



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Departamento de Producción Vegetal

Establecimiento de criterios para la fertilización racional del níspero japonés (*Eriobotrya Japonica* Lindl.)

MEMORIA PRESENTADA POR:

Esteban Soler López

Para optar al grado de:

DOCTOR INGENIERO AGRÓNOMO

DIRECTORES:

Dra. Ana Quiñones Oliver

Dra. Belén Martínez Alcántara

TUTOR ACADÉMICO:

Dr. Manuel Agustí Fonfría

Valencia, 2015

Tesis sometida a procesos de confidencialidad.

AGRADECIMIENTOS.

Este ha sido un camino largo que aún no ha terminado, pero como dice Lluís Llach en *Viatge a Ítaca*, lo más importante es lo que aprendes en el camino, los amigos que haces, no el camino en sí.

Lo más satisfactorio de este trabajo de tesis es que he tenido que recordar todas las vivencias sobre esta "mala penyora" que es el níspero japonés, "el nyesperer".

Toda esta historia empieza cuando en 1991 un funcionario de la Consellería de Agricultura, Mariano Lorente, me comentó que si tenía algún problema técnico con el níspero que él podría facilitarme a investigadores de la Escuela de Agrónomos de Valencia para intentar solucionarlos y yo le dije que sí.

Y apareció mi profesor, y amigo, Manolo Agustí. Y aquí empezó todo. Estaba todo por hacer.

Esta tesis para mí, entre otras cosas, ha supuesto acordarme de tanta gente que ha colaborado conmigo para que en estos momentos, este cultivo, en nuestra comarca y para los socios de la Cooperativa de Callosa, tenga futuro porque en sus manos tienen las herramientas técnicas precisas para hacer las cosas mejor que nadie.

En primer lugar, mi agradecimiento es para mis directores de tesis, las Doctoras Ana Quiñones y Belén Martínez, por su dedicación, por ser ejemplo del trabajo bien hecho a pesar de las prisas y las dificultades. Vuestra paciencia conmigo ha sido inmensa porque, después de tanto tiempo en el campo con agricultores, sus problemas, sus desilusiones; te haces, como digo yo, *un guerrillero*, para combatir con unos y con otros; vosotras me habéis ayudado tanto que no tengo palabras. Y al mismo tiempo, y no con menos entusiasmo, a D. Francisco Legaz, iniciador de estos trabajos y responsable hasta hace poco de los mismos. ¡Cuántas horas!, tanto en el campo como en el despacho y en los laboratorios. Cuántos ratos de comentarios, razonamientos y cuántos ánimos! "Vamos Esteban que esto lo sacamos adelante...".

Por supuesto, todo este trabajo no habría sido posible sin la colaboración de José Vte Orts, Juanjo Giner y Alfonso Pérez en la parcela experimental. Pero muy especialmente a Natalia Juan y Pepa Berenguer que han sido y son grandes amigas, compañeras y colaboradoras.

Gracias a Jaime Llinares Galiana porque sin su apoyo yo no sería Ingeniero Agrónomo.

Gracias a J.B. Torregrosa que siempre me ha estado animando: mi mejor amigo. A Pepolino y a Modesto.

A Marisa Badenes, ¡Cuánto he aprendido contigo! A José, Ana Delia y a Gerardo Llacer.

A María Herrero. ¡Que sabiduría! Te admiro. A Laura Carreras, la curranta; todos de Aula Dei.

Por supuesto a Manolo Agustí, camarada. A Carmina, Carlos, Amparo....También a Vicent Almela.

A Pepe García Giménez y su magnífico equipo. Josep, Ana, Elisa, etc.

A Luis Bonet, Diego y Miquel y muy especialmente In Memoriam a Pedro Ferrer.

A Eduardo Primo Millo y a Florentino Juste, y con mucho afecto a Mariano Lorente, Pepe Malagón y Julián Bartual por la confianza depositada en mi persona y la entidad que representaba.

A José Manuel Llorens, Julián Toledo, Enrique Albuja, Rafa Esteve y a Maria Gomis. Toda Sanitat Vegetal de Alicante.

A Ana Limiñana y a M^a Ángeles Lledó. ¡Magnificas!. Siempre a mi lado.

A todos los socios de la Cooperativa de Callosa d'En Sarriá, en especial a Saoret El Rei, Paco Cardona, Santiago Bacora, José Saval y José Sanchís, por su apoyo, ánimos y colaboración sin límites.

A todas las juntas rectoras y presidentes de la Cooperativa de Callosa que han apoyado y creído en el proyecto global de modernización de este cultivo y en especial a Alejandro Galiana.

A los que viajamos a China: Ribes, Javier, Carrasco, Alejandro, Mariano, Marisa y Ricardo. ¡Que vivencias!

A mi familia. A mi mujer Toñi que tanto me ha tenido que soportar y perderse por mi trabajo. A mis hijos María José y Jaume. A mis hermanas, Maria, Malena y Vicen. A Daniel Climent: "sempre aprenent d'ell". A mi cuñada M^a José, sobrinos y sobre todo a Llorens. ¿Cuant m'he recordé de tu?

Me siento muy afortunado porque a lo largo de este camino sobre todo he encontrado "molt bona gent".

La Vilajoiosa, Novembre 2015.

RESUMEN

La actual agricultura, con márgenes económicos cada vez más reducidos y sujeta a restricciones medioambientales, exige una mayor racionalización de las técnicas de cultivo empleadas. Estos factores cobran especial interés en el cultivo del níspero japonés, ya que se carece, entre otros, de criterios racionales de fertilización que permitan la realización de aportes ajustados de nutrientes para una óptima producción y calidad del fruto de forma económica y medioambientalmente sostenible. El objetivo del presente trabajo es establecer, en primer lugar, un protocolo de diagnóstico nutricional en el cultivo del níspero japonés (tipo de hoja, momento de muestreo y niveles de referencia de concentración foliar de macro y micronutrientes), que permitirán diagnosticar el estado nutritivo de la plantación. En un segundo término, se ahondará en el conocimiento de la dinámica del nitrógeno, mediante el uso de la técnica de dilución isotópica (^{15}N), que permitirá ajustar el aporte de los fertilizantes nitrogenados a las necesidades del cultivo. Los estudios para el establecimiento del protocolo de diagnóstico nutricional se llevaron a cabo en 40 parcelas de referencia, con óptima producción y calidad del fruto, con plantas adultas de níspero injertado con la variedad *Algerie* sobre pie franco. Los ensayos de la dinámica del nitrógeno marcado se realizaron en la parcela experimental de la Cooperativa Ruchey en Callosa d'en Sarriá de la misma variedad en plena producción y al aire libre. Con los resultados obtenidos se ha desarrollado un protocolo de diagnóstico nutricional en el níspero japonés. Para el muestreo foliar se establece como hoja de referencia, la tercera hoja desde la base de la brotación de primavera, de 3 a 4 meses de edad (estado 139 en la escala fenológica BBCH, primeras hojas completamente expandidas) muestreada durante los meses de agosto y septiembre. Asimismo, se han obtenido los índices foliares de referencia para N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Zn, Mn, Cu, B y Na, que permitirán diagnosticar el estado nutricional del arbolado como *deficiente*, *bajo*, *óptimo*, *alto* o excesivo en níspero japonés, y por tanto establecer criterios racionales de fertilización. El fertilizante aportado antes de la brotación de primavera se incorpora mayoritariamente a las hojas de la brotación de primavera, que actúan como fuente de N para las hojas de la brotación de verano y el esqueleto de la panícula. Y los realizados con anterioridad de la brotación de verano y posteriormente en floración son los que contribuyen fundamentalmente al desarrollo del fruto y su maduración. La aplicación foliar de urea constituye una herramienta para suplementar la concentración foliar y en el fruto de N en el níspero japonés y, por tanto, la planificación del momento del ciclo en el que se realiza el aporte foliar es muy importante. Los momentos más indicados para la aplicación de urea foliar en el ciclo de cultivo del níspero japonés son al inicio de la brotación de verano y en el cuajado del fruto. Por último, la contribución relativa del N procedente de las reservas es determinante para el desarrollo de los nuevos órganos. Por ello, sería de interés considerar reducir los aportes tempranos de fertilizante, siempre y cuando el estado nutricional de la planta sea el adecuado para sustentar, en mayor proporción, el desarrollo de estos.

ABSTRACT

Current agriculture, increasingly subject to environmental restrictions and reduced economic margin, calls for a greater rationalization of the cultivation methods used. These factors have a special interest in the crop of loquat because this crop has not rational criteria of fertilization that enable the realization of adjusted contributions of nutrients for optimal production and quality of the fruit. This production must be economical and environmentally sustainable. The aim of this work is to establish a protocol of nutritional diagnosis in the crop of Japanese loquat (type of leaf, time of sampling and foliar concentration of macro and micronutrient reference levels). This protocol allows for diagnosing the nutritive state of the plant. On the other hand, this study delves into the knowledge of the dynamics of nitrogen, using isotope dilution technique (^{15}N), which allows to adjust the contribution of nitrogen fertilizers to the needs of the crop. The studies for the establishment of nutritional diagnosis were held in forty plots of reference, with optimal production and quality of the fruit in adult plants of loquat grafted with the *Algerie* variety on ungrafted. The nitrogen dynamics tests were performed in the experimental plot of the Cooperativa Ruchey in Callosa d'En Sarrià (Alicante, Spain) with plants of the same variety in production. The results obtained have established a nutritional diagnosis protocol for Japanese loquat. For foliar sampling is set as reference, the third leaf from the base of the budding of spring (139 state scale phenological BBCH, first fully expanded leaves). These leaves were sampled in August and September. Also, the foliar benchmark indices were obtained for N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Zn, Mn, Cu, B and Na, which diagnosing the nutritional status of the plant as deficient, low, optimum, high or over in Japanese loquat. This parameter establishes rational criteria of fertilization. The fertilizer brought before sprouting of spring is source of nitrogen for the summer leaves and skeleton panicle. The fertilizer brought before summer sprouting and later of the blooming is who primarily contribute to the development of the fruit and its maturation. The foliar application of urea is a tool to supplement the foliar concentration of the nitrogen in leaves and fruits. For this motive, the planning is very important. The most suitable time for applying foliar urea are at beginning or the sprouting of summer and the studded fruit. Finally, the relative contribution from nitrogen is decisive for the development of the new organs. Therefore, it would be of interest to consider reducing fertilizer early contributions, provide that the nutritional status of the plant is adequate to sustain, higher, the development of these.

RESUM :

L'actual agricultura , amb marges econòmics cada vegada més reduïts i subjecta a restriccions mediambientals , exigeix una major racionalització de les tècniques de cultiu emprades. Aquests factors cobren especial interès en el cultiu del nispro japonès , ja que manca , entre altres , de criteris racionals de fertilització que permet la realització d'aportacions ajustades de nutrients per a una òptima producció i qualitat del fruit de forma econòmica i mediambiental sostenible.

El objectiu del present treball és establir , en primer lloc , un protocol de diagnòstic nutricional en el cultiu del nispro japonès (tipus de fulla , moment de la mostra i nivells de referència de concentració foliar de macro i micronutrients), que permetran diagnosticar l'estat nutritiu de la plantació. En un segon lloc , s'aprofundirà en el coneixement de la dinàmica del nitrogen , mitjançant l'ús de la tècnica de dilució isotòpica (15 N), que permetrà ajustar l'aportació dels fertilitzants nitrogenats a les necessitats del cultiu. Els estudis per a l'establiment del protocol de diagnòstic nutricional es va portar a terme en 40 parcel·les de referència, amb òptima producció i qualitat del fruit , amb plantes adultes de nispro empeltada amb la varietat *Algerie* sobre peu franc . Els assajos de la dinàmica del nitrogen marcat es van realitzar en la parcel·la experimental de la Cooperativa Ruchey en Callosa d'en Sarrià de la mateixa varietat en plena producció i a l'aire lliure. Amb els resultats obtinguts s'ha desenvolupat un protocol de diagnòstic nutricional en el nispro japonès. Per al mostreig foliar s'estableix com a fulla de referència, la tercera fulla des de la base del brotació de primavera , de 3 a 4 mesos d'edat (estat 139 en la escala fenològica BBCH, primeres fulles completament expandides) mostrejada durant els mesos d'agost i setembre. Així mateix, s'han obtingut els índexs foliar de referència per a N, P , K , CA , Mg, S, Fe, Zn , Mn, Cu, B i Na, que permetran diagnosticar l'estat nutricional de l'arborat com a deficient, baix , òptim, alta o excessiu en nispro japonès, i per tant establir criteris racionals de fertilització. El fertilitzant aportat abans de la brotació de primavera s'incorpora majoritàriament a les fulles de la brotació de primavera , que actuen com a font de N per a les fulles de brotació d'estiu i posteriorment en floració són els que contribueixen fonamentalment al desenvolupament del fruit i la seua maduració.

L'aplicació foliar d'urea constitueix una eina per suplementar la concentració foliar i en el fruit de N en el nispro japonès i, per tant, la planificació del moment del cicle en el qual es realitza l'aportació foliar és molt important. Els moments més indicats per a l'aplicació d'urea foliar en el cicle de cultiu del nispro japonès són a l'inici de la brotació d'estiu i en el quallat del fruit. Finalment, la contribució relativa del N procedent de les reserves és determinant per al desenvolupament de nous òrgans. Per això , seria d'interès considerar reduir les aportacions primerenques de fertilitzants , sempre i quant l'estat nutricional de la planta siga l'adequat per sustentar , en major proporció , el desenvolupament d'aquests.

Contenidos que forman parte de la tesis y que se encuentran inhibidos en este documento:

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ESTABLECIMIENTO DEL PROTOCOLO DE DIAGNÓSTICO NUTRICIONAL EN NÍSPERO JAPONÉS: CONDICIONES DE MUESTREO FOLIAR Y NIVELES DE REFERENCIA DE LOS NUTRIENTES

Ensayo 1.1. – Establecimiento del tipo de hoja

Ensayo 1.2. – Establecimiento de la época de muestreo

Ensayo 1.3 – Definición de los estándares de referencia

4.2. DINÁMICA DEL NITRÓGENO APORTADO AL SUELO EN LA PLANTA. CONTRIBUCIÓN RELATIVA AL DESARROLLO DE LOS NUEVOS ÓRGANOS DURANTE EL CICLO VEGETATIVO DEL NÍSPERO JAPONÉS

4.2.1. Evolución de la concentración de N

4.2.2. Evolución del nitrógeno derivado del fertilizante en función del momento de aplicación

4.2.3. Evolución del nitrógeno derivado del fertilizante como consecuencia del aporte acumulado

4.3. EVALUACIÓN DE LA FERTILIZACIÓN NITROGENADA FOLIAR COMO FUENTE DE NITRÓGENO EN EL DESARROLLO DE LOS NUEVOS ÓRGANOS DURANTE EL CICLO VEGETATIVO

4.3.1. Evolución de la concentración de N

4.3.2. Evolución del nitrógeno derivado del fertilizante aportado por vía foliar en función del momento de aplicación

4.4. EFECTO DEL APORTE FOLIAR SOBRE LA PRODUCCIÓN EN LA PARCELA EXPERIMENTAL

4.5. EXTRACCIÓN DE N POR LA PODA Y ÓRGANOS CAÍDOS

5. CONCLUSIONES

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1. EL NÍSPERO JAPONÉS.....	1
1.1.1. Clasificación botánica, origen y expansión.....	1
1.1.2. Estados fenológicos.....	2
1.1.3. Importancia económica.....	4
1.1.4. Un caso particular. El cultivo del níspero en Callosa d'En Sarrià.....	7
1.2. LA FERTILIZACIÓN NITROGENADA.....	9
1.2.1. La fertilización nitrogenada en el cultivo del níspero japonés.....	9
1.2.2. Uso del isótopo estable del nitrógeno ¹⁵ N en estudios de fertilización nitrogenada.....	10
1.2.2.1. Contribución relativa del nitrógeno aplicado al suelo al desarrollo de los nuevos órganos.....	12
1.2.2.2. Dinámica del nitrógeno aplicado vía foliar en frutales de pepita.....	13
1.2.3. Repercusión medioambiental de la fertilización nitrogenada.....	15
1.3. DIAGNÓSTICO NUTRICIONAL DE LOS CULTIVOS.....	17
1.4. ESTUDIOS I+D+i. LA TECNIFICACION DEL CULTIVO DEL NISPERO.....	18
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	20
2.1. OBJETIVOS.....	21
2.2. PLAN DE TRABAJO.....	22
2.2.1. Establecimiento del protocolo de diagnóstico nutricional en níspero japonés: condiciones de muestreo foliar y niveles de referencia de los nutrientes.....	22
2.2.2. Dinámica del nitrógeno aportado al suelo en la planta. Contribución relativa al desarrollo de los nuevos órganos durante el ciclo vegetativo del níspero japonés.....	22
2.2.3. Evaluación de la fertilización nitrogenada foliar como fuente de nitrógeno en el desarrollo de los nuevos órganos durante el ciclo vegetativo.....	23
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
3.1. MATERIAL VEGETAL.....	27
3.2. TÉCNICAS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	27
3.2.1. Riego.....	29
3.2.2. Período de estrés hídrico.....	31
3.2.3. Aclareo de frutos.....	32
3.2.4. Poda de mantenimiento.....	32
3.2.5. Recolección.....	32
3.2.6. Control de plagas y enfermedades.....	32
3.3. DOSIS DE ABONO.....	32
3.4. PERIODOS DE MARCADO ISOTÓPICO.....	33
3.5. MUESTREOS.....	35
3.5.1. Parcelas de referencia.....	35
Ensayo 1.1. – Establecimiento del tipo de hoja.....	36
Ensayo 1.2. – Establecimiento de la época de muestreo.....	36
Ensayo 1.3. – Definición de los estándares de referencia.....	36
3.5.2. Parcela experimental.....	36
3.6. ÓRGANOS CAÍDOS Y PODA.....	36

3.7. RECOLECCIÓN DEL FRUTO.....	38
3.8. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	38
3.8.1. Muestras de material vegetal procedentes de los diferentes muestreos mensuales.....	38
3.8.2. Muestras de material vegetal procedentes de órganos caídos, poda y aclareo	38
3.9. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	38
3.9.1. Determinación del N total y su composición isotópica en material vegetal	38
3.9.2. Determinación de macro y micronutrientes	39
3.9.3. Parámetros de calidad de los frutos.....	41
3.10. ESTABLECIMIENTO DE LA ÉPOCA DE MUESTREO.....	42
3.11. DETERMINACIÓN DE LOS VALORES ESTÁNDAR DE REFERENCIA PARA EL DIAGNÓSTICO NUTRICIONAL.....	42
3.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	43
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	
4.1. ESTABLECIMIENTO DEL PROTOCOLO DE DIAGNÓSTICO NUTRICIONAL EN NÍSPERO JAPONÉS: CONDICIONES DE MUESTREO FOLIAR Y NIVELES DE REFERENCIA DE LOS NUTRIENTES.....	
Ensayo 1.1. – Establecimiento del tipo de hoja	
Ensayo 1.2. – Establecimiento de la época de muestreo	
Ensayo 1.3 – Definición de los estándares de referencia	
4.2. DINÁMICA DEL NITRÓGENO APORTADO AL SUELO EN LA PLANTA. CONTRIBUCIÓN RELATIVA AL DESARROLLO DE LOS NUEVOS ÓRGANOS DURANTE EL CICLO VEGETATIVO DEL NÍSPERO JAPONÉS.....	
4.2.1. Evolución de la concentración de N	
4.2.2. Evolución del nitrógeno derivado del fertilizante en función del momento de aplicación	
4.2.3. Evolución del nitrógeno derivado del fertilizante como consecuencia del aporte acumulado	
4.3. EVALUACIÓN DE LA FERTILIZACIÓN NITROGENADA FOLIAR COMO FUENTE DE NITRÓGENO EN EL DESARROLLO DE LOS NUEVOS ÓRGANOS DURANTE EL CICLO VEGETATIVO	
4.3.1. Evolución de la concentración de N	
4.3.2. Evolución del nitrógeno derivado del fertilizante aportado por vía foliar en función del momento de aplicación.....	
4.4. EFECTO DEL APORTE FOLIAR SOBRE LA PRODUCCIÓN EN LA PARCELA EXPERIMENTAL	
4.5. EXTRACCIÓN DE N POR LA PODA Y ÓRGANOS CAÍDOS	
5. CONCLUSIONES.....	
6. BIBLIOGRAFÍA.....	45

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de la producción de níspero japonés en España en el año 2012 en las principales zonas productoras (MAAMA, 2012).	5
Figura 2. Evolución de la producción de níspero japonés (t) y precio medio pagado al agricultor (€/kg-1) en la Cooperativa Callosa d'En Sarrià (Fuente: Ruchey).....	6
Figura 3. Distribución porcentual del destino de las exportaciones de níspero japonés de la Cooperativa de Callosa d'En Sarrià durante la campaña 2012 (Fuente: Ruchey).	7
Figura 4. Evolución de la concentración de macronutrientes de las hojas de las brotaciones de primavera (HP) y verano (HVe) en las parcelas cultivadas en riego por inundación (I), goteo (G), sin y con malla de protección (M)..	
Figura 5. Evolución de la concentración de micronutrientes de las hojas de las brotaciones de primavera (HP) y verano (Hve) en las parcelas cultivadas en riego por inundación (I), goteo (G), sin y con malla de protección (M)..	
Figura 6. Evolución del nitrógeno derivado del fertilizante incorporado al suelo durante la etapa de desarrollo de la brotación de primavera (S1) en las hojas viejas (HV), hojas de la brotación de primavera (HP) y verano (HVe), esqueleto de la panícula (Esq), flor y fruto, en árboles adultos de níspero japonés.	
Figura 7. Evolución del nitrógeno derivado del fertilizante incorporado al suelo durante la etapa de desarrollo de la brotación de verano y floración (S2) en las hojas viejas (HV), hojas de la brotación de primavera (HP) y verano (HVe), esqueleto de la panícula (Esq), flor y fruto, en árboles adultos de níspero japonés.	
Figura 8. Evolución del nitrógeno derivado del fertilizante incorporado al suelo durante la etapa de cuajado y desarrollo del fruto (S3) en las hojas viejas (HV), hojas de la brotación de primavera (HP) y verano (HVe), esqueleto de la panícula (Esq), flor y fruto, en árboles adultos de níspero japonés.	
Figura 9. Evolución del nitrógeno derivado del fertilizante incorporado al suelo durante la etapa de maduración del fruto (S4) en las hojas viejas (HV), hojas de la brotación de primavera (HP) y verano (HVe), esqueleto de la panícula (Esq), flor y fruto, en árboles adultos de níspero japonés.	
Figura 10. Evolución del nitrógeno derivado del fertilizante aplicado por vía foliar a árboles adultos de níspero japonés al inicio del desarrollo de la brotación de primavera (F1) y de la brotación de verano (F2), en el cuajado (F3) y maduración del fruto (F4), en las hojas del ciclo anterior (hojas viejas).....	
Figura 11. Evolución del nitrógeno derivado del fertilizante aplicado por vía foliar a árboles adultos de níspero japonés al inicio del desarrollo de la brotación de primavera (F1) y de la brotación de verano (F2), en el cuajado (F3) y maduración del fruto (F4), en las hojas de la brotación de primavera.	
Figura 12. Evolución del nitrógeno derivado del fertilizante aplicado por vía foliar a árboles adultos de níspero japonés al inicio del desarrollo de la brotación de primavera (F1) y de la brotación de verano (F2), en el cuajado (F3) y maduración del fruto (F4), en el esqueleto de la panícula.	
Figura 13. Evolución del nitrógeno derivado del fertilizante aplicado por vía foliar a árboles adultos de níspero japonés al inicio del desarrollo de la brotación de primavera (F1) y de la brotación de verano (F2), en el cuajado (F3) y maduración del fruto (F4), en las hojas de la brotación de verano.....	
Figura 14. Evolución del nitrógeno derivado del fertilizante aplicado por vía foliar a árboles adultos de níspero japonés al inicio del desarrollo de la brotación de primavera (F1) y de la brotación de verano (F2), en el cuajado (F3) y maduración del fruto (F4), en las flores.....	
Figura 15. Evolución del nitrógeno derivado del fertilizante incorporado al suelo durante la etapa de maduración del fruto (S4) en las hojas viejas (HV), hojas de la brotación de primavera (HP) y verano (HVe), esqueleto de la panícula (Esq), flor y fruto, en árboles adultos de níspero japonés.	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis del suelo de las 40 parcelas de referencia en la campaña 2006-2007 ^z	28
Tabla 2. Análisis del suelo de las 40 parcelas de referencia en la campaña 2006-2007.....	28
Tabla 3. Características del suelo de la parcela experimental.....	29
Tabla 4. Condiciones de cultivo de las 40 parcelas de referencia.....	29
Tabla 5. Análisis del agua de riego empleada en ambos ensayos.	29
Tabla 6. Volúmenes (m ³ .ha ⁻¹) de agua empleados para el riego de las parcelas de referencia.	30
Tabla 7. Cálculo de la dosis de riego en la parcela experimental del estudio.	31

Tabla 8. Distribución de los nutrientes aplicados a lo largo del ciclo de cultivo de árboles adultos.....	33
Tabla 9. Distribución del aporte de ^{14}N y ^{15}N que recibieron los árboles en cada uno de los estados por el suelo y vía foliar.....	34
Tabla 10. Distribución de los fertilizantes aportados (g) en los árboles del objetivo 2.....	34
Tabla 11. Distribución de los períodos de marcado y órganos muestreados en los diferentes estados fenológicos en los ensayos vía suelo y foliar.....	37
Tabla 12. Peso seco (g) en el árbol completo y proporción del peso seco de las hojas de las principales brotaciones (%).....	
Tabla 13. Incrementos en la concentración (%) de macro y micronutrientes de las hojas de las parcelas de referencia.....	
Tabla 14. Diferencias entre los valores de calidad de fruto en las 40 parcelas de referencia.....	
Tabla 15. Concentración media (S) y coeficiente de variación (CV) de la concentración foliar de nutrientes para obtener los índices del balance de Kenworthy.....	
Tabla 16. Índices foliares de referencia para los nutrientes de las hojas de la brotación de verano de níspero japonés aplicando el método de índices de balance de Kenworthy.....	
Tabla 17. Evolución de la concentración de nitrógeno ($\text{g N}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ peso seco) en los distintos órganos a lo largo del ciclo en árboles de níspero japonés en los ensayos de aporte de N al suelo y vía foliar durante la etapa de desarrollo de la brotación de primavera (estado 1).....	
Tabla 18. Evolución de la concentración de nitrógeno ($\text{g N}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ peso seco) en los distintos órganos a lo largo del ciclo en árboles de níspero japonés en los ensayos de aporte de N al suelo y vía foliar durante la etapa de desarrollo de la brotación de verano (2).....	
Tabla 19. Evolución de la concentración de nitrógeno ($\text{g N}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ peso seco) en los distintos órganos a lo largo del ciclo en árboles de níspero japonés en los ensayos de aporte de N al suelo y vía foliar durante la etapa de cuajado y desarrollo del fruto (3).....	
Tabla 20. Evolución de la concentración de nitrógeno ($\text{g N}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ peso seco) en los distintos órganos a lo largo del ciclo en árboles de níspero japonés en los ensayos de aporte de N al suelo y vía foliar durante la etapa de maduración del fruto (4).....	
Tabla 21. Evolución del Nddf (%) en los distintos órganos a lo largo del ciclo en árboles de níspero japonés en los ensayos de aporte de N al suelo como consecuencia del aporte acumulado de fertilizante.....	
Tabla 22. Biomasa, concentración de N y ^{15}N extraído con la poda y el aclareo ^Z	
Tabla 23. Biomasa y nitrógeno extraído en los órganos caídos ^Z	

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1. Árbol adulto de níspero japonés (<i>Eriobotrya japonica</i> (Thunb.)).....	1
Fotografía 2. Frutos de níspero japonés. (a) Fruto maduro en el árbol y (b) sección longitudinal y transversal del fruto, mostrando las semillas.....	2
Fotografía 3. Estados de desarrollo del níspero japonés. (a) inicio de la brotación de primavera (121 en la escala BBCH); (b) inicio de la brotación de verano (501 en la escala BBCH); (c) crecimiento de la panícula floral (504 en la escala BBCH); (d) floración (605 en la escala BBCH); (e) desarrollo del fruto (701 en la escala BBCH); (f) frutos en el momento de la recolección (807 en la escala BBCH).....	4
Fotografía 4. Parcela experimental de la Cooperativa Agrícola de Callosa d'En Sarrià (Alicante).....	27
Fotografía 5. Detalle de la sonda Diviner 2000 utilizada para el cálculo de las necesidades de riego.....	30
Fotografía 6. Detalles de las redes colocadas en los árboles para recoger los pétalos, cáliz, ovarios en desarrollo y hojas caídas.....	37

[1]

INTRODUCCIÓN

3.1. EL NÍSPERO JAPONÉS

3.1.1. Clasificación botánica, origen y expansión.

La primera descripción botánica del níspero japonés la realizó el naturalista y físico alemán Engelbert Kaempfer en 1712, quién lo denominó *Amoenite Exotic*. Sin embargo, el primero en clasificar el níspero japonés fue el botánico sueco Carl Peter Thunberg en 1784, que lo denominó *Mespilus japonica* (Calabrese, 2006; Morton 1987). No fue hasta 1822, cuando John Lindley revisó el género *Mespilus* y clasificó al níspero japonés dentro de un nuevo género llamado *Eriobotrya*, del griego *erio* que significa 'lanoso' y *botrys* 'grupo', haciendo referencia al vello blanco que recubre las panículas (Lin *et al.*, 1999). El número de especies que engloba el género *Eriobotrya* ha sido revisado por varios autores, y sigue en discusión en la actualidad (Vidal 1965; Calabrese 2006; Huang *et al.*, 2007; Lin 2007). El níspero japonés (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.) pertenece a la familia Rosaceae, subfamilia Maloideae, compuesta por diploides funcionales ($2n = 2x = 34$) con un posible origen aloploiploide (Chevreau *et al.*, 1985).



Fotografía 1. Árbol adulto de níspero japonés (*Eriobotrya japonica* (Thunb.)).

El níspero japonés es un frutal subtropical vigoroso (Fotografía 1), de buen porte (5 - 6 m de altura) y raíz principal pivotante (2.5 m de profundidad). Sus hojas son perennes, coriáceas, elíptico-lanceoladas de 18 - 45 cm de longitud y bordes aserrados. Las inflorescencias son olorosas, blancas y pequeñas, se disponen en panículas de 10 a 19 cm de longitud y forma piramidal, pudiendo contener entre 30 y 260 flores cada una. La panícula consta de un eje principal en el que se insertan de 5 a 10 brazos consistentes (*esqueleto*), pero no leñosos, que contienen las flores agrupadas en racimos. El polen es amarillento tricolpado, llegando al 70% de germinación en óptimas condiciones de temperatura (20 °C). Comparte, junto al resto de especies de Rosáceas, el sistema de autocompatibilidad gametofítico (GSI) basado en *S-RNas* (Igic y Kohn, 2001). Es un árbol de rápida entrada en producción (2 - 3 años), los frutos se desarrollan durante el

invierno, adquiriendo un color de epidermis variable entre amarillo pálido y naranja oscuro. La pulpa es de color blanco o amarillo (Fotografía 2.a). Los frutos son pubescentes y albergan entre 1 y 5 semillas de gran tamaño, pudiendo contener hasta diez (Fotografía 2.b).



Fotografía 2. Frutos de níspero japonés. (a) Fruto maduro en el árbol y (b) sección longitudinal y transversal del fruto, mostrando las semillas.

Entre los posibles lugares de origen del níspero descritos por Vavilov en 1926, el centro del Sur de China sería el correspondiente al níspero japonés (Calabrese 2006). Concretamente, en la zona situada entre el curso medio y bajo del río Dadhue, en la provincia de Sichuan, se han encontrado pruebas de su cultivo de más de 2000 años de antigüedad (Zhang *et al.*, 1990a; Lin *et al.*, 1999). Yang *et al.* (2005) sugirieron que la provincia de Yunnan podía ser un centro de diversificación secundario. En Japón se halla documentado desde 1180 (Ichinose, 1995), lugar desde el cual se distribuyó a Europa como árbol ornamental en el s. XVIII. Algunos ejemplares se plantaron en los jardines botánicos de París (Francia) en 1784 y Kew (Inglaterra) en 1787 (Liu, 1982). Posteriormente, se extendió por países de toda la cuenca mediterránea como Argelia, Chipre, Egipto, Grecia, Italia, España, Túnez y Turquía (Demir, 1983; Morton, 1987), adaptándose muy bien a su clima. En España, fue introducido por los marinos mercantes en la zona de Sagunto, expandiéndose después a la región Este y Sudoeste de la Península Ibérica (Rodríguez 1983). A finales del s. XIX se introdujo en Florida desde Europa y en California desde Japón (Morton, 1987) y finalmente en el s. XX se extendió a la India, el sureste de Asia, Australia (Goubran y El-Zeftawi 1983), Nueva Zelanda (Burney, 1980), Madagascar y Sudáfrica. En la actualidad, se cultiva entre 20° y 35° de latitud Norte y Sur, aunque en los climas marítimos puede llegar hasta los 45° de latitud, donde comparte áreas medioambientales con los cítricos (Lin *et al.*, 1999; Soriano *et al.*, 2005).

3.1.2. Estados fenológicos.

El ciclo del níspero japonés comprende una etapa vegetativa, desde el otoño hasta el verano y una etapa reproductiva, que tiene lugar en otoño e invierno. A lo largo de todo el ciclo se produce la senescencia de hojas del ciclo anterior, sin que exista un periodo claro de caída. En zonas de clima templado, como es la zona mediterránea, el ciclo comprendería (Fotografía 3) las siguiente etapas de desarrollo (Agustí y Reig, 2006):

- BROTACIÓN DE PRIMAVERA: Constituye la principal brotación; si bien puede iniciarse antes de la recolección del fruto, su mayor desarrollo se realiza una vez la planta se ha liberado de éstos. Su crecimiento tiene lugar durante el final de la primavera y principios del verano, dando lugar a brotes largos y hojas grandes.
- PARADA VEGETATIVA: Durante los meses de julio y agosto se produce la parada vegetativa del árbol. Este periodo de latencia finaliza con el inicio la brotación de verano.
- BROTACIÓN DE VERANO: Se inicia en yemas laterales de los brotes originados el mismo año, desarrollándose rápidamente a lo largo del verano y con menor intensidad en otoño e invierno.
- DESARROLLO DE LA PANÍCULA: A mediados del verano, la brotación de primavera diferencia el eje principal de sus inflorescencias (panículas); un mes más tarde se diferenciarán en los brotes de verano.
- FLORACIÓN: La panícula florece durante el otoño en un periodo que comprende entre tres y cinco semanas, entre los meses de septiembre a diciembre.
- BROTACIÓN DE OTOÑO: En condiciones de cultivo, constituye la brotación de menor importancia.
- CUAJADO Y CRECIMIENTO LENTO DEL FRUTO: Durante las diez semanas siguientes al cuajado el fruto, durante el invierno, el fruto se desarrolla lentamente, con una baja tasa de crecimiento (fase I). Las siguientes cuatro semanas se produce una fase de división celular (fase II).
- CRECIMIENTO RÁPIDO DEL FRUTO: En primavera la tasa de crecimiento aumenta considerablemente, creciendo el fruto a gran velocidad hasta alcanzar su tamaño final (fase III).
- RECOLECCIÓN DEL FRUTO: El fruto se cosecha a mediados de primavera (abril- mayo) en un periodo que abarca un mes y medio aproximadamente. La recolección se realiza de forma escalonada en tres o cuatro pases.

Los estados fenológicos para el níspero japonés según la nomenclatura de la escala BBCH (Bleholder *et al.*, 1989) fueron adaptados por Martínez-Calvo *et al.*, (1999). Es un código numérico que consta de tres dígitos; el primero (macroestadio) corresponde al estadio principal mientras que el tercer dígito corresponde al estadio secundario (microestadio) en el transcurso de éste. Entre éstos el mesoestadio, que toma el valor 0 para la etapa reproductiva y 1, 2 o 3 para el crecimiento de otoño, primavera y verano, respectivamente.



Fotografía 3. Estados de desarrollo del níspero japonés. (a) inicio de la brotación de primavera (121 en la escala BBCH); (b) inicio de la brotación de verano (501 en la escala BBCH); (c) crecimiento de la panícula floral (504 en la escala BBCH); (d) floración (605 en la escala BBCH); (e) desarrollo del fruto (701 en la escala BBCH); (f) frutos en el momento de la recolección (807 en la escala BBCH).

3.1.3. Importancia económica

En España, el níspero se incluye dentro de las especies de frutales menores, por volumen de producción y consumo (Llácer, 1996; Bellini, 2002). Sin embargo, este cultivo recibe cada vez más atención debido a su época de recolección, ya que es el primer frutal que se recolecta en primavera (Cui *et al.*, 2007).

En cuanto a la superficie destinada al cultivo del níspero, la difusión de plantaciones regulares fue tardía, y todavía en el año 1950 la superficie media era inferior a 100 ha. Tras un incremento sostenido en los años sesenta, fue a partir de la década de los setenta, y sobre todo en los ochenta, cuando sufrió un importante incremento, sobretodo en la zona alicantina, manteniéndose en torno a las 3.000 ha en los últimos años.

Actualmente España produce unas 30.500 toneladas anuales (MAAMA, 2012), lo que la sitúa como el primer productor europeo y segundo mundial, detrás de China, superando, por orden decreciente de producción, a Turquía, Japón, Pakistán, Marruecos, Italia, Israel, Grecia, Brasil, Portugal y Chile. Alrededor del 55 % de la producción española se localiza en la provincia de Alicante y el resto se produce mayoritariamente en Andalucía, en las provincias de Granada y Málaga, (Figura 1; MAAMA, 2012). Aproximadamente la mitad de la producción nacional es exportada, ocupando España el liderazgo en el ámbito mundial y siendo los principales destinos, países de la UE (Caballero y Fernández, 2004).

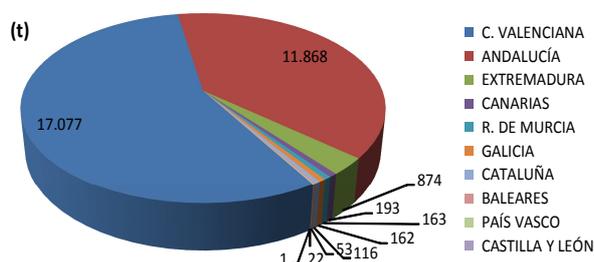


Figura 1. Distribución de la producción de níspero japonés en España en el año 2012 en las principales zonas productoras (MAAMA, 2012).

En la Comunidad Valenciana, es un cultivo muy bien adaptado a un nicho agroecológico concreto, el Valle de los ríos Algar-Guadalest en la provincia de Alicante (Rodríguez 1983), donde se ha desarrollado de forma intensiva, combinando métodos artesanales (cultivo en pequeños bancales y terrazas) y tecnificación (cubiertas de malla, riego localizado, fertilizantes y mano de obra especializada), dando lugar a uno de los cultivos más rentables de la fruticultura española (Fernández y Caballero 2002). En la zona alicantina destaca, sin lugar a dudas, la Cooperativa Agrícola de Callosa d'En Sarrià, conocida comercialmente como Ruchey, que agrupa el 85 % del total de la producción de la comarca. La evolución de su producción (Figura 2) presenta una tendencia claramente creciente desde los años setenta hasta el año 2000, momento en que la producción se redujo notablemente. Este descenso en la producción fue motivado por la disminución en la rentabilidad del cultivo, como consecuencia del aumento en los costes de la mano de obra, así como, de la entrada en producción de otras zonas más precoces como el sur de Andalucía, que con un producto mas barato y de peor calidad, compite con el níspero de Callosa.

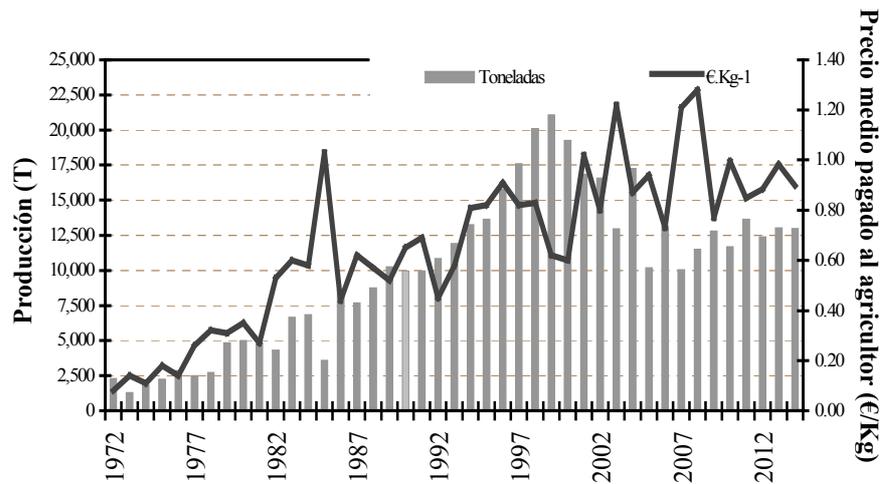


Figura 2. Evolución de la producción de níspero japonés (t) y precio medio pagado al agricultor (€/kg-1) en la Cooperativa Callosa d'En Sarrià (Fuente: Ruchey).

En la actualidad la producción se encuentra estabilizada en una horquilla de 13.000 a 15.000 toneladas (Figura 2). La coyuntura económica actual, en lo que respecta tanto del sector primario como al terciario, contribuye a este equilibrio. Cabe destacar que a pesar de la situación geográfica de la zona productora, tan próxima a Benidorm, ciudad turística por excelencia, no se produce una pérdida de superficie cultivada por abandono y trasvase de mano de obra al sector servicios, sino que se mantiene o, incluso, aumenta ligeramente, por el regreso de población joven al cultivo del níspero como única alternativa a la falta de trabajo en el sector terciario. Las pequeñas variaciones interanuales en la producción son debidas principalmente a la climatología. Destaca la helada del 2005, así como, el pedrisco del 2007, que redujeron considerablemente la producción anual. El precio percibido por el agricultor varía fundamentalmente en función de la precocidad de la campaña y de la calidad de la misma.

El consumo del níspero se encuentra muy arraigado en la zona mediterránea. Por ello, uno de los mercados fundamentales de la Cooperativa de Callosa d'En Sarrià es el italiano (Figura 3). Sin embargo, para el mundo anglosajón, siendo más desconocido, campañas publicitarias realizadas en Alemania, Inglaterra y Holanda, no han tenido la repercusión esperada. En estos países, emigrantes de Turquía, India, Pakistán, Argelia, Marruecos, etc. son sus consumidores principales.

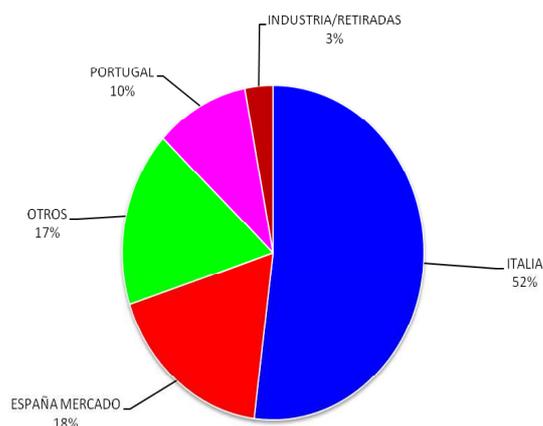


Figura 3. Distribución porcentual del destino de las exportaciones de níspero japonés de la Cooperativa de Callosa d'En Sarrià durante la campaña 2012 (Fuente: Ruchey).

La mayor parte de la producción mundial de níspero se comercializa para su consumo en fresco, aunque también en forma de almíbar, mermeladas y zumos. En China se considera una especie con alto valor medicinal, y todos los órganos son utilizados con este fin (Feng *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2007; Zheng 2007); aunque también son muy valorados algunos productos obtenidos del fruto, como vino o licor (Jiang *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007). En las zonas productoras españolas, la miel obtenida es otro de los productos apreciados (Llácer y Soler 2001; Caballero y Fernández 2004).

3.1.4. Un caso particular. El cultivo del níspero en Callosa d'En Sarrià.

La comarca de La Marina Baixa de Alicante, y en particular los municipios de Callosa d'En Sarrià, Bolulla, Polop de La Marina, Altea y La Nucia, concentra en la actualidad el 90 % de la producción valenciana. En esta comarca, y en especial el municipio de Callosa d'En Sarrià, los inviernos son muy suaves, con una orografía irregular conformada, principalmente, por las dos cuencas de los ríos Algar y Guadalest, por lo que se cuenta con suficiente agua con características químicas idóneas para el riego de este cultivo. El cultivo se desarrolla sobre suelos franco arcillosos con parcelas abancaladas en muros de mampostería, destacando el alto grado de minifundio (Rodríguez 1986).

Sobre este espacio físico, a mediados de los años cincuenta del siglo pasado, empezó a desarrollarse una agricultura frutal con el fin de abastecer los mercados comarcales y provinciales (Alcoy, Alicante, Valencia). Una gran parte de los agricultores de la zona pasaba la mayor parte del año trabajando como mano de obra especializada en la colonia francesa de Argel, que apenas estaba a cuatro horas en barco desde la costa alicantina. Allí ganaron dinero pero también conocimientos, que ayudaron a desarrollar con posterioridad el cultivo del níspero japonés. En este momento, el níspero era tan sólo un árbol para

autoconsumo que la mayoría de agricultores cultivaba. Sin embargo, al ser la primera fruta de primavera debido a la escasa variedad de frutas de invierno disponibles en aquel momento (naranjas tardías), el consumidor empezó a demandar el níspero. De los árboles francos existentes, que producían fruta de mejor calidad (“Nadal”, “Polop”, “Meneches”...), los agricultores empezaron a realizar plantaciones regulares y a *preparar y clasificar* los nísperos.

El sistema de venta de los productos agrícolas era “El Prado”. Este sistema consistía en la exposición de una pequeña cantidad o muestra de los productos que tenía el agricultor que era examinada y comprada por parte de los comerciantes. Una especie de subasta, donde unos pocos compradores tenían a su disposición a muchos vendedores. Mientras la oferta fue poca, las leyes económicas oferta-demanda regulaban los precios. Sin embargo, cuando la oferta empezó a aumentar, era el productor el que veía mermada la rentabilidad de su producción. Como consecuencia de esta situación, surgió en 1956 la Cooperativa Agrícola de Callosa d’En Sarrià, sin la cual no se puede entender la existencia de este cultivo, debido a su importante papel dinamizador en la colonización de nuevos mercados en aquel momento: Barcelona, Madrid, Bilbao, etc.

Un acontecimiento internacional sería responsable del verdadero impulso de la Cooperativa y el níspero: la independencia de Argelia. Regresaron muchos callosinos, y lo que fue determinante, se abrió el mercado de Francia para el níspero, que hasta la fecha provenía de la ex-colonia. En 1966 llegaron los primeros nísperos callosinos al mercado de Marsella y de ahí se extendió a los mercados italianos. Con la apertura del mercado de Saint Charles, en Perpignan, conocido como la *puerta de entrada a la Europa rica* de los años setenta, la comercialización del níspero experimentó un notable despegue. Sin embargo, los mayoristas franceses re-exportaban los nísperos a Italia, país donde el níspero era más apreciado, por lo que la Cooperativa se desplazó a Albenga, centro distribuidor de fruta en el norte de Italia.

Otro hecho fundamental para el desarrollo del cultivo fue la llegada de la variedad *Algerie*, importada de Argel por trabajadores callosinos. La correcta adaptación agroecológica de esta variedad en la zona, unida a las mejores cualidades organolépticas, mayor calibre y mejores condiciones de manipulación y conservación, supusieron el desplazamiento progresivo de las variedades tradicionales, “Nadal” y “Polop”. Asimismo, su aceptación por parte del mercado italiano fue decisivo. Por estas razones, la producción en la Cooperativa Ruchey alcanzó un máximo en el año 1999 con 21.000 t. Este éxito daría lugar a la proliferación de diversas empresas con la misma finalidad (Cooperativa de Altea, Cooperativa de Polop, Frutas Esther, Bernia Agrícola, etc.), así como al incremento de superficie cultivada en otras zonas de España, principalmente en Andalucía. La llegada anticipada al mercado de los nísperos andaluces, como consecuencia de las condiciones climáticas de la zona, supuso una importante amenaza para la Cooperativa Agrícola Ruchey. Por esta razón, a finales de los años ochenta y con el fin de comercializar un

producto diferenciado de otras zonas productoras y darle mayor valor añadido, en 1992 se crea el Consejo Regulador de la Denominación de Origen (D.O.) “Nísperos de Callosa d’En Sarrià”. Esta D.O. agrupa al 95 % de los productores, teniendo su ámbito geográfico de actuación en la comarca de La Marina Baixa. Una vez que la D.O. elaboró sus normas de calidad y éstas fueron aceptadas por los productores, las entidades comercializadoras tuvieron un producto homogéneo que ofrecer al mercado, distinto del de otras zonas productoras, sobre todo Andalucía.

La adscripción de los productores a la D.O., fue el primer paso para la comercialización del níspero en la comarca de manera conjunta por parte de las diversas empresas: cooperativas, sociedades anónimas, etc. En 1995 se constituyó una Agrupación de Intereses Económicos para vender la fruta y regular la oferta desde origen. Desde entonces, este organismo ha sido fundamental para el mantenimiento y desarrollo del cultivo. La Cooperativa ha desempeñado, por tanto, un papel fundamental en el desarrollo de este cultivo en la zona y, muy posiblemente, sin su existencia este cultivo no hubiera experimentado una evolución tan positiva. Asimismo, la Cooperativa Ruchey ha sido determinante en el desarrollo técnico del cultivo del níspero japonés, debido a la apuesta de ésta por una agricultura moderna, tecnificada y racional.

3.2. LA FERTILIZACIÓN NITROGENADA

El nitrógeno (N) es, después del agua, el factor limitante de mayor trascendencia en el crecimiento vegetal. Este elemento es un constituyente esencial de las plantas, en las que entra a formar parte de los compuestos orgánicos, proteínas, ácidos nucleicos, clorofilas etc. y está asociado con fenómenos fisiológicos, tales como el desarrollo y crecimiento de las plantas, la iniciación floral o el desarrollo de los frutos. Por tanto, la fertilización nitrogenada tiene generalmente un gran efecto en el crecimiento de los cultivos, el rendimiento y la calidad de la cosecha.

3.2.1. La fertilización nitrogenada en el cultivo del níspero japonés.

Los estudios centrados en la fertilización del níspero japonés son escasos (Crescimano y Barone, 1980; Jaime *et al.*, 1987; Tuset *et al.*, 1989; Ding *et al.*, 1995) y no proporcionan una información clara. A nivel práctico, una deficiencia de N en la fase de crecimiento del fruto produce una caída prematura de la hoja de junio, y la cosecha obtenida es de peor calidad. Por otro lado, la deficiencia de N en el periodo de prefloración produce panículas pequeñas o incluso falta de las mismas, permaneciendo las yemas sin brotar. Asimismo, se reduce tanto el cuajado como el número de semillas por fruto. Esta situación es común en los frutales, en los que la deficiencia de este nutriente disminuye la formación de flores y provoca la reducción del cuajado. En junio, tras la recolección, la brotación vegetativa se ve mermada, con menos brotes, siendo a su vez éstos de menor tamaño. Un exceso de N

también presenta consecuencias negativas para la calidad de la cosecha, para la propia planta. Así, la brotación vegetativa puede ser muy vigorosa y dar lugar a la brotación anticipada de yemas. A su vez, puede causar disminución de rendimientos, aumentar la susceptibilidad a algunas fisiopatías (mancha púrpura) y plagas, o agravar el daño producido por sequías y heladas, ya que el exceso de nitrógeno reduce el espesor de la pared celular (Wild, 1992).

3.2.2. Uso del isótopo estable del nitrógeno ^{15}N en estudios de fertilización nitrogenada

Los isótopos son átomos de un mismo elemento que difieren únicamente en el número de neutrones y por lo tanto en su masa atómica, manteniéndose idénticas sus propiedades químicas (Mateo *et al.*, 2004). Dentro de cada elemento, encontramos una familia de isótopos, algunos de ellos son radiactivos y tienden a degradarse emitiendo radiaciones de alta energía (isótopos inestables), mientras que otros son no radiactivos (isótopos estables). Los elementos más abundantes en la biosfera son C, H, O y N, siendo ^{13}C , ^2H (D), ^{18}O y ^{15}N sus respectivos isótopos estables de mayor interés en los estudios de ecofisiología.

En el caso del N, la concentración de ^{15}N en el aire es del 0,3663% (Junk y Svec, 1958; Mariotti, 1983) respecto al total de nitrógeno. Este valor es muy estable, con una variación de $\pm 0,0004\%$ (Axmann y Zapata, 1990), por lo que dicha concentración, denominada abundancia natural, se emplea como estándar de referencia para el cálculo de la composición isotópica de las sustancias. La composición isotópica ($\delta^{15}\text{N}$) es una medida de la abundancia de ^{15}N presente en una sustancia respecto a la referencia del aire y se calcula de acuerdo con la expresión:

$$\delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = \left(\frac{\frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}_{\text{sustancia}}} - 1}{\frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}_{\text{aire}}}} \right) \times 1000$$

donde $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ es la proporción en que el ^{15}N se encuentra respecto al isótopo mayoritario, ^{14}N , en la sustancia en cuestión y en el aire (0,3663 ‰). De este modo el valor de $\delta^{15}\text{N}_{\text{aire}}$ es del 0 ‰ y en el resto de sustancias en la naturaleza presenta valores que oscilan entre -10 y +10 ‰ (0,3630 - 0,3670 ‰). Factores de tipo cinético y termodinámico son los responsables de estas pequeñas variaciones, debido a que los isótopos pesados requieren una mayor energía de activación para disociarse y además reaccionan más lentamente. Este fenómeno se conoce con el término de fraccionamiento o discriminación isotópica.

La existencia del ^{15}N fue demostrada en 1929, sin embargo, su aplicación ha sido más intensa en las tres últimas décadas mediante la implantación de metodologías que utilizan la espectrometría de masas de flujo de isótopos (Middelboe y Johansen, 1990). La

composición isotópica del nitrógeno ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) se viene empleando para recoger información de tipo estructural o funcional tanto en los ecosistemas naturales como agrarios. Para ello se recurre a dos técnicas principalmente, la de la abundancia natural y la de enriquecimiento en ^{15}N . Los estudios basados en la técnica de la abundancia natural analizan la variabilidad natural en la composición isotópica de las sustancias nitrogenadas, en los distintos compartimentos de un ecosistema, tomando como unidad de medida las variaciones del $\delta^{15}\text{N}$. Así el nitrógeno del suelo está normalmente enriquecido en ^{15}N respecto al de la atmósfera (Shearer *et al.*, 1978), encontrándose gran variabilidad entre los diferentes horizontes (Tiessen *et al.*, 1984), de modo que los horizontes minerales están siempre enriquecidos respecto a los horizontes orgánicos superficiales. Por otro lado, fenómenos como la desnitrificación, provocan un enriquecimiento en ^{15}N debido a la liberación preferente del $^{14}\text{NO}_2$ o del $^{14}\text{N}_2$. Asimismo, en suelos con una elevada concentración de amonio (campos fertilizados, con pH neutro o en situaciones de alcalinidad), también se observa un enriquecimiento en ^{15}N debido a la volatilización preferencial del $^{14}\text{NH}_3$ (Shearer y Kohl, 1989). En las plantas, también se produce fraccionamiento isotópico asociado a los procesos de asimilación de NO_3^- o NH_4^+ , la translocación hacia las hojas o el propio metabolismo del nitrógeno en el citoplasma. Este fraccionamiento disminuye con la edad de la planta y con intensidades de luz crecientes, mientras que aumenta ante concentraciones crecientes de NO_3^- . Por lo que en general, en plantas adultas con crecimiento activo en un suelo con fertilidad normal y bajo irradiaciones moderadas, la discriminación del ^{15}N durante la incorporación de NO_3^- es muy pequeña. En cuanto a la variabilidad entre órganos, ésta es mayor en especies leñosas de vida larga, así el tallo y las raíces suelen estar empobrecidas en ^{15}N respecto a las hojas (Shearer y Kohl, 1989).

La técnica de enriquecimiento en ^{15}N o dilución isotópica es una técnica de determinación elemental descrita hace ya más de 50 años. Se basa en la alteración intencionada de la abundancia isotópica del N en el sistema mediante la adición de una cantidad conocida de un compuesto nitrogenado con una abundancia isotópica alterada (enriquecido o empobrecido en ^{15}N), que se comporta de este modo como trazador. El estudio de la variación en la abundancia isotópica de los distintos compartimentos del sistema permite identificar el recorrido y las transformaciones del compuesto adicionado.

En la técnica de dilución isotópica es necesario tener en cuenta dos hipótesis de partida. En primer lugar, se asume que en las transformaciones biológicas del N en el sistema planta-suelo no se produce discriminación isotópica, es decir que tanto ^{14}N como ^{15}N participarán en los procesos (inmovilización, nitrificación, absorción por la planta, entre otros), manteniéndose en la misma proporción en que se encuentran de partida (Barraclough, 1995). Las experiencias llevadas a cabo hasta la fecha confirman la seguridad de esta hipótesis, siempre y cuando se trabaje con enriquecimientos que disten de la abundancia natural, lo cual para los enriquecimientos habitualmente utilizados en los estudios con trazadores (1-10 % átomos en exceso o enriquecido) se cumple plenamente.

En segundo lugar, y en especial en el caso de incorporación del trazador al suelo, debe asegurarse una incorporación lo más homogénea posible de éste con el suelo, con el fin de que no exista absorción preferencial del N originario del suelo o del incorporado con el fertilizante.

En el caso de muestras enriquecidas con el trazador isotópico, la unidad de medida que habitualmente se emplea es el porcentaje de abundancia relativa del isótopo trazador ^{15}N sobre el total del nitrógeno de la muestra, siendo suficiente una precisión analítica en torno al 0,005 %, dependiendo del enriquecimiento. Los términos exceso de nitrógeno o enriquecimiento hacen referencia al porcentaje de ^{15}N existente en la muestra sobre el porcentaje de ^{15}N atmosférico (0,3663 %).

Esta técnica se aplica en el estudio de los flujos del N siendo posible estimar las tasas de reciclado entre las fracciones minerales, microbianas, orgánicas, gaseosas y vegetales (Davidson *et al.*, 1990; Schimel, 1996). Concretamente, la técnica de enriquecimiento en ^{15}N se ha empleado para estimar la tasa de fijación biológica de N_2 , así como para cuantificar la contribución del N fijado por bacterias fijadoras (*Azospirillum*) al total del N absorbido por plantas inoculadas (El-Komyet *al.*, 2003; Meunchanget *al.*, 2006). Sin embargo, una de las aplicaciones más estudiadas es el uso de fertilizantes enriquecidos en ^{15}N para evaluar la eficiencia en el uso de diferentes fertilizantes nitrogenados durante los distintos estados del desarrollo de plantas cultivadas (Bremner, 1965).

El conocimiento actual de la eficiencia de uso y dinámica de nutrientes no habría sido posible sin el uso de las técnicas isotópicas (Boutton, 1991a,b; Voroneyet *al.*, 1991; Powlson y Barraclough, 1993; Stevenson y Cole, 1999). Éstas no sólo permiten determinar la absorción de un nutriente por el cultivo, sino también su destino. Sin embargo, el método de dilución de ^{15}N presenta algunas desventajas, como son el alto costo tanto del fertilizante enriquecido como de los equipos analíticos y su mantenimiento, la reducción con el tiempo del enriquecimiento en el suelo y la dificultad de lograr una distribución uniforme del mismo (Witty y Ritz, 1984).

1.2.2.1. Contribución relativa del nitrógeno aplicado al suelo al desarrollo de los nuevos órganos.

La medición de la capacidad de almacenamiento de N de un árbol es dificultosa y gran parte del conocimiento adquirido deriva del uso del isótopo estable ^{15}N (Millard, 1996). El Nitrógeno derivado del fertilizante (Nddf) cuantifica en qué proporción las necesidades en N del órgano en cuestión son satisfechas por el N procedente del fertilizante aplicado. La identificación inequívoca de la procedencia del N se realiza mediante el marcado isotópico del fertilizante aplicado. Por tanto, un menor valor de Nddf conllevaría a un incremento en la proporción de N procedente de otras fuentes: las reservas de la propia planta, el suelo y/o el agua de riego. Por ello, algunos autores, basándose en este parámetro, deducen la importancia del papel desempeñado por el N procedente directamente del fertilizante o de

las reservas del árbol, en los estadios tempranos de desarrollo de las nuevas brotaciones y de los órganos reproductivos en cítricos (Legaz y Primo-Millo, 1988a; Weinert *et al.*, 2002; Quiñones *et al.*, 2005).

En frutales de pepita, Neto *et al.*, (2006) observaron que el Nddf en hojas de peral 'Rocha' aumentó de mayo (0.9 %) a agosto (12.1 %), momento en el que cesó el desarrollo de los brotes, permaneciendo constante posteriormente. Posiblemente la absorción del N procedente de los fertilizantes aplicados incrementa al aumentar la temperatura ambiental, como consecuencia del desarrollo de nuevas raíces (Neto *et al.*, 2008). En manzanos 'Golden Delicious' injertados sobre M9, la absorción radicular es muy baja hasta 11 semanas después de la siembra y durante ese periodo, el N procede del movilizado de los tejidos leñosos (Nielsen *et al.*, 2001a). A partir de ese momento, el Nddf aumenta considerablemente debido al desarrollo de los brotes y raíces fibrosas. En el cultivo del níspero no se han encontrado estudios que utilicen la técnica de dilución isotópica con el objetivo de conocer el Nddf en los distintos órganos en desarrollo durante un ciclo vegetativo completo.

Estos resultados muestran que el uso del Nddf expresa, de forma exhaustiva, los momentos en los que el crecimiento vegetativo depende principalmente del N removilizado de los órganos de reserva, o por el contrario, depende directamente del N absorbido del fertilizante (Grassi *et al.*, 2003; Guak *et al.*, 2003). Disponer de esta información permite identificar los momentos de baja absorción radicular, en los que se puede reducir por tanto el aporte de fertilizantes al suelo, o que en cambio conviene reforzar el aporte para que el desarrollo de los nuevos órganos no se vea comprometido.

1.2.2.2 Dinámica del nitrógeno aplicado vía foliar en frutales de pepita.

La nutrición de las plantas a través de los órganos aéreos es considerada una técnica para suministrar nutrientes rápidamente. Esta técnica puede ser útil cuando el suelo presenta condiciones limitantes para la disponibilidad y absorción de nutrientes, baja temperatura, humedad o aireación (Tagliavini y Toselli, 2004). Las características anatómicas de la hoja favorecen la incorporación inmediata de nutrientes minerales a los fotosintatos, y el transporte de éstos a los lugares de la planta con mayor demanda (Trinidad-Santos & Aguilar-Manjarez, 1999; Curetti, 2009).

Para que el nutriente sea absorbido foliarmente debe atravesar la cutícula de la hoja. La composición en ceras de la cutícula varía según la especie (Curetti, 2009) y se correlaciona con la capacidad de absorber nutrientes. Entre los frutales de hoja caduca, los manzanos son los que mejor responden a la fertilización foliar. En cambio, las hojas de peral presentan mayor contenido de ceras, por lo que absorción foliar de nutrientes es más limitada (Sánchez, 1999).

La urea es el fertilizante más utilizado en la producción agrícola mundial debido a su bajo coste, facilidad de manipulación, estabilidad química y elevado contenido nitrogenado

(46%) (Sirko & Brodzik, 2000; Wang *et al.*, 2008). La urea es muy soluble y puede ser aplicada por vía foliar, minimizando las pérdidas de N al medioambiente (Witte *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2008). Además, en la mayoría de los cultivos, la absorción foliar de urea es mayor y más rápida que la de otras formas inorgánicas de N (Witte *et al.*, 2002; Wójcik, 2004; Wang *et al.*, 2008). Este fenómeno está relacionado con el hecho que la cutícula es entre 10 y 20 veces más permeable a la urea que a los iones inorgánicos (Wójcik, 2004). Incluso la urea incrementa la permeabilidad de la cutícula facilitando la penetración de otros nutrientes (Sánchez, 1999).

La concentración de urea en la solución a pulverizar depende del tipo de cultivo; en hortalizas se aplican concentraciones de 0.5- 3.0 % y en cereales 0.5-10.0 % (Trinidad-Santos y Aguilar-Manjarez, 1999). En el caso de los frutales se recomiendan concentraciones de urea para su aplicación foliar de 0.6-1.0 % (Trinidad-Santos y Aguilar-Manjarez, 1999), aunque algunos autores proponen rangos más amplios de concentraciones 0,2 - 4 % (Tagliavini y Toselli, 2004). Con el fin de mejorar la absorción de urea en las hojas, el pH de la solución debe ser ligeramente ácido, entre 5.4 y 6.6 (Tagliavini y Toselli, 2004; Wójcik, 2004).

En frutales, la fertilización nitrogenada foliar aplicada tras la recolección es efectiva para incrementar las reservas en los tejidos perennes (Quartieri *et al.*, 2002). Estas aplicaciones permiten aumentar el N almacenado en la parte aérea de la planta (Sánchez *et al.*, 1991; Tagliavini *et al.*, 1999; Tagliavini y Millard, 2005) y removilizarlo más rápidamente en la floración (Sánchez, 1999). En floración, cuando se aplican altas concentraciones de urea, las concentraciones minerales en hojas y frutos pueden incrementarse, tanto en melocotonero y nectarinas, como en pistachos y manzanos (Zilkah *et al.*, 1988; Handschack y Alexander, 2002; Rahemi y Ramezani, 2007).

Por otro lado, el uso de fertilizantes marcados con ^{15}N nos proporciona información del destino del fertilizante aplicado. En aguacate, Zilkah *et al.* (1987) estudiaron la translocación de ^{15}N -urea en diferentes órganos vegetativos y reproductivos (*Persea americana* Mill). La aplicación de urea al 2% incrementó el peso seco de las inflorescencias laterales y su concentración en ^{15}N . Alrededor del 21 % del N de las inflorescencias terminales provenía de la urea aplicada. Similares cantidades de ^{15}N fueron translocadas a los frutos en desarrollo y a las nuevas hojas. Un mes después la aplicación foliar de ^{15}N -urea al 2 % tras el período de floración en manzanos cv Fuji, las hojas presentaban un 10 % de Nddf (Fallahi *et al.*, 2002). Handschack y Alexander (2002) observaron que manzanos pulverizados con urea al 6 % al inicio de la floración presentaban un mayor contenido de nitrógeno en hojas. Dong *et al.* (2002) observaron un contenido total de N en árboles de manzano Fuji sobre M26, de un año de edad, mayor cuando recibieron urea al 3 % enriquecida con 10 % átomos ^{15}N en exceso, con porcentajes de Nddf de alrededor de 14.5 %.

Todos estos resultados corroboran que los aportes de N foliar pueden ser esenciales en una fertilización racional de N para momentos de absorción radicular limitada en frutales de pepita.

3.2.3. Repercusión medioambiental de la fertilización nitrogenada

Un aspecto derivado de la fertilización nitrogenada es la contaminación de los acuíferos por el ion nitrato procedente de estos fertilizantes, como consecuencia de un uso abusivo o incorrecto de éstos. Los nitratos se hallan presentes de forma natural en la gran mayoría de las aguas, siendo por lo general su concentración variable y del orden de $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (OMS, 1995). Los nitratos forman parte del ciclo del nitrógeno, se originan principalmente por la oxidación del nitrógeno orgánico por bacterias aerobias presentes en el suelo y en el agua. También pueden originarse por la fijación del nitrógeno atmosférico por ciertos grupos de bacterias, así como a través de la formación de óxidos de nitrógeno a partir del nitrógeno atmosférico que al reaccionar con la humedad ambiente forman ácidos, como el nítrico, que precipitan y originan la denominada lluvia ácida (Manahan, 1994). Sin embargo, cuantitativamente los principales aportes de nitrato a las aguas subterráneas son de origen antropogénico. Los vertidos urbanos, industriales y procedentes de granjas de estabulación intensiva constituyen las principales fuentes puntuales de contaminación por nitratos de los acuíferos. Las fuentes puntuales de contaminación son relativamente fáciles de identificar y se caracterizan porque su impacto directo se localiza en áreas restringidas. No obstante, es la contaminación procedente de fuentes difusas la que provoca sin duda un mayor impacto, caracterizándose por la existencia de gran cantidad de puntos de entrada del contaminante al suelo, que ocupan en su conjunto grandes extensiones de terreno (Perfil Ambiental 2013.MAGRAMA). La principal vía de contaminación difusa de los acuíferos es consecuencia de la incorporación al suelo de fertilizantes y residuos orgánicos ganaderos, sobre todo en zonas de cultivo intensivo. Aproximadamente unas dos terceras partes del nitrato en las aguas subterráneas tienen una procedencia agrícola, lo que ha llevado a la identificación de la contaminación difusa con la producida por la agricultura (Genovés, 1993; de Paz y Ramos, 2002). De las distintas formas de nitrógeno presentes en el suelo, solamente los nitratos son lavados y arrastrados en cantidades importantes, ya que son muy solubles y se mantienen en la solución del suelo al no ser fijados por el complejo de cambio (Singh y Kanehiro, 1969). En cambio, los iones amonio son fijados como cationes de cambio sobre el complejo arcillo-húmico, y únicamente son desplazados por el aporte de soluciones salinas; por otro lado, la mayor parte de los compuestos orgánicos nitrogenados tienen una solubilidad muy baja. Sin embargo, aunque los abonos minerales más utilizados son aquellos que tienen un alto contenido de N en forma de amonio (sulfato amónico y nitrato amónico), estos iones sufren una oxidación gradual (nitrificación) por acción de las bacterias aerobias autótrofas del suelo (*Nitrosomonas* y *Nitrobacter*), convirtiéndose en nitrato en un período de entre 15 y 30 días. Es por ello, que aportes excesivos de agua de riego o episodios de intensas lluvias, provocan que los nutrientes de la solución del suelo

desciendan a lo largo del perfil, pudiendo ser desplazados fuera del alcance de las raíces hasta encontrar un acuífero o desplazarse lateralmente hacia cauces superficiales a través de los sistemas de drenaje o de las galerías y fisuras naturales del suelo. Ejemplo de ello son las precipitaciones que se producen durante el otoño e invierno en el Mediterráneo occidental, coincidiendo con el período de letargo en frutales, que se caracteriza por una baja absorción radicular. La cantidad de nitratos percolados dependerá pues de la concentración de éstos en la solución del suelo siendo ésta a su vez dependiente de las cantidades aportadas con la fertilización y de la capacidad de los sistemas radiculares de absorberlos antes de que avancen a horizontes más profundos fuera de su alcance. Son numerosos los datos existentes en la bibliografía sobre las cantidades lixiviadas. Bingham *et al.* (1971) estimaron unas pérdidas de N por lixiviación de $67 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{año}^{-1}$ en el cultivo de los cítricos en California, lo que representaba un 45% del total de N aplicado. Avinimelech y Raveh (1976) estimaron un promedio de 50 a $127 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{año}^{-1}$. Dasberg *et al.* (1984) estimaron pérdidas de más de $50 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{año}^{-1}$ cuando se aplican dosis de entre $100\text{-}180 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{año}^{-1}$, lo que representa entre un 27-50% del N aplicado. Ramos *et al.* (2002), en estudios más recientes establecieron unos valores promedio de lixiviación de nitrato de entre $150\text{-}300 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$ para los principales cultivos de la Comunidad Valenciana, siendo los cultivos de alcachofa, patata temprana y cebolla los que presentan, de acuerdo con estudios basados en simulaciones, mayores valores de lixiviación de nitrógeno.

De este modo, el nitrato excedentario lixiviado en las tierras agrícolas, origina la contaminación de los acuíferos subterráneos y aumenta los nutrientes presentes en las aguas continentales e incluso marinas (eutrofización), provocando la proliferación de algas y microorganismos, rompiendo el equilibrio ecológico (Greenwood, 1990). Este incremento en el contenido en nitrato de las aguas subterráneas supone serias repercusiones tanto desde un punto de vista sanitario como económico. Concretamente, el exceso de nitrato en el agua es un peligro para su potabilidad, ya que la ingesta de agua con altos valores de nitrato puede ocasionar problemas de salud, siendo el principal efecto la producción de metahemoglobinemia. Es por ello que con el fin de prevenir esta afección la OMS confirmó en 2004, como valor máximo orientativo $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de nitrato en el agua de consumo; mientras que por lo que respecta a los efectos crónicos, se estableció la ingesta diaria admisible de nitratos en $0\text{-}3,65 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de peso corporal y día (WHO, 2004). Por otro lado, el hecho de que el agua subterránea constituya en muchos casos la fuente principal de agua potable de la población, unido a la dificultad y elevado coste de potabilización de las aguas afectadas, incrementan considerablemente la magnitud de este problema. En España, en el año 2011, el agua captada para producción de agua de consumo humano fue en un 69% agua superficial, 30% agua subterránea y un 1 % agua marítima (Ministerio Sanidad, e Igualdad, 2011). Este porcentaje es aún mayor en la Comunidad Valenciana, donde el 88% de los municipios, lo que equivale a un 54% de la población, se abastece de aguas subterráneas (ITGE, 1996).

Una cuidadosa selección de la dosis y tipo de abono nitrogenado, una correcta distribución temporal de la dosis, evitando los meses de máxima precipitación y un manejo del riego preciso son factores de gran importancia para incrementar la eficiencia de absorción del N y, por tanto, para reducir las pérdidas de nitrato por lixiviación (Syvertsen y Smith, 1996; Alva y Paramasivam, 1998; Alva *et al.*, 2003b).

3.3. DIAGNÓSTICO NUTRICIONAL DE LOS CULTIVOS

Con el fin de garantizar una alta productividad de los cultivos, manteniendo una disponibilidad aceptable de nutrientes en el suelo, de forma respetuosa con el medio ambiente, biofertilizantes y fertilizantes químicos deben aplicarse en dosis lo más ajustadas posibles maximizando su eficiencia. Para ello, disponer de herramientas fiables que permitan el diagnóstico nutricional del cultivo constituye una pieza clave en el manejo racional de la fertilización.

Durante años, se ha utilizado el análisis foliar de nutrientes como indicador del estado nutricional del árbol (Shear y Faust, 1980; Benton-Jones, 1985) siendo útil para determinar los requerimientos en fertilizantes (Kenworthy, 1973; Benton Jones, 1985). El uso del análisis foliar para el diagnóstico nutricional se basa en la premisa de que existe una relación biológica significativa entre el contenido mineral de la hoja, el crecimiento de las plantas y el rendimiento en fruta. Estas relaciones normalmente siguen una curva sigmoideal de respuesta, en la que se pueden identificar dos valores críticos. Estos valores, diferentes para cada nutriente, son el valor por encima o por debajo del cual el rendimiento de la planta se reduce (Terblanche y Du Plessis, 1992). Estos índices están siendo utilizados con éxito en cultivos, como el mango (Salazar-García *et al.*, 1993), la macadamia (Stephenson y Cull, 1986), el aguacate (Salazar-García y Lazcano-Ferrat, 1999) o los cítricos (Maldonado-Torres *et al.*, 2001).

Otro aspecto importante a tener en cuenta, es la estandarización del proceso de muestreo (tipo de hoja y época de muestreo), con el fin de que las tablas de referencia sean representativas del estado nutricional de las plantas en un momento establecido, ya que la concentración de nutrientes no permanece estable en la hoja durante todo el ciclo de cultivo (Quiñones *et al.*, 2002).

Por otro lado, existe en la actualidad una amplia variedad de herramientas de interpretación del análisis de la hoja. Entre otros, concentración crítica de nutrientes (Terblanche y Du Plessis 1992; Srivastava *et al.*, 1999), rango de concentración de nutrientes (Padres y Dafir 1992), balance de nutrientes mediante el método factorial (Cantarella *et al.*, 1992), índices de balance de Kenworthy (Kenworthy 1973), concepto de equilibrio de Moller-Nielson (Moller Nielsen y Friis-Nielson 1976b), carga del cultivo (Abaev 1977), línea o frontera límite (Walworth *et al.*, 1986) y sistema integrado de diagnosis y recomendación (Walworth y Sumner 1987; Beverly 1987).

Sin embargo, para desarrollar sistemas de diagnóstico e interpretación foliar es necesario disponer de valores de referencia (Lucena, 1997; Rodríguez y Rodríguez, 2000; Cadahía, 2005) que permitan determinar las necesidades exactas de nutrientes por parte de la planta, garantizando así los principios de la sostenibilidad y respeto al medio ambiente.

Dado que el árbol de níspero es de hábito foliar perenne, puede ser comparado con otros cultivos similares en los que el análisis foliar está siendo utilizado como una herramienta para determinar los requisitos de fertilización. Sin embargo, hay pocos estudios que analicen la concentración foliar de macro y micronutrientes en este cultivo (Crescimano y Barone, 1980; Jaime *et al.*, 1987; Tuset *et al.*, 1987; Ding *et al.*, 1995) y los estudios existentes no proporcionan una información clara sobre aspectos tan importantes como el tipo de hojas a muestrear o la metodología utilizada, y sobre todo, no existen tablas de referencia con los estándares de concentración de nutrientes establecido en el níspero japonés.

3.4. ESTUDIOS I+D+i. LA TECNIFICACION DEL CULTIVO DEL NISPERO.

Durante las últimas décadas, diversos factores han influido en la necesidad de realizar estudios en este cultivo:

- Cultivo prácticamente monovarietal. La variedad *Algerie* y sus mutaciones se cultiva en más del 90 % de las parcelas de la provincia de Alicante, con el riesgo comercial y sanitario que supone depender de una sola variedad.
- Costes de cultivo muy elevados, con más de un 66 % de éstos correspondientes a la mano de obra necesaria para el aclareo de frutos y la recolección.
- Desconocimiento de las diferentes prácticas agrarias de manejo del cultivo. Necesidades nutricionales del níspero en las condiciones y variedades existentes. Necesidades hídricas del cultivo, en riego localizado, tras su expansión. Obtención del coeficiente del cultivo (Kc). Eficiencia de absorción de los diferentes nutrientes con este nuevo sistema de riego. Evaluación del efecto del cultivo bajo malla, donde las condiciones agronómicas son distintas debido a las diferentes condiciones climáticas de desarrollo.
- Problemas de productividad por falta de cuajado tras la expansión del cultivo bajo malla.
- Necesidad de optimización de los tratamientos fitosanitarios para controlar el moteado producido por el hongo *Flusicladium eriobotryae*, específico del níspero japonés. Hasta esos momentos se estaban utilizando modelos de enfermedades de otras especies vegetales, por ejemplo, *Venturia pirina*, propia del peral.
- Agravamiento de la fisiopatía denominada Mancha Púrpura como consecuencia del forzado del cultivo.

- Necesidad de figuras de Certificación en el Cultivo: Global Gap, Producción Integrada.
- Conocimiento de la conservación postcosecha del níspero con el objetivo de regular la oferta.

Mediante el desarrollo de diferentes trabajos de investigación, se pretendía mejorar el conocimiento de todos los aspectos antes señalados, en las áreas de mayor impacto en la producción del níspero, mejora de la calidad del fruto, estudios sobre la mancha púrpura, plan de mejora varietal del níspero japonés, floración y cuajado del fruto, conservación y postcosecha del fruto, técnicas de riego y fertilización. De los resultados se han implementado pautas importantes en el cultivo del níspero, entre ellas, se han establecido normas de aclareo químico y auxinas de síntesis para mejorar la calidad del fruto (Agustí *et al.*, 2000); se comprobó que aplicaciones foliares con productos salinos así como técnicas menos agresivas en el aclareo de frutos disminuían significativamente la incidencia de la mancha púrpura, (Gariglio *et al.*, 2002); se está realizando un plan de mejora varietal del níspero japonés (Martínez-Calvo *et al.*, 1999; Martínez-Calvo *et al.*, 2007; Badenes *et al.*, 2013; González-Domínguez *et al.*, 2013); se establecieron las condiciones óptimas postcosecha para el manejo óptimo la fruta una vez recolectada; se evaluó la sensibilidad frente a hongos de suelo como a *Phytophthora*, *Rosellinia* y *Armillaria*; se estudió la biología del moteado del níspero (*Flusicladium eriobotriae*) optimizándose los tratamientos necesarios (González-Domínguez *et al.*, 2009; Guillem *et al.*, 2013); se comprobó que la colocación de polinizadores mejora el problema de falta de cuajado en el cultivo bajo malla (Carrera *et al.*, 2001); se determinó el Kc del cultivo del níspero, variable esencial para la realización de un sistema de riego racional, a la vez que se evaluaron prácticas de riego deficitario sobre la producción y calidad del níspero (Ballester *et al.*, 2014); se mejoraron las técnicas de conservación de la variedad Xirlero y se iniciaron los estudios sobre fertilización, fijándose las dosis anuales de macro y micronutrientes.

[2]

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

3.1. OBJETIVOS

La actual agricultura, con márgenes económicos cada vez más reducidos y sujeta a restricciones medioambientales, exige una mayor racionalización de las técnicas de cultivo empleadas. Estos factores cobran especial interés en el cultivo del níspero japonés, ya que se carece, entre otros, de criterios racionales de fertilización que permitan la realización de aportes ajustados de nutrientes para una óptima producción y calidad del fruto de forma económica y medioambientalmente sostenible.

El objetivo del presente trabajo es establecer, en primer lugar, un protocolo de diagnóstico nutricional en el cultivo del níspero japonés. Esta herramienta es básica para una correcta fertilización, ya que constituye el primer paso para el establecimiento de un plan de abonado. Concretamente, se determinarán las pautas de muestreo foliar, es decir, el tipo de hoja y momento de muestreo que mejor se correlacionen con el estado nutricional del árbol. Una vez determinados éstos, se establecerán los niveles de referencia de concentración de macro y micronutrientes, que permitirán diagnosticar el estado nutritivo de la plantación mediante el análisis foliar, y por tanto determinar la conveniencia y cuantía del fertilizante a aportar. Asimismo, con el fin de mejorar la eficiencia de uso de los fertilizantes nitrogenados, se evaluará la contribución relativa del nitrógeno aportado, por vía suelo y foliar, al desarrollo estacional de nuevos órganos. El conocimiento de la dinámica de los nutrientes en la planta permitirá profundizar en los actuales criterios del abonado del níspero japonés, ajustándose así el aporte de los fertilizantes a las necesidades del cultivo. Por tanto los objetivos que se abordarán son los siguientes:

Objetivo 1 Establecimiento del protocolo de diagnóstico nutricional en níspero japonés: condiciones de muestreo foliar y niveles de referencia de los nutrientes.

Objetivo 2 Dinámica del nitrógeno aportado al suelo en la planta. Contribución relativa al desarrollo de los nuevos órganos durante el ciclo vegetativo del níspero japonés.

Objetivo 3 Evaluación de la fertilización nitrogenada foliar como fuente de nitrógeno en el desarrollo de los nuevos órganos durante el ciclo vegetativo.

La información recabada permitirá concretar los dos pilares básicos de un plan de abonado, nutrientes a aportar, si procede, así como el momento y forma de aplicación; datos que en la actualidad se desconocen con precisión en el níspero japonés.

3.2. PLAN DE TRABAJO

3.2.1. Establecimiento del protocolo de diagnóstico nutricional en níspero japonés: condiciones de muestreo foliar y niveles de referencia de los nutrientes

Se eligieron 40 parcelas de referencia distribuidas por el área adscrita a la D.O. Nísperos de Callosa d'En Sarrià, con diferentes prácticas de cultivo (riego por inundación/goteo, bajo malla de protección/aire libre). El estudio se llevó a cabo en árboles del cv. *Algerie* injertados sobre patrón franco. Durante dos campañas sucesivas se muestrearon mensualmente hojas de las dos brotaciones principales, la de primavera y la de verano, con el fin de seleccionar la brotación más representativa a muestrear para el diagnóstico nutricional y la época más adecuada de muestreo. En estas parcelas, se muestrearon también frutos para evaluar la calidad del mismo en función del estado nutricional del árbol. Posteriormente, mediante la correlación entre producción, calidad del fruto y concentración foliar de nutrientes, se establecieron 5 niveles de nutrientes (*deficiente, bajo, óptimo, alto y excesivo*) que permitieran diagnosticar el estado nutricional de las plantaciones.

3.2.2. Dinámica del nitrógeno aportado al suelo en la planta. Contribución relativa al desarrollo de los nuevos órganos durante el ciclo vegetativo del níspero japonés

Para la consecución de este objetivo, se recurre a la técnica de dilución isotópica mediante la incorporación del isótopo estable ^{15}N a los fertilizantes aportados. La utilización de este isótopo como trazador, constituye una potente herramienta de investigación que permitirá obtener información exhaustiva del destino final del N aplicado, no accesible por los procedimientos y técnicas convencionales de estudio. En este estudio se determinó la proporción del contenido total de N en los órganos jóvenes que proviene del N absorbido directamente de los fertilizantes aplicados al suelo en distintos momentos del ciclo anual.

En la parcela experimental de la que dispone la cooperativa Ruchey en Callosa d'En Sarrià, se suministró mediante fertirriego un abono nitrogenado enriquecido en ^{15}N a árboles adultos de níspero japonés de la variedad *Algerie*. Con el fin de estudiar el efecto de los aportes realizados a lo largo del ciclo vegetativo en el destino del N aplicado, grupos distintos de árboles recibieron N enriquecido isotópicamente en diferentes estados del ciclo vegetativo:

Estado 1. Desarrollo de la brotación de primavera.

Estado 2. Desarrollo de la brotación de verano y floración.

Estado 3. Cuajado y desarrollo del fruto.

Estado 4. Maduración del fruto.

La evolución de la concentración total de N en los órganos en desarrollo, así como su enriquecimiento en ^{15}N , se evaluará mediante la realización de muestreos mensuales desde el momento de aplicación hasta la recolección del fruto. De este modo se determinó la contribución relativa del N absorbido del fertilizante al total de este elemento en los distintos órganos a lo largo del ciclo vegetativo, en función del periodo en que se realizó el abonado.

3.2.3. Evaluación de la fertilización nitrogenada foliar como fuente de nitrógeno en el desarrollo de los nuevos órganos durante el ciclo vegetativo

Se realizó una única aplicación por vía foliar de una solución de urea enriquecida en ^{15}N , al inicio de cada uno de los periodos del ciclo vegetativo del cultivo (apartado 2.2.2), y se realizó muestreos paralelos a los realizados en el ensayo anterior. De este modo se determinó la proporción del contenido total de N en los órganos jóvenes que proviene del absorbido directamente del fertilizante aplicados por vía foliar y que es, posteriormente, translocado de los órganos viejos a los jóvenes en desarrollo.

[3]

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

Los estudios para el establecimiento del protocolo de diagnóstico nutricional (objetivo 1) se llevaron a cabo en 40 parcelas de referencia, con óptima producción y calidad del fruto, con diferentes prácticas de cultivo (riego por inundación/goteo, bajo malla de protección/aire libre), y con plantas adultas de níspero injertado con la variedad *Algerie* sobre pie franco, durante dos ciclos vegetativos, 2006-2008. En ellas se seleccionaron 20 árboles representativos de cada parcela.

Los ensayos para la consecución de los objetivos 2 y 3 se realizaron en la parcela experimental de la Cooperativa Ruchey en Callosa d'En Sarriá (Fotografía 4), situado en la Partida el Pinar. Dentro de ella, se eligió una sub-parcela compuesta por 24 árboles de la variedad *Algerie*, sobre pie franco, en plena producción y al aire libre. El diámetro medio de los árboles al inicio del ensayo fue de 5 m con un marco de plantación de 6 x 5 m.



Fotografía 4. Parcela experimental de la Cooperativa Agrícola de Callosa d'En Sarriá (Alicante).

3.2. TÉCNICAS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las prácticas culturales realizadas en las parcelas de referencia son similares a las llevadas a cabo en la parcela experimental y son las necesarias para el correcto desarrollo de la plantación.

Las tablas 1 y 2 muestran los valores medios de las características del suelo de las parcelas de referencia, en función de las técnicas de cultivo empleadas.

Tabla 1. Análisis del suelo de las 40 parcelas de referencia en la campaña 2006-2007^z.

Características	pH	MO (%)	N (%)	P soluble (mg.kg ⁻¹)	Carbonatos Totales (%)	Caliza activa (%)
Aire Libre - Manta	8.07	1.54ab ^y	0.07a	76.5a	36.3	7.95
Aire Libre - Goteo	8.09	1.17ab	0.05ab	34.4b	49.4	10.23
Malla - Manta	8.04	1.69a	0.08a	76.1a	37.6	7.1
Malla - Goteo	8.21	1.11b	0.04b	42.4ab	44.8	9.33
Condiciones de cultivo ^x	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Sistema de Riego	NS	*	*	*	NS	NS

^zCada valor es la media de al menos nueve repeticiones.

^yDentro de cada columna, letras diferentes indican diferencias significativas entre medias, de acuerdo al test LSD Fisher para $p \leq 0.05$ (*) y no significativa para $p > 0.05$ (NS).

^xANOVA, análisis de varianza de dos vías. Efecto de las condiciones de cultivo y del sistema de riego sobre las variables evaluadas.

Las parcelas con riego a manta presentaron un mayor contenido de materia orgánica (MO) y concentración de N, sin embargo mostraron una menor concentración de fósforo soluble. Por otro lado, en cuanto a los cationes de cambio, las parcelas cultivadas bajo malla presentaron mayores concentraciones de sodio intercambiable. Y las regadas con riego localizado a goteo tuvieron menor concentración de sodio y potasio y relación K/Mg. En general, todos los valores analizados se encontraban dentro de los niveles considerados óptimos para el desarrollo de los cultivos, con valores de fósforo, de las parcelas cultivadas en riego a manta, ligeramente altos y, en todas ellas, niveles de calcio intercambiable muy alto (Legaz *et al.*, 1995).

Tabla 2. Análisis del suelo de las 40 parcelas de referencia en la campaña 2006-2007.

Características ^z	CE (mmhos.cm)	Na (meq)	K (meq)	Ca (meq)	Mg (meq)	K/Mg
Aire Libre - Manta	0.41	0.65b	1.07a	25.8	2.09	0.53a
Aire Libre - Goteo	0.68	0.54c	0.58b	23.9	2.52	0.27b
Malla - Manta	0.74	0.78a	1.01a	28.4	2.26	0.45a
Malla - Goteo	0.58	0.63b	0.67b	28.6	2.33	0.28b
Condiciones de cultivo ^x	NS	*	NS	NS	NS	NS
Sistema de Riego	NS	*	*	NS	NS	*

^z, ^y y ^x Ver Tabla 1.

En la parcela del campo de experiencias, las plantas se cultivaron en un suelo calizo (40 % carbonato cálcico) y de textura fina (35% arcilla), típico de las zonas de cultivo en la provincia de Alicante (Tabla 3).

Tabla 3. Características del suelo de la parcela experimental.

Parámetro	Resultados	Unidades
Textura	Arcillo-limoso	
Arena	2.8	%, diámetro partículas 2,00 – 0,05 mm
Limo	54.1	%, diámetro partículas 0,05 – 0,002 mm
Arcilla	43.1	%, diámetro partículas < 0,002 mm
pH	8.2	
Conductividad eléctrica. Extracto (1/5)	0.15	mS.cm ⁻¹ a 25° C
Carbonatos	43.6	% CaCO ₃
Caliza activa	8.3	% calcio activo

^zVer Tabla 1.

3.2.1. Riego

Las parcelas de referencia se cultivaron en las condiciones de cultivo descritas en la tabla 4. En ellas se llevaron a cabo las prácticas habituales del cultivo.

Tabla 4. Condiciones de cultivo de las 40 parcelas de referencia.

Nº Parcela	Condiciones de cultivo	Tipo de riego
1-11	Aire libre	Goteo
12-22	Aire libre	A Manta
23-31	Bajo malla	Goteo
32-40	Bajo malla	Manta

Para el riego de estas parcelas se utilizó agua procedente de las fuentes de Algar, desde donde se abastece el riego de todas las parcelas de la cooperativa agrícola de Callosa d'En Sarrià, incluida la parcela experimental de la misma (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis del agua de riego empleada en ambos ensayos.

Parámetro	Resultados	Unidades
pH	7.8	
Conductividad eléctrica	0.27	mS.cm ⁻¹ a 25°C
Sólidos disueltos totales	170	mg.L ⁻¹
Cloruros	0.32	meq.L ⁻¹ Cl ⁻
RAS ajustado	0.3	
Nitratos	2.5	mg.L ⁻¹ NO ₃ ⁻

A las parcelas de referencia, regadas mediante riego a manta o localizado a goteo, se les aportaron xxx y xxxx m³ de agua de riego (Tabla 6). El potencial hídrico del suelo se

controló a través de ThetaProbe PR2 (Delta-T Devices, UK) instaladas en diferentes parcelas cultivadas con los dos sistemas de riego. El riego se realizaba cuando el potencial mátrico a 30 cm superaba los -10 kPa para riego localizado y -20 kPa en riego a manta. (Parsons, 1989; Smajstrala *et al.*, 1987).

Tabla 6. Volúmenes ($\text{m}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$) de agua empleados para el riego de las parcelas de referencia.

Riego	Manta	Localizado a goteo
Enero		
Febrero		
Marzo		
Abril		
Mayo		
Junio		
Julio		
Agosto		
Septiembre		
Octubre		
Noviembre		
Diciembre		
Total		

El sistema de aporte de agua de la parcela experimental se hizo mediante el de riego localizado de alta frecuencia (goteo) con 6 emisores autocompensantes de $4 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ por planta. Para la determinación de las dosis de riego se utilizaron sondas de capacitancia (Diviner 2000, Sentek Pty Ltd., Stepney, Australia). Esta tecnología (Fotografía 5) se basa en la realización de balances en el contenido de agua en un periodo determinado de tiempo, durante el que se aplica un volumen conocido de agua por árbol. El contenido de agua en el perfil del suelo se determina mediante diversos sensores situados, cada 10 cm, hasta 1 metro de profundidad.



Fotografía 5. Detalle de la sonda Diviner 2000 utilizada para el cálculo de las necesidades de riego.

Con el fin de conocer la densidad de raíces absorbentes existentes, se realizó una zanja en la zona del bulbo húmedo en el perfil del suelo.

En ella se observó que el 95 % de estas raíces se encontraba en una profundidad de 70 cm, concentrándose la mayoría de ellas en los primeros 40 cm. Posteriormente, tras varias lluvias torrenciales típicas de otoño, se calculó tanto el contenido de humedad del suelo a capacidad de campo y como del punto de marchitamiento, durante el periodo de estrés hídrico. El agua comprendida entre estos dos puntos es la que hay que aportar con el agua de riego. Las dosis de riego aportadas se detallan en la Tabla 7.

Por otro lado, para determinar la duración del riego se midió la humedad del suelo a 70 cm, límite por debajo del cual hay ausencia de raíces absorbentes, y se mantuvo el riego hasta que las sondas detectaban que el agua llegó a esta profundidad, evitando pérdidas por percolación. Esta técnica también nos permitió reanudar los riegos tras un período de lluvia.

Tabla 7. Cálculo de la dosis de riego en la parcela experimental del estudio.

Mes	Lectura Di /iner hasta 70 cm (mm)	Precipitación (mm)	Dosis media riego (L.árbol-día ⁻¹)
Mayo-07	251.1	0	14.16
Junio-07	150.6	0	8.10
Julio-07	222	4	8.25
Agosto-07	246.3	129.4	18.20
Septiembre-07	252.8	410.9	9.1
Octubre-07	248.5	13.4	9.6
Noviembre-07	246.2	211.6	5.1
Diciembre-07	248	0	3.1
Enero-08	246.1	26	9.2
Febrero-08	250.6	0	16.8
Marzo-08	251	0	21.3
Abril-08	254.1	42	25.9
Total		837.3	4045

3.2.2. Período de estrés hídrico

Tras la recolección, a mediados de mayo, el níspero brota y se desarrolla vegetativamente hasta mediados de Julio. Una vez a finalizado el crecimiento de verano, se sometió a las plantas a un estrés hídrico durante un período aproximado de 4 semanas, momento en el que se apreciaba claramente que la yema apical ya estaba diferenciada. Durante este período, del 15 de julio hasta el 13 de agosto, las plantas recibieron un aporte mínimo de agua, solamente se aportó agua cuando, visualmente, se observaba que estaban padeciendo estrés severo, y no se abonaron.

3.2.3. Aclareo de frutos

Después del cuajado y crecimiento lento del fruto, se procedió al aclareo manual de los mismos. Éste se realizó a mediados de enero, dejando 3-4 frutos por panícula, los de mayor tamaño, mejor situados dentro de ésta, sin defectos ni rozaduras, etc. La brotación anticipada (hijuelos florales y vegetativos) se eliminó en su totalidad.

3.2.4. Poda de mantenimiento

En la parcela experimental, al igual que en las parcelas de referencia, se realizaron dos podas. En mayo-junio, tras la cosecha, en la que se eliminó la madera más gruesa, y al inicio de la floración, eliminando los brotes y tallos sobrantes para permitir la entrada de sol en el interior del árbol.

3.2.5. Recolección

En términos generales, la recolección fue escalonada con 4 pases cada 7-8 días y porcentajes de recolección de 10, 30, 50 y 10 %, respectivamente.

3.2.6. Control de plagas y enfermedades

El níspero no tiene plagas dignas de mención. La única enfermedad importante es el Moteado, producida por *Flusicladium Eriobotriae*. Durante la época de riesgo, se realizaron los tratamientos fitosanitarios adecuados para su control.

3.3. DOSIS DE ABONO

Las dosis de nutrientes anuales para árboles adultos y distribución durante el ciclo de cultivo se establecieron de acuerdo con Quiñones *et al.* (2006). Cada árbol de este estudio (objetivos 1, 2 y 3) recibió 420, 210, 450, 225 y 3 g de N, P₂O₅, K₂O, MgO y Fe, respectivamente (Tabla 8).

El nitrógeno se aplicó como nitrato potásico (13.5 %N y 46.2 % K₂O) y nitrato cálcico (15.5 %N y 27 % CaO), el fósforo como ácido fosfórico (61.8 % p/p), el potasio como nitrato potásico, el magnesio como epsomita (16 % MgO), y el hierro como quelato de hierro (6 % Fe).

Tabla 8. Distribución de los nutrientes aplicados a lo largo del ciclo de cultivo de árboles adultos.

Mes/ nutriente	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	MgO	Fe
Estado 1-Inicio 23 de mayo					
Mayo	10.0 ^z	10.0	10.0	10.0	10.0
Junio	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0
Julio	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Agosto					
Parcial (%)	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
Estado 2-Inicio 6 de septiembre					
Septiembre	15.0	15.0	15.0	15	15.0
Octubre	15.0	15.0	15.0	15.00	15.0
Noviembre	10.0	10.0	10.0	10	10.0
Diciembre					
Parcial (%)	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0
Estado 3-Inicio 18 de enero					
Enero	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Febrero	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0
Parcial (%)	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0
Estado 4-Inicio 12 de marzo					
Marzo	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Abril					
Parcial (%)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Total (%)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

^zPorcentaje mensual sobre dosis anual aplicada (g): 420 g N. P₂O₅: 210. K₂O: 450. MgO: 225 Fe: 3

3.4. PERIODOS DE MERCADO ISOTÓPICO

En los estados del ciclo vegetativo descritos en el apartado 2.2.2., los fertilizantes nitrogenados se aplicaron marcados isotópicamente en forma de K¹⁵NO₃ y Ca(¹⁵NO₃)₂ (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover MA, USA) con un 5 % de átomos de ¹⁵N en exceso, a tres árboles distintos de la parcela experimental, en 4 períodos clave del ciclo de cultivo (Objetivo 2, aplicación de N marcado al suelo), tal y como se detalla en las tablas 9 y 10.

Además, con el objetivo de evaluar la dinámica del nitrógeno aplicado vía foliar (Objetivo 3, aplicación de N foliar), A un grupo de otros tres árboles de la parcela experimental, a los que se les suministraron la mismas dosis de abonado vía suelo, recibieron un aporte puntual de 100 g por árbol de urea [CO(¹⁵NH₂)₂] en una disolución al 2% (enriquecida al 10% con ¹⁵N) al inicio de cada uno de los períodos citados en la tabla 8, mediante mochila manual.

Tabla 9. Distribución del aporte de ^{14}N y ^{15}N que recibieron los árboles en cada uno de los estados por el suelo y vía foliar.

Tratamiento	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr
1-Suelo S1	^{15}N	^{15}N	^{15}N	-	^{14}N	^{14}N	^{14}N	-	^{14}N	^{14}N	^{14}N	-
1-Foliar F1- ^{15}N 23/05	^{14}N	^{14}N	^{14}N	-	^{14}N	^{14}N	^{14}N	-	^{14}N	^{14}N	^{14}N	-
2-Suelo S2	^{14}N	^{14}N	^{14}N	-	^{15}N	^{15}N	^{15}N	-	^{14}N	^{14}N	^{14}N	-
2-Foliar F2- ^{15}N 06/09	^{14}N	^{14}N	^{14}N	-	^{14}N	^{14}N	^{14}N	-	^{14}N	^{14}N	^{14}N	-
3-Suelo S3	^{14}N	^{14}N	^{14}N	-	^{14}N	^{14}N	^{14}N	-	^{15}N	^{15}N	^{14}N	-
3-Foliar F3- ^{15}N 18/01	^{14}N	^{14}N	^{14}N	-	^{14}N	^{14}N	^{14}N	-	^{14}N	^{14}N	^{14}N	-
4-Suelo S4	^{14}N	^{14}N	^{14}N	-	^{14}N	^{14}N	^{14}N	-	^{14}N	^{14}N	^{15}N	-
4-Foliar F4- ^{15}N 12/03	^{14}N	^{14}N	^{14}N	-	^{14}N	^{14}N	^{14}N	-	^{14}N	^{14}N	^{14}N	-
% aportado de abono	30				40				25		5	
E. Fenol. predominante	Brotación primavera				Brotación verano y floración				Desarrollo fruto		Maduración	

A fin de evaluar el N translocado de las hojas viejas del ciclo anterior hacia el desarrollo de la brotación de primavera, inmediatamente antes del inicio de la actividad de ésta (23 de mayo) se aplicó, a tres plantas, urea por vía foliar a una concentración del 2 % (enriquecida al 10% con ^{15}N), lo que supuso 46 g N por árbol. El ^{15}N que aparece en las nuevas brotaciones que tienen lugar después del aporte foliar, únicamente puede provenir del N aportado por la urea.

Estado 1 – Desarrollo de la brotación de primavera

El 30 % de la dosis total de N (Tabla 9) se aplicó desde inmediatamente antes del inicio de la actividad vegetativa y del desarrollo de la brotación de primavera (23 de mayo) hasta la mitad de julio (inicio del período de estrés hídrico). Para ello se utilizaron tres árboles.

Tabla 10. Distribución de los fertilizantes aportados (g) en los árboles del objetivo 2.

Tratamiento	Estadio 1				Estadio 2				Estadio 3		Estadio 4	
	May 2 ^Z	Jun 4	Jul 2	Ago	Sep 4	Oct 2	Nov 2	Dic	Ene 2	Feb 4	Mar 2	Abr
K($^{15}\text{NO}_3$)	145.0	217.5	72.5	-	217.5	217.5	145.0	-	145.0	217.5	72.5	-
K(NO_3)	146.2	219.3	73.1	-	219.3	219.3	146.2	-	146.2	219.3	73.1	-
Ca($^{15}\text{NO}_3$) ₂	258.6	387.9	129.3	-	387.9	387.9	258.6	-	258.6	387.9	129.3	-
Ca($^{15}\text{NO}_3$) ₂	279.4	419.1	139.7	-	419.1	419.1	279.4	-	279.4	419.1	139.7	-
H ₃ (PO ₄) mL	59.6	89.4	29.8	-	89.4	89.4	59.6	-	59.6	89.4	29.8	-
Mg(SO ₄)	421.9	632.9	211.0	-	632.9	632.9	421.9	-	421.9	632.9	211.0	-
Quelato Fe	15.0	22.5	7.5	-	22.5	22.5	15.0	-	15.0	22.5	7.5	-

^ZNúmero de aplicaciones al mes

Estado 2 - Desarrollo de la brotación de verano y floración

Otro grupo de tres árboles recibió el 40 % del aporte de N, desde inmediatamente antes del inicio de la brotación-floración de verano (6 de septiembre) hasta la conclusión de la floración (final de noviembre).

Con el fin de cuantificar el N translocado de las hojas viejas del ciclo anterior y de las hojas jóvenes de la brotación de primavera hacia el desarrollo del brotación de verano y floración, a otro grupo de tres plantas se les realizó un único aporte de urea marcada al inicio de este período (6 de septiembre).

Estado 3 - Cuajado y desarrollo del fruto

Desde el 18 de enero, final de la floración, cuando todos los pétalos han caído (cuajado del fruto, 609 escala BBCH) hasta el final de febrero (el fruto alcanza el 70 % de su tamaño final, 707 escala BBCH), se aplicó el 25% de la dosis a otros 3 árboles de la parcela experimental.

Igual que en los estados anteriores, el 18 de enero, otros tres árboles recibieron un único aporte de urea marcada con el fin de conocer la translocación del N aportado a las brotaciones anteriores en el desarrollo lento del fruto.

Estado 4 – Maduración del fruto

Durante la segunda quincena del mes de marzo (inicio el 12 de marzo, el fruto ha alcanzado el 90 % de su tamaño final, 709 escala BBCH), se aplicó al suelo, a otro grupo de tres plantas, el 5 % restante de la dosis de nitrógeno con fertilizantes marcados.

Con el fin de conocer la translocación de nitrógeno durante la maduración del fruto, otro grupo de tres árboles recibió un aporte de urea foliar al 2 %, marcada con un 10 % de ¹⁵N en exceso, el día 12 de marzo.

3.5. MUESTREOS

A continuación se detallan los muestreos realizados en las parcelas de referencia del objetivo 1 y en la parcela de los experimentos para cubrir los objetivos 2 y 3.

3.5.1. Parcelas de referencia

Los muestreos se realizaron durante dos ciclos vegetativos consecutivos, 2006-2007 y 2007-2008.

Ensayo 1.1. – Establecimiento del tipo de hoja

Durante el primer ciclo vegetativo (2006-2007), en cada una de las 40 parcelas de referencia se seleccionaron 20 árboles distribuidos al azar, característicos de la plantación. En ellos, mensualmente, se muestrearon hojas de las brotaciones principales del níspero, brotación primavera y verano, la tercera desde la base de la brotación, alrededor de la copa, cubriendo los cuatro puntos cardinales. En este ensayo, se utilizó la hoja completa para el análisis foliar siguiendo la metodología descrita por Bould *et al.* (1960) para árboles de climas templados, como es el caso del níspero japonés. Además, en diferentes momentos del ciclo vegetativo, se extrajeron del suelo tres árboles adultos. Los órganos de las distintas brotaciones se pesaron directamente en el campo utilizando una balanza de 250 kg de capacidad y se tomaron muestras para cuantificar la biomasa seca total. La hoja más representativa de las reservas de la planta, que actuará como fuente de nutrientes se elegirá por ser la de mayor biomasa y contenido en nutrientes.

Ensayo 1.2. – Establecimiento de la época de muestreo

Para la consecución de este objetivo, no se realizó ningún muestreo y se utilizaron los valores de concentración foliar de nutrientes de las hojas de la brotación de primavera muestreadas en el ensayo anterior.

Ensayo 1.3. – Definición de los estándares de referencia

Durante dos ciclos vegetativos consecutivos se muestrearon las hojas de la brotación elegida en la época recomendada para el muestreo.

Las muestras recogidas en estos tres ensayos se guardaron en bolsas correctamente identificadas, y se llevaron al Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), manteniéndose en cámara a -4 °C, hasta su posterior procesado.

3.5.2. Parcela experimental

En los dos ensayos establecidos en la parcela experimental (objetivos 2 y 3) se realizaron muestreos a lo largo del ciclo vegetativo durante la campaña 2007/08 (Tabla 11). También en este caso, los órganos muestreados se guardaron en bolsas identificadas y se procedió como con los anteriores.

3.6. ÓRGANOS CAÍDOS Y PODA

Con el fin de cuantificar las pérdidas de biomasa y de N asociadas a los órganos caídos (pétalos, cáliz, ovarios en desarrollo y hojas senescentes) se dispusieron mallas alrededor del tronco de los árboles de los dos ensayos de la parcela experimental (Fotografía 6).



Fotografía 6. Detalles de las redes colocadas en los árboles para recoger los pétalos, cáliz, ovarios en desarrollo y hojas caídas.

Éstas se colocaron a inicio del ensayo (23 de mayo del 2007) y se retiraron al final del mismo (7 de mayo del 2008). Quincenalmente se recogieron los órganos caídos en las mallas y se separaron en distintas fracciones indicadas según el tipo de órgano. Además, con el fin de conocer la extracción de nutrientes en la poda y aclareo del fruto, las muestras vegetales obtenidas en esos dos procesos, se pesaron y, una fracción representativa, se guardó para su análisis posterior del modo descrito anteriormente.

Tabla 11. Distribución de los periodos de marcado y órganos muestreados en los diferentes estados fenológicos en los ensayos vía suelo y foliar.

Me:	Jun	Jul	Ag	Sept	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May
Fec a muestreo		26		06	30		13	15		12	22	7
Brotación primavera (E1)		HV HP		HV HP	HV HP HVe E		HV HP HVe E Fl F	HV HP HVe E F		HV HP HVe E F(P+H)	E F(P+H)	HV HP HVe E F(P+H)
Brotación verano (E2)					HV HP HVe E		HV HP HVe E Fl F	HV HP HVe E F		HV HP HVe E F(P+H)	E F(P+H)	HV HP HVe E F(P+H)
Desarrollo fruto (E3)										HV HP HVe E F(P+H)	E F(P+H)	HV HP HVe E F(P+H)
Maduración (E4)											E F(P+H)	HV HP HVe E F(P+H)

²Los órganos muestreados fueron: HV-Hoja vieja del año anterior, HP-Hoja joven de la brotación de primavera, HVe-Hoja de la brotación de verano; E-Esqueleto de la panícula; Fl-Flor, F-Fruto; P-Pulpa, H-Hueso.

³Las celdas sombreadas indican periodos de aplicación del fertilizante marcado al suelo.

3.7. RECOLECCIÓN DEL FRUTO

Con el fin de conocer la producción y calidad del fruto, en el momento de la recolección, del 14 al 28 de abril, se pesó la cosecha de los árboles de las parcelas de referencia y se tomó una muestra representativa de 30 frutos por parcela, y se transportaron al laboratorio para el análisis de su calidad. Además, al final de los ensayos, se contabilizó la producción por calibres y categorías con el fin de conocer si el aporte de N vía foliar incrementaba el valor de la misma.

3.8. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

3.8.1. Muestras de material vegetal procedentes de los diferentes muestreos mensuales

Las muestras de material vegetal se lavaron con agua y detergente no iónico, y se enjuagaron tres veces con agua desionizada. Posteriormente, las muestras se congelaron con nitrógeno líquido y se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su liofilización (LyoAlfa 6, Telstar, Terrasa, España). Una vez liofilizadas se determinó su peso seco y se trituraron mediante molinillo refrigerado con agua (IKA M 20, Staufen, Alemania), para evitar su calentamiento, hasta un tamaño inferior a 0,3 mm de diámetro, y se guardaron en recipientes herméticos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ protegidos de la luz.

3.8.2. Muestras de material vegetal procedentes de órganos caídos, poda y aclareo

El material vegetal recogido en las mallas se lavó con agua y detergente no iónico, seguido de varios enjuagues con agua desionizada. A continuación se desecaron en estufa de aire forzado a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 72 h, determinándose su peso seco. Posteriormente, se trituraron y almacenaron del mismo modo indicado para las muestras vegetales procedentes de las extracciones.

3.9. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

3.9.1. Determinación del N total y su composición isotópica en material vegetal

La determinación del N total presente en las muestras de material vegetal, y su composición isotópica en $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ se realizó mediante un Analizador Elemental (NC 2500, ThermoFinnigan, Bremen, Alemania) acoplado (interfaz ConFloII, Finnigan, Bremen, Alemania) a un Espectrómetro de Masas de Relaciones Isotópicas (Delta Plus, ThermoFinnigan, Bremen, Alemania). Para ello, se pesaron en balanza analítica (XP205 DeltaRange, Mettler, $\pm 0,01\text{ mg}$, Hospitalet de Llobregat, España) de 1,5 a 2,5 mg de materia

seca según el tipo de órgano, previamente liofilizada y triturada, en cápsulas de estaño de 5x9 mm (Eurovector, Milán, Italia) que se sellaron para su posterior análisis.

En el analizador elemental, las cápsulas entran en el horno de oxidación de cuarzo que se encuentra a una temperatura de 1.000 °C, donde las muestras son, mediante la inyección de oxígeno de alta pureza, sometidas a una fuerte combustión instantánea (combustión flash), ya que la oxidación del estaño de la cápsula provoca que la temperatura ascienda hasta 1.800 °C. La mezcla de compuestos gaseosos procedentes de la pirólisis (método Dumas) de la muestra, atraviesan el tubo de oxidación, arrastrados por un flujo de He constante (90 mL·min⁻¹), donde se completa la oxidación de la muestra mediante los compuestos de relleno del tubo (óxido de cromo y óxido de cobalto y plata). Estos compuestos oxidados pasan por el horno de reducción (700 °C) que contiene cobre, donde los óxidos de nitrógeno procedentes de la muestra son reducidos a nitrógeno elemental (N₂), quedando retenidos el exceso de oxígeno y el óxido de cobre para convertir el CO en CO₂. De este modo la muestra inicial se transforma en una mezcla de gases, N₂, CO₂ y H₂O; el vapor de agua es retenido en una trampa de anhídrona (perclorato de magnesio anhidro). El resto de gases pasa a través de la columna cromatográfica (Porapack PQS) para separarlos, de este modo se genera una señal proporcional a la concentración de los componentes individuales de la mezcla, que es registrada en el detector de conductividad térmica (TCD) en la secuencia N₂, CO₂ y, posteriormente procesada mediante el software del equipo (Eager2000, C.E. Instruments, Lancashire, Reino Unido). El empleo de la atropina (C₁₇H₂₃NO₃, Eurovector, Milán, Italia) como estándar permite crear una recta de calibración y obtener así, directamente, la composición másica porcentual de la muestra (%N y %C) con un error absoluto inferior al 0,2 %.

Una parte del efluente de gas procedente de la columna del analizador elemental entra en el espectrómetro de masas para la determinación de su composición isotópica. En su interior, el sistema se encuentra a alto vacío (10⁻⁴ Pa). Un filamento a elevada temperatura produce electrones emite bombardean las moléculas de N₂, ionizando el gas. Los aniones son atraídos por un pequeño voltaje positivo y eliminados. Los iones moleculares resultantes son acelerados, formando un haz que al atravesar el interior de un campo magnético es separado en función de las distintas masas moleculares del N₂: 28, 29 y 30 para ¹⁴N¹⁴N, ¹⁴N¹⁵N y ¹⁵N¹⁵N, respectivamente. Los iones son captados en un colector que consta de tres copas de Faraday, en las que los impulsos eléctricos son amplificados y medidos (precisión en torno al 0,2‰).

Cada muestra se analizó por duplicado y se incluyó una muestra de referencia en cada secuencia de veinte muestras.

3.9.2. Determinación de macro y micronutrientes

En las muestras de hojas pertenecientes a la brotación de primavera, se determinaron macro (P, K, Mg, Ca, S) y micronutrientes (Fe, Zn, Mn, Cu, B) por la técnica de digestión

nítrico-perclórica y posterior análisis mediante espectrometría de emisión atómica con fuente de plasma de acoplamiento inductivo. pesaron 0,5 g, con una precisión de $\pm 0,003$ g, de las muestras liofilizadas y trituradas, a los que se les añadieron 10 mL de ácido nítrico concentrado. Se agitó suavemente y se dejó en reposo 24 horas. Posteriormente, se colocaron los tubos en un termobloque digestor (FOSS, Tecator, Barcelona, España) durante 10 minutos a 120 °C, y seguidamente durante 20-25 minutos a 170 °C, hasta que el volumen del ácido se redujo, aproximadamente, a la mitad. En frío se añadieron 2 mL de ácido perclórico al 70% y se procedió a la digestión a 200 °C. La digestión finaliza cuando la solución se vuelve incolora. Se enrasó en frío a 25 mL con agua mili-Q y se añadió una gota de Tritón.

En las muestras ya digeridas se procedió a la determinación de los macro y micronutrientes en un espectrómetro de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (iCAP 6000, Thermo Scientific, Massachusetts, USA). La técnica de ICP-AES, con un límite de detección de 0,1 a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, se basa en la vaporización, disociación, ionización y excitación de los diferentes elementos químicos de una muestra en el interior de un plasma de argón generado en un campo magnético. Para ello, un nebulizador transforma la solución acuosa problema en aerosol con partículas de 1 a 10 μm de diámetro. Estas partículas atraviesan el plasma, que en su zona analítica se encuentra a una temperatura entre 4.000 y 8.000 °C; esta elevada temperatura conlleva la ruptura de todos los enlaces químicos (atomización) y la ionización de los elementos. Los átomos en el interior de este plasma estable incrementan su estado energético. Durante el proceso de desexcitación de éstos en el interior del plasma, se producen emisiones de radiación electromagnética. Estas radiaciones, características de cada elemento, se separan en función de su longitud de onda (análisis cualitativo), determinándose asimismo la cantidad del mismo (análisis cuantitativo) en función de la intensidad de la luz emitida. La intensidad de la señal es posteriormente comparada con intensidades medidas previamente de una concentración conocida del elemento. Cada elemento puede tener muchas ondas en el espectro que es usado para su análisis. La selección de las mejores líneas es de suma importancia para la correcta determinación de cada elemento. La mayor parte de los elementos de la tabla periódica se pueden ionizar en un ICP, sin embargo no se pueden determinar el H, C, N, O, F y los gases nobles.

La determinación de micronutrientes se realizó por análisis directo en la solución procedente de la digestión en el ICP. Para el cálculo de la concentración se utilizó la fórmula:

$$\text{Micronutriente (ppm)} = \frac{(a-b)*V}{P}$$

En la que:

- a: Concentración de Fe, Zn, Mn, Cu, B en la solución procedente de la digestión de la muestra vegetal ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).
- b: Concentración de Fe, Zn, Mn, Cu, B en el blanco ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).
- V: Volumen final de la digestión (25 mL).
- P: Peso muestra tejido vegetal (0.5 g).

Los patrones utilizados para la calibración del ICP se enrasaron con una solución de ácido nítrico al 2%. Las muestras se analizaron por duplicado y se incluyó una muestra control (QC) de concentración conocida cada 40 muestras.

Para la determinación de los macronutrientes se tomó una alícuota de 0,5 mL de la digestión nítrico-perclórica y se enrasó a 10 mL con agua mili-Q. Para el cálculo de la concentración se utilizó la fórmula:

$$\text{Macronutriente (ppm)} = \frac{(a-b) \times V \times d}{P \times 1000}$$

en la que:

- a: Concentración de P, K, Mg, Ca, S en la alícuota procedente de la digestión de la muestra vegetal ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).
- b: Concentración de P, K, Mg, Ca, S en el blanco ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).
- V: Volumen final de la digestión (25 mL).
- P: Peso muestra tejido vegetal digerido (0.5 g).
- d: Factor de dilución de la muestra (10/0.5).

3.9.3. Parámetros de calidad de los frutos

En la muestra representativa de fruto, en el momento de madurez, se analizaron los parámetros de calidad.

Peso. Con el total de los frutos de cada árbol se determinó el peso medio utilizando una balanza (Mettler, Hospitalet de Llobregat, España, precisión de ± 1 g).

Diámetro de fruto. El diámetro ecuatorial se midió mediante un calibre digital (Mitutoyo CD-15D, Neuss, Alemania).

Firmeza de la pulpa. La firmeza se consideró como la fuerza máxima de penetración que puede soportar la pulpa del fruto (expresada en N). Para su determinación se utilizó un penetrómetro (PCE-PTR 200, Albacete) Se realizaron 2 medidas en cada fruto, en la zona ecuatorial y en caras opuestas del fruto, eliminando previamente una sección de piel de aproximadamente 1 cm de diámetro.

Sólidos solubles totales. Para la determinación de este parámetro se utilizó un refractómetro (Atago PR-32, Tokio, Japón), previa calibración con agua destilada. La medición se realiza en escala refractométrica, cuyos valores de índice de refracción se corresponden con valores de °Brix. La concentración de sólidos solubles totales se expresa en °Brix, sabiendo que, aproximadamente, una solución de sacarosa al 1% y a 20°C tiene 1 °Brix. El zumo, además de sacarosa, tiene otros azúcares, ácidos y sales, por lo que 1 °Brix no equivale exactamente a una concentración de sólidos disueltos de 1 g en 100 mL, pero el valor obtenido se acepta convencionalmente como índice aproximado. Este parámetro también se expresa como $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de zumo.

Acidez total. La acidez del zumo se expresa en g de ácidos contenidos en un litro del mismo. La determinación se realiza por volumetría, neutralizando 10 mL de zumo filtrado mediante hidróxido sódico 0,1 N y utilizando fenolftaleína como indicador. La acidez titulable expresada como ácido cítrico se calcula mediante la expresión (AOAC, 1980):

$$\text{Acidez (g}\cdot\text{L}^{-1}) = \frac{V_{\text{NaOH}} \times N (0.064 \text{ g meq NaOH}^{-1}) \times 1000}{V_{\text{zumo}}}$$

En la que:

V_{NaOH} : Volumen de NaOH usado en la valoración (mL).

N: Normalidad del NaOH empleado (0,1 N).

V_{zumo} : Volumen de zumo valorado (10 mL).

Índice de madurez. Es la relación existente entre los sólidos solubles totales (%) y el contenido en ácidos ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), multiplicado por 10.

3.10. ESTABLECIMIENTO DE LA ÉPOCA DE MUESTREO

Una vez seleccionado el tipo de hoja, se calculó el incremento de concentración entre dos puntos de muestreo consecutivo y se eligió aquel periodo ($\text{mes}_x - \text{mes}_{x-1}$), que en promedio, presentaba un valor significativamente inferior al resto.

3.11. DETERMINACIÓN DE LOS VALORES ESTÁNDAR DE REFERENCIA PARA EL DIAGNÓSTICO NUTRICIONAL

El Índice de Balance Kenworthy define su valor estándar como la media de las concentraciones foliares de nutrientes hojas muestreadas en un momento particular de árboles de alto rendimiento que muestran un buen crecimiento, producción y calidad de la

fruta. El método del índice de balance Kenworthy normaliza la concentración de nutrientes muestreados basado en un valor estándar (la media de la concentración) y el coeficiente de variación (CV), a través de las ecuaciones siguientes.

- Si la concentración del nutriente en la muestra (X) es menor que la concentración en el promedio de concentración (S) →

$$B = ((X/S) \times 100) - (100 - ((X/S) \times 100)) \times (CV/100)$$

- Si la concentración del nutriente en la muestra (X) es mayor que la concentración en el promedio de concentración (S):

$$B = ((X/S) \times 100) - ((X/S) - 100) \times (CV/100)$$

en el que:

X = concentración de nutrientes de la muestra

CV = coeficiente de variación

S = media de la población

B = índice de balance

Una vez calculados estos índices, Awasthi *et al.*, (1979) modificó los índices de balance de Kenworthy en porcentajes de un valor estándar, obteniéndose así, los niveles de referencia del estado nutricional de una plantación:

Los valores del índice de equilibrio (B) de cada nutriente entre 17-50 % se definen como *deficiente*, los valores del índice de balance entre 50-83, 83-117 y 117-150 % se definen como *bajo*, *óptimo*, *alto*, respectivamente y los valores entre 150-183 % como *excesivo*.

3.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En los resultados obtenidos, se aplicó un análisis de la varianza de una vía (ANOVA one-way), utilizando el paquete estadístico SAS 9.1. (SAS, Statistical Analysis System Institute Inc., EEUU). Para comparar las medias entre sí se utilizó el test LSD-Fisher.

[6]

BIBLIOGRAFÍA

- Alva A K; Paramasivam S; Graham W D. 1998. Impact of nitrogen management practices on nutritional status and yield of Valencia orange trees and groundwater nitrate. *J. Environ. Qual.* 27:904-910.
- Alva A K; Fares A; Dou H. 2003. Managing citrus trees to optimize dry mass and nutrient partitioning. *J. Plant Nutr.* 26(8):1541-1559.
- Agustí M; Juan M; Almela V; Gariglio N. 2000. Loquat fruit size is increased through the thinning effect of naphthaleneacetic acid. *Plant Growth Regulation* 31:167-171.
- AOAC. 1980. Official methods of analysis. Titrable acidity (22.060). Thirteenth edition, Washington, USA. 1018p.
- Avinimelech Y; Raveh J. 1976. Nitrate leakage from soils differing in texture and nitrogen load. *J. Environ. Qual.* 5:79-82.
- Awasthi R P; Dhuria H S; Karkara B K. 1979. Nutritional status of apple orchards in Himachal Pradesh. I. Macronutrients. *Indian J Hortic* 36:57-63.
- Axmann H; Zapata F. 1990. Stable and radioactive isotopes. In: Use of Nuclear Techniques in Studies of Soil-Plant Relationships (G. Hardarson, ed.). Training Course Series No. 2. International Atomic Energy Agency. Vienna, Austria. pp:9-25.
- Badenes M L; Castro M; Gisbert A D; Martínez-Calvo J; Llácer G. 2006. Clasificación botánica. Variedades y patrones, pp 27-48. Agustí M, Reig C y Undurraga P (eds). En: El cultivo del níspero japonés. Univ. Católica de Valparaíso (Chile)-UPV (España).
- Badenes M L; Janick J; Lin S; Zhang Z; Liang G L; Wang W. 2013. Breeding loquat. In: Janick J (ed) *Plant Breeding Reviews*, Volume 37, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Ballestera C; Buesaa I; Bonetb L; Intrigliolo DS. 2014. Usefulness of stem dendrometers as continuous indicator of loquat trees water status *Agricultural Water Management* 142:110-114.
- Barraclough D. 1995. ¹⁵N isotope dilution techniques to study soil nitrogen transformations and plant uptake. *Fertilizer Research.* 42:185-192.
- Bellini E. 2002. Fruttiferi minori in Europa. Ed. L'Informatore Agrario. 190 pp7.
- Bengtsson G; Bergwall C. 2000. Fate of ¹⁵N labelled nitrate and ammonium in a fertilizer forest soil. *Soil Biol. Biochem.* 32:545-557.
- Bould C; Bradfield EG; Clarke G M. 1960. Leaf analysis as a guide to the fruit crops. I-General principles, sampling techniques and analytical methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 11:229-242.
- Boutton T W. 1991a. Stable carbon isotopes ratios of natural materials. I. Sample preparation and mass spectrometric analysis. p. 155-171. In D.C. Coleman and B. Fry (eds.). *Carbon isotopes techniques*. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Boutton T W. 1991b. Stable carbon isotopes ratios of natural materials. II. Atmospheric, terrestrial, marine, and freshwater. p. 173-185. In D.C. Coleman and B. Fry (eds.). *Carbon isotopes techniques*. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Burney B. 1980. Exotics: A guide to some that may be grown in New Zealand. Part I. *New Zealand J. Agr* 140:58-59.
- Caballero P; Fernández M A. 2004. Loquat, production and market. *Options Méditerranéennes* 58:11-20.
- Cantarella H; Mattos D; Quaggio J A; Rigolin A T. 2003. Fruit yield of Valencia seet orange fertilized with different N sources and the loss of applied N. Nutrient cycling in agroecosystems.

67(3):215-223.

Carranca C. 1999. Diagnóstico do estado nutritivo dos citrinos. Métodos de recomendação da fertilização. *Agron Lusit* 46:1-9 .

Carrera L; Sanzol J; Soler E; Herrero M; Hormaza JI; 2011. Molecular S-genotyping and determination of S-RNase-based incompatibility groups in loquat [*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.] *Euphytica* 181:267-275.

Chevreau E; Lespinasse Y; Gallet M. 1985. Inheritance of pollen enzymes and polyploid origin of apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Theor Appl Genet* 71:268-277.

Cline R A; Mc Neill B. 1991. Leaf analyses for fruit crop nutrition. In: *FactSheet 206/532*. Ontario: Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs.

Crescimano F G; Barone F. 1980. Variazioni del contenuto in N, P, K, y Mg nel Nespolo del Giappone (*Eriobotrya Japonica* L.) durante un ciclo annuale [Changes in the N, P, K, and Mg content in the loquat tree (*Eriobotrya japonica* L.) during an annual cycle]. Estratto da "Tecnica Agricola 4:1-10.

Cui XP; Ren GH; Qi YH; Yu LF; Liu Q. 2007. Sampling methods for loquat fruit quality analysis. *Acta Horticulturae* 750:367-372.

Davidson EA; Stark JM; Firestone MK. 1990. Microbial production and consumption of nitrate in an annual grassland. *Ecology*. 71(5):1968-1975.

Demir S. 1983. Promising loquat cultivars for the Antalya region. *Bahce* 12:5-16.

Ding CK; Chen QF; Sun TL. 1995. Seasonal variations in the contents of nutrient elements in the leaves and the fruits of *Eriobotrya japonica* L." *Acta Horticulturae* 396:235-242.

El-Komy HM; Hamdia MA; El-Baky GKA. 2003. Nitrate reductase in wheat plants grown under water stress and inoculated with *Azospirillum* spp. *Biol. Plantarum* 46(2):281-287.

Emblenton TW; Jones WW; Labanauskas CK; Reuther WJ. 1973. Leaf analysis is a diagnostic tool and guide to fertilization. In: *The Citrus Industry*, ed. W. J. Reuther, pp. 183-211. Berkeley, CA: University of California, Division of Agricultural Science.

Feng JJ; Liu Q; Wang XD; Chen JW; Ye JG. 2007. Characterization of a new loquat cultivar 'Ninghaibai'. *Acta Horticulturae* 750:117-124.

Fernández M A; Caballero P. 2002. Características económicas de la producción de níspero. *Agrícola Vergel* 248:445-454.

Gariglio N; Castillo M; Juan M; Almeda V; Agustí M. 2002. El níspero japonés. Técnicas para mejorar la calidad del fruto. *Generalitat Valenciana. Serie Divulgació Técnica No.52*, Valencia, España, 61 pp.

Genovés JC. 1993. El problema de la contaminación difusa: estrategias de planificación. *Jornadas sobre la contaminación por nitrato de las aguas continentales. Conselleria de Medi Ambient, Valencia, 1993*.

González-Dominguez E; Pérez-Sierra L; Álvarez, M; Len P; Abad-Campos, J; Armengol J; García-Jiménez J. 2009. Agentes fúngicos presentes en plantaciones de nísperos (*Eriobotrya japonica* Lindl.) con síntomas de decaimiento en la provincia de Alicante *Bol. San. Veg. Plagas*, 35:453-467.

González-Domínguez E; Rossi V; Armengol J; García-Jiménez J. 2013. Effect of Environmental Factors on Mycelial Growth and Conidial Germination of *Fusicladium eriobotryae*, and the Infection of Loquat Leaves. *Plant Disease* 97(10):1331-1338.

Goubran FH; El-Zeftawi BM. 1983. Assessment of some loquat cultivars. *Australia Horticultural Research Newsletter* 55:125.

Greenwood DJ. 1990. Production or productivity: the nitrate problem? *Ann. Appl. Biology*. 117:

209-231.

Guillem A. 2013. Caracterización de la resistencia a fungicidas de *fusicladium eriobotryae*, agente causal del moteado del níspero TRABAJO FINAL DE CARRERA.

Igic B; Kohn JR. 2001. Evolutionary relationships among self-incompatibility RNases. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13167-13171.

ITGE. 1996. Instituto Tecnológico Geominero de España. Los recursos hídricos en la Comunidad Valenciana. Conselleria de Agricultura y Medio Ambiente. 77pp.

Jaime S; Farre J M; Hermoso J M; Aguilar A. 1987. Nutrición mineral del Níspero del Japon (*Eriobotrya japonica* L.). Evolución anual de los macroelementos: N, P, K, Ca y Mg en 8 años de observaciones [Mineral nutrition of Japanese Loquat (*Eriobotrya japonica* L.). Trend of macronutrients: N, P, K, Ca and Mg in eight years of observations]. *Annals of Edaphology and Agrobiology XLVI*:1385-1395.

Jiang F; Zheng SQ; Gao HY; Huang AP; Chen XP. 2007. Polysaccharides and flavones in loquat cultivars. *Acta Horticulturae* 750:321-323.

Juan N; Quiñones A; Bañuls J; Ferrer P; Soler E; Giner JF; Martín B; Legaz F. 2003. Seasonal changes of nutrients concentrations in loquat trees (*Eriobotrya japonica* Lindl.). *Options Méditerranéennes*, 1:113-116.

Junk G; Svec HJ. 1958. The absolute abundance of the nitrogen isotopes in the atmosphere and compressed gas from various sources. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 14:234-243.

Kenworthy AL. 1961. Interpreting the balance of nutrient element in leaves of fruit trees. In: Reuther W (ed) *Plant analysis and fertilizer problems*, 8th edn. American Institute of BioSciences/EEUU, Washington, DC, pp 28-43.

Klein I; Weinbaum SA. 1985. Foliar application of urea to almond and olive: Leaf retention and kinetics of uptake *Journal of Plant Nutrition* 8 (2): 117-129. DOI:10.1080/01904168509363329.

Kraimer RA; Lindemann WC; Herrera EA. 2001. Distribution of ¹⁵N-labeled fertilizer applied to pecan: A case study. *HortScience*, 36:308-312.

Lacertosa G; Giuffrida A; Mennone C; et al. 2001. Stato nutrizionale e qualità dei frutti in agrumeti del metapontino. XVII Convegno SICA, pp 387-394.

Lee RB; Purves JV; Rarcliffe RG; Saker LR. 1992. Nitrogen assimilation and the control of ammonium and nitrate absorption by maize roots. *J. Exp. Bot.* 43:1385-1396.

Legaz F; Primo-Millo E. 1988a. Normas para la fertilización de los agrios. Serie Fullets Divulgació nº 5-88. Conselleria d'Agricultura i Pesca. Generalitat Valenciana, 29 pp.

Legaz F; Primo-Millo E. 1988a. Absorption and distribution of Nitrogen-15 applied to young orange trees. In: Goren R and Mendel K (eds). *Proceedings of the International Society of Citriculture*, 2: 643-661. 6th International Citrus Congress, Tel Aviv, Israel.

Legaz F; Serna MD; Ferrer P; Cebolla V; Primo-Millo E. 1995. Análisis de hojas, suelos y aguas para el diagnóstico nutricional de plantaciones de cítricos. Procedimiento de toma de muestras. Servicio de Transferencia de Tecnología Agraria. Conselleria d'Agricultura, Pesca y Alimentació. Generalitat Valenciana. 28 pp.

Li H; Ge SF; Jiang YM; Peng FT; Wei SCh; Fang XJ. 2011. Characteristics of Absorption, Distribution and Utilization of ¹⁵N-Urea Applied in Different Depths in Gala (*Malus hupehensis*)[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 44(7):1408-1414.

Lin S; Sharpe RH; Janick J. 1999. Loquat: botany and horticulture. *Horticultura reviews* 23:233-276.

Llácer G. 1996. Creciente interés por los frutales infrautilizados en el Mediterráneo. *Información Técnica Económica Agraria* 17:240-245.

Llácer G; Soler E. 2001. Níspero del Japón, pp 344-346. En: Nuez F, Llácer G (Eds). *La Horticultura Española*. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas.

Lu ZM; Zhang ZL; Wu WX; Li WH. 2007. Effect of low temperatures on postharvest loquat fruit. *Acta Horticulturae* 750:483-486.

MAAMA. 2012. Ministerio de Agricultura, Agua y Medio Ambiente. *Anuario Estadístico*. 2012.

Maldonado-Torres R; Etchevers BJD ; Alcántar GG; Rodríguez AJ; Colinas LMT . 2001. Nutritional status of Mexican lime in calcareous soils. *Terra* 19: 163-174.

Maldonado-Torres R; Álvarez-Sánchez ME; AlmaguerVargas G; Barrientos-Priego AF; García-Mateos R. 2007. Estándares nutrimentales para aguacatero "hass". *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 13:103-108.

Manahan SE. 1994. *Environmental Chemistry*, 6th Edition. Lewis Publishers CRC Press, Boca Raton, Florida. OMS, 2000. Bottled drinking water Factsheet N 256.

MAPA. 2013. Ministerio de Agricultura , Alimentación y Medio Ambiente. *Anuario Estadístico*.

Mariotti A. 1983. Atmospheric nitrogen is a reliable standard for natural ^{15}N abundance measurements. *Nature*. 303:685-687.

Martínez-Alcántara B; Quiñones A; Legaz F; Primo-Millo E. 2012. Nitrogen-use efficiency of young citrus trees as influenced by the timing of fertilizer application. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 175(2): 282-292.

Martínez-Calvo J; Badenes M L; Llácer G; Bleiholder H; Hack H; Meier U. June 1999. Phenological growth stages of loquat tree (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.). *Annals of Applied Biology*. 134(3):353-357.

Martínez-Calvo J; Badenes M L; Llácer G. 2000. Descripción de variedades de níspero japonés. *Publicaciones de la Consellería, de Agricultura, Pesca y Alimentación. Serie Divulgación Técnica* nº 47, 119 pp.

Martínez-Calvo J; Gisbert AD; Alamar C; Hernandorena R; Romero C; Llácer G; Badenes ML. 2007. Study of a germplasm collection of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) by multivariate analysis. *Genet Resour Crop Evol*

Mateo MA; Ferrio P; Araus JL. 2004. Isótopos estables en ecofisiología vegetal. *La Ecofisiología Vegetal. Una ciencia de síntesis*. Reigosa M.J., Pedrol N. y Sánchez-Moreiras A. eds. Paraninfo S.A. pp 113-160.

Menino MR; Carranca C; de Varennes A. 2007. Distribution and remobilization of nitrogen in young non-bearing orange trees grown under mediterranean conditions. *J. Plant Nutr.* 30:1083-1096.

Menino MR. 2012. Leaf Analysis in Citrus: Interpretation Tools. En: *Advances in citrus nutrition*. Srivastava AK (ed). Springer. London. Reino Unido.

Meunchang S; Panichsakpatana S; Weaver RW. 2006. Tomato growth in soil amended with sugar mill by-products compost. *Plant Soil* 280(1-2):171-176.

Middelboe V; Johansen HS. 1990. Analysis of nitrogen, carbon and oxygen isotope ratios by optical emission spectrometry. In: *Soil Analysis. Modern Instrumental Techniques* (KA Smith, ed.) Marcel Dekker, Inc., New York, USA. pp: 433-464.

Millard P; Neilsen GH. 1989. The influence of nitrogen supply on the uptake and remobilization of stored N for the seasonal growth of apple trees. *Ann. Bot.* 63:301-309.

Millard P; Wendler R; Grassi G; Grellet GA; Tagliavini M. 2006. Translocation of nitrogen in the xylem of field grown cherry and poplar trees during remobilization. *Tree Physiol.* 26:527-536.

Morton JF. 1987. Loquat, pp 103-108. Morton JF (Ed). In: *Fruits of warm climates*. Creative Resource Systems, Winterville, FL.

Muller B; Touraine B. 1992. Inhibition of NO₃- uptake by various phloem-translocated amino acids in soybean seedlings. *J. Exp. Bot.* 43:616-623.

Neilsen D; Millard P; Herbert LC; Neilsen GH; Hogue EJ; Parchomchuk P; Zebarth BJ. 2001a. Nitrogen uptake, efficiency of use, and partitioning for growth in young apple trees. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126:144-50.

Neilsen D; Millard P; Herbert LC; Neilsen GH; Hogue EJ; Parchomchuk P; Zebarth BJ. 2001b. Remobilization and uptake of N by newly planted apple (*Malus domestica*) trees in response to irrigation method and timing of N application. *Tree Physiology*, 21:513-21.

Niederholzer FJA; Dejong TM; Saenz JL; Muraoka TT; Weinbaum SA. 2001. Effectiveness of fall versus spring soil fertilization of field-grown peach trees. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125:644-8.

OMS. 1995. Organización Mundial de la Salud. Informe sobre la salud en el mundo. Reducir desigualdades. Disponible en Internet: <http://www.who.int/whr/1995/es/index.html>.

Parsons LR. 1989. Management of micro-irrigation systems for Florida citrus. In *Fruit Crops Fact Sheet*. Univ. of Florida Coop. Ext. Serv. FC-81. Univ. of Florida, Gainesville.

Pestana M; Correia PJ; de Varennes A ; et al. 2001. The use of flora analysis to diagnose the nutritional status of orange trees. *J Plant Nutr* 24:1913-1923.

Powelson DS; Barraclough D. 1993. Mineralization and assimilation in soil-plant systems. p. 209-242. In R. Knowles and T.H. Blackburn (eds.). *Nitrogen isotopes techniques*. Academic Press, San Diego, California, USA.

Quinzà E; Rodríguez A; Bononad S; Escrivá A. 1972. El níspero en la comarca de Callosa de Ensarrià. Servicio de Extensión Agraria. Ministerio de Agricultura. Madrid. 64 pp.

Quiñones A; Legaz F. 2006. Criterios para la fertilización del níspero japonés. En: *El cultivo del níspero japonés*. Agustí Fonfría, M.; Reig, C; Undurraga, P. (eds). Gráfica Alcoy. España.

Quiñones A; Juan N; Bañuls J; Soler E; Ferrer P; Primo-Millo E; Legaz F. 2003. Seasonal changes of nutrient concentrations in loquat tree (*Eriobotrya japonica* Lindl.). *Options Mediterraneens*. 58:113-116.

Quiñones A; Juan N; Montaña C; Soler E; Primo-Millo E; Legaz F. 2004. Cambios en la concentración de macro y micronutrientes a lo largo del ciclo vegetativo en el níspero (*Eriobotrya japonica* Lindl.). *Fruticultura Profesional*, 145:50-56.

Quiñones A; Bañuls E; Primo-Millo E; Legaz, F. 2005. Recovery of the 15N-labelled fertiliser in citrus trees in relation with timing of application and irrigation system. *Plant Soil*. 268:367-376.

Ramos C; Agut A; Lidon A L. 2002. Nitrate leaching in important crops of the Valencian Community region (Spain). *Environ. Pollut.* 118(2):215-223.

Reig C; Agustí M. 2006. Morfología y anatomía, pp 27-48. Agustí M, Reig C y Undurraga P (Eds). En: *El cultivo del níspero japonés*. Univ. Católica de Valparaíso (Chile)-UPV (España).

Rodríguez A. 1983. *El cultivo del níspero y el Valle del Algar-Guadalest* Ed. Sociedad Cooperativa de Crédito de Callosa d'En Sarrià.

Ruchey. Cooperativa Agrícola de Callosa d'En Sarrià. Informe anual 2014.

Rufat J; Dejong TM. 2001. Estimating seasonal nitrogen dynamics in peach trees in response to

nitrogen availability. *Tree Physiology*, 21:1133-1140.

Salazar-García S; Lazcano-Ferrat I. 1999. Nutritional Diagnosis of avocado Hass. under rainfed conditions. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5:173-184.

Salazar-García S; Gutiérrez-Camacho G; Becerra-Bernal E; Gómez-Aguilaret JR. 1993. Nutritional diagnosis in San Blas Nayarit. Diagnóstico nutricional en San Blas Nayarit. *Revista Fitotecnía México* 16: 190-202.

Sanz M; Val J; Montañés-Millán L; Monge E; Montañés L. 1997. Optimum nutrient values for peach trees at different times of the growing season. *Acta Horticulturae (ISHS)* 448:193-198.

Shearer, G; Kohl DH. 1989. Estimates of N₂ fixation in ecosystems: the need for and the basis of the 15N natural abundance method. In RW Rundel, JR. Ehleringer, KA. Nagy, eds. *Stable isotopes in ecological research*. Ecological Studies 68, Springer-Verlag, Berlin, Germany pp 342-374.

Shearer G; Kohl DH; Chien SH. 1978. The nitrogen-15 abundance in a wide variety of soils. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 42:889-902.

Singh BR; Kanehiro Y. 1969. Adsorption of nitrate in amorphous and kaolinitic Hawaiian soils. (Ion exchange). *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 33(5):681-383.

Smajstrala AG; Harrison DS; Zazutta FS; Parsons LR; Stone KC. 1987. Trickle irrigation scheduling for Florida citrus. In: Bull. 208. Florida Coop. Ext. Serv., Institute of Food and Agriculture Sciences. University of Florida, Gainesville.

Smith PF. 1966. Leaf analysis of citrus. In: Childers NF (ed) *Temperate to tropical fruit nutrition*. Horticulture Publication, Rutgers University, New Brunswick, pp 208-228.

Stephenson RA; Cull BW. 1986. Standard leaf levels for bearing macadamia trees in Southeast Queensland. *Science Horticulturae* 30:73-82.

Syvtertsen JP; Smith ML. 1996. Nitrogen uptake efficiency and leaching losses from lysimeter-grown. Citrus trees fertilized at three nitrogen rates. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 121(1):57-62.

Tagliavini M; Millard P; Quartieri M; Marangoni B. 1999. Timing of N uptake affects storage and remobilisation of nitrogen in nectarine trees. *Plant Soil.* 211(2):149-153.

Tagliavini M; Toselli M; Bertschinger L; Neilsen D; Thalheimer M. 2002. Nitrogen pool enrichment in fruit trees for specific target requirement. *Proceedings of the internacional Symposium on foliar nutrition of perennial fruit plants*. *Acta horticulturae* 594:131-137.

Therios IN. 2009. In: *Olives. Crop Production Science in Horticulture*, series no. 18. Wallingford, UK: CABI Publishing, pp. 409 doi:10.1017/S0014479709990342.

Thomas W. 1945. Present status of diagnosis of mineral requirements of plants by means of leaf analysis. *Soil Sci* 59:353-374.

Tiessen H; Karamanos RE; Stewart JWB; Selles F. 1984. Natural nitrogen-15 abundance as an indicator of soil organic matter transformations in native and cultivated soils. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 48:312-315.

Tuset JJ; Rodríguez A; Bonoads S; García J; Monteagudo E. 1989. La mancha morada del níspero. *Fulletts Divulgació* nº 1. 22 pp. Conselleria d'Agricultura i Pesca. Generalitat Valenciana.

Vidal I; Roig A. 1988. Aspectos nutricionales del cultivo de *Eriobotryae japonica* L. (cv. ALGERI). Tesis doctoral. Universidad de Alicante. Facultad de Ciencias.

Voroney RP; Winter JP; Gregorich E G. 1991. Microbe/plant/soil interactions. p. 77-99. In D.C. Coleman and B. Fry (eds.). *Carbon isotopes techniques*. Academic Press, San Diego, California, USA.

Wallace T. 1943. *The diagnosis of mineral deficiencies in plants by visual symptoms*. Bristol:

Agricultural and Horticulture Research Station, Long Ashton.

Weinbaum SA; Brown PH; Rosecrance RC; Picchioni GA; Niederholzer FJA; Youseff F; Muraoka TT. 2001. Necessity for whole tree excavations in determining patterns and magnitude of macronutrient uptake by mature deciduous fruit trees *Acta Horticulturae*. Proceedings of the fourth international symposium on mineral nutrition of deciduous fruit crops 564:41-49.

Weinert TL; Thompson TL; White SA; Maurer MA. 2002. Nitrogen fertigation on young Navel oranges: growth, N status and uptake of fertilizer N. *HortScience*. 119:24-31.

WHO. 2004. World Health Organization. Guidelines for drinking water quality, 3rd ed. Vol. 1. Recommendations. Geneva. Disponible en Internet: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/GDWQ2004web.pdf. [Fecha de acceso 10 de julio de 2008].

Wild A. 1992. Elementos nutritivos en el suelo: Nitrógeno. En: *Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell*. Madrid. Mundi prensa, pp. 687-732.

Witty J; Ritz K. 1984. Slow-Release ¹⁵N fertilizer formulations to measure N₂-fixation by isotope dilution. *Soil Biol. Biochem.* 16: 657-661.

Xu C M; Liu D; Zhang Z; Shen Z J. 2007. Genetic relationship of loquat analyzed by ISSR. *Acta Horticulturae* 750:175-181

Youssefi F; Weinbaum SA; Brown PH. 2000. Regulation of nitrogen partitioning in field-grown almond trees: Effects of fruit load and foliar nitrogen applications. *Plant and Soil* 227: 273-281.

Zhao L; Jiang Y; Peng F; Li P; Wang L; Li H .2009. Characteristics of absorption, utilization and distribution of spring soil ¹⁵N-urea application for Gala (*Malus hupehensis*). *Plant Nutrition and Fertilizer Science* 15(6):1439-1443.

Zheng SQ. 2007. Achievement and prospect of loquat breeding in China. *Acta Horticulturae* 750: 85-91.

Tesis sometida a procesos de protección que impiden la publicidad del trabajo completo en abierto. Autorizado por la Comisión Académica del programa de doctorado y Comisión Permanente del Comité de Dirección de la Escuela de Doctorado de la Universidad Politécnica de Valencia.