

# INFLUENCIA DEL NITROGENO SOBRE EL DESARROLLO IN VITRO DEL PORTAINJERTO DE VID 161-49

A. Villegas\*, C. Mazuelos, M. Cantos y A. Troncoso

*Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS) CSIC.  
Apartado 1052. - Sevilla.*

*\* Colegio de Postgraduados, Mex-56230 Chapingo, México.  
(Durante la realización del trabajo Becario del CSIC en el IRNAS).*

## RESUMEN

Se estudió el desarrollo, crecimiento, grado de hidratación, calidad y composición mineral de explantos del portainjerto de vid 161-49, cultivado in vitro sobre un medio base con 10.4 mM de  $\text{NO}_3^-$ , y adiciones respectivas de 5, 10, 15, 20 y 25 mM de diferentes sales de N.

La baja disponibilidad de N (medio base y las adiciones de  $\text{NaNO}_3$ ) indujeron baja formación y crecimiento de brotes (mayor desarrollo relativo del callo) y baja acumulación de N en los tejidos.

Las adiciones de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  entre 10 y 20 mM aumentaron el número, crecimiento, calidad y contenidos de N y de Fe de los brotes. Ulteriores aumentos de N en el medio provocaron contenidos muy elevados de este elemento en los tejidos y la aparición de brotes de baja calidad (hojas grandes y anormales, tejidos de color oscuro y frágiles, y brotes anormalmente ramificados). La adición de 10 mM de N como  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  produjo efectos parecidos aunque menores a los indicados para el  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  hasta 20 mM. Aumentos de la concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  condujeron progresivamente a aumentar la baja calidad de los brotes. El contenido de K de los explantos fue afectado negativamente por el aumento de N- $\text{NH}_4$  en el substrato y por el incremento de N en los tejidos.

Adiciones de  $\text{KNO}_3$  o de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  sobre el medio base enriquecido con 10 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , aumentaron la calidad de los brotes y la primera sal incrementó además el nivel de K.

Todos los tratamientos aumentaron el grado de hidratación de los tejidos, con mayor efecto por parte del N- $\text{NH}_4$  sobre el N- $\text{NO}_3$ , aunque no se encontró relación entre la hidratación y la calidad del brote.

Palabras clave: Vid. Cultivo in vitro. Nutrición nitrogenada.

## SUMMARY

### INFLUENCE OF NITROGEN ON THE IN VITRO DEVELOPMENT OF GRAPE-VINE ROOTSTOCK 161-49

The development, growth, hydration, quality and mineral composition of grape-vine explants (161-49 rootstock) cultured in vitro on a basal medium with 10.4 mM of  $\text{NO}_3^-$ , and respective additions of 5, 10, 15, 20 and 25 mM of different N-salts, were studied.

Low N-availability (basal medium and  $\text{NaNO}_3$  additions) induced low shoot forma-

tion and growth (more relative growth of callus) and low N-accumulation in explant tissues.

The addition of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  up to 10-20 mM increased the number, growth, quality, and N and Fe levels of shoots. Further increase of N in the medium induced very high contents of N and led to bad shoot quality (large and abnormally shaped leaves, dark colour, fragile tissues and abnormally ramified shoots). Addition of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  up to 10 mM produced effects which were similar to, but lower than those of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  up to 10-20 mM. Further increases of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  led to progressively lower quality shoots. The K content of explants was negatively affected by both  $\text{NH}_4$ -salts in the substrate and by the N level in tissues.

Additions of  $\text{KNO}_3$  or  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  on basal medium improved with 10 mM of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , increased the shoot quality and the former salt also increased the K-content.

All treatments increased the water content in tissues (hydration) with a larger effect of N- $\text{NH}_4$  compared to N- $\text{NO}_3$ , but it was not possible to relate hydration and shoot quality.

Key words: Grape-vine. In vitro culture. Nitrogen nutrition.

## INTRODUCCION

Es bien conocido que las plantas superiores toman el nitrógeno fundamentalmente bajo las formas de iones  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$  y que según dispongan del anión o del catión se producen respuestas diferentes. Este fenómeno no es muy acusado en los cultivos tradicionales en campo, ya que el proceso de nitrificación suele ser muy rápido y la planta dispone fundamentalmente de N- $\text{NO}_3$  (Troncoso *et al.*, 1987). Por el contrario, es bastante acusado en los cultivos de tipo hidropónico y muy especialmente en el cultivo in vitro. Así, los efectos del nitrato y del amonio en cultivos in vitro han sido evaluados por numerosos investigadores, entre ellos Pierik *et al.* (1979), Anderson (1984), Driver y Kuniyuki (1984), Hutchinson (1984), Evers (1985), Loreti *et*

*al.* (1988) y Vieitez *et al.* (1989). Probablemente debido a la utilización de especies distintas, no se llega a conclusiones homogéneas al comparar los resultados de los autores indicados.

En trabajos previos Troncoso *et al.* (1988, 1990) estudiaron la influencia de distintas concentraciones de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  sobre el desarrollo in vitro de diferentes portainjertos de vid, indicando que el aumento de N en el medio afectó al crecimiento, calidad y composición mineral del explanto. Al objeto de conocer la influencia específica de cada ión sobre un único portainjerto (para evitar diferencias debidas a la variedad) se estudian en este trabajo concentraciones distintas de N- $\text{NO}_3$ , N- $\text{NH}_4$  y combinaciones de ambos.

## MATERIAL Y METODOS

Se cultivaron in vitro explantos homogéneos de 10 mm de longitud

del portainjerto de vid 161-49, a temperatura de 25 °C, 31.2  $\mu\text{Em}^{-2}$

seg<sup>-1</sup> de intensidad luminosa y 16 horas de fotoperíodo. Aunque los explantos utilizados provenían de un primer subcultivo in vitro, los originales se tomaron de clones selectos del portainjerto existentes en el IRNAS, por lo que fueron previamente esterilizados mediante inmersión en etanol 70% (1 min) e hipoclorito sódico al 30% (v/v con 6% de cloro) (10 min), después se enjuagaron 4 veces con agua destilada esterilizada.

Se sometieron a los siguientes tratamientos:

#### Experimento 1 (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>):

- Control con substrato basal (Tabla 1).
- Cinco concentraciones de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> adicionando al control respectivamente 5, 10, 15, 20 y 25 mM de N de la sal.

#### Experimento 2 ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>):

- Control con substrato basal (Tabla 1).
- Cinco concentraciones de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> adicionando al control respectivamente 5, 10, 15, 20 y 25 mM de N de la sal.

#### Experimento 3 (NaNO<sub>3</sub>):

- Control con substrato basal (Tabla 1).
- Cinco concentraciones de NaNO<sub>3</sub> adicionando al control respectivamente 5, 10, 15, 20 y 25 mM de N de la sal.

#### Experimento 4 (KNO<sub>3</sub>):

- Control con substrato basal (Tabla 1) más 10 mM de N como NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>.
- Cinco concentraciones de KNO<sub>3</sub> adicionando a este control respectivamente 5, 10, 15, 20 y 25 mM de N de la sal.

#### Experimento 5

- Control con substrato basal (Tabla 1) más 10 mM de N como NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>.
- Cinco concentraciones de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> adicionando a este control respectivamente 5, 10, 15, 20 y 25 mM de N de la sal.

Se utilizaron 24 explantos (8 × 3 repeticiones) por cada tratamiento.

Después de 30 días de cultivo se determinó el peso fresco y seco, el grado de hidratación (peso fresco menos peso seco/peso fresco × 100)

TABLA 1

*Composición del medio nutritivo basal (Troncoso et al., 1990).*

| Compuesto químico                                     | mM   | Compuesto químico                                    | μM    | Compuesto químico | μM                   |
|---|------|--|-------|-------------------|----------------------|
| KNO <sub>3</sub>                                      | 7.91 | MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O                | 5.0   | M-inositol        | 27.75                |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O | 1.27 | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 100.0 | Tiamina           | 2.96                 |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 1.25 | ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                | 30.0  | 6-BAP             | 4.43                 |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                 | 1.50 | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O | 1.0   | IBA               | 0.48                 |
| FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                 | 0.09 | CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O                | 0.1   | Sacarosa          | 30 g L <sup>-1</sup> |
| Na <sub>2</sub> EDTA                                  | 0.10 | CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O                | 0.1   | Agar              | 6 g L <sup>-1</sup>  |

y la composición mineral de los tejidos del explanto (Pinta *et al.*, 1969; 1973), así como el número y tamaño (mayores y menores de 10 mm) de

los brotes. Para definir la calidad de los brotes se consideró el tamaño y forma de las hojas y el color y fragilidad de los tejidos.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### *Influencia de los tratamientos sobre la producción de biomasa*

En la figura 1A, se observa que el aumento creciente de la concentración de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  en el medio, produjo sólo un pequeño incremento del peso de la biomasa total (callo + brotes) ( $R = 0.988$ ) que se debió a la evolución opuesta del peso fresco de los brotes y del callo. Existió una relación directa ( $R = 0.992$ ) entre la cantidad de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y el peso de los brotes, e inversa con el peso del callo ( $R = -0.958$ ).

Con los tratamientos de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Fig. 1B), la evolución del peso total, el de los brotes y el del callo fue muy parecida a la indicada para los tratamientos anteriores, salvo un descenso de producción para las concentraciones más elevadas de la sal, que se atribuyó a un efecto tóxico del exceso de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Las aplicaciones de N como  $\text{NaNO}_3$  (Fig. 1C) mostraron una influencia muy moderada del N- $\text{NO}_3$  sobre la producción de biomasa, y en especial un desarrollo muy pequeño de los brotes, superados siempre por el peso del callo respectivo.

Los tratamientos con  $\text{KNO}_3$  (Fig. 1D) y con  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (Fig. 1E) confirmaron el pequeño efecto de las incorporaciones de N- $\text{NO}_3$ , sin que se pudiese observar una influencia clara de las disponibilidades crecientes de K o de Ca. Con estos tratamientos, a

diferencia de lo indicado para los de  $\text{NaNO}_3$ , existió equivalencia entre el peso de los brotes y del callo, es decir, mejoró el peso de los primeros, lo que se asoció a la presencia de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (10 mM de N) en el medio base.

### *Influencia de los tratamientos sobre el grado de hidratación de los tejidos del brote*

Como se indica en la figura 2, en todas las pruebas se produjo un incremento del grado de hidratación de los tejidos del brote al aumentar la disponibilidad de N, aunque con distinta intensidad según la sal usada. Los menores niveles se obtuvieron con las adiciones de  $\text{NaNO}_3$  (ausencia de N- $\text{NH}_4$ ) ( $R = 0.939$ ), seguidos por los tratamientos con una base de 10 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y aplicaciones crecientes de  $\text{KNO}_3$  ( $R = 0.839$ ) y  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  ( $R = 0.957$ ) y aumentó ligeramente la hidratación al emplear  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $R = 0.911$ ). Los niveles más elevados de agua en tejidos se alcanzaron con los tratamientos con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  sin que se pudiese relacionar la mayor hidratación con una peor calidad del brote.

### *Influencia de los tratamientos sobre el número y calidad de los brotes*

Como se indica en la figura 3, el tipo de sal y la concentración de N

FIGURA 1

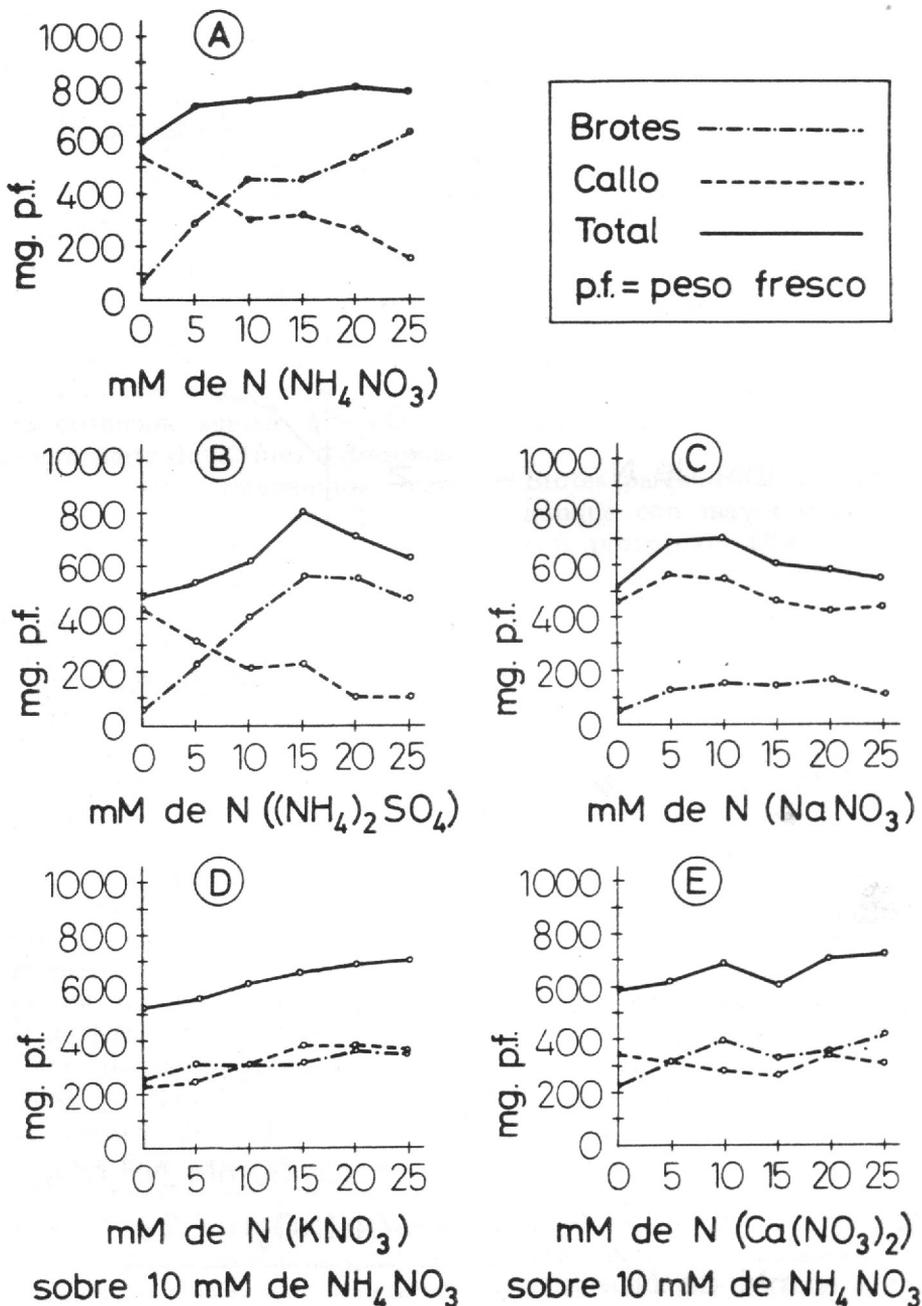


FIGURA 2

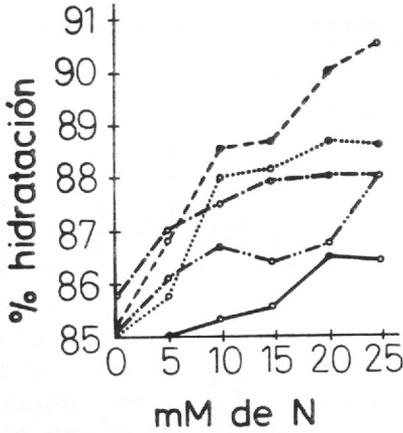


FIGURA 3

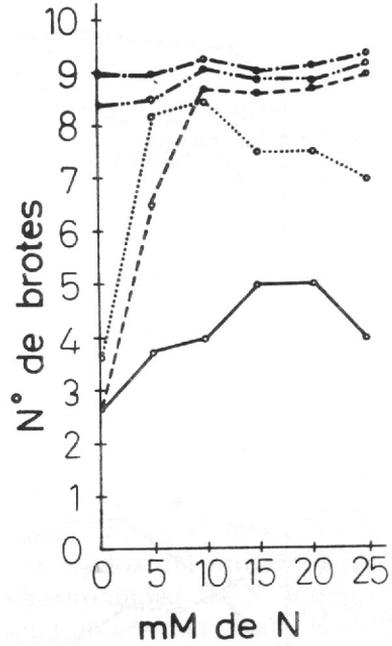
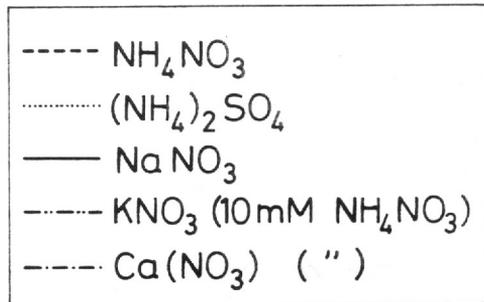
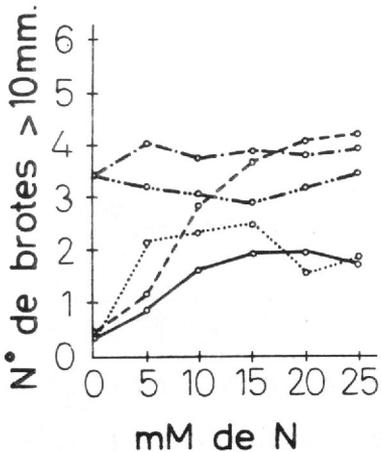


FIGURA 4



tuvieron una gran influencia sobre el número de brotes formados. El menor número de brotes se obtuvo con la aplicación de  $\text{NaNO}_3$ , que no obstante mostró una incidencia positiva desde el control (medio base) hasta la adición de 15 mM de N, para descender al utilizar la concentración más alta de la sal. Esto último se relacionó con una incidencia negativa del exceso de Na.

Las adiciones al medio base de hasta 10 mM de N como  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , provocaron un aumento muy significativo del número de brotes, mientras que concentraciones más altas no modificaron el nivel alcanzado. Una evolución similar presentó la primera parte de la línea representativa de los tratamientos con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , mientras que las concentraciones superiores a 10 mM de N originaron un descenso progresivo del número de brotes, indicando un efecto negativo del exceso de esta sal.

Los tratamientos con  $\text{KNO}_3$  y  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  sobre 10 mM de N como  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , dieron resultados muy similares entre sí, sin variaciones significativas entre el control y las distintas adiciones respectivas, y con un nivel medio semejante al obtenido con el tratamiento  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  a partir de 10 mM de N. Esto indicó por una parte un efecto prácticamente nulo de las adiciones suplementarias de  $\text{NO}_3$ , K y Ca y una confirmación de la acción positiva del  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  a 10 mM de N.

El control de la calidad de los brotes se determinó en función del número de ellos con longitud superior a 10 mm (a los 30 días desde la implantación) y con la aparición de síntomas visibles que denotaban una situación de estrés. De acuerdo

con los resultados de la figura 4 los diferentes tratamientos ofrecieron respuestas coincidentes con las indicadas antes para el número total de brotes, es decir incrementos provocados por las aplicaciones de N- $\text{NH}_4$  pero con efectos negativos por el exceso de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , y poca influencia de la disponibilidad de N- $\text{NO}_3$ . En cuanto a los síntomas visuales se pudieron definir los siguientes grupos de brotes:

- Muy débiles, con pequeño crecimiento y cloróticos. Se observaron en los cultivos con el medio base (Tabla 1) y con las aplicaciones de  $\text{NaNO}_3$  a concentraciones bajas.
- Brotes parecidos a los anteriores, aunque con mayor desarrollo, y con proporción alta de necrosis apical. Se produjeron al aplicar las concentraciones más elevadas de  $\text{NaNO}_3$ .
- Brotes de color verde muy oscuro, con hojas grandes, gruesas, deformes y quebradizas. Tallos también quebradizos con ramificaciones dicotomas y brotaciones múltiples. Aparecieron con la concentración de 25 mM de N del tratamiento  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y especialmente, y de forma progresiva, con las adiciones superiores a 10 mM de N de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Estos síntomas coincidieron con los descritos como vitrificación por Debergh, 1983 y Ballester *et al.*, 1990.
- Brotes con buen crecimiento, color verde esmeralda, y hojas y ramificaciones normales. Se obtuvieron con los tratamientos de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  entre 10 y 20 mM de N y más con las aplicaciones de  $\text{KNO}_3$

y  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  sobre medio base con 10 mM como  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

### *Influencia de los tratamientos de N sobre la composición mineral de los tejidos del explanto*

Las diferentes sales de N utilizadas y sus concentraciones respectivas, tuvieron una gran influencia sobre la composición mineral del explanto (Tabla 2). En conjunto, se pudieron destacar dos efectos principales:

- Existencia de una relación directa entre el ión añadido al medio y su nivel en el tejido. Así, para el caso del N, los coeficientes de correlación fueron:  $R = 0.988$  para  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ;  $R = 0.954$  para  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ;  $R = 0.911$  para  $\text{NaNO}_3$ ;  $R = 0.977$  para  $\text{KNO}_3$  sobre 10 mM de N como  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $R = 0.970$  para  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  sobre 10 mM de N como  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . El tratamiento  $\text{NaNO}_3$  originó también una relación directa con el Na en el tejido con  $R = 0.976$ , y las aplicaciones de  $\text{KNO}_3$  y  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  provocaron aumentos progresivos respectivamente de K ( $R = 0.933$ ) y Ca ( $R = 0.939$ ).
- Influencia del ión añadido al medio y como consecuencia incrementado en los tejidos, sobre el contenido de otros iones. En este senti-

do se pudo destacar la acción inversa del N- $\text{NH}_4$  sobre el nivel de K ( $R = -0.941$  para  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $R = -0.873$  para  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y en menor grado sobre el de Mg ( $R = -0.942$  y  $R = -0.866$  respectivamente) y el efecto positivo de aquel ión sobre la acumulación de Fe ( $R = 0.946$  y  $R = 0.990$ ). Se observó, además, un contenido medio muy elevado de K en todas las aplicaciones de  $\text{NaNO}_3$  al que no se le encontró explicación.

Aunque como se ha indicado todos los tratamientos de N incrementaron el nivel de este elemento en el explanto, estos aumentos no fueron iguales con todas las sales usadas. El mayor incremento se produjo con las adiciones combinadas de las dos formas de N ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) lo que concordó con lo indicado por Hagin *et al.* (1990), seguido por el provocado por el N- $\text{NH}_4$  solo, mientras que las acumulaciones más pequeñas se debieron a los tratamientos con N- $\text{NO}_3$ . La baja acción del nitrógeno nítrico, que reflejó lo indicado antes para la producción de brotes, se relacionó con la asimilación de esta forma de nitrógeno, muy controlada por su proceso de reducción necesario para entrar en la ruta metabólica (Stewart y Rhodes, 1977).

## CONCLUSIONES

El cultivo in vitro de explantos del portainjerto de vid 161-49 sobre un medio base con baja disponibilidad de N (sin N- $\text{NH}_4$ ) y con 10.4 mM de N- $\text{NH}_3$ ) determinó una baja producción de biomasa, escasa formación,

crecimiento y calidad de brotes y un nivel bajo de N en los tejidos.

Adiciones a este medio de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  a concentraciones entre 10 y 20 mM de N mejoraron significativamente el número, crecimiento y calidad de los

TABLA 2

*Influencia de los tratamientos de N sobre la composición mineral del explanto.*

| Tratamiento<br>y 10 mM de<br>N añadido do                                       | Elemento, % m. s. |     |      |     |     |      | Elemento, mg kg <sup>-1</sup> |     |    |    |     |
|---|-------------------|-----|------|-----|-----|------|-------------------------------|-----|----|----|-----|
|   | N                 | P   | K    | Ca  | Mg  | Na   | Fe                            | Mn  | Cu | Zn |     |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>   | 0                 | 1.5 | 0.22 | 2.7 | 0.6 | 0.29 | 0.15                          | 189 | 22 | 14 | 132 |
|   | 5                 | 2.9 | 0.39 | 3.0 | 0.5 | 0.28 | 0.12                          | 271 | 16 | 25 | 143 |
|   | 10                | 3.8 | 0.43 | 2.5 | 0.5 | 0.24 | 0.15                          | 375 | 20 | 27 | 159 |
|   | 15                | 4.6 | 0.43 | 2.1 | 0.6 | 0.19 | 0.14                          | 414 | 20 | 37 | 147 |
|   | 20                | 5.1 | 0.41 | 1.6 | 0.4 | 0.18 | 0.13                          | 399 | 18 | 34 | 129 |
|   | 25                | 6.0 | 0.41 | 1.4 | 0.4 | 0.14 | 0.10                          | 478 | 21 | 27 | 127 |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                                 | 0                 | 1.5 | 0.22 | 2.7 | 0.6 | 0.29 | 0.15                          | 189 | 22 | 14 | 138 |
|   | 5                 | 2.9 | 0.33 | 3.3 | 0.4 | 0.19 | 0.19                          | 241 | 16 | 17 | 141 |
|   | 10                | 2.9 | 0.36 | 2.2 | 0.3 | 0.16 | 0.20                          | 365 | 17 | 20 | 155 |
|   | 15                | 3.8 | 0.39 | 1.6 | 0.3 | 0.12 | 0.21                          | 478 | 14 | 29 | 163 |
|   | 20                | 4.1 | 0.41 | 1.6 | 0.3 | 0.12 | 0.12                          | 553 | 14 | 25 | 178 |
|   | 25                | 4.4 | 0.41 | 1.4 | 0.3 | 0.12 | 0.15                          | 661 | 16 | 22 | 168 |
| NaNO <sub>3</sub>   | 0                 | 1.5 | 0.22 | 2.7 | 0.6 | 0.29 | 0.15                          | 189 | 22 | 14 | 138 |
|   | 5                 | 2.4 | 0.39 | 4.7 | 0.6 | 0.47 | 0.54                          | 146 | 20 | 15 | 121 |
|   | 10                | 2.6 | 0.38 | 4.8 | 0.8 | 0.53 | 0.85                          | 157 | 21 | 18 | 156 |
|   | 15                | 2.9 | 0.32 | 4.1 | 0.7 | 0.44 | 1.19                          | 126 | 17 | 17 | 104 |
|   | 20                | 3.0 | 0.30 | 4.1 | 0.7 | 0.47 | 1.32                          | 158 | 21 | 17 | 101 |
|   | 25                | 3.1 | 0.33 | 4.3 | 0.7 | 0.49 | 1.43                          | 156 | 21 | 19 | 100 |
| KNO <sub>3</sub><br>(10 mM NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )                    | 0                 | 3.0 | 0.30 | 1.9 | 0.4 | 0.21 | 0.18                          | 286 | 12 | 15 | 158 |
|   | 5                 | 3.2 | 0.31 | 2.3 | 0.4 | 0.20 | 0.21                          | 267 | 14 | 16 | 143 |
|   | 10                | 3.2 | 0.28 | 2.5 | 0.4 | 0.20 | 0.20                          | 233 | 14 | 12 | 119 |
|   | 15                | 3.5 | 0.28 | 3.1 | 0.4 | 0.21 | 0.20                          | 228 | 14 | 13 | 130 |
|   | 20                | 3.6 | 0.25 | 3.4 | 0.4 | 0.20 | 0.20                          | 218 | 14 | 11 | 116 |
|   | 25                | 3.7 | 0.25 | 3.9 | 0.4 | 0.20 | 0.21                          | 205 | 14 | 15 | 104 |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub><br>(10 mM N NH <sub>2</sub> NO <sub>3</sub> ) | 0                 | 3.5 | 0.31 | 1.9 | 0.4 | 0.19 | 0.19                          | 277 | 17 | 20 | 175 |
|   | 5                 | 3.6 | 0.31 | 2.3 | 0.4 | 0.19 | 0.15                          | 269 | 13 | 13 | 180 |
|   | 10                | 3.6 | 0.31 | 2.5 | 0.5 | 0.22 | 0.18                          | 297 | 14 | 12 | 189 |
|   | 15                | 3.7 | 0.30 | 2.4 | 0.6 | 0.20 | 0.15                          | 284 | 14 | 12 | 158 |
|   | 20                | 3.8 | 0.29 | 2.3 | 0.8 | 0.25 | 0.16                          | 241 | 14 | 11 | 143 |
|   | 25                | 3.8 | 0.26 | 2.3 | 1.1 | 0.24 | 0.16                          | 287 | 12 | 12 | 133 |

brotos, así como los contenidos de N y de Fe en los tejidos, aunque disminuyeron progresivamente los niveles de K. Concentraciones más altas de N en el medio, aunque no modifica-

ron el número y longitud de los brotos comenzaron a deteriorar la calidad de los mismos (color muy oscuro, hojas malformadas y frágiles, ramificaciones anormales, etc.).

La adición al medio base de 10 mM de N como  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  tuvo un efecto semejante, aunque menos intenso, que el indicado para el  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  hasta 20 mM de N. Concentraciones más altas disminuyeron progresivamente el número, crecimiento y calidad de los brotes.

La aplicación al medio base de concentraciones crecientes de N (5 a 25 mM) como  $\text{NaNO}_3$  se mostró poco efectiva (escaso aumento en el número y crecimiento de brotes y baja acumulación de N en tejidos) accionando principalmente sobre un mayor desarrollo relativo del callo y en una fuerte acumulación de Na en los tejidos.

Adiciones al medio base con 10 mM de N como  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (que se había demostrado como dotación

suficiente de  $\text{N-NH}_4$ ) de concentraciones crecientes de  $\text{KNO}_3$  o de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , aumentaron respectivamente los contenidos de K (evitando el efecto antagónico del  $\text{N-NH}_4$  sobre este elemento) y de Ca. Aunque estos tratamientos adicionales no mostraron una influencia significativa sobre el número de brotes formados sí ayudaron a mejorar la calidad de los mismos.

Todos los tratamientos incrementaron el grado de hidratación de los tejidos: Con mayor intensidad el de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , seguido por el de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y con el menor nivel el de  $\text{NaNO}_3$ . No se encontró una relación clara entre el grado de hidratación de los tejidos y la calidad del brote.

## BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON, W. C., 1984. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 109: 343-347.
- BALLESTER, A., SAN-JOSE, M. C. and VIEITEZ, A. M., 1990. Vitrification and BA-induced anomalies in vitro chestnut cultures. *Suelo y Planta*, 1: 69-80.
- DEBERGH, P. C., 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiol. Plant*, 59: 270-276.
- DRIVER, J. A. and KUNIYUKI, A. H., 1984. In vitro propagation of paradox walnut rootstock. *Hort. Sci.*, 19: 507-509.
- EVERS, P. W., 1985. Growth and morphogenesis of shoot initials of Douglas fir, *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) franco, in vitro. *Neth. J. Agr. Sci.*, 33: 179-181.
- HAGIN, J., OLSEN, S. R. and SHAVIV, A., 1990. Review of interaction of ammonium-nitrate and potassium nutrition of crops. *J. Plant Nutr.*, 13: 1211-1226.
- HUTCHINSON, J. F., 1984. In vitro propagation of *Dionaea muscipula ellis* (venus fly trap). *Sci. Hort.*, 22: 189-194.
- LORETI, F., MORINI, S. and CONCETTI, S., 1988. Effect of potassium and nitrogen concentration on growth of peach shoots culture in vitro. *Acta Hort.*, 227: 311-317.
- PIERIK, R. L. M., VAN LEEUWEN, P. and RIGTER, G. C. C. M., 1988. Regeneration of leaf explants of *Anthunum andraeanum* Lind. in vitro. *Neth. J. Agric. Sci.*, 27: 221-226.

- PINTA, M. ET MEMBRES DU COMITE INTER-INSTITUTS D'ETUDE DES TECHNIQUES ANALYTIQUES DU DIAGNOSTIC FOLIARE., 1969. Méthodes de référence pour la détermination des éléments minéraux dans les végétaux: N, P, K, Ca, Mg. Oléagineux, 24: 497-504.
- PINTA, M. ET MEMBRES DU COMITE INTER-INSTITUTS D'ETUDE DES TECHNIQUES ANALYTIQUES DU DIAGNOSTIC FOLIARE., 1973. Méthodes de référence pour la détermination des éléments minéraux dans les végétaux. Détermination des éléments Ca, Mg, Fe, Mn, Zn et Cu par absorption atomique. Oléagineux, 28: 87-92.
- STEWART, G. R. and RHODES, D., 1977. Control of enzyme levels in the regulation of nitrogen assimilation. In Regulation of Enzyme Synthesis and Activity in Higher Plants. Ed. H. Smith 1-22. Academic Press Inc., London.
- TRONCOSO, A., BARROSO, M., MARTIN-ARANDA, J., MURILLO, J. M. and MORENO, F., 1987. Effect of the fertilization level on the availability and loss of nutrients in an olive-orchard soil. J. Plant. Nutr., 10: 9-16.
- TRONCOSO, A., VILLEGAS, A., MAZUELOS, C. e CANTOS, M., 1988. Influenza del livello di azoto ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) del mezzo sullo sviluppo e composizione minerale di meristemi di vite "in vitro". III Convegno sui portainnesti della vite. Potenza (Italia). NOTAE Accademia Italiana della Vite e del Vino 5, 144.
- TRONCOSO, A., VILLEGAS, A., MAZUELOS, C. and CANTOS, M., 1990. Growth and mineral composition of grape-vine rootstock cultured in vitro with different levels of ammonium nitrate. M. L. van Beusichem (Ed.) Plant nutrition-physiology and applications, 653-654. Kluwer Academic Publishers. Holanda.
- VIEITEZ, A. M., BARCIELA, J. and BALLESTER, A., 1989. Propagation of *Camellia japonica* cv. *Alba plena* by tissue culture. J. Hort. Sci., 64: 177-182.

Recibido: 2-3-92.

Aceptado: 12-6-92.