El papel del nitrógeno orgánico en el desarrollo de mecanismos de resistencia a estrés en especies del género *Pinus*: resultados preliminares

**The role of organic nitrogen in promoting mechanisms
of stress resistance in *Pinus* species: preliminary results**

Sigala, J.A.^{1,2*}; Uscola, M.³; Oliet, J.A.¹

¹*Grupo de Ecología y Gestión Forestal Sostenible (ECOGESFOR). ETS Ingenieros de Montes Forestal y del Medio Natural. Universidad Politécnica de Madrid. 28040 Madrid.*

²*Campo Experimental Valle del Guadiana. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). 34170 Durango, México.*

³*Forest Ecology and Restoration Group. Departamento de Ciencias de la Vida. Universidad de Alcalá. 28805 Alcalá de Henares, Madrid*

Autor para correspondencia: ja.sigala@alumnos.upm.es

Resumen

Las plantas pueden usar múltiples fuentes de nitrógeno (N), tanto inorgánicas (nitrato y amonio) como orgánicas (aminoácidos intactos y proteínas). El bajo coste metabólico del N orgánico, en comparación con el N inorgánico, podría redundar en un mayor crecimiento o en aumento de tolerancia de las plantas a factores de estrés. Sin embargo, se ha estudiado poco el uso de N orgánico como fuente de fertilización de especies forestales en vivero y el papel que juega en promover resistencia a factores de estrés abiótico en las plantas. Se estudió el efecto de la fertilización con aminoácidos como fuente de N, en comparación con las fuentes de N inorgánicas, sobre el crecimiento y resistencia al estrés por sequía o frío en plantas de cinco especies de género *Pinus*. Los resultados mostraron que el N orgánico fue tan efectivo como las fuentes inorgánicas promoviendo el crecimiento de las plantas. En ausencia de aclimatación a la sequía, el N orgánico no incrementó la tolerancia a la sequía en comparación con las fuentes inorgánicas de N. Sin embargo, tras un periodo de aclimatación a la sequía, las plantas fertilizadas con N orgánico tuvieron mayor incremento en la concentración de prolina, especialmente en el nivel de estrés severo. Aunque el endurecimiento al frío se retrasó en las plantas fertilizadas con N orgánico, éstas presentaron mayor tolerancia a heladas en invierno. Los resultados indican que el N orgánico puede ser usado como una alternativa viable en programas de fertilización de los viveros forestales, ya que puede mejorar características fisiológicas relacionadas con la resistencia de las plantas a factores de estrés sin afectar a su calidad morfológica.

Palabras clave: aminoácidos, fertilización, fuentes de nitrógeno, resistencia a frío, resistencia a sequía.

Abstract

Plants can use a wide range of nitrogen (N) sources, both inorganic N (nitrate or ammonium) and organic N (amino acids and proteins). The low metabolic cost of organic N compared to inorganic N would allow plants to enhance growth and tolerance to abiotic stress factors. Nevertheless, the use of organic N as source of nitrogen fertilization has been rarely studied in nursery tree species. Furthermore, the function of organic N on improves stress resistance has been barely addressed. We evaluated the effect of fertilization with amino acids compared to that of inorganic N on the growth and tolerance to drought or frost in *Pinus* spp. seedlings. Organic N was as effective as both inorganic N forms, ammonium and nitrate, in promoting seedling growth. Before drought induction treatments, none of the studied variables of drought potential tolerance were affected by N forms. However, after drought induction treatments, seedlings fertilized with organic N increased the concentration of proline more than inorganic N forms, mainly at the severe-drought level. While frost hardening was slightly delayed by organic N in winter, in mid-winter seedlings fertilized with organic N showed higher frost tolerance than inorganic N fertilized seedlings. Thus, organic N can be a suitable N source in nursery fertilization programs as it increases plant resistance to both drought and frost without negative effects on plant morphology.

Keywords: amino acids, drought resistance, fertilization, frost resistance, nitrogen forms.

---

1. Introducción

Los factores de estrés abiótico, cada vez más frecuentes y extremos, representan una de las principales amenazas para los bosques de coníferas (Dumroese *et al.*, 2015). Para la recuperación y conservación de estos bosques, el cultivo en vivero debe focalizarse en producir plantas con elevada resistencia y capacidad de aclimatación al estrés post-trasplante (Grossnickle and MacDonald, 2018). En este sentido, la nutrición nitrogenada, además de influir en el crecimiento de las plantas, mejora los procesos fisiológicos relacionados con la resistencia al estrés (Villar-Salvador *et al.*, 2012; Oliet *et al.*, 2013).

Las plantas pueden usar distintas fuentes de nitrógeno (N), desde formas inorgánicas (amonio- NH_4^+ - y nitrato- NO_3^- -) hasta compuestos orgánicos (aminoácidos, péptidos y proteínas) (Näsholm *et al.*, 2009; Nacry *et al.*, 2013). Los estudios sobre nutrición nitrogenada de especies forestales en vivero generalmente se han enfocado hacia las formas inorgánicas (Lipson and Näsholm, 2001). En distintas especies de coníferas no solo está demostrada la adquisición de aminoácidos intactos (Persson *et al.*, 2006; Näsholm *et al.*, 2009; Gruffman *et al.*, 2014) sino que, además, estos se absorben en tasas iguales o superiores a las formas de N inorgánicas (Uscola *et al.*, 2014, 2017).

En programas de fertilización de plantas vivero, generalmente se emplean mezclas de las fuentes mencionadas de N inorgánicas para mitigar los problemas que presentan de manera independiente. Por un lado, el NH_4^+ a altas dosis puede derivar en efectos de toxicidad para las plantas por la bajada de pH en el sustrato y la baja capacidad de almacenamiento en la célula (Britto *et al.*, 2001). Además el NH_4^+ inhibe la adquisición de otros cationes (Öhlund and Näsholm, 2001), incluso en especies tolerantes o con alta preferencia a NH_4^+ , como muchas coníferas (Britto and Kronzucker, 2002). Por otra parte, el NO_3^- es la forma de N con mayor coste energético para su asimilación a formas reducidas (Zerihun *et al.*, 1998); por ello, la adquisición de NO_3^- por las plantas es altamente dependiente de la fotosíntesis (Gruffman *et al.*, 2013).

La fertilización con N orgánico no presentaría, en teoría, las desventajas de las fuentes de N inorgánicas. Además, la absorción de aminoácidos intactos tendría la ventaja añadida de una reducción de costes metabólicos para las plantas, tanto en carbono (C) como en energía (Näsholm *et al.*, 2009). Es decir, la absorción de aminoácidos representaría una ganancia en C proveniente del C de los aminoácidos (un "bonus" de C) que podría ser incorporado a la formación de biomasa o en energía disponible para otras funciones metabólicas (Franklin *et al.*, 2017). Por ello, podría haber un aumento en la eficiencia de uso de N en plantas fertilizadas con N orgánico en comparación con el N inorgánico. Sin embargo, las respuestas a la fertilización con aminoácidos en plantas forestales están escasamente abordadas, menos aún se ha analizado su papel en la resistencia a factores de estrés abiótico.

El objetivo del estudio fue investigar si el N orgánico, en comparación con las fuentes inorgánicas, promueve un adecuado crecimiento de diferentes especies de *Pinus* cultivadas en vivero. Además, se analiza si el N orgánico influye en los me-

canismos fisiológicos o bioquímicos que se relacionan con la resistencia a la sequía y el frío. La primera hipótesis planteada fue que el N orgánico, como fuente exclusiva de N, produciría un crecimiento mayor que las fuentes inorgánicas. Además, dado que la nutrición con aminoácidos intactos representa un ahorro energético y un aporte extra de C, la segunda hipótesis fue que el N orgánico favorecería el desempeño de las plantas ante escenarios de estrés abiótico.

2. Material y métodos

Se desarrollaron tres experimentos independientes en vivero. Los dos primeros tenían por objetivo analizar el efecto de las fuentes de N aplicadas de forma independiente en el crecimiento y la resistencia a la sequía. El objetivo del último experimento era comparar la fertilización convencional (mezcla de fuentes inorgánicas) con la fertilización con N orgánico sobre la resistencia al frío.

Experimento 1

La finalidad del experimento fue estudiar si los aminoácidos, en comparación a las formas inorgánicas de N, promueven cambios fisiológicos o bioquímicos que aumenten la resistencia a la sequía, en plantas de *Pinus ponderosa* Dougl. ex Laws, una especie ampliamente distribuida en Estados Unidos de América y comúnmente usada en programas de conservación forestal. Para ello, se utilizaron plantas de un año procedentes del vivero forestal Webster (Tumwater, WA, EE.UU.) cultivadas en contenedor de 170 cm³. Las características morfológicas de las plantas eran: 14.8±0.8 cm de altura, 4.9±0.2 mm de diámetro, 3.0±0.2 y 3.4±0.2 g de biomasa aérea y radical, respectivamente. En marzo de 2017 las plantas se trasladaron a la Universidad de Purdue (West Lafayette, IN, EE.UU.), donde se llevó a cabo el experimento.

Cuatrocientas ochenta plantas se trasplantaron a alveolos de 650 cm³, organizados en bandejas de 20 alveolos. Las plantas se dividieron en tres grupos de 160 individuos (tratamientos, en adelante) que se fertilizaron durante 10 semanas (abril-junio) con soluciones nutritivas completas, en las que la concentración de N fue 9 mM, pero diferenciadas por la forma química de N:

- 1. Nitrato (NO₃⁻).
- 2. Amonio (NH₄⁺).
- 3. N orgánico (mezcla comercial de aminoácidos).

La cantidad total de N aportada por planta en el experimento fue de 150 mg. Al finalizar la fertilización, se cosecharon 10 plantas por tratamiento para la caracterización morfo-fisiológica. Después, se evaluó la respuesta de las plantas al estrés por sequía en dos contextos:

- 1. Evaluación de la tolerancia actual a la sequía.
- 2. Evaluación de la capacidad de aclimatación a distintos niveles de sequía.

En el primer caso (tolerancia a sequía), se determinaron los parámetros hídricos a partir de curvas de presión-volumen en ocho plantas por tratamiento, siguiendo el método descrito por Koide *et al.* (1989). Con ello se calculó: potencial osmótico en el punto de pérdida de turgencia ($\Psi_{\pi tlp}$), potencial osmótico a plena turgencia ($\Psi_{\pi sat}$), máximo módulo de elasticidad (ϵ_{max}) y la fracción de volumen simplástico (V_s/V_t). Además, un grupo de 24 plantas por tratamiento se sometió a desecación, suspendiendo completamente el riego durante dos semanas. Cada 2-3 días se midió el potencial hídrico al alba (Ψ_{pd}) y la liberación de electrolitos en hojas, siguiendo la metodología de Earnshaw (1993); asimismo, se midió la tasa fotosintética a media mañana (8:00-10:00h) en todas las plantas.

En el segundo contexto (capacidad de aclimatación), se evaluó la respuesta de 30 plantas por tratamiento después de someterlas a tres niveles de sequía sostenida durante ocho semanas:

- 1. Tratamiento control, en el que las plantas se mantuvieron con riego a saturación ($\Psi_{pd} = -0.5 \pm 0.02$ MPa).
- 2. Sequía moderada, sosteniendo un 30-35% de pérdida del peso a saturación de la bandeja ($\Psi_{pd} = -0.9 \pm 0.05$ MPa).
- 3. Sequía severa, 40-45% de pérdida del peso a saturación ($\Psi_{pd} = -1.8 \pm 0.15$ MPa).

Para tener certeza de que los niveles de sequía se diferenciaron, cada dos semanas se midió el Ψ_{pd} en seis plantas por tratamiento. Los niveles de peso a saturación se comprobaban y se regaba en función de las necesidades cada dos días. Al final, se cosecharon 12 plantas por tratamiento de fuente de N y de sequía para la caracterización morfológica. Además, en estas plantas se determinó la concentración de clorofilas ($a+b$), de acuerdo a la metodología de Barnes *et al.* (1992), y prolina, siguiendo el método descrito por Ábrahám *et al.* (2010).

Experimento 2

Se estudió el efecto de las fuentes de N sobre el crecimiento y la capacidad para desarrollar mecanismos fisiológicos de resistencia a sequía en plantas durante el primer año de crecimiento. En este caso, se utilizaron semillas de *Pinus engelmannii* Carr. y *Pinus greggii* Engelm., especies nativas de México que comúnmente son empleadas para planes de reforestación y plantaciones productivas en ambientes con amplios periodos de sequía. El experimento se llevó a cabo en los invernaderos de la Universidad Politécnica de Madrid. Las semillas se sembraron en alveolos de 200 cm³, con un sustrato de 74% turba rubia y 25% vermiculita.

Dos meses después de la siembra, las plantas se dividieron en tres grupos de 200 plantas (tratamientos, en adelante) que se fertilizaron con soluciones nutritivas diferenciadas por la forma química del N:

- 1. NO_3^-
- 2. NH_4^+
- 3. N orgánico (mezcla comercial de aminoácidos).

La dosis total de N fue de 150 mg por planta repartida a lo largo de 30 semanas con dos aplicaciones por semana. Una vez concluidos los tratamientos de fertilización, se cosecharon 16 plantas por tratamiento para su caracterización tras cultivo. Asimismo, en seis plantas por tratamiento se evaluaron las relaciones hídricas mediante curvas de presión-volumen, con objeto de evaluar el potencial de tolerancia a la sequía. El resto de las plantas cultivadas fueron usadas en pruebas de comportamiento, tanto para evaluar la tolerancia a la sequía como la capacidad de aclimatación a distintos niveles de sequía (resultados todavía no procesados).

Experimento 3

El objetivo fue comparar la fertilización convencional (mezcla de fuentes de N inorgánicas) con la fertilización con fuentes de N orgánicas y la dosis de N en la resistencia a estrés por frío en plantas de *Pinus sylvestris* L. y *Pinus halepensis* Mill. (Región de procedencia Sistema Ibérico Septentrional E-07/033/10 y Alcarria E-07/049/10, respectivamente). Estas especies difieren en características ecológicas y hábitos de crecimiento, así como en su respuesta fisiológica al frío. El experimento se llevó a cabo en los invernaderos de la Universidad Politécnica de Madrid. Las semillas se sembraron en alveolos de 300 cm³ con un sustrato de 74% turba rubia y 25% vermiculita.

Se desarrolló un experimento factorial con distintas:

- 1. Fuentes de N:
  - N inorgánico (NH₄NO₃).
  - N orgánico (mezcla comercial de aminoácidos, mayormente Glicina, Alanina y Prolina).
- 2. Dosis de N:
  - Baja (30 mg N planta⁻¹).
  - Alta (130 mg N planta⁻¹).

Se utilizaron 200 plantas por combinación de fuente y dosis de N. La fertilización se inició seis semanas después de la siembra, con aplicaciones una vez por semana durante 28 semanas. Al finalizar la fertilización, se cosecharon 12 plantas por tratamiento para su caracterización morfológica.

Posteriormente, seis plantas por tratamiento fueron sometidas a ciclos de helada. Los ciclos de helada se repitieron en tres momentos durante el período de endurecimiento y a distintas temperaturas diana:

- 1. Mediados de otoño, 18-20 de octubre (0, -4, -8 y -12°C).
- 2. Principios de invierno, 12-14 de diciembre (-8, -12, -16, -20 y -24 °C).
- 3. Mitad de invierno, 22-24 de enero (-12, -16, -20, -24, -28 y -32°C).

El daño por helada se midió mediante la reducción de la máxima eficiencia fotoquímica del PSII (F_v/F_m) en las hojas 144 h después de la helada.

Para cada momento de helada, la relación de reducción de F_v/F_m y temperatura (T) se ajustó con una función logística: $y = a/(1 + e^{(b-T)/c})$ donde, a es el valor má-

ximo de reducción de F_v/F_m a la T más alta probada, asíntota derecha, b es el punto medio de la curva, temperatura que produce un 50% de reducción de F_v/F_m (LT_{50}) y c es un parámetro escalar que describe la tasa de cambio (i.e. valores bajos de c significan una caída más pronunciada de reducción de F_v/F_m). Las diferencias entre parámetros de cada curva se analizaron con un test de homogeneidad de parámetros.

A su vez, en cada momento de helada se cosecharon 12 plantas por tratamiento para caracterizar la morfología. Además, se determinó la concentración de azúcares solubles, para ello se hicieron cuatro muestras compuestas mezclando las hojas de tres plantas de una misma bandeja.

3. Resultados y discusión

Efecto del N orgánico en el crecimiento

Las cinco especies de *Pinus* fueron capaces de crecer con N orgánico como fuente exclusiva de N, siendo su crecimiento igual al obtenido con fuentes inorgánicas en *P. ponderosa* (Exp. 1) y tanto en *P. ponderosa* (Exp. 1) como en *P. engelmannii* ($p > 0.05$ en todos los órganos; Exp. 2). Las plantas de *P. greggii* cultivadas con N orgánico tuvieron una producción de biomasa igual a las fertilizadas con NH_4^+ , pero significativamente mayor a aquellas que crecieron con NO_3^- ($F = 12.8$, $p = 0.002$; Exp. 2, (Fig. 1)). Igualmente, tanto las plantas de *P. sylvestris* como las de *P. halepensis* tuvieron mayor crecimiento con N orgánico a dosis baja, principalmente en

Figura 1. Crecimiento acumulado en biomasa total de plantas de *Pinus engelmannii* y *P. greggii* cultivadas con distintas fuentes de N en vivero.

biomasa de raíz (interacción fuente de N x dosis, $p < 0.05$; Exp. 3, datos no mostrados).

Muchas coníferas tienen mayor preferencia por aminoácidos y NH_4^+ que por NO_3^- , por ejemplo *P. halepensis* (Uscola *et al.*, 2017), *Picea abies* (Marschner *et al.*, 1991) o *Picea glauca* (Kronzucker *et al.*, 1997), traduciendo en un mayor desarrollo cuando se cultivan con estas fuentes de N. La explicación más habitual a esta preferencia es que las especies se adaptan a la fuente de N dominante en sus hábitats (Metcalf *et al.*, 2011). Generalmente, en suelos forestales, las fuentes de N dominantes son NH_4^+ y aminoácidos (Kielland, 1994; Näsholm *et al.*, 1998; McKane *et al.*, 2002; Delgado-Baquerizo *et al.*, 2011), lo que explicaría la mayor preferencia de las coníferas por estas fuentes, aunque con excepciones (ver por ejemplo Schulz *et al.* (2011)).

Por otra parte, el mayor crecimiento de raíz en plantas de *P. sylvestris* y *P. halepensis* con dosis baja de N orgánico, concuerda con otros trabajos en los que el N orgánico también incrementó el crecimiento de raíz en comparación con el N inorgánico (Gruffman *et al.*, 2012; Franklin *et al.*, 2017). De esta forma, es probable que el crecimiento de la raíz no sólo se vea afectado por la dosis de fertilización, sino también por la forma química de N.

Figura 2. Potencial osmótico en el punto de pérdida de turgencia determinado a partir de curvas de Presión-Volumen en plantas de *Pinus engelmannii* y *P. greggii* de un año fertilizadas con distintas fuentes de N (Exp. 2).

Efecto del N orgánico en la resistencia y tolerancia a sequía

En general, la variación en las relaciones hídricas de las plantas dependió principalmente de la especie. Por ejemplo, los valores promedio de $\Psi_{\pi\text{tlp}}$ fueron de -1.6 MPa en *P. greggii*, -1.9 MPa en *P. engelmannii* y -2.3 MPa en *P. ponderosa*. Tanto en *P. greggii* como en *P. ponderosa*, los parámetros hídricos no difirieron entre fuentes de N ($p > 0.05$). Sin embargo, en *P. engelmannii*, las plantas fertilizadas con NO_3^- y NH_4^+ presentaron $\Psi_{\pi\text{tlp}}$ más bajos que aquellas fertilizadas con N orgánico ($F=7.17$, $p=0.005$; Fig. 2). Esto indicaría que las plantas fertilizadas con N orgánico potencialmente tendrían menor tolerancia a la deshidratación en comparación con las fuentes inorgánicas.

El comportamiento de las variables fisiológicas con la reducción del potencial hídrico en *Pinus ponderosa* (Exp. 1), como la liberación de electrolitos o la tasa fotosintética, mostró que la fuente de N orgánico promovió una respuesta similar a las fuentes inorgánicas (Fig. 3). En promedio, los valores de Ψ_{pd} donde la fotosíntesis neta es cercana a cero (Fig. 3-A), o bien comienza a aumentar el daño de la membrana celular (Fig. 3-B), coinciden con el punto de pérdida de turgencia ($\Psi_{\pi\text{tlp}} \approx -2.3$ MPa). Estos resultados indican que la fuente de N no afectaría a la estabilidad de las membranas frente a desecación ni a la capacidad de ajuste osmótico actual (en ausencia de un periodo de aclimatación).

En escenarios de sequía inducida, las plantas de *P. ponderosa* (Exp. 1), fertilizadas tanto con NH_4^+ como con N orgánico, presentaron concentraciones de cloro-

Figura 3. Tasa fotosintética a media mañana (A) y liberación de electrolitos (B) en función del potencial hídrico al alba en plantas de un año de *Pinus ponderosa* fertilizadas con distintas fuentes de N (Exp. 1). Cada punto representa una medición en una planta en un día; por tanto, cada planta tuvo varias mediciones a lo largo de la prueba. Las líneas representan los valores predichos para cada tratamiento con ajuste a una función logística.

filas superiores a las plantas con NO_3^- ($F=11.8$, $p<0.0001$, (Fig. 4-A)). La sequía afectó significativamente a la concentración de prolina ($F=7.57$, $p=0.0009$). Las plantas con estrés severo tuvieron mayor acumulación de prolina en comparación con las plantas sin estrés o estrés moderado (Fig. 4-B). La fuente de N no influyó en la concentración de prolina después de la sequía ($F=0.13$, $p=0.87$), pero sí en el incremento ($F=4.50$, $p=0.014$), calculado con respecto a la concentración antes de la sequía. En promedio, el N orgánico produjo un incremento de prolina del 89.5%, mientras que las plantas con NO_3^- y NH_4^+ incrementaron la concentración en 74.1 y 33.9%, respectivamente. Una mayor acumulación de prolina es considerada como buen indicador de resistencia al estrés en plantas (Heuer 2010), ya que juega un papel importante como osmolito soluble, dando estabilidad a las estructuras subcelulares ante efectos del estrés hídrico (Szabados y Saviouré, 2010).

Los resultados pre-aclimatación no muestran una clara ventaja del N orgánico promoviendo la tolerancia actual a la sequía (por ejemplo, en potencial osmótico en el punto de pérdida de turgencia). Sin embargo, el incremento de prolina después del periodo de sequía, indica que la fertilización con N orgánico podría facilitar la síntesis de osmolitos en las plantas durante el proceso de aclimatación a la sequía, en comparación con las fuentes inorgánicas.

Efecto del N orgánico en la tolerancia a frío

En general la tolerancia al frío se incrementó de otoño a invierno, siendo el endurecimiento especialmente rápido de octubre a diciembre, indicado por valores cada vez más negativos de LT_{50} (Fig. 5-A). Las plantas de *P. sylvestris* tuvieron una

Figura 4. Concentración de clorofilas totales (a+b) (A) y prolina (B) determinados en plantas de un año de *Pinus ponderosa* fertilizadas con distintas fuentes de N y sometidas a tres escenarios de sequía inducida de cuatro semanas de duración (Exp. 1).

Figura 5. LT₅₀ (A), temperatura a la que la F_v/F_m disminuye al 50%, considerado como el parámetro b de los modelos completos ajustados en cada momento de heladas, y concentración de azúcares solubles (B) en plantas de un año de *Pinus halepensis* cultivadas con distintas dosis de N y dos fertilizantes con distinta fuente de N, inorgánica vs orgánica, durante el período de endurecimiento (Exp. 3).

elevada resistencia a daño por helada, especialmente en enero, ya que no se alcanzó el 50% de daño ni en la temperatura más baja (-32°C , datos no mostrados). En *P. halepensis*, con menor tolerancia que *P. sylvestris*, los valores de LT₅₀ fueron de -6.3°C en octubre hasta -18.6°C en diciembre.

El efecto de la fuente y dosis de N sobre la tolerancia al frío en *P. halepensis* dependió de la fecha. En octubre, los parámetros de las curvas de F_v/F_m se diferenciaron por la fuente de N ($p < 0.0001$) y no por la dosis ($p = 0.48$), siendo las fuentes inorgánicas las que indujeron una mayor resistencia al frío (i.e. menor LT₅₀). En cambio, en diciembre y enero, los parámetros cambiaron tanto por la fuente de N ($p = 0.002$; $p = 0.049$, respectivamente) como por la dosis de N ($p < 0.0001$; $p = 0.0007$, respectivamente). En general, la dosis alta de N promovió mayor tolerancia al frío, mientras que el N orgánico fue la fuente que manifestó mejor comportamiento, principalmente en enero. En este sentido, el efecto de la dosis de N contrasta con los resultados presentados por Villar-Salvador *et al.* (2005), quienes encontraron un mayor daño por frío en plantas de *Pinus* con mayor dosis de N, aunque las diferencias tendieron a desaparecer durante el endurecimiento.

El proceso endurecimiento en *Pinus* está asociado a la acumulación de azúcares solubles (Greer *et al.*, 2000). En coherencia con esta idea, en ambas especies la concentración de azúcares solubles se incrementó a lo largo del invierno (Figura 5-B). Sin embargo, las plantas con baja dosis de N, que tuvieron mayores concentraciones de azúcares solubles en todas las fechas, no mostraron mayor resistencia al frío (LT₅₀). En este sentido, recientes trabajos no muestran un claro vínculo de los azúcares totales con la tolerancia al frío en distintas especies de pinos mediterráneos (Toca *et al.*, 2018; Fernández-Pérez *et al.*, 2018). Esta discrepancia podría explicarse si sólo algunos de los azúcares u otros compuestos estuvie-

ran involucrados en la tolerancia al frío. En este sentido, Taïbi *et al.* (2018) encontraron mayor concentración de azúcares específicos como glucosa y fructosa, en plantas de *P. halepensis* resistentes al frío comparadas con plantas sensibles, al igual que otros compuestos como la prolina, la arginina, el glutatión (GHS) y el triptófano (Trp).

Las diferencias en concentración de azúcares solubles fueron más notables debido a la dosis que a la fuente de N. Bajo condiciones de baja disponibilidad de N, la reducida demanda de C para el crecimiento y la asimilación de N incrementa el almacenamiento de C como almidón o azúcares solubles (Villar-Salvador *et al.*, 2013). No obstante, tanto en dosis baja como en alta, las plantas fertilizadas con N orgánico aumentaron su concentración de azúcares progresivamente desde octubre hasta enero. En cambio, las plantas con N inorgánico aumentan la concentración hasta diciembre para luego mantenerla constante o incluso disminuirla en enero. Este patrón se correlaciona con los niveles de tolerancia medidos como LT₅₀. Todo ello sugiere que la fuente de N orgánico podría estar relacionada con la síntesis de metabolitos específicos como los reportados por Taïbi *et al.* (2018), confiriendo mayor resistencia al frío hacia final del invierno.

4. Conclusiones

El N orgánico fue tan eficiente como las fuentes de N inorgánicas promoviendo el crecimiento de las plantas. Los parámetros hídricos pre-aclimatación que se relacionan con la resistencia potencial a la sequía, se mantuvieron al mismo nivel en plantas fertilizadas con N orgánico que con N inorgánico, tanto en *Pinus ponderosa* como *P. greggii*, pero fueron afectados negativamente en *P. engelmannii*. Sin embargo, después de un periodo de aclimatación a la sequía, la fertilización con N orgánico incrementó en mayor medida la concentración de prolina, en comparación con las fuentes inorgánicas. Además, se encontraron diferencias en la resistencia al frío asociadas a la dosis y las fuentes N. Durante el endurecimiento en invierno, la concentración de azúcares solubles y patrones de resistencia al frío fueron mejorados en las plantas cultivadas con N orgánico con respecto a aquellas cultivadas con fuentes inorgánicas. Los resultados indican que el N orgánico puede ser usado como una alternativa viable en programas de fertilización de los viveros forestales, optimizando las características de resistencia en las plantas sin afectar su calidad morfológica.

Agradecimientos

Los experimentos se han realizado con la financiación del proyecto “FORADMIT: Gestión forestal para la adaptación y mitigación: diversificación estructural y específica de pinares mediterráneos de repoblación” (AGL2016-77863-R). Agradecemos también la colaboración de Silvia Medina Villar, Pedro Muñoz, Miguel

Ángel Pequeño y Sebastián Escobar en los trabajos de laboratorio. Finalmente, se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México) por la beca predoctoral concedida al primer autor.

5. Bibliografía

- Ábrahám, E.; Hourton-Cabassa, C.; Erdei, L.; Szabados, L.; 2010. Methods for determination of proline in plants. In: Sunkar, R. (ed) *Plant Stress Tolerance: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 317–331. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-702-0_20
- Barnes, J.D.; Balaguer, L.; Manrique, E.; Elvira, S.; Davison, A.W.; 1992. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. *Environ Exp. Bot.* 32:85–100. [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(92\)90034-Y](https://doi.org/10.1016/0098-8472(92)90034-Y)
- Britto, D.T.; Kronzucker, H.J.; 2002. NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. *J. Plant Physiol* 159:567–584. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-0774>
- Britto, D.T.; Siddiqi, M.Y.; Glass, A.D.; Kronzucker, H.J.; 2001. Futile transmembrane NH_4^+ cycling: a cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:4255–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.061034698>
- Delgado-Baquerizo, M.; Covelo, F.; Gallardo, A.; 2011. Dissolved organic nitrogen in Mediterranean ecosystems. *Pedosphere* 21:309–318. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(11\)60131-8](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(11)60131-8)
- Dumroese, R.K.; Williams, M.I.; Stanturf, J.A.; Clair, J.B. St.; 2015. Considerations for restoring temperate forests of tomorrow: forest restoration, assisted migration, and bioengineering. *New For.* 46:947–964. <https://doi.org/10.1007/s11056-015-9504-6>
- Earnshaw, M.J.; 1993. Stress indicators: electrolyte leakage. In: Hendry, G.A.F.; Grime, J.P.; (eds) *Methods in comparative plant ecology. A laboratory manual*, 1st. Chapman and Hall, London, pp 152–154
- Fernández-Pérez, L.; Villar-Salvador, P.; Martínez-Vilalta, J.; Toca, A.; Zavala, M.A.; 2018. Distribution of pines in the Iberian Peninsula agrees with species differences in foliage frost tolerance, not with vulnerability to freezing-induced xylem embolism. *Tree Physiol* 38:507–516. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpx171>
- Franklin, O.; Cambui, C.A.; Gruffman, L.; Palmroth, S.; Oren, R.; Näsholm, T.; 2017. The carbon bonus of organic nitrogen enhances nitrogen use efficiency of plants. *Plant Cell Environ* 40:25–35. <https://doi.org/10.1111/pce.12772>
- Greer, D.H.; Robinson, L.A.; Hall, A.J.; Klages, K.; Donnison, H.; 2000. Frost hardening of *Pinus radiata* seedlings: effects of temperature on relative growth rate, carbon balance and carbohydrate concentration. *Tree Physiol* 20:107–114. <https://doi.org/10.1093/treephys/20.2.107>
- Grossnickle, C.S.; MacDonald, E.J.; 2018. Seedling Quality: History, Application, and Plant Attributes. *Forests* 9:283. <https://doi.org/10.3390/f9050283>
- Gruffman, L.; Ishida, T.; Nordin, A.; Näsholm, T.; 2012. Cultivation of Norway spruce and Scots pine on organic nitrogen improves seedling morphology and field performance. *For Ecol Manage* 276:118–124. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2012.03.030>

- Gruffman, L.; Jämtgård, S.; Näsholm, T.; 2014. Plant nitrogen status and co-occurrence of organic and inorganic nitrogen sources influence root uptake by Scots pine seedlings. *Tree Physiol* 34:205–213. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpt121>
- Gruffman, L.; Palmroth, S.; Näsholm, T.; 2013. Organic nitrogen uptake of Scots pine seedlings is independent of current carbohydrate supply. *Tree Physiol* 33:590–600. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpt041>
- Heuer, B.; 2010. Role of Proline in plant response to drought and salinity. In: *Handbook of Plant and Crop Stress*, Third Edition. CRC Press, pp 213–238. <https://doi.org/10.1201/b10329-12>
- Kielland, K.; 1994. Amino acid absorption by arctic plants: implications for plant nutrition and nitrogen cycling. *Ecology* 75:2373–2383. <https://doi.org/10.2307/1940891>
- Koide, R.T.; Robichaux, R.H.; Morse, S.R.; Smith, C.M.; 1989. Plant water status, hydraulic resistance and capacitance. In: Pearcy, R.W.; Ehleringer, J.R.; Mooney, H.A.; Rundel, P.W.; (eds) *Plant Physiological Ecology: Field Methods and Instrumentation*, 1st. Chapman and Hall, London, pp 161–183. https://doi.org/10.1007/978-94-009-2221-1_9
- Kronzucker, H.J.; Siddiqi, M.Y.; Glass, A.D.M.; 1997. Conifer root discrimination against soil nitrate and the ecology of forest succession. *Nature* 385:59. <https://doi.org/10.1038/385059a0>
- Lipson D.; Näsholm T.; 2001. The unexpected versatility of plants: organic nitrogen use and availability in terrestrial ecosystems. *Oecologia* 128:305–316. <https://doi.org/10.1007/s004420100693>
- Marschner, H.; Häussling, M.; George, E.; 1991. Ammonium and nitrate uptake rates and rhizosphere pH in non-mycorrhizal roots of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. *Trees* 5:14–21. <https://doi.org/10.1007/BF00225330>
- McKane, R.B.; Johnson, L.C.; Shaver, G.R.; Nadelhoffer, K.J.; Rastetter, E.B.; Fry, B.; et al., 2002. Resource-based niches provide a basis for plant species diversity and dominance in arctic tundra. *Nature* 415:68–71. <https://doi.org/10.1038/415068a>
- Metcalf, R.J.; Nault, J.; Hawkins, B.J.; 2011. Adaptations to nitrogen form: comparing inorganic nitrogen and amino acid availability and uptake by four temperate forest plants. *Can J For Res* 41:1626–1637. <https://doi.org/10.1139/x11-090>
- Nacry, P.; Bouguignon, E.; Gojon, A.; 2013. Nitrogen acquisition by roots: physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to a fluctuating resource. *Plant Soil* 370:1–29. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1645-9>
- Näsholm, T.; Ekblad, A.; Nordin, A.; Giesler, R.; Höglberg, M.N.; Höglberg, P.; 1998. Boreal forest plants take up organic nitrogen. *Nature* 392:914–916. <https://doi.org/10.1038/31921>
- Näsholm, T.; Kielland, K.; Ganeteg, U.; 2009. Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytol* 182:31–48. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02751.x>
- Öhlund, J.; Näsholm, T.; 2001. Growth of conifer seedlings on organic and inorganic nitrogen sources. *Tree Physiol* 21:1319–1326. <https://doi.org/10.1093/treephys/21.18.1319>
- Oliet, J.A.; Puértolas, J.; Planelles, R.; Jacobs, D.F.; 2013. Nutrient loading of forest tree seedlings to promote stress resistance and field performance: a Mediterranean perspective. *New For* 44:649–669. <https://doi.org/10.1007/s11056-013-9382-8>
- Persson, J.; Gardeström, P.; Näsholm, T.; 2006. Uptake, metabolism and distribution of organic and inorganic nitrogen sources by *Pinus sylvestris*. *J Exp Bot* 57:2651–2659. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl028>

- Schulz, H.; Härtling, S.; Stange, C.F.; 2011. Species-specific differences in nitrogen uptake and utilization by six European tree species. *J Plant Nutr Soil Sci* 174:28–37. <https://doi.org/10.1002/jpln.201000004>
- Szabados, L.; Savouré, A.; 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci* 15:89–97. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.009>
- Taïbi, K.; Del Campo, A.D.; Vilagrosa, A.; Bellés, J.M.; López-Gresa, M.P.; Pla, D.; et al., 2018 Drought tolerance in *Pinus halepensis* seed sources as identified by distinctive physiological and molecular markers. *Front Plant Sci* 8:1202. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01202>
- Toca, A.; Oliet, J.A.; Villar-Salvador, P.; Maroto, J.; Jacobs, D.F.; 2018 Species ecology determines the role of nitrogen nutrition in the frost tolerance of pine seedlings. *Tree Physiol* 38:96–108. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpx165>
- Uscola, M.; Villar-Salvador, P.; Oliet, J.A.; Warren, C.R.; 2014 Foliar absorption and root translocation of nitrogen from different chemical forms in seedlings of two Mediterranean trees. *Environ Exp Bot* 104:34–43. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.03.004>
- Uscola, M.; Villar-Salvador, P.; Oliet, J.A.; Warren, C.R.; 2017 Root uptake of inorganic and organic N chemical forms in two coexisting Mediterranean forest trees. *Plant Soil* 1–6. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3172-6>
- Villar-Salvador, P.; Peñuelas, J.L.; Jacobs, D.F.; 2013 Nitrogen nutrition and drought hardening exert opposite effects on the stress tolerance of *Pinus pinea* L. seedlings. *Tree Physiol* 33:221–32. <https://doi.org/10.1093/treephys/tps133>
- Villar-Salvador, P.; Puértolas, J.; Cuesta, B.; Peñuelas, J.L.; Uscola, M.; Heredia-Guerrero, N.; Rey Benayas, J.M.; 2012 Increase in size and nitrogen concentration enhances seedling survival in Mediterranean plantations. Insights from an ecophysiological conceptual model of plant survival. *New For* 43:755–770. <https://doi.org/10.1007/s11056-012-9328-6>
- Villar-Salvador, P.; Puértolas, J.; Peñuelas, J.L.; Planelles, R.; 2005 Effect of nitrogen fertilization in the nursery on the drought and frost resistance of Mediterranean forest species. *Investig Agrar Sist y Recur For* 14:408–418. <https://doi.org/10.5424/srf/2005143-00935>
- Zerihun, A.; McJenzie, B.A.; Morton, J.D.; 1998 Photosynthate costs associated with the utilization of different nitrogen-forms: influence on the carbon balance of plants and shoot–root biomass partitioning. *New Phytol* 138:1–11. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1998.00893.x>