaleza polar y mayor volumen molecular se comporta como una cadena lateral corta que mejora la densidad, claridad, permeabilidad, solubilidad, flexibilidad, resistencia a la fisuración y disminuye la rigidez y dureza superficial del PE (Robledo y Martín, 1988). La proporción usual de EVA utilizada en las láminas empleadas en cubiertas flotantes está entre el 6 y el 12 %.

Las láminas deben perforarse para permeabilizarlas y permitir la ventilación, el intercambio gaseoso, así como posibilitar los riegos. Aunque existe en el mercado un material microperforado de PE lineal de baja densidad, con pequeñas microperforaciones de 1 mm de  $\varnothing$  y una densidad de 2.500 perforaciones/m<sup>2</sup> (Gerst, 1993), fabricado especialmente para su uso como cubierta flotante, lo más usual es la perforación de mayor tamaño. Se considera como lámina estándar aquella de 50  $\mu$  de espesor con 500 perforaciones de 1 cm de  $\varnothing$ /m<sup>2</sup>. En lugares de fuertes vientos hay que aumentar el número de perforaciones a 800-1.000 perforaciones /m<sup>2</sup>.

### **2.3.3.- Velos**

Los velos son materiales no tejidos, constituidos a base de polipropileno mediante un proceso industrial denominado "spunbonded" o termosoldado, el cual se divide en 4 fases (Gregoire, 1989):

Fase I .- Homogeneización y mezclado del polímero con sus posibles aditivos.

Fase II .- Extrusión y enfriado. Se obtienen filamentos de  $\varnothing$  inferior a 20-25  $\mu$ .

Fase III.- Distribución de los filamentos en láminas de la forma más isotrópica posible.

Fase IV .- Termosoldado de filamentos.

Una lámina de 1m<sup>2</sup> de este material, con un peso de 17 g/m<sup>2</sup> contiene hasta 1.500 filamentos, que alineados alcanzarían unos 50 Km de longitud.

La resistencia intrínseca de los filamentos, unida a la que suministra la termosoldadura, explica el aceptable comportamiento ante el desgarro de un velo de escaso espesor.

Como estándar para su uso como cubierta flotante puede considerarse un velo de 17 g/m<sup>2</sup>, con una porosidad de un 90 % (superficie libre/superficie total).

### **2.3.4.- Mallas**

Las mallas o redes se obtienen a partir de filamentos cuya consolidación puede realizarse mediante tejedoras (mallas tejidas) o algún otro modo (mallas no tejidas). Los materiales base de fabricación son poliamidas, poliésteres, poletileno, polipropileno, fibras de vidrio, etc.. que una vez consolidados suministran productos de alta permeabilidad y porosidad, una baja razón peso/superficie y una buena resistencia al desgarro (Hernández y Castilla, 1995). Este tipo de material tiene un buen comportamiento frente a fuertes vientos y no provoca aumentos de temperatura relevantes. Sin embargo, conseguir tamaños de poro muy pequeños, necesarios para impedir el acceso de insectos, es difícil y caro de conseguir. Por ejemplo, Huber (1989) comprobó que una malla formada por filamentos entre 0,2-0,3 mm de grosor y un diámetro de poro de 1,6 a 1,8 mm no era eficaz para el control de la mosca de la zanahoria, lo que si puede conseguir con un velo no tejido de menor precio.

El uso de este tipo de mallas como cubierta flotante es muy reducido y su aplicación más utilizada es la de sombrear cultivos que necesitan durante alguna etapa de su desarrollo una reducción de radiación.

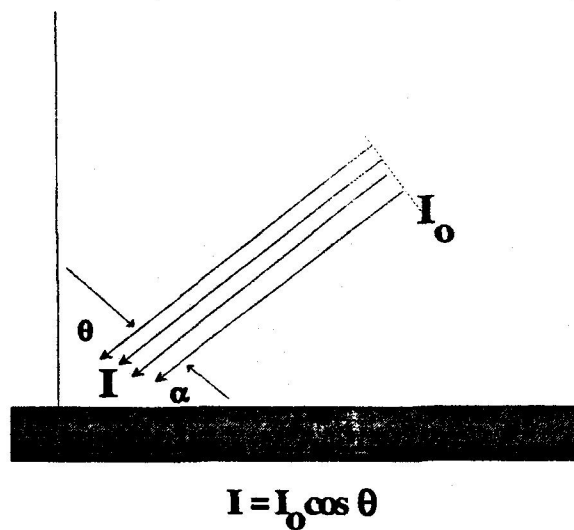
### **2.4.- Microclima generado bajo las cubiertas**

La colocación de una cubierta flotante que actúa como una barrera, más o menos permeable, que separa el cultivo del ambiente exterior va a generar una serie de modificaciones microclimáticas sobre el entorno que protege.

### 2.4.1.- Radiación

La radiación que llega a un cultivo bajo cubierta flotante va a depender de la intensidad de la radiación solar, de la posición del sol (ángulo de incidencia) y de la disposición y características ópticas del material de cubierta. Son estos dos últimos factores los que más van a establecer las diferencias microclimáticas que genera esta técnica con respecto al aire libre.

En un cultivo al aire libre, según la ley del coseno de Lambert (**Figura II**), la intensidad radiante que llega a una superficie ( $I$ ) varía con la intensidad de la radiación ( $I_0$ ) y el coseno del ángulo formado por la dirección de los rayos solares y la perpendicular a la superficie ( $\theta$ ) (Jones, 1987).



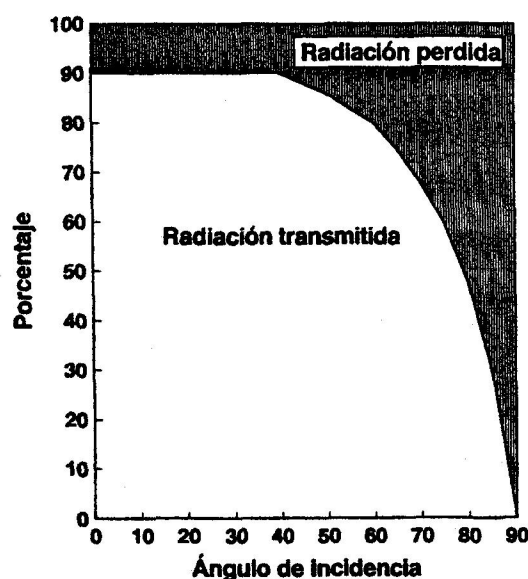
**Figura II.-** Ley del coseno de Lambert.

Este ángulo va a depender de la declinación solar, la altitud y la hora. Cuando la disposición de la cubierta es plana  $I$  puede calcularse fácilmente, lo que no ocurre

cuando está apoyada sobre el cultivo y por lo tanto su forma es irregular.

La intensidad de la radiación será mayor cuanto más cerca estemos del solsticio de verano, con la proximidad al ecuador y en las horas cercanas al mediodía.

Una vez llegada la radiación a la cubierta, las distintas fracciones del espectro serán reflejadas, absorbidas o transmitidas al interior de la cámara en función de la naturaleza del material de cubierta. El porcentaje de radiación transmitida va a depender también del ángulo de incidencia (ángulo que forman los rayos solares con la perpendicular a la cubierta) con que lleguen los rayos solares (Mastalerz, 1977). En la **Figura III** puede observarse como la radiación transmitida a través de una superficie acristalada (o de lámina o placa plástica) va disminuyendo conforme aumenta este ángulo.



**Figura III.-** Efecto del ángulo de incidencia sobre la transmisión de energía solar.

Adaptada de Mastalerz (1977).

## *Introducción*

---

La mayoría de los materiales utilizados son bastante transmisivos a la radiación global (suma de radiación directa y difusa). La transmisividad (porcentaje de radiación que traspasa la cubierta) en este rango, en condiciones de laboratorio (con ángulos de incidencia de cero grados), es de un 88-89 % en láminas de PE (50  $\mu$  de espesor) y un 90 % en láminas de EVA (50  $\mu$  de espesor) (Gerst, 1985). Sin embargo cuando la transmisividad es medida en condiciones de campo, estos valores son bastante inferiores. Así, por ejemplo los valores medios son del 62 %, 68 % y 59 % en PE, EVA y PP, respectivamente (Benoit y Ceustermans, 1987; 1990; 1992).

Esta atenuación de la transmisividad en campo es debido al citado ángulo de incidencia de los rayos solares, a la acumulación de partículas de polvo y a la condensación de vapor de agua en la cara interna de la cubierta. Solamente por esta última causa una lámina plana puede perder hasta un 30% de transmisividad en el rango de la radiación global (Pieters y Balemans, 1992).

Las pérdidas de transmisividad se deben fundamentalmente a la reflexión del material el cual puede variar en las distintas regiones del espectro. Un PE que presenta un poder de reflexión del 5 % en la región de 300 nm puede presentar una reflexión de hasta el 14 % con una radiación de 1200 nm de longitud de onda (Robledo y Martín, 1988).

La mayoría de los materiales plásticos no presentan patrones de transmisividad distintos en el rango de la radiación fotosintéticamente activa (PAR, entre 400-700 nm) con lo que su valor no difiere de los citados para la radiación total. Wells y Loy (1985) la cifran en 90 % y 80 % para PE y PP respectivamente.

Los materiales usados para la cobertura flotante deben ser lo más transparente posible a la radiación visible y PAR pero, para asegurar un buen comportamiento térmico, deben tener cierta opacidad a las radiaciones infrarrojas (IR) emitidas por el suelo y las plantas durante la noche. Gerst, (1985) cifró la transmisividad para el infrarrojo a  $10 \mu$  de longitud de onda, (en condiciones de laboratorio) en un 55-63 % para láminas de PE ( $50 \mu$  de espesor), en 18-27 % en láminas de EVA ( $50 \mu$  de espesor) y en 30 % para un velo de PP ( $15,6 \text{ g/m}^2$ ). Según estos datos, el PE es el que peores prestaciones ofrece en cuanto a aislamiento térmico por radiación. Sin embargo, existen en el mercado PE térmicos con aditivos especiales, que reducen esta transmisividad hasta un 10 %.

En campo, la transparencia al infrarrojo de estos materiales es modificada al condensarse vapor de agua, lo que ocurre durante la noche cuando la temperatura de la cámara desciende del punto de rocío, provocando la aparición de una película de agua en la cara interna de la lámina (Wells y Loy, 1985). El agua absorbe fuertemente la radiación IR (Rosenberg et al., 1983), de tal modo que constituye una barrera opaca a esta radiación (sobre todo en longitudes de onda superiores a  $10 \mu$ ) limitando pérdidas térmicas. Es de vital importancia que el agua de condensación forme una lámina uniforme para evitar goteos sobre la planta que favorezcan el desarrollo de enfermedades criptogámicas.

En días nublados y húmedos, este agua de condensación nocturna puede no evaporarse al inicio del día, con lo que la transmisividad global del plástico se ve muy mermada (Loy y Wells, 1982).

### **2.4.2.- Temperatura**

Las cubiertas flotantes generan el efecto túnel o invernadero (Benoit y Ceustermans, 1985; 1987; Choukr-Allah et al., 1994; Gerst, 1985; Rumpel y Grudzien, 1990; Wells y Loy, 1985), que puede definirse como la ganancia térmica impuesta por un material de cubierta que transmite la radiación de longitud de onda corta (que aportan los rayos solares) y absorbe o limita la emisión de la radiación de longitud de onda larga (radiación calorífica que emiten las plantas y suelo ubicadas bajo la cubierta). De este modo el recinto protegido se comporta como una trampa de calor (Seeman, 1979).

El balance de la energía de un sistema puede modelizarse con la siguiente ecuación (Seeman, 1979):

$$Q - B - P - L - V = 0$$

Donde:

**Q** = Radiación neta.

**B** = Flujo de calor del suelo.

**P** = Flujo de calor de las plantas.

**L** = Flujo de calor del aire.

**V** = Energía consumida en evapotranspiración.

No se incluye, por ser mínimo, el consumo energético utilizado en fotosíntesis.



Según esta ecuación, salvo la fracción de energía utilizada en evapotranspiración, el resto es convertida en energía térmica, la cual es reirradiada como radiación térmica (infrarrojo largo) o intercambiada por convección y conducción.

La temperatura del aire bajo el recinto protegido es mayor que la del aire libre, salvo en el caso en que se de el fenómeno de "inversión térmica", el cual se produce cuando se utilizan materiales de cubierta transparentes a la radiación IR larga y en condiciones de gran emisión hacia la atmósfera, lo cual ocurre en noches claras con escasa turbulencia de aire. Benoit y Ceustermans, (1987) indicaron que la ventilación que proporcionan las perforaciones de la cubierta de PE es suficiente para reducir este efecto. En el caso de utilizar velos permeables, las altas tasas de ventilación que proporcionan evitarían el fenómeno. Este efecto de inversión es muy escaso ya que además de la ventilación, la condensación anteriormente citada, impide la salida de los IR largos.

Las temperaturas diurnas del aire están más afectadas por la técnica, especialmente las máximas. Bajo PE han sido descritos aumentos de máximas de hasta 14°C (Hemphill y Mansour, 1986), siendo ligeramente inferiores en A (Wolf et al., 1989) o en poliéster (Motsenbocker y Bonnano, 1989), Estas temperaturas máximas pueden en algunos casos ser lesivas (Mansour y Hemphill, 1987; Rumpel y Grudzien, 1990), en el caso de plantas sensibles o recién trasplantadas. Las temperaturas máximas pueden ser atenuadas por el propio cultivo si éste transpira lo suficiente. Choukr-Allah et al., (1994) comprobaron que las diferencias de  $T^{\circ}$  máxima de aire medidas bajo Agrotexil respecto al cultivo al aire libre se reducían paralelamente al crecimiento de las plantas. Esto es debido a que una gran área

## *Introducción*

---

foliar modifica el microclima ya que gran parte de la energía es empleada en evapotranspiración.

En cuanto a la temperatura mínima de aire, la técnica solamente proporciona ligeros aumentos en torno a 1-2° C (Gerst, 1985; Hemphill y Crabtree, 1988), los cuales en algunas ocasiones suelen ser suficientes para la supervivencia del cultivo (Hemphill y Mansour, 1986).

Es la integral térmica, utilizada profusamente para analizar el desarrollo de los cultivos (Ritchie y NeSmith, 1991), la que puede proporcionar mayor información sobre el efecto de la técnica sobre las temperaturas de aire. Hemphill (1989) cuantificó las integrales térmicas de cultivos de tomate y pepino bajo cubierta flotante de PE perforado y observó como éstas se incrementaban en un 230 % y en un 190 % respectivamente con respecto a las integrales térmicas de los mismos cultivos al aire libre.

Las temperaturas de suelo también se incrementan bajo las cubiertas flotantes, aunque las diferencias son menores que las ya citadas para la temperatura del aire. Estos aumentos pueden cifrarse entre 2-3° C como media (Gerst, 1985) siendo los velos de PP los que menos aumentos consiguen (Hemphill, 1989; Wolf et al., 1989).

Todas estas diferencias dependen de las condiciones climáticas exteriores.

### **2.4.3.- Humedad**

Los valores de humedad relativa del aire dependen de la cantidad de vapor de agua que el aire contiene y de su temperatura, de modo que a igual contenido de vapor de agua la humedad aumentará al bajar la temperatura y disminuirá al subir esta.

Cuando la temperatura baja hasta el punto de rocío se alcanza la saturación y se produce la condensación del agua, que constituye un fenómeno de gran importancia en la técnica de cubiertas flotantes, como ya se ha visto en apartados anteriores.

La humedad relativa bajo las cubiertas es superior a la del aire. Mermier et al. (1994), bajo velo de PP, midieron incrementos del 15 al 20 % durante el día y entre el 5 y el 10 % durante la noche, similares a los obtenidos por Choukr-Allah et al. (1994), que cifra estos incrementos en una media entre 5-15 % durante todo el ciclo.

Este ambiente húmedo se crea gracias a que la cubierta supone un cierto freno a la renovación de aire y a que las altas temperaturas, generadas bajo cubierta, permiten que la atmósfera interior pueda contener mayor cantidad de agua. Este efecto es mayor bajo una lámina de PE (Benoit y Ceustermans, 1987) que bajo un velo de PP, debido a la menor ventilación del primero.

Estas altas humedades y la reducción de la radiación impuesta por el material de cubierta provoca una reducción en la evapotranspiración del cultivo (Benoit y

Ceustermans, 1985). Como consecuencia de esto, la humedad del suelo también se favorece, habiéndose detectado incrementos de hasta un 20 % respecto a un cultivo sin protección tras un periodo de desecación entre riegos (Mermier et al., 1994).

### **2.4.4.- Otros parámetros climáticos**

Existe una escasa información sobre la incidencia del viento sobre las cubiertas flotantes. Marmier et al., (1994) indican que el viento bajo un velo de PP es 10 veces menor que en el exterior. Si tenemos en cuenta que la permeabilidad del PE perforado es menor, cabe pensar que bajo estas láminas la velocidad del viento será aún más reducida.

Las cubiertas favorecen un efecto cortavientos (Benoit y Ceustermans, 1987; Odet y Jay, 1987). Jones (1983), analizó la influencia de este efecto sobre el microclima indicando que sus principales efectos son el aumento de la temperatura durante el día (debido a que la reducción de la turbulencia limita la renovación, por aire frío de capas altas, del aire calentado junto al suelo durante las horas diurnas) y la reducción de la evapotranspiración (al disminuir la renovación del aire saturado de vapor de agua junto a las hojas, procedente de la transpiración).

Gerst (1985), analizó el efecto del viento sobre la renovación del aire bajo la cubierta. En cámaras con velos de PP la tasa de renovación es tres veces superior a la medida bajo lámina de PE. Un viento de 1 m/s duplica, en ambos casos, la tasa de renovación obtenida sin viento.

No existen datos concluyentes de como afecta la técnica a la composición del

aire bajo cubierta, especialmente sobre los contenidos de CO<sub>2</sub>, que deben ser bajos cuando las condiciones son óptimas para la fotosíntesis debido a la limitación en la renovación del aire.

## **2.5.- Efecto sobre los cultivos de las cubiertas flotantes**

Las cubiertas flotantes actúan como barrera física que impide los daños por lluvias de gran intensidad o granizo (Wells y Loy, 1985; Gerst, 1993) tanto sobre el cultivo como sobre el suelo, el cual mantiene así su estructura agregada (Odet y Jay, 1987; Hemphill y Crabtree, 1988).

La reducción de la evapotranspiración provoca que el suelo tenga unos mayores niveles de humedad que, junto con el incremento térmico, favorecen los procesos de nitrificación (Benoit y Ceustermans, 1992), lo que redundará en el aumento de la fertilidad de los suelos.

Esta mejora de las condiciones edáficas se traduce en la optimización de las condiciones de germinación (Benoit y Ceustermans, 1985; Wells y Loy, 1985) reduciéndose el gasto de semillas hasta un 10 % (Gerst, 1985).

Son numerosos los trabajos que relatan como la alteración de los parámetros climáticos redundan sobre la producción, calidad y precocidad de diversos cultivos hortícolas. Por ejemplo: calabacín (Faouzi et al., 1993; Reyd et al., 1993), cebolla (Mansour y Hemphill, 1987), escarola (Benoit y Ceustermans, 1987), lechuga (Fuelle et al., 1993; Borosic et al., 1994), maíz dulce (Bonnano y Sanders, 1987), melón (Loy y Wells, 1982; Hemphill, 1989), patata (Begin et al., 1989), pepino

## *Introducción*

---

(Hemphill, 1989), tomate (Hemphill, 1989; Khan et al., 1989; Kucera, 1989), zanahoria (Benoit et al., 1986; Borosic et al., 1994), etc. Gerst (1985;1993), da un amplio catálogo de cultivos en los cuales la técnica ha mostrado su eficacia.

Un uso especial de los velos permeables es la de su utilización como protección fitosanitaria.

Según Gregoire (1992), el proceso de fabricación del velo de PP consolida un material con "efecto barrera", ya que los filamentos forman un entramado en el cual el 50 % de los espacios libres tienen una dimensión inferior a 50  $\mu$ , a través de los cuales no puede pasar ningún insecto. Además, este mismo autor indica que este material tiene un efecto repulsivo para los insectos, similar al encontrado en otros materiales, como por ejemplo los plásticos aluminizados (Sorensen, 1989; Lamont et al., 1990).

La exclusión de insectos limita la incidencia de las virosis. Por ejemplo, en calabacín, el virus del mosaico de la sandía (WMV) se retrasa un mes (Reyd et al., 1993) reduciéndose las tasas de infección al final del ciclo (Faouzi et al., 1993; Gómez et al., 1989).

El control realizado sobre las plagas, en algunas ocasiones, ha demostrado que su utilización es una alternativa económica a los tratamientos fitosanitarios convencionales (Brown et al., 1989) que pueden no asegurar un control uniforme de las virosis (Hemphill et al., 1988).

En contra de su utilización hay que indicar que las especies cultivables están

restringidas a aquellas de bajo porte, no siendo de interés práctico su uso en plantas entutoradas, a pesar de haberse empleado en algunos casos.

Como anteriormente se indicó, en plantas sensibles o pequeños trasplantes la elevación de las temperaturas máximas pueden ser lesivas. Gent (1989), comprobó como el contacto con la cubierta provocó abrasamientos en los ápices de crecimiento de plantas de tomate, lo que condujeron al desarrollo de tallos laterales que cambiaron la arquitectura de la planta, reduciendo la producción. Lo mismo relatan en pimiento Rumpel y Grudzien (1990), que observan crecimientos arbustivos multilaterales que retrasan el cuajado de los frutos y la cosecha, y Call y Courter (1989), que cuantifican la reducción en producción precoz en un 80 %. Sobre patata, Green y Hadley (1989), encontraron una mejora en la germinación y unas altas tasas de crecimiento iniciales que no se vieron reflejadas posteriormente en la producción, debido a que extensos periodos de protección aceleran la senescencia. En ocasiones no se ve alterada la producción y si la calidad que puede verse afectada por estas altas temperaturas como en el caso del melón (Donley y Hochtmoth, 1989). Para evitar estos efectos indeseables es necesario la realización de ensayos de adaptación local para cultivos de interés, optimizando los ciclos de protección (fundamentalmente el momento de retirada de cubiertas).

## **2.6.- Colocación y utilización de las cubiertas flotantes**

La colocación de la cubierta puede realizarse manualmente o de forma mecanizada. En el primer caso son necesarios dos operarios que van desenrollando la bobina del material de cubierta sobre dos caballones en los que anclan el filme por enterramiento o con fijadores especiales. La colocación mecánica se realiza

mediante un tractor con una extendedora combinada similar a la utilizada para acolchados de suelo. El apero dispone transversalmente de una bobina con el material de cubierta que tras ser fijado al suelo inicialmente, se desenrolla y coloca con el avance del tractor (Gracia, 1993). La realización del caballón puede ser anterior al pase de la extendedora o bien ésta puede ir provista de unos discos asurcadores adelantados a la bobina que realizan esta tarea. Tras la bobina unos aporcadores aseguran el anclaje de la lámina al caballón por enterramiento. Pueden también combinarse otra serie de implementos, como por ejemplo rejillas inyectoras de gas desinfectante de suelo, aplicadores de herbicida, insecticida y fertilizante, así como rodillos de distribución de tubería de riego localizado (Gracia, 1993), o plantadora de cepellones.

La colocación manual requiere del orden de 16 horas de trabajo por hectárea mientras que la mecanizada utiliza entre 5 y 10 horas (Gerst, 1985).

En climas o periodos de cultivo fríos puede utilizarse una doble cubierta. Lo normal es que se utilice una lámina de PE asociada a un velo de PP ya que cuando se utilizan dos cubiertas de PE puede producirse adherencia entre ellas por atracción electrostática (Benoit y Ceustermans, 1992), desapareciendo la cámara de aire que debe existir para proporcionar un mejor aislamiento térmico. A pesar del incremento de coste y la gran disminución que se da en la transmisividad, que se cifra en casi un 50 % en condiciones de campo (Benoit y Ceustermans, 1987), se considera rentable en algunos cultivos en climas fríos del norte de Europa.

Pueden utilizarse combinaciones de distintas técnicas de semiforzado, como acolchado de suelo-cubierta flotante (frecuente en USA para el cultivo de melón),



túnel-cubierta flotante e incluso acolchado-cubierta túnel. También puede utilizarse esta técnica (y las ocasiones anteriores) dentro de invernadero.

Las cubiertas flotantes pueden utilizarse durante todo el ciclo de cultivo en plantas de bajo porte, en especies autopolinizantes (Natwick y Laemmlen, 1989) o cuando se utilizan como protección fitosanitaria, aunque lo normal es su utilización solamente durante parte del ciclo. En este caso, determinar el tiempo óptimo de protección y retirada de cubiertas es un paso crítico. Es deseable el mantenimiento de la cubierta hasta que se den condiciones de altas temperaturas (Jenni y Stewart, 1989) que no puedan dañar a la planta.

La retirada del material de cubierta puede también ser mecanizada. La vida media de estos materiales es de 2-3 campañas en el caso de láminas de PE y de 2 años para el velo de PP.

Hay que tener un especial cuidado en el control fitosanitario ya que el microclima creado, al igual que en los cultivos protegidos, no es tan sólo beneficioso para los cultivos sino que también favorece la incidencia de plagas y malas hierbas (Wells, 1994), siendo en algunos casos indispensable el manejo de herbicidas y aconsejables los tratamientos sanitarios. La cubierta altera el ambiente en que actúan los herbicidas pudiendo reducir su eficacia (Hemphill y Crabtree, 1988), afectando su movimiento, permanencia, volatilidad y actividad (Greenfield, 1989). La alta humedad relativa del aire, además, puede favorecer el desarrollo de enfermedades criptogámicas.

## **2.7.- Planta utilizada: Col China**

Con el nombre de col china se engloban 2 especies diferentes:

- *Brassica pekinensis* (Lour) Rupr, Sin. *Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* (Lour.) Olson o "pe-tsai".
- *Brassica chinensis* L., Sin. *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (Rup.) Olson o "pak-choi".

Las formas cultivadas son morfológicamente distintas, siendo la 1ª similar a una lechuga y la 2ª con hojas más parecidas a la acelga.

La planta utilizada para el experimento es *Brassica pekinensis* (Lour) Rupr. Perteneciente a la Familia Crucíferas, Orden Caparales.

La col china es oriunda de Extremo Oriente (China y Japón), donde es la hortaliza que aporta a las dietas alimenticias una mayor cantidad de vitaminas. Actualmente está muy extendido su cultivo, y su consumo en Japón es elevadísimo. Se ha difundido el consumo de esta hortaliza por Europa en los últimos años.

### **2.7.1.- Morfología y características**

*Brassica pekinensis* (Lour) Rupr. es una planta herbácea, bianual (Este Asiático) o anual (cultivo europeo) (Elers y Wiebe, 1984a), alógama de autoincompatibilidad no total, cuyas células poseen:  $2n=20$  cromosomas (Sánchez-Monge, 1981).

*Brassica pekinensis*, parecida a una lechuga con hojas verticales, alargadas, con forma más o menos estipulada, con márgenes irregularmente dentados, con nerviaciones muy marcadas siendo el limbo foliar grueso y prolongándose en forma de ala hasta la base del peciolo, que es ancho, lleno y de color blanquecino. La disposición foliar es radial, los peciolos insertos muy próximos entre sí sobre un tallo muy corto, dando el conjunto una planta en roseta. El cogollo, situado centralmente, se compone de hojas abrazadoras entre sí, muy diferenciadas, de color verde muy claro, escasamente pigmentadas, casi blancas y con nervios y peciolos más patentes que las hojas externas. Existen variedades que forman cogollos bastante apretados. Pueden llegar a adquirir alturas de 50-60 cm. Las hojas interiores son de un color verde muy claro, casi blancas. La raíz principal es pivotante, con escasa profundidad, no extendiéndose más allá de 15-20 cm, y con abundantes raicillas secundarias. Las flores son amarillas, agrupadas en inflorescencias racemosas, con 4 sépalos y 4 pétalos libres y dispuestos en cruz, 6 estambres y 2 carpelos unidos formando un ovario superior que da un fruto en silicua con un pico corto.

Las variedades cultivadas en Europa suelen ser híbridas y se clasifican comercialmente en función de su precocidad y en la forma del cogollo. La mejora genética de esta hortaliza está dirigida principalmente a la obtención de híbridos, mediante genes de androesterilidad.

La madurez comercial es similar a la de la lechuga iceberg y se alcanza cuando se desarrolla un cogollo compacto y con un peso determinado.

## Introducción

Según su ciclo biológico, es decir, en función de su precocidad, se clasifican en los siguientes grupos:

- **Variedades tempranas o precoces**, suelen cubrir un ciclo de menos de 60 días desde la siembra, desarrollándose entre primavera y verano.
- **Variedades semitardías o de ciclo medio**, su ciclo está en torno a los 80 días, y se desarrollan entre verano y principios de otoño.
- **Variedades tardías o de ciclo largo**, la siembra se realiza en otoño-invierno y la recolección es en invierno-primavera. Son muy resistentes al frío y a la subida prematura a flor.

Existen variedades específicas para su cultivo en invernadero, donde sus ciclos biológicos son diferentes a los descritos.

En función de la forma del cogollo podemos distinguir entre:



Oval



Cilíndrica  
cerrada



Redonda



Cilíndrica  
abierta



Cilíndrica  
alargada

Las variedades comerciales suelen incorporar características genéticas de tolerancia al frío, subida prematura a flor, al tripburn, a virosis (TUMV) y a hongos comunes (Mildiu, oídios, Fusarium).

### **2.7.2.- Fisiología del desarrollo**

Nakamura (1976) distingue en el cultivo de col china las siguientes fases:

- Estadio I: Crecimiento.
- Estadio II: Incremento máximo del número de hojas.
- Estadio III: Incremento máximo del peso de hojas.
- Estadio IV: Incremento de peso en el cogollo
- Estadio V: Período de recolección.

Los estadios IV y V comprenden la formación de cogollos.

Este mismo autor señala como temperaturas óptimas de germinación las comprendidas entre 18 y 22°C; las más adecuadas entre el comienzo del estadio I y mediados del estadio II, son de 18-20°C; entre mediados del estadio II y el estadio III, de 15-16°C, y en los estadios IV y V, de 10-13°C.

Son hortalizas sensibles al frío, y temperaturas inferiores a 12 °C inducen la subida prematura a flor. También los fotoperíodos largos pueden inducir a la floración prematura (Chauvet, 1976; Thompson y Kelly, 1957), pero parece que un fotoperíodo largo influye en la subida a flor prematura cuando se ha producido una vernalización incompleta. Elers y Wiebe (1984a y 1984b), han visto que temperaturas elevadas pueden tener un efecto antivernalizante, disminuyendo el crecimiento de los talamos florales, aunque sin inducir la formación de un número mucho mayor de hojas.

## *Introducción*

---

En general, puede decirse que las variedades alargadas son más sensibles a la subida a flor prematura que las acogolladas.

La col china es una planta con una altísima capacidad fotosintética, cifrable en 1.050 g MF/planta en 80 días (Peron, 1983). La temperatura óptima para la formación de cogollos está aproximadamente entre 15-16°C. En esta formación interviene activamente un mecanismo hiponástico, que determina que las hojas se dispongan con los peciolo erectos y los limbos en forma de copa, siendo los agentes desencadenantes de dicho mecanismo: la edad de la planta, el balance auxínico, el fotoperíodo, bajas intensidades luminosas, etc.

En lo referente a las exigencias de suelo, son muy parecidas a las que tienen el resto de las coles, habiéndose constatado una muy buena adaptación a suelos orgánicos.

Nakamura (1976), observó que los requerimientos para una producción de 60 T/Ha son de :120-150 Kg de N, 40-60 Kg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 200 Kg de K<sub>2</sub>O, 120-160 Kg de CaO y 30 Kg de MgO.

En las regiones mediterráneas, y para cultivo destinado a la exportación, las siembras se realizan en semilleros o en el terreno definitivo directamente, desde mediados de Agosto hasta finales de Septiembre. La producción de col china entre mediados de invierno y mediados de primavera, realizada al aire libre, tiene bastantes problemas por la incidencia de la subida a flor prematura en el cultivo.

Las siembras estivales en el litoral mediterráneo, pueden recolectarse, según la precocidad de las variedades, entre mediados de otoño (o antes) y mediados de invierno. Para conseguir cosechas más tardías, sin los problemas de "subida a flor", se hace necesario cultivar total o parcialmente algunas de sus fases bajo protección climática mediante algún sistema de abrigo o utilizar variedades resistentes (Maroto et al., 1983; 1986b).

Una vez recolectada la col china, para la obtención de la producción comercial se eliminan las hojas externas, se calibran las piezas, y posteriormente se introducen en bolsas de plástico (polietileno) y se disponen verticalmente en cajas.

Se conservan a una temperatura entre 0-1°C y a una humedad relativa ambiental entre el 90-95%, pudiendo conservarse en perfectas condiciones hasta 3 ó 4 semanas.

Las anomalías específicas que puede presentar la col china son:

**Subida a flor prematura:** es inducida por las bajas temperaturas.

**Tipburn:** es una fisiopatía que en principio se manifiesta con la desecación marginal de las hojas jóvenes (interiores) de la col china, que puede evolucionar con el tiempo y producir podredumbres a causa de infecciones microbianas secundarias, teniendo una incidencia muy negativa para el acogollado y la calidad comercial de la col china. La causa de esta enfermedad es una mala translocación del calcio. Maroto et al., (1986a; 1988) han visto que existen cultivares que son menos susceptibles de sufrir esta enfermedad que otros. También observaron que era

mayor la incidencia si el cultivo se realizaba en invernadero sin climatizar que en climatizado y que las aplicaciones foliares reiteradas con un abono rico en calcio podrían prevenir en alguna medida la incidencia del tipburn. Nakamura (1976), diferencia en la sintomatología entre dos tipos de tipburn en la col china. Uno de aparición precoz, con marchitamiento de las hojas externas hasta desecación total adquiriendo un color blanquecino (marginal-rot) y el otro (Heart-rot) aparece con el marchitamiento y después podredumbre de los hojas del interior del cogollo.

**Carencia de boro:** su sintomatología comienza con manchas marrones y de consistencia corchosa en las nerviaciones de las hojas externas, quedando paralizado el crecimiento de la planta.

**Carencia de calcio:** aparecen márgenes foliares secos.

**Pulgones:** hay que estar pendientes en la época del acogollado por si existieran infecciones de estos insectos, ya que una vez formado el cogollo se hace dificultoso combatirlos.

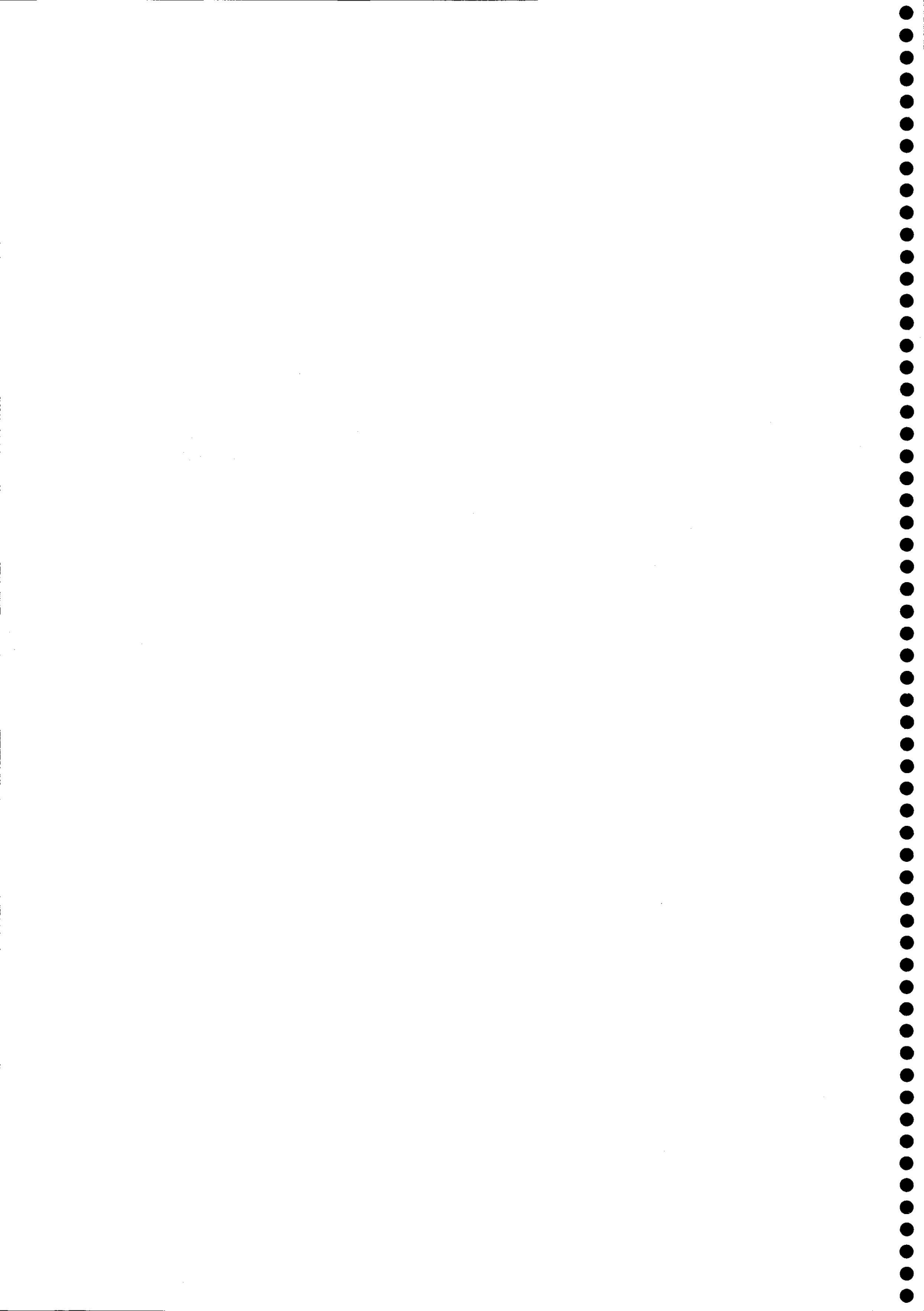
**Otras plagas** en España a tener en cuenta son: la mosca de la col, la polilla de las crucíferas y la rosquilla negra.

**Micosis** producida por *Alternaria brassicae* (Berk.), que debe prevenirse con fungicidas cada 8-10 días.

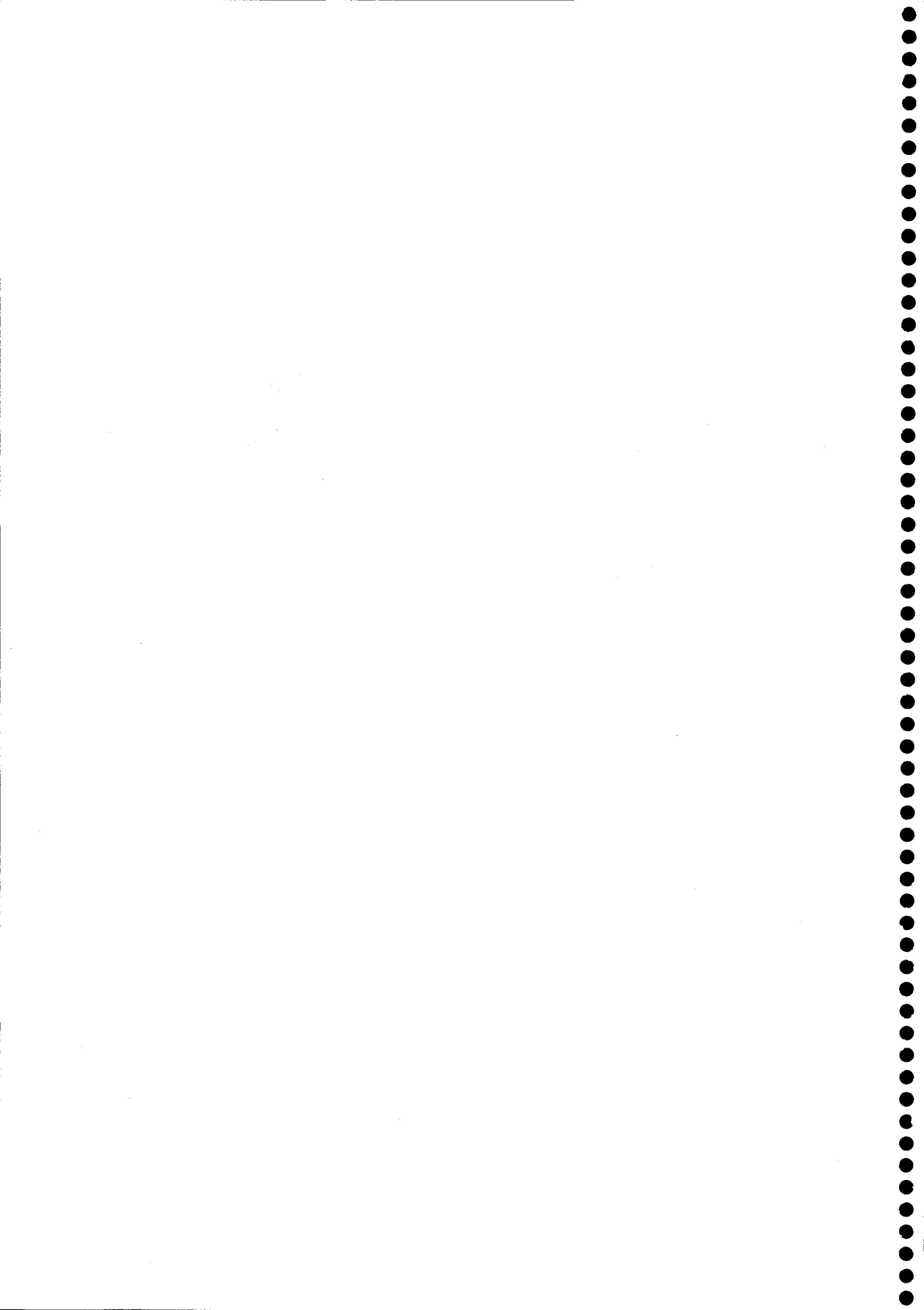
**Bacteriosis:** *Erwinia aroidea* (Townsend) Bersey et al., que desarrolla podredumbres blandas.



**Virosis:** Las principales que pueden afectar a la col china son, el virus del mosaico del pepino (C.M.V.) y el virus del mosaico del nabo (T.U.M.V.).



### ***3.- MATERIAL Y MÉTODOS***



### **3.- MATERIAL Y MÉTODOS**

Los experimentos se llevaron a cabo en el Centro de Investigación y Desarrollo Agrario (C.I.D.A.) que se encuentra localizado al Sur-Oeste de la ciudad de Granada (37° 10' 21" N; 3° 38' 10" O; 600 m de altitud), en la Vega granadina. Realizándose en los meses de Marzo, Abril y Mayo de 1993 y 1994.

#### **3.1.- Siembra y transplante**

La siembra se realizó en bandejas alveoladas de polietileno sobre turba mezclada con un 20 % de vermiculita. Se llevó a cabo en el mes de Febrero, en invernadero no climatizado de cubierta plástica.

Los trasplantes a las parcelas experimentales se practicaron en el mes de Marzo, cuando las plantas tenían un mínimo de 4 hojas verdaderas y un peso fresco superior a 2 g. Tras el transplante se aplicó un riego ligero y se colocaron las cubiertas, las cuales se retiraron definitivamente cuando suponían un freno físico al crecimiento de las plantas.

#### **3.2.- Características de las parcelas experimentales**

La superficie de las parcelas experimentales fue de 4 x 1,5 m<sup>2</sup>. Cada una de ellas tenía 4 líneas de cultivo con 12 plantas cada una. El marco de plantación fue de 0,3 m x 0,3 m. De las 4 líneas de cultivo sólo fueron utilizadas para las determinaciones las plantas de las 2 líneas centrales, siendo consideradas las 2 exteriores como bordes, por lo que no fueron muestreadas.

### **3.3.- Ensayos realizados**

Los ensayos llevados a cabo con las plantas de col china en las parcelas fueron:

1°.- Cultivo al aire libre (**Testigo: T**).

2°.- Cubierta de lámina de polietileno de 50  $\mu$  de espesor y 500 perforaciones de 1 cm de diámetro en 1 m<sup>2</sup> (**Polietileno: PE**).

3°.- Cubierta de velo de polipropileno termosoldado de 17 g/m<sup>2</sup> (Agryl P17 de SODOCA) o agrotexil (**Agrotexil: AG**).

### **3.4.- Fertilización aplicada**

Se realizaron dos tipos de abonado: un abonado de fondo con 750 Kg/ha de abono complejo 15-15-15 (N-P-K) y otro abonado de cobertera en dos aplicaciones, una el mismo día de la retirada de los plásticos y la segunda 15 días después, totalizando en las dos aplicaciones 170 Kg/ha de Nitrosulfato amónico (26% N) y 360 Kg/ha de Nitrato potásico (13-45% N-K).

La aplicación en cobertera de N y K es aconsejable, ya que los requerimientos de éstos crecen con la edad de la planta y fundamentalmente cuando se inicia la fase de acogollado. La movilidad del N en el suelo y la relación directa existente entre la dosis y el peso medio de los cogollos enfatiza el interés de éstas aplicaciones (Hill, 1990), preferentemente en forma nítrica, ya que las formas

amoniacaes han sido relacionadas con la incidencia del tripburn (Imai, 1987; Imai et al., 1988; Imai, 1990; Takahashi, 1981).

El riego se aplicó por inundación.

Las plantas eran tratadas semanalmente, tras la retirada de las cubiertas plásticas, con ClCa (0,3 g/L) como tratamiento preventivo contra tipburn.

En el semillero se utilizó como fungicida preventivo de amplio espectro Zineb (etilen bis ditiocarbamato de zinc).

El insecticida de suelo previo al transplante fue Lindano (Gamma 1,2,3,4,5,6 hexacloro-ciclolaxano) que actúa por ingestión y contacto.

Los insecticidas foliares aplicados fueron: Permetrin (Cis, trans 3-(2-2)-dicloroetenil, 2,2 dimetil ciclopropano carboxilato de 3 fenoxibencilo), Dimetoato (Ditiofosfato de 0,0-dimetilo de S-Nmetil carbomil metilo) o Malatión (Ditiofosfato de 0,0 -dimetilo de S-1,2-dietoxicarbonil etilo).

### **3.5.- Estudio climático**

En la parcela de ensayos se instaló una estación agrometeorológica portátil con la cual se midieron, en el exterior y bajo cubiertas los siguientes parámetros:

- Temperatura del aire
- Temperatura del suelo a 5 y 15 cm de profundidad
- Humedad relativa
- Precipitación
- Radiación puntual

Las estaciones meteorológicas estaban compuestas por un microordenador o datalogger (equipo de adquisición de datos) CR-21X de Campbell Scientific, los cuales fueron programados para realizar medidas cada 15' y promediar cada hora para todos los sensores, salvo en el caso de la radiación en la que fueron cada minuto.

#### **3.5.1.- Temperatura**

Las medidas de temperatura aérea y bajo las distintas cubiertas flotantes, así como las del suelo a 5 y 15 cm de profundidad, se realizaron mediante sondas 107 de Campbell Scientific, con un error máximo de  $\pm 0,4^{\circ}\text{C}$  en un rango entre  $-23^{\circ}\text{C}$  y  $48^{\circ}\text{C}$ . La medida se expresó en  $^{\circ}\text{C}$ .



### **3.5.2.- Humedad relativa**

Los sensores utilizados para medir la humedad relativa del aire fueron de 2 tipos:

- Aspirosicrometros ventilados (bulbo húmedo-bulbo seco)
- Sensor de humedad de estado sólido MP 100 de Rotronic.

### **3.5.3.- Radiación solar**

Los sensores para determinar la radiación solar puntual del aire, del exterior y bajo las diferentes cubiertas, fueron LI-200 pyranometer de LI-COR inc. Se midió en  $W/m^2$ , con un error absoluto máximo de  $\pm 5\%$  y  $\pm 3\%$  como media.

### **3.6.- Análisis de los materiales de cubierta**

Para caracterizar las propiedades ópticas y térmicas de los materiales de cubierta se realizaron análisis espectroscópicos. El comportamiento óptico en la región de la radiación visible fue registrado mediante un espectrofotómetro de doble haz Perkin-Elmer modelo 300, mientras que la espectrofotometría infrarroja se registró en un espectrofotómetro de doble haz Perkin-Elmer modelo 857.

### **3.7.- Análisis de suelo**

Para el análisis del suelo, cada muestra era el resultado de la suma de 12 submuestras tomadas al azar en cada parcela. Para cada muestreo se hicieron 4 repeticiones. Se muestrearon tan solo los primeros 20 cm tras valorar la presencia en profundidad de las raíces de la col china. Las muestras fueron tomadas antes de la plantación de la col china. Con ellas se realizaron los análisis físico y químico del suelo.

En el análisis físico se realizó la determinación de la composición granulométrica del suelo: arena, limo y arcilla, expresada en % (Day, 1965).

Las muestras se secaron en estufa de aire forzado (30°C) desmenuzándolas con rodillo de madera, tamizando el resultado a través de una malla de 2 mm de luz y almacenándolas en bolsas de plástico previamente rotuladas. La metodología analítica para la determinación de los parámetros químicos se encuentra en la **Tabla I**.

### **3.8.- Análisis del agua de riego**

El agua de riego procedía de una captación subterránea en la finca. Las muestras para análisis, tomadas tras 35' de funcionamiento de la bomba, eran envasadas en botellas de plástico de un litro de capacidad.

La metodología para cuantificar los parámetros del agua de riego (**Tabla II**) es la descrita por el Método Oficial de Análisis del M.A.P.A. (1995).

**Tabla I.- - Parámetros y metodología seguida para el análisis químico del suelo.**

<b>Parámetros</b>	<b>Metodología</b>
- pH (1/2,5)	Chapman y Pratt, 1961
- pF a 1/3 y a 1/5 atmósferas	U.S. Salinity Lab. Staff., 1954
- Conductividad Eléctrica (C.E.)	Bower y Wilcox, 1965
- Materia Orgánica Oxidable	Walkey, 1935; Jackson, 1964
- Nitrógeno	Rubia et al., 1950
- Carbonatos	Allison y Moodie, 1965
- P Asimilable (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	Watanabe y Olsen, 1965
- K Asimilable (K <sub>2</sub> O)	Pratt, 1965
- Caliza Activa	Hess, 1971; Barahona, 1984
- Cationes de Cambio: K, Na, Ca y Mg	Bower et al., 1952
- Capacidad de cambio	Bower et al., 1952
- Micronutrientes: Fe, Mn, Zn y Cu	Aguilar et al., 1984; 1985; Romero et al., 1982

**Tabla II.- Parámetros y Metodología seguida para el análisis del agua de riego.**

<b>Parámetros</b>	
- Bicarbonatos	- Cloruros
- Carbonatos	- Boro
- Fosfatos	- Cobre
- Amonio	- Manganeso
- Calcio	- Hierro
- Magnesio	- Zinc
- Sodio	- Ph
- Potasio	- Conductividad (20°C)
- Nitratos	- Dureza
- Sulfatos	- Indice RAS

El índice RAS (Relación de adsorción de sodio) y la Dureza (grados (°) hidrométricos franceses) (**Tabla II**) se calcularon según describe Canovas (1990).

### **3.9.- Especie vegetal utilizada**

Como ya hemos visto en la Introducción, con el nombre de col china se engloban 2 especies diferentes: *Brassica pekinensis* (Lour) Rupr. y *Brassica chinensis* L. (Maroto, 1989). Algunos autores las incluyen como subespecies dentro de *Brassica campestris* L. (ssp. *pekinensis* y *chinensis*). Las formas cultivadas son morfológicamente distintas, siendo la 1ª similar a una lechuga y la 2ª con hojas más parecidas a la acelga.

La planta utilizada para el experimento es *Brassica pekinensis* (Lour) Rupr., perteneciente a la Familia Crucíferas, Orden Caparales. Es oriunda de Extremo Oriente, siendo allí la hortaliza que aporta a las dietas alimenticias una mayor cantidad de vitaminas. Actualmente está muy extendido su cultivo.

El cultivar de col china utilizado para nuestra experiencia fue el **Nagaoka 50** de Sluis & Groot. Híbrido de ciclo precoz, cogollo cilíndrico, poca altura (35-40 cm), hojas color verde amarillento y un aceptable comportamiento ante la subida a flor en las condiciones ecológicas empleadas.

### **3.10.- Toma de muestras vegetales y su preparación.**

Se realizaron 5 muestreos del cultivo en cada uno de los dos años que duró el experimento (**Tabla III**). El 1º muestreo correspondió a las plántulas procedentes de invernadero antes de ser colocadas en las parcelas experimentales. Una vez trasplantadas las coles chinas eran cubiertas por los materiales plásticos Polietileno y Agrotexil, salvo el Testigo, que queda sin cubrir. El 2º, 3º y 4º muestreos se

realizaron cuando las plantas estaban cubiertas, coincidiendo el 4º muestreo con la retirada de los materiales plásticos. El 5º correspondía a la cosecha.

**Tabla III.- Calendario de muestreos.**

<b>Muestreos</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>1993/94</b>
<b>Siembra</b>	Invernadero	8 de Febrero
<b>1º</b>	Plantación y colocación de cubiertas	15 de Marzo
<b>2º</b>	Con cubiertas plásticas	30 de Marzo
<b>3º</b>	Con cubiertas plásticas	14 de Abril
<b>4º</b>	Retirada de cubiertas plásticas	29 de Abril
<b>5º (Cosecha)</b>	Sin cubiertas plásticas	14 de Mayo

En cada muestreo se tomaron 4 plantas, las cuales arrancadas de raíz, fueron introducidas en bolsas de plástico debidamente etiquetadas, siendo finalmente transportadas al laboratorio en condiciones de frío, para su posterior identificación y manipulación (Wolf, 1982).

Para la cosecha fueron recolectadas 14 plantas por parcela experimental, de las cuales 4 eran muestras para análisis como en los anteriores muestreos. El resto se pesaron en bruto y posteriormente se eliminaron las hojas externas hasta dejar un cogollo comercial, el cual fue pesado. Se desecharon los cogollos mal formados, con pesos inferiores a 500 g, o con cualquier anomalía que los hiciera comercialmente inviables. Se cuantificaron la producción bruta y la comercial.

Las plantas de col china muestreadas fueron sometidas a un proceso de lavado para eliminar la contaminación, con una solución de detergente no iónico al 1%. Posteriormente se lavaron con agua corriente hasta la total eliminación del detergente y seguidamente se enjuagaron con agua destilada. Se secaron con papel de filtro y se realizaron 2 submuestras con ellas. Una de las submuestras se introdujo en bolsas de plástico y éstas en un frigorífico a - 25°C y la otra se introdujo en una estufa con corriente de aire forzado, a una temperatura de 70°C durante 24 h, (Steyn, 1959). Pasado dicho tiempo las muestras de la estufa se molieron hasta el estado de polvo (Lachica, 1967), empleando para ello un molinillo "Kelner mod. K.S." de material plástico y se guardaron en bolsas de plástico convenientemente rotuladas para su posterior identificación y análisis.

### **3.10.1.- Análisis del material vegetal fresco.**

En la submuestra de material vegetal fresco, mantenida a - 25° C, se determinaron los parámetros y actividades enzimáticas que se muestran en la Tabla IV.

**Tabla IV.- Esquema de trabajo desarrollado con la submuestra de material vegetal fresco de col china.**

<b>Parámetros</b>	<b>Actividades Enzimáticas</b>
- Proteínas y aminoácidos	- Nitrato Reductasa "in vivo"
- Hidratos de C. no estructurales	- Nitrato Reductasa con $\text{NO}_3^-$
- Prolina	- Nitrato Reductasa con $\text{NO}_3^-$ y Mo
- Clorofila a y b	- Nitrato Reductasa "in vitro"
- Pigmentos accesorios	- Nitrito Reductasa "in vitro"
- Acidez iónica	- Piruvato Kinasa endógena
- Acidez valorable	- Piruvato Kinasa inducida con Ca, Mg
- Ácido Ascórbico	- Fosfatasa ácida foliar

### **3.10.1.1.- Proteínas y Aminoácidos solubles.**

Se pesaron 0,5 g de material vegetal fresco y se maceraron con 5 mL de tampón fosfato 50 mM y pH 7. El extracto se filtró y centrifugó a 12.000g durante 15'. Del sobrenadante se tomaron 0,2 mL y se les añadió 10 mL de colorante Azul de Coomassie (G-2), se agitaron por inversión del tubo y se dejaron reposar entre 5'y 60'. Pasado este tiempo se procedió a la lectura por espectrofotometría, a una longitud de onda de 595 nm. Los datos se enfrentaron a una curva patrón de albúmina bovina. Los resultados se expresan en mg/g p.f. (Bradford, 1976).

Del sobrenadante obtenido en la extracción se tomó una alícuota, para determinación de aminoácidos solubles, de 0,1 mL a la que se le añadió 0,4 mL de tampón fosfato 50 mM pH 7 y 1,5 mL de reactivo de Ninhidrina, se introdujo en un



baño de agua a 100° C durante 20'. Pasado este tiempo sacamos los tubos y los introducimos en un baño de hielo y posteriormente adicionamos 8 mL de propanol al 50 %. Se procedió a la lectura, pasados 10', por espectrofotometría a una longitud de onda de 570 nm frente a una curva patrón de Glicocola. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{g/g}$  p.f. (Moore y Stein, 1954).

### **3.10.1.2.- Hidratos de Carbono no Estructurales.**

Se determinaron por el método de Irigoyen et al., (1992). Se maceró material vegetal fresco con etanol al 96 %, se filtró y lavó 2 veces con etanol al 70 %, y se centrifugó. Del sobrenadante se tomaron las alícuotas correspondientes a las que añadimos antrona e incubamos 10' en baño de agua a 100°C. Pasado ese tiempo se midieron por espectrofotometría frente a curvas patrón de glucosa, fructosa y sacarosa. Los resultados obtenidos se expresaron en mg de glucosa, fructosa y sacarosa/g p.f. respectivamente.

El residuo de la centrifugación se secó y se añadió agua destilada, buffer acetato 4M pH 4,5 y alfa-glucoamilasa 0.5% (p/v), se agitó y se introdujo en estufa 48h a 37°C. De él se extrajo una alícuota con la que se determinó el almidón por espectrofotometría (Irigoyen et al. 1992). Las concentraciones de almidón obtenidas se expresaron en mg/g p.f.

### **3.10.1.3.- Prolina**

Del sobrenadante obtenido en la extracción anterior para azúcares (Irigoyen et al., 1992) se tomaron 0,2 mL de alícuota, se añadieron agua, ninhidrina y ácido

acético glacial. Se introdujeron en baño de agua a 100°C durante 45'. Se enfriaron en baño de hielo, se añadieron 10 mL de benceno, agitando vigorosamente y dejando reposar 20-30'. Pasado este tiempo se realizó la lectura por espectrofotometría a 515 nm de longitud de onda, frente a una curva patrón de prolina. Los datos se expresaron en  $\mu\text{g/g}$  p.f. (Paquin y Lechasser, 1979).

#### **3.10.1.4.- Pigmentos**

Los pigmentos analizados fueron: clorofilas **a** y **b**, carotenos, antocianinas, y licopenos.

##### **3.10.1.4.1.- Clorofilas**

El método seguido es el de Hiscox e Israelstam (1979). En 5 mL de dimetil-sulfóxido se introducen 40 mg de taleolas de 3 mm de diámetro, en un baño termostatzado a 65°C 1h 30'. Pasado este tiempo se mide la intensidad de color espectrofotométricamente frente al correspondiente blanco y a las longitudes de onda indicadas por Bruinsma (1963). Los contenidos clorofilicos se expresaron en mg/100 g p.f. según las ecuaciones de McKinney (1941).

##### **3.10.1.4.2.- Carotenos**

Del extracto del apartado anterior se realiza una lectura a 502 nm de longitud de onda y aplicamos la fórmula de Jaspas (1965). Los resultados se expresaron en mg/100 g p.f.

#### **3.10.1.4.3.- Antocianinas y Licopenos**

Se pesaron entre 0,5-1 g de material vegetal fresco en taleolas de 5 mm de diámetro y se le añadieron 10 mL de metanol acidificado con ClH, manteniéndose 24 h (Bajaj et al., 1981). La lectura se realizó en absorbancia a 530 nm de longitud de onda por espectrofotometría y los resultados se expresaron en D.O. (densidad óptica).

La extracción en el material fresco para la determinación de los licopenos se realizó del mismo modo que para las antocianinas y los resultados se expresaron en % (Bajaj et al., 1981).

#### **3.10.1.5.- Acidez iónica y valorable**

Se trituraron 5 g de material vegetal fresco con 50 mL de H<sub>2</sub>O destilada y se filtraron.

De ellos se tomaron 40 mL a los que se le añadió unas gotas de fenolftaleína y se valoraron con NaOH 0,1 N, hasta persistencia de un pH 8,2 medido con un pH-metro para determinar la **acidez valorable**. Los datos se expresaron en g de ácido cítrico/100 g p.f. (Jarret et al., 1948).

La **acidez iónica** se realizó midiendo el pH del extracto triturado con un pH-metro. (Aubert, 1971).

### **3.10.1.6.- Ácido ascórbico**

5 g de material vegetal fresco se maceraron con 10 mL de ácido oxálico al 0,4 %, se centrifugaron y se tomó una alícuota que fue valorada con 2,6-diclorofenol-indofenol 0,05 mM, frente a un blanco de ácido ascórbico. Los resultados se expresaron en g/100 g p.f. (Aberg, 1958).

### **3.10.1.7.- Actividad Nitrato Reductasa**

La determinación de la Nitrato Reductasas se basa en el método de Bar-Akiva y Sternbaum (1966), modificado posteriormente por Bar-Akiva et al. (1970) y adaptado a nuestro material por Valenzuela y Romero (1996).

#### **3.10.1.7.1.- Actividad Nitrato Reductasa "in vivo" o endógena**

Se pesaron 100 mg de material vegetal fresco en discos de 5 mm de diámetro y como medio de incubación e infiltración se utilizó tampón fosfato 100 mM pH = 7,5 que contenía propanol al 1 % (v/v). Se realizó el vacío a las muestras y posteriormente fueron incubadas durante 1 h a 30° C en oscuridad.

Los  $\text{NO}_2^-$  obtenidos en este proceso se valoraron mediante la adición de 2 mL de Sulfanilamida en HCl 1.5 N al 1% (p/v) y 2 mL de N-NEDA (dihidrocloreuro de N-1-naftil-etilendiamida) en HCl 0.2 N al 0.02% (p/v). El color desarrollado se midió mediante espectrofotometría, a una longitud de onda de 540 nm frente a una curva patrón de  $\text{NO}_2^-$  (Snell y Snell, 1949). La ANR se expresó en  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NO}_2^-$  formados h/g p.f.

### **3.10.1.7.2.- Actividad Nitrato reductasa inducida con $\text{NO}_3\text{K}$**

El tampón fosfato 100 mM pH = 7,5 además del propanol al 1 % lleva  $\text{KNO}_3$  50 mM. La determinación de los  $\text{NO}_2^-$  resultantes se llevó acabo por el método de Snell y Snell (1949) y se expresaron en  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NO}_2^-$  formados h/g p.f.

### **3.10.1.7.3.- Actividad Nitrato reductasa infiltrada con $\text{NO}_3^-$ y Mo**

En el medio de infiltración se añadieron  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  y  $\text{NO}_3\text{K}$ , para nuestro material vegetal sustituimos la primera sal por  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  al 2%. Los resultados se obtuvieron y expresaron de la misma forma que para la ANR "in vivo" (Snell y Snell, 1949).

### **3.10.1.7.4.- Actividad Nitrato Reductasa "in vitro"**

Se maceró el material vegetal fresco con tampón P-K (fosfato potásico) 50 mM pH = 7,5 que lleva EDTA- $\text{Na}_2$  2mM, DTT 2 mM y cisteina al 1,5 %. Al macerar añadimos 0,5 g de PVPP (p/v). Se centrifugó 2 veces. El sobrenadante obtenido servirá también para la determinación de la Actividad Nitrito Reductasa "in vitro" (Becana et al., 1985).

Del sobrenadante se tomó una alícuota a la que se le añadió tampón P-K 100 mM pH 7,5, cisteina 10 mM,  $\text{KNO}_3$  100 mM y NADH 2 mM. Incubamos a 30°C durante 1 h y posteriormente paramos la reacción con acetato de Zn 1 M. Se realizó una nueva centrifugación (Becana et al., 1985).

De este último sobrenadante se tomó la alícuota a la que se le añadió Sulfanil-CIH y N-NEDA. Por espectrofotometría a 540 nm se midió la absorbancia de las muestras frente a una curva patrón de  $\text{NO}_2^-$ . Los resultados se expresaron en  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NO}_2^-$  formados h/g p.f. (Snell y Snell, 1949).

#### **3.10.1.8.- Actividad Nitrito Reductasa "in vitro" (ANiR)**

Del sobrenadante obtenido después de las 2 primeras centrifugaciones en la determinación de la ANR "in vitro" (Becana et al., 1985), se tomó una alícuota a la que se le añadió tampón P-K 50 mM pH 7,5,  $\text{KNO}_2$  2 mM, Ditionito-Na (25 mg/mL) en  $\text{NaHCO}_3$  0,3 M y metil viológeno 5 mM. Se agitaron las muestras y se incubaron a 30° C durante 1 h, parando la reacción por agitación fuerte hasta decoloración (oxidación del ditionito-Na). Posteriormente se añadieron 8 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada y agitamos (Lillo, 1984).

De aquí se tomó una alícuota a la que se adicionó sulfanil-CIH y N-NEDA. Se enfrentaron las muestras frente a una curva patrón de  $\text{NO}_2^-$  y los resultados se expresaron en  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NO}_2^-$  destruidos h/g p.f. (Snell y Snell, 1949).

#### **3.10.1.9.- Actividad Piruvato-Kinasa**

La determinación de las distintas formas de la Piruvato-Kinasa se realizó según el método descrito por Bar-Akiva et al. (1976) con las modificaciones adecuadas para nuestro material (Pulgar et al, 1996).

### **3.10.1.9.1.- Actividad Piruvato-Kinasa endógena**

Se pesaron 0,5 g de material vegetal fresco y se maceraron con 5 mL de Buffer-Tris-ClH 0,05 M con un pH 7,5, que contiene glicerol al 50 % y 2-mercaptoetanol 10 mM. Se filtró y centrifugó y del sobrenadante obtenido tomamos una alícuota de cada muestra, a la que se le adicionó Buffer-Tris-ClH 0,05 M pH =7,4 con molibdato sódico 0,25 mM, PEP 2,5 mM, ADP 5 mM y H<sub>2</sub>O destilada. Se incubaron los ensayos 12' a 37°C y se paró la reacción con 2,4-dinitrofenilhidrazina 0,0125 % en ClH 2N frío. Se realizó otra incubación durante 17' a 37°C. Pasado este tiempo se paró la reacción por adición de NaOH 2N, se centrifugó y se realizó la lectura de absorbancia a 510 nm frente a una curva patrón de ácido pirúvico. Los resultados finales se expresaron en  $\mu\text{mol}$  de ácido pirúvico formado h/g p.f.

### **3.10.1.9.2.- Actividad Piruvato-Kinasa en presencia de $\text{Mg}^{2+}$**

Se siguió el mismo método que en la Piruvato-Kinasa endógena, sustituyendo el H<sub>2</sub>O destilada por MgSO<sub>4</sub> 0,01 M. Todos los restantes procesos siguieron lo descrito en el apartado 3.10.1.9.1.

### **3.10.1.9.3.- Actividad Piruvato-Kinasa en presencia de $\text{K}^{+}$**

Del mismo extracto utilizado en los ensayos anteriores se tomó una alícuota y se siguieron las mismas pautas que en el apartado anterior, pero en este caso sustituimos el H<sub>2</sub>O destilada por una solución de KCl 0,1 M.

#### **3.10.1.9.4.- Actividad Piruvato-Kinasa en presencia de $\text{Ca}^{2+}$**

Todo el proceso fue igual al descrito para la Actividad Piruvato-Kinasa endógena (apartado 3.10.1.9.1) salvo que en la determinación de esta forma del enzima, se sustituyó el  $\text{H}_2\text{O}$  destilada por una solución de  $\text{CaCl}_2$  0,1 M.

#### **3.10.1.10.- Actividad Fosfatasa Ácida Foliar**

El método seguido para la determinación de la Actividad Fosfatasa Ácida Foliar fue el propuesto por Besford (1979), con las modificaciones apropiadas para nuestro material vegetal.

Se pesaron 0,5 g de material vegetal fresco y se maceraron con 10 mL de Buffer acetato sódico-ácido acético 0,2 M pH = 5,8, durante 4' a 2°C. Los homogenados se centrifugaron a 3.000 g durante 10' a 2°C. Se tomaron alicuotas de cada extracto, a las que se añadieron P-nitrofenil-fosfato (PNP-P) y tampón acetato sódico-ácido acético 50  $\mu\text{M}$  pH = 5,8. Se incubaron las muestras con los reactivos a 30°C durante 15'. Pasado este tiempo se detuvo la reacción con NaOH 0,2 N por hidrólisis del enzima. Cada muestra lleva un blanco control al que se le añade los mismos reactivos que a las muestras, pero el NaOH 0,2 N se pone antes de la incubación. La lectura se realiza por espectrofotometría pasados 10' a 405 nm.

El ensayo consiste en la hidrólisis del P-nitrofenil-fosfato (PNP-P) por la actividad de la fosfatasa ácida dando P-nitrofenol (PNP). Así, la unidad de actividad del enzima se expresa en  $\mu\text{mol}$  de PNP-P hidrolizados h/g p.f. ó  $\mu\text{mol}$  de PNP formados h/g p.f., todo ello a 30°C.



### **3.10.2.- Análisis del material vegetal seco**

El material vegetal seco se introdujo, en vasos de vidrio, en una estufa durante 48 h. a 70°C. Pasado éste tiempo, las muestras se dejaron enfriar en un desecador (Lachica et al., 1973). En este material se determinaron los nutrientes que se indican en la Tabla V.

**Tabla V.- Esquema de trabajo desarrollado con la submuestra de material vegetal seco de col china.**

<b>Nutrientes Totales</b>	<b>Nutrientes Solubles</b>
- Nitrógeno orgánico	- Nitratos y Amonio
- Fósforo	- Sulfatos y Cloruros
- Sodio y Potasio	- Fósforo inorgánico y orgánico
- Calcio y Magnesio	- Sodio y Potasio
- Azufre	- Calcio y Magnesio

#### **3.10.2.1.- Mineralización por vía húmeda con sulfúrico**

Se pesaron 0.15 g de material vegetal seco de cada una de las muestras y se sometieron a una mineralización por vía húmeda con sulfúrico concentrado y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% libre de P, (Wolf, 1982). Este método se utiliza para la obtención de las formas totales de los nutrientes.

Del mineralizado se tomaron las correspondientes alícuotas para la determinación de los siguientes macronutrientes: N orgánico, P, Mg, Ca, Na, K. la determinación de cada uno de los elementos antes citados fue el siguiente:

#### **3.10.2.1.1.- Nitrógeno orgánico.**

Se tomó una alícuota del mineralizado al que se le añadió Buffer de trabajo (fosfato disódico, tartrato sódico-potásico e hidróxido sódico), salicilato sódico-nitroprusiato sódico al 15 % e hipoclorito sódico al 5,35 %, se agitó e incubó a 37°C durante 15'. Pasado este tiempo, se procedió a la lectura del N orgánico por espectrofotometría, a una longitud de onda de 650 nm frente a una curva de  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$  (Baethgen y Alley, 1989). Los datos se expresaron en mg de  $\text{NH}_4^+$ /g p.s.

#### **3.10.2.1.2.- Fósforo**

Se tomó una alícuota del mineralizado sulfúrico y se le añadió reactivo nitrovanadomolibdico y se efectuó la lectura pasada 1 h a una longitud de onda de 430 nm frente a una curva patrón de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Los resultados se expresaron en mg de P/g p.s. El método utilizado fue el de Kitson y Mellon, 1944.

#### **3.10.2.1.3.- Sodio y Potasio**

Tomamos una alícuota de 0.1 mL y le añadimos 10 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Se determinaron por fotometría de llama (Lachica et al., 1973), usando el filtro correspondiente al  $\text{Na}^+$  o al  $\text{K}^+$ , frente a las respectivas curvas. Los datos se expresaron en mg de  $\text{Na}^+$ /g p.s. y  $\text{K}^+$ /g p.s. respectivamente.

#### **3.10.2.1.4.- Calcio y Magnesio**

Se determinaron por el método de espectrofotometría de absorción atómica, (Hocking y Pate, 1977).

El  $Mg^{2+}$  se midió directamente de la solución hecha para la determinación de  $Na^+$  y  $K^+$ . Se expresó en mg de  $Mg^{2+}/g$  p.s..

La medida del  $Ca^{2+}$  se efectuó en una dilución del mineralizado sulfúrico en una solución de óxido de lantano al 0.3%. La adición de óxido de lantano impide que se formen compuestos de  $Ca^{2+}$  difícilmente atomizables en la llama y se permite una correcta medida del  $Ca^{2+}$  (Pinta, 1973). Los datos en en mg de  $Ca^{2+}/g$  p.s.

#### **3.10.2.2.- Mineralización por vía húmeda con Nitrico-Perclórico**

Se pesaron 0,1 g de material vegetal seco y se le añadieron 5 mL de solución Nitrico-perclórica (1:1), se realizó la mineralizaron por adición de  $H_2O_2$ . Una vez frías las muestras se le adicionaron 20 mL de  $H_2O$  destilada y se agitaron (Novozamsky y van Eck, 1977). Del extracto obtenido medimos:

##### **3.10.2.2.1.- Azufre orgánico**

Del mineralizado anteriormente obtenido se tomó una alícuota a la que adicionamos  $H_2O$  desionizada, Goma de acacia (0,25 % p/v) y  $BaCl_2 \cdot 2H_2O$  (8 %). La concentración de S orgánico se determinó por turbidimetría (Novozamsky y van Eck, 1977). Los datos se dieron en mg de S/g p.s.

### **3.10.2.3.- Extracción de las formas solubles de los nutrientes en medio acuoso**

Se realizó mediante el método propuesto por Cataldo et al., 1975. En tubos de plástico se introdujo 0,2 g de material vegetal seco y molido finamente y se añadieron 20 mL de agua destilada. Seguidamente se mantuvo en agitación 120', pasado este tiempo se procedió a una centrifugación a (800g) durante 15'. El sobrenadante se pasó a tubos de ensayo y se realizaron las medidas de:  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{P}_i$  y P orgánico soluble. El procedimiento seguido para la determinación de los elementos antes citados fue:

#### **3.10.2.3.1.- Nitratos**

Se determinó mediante el método descrito por Cataldo et al., 1975. A una alícuota del extracto acuoso se le añadió ácido salicílico-ácido sulfúrico al 5 % (p/v) y Na(OH) y se agitó. La lectura se realizó frente a una curva patrón de nitratos. Se expresaron los resultados en mg de  $\text{NO}_3^-$ /g p.s.

#### **3.10.2.3.2.- Amonio**

La medida se llevó a cabo por colorimetría, mediante el método de Baethgen y Alley, (1989), ya descrito en el apartado (3.10.1.2.1.1). Los resultados se expresaron en mg de  $\text{NH}_4^+$ /g p.s.

### **3.10.2.3.3.- Sulfatos**

La determinación se realizó por turbidimetría según lo propuesto por Novozamsky y van Eck (1977), como ya se ha indicado en el apartado 3.10.1.2.2.1, con las oportunas modificaciones para nuestro material vegetal. Los datos fueron expresados en mg de  $\text{SO}_4^{=}$ /g p.s.

### **3.10.2.3.4.- Cloruros**

Su determinación se hizo mediante valoración, por el método descrito por Koltoff y Kuroda (1951) y posteriormente modificado por Chapman y Pratt, (1961). A una alícuota del extracto acuoso se le añade  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  y se valora con  $\text{AgNO}_3$  0,0141 N. Se expresaron los resultados en mg de  $\text{Cl}^-$  /g p.s.

### **3.10.2.3.5.- Fósforo inorgánico**

Las medidas se realizaron siguiendo la metodología propuesta por Kitson y Mellon (1944), ya descrita en el apartado (3.10.1.2.1.2). Las unidades en que vienen expresados los resultados son mg de P/g p.s.

### **3.10.2.3.6.- Fósforo orgánico soluble**

Se tomó una alícuota del extracto acuoso (3.10.2.3) y se sometió a desecación y mineralización húmeda por vía sulfúrica según se describió en el apartado (3.10.1.2.1.2). En el mineralizado obtenido se determinó el P orgánico soluble (Kitson y Mellon, 1944). Los datos se expresaron en mg de P/g p.s.

### **3.10.2.3.7.- Sodio y Potasio solubles**

Con la metodología propuesta por Lachica et al., (1973), siguiendo la metodología ya descrita en el apartado (3.10.1.2.1.3), se realizaron las determinaciones mediante medida por espectrofotometría de llama. Los datos se expresaron en mg de Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>/g p.s. respectivamente.

### **3.10.2.3.8.- Calcio y Magnesio solubles**

Se utilizó la espectrofotometría de absorción atómica para la determinación de Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup> por el método de Hocking y Pate, 1977, según hemos indicado en el apartado 3.10.1.2.1.4. Los resultados se dieron en mg de Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>/g p.s.

### **3.11.- Análisis estadístico**

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico, realizando para ello un análisis de la varianza y el test de mínima diferencia significativa (MSD) ó test de Rango Múltiple de Duncan con un porcentaje de confianza del 95% para revelar posibles diferencias significativas entre los tratamientos.

## ***4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN***

