



2022  
Lleida

27 · 1  
junio · juny  
juliol · juliol

Cataluña  
Catalunya

## 8º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

La **Ciencia forestal** y su contribución a  
los **Objetivos de Desarrollo Sostenible**

8CFE

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales

**Cataluña | Catalunya · 27 junio | juny - 1 julio | juliol 2022**

**ISBN 978-84-941695-6-4**

© Sociedad Española de Ciencias Forestales



Organiza

## Influencia de la cantidad de nitrógeno y la forma de aportarlo en el medio de cultivo para micropropagación de alcornoque

FERNÁNDEZ GARCÍA, M.L.<sup>1</sup>, QUEVEDO DÍAZ, A.<sup>1</sup>, ALESSO OVIEDO, P.<sup>1</sup>, GARCÍA MARTÍNEZ, J.J.<sup>1</sup>, FERNÁNDEZ MARTÍNEZ, M.<sup>1</sup> Y TAPIAS MARTÍN, R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciencias Agroforestales de la Universidad de Huelva.

### Resumen

*Quercus suber* es una especie ampliamente distribuida por la cuenca del Mediterráneo de gran importancia económica y social. Entre sus múltiples aprovechamientos destaca la producción de corcho y fruto para alimentación del ganado. En las últimas décadas esta especie ha sufrido un importante decaimiento en gran parte de su área de distribución provocada por un patógeno del suelo *Phytophthora cinnamomi*, agravado por otros factores como el cambio climático, insectos defoliadores y perforadores y malas prácticas de manejo.

Esta especie ha sido objeto de varias acciones de mejora encaminadas tanto a mejorar sus producciones como incrementar la resistencia al patógeno. En todas ellas, la propagación vegetativa mediante cultivo *in vitro* desempeña un papel destacado para la producción de genotipos con características sobresalientes. El objetivo principal este trabajo es la optimización del medio de cultivo para la micropropagación de *Q. suber* mediante proliferación de yemas auxiliares. En concreto, se aborda la optimización de la concentración de nitrógeno y las proporciones entre las dos fuentes de aporte.

El ensayo ha sido realizado con plantas de cuatro clones de alcornoques seleccionados por su resistencia a *P. cinnamomi*, que han sido multiplicados en nueve medios de cultivos diferentes como combinación de tres concentraciones de N y tres proporciones de  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ . El medio de cultivo básico, sobre el cual se modifican las proporciones de sus elementos es el de Murasigue y Skoog (MS). Se ha realizado un seguimiento durante todo el ensayo cuantificando el crecimiento y la tasa de multiplicación, además de otros parámetros cualitativos como el aspecto de las plantas o las manchas de taninos que producen. Los mayores crecimientos de biomasa se consiguieron con una concentración de nitrógeno 25 mM y una proporción de amonio sobre nitrógeno total del 33%.

### Palabras clave

*Quercus suber*, organogénesis, medio de cultivo, nitrógeno, amonio, nitrato.

### 1. Introducción

El alcornoque (*Quercus suber* L.) tiene un gran valor como integrante de los ecosistemas forestales mediterráneos, e interés industrial por las aplicaciones comerciales del corcho y la bellota (Turok et al, 1996). La Biotecnología ofrece nuevas técnicas que complementan a las metodologías tradicionales de la Mejora Genética Forestal (Toribio y Celestino, 2000), para el conocimiento, conservación y uso de los recursos genéticos forestales. Concretamente, la crioconservación y la regeneración de plantas se están utilizando para conservar y micropropagar material vegetal específico, por ejemplo, que pudiera estar en poblaciones amenazadas, a fin de llevar a cabo la conservación ex situ y permitir el desarrollo de la silvicultura clonal (Toribio y Celestino, 2000).

Los métodos de micropropagación *in vitro* de plantas permiten salvar los inconvenientes originados por las condiciones geográficas, climáticas y de tiempo de producción, ya que se realizan en condiciones ambientales muy controladas, lo que supone una gran ventaja respecto de los métodos de propagación tradicionales (Pierik, 1987). En contra, este tipo de cultivo presenta como

dificultades la necesidad de lograr unas condiciones de cultivo óptimas para poder realizar una producción a gran escala, la alteración de la estabilidad genética y funcional de sus células y la falta de adaptación de condiciones in vitro a ex vitro.

Concretamente, en la composición del medio de cultivo se puede distinguir los siguientes componentes necesarios para el crecimiento celular: micro y macro nutrientes, vitaminas, hidratos de carbono, aminoácidos y reguladores de crecimiento (Misawa, 1985; Stafford et al., 1986). El componente inorgánico más abundante de casi todos los medios es el nitrógeno inorgánico en forma de nitrato o amonio. Las sales que más se utilizan son el nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ), el nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) y nitrato de calcio  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Estos compuestos proporcionan a la planta nitrógeno inorgánico para sintetizar moléculas orgánicas complejas. El amonio se almacena principalmente en las raíces como nitrógeno orgánico. El nitrato es transportado a través del xilema a otras partes de la planta, donde participa en la asimilación de nitrógeno. El nitrato se puede almacenar en las vacuolas de las células y cumplen una función importante en la osmorregulación y equilibrio aniónico-catiónico de la planta (Duchefa, 2012).

El medio de cultivo más comúnmente usado en el cultivo de tejidos es el de Murashige y Skoog (1962), el cual presenta en su formulación la relación molar amonio:nitrato ( $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ ) 1:2. Otros autores han utilizado el medio GD (Gresshoff y Doy, 1972) y SH (Schenk y Hildebrandt, 1972) para el cultivo de alcornoques in vitro (Vidal et al, 2009, El Kbiach et al, 2017, Sánchez et al, 2018). El primero presenta proporciones similares a MS mientras que en el caso de SH, más utilizado en la embriogénesis, tiene una proporción amonio:nitrato 1:9. Por tanto, cuantificar el efecto del suministro de diferentes formas de nitrógeno, podría contribuir a mejorar el conocimiento de la asimilación de nitrato y amonio en diferentes niveles de suministro de nitrógeno inorgánico y contribuir a optimizar el suministro de nitrógeno en los medios de cultivo (Zhang et al, 2019).

## 2. Objetivos

El objetivo principal este trabajo es la optimización del medio de cultivo para la micropropagación de *Q. suber* mediante proliferación de yemas auxiliares. En concreto, se aborda la optimización de la concentración de nitrógeno y las proporciones entre las dos fuentes de aporte.

## 3. Metodología

Con el objetivo final de optimizar el medio de cultivo para la proliferación de yemas axilares de *Q. suber*, en estos ensayos se analiza la proporción de  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  sobre el crecimiento y tasa de multiplicación. El medio de cultivo de referencia fue el MS con una concentración de macronutrientes del 70% salvo para el nitrógeno. Con el que se han realizado tres ensayos con distintas concentraciones de nitrógeno (20, 25 y 30 mM), cada una de ellas con tres proporciones diferentes de amonio y nitrato, (Tabla 1). El medio se suplementó con 30 gramos de sacarosa por litro, 0,3 mg/l de 6-bencilaminopurina y 2 mg/l de ácido indol-3-butírico (AIB) y 6.5 g/l de agar. El pH se ajustó a 5,7.

Tabla 1. Tratamientos del ensayo combinado de concentración de nitrógeno (20, 25, 30 mM) y proporciones molares amonio sobre nitrógeno total ( $\text{NH}_4/\text{N}_{\text{total}}$ : 18, 25, 33, 40%).

N(mM)	20			25			30		
$\text{NH}_4/\text{N}_{\text{total}}$	Tratam.	N (Mm)	(%) $\text{NH}_4$	Tratam.	N (Mm)	(%) $\text{NH}_4$	Tratam.	N (Mm)	(%) $\text{NH}_4$
18				25.18	25	18	30.18	30	18
25	20.25	20	25	25.25	25	25	30.25	30	25
33	20.33	20	33	25.33	25	33	30.33	30	33
40	20.44	20	40						

Para evaluar el comportamiento de la planta en los distintos medios, se han usado cuatro clones de Alcornoques, (A, B, C, D) Seleccionados por su resistencia a *P. cinnamomi* (León et al 2017). La elección de estos clones se ha basado en que son unos clones totalmente implantados y adaptados en el cultivo in vitro y con un numero de planta abundantes y en buen estado.

El recipiente utilizado ha sido tarrinas de polipropileno de 450 ml de capacidad. De cada clon se han puesto en cultivo tres tarrinas de cada modificación expuesta anteriormente, en total nueve tarrinas y en cada tarrina se han introducido diez plantas.

El desarrollo del ensayo se ha basado en dos transferencias de las plantas (N =60 plantas por clon, 240 plantas totales), tomando datos para la evaluación en cada fase. En el momento inicial se introdujeron las diez plantas sin callos en cada tarrina del experimento correspondiente. En esta primera fase se tomó datos de peso fresco de la planta, mediante diferencia de peso antes y después de la transferencia.

A los 30 días aproximadamente, se realizó una primera transferencia de las plantas sin multiplicarlas y conservando el callo. Se tomaron datos por tarrinas de:

- Peso de la tarrina tras un periodo de cultivo
- Peso de las tarrinas nueva antes y después de la transferencia
- Número de brotes nuevos
- Manchas de taninos diferenciando tamaños (mayores o menores a 5 mm)
- Número de plantas con raíz
- Número de plantas con necrosis apical
- Número de plantas con color normal, claro o cloróticas
- Número de plantas aparentemente muertas

Tras otros 30 días aproximados, se tomaron las fotos y se realizó la multiplicación con lo que termina el ensayo. En este caso, además de los parámetros anteriores, se pesa por separado los brotes y el callo generado y se cuentan los explantes producidos. Una muestra de estos brotes se recolecta para la determinación del porcentaje de humedad y posteriores análisis.

Para el análisis de datos se empleó el modelo lineal generalizado de tres factores de las variables dependientes crecimiento en peso fresco, la tasa de multiplicación, la transpiración media de las tarrinas utilizando el peso a los 30 días de tratamiento, la pérdida de agua de las tarrinas. El modelo empleado fue  $Y = m + N + N(NH_4/N_{total}) + Clon + Clon*N + Clon*(NH_4/N) + error$ . Donde m es la media general del ensayo, N el efecto de la concentración de nitrógeno (20, 25 y 30 mM),  $N(NH_4/N_{total})$  el efecto de la proporción de amonio sobre nitrógeno total dentro de cada concentración de N, Clon es el efecto del clon y  $Clon*N$  y  $Clon*(NH_4/N)$  las interacciones.

#### 4. Resultados

En el análisis global del incremento de biomasa, resultó significativo el efecto de la concentración de N ( $p=0,02$ ), la proporción  $NH_4^+/N$  ( $p<0,001$ ), el clon ( $p<0,001$ ) y la interacción o clon x  $NH_4^+/N$  ( $p=0,009$ ). No fue la interacción clon x N ( $p=0,578$ ). Los mejores crecimientos se consiguieron con la concentración 25 mM de N (tabla 2) con  $2,91 \pm 0,20$  g seguido de la concentración 20mM que alcanza un 83% del crecimiento del mejor tratamiento. Las proporciones de amonio sobre nitrógeno total que mejor crecimiento han dado ha sido la del 33%, salvo en la dosis más baja de nitrógeno (20mM) que fue la del 25%.

Tabla 2. Valores medios de producción de biomasa (g/10 plantas) en el tratamiento combinado de N y proporción  $NH_4^+/N$  total. E.t.: error típico. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias ( $\alpha<0.05$ ).

N(mM)	20			25			30		
$NH_4^+/N_{total}$	Tratam.	Crec. (g/10 p)	e.t.	Tratam.	Crec. (g/10 p)	e.t.	Tratam.	Crec. (g/10 p)	e.t.
18				25.18	2.57 b	0.21	30.18	2.15 b	0.13
25	20.25	3.67 a	0.48	25.25	2.68 b	0.15	30.25	1.55 c	0.18

33	20.33	1.55 b	0.18	25.33	3.07 a	0.14	30.33	3.06 a	0.13
40	20.40	2.07 b	0.16						
media	Todos	2.43 ab	0.18	Todos	2.78 a	0.10	todos	2.25 b	0.11

En el análisis global de la tasa de multiplicación, el efecto de la concentración de nitrógeno no resultó significativo ( $p=0,104$ ). Si lo fue la proporción  $\text{NH}_4^+/\text{N}$  ( $p<0,001$ ), el clon ( $p<0,001$ ) y la interacción clon x N ( $p=0,035$ ) o clon x  $\text{NH}_4^+/\text{N}$  ( $p=0,005$ ). Las proporciones de amonio sobre nitrógeno total que mayores tasas de crecimiento han dado ha sido la del 33%, salvo en la dosis más baja de nitrógeno (20mM) que fue la del 25%. Llama la atención las bajas tasas de multiplicación de la concentración de nitrógeno 25 mM que tuvo los mejores crecimientos.

Tabla 3. Valores medios de tasa de multiplicación en el tratamiento combinado de N y proporción  $\text{NH}_4^+/\text{N}$  total. E.t.: error típico. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias ( $\alpha<0.05$ ).

N(mM)	20			25			30		
$\text{NH}_4^+/\text{N}$ total	Trata m.	Tasa Multi	e.t.	Trata m.	Tasa Multi	e.t.	Trata m.	Tasa Multi	e.t.
18				25.18	1.61 a	0.11	30.18	1.65 b	0.10
25	20.25	3.03 a	0.42	25.25	1.53 b	0.07	30.25	1.70 b	0.14
33	20.33	1.29 b	0.07	25.33	1.76 a	0.11	30.33	2.40 a	0.19
40	20.40	1.47 b	0.09						
Media	Todos	1.93	0,15	Todos	1.64	0,06	todos	1.92	0,07

El resto de variables medidas tuvo el mismo comportamiento que la variable crecimiento. En general las plantas con la concentración intermedia de nitrógeno y proporción amonio sobre nitrógeno total del 33% tuvieron mayor transpiración, mayor crecimiento del callo y mejor coloración de la planta y menor proporción de plantas necrosadas o muertas

En los resultados por clones de la producción de biomasa (tabla 4) destaca el clon D, que también presenta los mejores resultados en tasa de multiplicación (tabla 5). En el extremo opuesto se encuentra el clon C con el menor crecimiento. Este último clon fue el único en el que se observaron diferencias significativas de la concentración de nitrógeno. En el resto no lo fueron, pero la concentración de 25 mM de nitrógeno fue la mejor en todos menos el A.

Tabla 4. Valores medios de producción de biomasa (g) en el tratamiento combinado de N según clon. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias ( $\alpha<0.05$ ).

Clon	A		B		C		D	
Ntotal	Crec. (g/10 p)	e.t.	Crec. (g/10 p)	e.t.	Crec. (g/10 p)	e.t.	Crec. (g/10 p)	e.t.
20	2.50	1.68	2.30	0.29	1.73 ab	0.34	3.09	0.72
25	2.28	0.23	2.72	0.23	2.22 a	0.25	4.09	0.31
30	2.03	0.96	2.33	0.20	1.25 b	0.35	3.73	0.50
media	2.27 c	0.10	2.45 b	0.14	1.73 d	0.18	3.63 a	0.31

La tasa de multiplicación según el clon y la concentración de nitrógeno (tabla 5), tiene un comportamiento similar al crecimiento. Dos clones obtienen las mejores tasas con la concentración de 30mM (C y D) y otros dos con la de 20mM (A y B) lo que provoca que el efecto de la dosis no sea significativo para el conjunto.

Tabla 5. Valores medios de la tasa de multiplicación en el tratamiento combinado de N según clon. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias ( $\alpha<0.05$ ).

Clon	A		B		C		D	
Ntotal	Tasa	e.t.	Tasa	e.t.	Tasa	e.t.	Tasa	e.t.

	Multi		Multi		Multi		Multi	
20	1.80 a	0.14	2.07 a	0.16	1.53	0.25	2.27 ab	0.64
25	1.40 b	0.10	1.85 b	0.07	1.62	0.18	1.72 b	0.10
30	1.48 b	0.11	1.60 b	0.07	1.65	0.22	3.21 a	0.38
media	1.55 c	0.07	1.84 b	0.06	1.60 c	0.13	2.40 a	0.25

## 5. Discusión

Los resultados de crecimiento y multiplicación para las tres concentraciones de N (20mM, 25mM y 30mM de nitrógeno), muestran un efecto diferente sobre la tasa de multiplicación y la producción de biomasa. La concentración intermedia de nitrógeno resultó más favorable para la producción de biomasa en general y este patrón se observó en tres de los cuatro clones estudiados. Sin embargo, la tasa de multiplicación no tuvo un patrón tan claro y las concentraciones extremas fueron más favorables para la mitad de los clones haciendo que el efecto sobre los datos globales no sea estadísticamente significativo. Esto pone de manifiesto que el efecto del genotipo es importante como ha sido puesto de manifiesto en numerosos estudios.

No parece haber una relación directa entre la mayor tasa de crecimiento de algunos clones con la necesidad de una mayor concentración de nitrógeno. Por ejemplo, el clon D destaca por su crecimiento y multiplicación y tiene los valores más altos en la concentración de 25mM para el crecimiento y 30mM para la tasa de multiplicación. Lo mismo ocurre con el clon C que posee los valores más bajos de crecimiento. Los otros dos clones con crecimientos intermedios en general tienen mejores valores con concentraciones más bajas de nitrógeno.

En cuanto a la forma de suministrar el nitrógeno a los cultivos in vitro la proporción 1:2 (amonio : nitrato) que corresponde al 33% de amonio sobre N total es la que mejor rendimiento ha dado de manera general, exceptuando en la concentración más baja de nitrógeno que fue la proporción del 25%. Además, para el tratamiento con un 40% de amonio se observa un número significativo de vitroplantas con un aspecto más claro al color que normalmente presentan. Esto es posible achacarlo al aumento de crecimiento en biomasa en este tratamiento, por lo que el material más joven presenta normalmente un color verde más claro. En consecuencia, con esto, se intuye que entorno a un 33% de amonio se encontraría el valor más óptimo, al partir del cual comenzaría a empeorar el rendimiento en los cultivos, pero al igual que en la cantidad de nitrógeno es conveniente un ensayo de comprobación.

Con los resultados de este ensayo, queda respaldada la utilización de medios MS (Murashige y Skoog, 1962) y GD (Gresshoff y Doy, 1972) en el cultivo in vitro de alcornoque, los cuales han sido usados por distintos autores Vidal et al, 2009, El Kbiach et al, 2017, Sánchez et al, 2018). Ambos tipos de medio presentan una proporción similar de (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>:NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), entorno al 33%

## 6. Conclusiones

La concentración de nitrógeno y las proporciones de las dos fuentes inorgánicas empleadas en los medios de cultivo afectan al crecimiento y multiplicación de alcornoque en cultivo in vitro.

A partir del medio de cultivo MS, la concentración 25 mM de nitrógeno proporcionó los mejores crecimientos en biomasa. Para la tasa de multiplicación el efecto del genotipo fue más fuerte que la dosis y esta no fue significativa para los datos globales.

## 7. Agradecimientos

Este trabajo ha sido posible gracias al apoyo financiero y colaboración de la Junta de Andalucía (PE07-RNM-03108), la empresa Sánchez Romero Carvajal Jabugo SL y a el Programa Nacional de Mejora y Conservación de Recursos Genéticos de la encina y el alcornoque frente al síndrome de la seca, coordinado por la empresa TRAGSA.



## 8. Bibliografía

DUCHEFA CATALOGUE (2012). "Plant cell and Tissue culture Phytopathology Biochemical"

FERNANDEZ GUIJARRO, B.; CELESTINO, C.; TORIBIO, M., (1995). "Influence of external factors on secondary embryogenesis and germination in somatic embryos from leaves of *Quercus suber* L". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 41: 99-106.

GRESSOHOFF, P.M.; DOY, C.H. (1972). "Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (Tomato)". *Planta*, 107: 161-170

Hartmann, H.T.; Kester, T.T.; Davies, T.T. (1990). "Plant propagation". PrenticeHall, Englewood Cliffs, N.J.

MISAWA, M. (1985). "Production of useful plant metabolites". En: *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* Fiechter, A. (Eds). Berlin, Springer-Verlag, p 59-88

MOHAMMED L'BACHIR EL KBIACH, BRAHIM EL BOUZDOUDI, RABAH SAÏDI, ZINEB NEJJAR EL ANSARI, SAFAA RAHMOUNI, AHMED LAMARTI (2017) "Callogenesis of Cork Oak (*Quercus suber* L.) through In Vitro Culture of Nodes and Internodes". *American Journal of Plant Sciences* Vol.8 No.8

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962). "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures". *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497

Murashige, T. (1974). "Plant propagation through tissue cultures". *Ann. Rev. Plant Physiology*, 25: 135-166

PARK, Y.S.; BARRET, J.D.; BONGA, J.M., (1998). "Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry: deployment, genetic control and stability of cryopreserved clones". *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 34: 231-239.

Pierik, R.L.M. (1987). "In vitro culture of higher plants". Martinus Nijhoff (Eds), Dordrecht, pp 183-230.

SÁNCHEZ C., COVELO P., ALDREY A., VIELBA J., RICO S., VIDAL N. (2018) "Conservación de germoplasma de árboles singulares de Galicia por cultivo in vitro". *Cuad. Soc. Esp. Cienc. For.* 44(1): 39-50.

SCHENK, R.V.; HILDEBRANDT, A.C. (1972) "Medium and Techniques for Induction and Growth of Monocotyledonous and Dicotyledonous Plant Cell Cultures". *Canadian Journal of Botany*, 50, 199-204.

TORIBIO, M.; CELESTINO, C. (2000). "El uso de la Biotecnología en la conservación de recursos genéticos forestales". *Invest. Agrar.: Sistema de Recursos Forestales*, Fuera de serie no2: 249-260.

TUOK J.; ERIKSON G.; KLEINSCHMIT J; CANGER S. (1996) "Noble Hardwoods Network Report of the first meeting"

VIDAL, N., BALLESTER, A., FERNÁNDEZ, M. R., CUENCA, B.; OCAÑA, L. (2009) "Crioconservación de genotipos adultos de castaño y alcornoque seleccionados en campo" 5º Congreso Forestal Español.

ZHANG, K.; WU, Y.; HANG, H. (2019). "Differential contributions of  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  to nitrogen use in response to a variable inorganic nitrogen supply in plantlets of two Brassicaceae species in vitro". Plant Methods 15, 86.