

**UNIVERSIDAD DE JAÉN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS  
EXPERIMENTALES  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
ANIMAL, BIOLOGÍA VEGETAL Y  
ECOLOGÍA**

**TESIS DOCTORAL  
EL OLIVO (*Olea europaea* L.) Y EL ESTRÉS  
SALINO. IMPORTANCIA DE LOS  
REGULADORES DEL CRECIMIENTO**

**PRESENTADA POR:  
CAROLINA APARICIO AYORA**

**DIRIGIDA POR:  
DRA. DÑA. MARÍA DEL PILAR CORDOVILLA  
PALOMARES**

**JAÉN, 2 DE FEBRERO DE 2016**

**ISBN 978-84-16819-54-6**



**UNIVERSIDAD DE JAÉN**

**Facultad de Ciencias Experimentales**

**Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y  
Ecología**



**EL OLIVO (*Olea europaea* L.) Y EL ESTRÉS SALINO.**

**IMPORTANCIA DE LOS REGULADORES DEL CRECIMIENTO**

**TESIS DOCTORAL**

**Carolina Aparicio Ayora**

**Jaén, 2015**





**UNIVERSIDAD DE JAÉN**

**EL OLIVO (*Olea europaea* L.) Y EL ESTRÉS SALINO.**

**IMPORTANCIA DE LOS REGULADORES DEL CRECIMIENTO**

Memoria presentada por  
**CAROLINA APARICIO AYORA**  
para optar al Grado de Doctor por la  
Universidad de Jaén

Vº Bº de la Directora

Dra. María del Pilar Cordovilla Palomares  
Profesora Titular  
Universidad de Jaén

Lda. Carolina Aparicio Ayora  
Aspirante al Grado de Doctor  
Jaén, diciembre de 2015





Dña. María del Pilar Cordovilla Palomares, Profesora Titular de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén

Certifica:

Que el trabajo recogido en la presente Memoria, titulada: “*El olivo (Olea europaea L.) y el estrés salino. Importancia de los reguladores del crecimiento*”, presentada por Carolina Aparicio Ayora, ha sido realizada bajo mi dirección y considero que presenta contenido científico suficiente, por lo que autorizo su presentación y defensa para optar al grado de Doctor por la Universidad de Jaén,

Jaén, diciembre de 2015

Fdo. Dra. María del Pilar Cordovilla Palomares





## **AGRADECIMIENTOS**

*El hecho de que yo pueda estar hoy escribiendo estas líneas, ha sido fruto del esfuerzo de muchas personas. Algunos me han dedicado su tiempo y su ayuda, otros un consejo y unas palabras de ánimo. A todos ellos quiero darles las gracias.*

*A mi directora de tesis, Dña. María del Pilar Cordovilla, por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por su dedicación, su tiempo y sus enseñanzas.*

*A D. Francisco J. Márquez, por su ayuda y sus consejos.*

*A todos los que, en algún momento, han pasado por el laboratorio de Fisiología Vegetal e hicieron de los días de recogidas algo más que unos largos días de trabajo.*

*A mis amigos por sus palabras de ánimo. A mi familia de Linares, por hacerme sentir como uno más y tener siempre preparado para mí un rinconcito para poder trabajar. A mis tíos Paqui, M<sup>a</sup> Carmen y Fernando, por su cariño, sus palabras de ánimo y por poner un punto de sensatez en los peores momentos. A mis cuatro “hermanos”, porque sé que se alegran casi tanto como yo.*

*A los que ya no están, mis abuelos Carmen, Carolina y Miguel, porque aunque me quedo con la pena de no poder ir a contarles que he terminado la tesis, sé que me han acompañado todo este tiempo. A mi tío Pedro, por darme un empujón y servirme de apoyo cuando más lo necesitaba.*

*A Tomy, porque no tengo palabras para agradecer su ayuda, su infinita paciencia y su cariño en todos estos años. Porque a pesar de no comprender muchas cosas, siempre estuvo ahí. Ahora te toca a ti.*

*A mis padres, por estar siempre a mi lado y confiar en mí en todo momento.*

*Porque todo este esfuerzo ha sido por ellos.*

## ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
ABTS <sup>•+</sup>	Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico
AF	Área foliar
AFH	Área final de la hoja
AGR	Tasa de crecimiento absoluto
AIA	Ácido indolacético
APX	Ascorbato peroxidasa
AS	Ácido salicílico
C <sub>a</sub>	Clorofila a
C <sub>a+b</sub>	Clorofila total
Car	Carotenoides
C <sub>b</sub>	Clorofila b
Ci	Concentración interna de CO <sub>2</sub>
cv.	Cultivar
D	Densidad
DPPH <sup>•</sup>	2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo
E	Transpiración
GA <sub>3</sub>	Ácido giberélico
GB	Glicina betaína
GR	Glutación reductasa
GS	Conductividad estomática
GSSG	Glutación oxidado
LAR	Relación de área foliar
LMA	Masa foliar por unidad de área
LMR	Leaf mass ratio
LAR	Leaf area ratio

$\eta^2$	Coefficiente de determinación
NAR	Tasa de asimilación neta
ND	No determinado
NP	No pretratado
PAs	Poliaminas
$P_n$	Tasa asimilación neta de CO <sub>2</sub>
PF	Peso fresco
PNUE	Eficiencia fotosintética en el uso del nitrógeno
POD	Guaiacol peroxidasa
PS	Peso seco
PT	Peso turgente
p/v	Peso/ volumen
PVP	Polivinilpirrolidona
QUIN	Quinetina
R/PA	Relación raíz/parte aérea
RGR	Tasa de crecimiento relativo
RMR	Root mass ratio
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RWC	Contenido hídrico relativo
S	Suculencia
SLA	Área foliar específica
SE	Error estándar
SPD	Espermidina
SPM	Espermina
SMR	Stem mass ratio
WCS	Contenido hídrico para la saturación
WSD	Déficit de saturación hídrico

# Índice

---



# ÍNDICE

<b>I. Introducción</b>	1
1. Importancia del olivo	3
2. Fisiología del olivo	6
2.2. Características morfológicas	6
2.3. Ciclo bienal del olivo	7
3. La salinización de los suelos	10
4. Efectos de la salinidad en las plantas	13
4.1. Efectos de la salinidad en el olivo	16
5. Mecanismos de tolerancia al estrés salino	17
5.1. Mecanismos de tolerancia en el olivo	20
6. Reguladores del crecimiento	22
7. Justificación del trabajo	27
<b>II. Objetivos</b>	31
<b>III. Materiales y métodos</b>	35
1. Material vegetal	37
2. Cultivo de las plantas	38
3. Experimentos realizados	40
3.1. Evaluación de la tolerancia a la salinidad en distintos cultivares de <i>O. europaea</i>	40
3.2. Efecto del estrés salino en estaquillas enraizadas de <i>O. europaea</i> cv. Picual	42
3.3. Importancia de los reguladores del crecimiento en la respuesta de estaquillas enraizadas de <i>O. europaea</i> cv. Picual frente al estrés salino	43
3.4. Importancia de los reguladores del crecimiento en la respuesta de plantas de 1 año de <i>O. europaea</i> cv. Picual frente al estrés salino	45
3.5. Interacción entre el ácido abscísico y la salinidad en estaquillas enraizadas de <i>O. europaea</i> cv. Picual	47
4. Metodología empleada	48

4.1. Recolección de plantas	48
4.2. Parámetros de crecimiento	48
4.3. Intercambio gaseoso y estado hídrico de la planta	52
4.4. Determinaciones analíticas	54
4.4.1. Contenido de carbono y nitrógeno	54
4.4.2. Contenido de Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> y Ca <sup>2+</sup>	54
4.4.3. Pigmentos fotosintéticos y fenoles totales	55
4.4.4. Aminoácidos libres, azúcares solubles y almidón	56
4.4.5. Proteína soluble, prolina soluble y grupos tiol	58
4.4.6. Glicina betaína	60
4.4.7. Nitrato	61
4.4.8. Poliaminas libres: espermidina y espermina	61
4.4.9. Producción de etileno	62
4.4.10. Polioles, sacarosa, glucosa y fructosa	63
4.4.11. Flavonoides	64
4.4.12. Capacidad antioxidante	65
4.4.13. Actividades enzimáticas del metabolismo oxidativo	66
5. Análisis estadístico	68
<b>IV. Resultados y discusión</b>	<b>71</b>
1. Evaluación de la tolerancia a la salinidad en distintos cultivos de <i>O. europaea</i>	73
1.1. Resultados	73
1.1.1. Crecimiento vegetativo	73
1.1.2. Contenido de nutrientes	79
1.1.3. Intercambio gaseoso	85
1.1.4. Pigmentos fotosintéticos	88
1.1.5. Metabolitos e indicadores del estrés en la hoja	90
1.2. Discusión	97



2. Efecto del estrés salino en estaquillas enraizadas de <i>O. europaea</i> cv. Picual	105
2.1. Resultados	105
2.1.1. Crecimiento vegetativo	105
2.1.2. Contenido de nutrientes	119
2.1.3. Estado hídrico de la planta	122
2.1.4. Intercambio gaseoso	123
2.1.5. Pigmentos fotosintéticos	125
2.1.6. Metabolitos e indicadores del estrés en la hoja	125
2.2. Discusión	135
3. Importancia de los reguladores del crecimiento en la respuesta de estaquillas enraizadas de <i>O. europaea</i> cv. Picual frente al estrés salino	148
3.1. Resultados	148
3.1.1. Crecimiento vegetativo	148
3.1.2. Contenido de nutrientes	162
3.1.3. Estado hídrico de la planta	167
3.1.4. Pigmentos fotosintéticos	171
3.1.5. Metabolitos e indicadores del estrés en la hoja	175
3.2. Discusión	189
4. Importancia de los reguladores del crecimiento en la respuesta de plantas de 1 año de <i>O. europaea</i> cv. Picual frente al estrés salino	196
4.1 Resultados	196
4.1.1. Crecimiento vegetativo	196
4.1.2. Estado hídrico de la planta	201
4.1.3. Intercambio gaseoso	204
4.1.4. Pigmentos fotosintéticos	210
4.1.5. Enzimas del estrés oxidativo	214
4.1.6. Metabolitos e indicadores del estrés en la hoja	219
4.1.7. Capacidad antioxidante	224

4.2. Discusión	229
5. Interacción entre el ácido abscísico y la salinidad en estaquillas enraizadas de <i>O. europaea</i> cv. Picual	239
5.1. Resultados	239
5.1.1. Crecimiento vegetativo	239
5.1.2. Contenido de nutrientes	246
5.1.3. Estado hídrico de la planta	250
5.1.4. Intercambio gaseoso	251
5.1.5. Enzimas del estrés oxidativo	254
5.1.6. Metabolitos e indicadores del estrés en la hoja	256
5.2. Discusión	261
<b>V. Discusión general</b>	267
<b>VI. Conclusiones</b>	281
<b>VII. Bibliografía</b>	287
<b>VIII. Anexo</b>	335

# I. Introducción

---



## 1. Importancia del olivo

El olivo tiene su origen en Oriente Medio, en una región geográfica que va desde el sur del Cáucaso hasta Irán, Palestina y la zona costera de Siria. Desde aquí se extendió hasta poblar todos los países ribereños del Mediterráneo. En la actualidad el cultivo del olivo se ha extendido por regiones climáticas de tipo Mediterráneo de todo el mundo, caracterizadas por un verano seco y caluroso. Se encuentra en América, principalmente en Argentina y en Estados Unidos (California, Arizona), Sudáfrica, China, Japón y Australia.

Según datos de la FAO (FAOSTAT, base de datos estadística, <http://faostat3.fao.org/home/S>), la superficie mundial de olivar en el año 2013 era superior a los 10,3 millones de ha, de los cuales 2,5 millones de ha corresponden a la superficie de olivar de España (Tabla 1). En nuestro país, la producción de aceituna en el año 2013 fue de 7.875.800 t, lo que supone un 39% de la producción mundial. Según estos datos de la FAO, España es el país con mayor superficie cosechada, seguido por Túnez, Italia y Grecia; nuestro país también cuenta con la mayor producción de aceituna del mundo, seguido por Italia, Grecia y Turquía.

**Tabla 1.** Superficie de olivar dedicado a almazara y aceituna de mesa en España (datos correspondientes al año 2013).

Cultivo	Superficie en plantación regular (ha)		
	Secano	Regadío	Total
Olivar de aceituna de mesa	111.793	53.946	163.795
Olivar de aceituna de almazara	1.789.039	547.692	2.343.184
Olivar total	1.900.832	601.638	2.506.979

Fuente: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (2014).

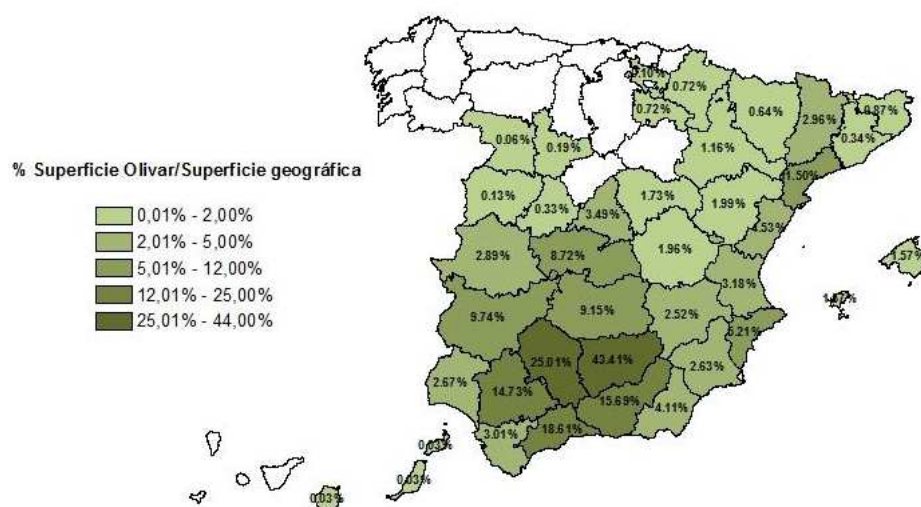
En España, del total de superficie de olivar, el 93% se destina la producción de

aceite, mientras que, el 7% restante se destina a la obtención de aceituna de mesa (Tabla 1); de hecho, España es el principal país exportador de aceite de oliva virgen seguido de Italia y Grecia (FAOSTAT, base de datos estadística, <http://faostat3.fao.org/home/S>). La exportación de aceite representa el 60% del comercio total del aceite de oliva en España, con más de 100 países de destino, y con una media en las campañas 2007/08-2012/13 de 745.700 t. El volumen de las exportaciones ha subido un 48% desde la campaña 2006/07 hasta la 2011/12. Sin embargo, en la campaña 2012/13 las exportaciones fueron excepcionalmente bajas, a causa de una cosecha anormalmente baja. En nuestro país, la producción de aceite de oliva está condicionada por la aportación de Andalucía, y esta a su vez por la de las provincias de Jaén y Córdoba (Civantos, 2004).

**Tabla 2.** Producción de aceite de oliva y superficie de olivar dedicado a almazara y aceituna de mesa en las distintas comunidades autónomas españolas (datos correspondientes al año 2013).

Comunidades Autónomas	Superficie olivar aceituna de almazara (ha)	Superficie olivar aceituna de mesa (ha)	Producción de aceite de oliva (t)
Galicia	256	-	56
País Vasco	322	-	80
Navarra	6.005	-	4.093
La Rioja	5.658	-	2.159
Aragón	47.982	-	13.793
Cataluña	116.354	575	26.231
Baleares	8.022	79	551
Castilla y León	7.160	868	1.840
Madrid	26.288	111	6.088
Castilla-La	366.540	280	79.132
Comunidad	91.645	442	15.312
Murcia	21.044	1.054	9.979
Extremadura	203.171	61.800	60.109
<b>Andalucía</b>	<b>1.442.598</b>	<b>98.511</b>	<b>1.474.064</b>
Canarias	139	75	20
<b>España</b>	<b>2.343.184</b>	<b>163.795</b>	<b>1.760.957</b>

Fuente: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (2014).



**Figura 1.** Superficie de olivar respecto a la superficie geográfica de las provincias españolas en el año 2012. (Fuente: Encuesta sobre Superficies y Rendimientos de Cultivos. Análisis de las Plantaciones de Olivar en España, 2012).

**Tabla 3.** Producción de aceite de oliva y superficie de olivar dedicado a almazara y aceituna de mesa en las distintas provincias andaluzas (datos correspondientes al año 2013).

Provincias	Superficie olivar aceituna de almazara (ha)	Superficie olivar aceituna de mesa (ha)	Producción de aceite de oliva (t)
Almería	19.826	82	9.992
Cádiz	23.148	-	9.473
Córdoba	342.499	4.090	362.081
Granada	184.955	15	149.262
Huelva	28.695	4.050	4.992
<b>Jaén</b>	<b>585.319</b>	<b>198</b>	<b>751.610</b>
Málaga	119.731	6.185	80.088
Sevilla	138.425	83.891	106.566
<b>Andalucía</b>	<b>1.442.598</b>	<b>98.511</b>	<b>1.474.064</b>

Fuente: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (2014).

De las comunidades autónomas, Andalucía es la región oleícola por excelencia, representa el 61% de la superficie de olivar de almazara, el 60% de olivar de aceituna de mesa y el 84% de la producción de aceite del país (Tabla 2). Además, Jaén es la

provincia española con mayor superficie de olivar, con más del 43% de su superficie geográfica cultivada, seguida por Córdoba con un 25% (Figura 1). Jaén representa el 38% de la superficie de olivar y el 51% de la producción de aceite de Andalucía (Tabla 3).

## 2. Fisiología del olivo

### 2.2. Características morfológicas

El olivo, cuyo nombre científico es *Olea europea* L., es la única especie de la familia *Oleaceae* con fruto comestible. En la especie *Olea europaea* se incluyen tanto los olivos cultivados (subespecie *sativa*), como los acebuches u olivos silvestres (subespecie *sylvestris*) (Rapoport, 2008).

El olivo es un árbol esclerófilo y perennifolio con una lenta tasa de crecimiento que puede vivir y ser productivo durante cientos de años (Uceda and Hermoso, 2008). El olivo cultivado es un árbol de unos 4 a 8 m de altura. Su tronco es grueso de color gris a verde grisáceo y su copa es redondeada más o menos lobulada. Las características morfológicas del olivo pueden variar en función del cultivar, de las condiciones ambientales y agronómicas y del tipo de poda (Rapoport, 2008).

Las hojas perduran en el árbol de 2 a 3 años, son simples, de forma elíptica y lanceolada con bordes enteros. El limbo tiene una longitud de entre 3 y 9 cm y una anchura de entre 1 y 1,8 cm. El nervio central es muy marcado y su peciolo no supera los 0,5 cm. El haz es de color verde oscuro brillante debido a la gruesa cutícula que la protege de la pérdida de agua, y el envés está cubierto por abundantes pelos que le confieren un color blanco plateado.



La forma de la raíz depende del origen del árbol y de las condiciones del suelo. Un olivo procedente de semilla tendrá una raíz principal sin raíces laterales importantes, mientras que si el olivo se ha producido por propagación vegetativa mediante enraizamiento de estaquillas semileñosas, que es el método habitual para el olivo comercial, tendrá múltiples raíces adventicias. Por otro lado, la profundidad, expansión lateral y grado de ramificación dependerán de las características del suelo (Fernández et al., 1991).

Las inflorescencias son paniculadas, tienen un eje central del cual salen ramificaciones y se forman a partir de las yemas axilares de las hojas formadas el año previo a la floración. Cada una de las inflorescencias puede tener entre 10 y 40 flores dependiendo del cultivar y de las condiciones fisiológicas y ambientales. Las flores del olivo son de pequeño tamaño y actinomorfas con simetría regular. Poseen cuatro pétalos de color blanco o blanco amarillento (Rapoport, 2008). En Andalucía, la floración suele ocurrir entre abril y mayo. Las flores del olivo son hermafroditas y la mayoría de las variedades pueden ser autopolinizadas, sin embargo, el cuajado del fruto generalmente tiene lugar por el polen de otra variedad (Rapoport, 2008).

El fruto del olivo, la aceituna, es una drupa con una sola semilla, de tamaño variable, que oscila entre 1 y 4 cm de longitud y entre 0,6 y 2 cm de diámetro, según el cultivar. Cuando está madura su color es negro, negro violáceo o rojizo.

### **2.3. Ciclo bienal del olivo**

El crecimiento de los brotes y el desarrollo de los frutos son fenómenos cíclicos en el olivo (Figura 2). El crecimiento de los brotes se completa dentro del mismo año, mientras que la fructificación se completa en dos estaciones consecutivas, en el primer

año se produce la formación de las yemas y la inducción floral y en el segundo tiene lugar el desarrollo de las flores, la floración y el desarrollo del fruto, es decir, el olivo fructifica en ramos del año anterior.

El **crecimiento de los brotes** tiene lugar a partir de las yemas vegetativas que brotan al comienzo de la primavera. Existen dos etapas de crecimiento, la más importante tiene lugar en primavera y dura hasta mitad de julio, mientras que la segunda tiene lugar en otoño.

La **inducción floral** es un proceso que tiene lugar entre mediados de junio y finales de octubre, por el cual las yemas formadas en los brotes en crecimiento experimentan cambios fisiológicos que conducen a la formación de yemas de flor.

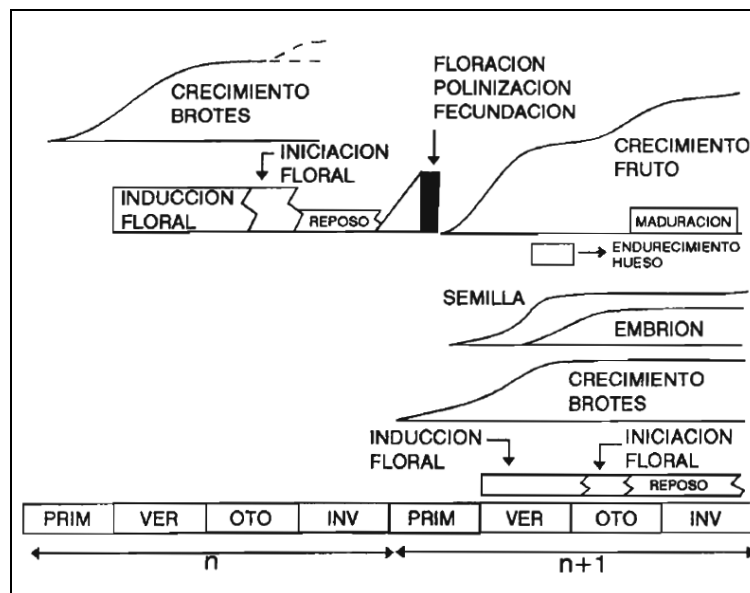
La **iniciación floral** tiene lugar a mediados de otoño en las yemas inducidas previamente. Una vez determinada su naturaleza floral, las yemas entran en un período de reposo o latencia caracterizado por la ausencia de crecimiento. Existen dos causas fundamentales de latencia, una es endógena y consiste en la incapacidad de la yema para crecer aunque las condiciones ambientales sean favorables (endolatenencia), este período comprende desde mediados de noviembre a mediados de enero. La segunda se debe a condiciones ambientales desfavorables que impiden el crecimiento (ecolatenencia), comprende desde que finaliza la endolatenencia hasta principios de marzo.

El **desarrollo floral** es el proceso de diferenciación floral que comienza con la salida de la dormancia de las yemas y se produce generalmente entre finales de marzo y mediados de abril (Aguilera and Ruiz, 2009).

Durante la **floración** el transporte del polen lo realiza principalmente el viento.

El olivo es una especie preferentemente alógama que favorece la fecundación cruzada mediante un mecanismo de autoincompatibilidad polen-pistilo.

El **desarrollo del fruto** hasta su maduración se produce a través de una serie de etapas que pueden durar entre 4 y 5 meses. La primera etapa se caracteriza por la división y expansión celular y concluye con el endurecimiento del endocarpo, que sucede unas 7 y 9 semanas después de la floración. A continuación el crecimiento del fruto se hace más lento y comienza la biosíntesis del aceite y su acumulación en las células parenquimáticas de la pulpa (Beltrán et al., 2008). Durante los meses de septiembre y octubre se produce el enverado o cambio de color de los frutos, en este momento comienza la maduración que termina entre los meses de noviembre y enero (Barranco et al., 1998), aunque el período de maduración es variable dependiendo de las condiciones climáticas y la variedad (Beltrán et al., 2008).



**Figura 2.** Ciclo bienal de olivo (Fuente: Rallo and Cuevas, 2008).

La simultaneidad entre procesos vegetativos y reproductores del mismo año y entre procesos de dos ciclos reproductores consecutivos origina fenómenos de competencia y de inhibición (Rallo, 1994; Barranco et al., 2008). En años de gran cosecha los asimilados procedentes de la fotosíntesis se dirigen hacia los frutos en desarrollo, limitando el crecimiento vegetativo del árbol, esto conlleva la reducción de las zonas potenciales de floración del año siguiente lo que podría afectar a la producción. Además, el desarrollo de la semilla está relacionado con la inhibición de la inducción floral (Stutte and Martin, 1983). Estos fenómenos explican la vecería del olivo, ya que un año de producción elevada disminuye el crecimiento vegetativo que dará lugar a la siguiente cosecha (Fernández-Escobar et al., 1992; Barranco et al., 2008). No obstante, la vecería del olivo es algo que puede evitarse con unas buenas prácticas agrícolas.

### **3. La salinización de los suelos**

La salinidad se define como la concentración de sales minerales disueltas, presentes en el agua o en el suelo, referidas a una unidad de volumen o de peso. Los principales solutos son los cationes  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{K}^+$ , y los aniones  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  y  $\text{NO}_3^-$  (Tanji, 1990).

En el suelo, la salinidad se expresa como la conductividad eléctrica del extracto acuoso saturado del suelo. Un suelo es clasificado como salino a partir de una CE de  $4 \text{ dS m}^{-1}$  (USDA-ARS, 2008), lo que equivale aproximadamente a  $40 \text{ mM NaCl}$  y genera una presión osmótica de aproximadamente  $0,2 \text{ MPa}$  (Munns and Tester, 2008).

Los suelos se dividen, generalmente, en tres categorías, suelos salinos, sódicos y

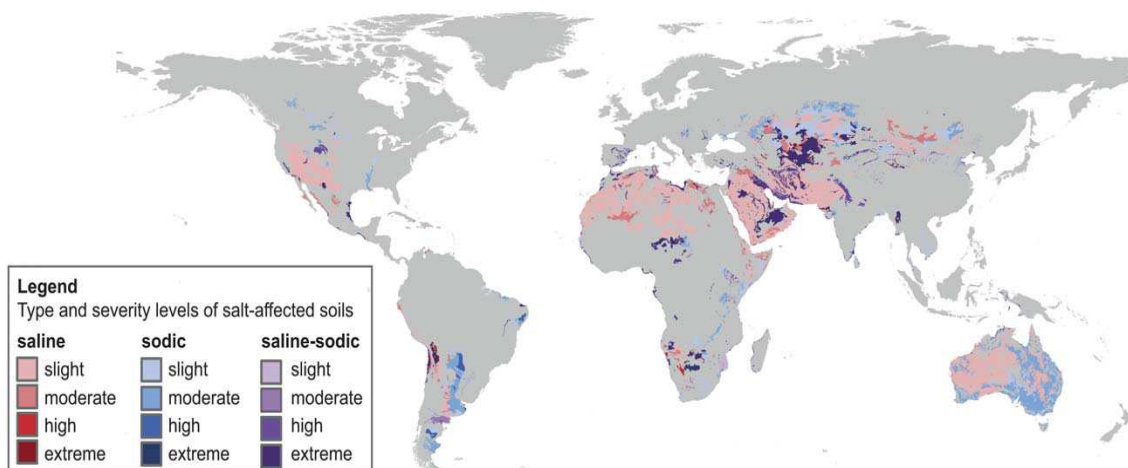
salino-sódicos (Qadir et al., 2000).

- Suelo salino: se caracterizan por una  $CE \geq 4 \text{ dS m}^{-1}$  y una relación de adsorción de  $\text{Na}^+$  (SAR)  $< 13$ .
- Suelo sódico: se caracterizan por una  $CE < 4 \text{ dS m}^{-1}$  y una relación de adsorción de  $\text{Na}^+$  (SAR)  $\geq 13$ .
- Suelo salino-sódico: se caracterizan por una  $CE \geq 4 \text{ dS m}^{-1}$  y una relación de adsorción de  $\text{Na}^+$  (SAR)  $> 13$ .

La salinidad en el agua y en el suelo puede tener un origen natural o ser inducida por el hombre. La causa natural más importante es la meteorización físico-química de las rocas y minerales de la corteza terrestre. En zonas áridas o semiáridas, donde el material geológico original es rico en sales, la salinización del suelo es un proceso que ocurre de forma natural, además, se trata de suelos poco permeables con mal drenaje y donde la evapotranspiración potencial supera a la lluvia. En zonas costeras, la corta distancia al mar favorece la acumulación de sales.

La principal causa de salinización originada por el hombre es el manejo inadecuado del agua en zonas de regadío. La aplicación excesiva de agua de riego en suelos con un drenaje limitado, conduce a la formación de capas freáticas superficiales que impiden el lavado de las sales del suelo e inducen el ascenso por capilaridad de agua y sales, y la consecuente evapoconcentración. Otra causa fundamental es el uso de aguas de baja calidad (salinas) para el riego de los cultivos, ya que su alto contenido de sales, junto con un mal manejo del riego, puede dar lugar a su acumulación en el suelo en concentraciones perjudiciales para los cultivos. Otro factor a tener en cuenta es la

cantidad y el tipo de fertilizantes aplicados al suelo. Algunos fertilizantes contienen altos niveles de sales y su aplicación excesiva o inadecuada conduce a la acumulación de estas sales en el suelo.



**Figura 3.** Mapa mundial de los suelos afectados por la salinidad (Fuente: Wicke et al., 2011).

Existen diferentes estimaciones de la extensión a nivel mundial de los suelos afectados por la salinidad. Según Wicke et al. (2011), 1128 millones de ha de suelo se encuentran afectadas por la salinidad, de las cuales el 60% son suelos salinos, el 26% son suelos sódicos y el 14%, suelos salino-sódicos. El 60% de los suelos afectados por la salinidad están ligeramente afectados, el 20% moderadamente, el 10% extremadamente y el 5% altamente afectados (Figura 3). Las cifras dadas por Wicke et al. (2011) son superiores a otras estimaciones previas, por ejemplo, según Szabolcs (1989), 955 millones de ha de suelo se encuentran afectadas por la salinidad, mientras que la FAO (2008) sitúa esta cifra en 831 millones de ha, de las cuales, 397 millones de ha son suelos salinos (48%) y 434 millones de ha son suelos sódicos (52%).

Por otra parte, de los 230 millones de ha de tierras de regadío, 45 millones de ha

(19%) son suelos afectados por la sal y, de los casi 1500 millones de ha de tierras de secano, lo son 32 millones de ha (2%).

#### 4. Efectos de la salinidad en las plantas

Munns and Tester (2008) definen el estrés como una circunstancia adversa que altera, o puede alterar, las funciones fisiológicas normales de un individuo.

Las plantas están expuestas a un gran número de condiciones o factores estresantes que pueden agruparse en bióticos y abióticos. El estrés biótico es causado por seres vivos como animales, plantas y agentes patógenos (bacterias, hongos, virus y viroides), mientras que el estrés abiótico es causado por agentes físicos, químicos o físico-químicos como sequía, salinidad, temperaturas extremas, encharcamiento, etc.

La **salinidad** en el suelo o en el agua es uno de los principales estreses y puede limitar la producción del cultivo. Sus efectos negativos sobre el crecimiento de la planta se asocian con el bajo potencial osmótico de la solución del suelo (estrés osmótico) que dificulta la absorción de agua por la raíz, un desequilibrio nutricional, el efecto específico de los iones (estrés iónico) o una combinación de todos estos factores (Ashraf, 1994; Marschner, 1995). La respuesta de la planta tiene lugar a través de dos fases, la fase osmótica y la fase iónica (Munns and Tester, 2008; Roy et al. 2014).

La **fase osmótica** comienza inmediatamente después del aumento de la concentración de sal en la zona de la raíz, por encima del nivel de tolerancia (40 mM NaCl para la mayoría de las plantas). Según Roy et al. (2014), en condiciones experimentales, la fase osmótica tiene lugar entre unos minutos y unos pocos días tras la aplicación de la sal, por tanto, es independiente de la acumulación de la sal en la parte

aérea de la planta. El aumento de las sales en el medio descende el potencial hídrico del suelo; en la planta, el potencial hídrico tiende al equilibrio con el de la solución exterior, por lo que a medida que la concentración de sal en el suelo aumenta, el agua está menos disponible para la planta provocando un descenso drástico del crecimiento, reducción de la expansión celular, área foliar y conductividad estomática (Munns and Tester, 2008).

La **fase iónica** se desarrolla a lo largo del tiempo (después de varios días o semanas) y se debe a la acumulación de iones en la parte aérea de la planta, especialmente en las hojas viejas, y a su incapacidad para tolerar dicha acumulación provocando la muerte de las hojas. Si la caída de las hojas es mayor que su tasa de formación, la capacidad fotosintética de la planta no podrá proveer de los azúcares requeridos por las hojas jóvenes, dando lugar a una tasa de crecimiento reducida (Munns and Tester, 2008).

Los principales efectos secundarios del estrés salino incluyen un desequilibrio nutricional, disfunción de la membrana, deterioro de la fotosíntesis y otros procesos bioquímicos, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y muerte celular programada (Serrano et al., 1999; Hasegawa et al., 2000).

El  $K^+$  es un elemento esencial para el crecimiento de las plantas y su producción (Zörb et al., 2014), interviene en la osmorregulación de la célula y el mantenimiento de la turgencia, en el cierre y apertura estomática, en la activación de un gran número de enzimas y en el equilibrio de cargas en las membranas (Marschner, 1995). Las similares estructuras fisicoquímicas del  $Na^+$  y el  $K^+$  hacen que el  $Na^+$  compita con el  $K^+$  por la entrada en la célula, lo que conlleva una deficiencia de  $K^+$  (Bandeh-hagh et al., 2008) y, en consecuencia, un descenso de la relación  $K^+/Na^+$ . El  $Na^+$  también puede afectar al



$\text{Ca}^{2+}$  desplazándolo de la superficie de la membrana plasmática, donde desempeña una función importante en la regulación de la selectividad de la absorción iónica, lo que es esencial para el mantenimiento de una concentración apropiada de  $\text{K}^+$  en la célula (Cramer et al., 1987).

La salinidad también afecta a la fotosíntesis y a la conductividad estomática (Munns and Tester, 2008; Chaves et al., 2009), lo cual influye de forma importante en el crecimiento. El cierre estomático es una respuesta de la planta que tiene lugar inmediatamente después de su exposición a la sal y es inducida por la fase osmótica (Munns and Tester, 2008). Por otra parte, también tiene lugar un descenso de la fotosíntesis que puede estar asociado al descenso de la conductividad estomática o mesofílica (Bongi and Loreto, 1989; Paranychianakis and Chartzoulakis, 2005), y a limitaciones bioquímicas (Flexas and Medrano, 2002; Loreto et al., 2003). Además también influyen la reducción del área foliar, el contenido de clorofila y la disminución de la eficiencia del fotosistema II (Chinnusamy et al., 2005).

Otro efecto secundario de la salinidad es el estrés oxidativo inducido por la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) como el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ), oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ), ozono ( $\text{O}_3$ ), alcoxilo ( $\text{RO}^\cdot$ ), peroxilo ( $\text{RO}_2^\cdot$ ) e hidroperoxilo ( $\text{HO}_2^\cdot$ ). Las ROS se generan continuamente en procesos metabólicos que tienen lugar en la mitocondria, en los peroxisomas y en el citoplasma; sin embargo, un exceso en su producción puede alterar el metabolismo a través del daño oxidativo producido en los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (McCord, 2000). En condiciones de salinidad, el incremento en la producción de las ROS se asocia al descenso de la fotosíntesis (Munns and Tester, 2008).

#### **4.1. Efectos de la salinidad en el olivo**

La salinidad produce en el olivo unos síntomas de toxicidad visuales, como son un reducido crecimiento, necrosis, clorosis y enrollamiento de las hojas, marchitez de las flores, necrosis de la raíz y defoliación. La necrosis en las hojas comienza a desarrollarse en el ápice principalmente de hojas viejas (Benlloch et al., 1991; Tattini et al., 1992). La defoliación tiene lugar con altas concentraciones de sal, sin embargo, estas hojas no muestran necesariamente síntomas visuales de toxicidad (Gucci and Tattini, 1997).

Los principales efectos de la salinidad en el olivo son un descenso del crecimiento (Chartzoulakis, 2005; Vigo et al., 2005; Perica et al., 2008; Kchaou et al. 2010, 2013; Bader et al., 2015) y una reducción de la fotosíntesis y la conductividad estomática (Gucci and Tattini, 1997; Chartzoulakis et al., 2002). Concretamente se ha descrito una reducción en la elongación de tallo, área foliar total y área final de la hoja, peso seco, longitud de la raíz y número de hojas y tallos (Therios and Misopolinos, 1988; Bartolini et al., 1988; Tattini et al., 1992, 1995; Marín et al., 1997; Chartzoulakis et al., 2002). Además, se han descrito cambios en la morfología de la hoja como un aumento del grosor de la pared celular (Bongi and Loreto, 1989).

Por otra parte, la salinidad también afecta a la distribución de la materia seca, afectando más a la parte aérea que a la raíz (Chartzoulakis et al., 2002; Melgar et al., 2007). Algunos autores asocian el descenso en el crecimiento y el daño en la hoja con niveles superiores al 0,4% de Na<sup>+</sup> en la hoja de olivo (Klein et al., 1994; Tattini et al., 1992; Kchaou et al., 2010); sin embargo, esta reducción del crecimiento depende del cultivar y del tiempo de exposición a la sal (Chartzoulakis, 2005). Según Tattini et al.

(1995), esta reducción en los parámetros de crecimiento puede atenuarse mediante un período de recuperación sin sal.

En general, la productividad del olivo desciende con la salinidad (Gucci and Tattini, 1997; Chartzoulakis et al., 2002; Chartzoulakis, 2005), sin embargo, algunos autores describen efectos contradictorios dependiendo del nivel de sal, la densidad de plantación y el cultivar (Bouaziz, 1990; Weisman et al., 2004; Melgar et al., 2009). En cuanto a la calidad del aceite, se ha descrito un aumento en el contenido de fenoles con la salinidad (Weisman et al., 2004; Ben Ahmed et al., 2009; Stefanoudaki et al., 2009), así como, una alteración en la composición de ácidos grasos, descendiendo la relación ácidos grasos insaturados/saturados (Zarrouk et al., 1996; Weisman et al., 2004; Chartzoulakis, 2005; Stefanoudaki et al., 2009).

## **5. Mecanismos de tolerancia al estrés salino**

Las plantas han desarrollado tres estrategias principalmente para contrarrestar el estrés salino: detoxificación, restablecimiento de la homeostasis y regulación del crecimiento (Zhu, 2001). Para ello, han desarrollado diferentes mecanismos de tolerancia; el uso de un mecanismo u otro depende del tipo de planta. Las plantas se clasifican en halófitas o glicófitas en función de su tolerancia a la salinidad; las halófitas (estrictas o facultativas) son aquellas que crecen en suelos con una alta concentración de sales; mientras que, las glicófitas son aquellas que se desarrollan en suelos libres de sales (glicófitas obligadas), o con un nivel de sal bajo (glicófitas tolerantes). La mayoría de las plantas cultivadas se encuentran entre las glicófitas (Greenway and Munns, 1980). Distintos autores diferencian tres tipos de mecanismos de tolerancia al estrés; la tolerancia al estrés osmótico, la exclusión de iones y la tolerancia de los tejidos (Munns

and Tester, 2008; Roy et al., 2014).

El estrés osmótico reduce de forma inmediata la expansión celular en la hoja y la raíz, y provoca el cierre de los estomas. Una menor respuesta al estrés osmótico no reduciría el crecimiento ni la conductividad estomática, sin embargo, esto sólo beneficiaría a las plantas con suficiente disponibilidad de agua. Un aumento en la **tolerancia al estrés osmótico** se caracteriza principalmente por un incremento en la capacidad de la planta para continuar formando hojas nuevas y está regulado por una cadena de señales desde la raíz hacia la parte aérea (Munns and Tester, 2008).

El **mecanismo de exclusión de iones** ( $\text{Na}^+$ ) de la raíz es muy importante en la minimización del daño en algunas plantas que crecen en medio salino, y se basa en la existencia de barreras que interrumpen la absorción y/o el transporte de sales (Larcher, 1995). El  $\text{Na}^+$  ejerce su toxicidad principalmente en la hoja, donde se acumula tras ser depositado por la corriente de transpiración, la mayor parte del  $\text{Na}^+$  que llega desde la raíz, permanece en la parte aérea ya que la recirculación del  $\text{Na}^+$  en el floema de nuevo hacia la raíz es mucho menor. Por tanto, evitar que el  $\text{Na}^+$  llegue a la parte aérea es de mayor importancia que evitar que entre en la raíz (Munns and Tester, 2008). Este mecanismo de exclusión de iones es utilizado por plantas glicófitas (Ashraf, 2004).

La **tolerancia de los tejidos** se debe a tres mecanismos, acumulación de  $\text{Na}^+$  en la vacuola, ajuste osmótico mediante la síntesis de solutos compatibles y detoxificación de las ROS (Roy et al., 2014).

Para que la planta pueda absorber agua del suelo y mantener la turgencia celular necesaria para el crecimiento, debe acumular solutos en la célula para alcanzar un potencial hídrico inferior al potencial hídrico del suelo (Ashraf, 2004). En los suelos

salinos, los solutos más abundantes son los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , en el caso de las plantas halófitas, el ajuste osmótico tiene lugar por la acumulación de iones inorgánicos (principalmente  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ); sin embargo, las plantas glicófitas no pueden realizar el ajuste osmótico mediante la absorción de iones tóxicos del medio, por tanto, tienen que sintetizar otros solutos compatibles con las reacciones metabólicas que tienen lugar en el citosol (Greenway and Munns, 1980; Wyn Jones, 1981; Ashraf, 1994), lo cual requiere un gasto de energía que deja de ser usada en procesos como el crecimiento (Larcher, 1995).

Los principales osmolitos compatibles que se encuentra en plantas superiores son, azúcares (manitol, sacarosa, glucosa o fructosa), aminoácidos, proteínas y compuestos cuaternarios del amonio como la glicina betaína (Ashraf, 2004). Dentro de los aminoácidos, la prolina tiene una especial relevancia, ya que su acumulación en condiciones de salinidad es mayor que la de otros aminoácidos (Ashraf, 1994; Ali et al., 1999; Abraham et al., 2003). En el caso de las plantas halófitas, cuando el  $\text{Na}^+$  aumenta en el citoplasma de las células, es acumulado en las vacuolas. Este incremento de la concentración de  $\text{Na}^+$  en la vacuola requiere un aumento de la presión osmótica en el citosol para mantener su volumen; para ello se produce un aumento en la concentración de  $\text{K}^+$  y de solutos compatibles (Munns and Tester, 2008).

Para evitar el daño oxidativo producido por el aumento de las ROS en condiciones de estrés salino, las plantas desarrollan mecanismos para su eliminación. Algunos de los solutos compatibles producidos en las plantas como la prolina o el manitol muestran una actividad antioxidante (Shen et al., 1997; Ashraf and Foolad, 2007; Seki et al., 2007). Sin embargo, el principal mecanismo antioxidante es el

incremento de las enzimas del estrés oxidativo, como son, la superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, catalasa, guaiacol peroxidasa o la glutatión reductasa (Demiral and Turkan, 2005). Mediante la actividad coordinada de estas enzimas en los diferentes compartimentos celulares se alcanza el equilibrio entre la formación de las ROS y su eliminación (Munns and Tester, 2008).

### **5.1. Mecanismos de tolerancia en el olivo**

El olivo es una planta glicófita moderadamente tolerante a la salinidad (Rugini and Fedeli, 1990), aunque su tolerancia depende del cultivar (Tattini et al., 1992; Benlloch et al., 1994; Tattini, 1994; Marin et al., 1995; Chartzoulakis et al., 2002; Chartzoulakis, 2005; Tabla 4).

La tolerancia a la salinidad en el olivo está asociada a un mecanismo de exclusión de iones y de retención de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  a nivel de la raíz, que limita la acumulación de estos iones potencialmente tóxicos en la parte aérea (Tattini et al., 1994; Chartzoulakis, 2005; Kchaou et al., 2010). Sin embargo, la mayoría de las investigaciones se centran en el  $\text{Na}^+$ , ya que el olivo es menos sensible al  $\text{Cl}^-$ , especialmente con altas concentraciones de sal (Aragüés et al., 2005), y su absorción y transporte a la parte aérea es menor que la del  $\text{Na}^+$  (Tattini et al., 1992). La efectividad de este mecanismo de exclusión depende del nivel de sal. Según Chartzoulakis et al. (2002) el mecanismo de exclusión es efectivo hasta 50 mM NaCl (salinidad moderada) independientemente de la tolerancia del cultivar, mientras que, un mayor nivel de sal provoca el transporte del  $\text{Na}^+$  y su acumulación en la parte aérea, dando lugar a síntomas de toxicidad en los cultivares sensibles. Sin embargo, otros autores afirman que la exclusión de  $\text{Na}^+$  con 50 mM NaCl es efectiva en cultivares tolerantes (Kchaou et

al., 2010).

**Tabla 4.** Clasificación de cultivares de olivo por su tolerancia a la salinidad en función de su crecimiento.

<b>Tolerancia</b>	<b>Cultivar</b>	<b>Fuente</b>
Tolerantes	Megaritiki, Lianolia, Kerkiras	Therios and Misopolinos 1988
	Kalamata, Kothreiki	Chartzoulakis et al., 2002
	Frantoio	Tattini et al., 1992, 1994
	Arbequina, Picual, Jabaluna, Nevadillo, Lechín de Sevilla, Cañivano, Escarabajuelo.	Benlloch et al., 1994; Marin et al., 1995
	Hamed	El-Sayed Emtithal et al., 1996
	Chemlali	Bouaziz, 1990
	Barnea	Weisman et al., 2004
Moderadamente tolerantes	Chorro, Changlot Real, Verdial de Vélez, Gordal Sevillana, Oblonga, Blanqueta, Alameño, Redondil, Hojiblanca, Cañivano Negro, Lechín de Granada, Galego, Manzanilla de Sevilla	Marin et al., 1995
	Amphissis, Koroneiki	Therios and Misopolinos, 1988
	Mastoidis, Valanolia, Adramitini	Chartzoulakis et al., 2002
	Maurino, Coratina, Carolca Maraiolo	Briccoli Bati et al., 1994; Tattini et al., 1994; Bartolini et al., 1991
	Aggezi, Mostazal, Toffahi, Wardan	El-Sayed Emtithal et al., 1996
	Nabali Muhassan	Al-Absi et al., 2003
	Sensibles	Pajarero, Chetoui, Calego, Cobrancosa, Meski
Chalkidikis, Throubolia, Chondrolia		Therios and Misopolinos, 1988
Aguromanaki		Chartzoulakis et al., 2002
Leccino		Tattini et al., 1994
Bouteillan, Nabal		El-Sayed Emtithal et al., 1996

Por otra parte, el  $K^+$  y el  $Ca^{2+}$  también están implicados en la tolerancia al estrés salino. Tattini et al. (2008) describen que, en olivo, la tolerancia a la salinidad no sólo está relacionada con la exclusión de  $Na^+$  de la raíz, sino también con el mantenimiento de una relación  $K^+/Na^+$  apropiada; ya que, según Chartzoulakis et al. (2002), el intercambio  $K^+-Na^+$  en la membrana plasmática en las células de la raíz está implicado en la regulación del transporte de  $Na^+$  en la parte aérea. Otros autores indican que el

$\text{Ca}^{2+}$  está relacionado con el mecanismo de exclusión y retención de  $\text{Na}^+$  de la raíz (Melgar et al., 2006; Tattini and Traversi, 2008).

Según Gucci and Tattini (1997), un crecimiento vigoroso se relaciona de forma negativa con la supervivencia. Los cultivares con mayor crecimiento absorben y transportan hacia la parte aérea mayor cantidad de  $\text{Na}^+$ , haciéndolos más susceptibles a los daños producidos por el estrés salino. Además, los cultivares menos vigorosos dirigen la energía necesaria para el crecimiento hacia la síntesis de osmolitos y hacia el mantenimiento del mecanismo de exclusión y retención de  $\text{Na}^+$  de la raíz (Tattini et al., 2008).

Otro mecanismo del olivo para hacer frente a la salinidad y mantener la turgencia celular es el ajuste osmótico. En olivo, se ha descrito la acumulación de glucosa y manitol principalmente (Tattini et al., 1996; Rejškova et al., 2007), que constituyen entre un 20 y un 25% del ajuste osmótico (Gucci et al., 1997). También se ha descrito la acumulación de prolina como una respuesta del olivo al estrés salino (Ben Ahmed et al., 2010, 2011; Demiral et al., 2011), sin embargo, según Petridis and Therios (2012), su aumento depende del nivel de NaCl y del cultivar.

Algunos autores describen el descenso de la conductividad estomática y de la transpiración en olivo como un mecanismo de adaptación al estrés salino, más que a una consecuencia negativa (Tattini et al., 2002), ya que al descender la corriente de transpiración desciende la absorción y transporte del  $\text{Na}^+$  (Gucci and Tattini, 1997)

## **6. Los reguladores del crecimiento y la salinidad**

Las fitohormonas, denominadas reguladores del crecimiento cuando son sintetizadas químicamente (Kaya et al., 2009), son compuestos derivados de rutas



biosintéticas de las plantas, que pueden actuar localmente (en el lugar de la síntesis) o ser transportadas a otro lugar de la planta para participar en el crecimiento y desarrollo de respuestas, tanto a condiciones ambientales como a situaciones de estrés (Peleg and Blumwald, 2011).

Las fitohormonas tienen un importante papel en la respuesta de la planta al estrés abiótico, en el cual la planta dedica sus recursos a la supervivencia en dichas condiciones estresantes, dando lugar a una reducción del crecimiento (Skirycz and Inzé, 2010). Además, el estrés abiótico altera los niveles de fitohormonas en la planta (Morgan, 1990). En cuanto al estrés salino, se ha demostrado la influencia de la fitohormonas en la tolerancia a la salinidad a través de la regulación de diversos procesos fisiológicos y mecanismos bioquímicos de la planta dirigidos a su adaptación a estas condiciones adversas (Fatma et al., 2013). Por tanto, la aplicación exógena de fitohormonas ha sido propuesta como una alternativa para hacer frente al estrés salino (Iqbal et al., 2012). Sin embargo, el mecanismo desarrollado para hacer frente a la salinidad depende de cada fitohormona.

El **ácido abscísico (ABA)** es llamado la “hormona del estrés”, ya que regula diferentes procesos del desarrollo de la planta, así como la respuesta adaptativa a diferentes tipos de estrés (Zhu, 2002; Sharma et al., 2005; Hadiarto and Tran, 2011). La exposición de las plantas a un estrés abiótico, entre los que se encuentran el estrés hídrico y salino, induce un rápido incremento en los niveles de ABA endógenos (Zhu, 2002; Kang et al., 2005; Mahajan and Tuteja, 2005) y la expresión de los genes que regulan su síntesis (Zhu, 2002). El ABA contribuye a la adaptación de las plantas al estrés a través de la regulación del equilibrio hídrico, mediante el cierre de los estomas

(Wilkinson and Davies, 2010), y al equilibrio osmótico, mediante la acumulación de proteínas y otros osmoprotectores (Chavez and González, 2009; Ryu and Cho, 2015). Sin embargo, un aumento en los niveles de ABA en hoja conlleva un descenso del crecimiento. El incremento del ABA como consecuencia del estrés salino en arroz (Moons et al., 1997), plantas del género *Brassica* (He and Cramer, 1996), judía (Cabot et al., 2009) y maíz (Cramer and Quarrie, 2002), se relaciona con una inhibición del crecimiento. En cambio, el incremento del ABA en la raíz no afecta a su crecimiento, lo que implica una sensibilidad diferente de los tejidos a esta hormona, ya sea su origen endógeno o exógeno (Creelman et al., 1990; Jia et al., 2002).

El **ácido indolacético (AIA)** fue la primera fitohormona de tipo auxina descubierta, y se sintetiza principalmente en el tallo de la planta. Existe poca información respecto a la relación entre el estrés salino y los niveles de AIA en plantas y su papel en la tolerancia al estrés. Según Ribaut and Pilet (1991), en condiciones de estrés, la variación en el contenido de AIA es similar al de ABA y su aumento se relaciona con una reducción en el crecimiento. Sin embargo, otros autores describen un descenso del AIA en condiciones de salinidad en arroz (Prakash and Prathapasenan, 1990; Nilsen and Orcutt, 1996) y tomate (Dunlap and Binzel, 1996). Según Sakhabutdinova et al. (2003), la salinidad provoca una disminución progresiva en el nivel de AIA en el sistema radicular de las plantas.

El **ácido giberélico (GA<sub>3</sub>)** afecta, regula o modula múltiples y variadas respuestas del crecimiento. La rápida acumulación de GA<sub>3</sub> es característica en plantas expuestas a estrés abiótico (Xu et al., 1994; Lehmann et al., 1995; Fahad et al., 2015), y su importancia en la mejora de la tolerancia al estrés salino ha sido descrita por varios

autores (Hisamatsu et al., 2000; Hoque and Haque, 2002; Iqbal et al., 2011). La GA<sub>3</sub> mejora el efecto adverso de la salinidad y restablece el crecimiento y desarrollo normal de *Glycine max* en condiciones de estrés salino mediante la regulación de los niveles de otras fitohormonas (Hamayun et al., 2010). En trigo, la reducción del crecimiento por el estrés salino puede evitarse de forma bastante efectiva mediante el tratamiento de las semillas con GA<sub>3</sub> (Kumar and Singh, 1996). Por otra parte, se ha descrito una mejora del estado hídrico de la planta y en la eficiencia en el uso del agua en condiciones de estrés salino (Yamaguchi, 2008). En tomate, la aplicación de GA<sub>3</sub> reduce la resistencia estomática y mejora la eficiencia en el uso del agua a bajos niveles de sal (Maggio et al., 2010). El tratamiento con GA<sub>3</sub> puede aumentar el crecimiento de un cultivo y su productividad en condiciones de estrés salino; por tanto, para restablecer la actividad metabólica normal de la planta, la aplicación exógena de esta fitohormona puede ser beneficiosa en condiciones ambientales estresantes (Iqbal et al., 2011).

El **ácido salicílico (AS)** tiene un papel fundamental en la respuesta de la planta frente al estrés biótico, sin embargo, en la actualidad se ha descrito su implicación en la respuesta de la planta frente a diferentes estreses abióticos, incluyendo el estrés salino (Khodary, 2004; Javid et al., 2011; Fahad and Bano, 2012; Bastam et al., 2013; Iqbal et al., 2014; Fahad et al., 2014). La aplicación de AS incrementa el contenido de pigmentos y la tasa fotosintética en sorgo y soja en condiciones de estrés salino (Maiti, 1995; Zhao et al., 1995). También se ha descrito un aumento en el crecimiento de la raíz. La tolerancia a la salinidad por la aplicación de AS ha sido asociada a la acumulación de solutos compatibles como prolina y glicina betaína (Palma et al., 2009), y a una activación de sistema antioxidante (Nazar et al., 2011). Además, se ha descrito un descenso en la acumulación de iones tóxicos en maíz y mostaza (Gunes et al., 2007).

Sin embargo, en ocasiones, el efecto de la aplicación exógena de AS resulta contradictorio ya que un déficit de AS o un nivel elevado aumenta la susceptibilidad de la planta al estrés, sin embargo, la aplicación de de AS en concentraciones de 0,1 a 0,5 mM mejora la tolerancia dependiendo del tipo de planta y su estado de crecimiento (germinación, plántula, etc.) (Borsani et al., 2001; Yuan and Lin, 2008).

Las **poliaminas**, entre las que se encuentran la tetraamina espermina (SPM), la triamina espermidina (SPD) y su precursor, la diamina putrescina (PUT), son aminas alifáticas polibásicas que se distribuyen por todas las células de las plantas (Boucherau et al., 1999). En los últimos años se ha dedicado una gran atención a la implicación de las poliaminas como mensajeros secundarios en la respuesta a los diferentes estreses ambientales (Alcazar et al., 2006; Liu et al., 2007), entre los que se encuentran la salinidad y la deficiencia en potasio (Chattopadhyay et al., 2002; Simon-Sarkadi et al., 2002). El efecto protector de las poliaminas se debe principalmente a su naturaleza cationica y a su pH celular, que les permite interactuar electrostáticamente con macromoléculas policationicas como el ADN, ARN, proteínas y fosfolípidos (Boucherau et al., 1999). Se ha descrito su implicación en la estabilización de membranas biológicas y estructuras celulares mediante su unión a fosfolípidos de membrana, eliminación de radicales libres, ajuste osmótico, mantenimiento del equilibrio catión-anión, regulación de los canales iónicos e incremento de la actividad de enzimas antioxidantes (Verma and Mishra, 2005; Tang and Newton, 2005).

La aplicación exógena de poliaminas se considera una alternativa efectiva en la mejora de la tolerancia a la salinidad de los cultivos y a su productividad bajo condiciones de alta salinidad (Chattopadhyay et al., 2002). La aplicación exógena de

SPD juega un papel fundamental previniendo la pérdida de electrolitos y amino ácidos o en la recuperación de los daños de la membrana plasmática en respuesta a la salinidad en arroz, en la tolerancia a las heladas y en la protección frente al estrés hídrico en pepino (Roy et al., 2005; Kubiś, 2008). También se ha descrito su actividad antirradicales libres (Kubis, 2001).

La **quinetina (QUIN)** es una citoquinina artificial que no es sintetizada por las plantas. Diferentes autores han descrito una mejora en el crecimiento de plantas en condiciones de estrés salino (Barciszewski et al., 2000; Fahad et al., 2014). Las citoquininas se producen en el ápice de la raíz y son transportadas a través del xilema hacia la parte aérea, donde regulan los procesos de crecimiento de la planta (Zahir et al., 2001; Kakimoto, 2003). El descenso de citoquinina por el estrés salino la convierte en un factor limitante en dichas condiciones. Por tanto, la aplicación exógena de quinetina provoca una menor inhibición del crecimiento de plántulas de garbanzo (Boucaud and Ungar, 1976), trigo (Naqvi et al., 1982) y patata (Abdullah and Ahmad, 1990) en condiciones de salinidad. Por otra parte, el efecto positivo del tratamiento con quinetina se debe a su actividad antirradical y a su implicación en los mecanismos antioxidantes relacionados con la protección de la purina (Chakrabarti and Mukherji, 2003; Javid et al., 2011).

## **7. Justificación del trabajo**

La salinización de los suelos se ha convertido en uno de los principales problemas para la agricultura, ya que, según datos de la FAO (2008), la extensión de suelos salinos se sitúa alrededor de los 831 millones de ha, de los cuales 80 millones son tierras cultivables (Ghassemi et al., 1995). Inevitablemente, la superficie de los suelos

afectados por la salinidad irá en aumento por procesos naturales como la meteorización de las rocas y minerales de la superficie terrestre; además, este proceso se incrementa por las malas prácticas agrícolas, como un manejo inadecuado del riego o un exceso en el uso de los fertilizantes.

Este problema es de mayor gravedad en zonas áridas y semiáridas, como la zona del Mediterráneo, principal área de cultivo del olivo, donde la salinidad se hace frecuente debido a la elevada evapotranspiración asociada a la escasez e irregularidad de las lluvias. Además, el cambio climático dará lugar a un aumento de la temperatura y cambios en las precipitaciones lo que disminuirá aún más la disponibilidad de agua en estas regiones (IPCC, 1996).

Según datos de la ONU, la población mundial pasará de 6.800 millones de personas en 2009 a 9.100 millones en 2050, lo que supone un incremento del 34% de la población (<http://www.fao.org/news/story/es/item/35675/icode/>), un tercio más de bocas que alimentar. Casi todo el incremento demográfico tendrá lugar en los países en desarrollo y, se estima que, en 2050 un 70% de la población vivirá en zonas urbanas, lo que incrementará la industrialización. Esto, junto con la mejora del nivel de vida y el aumento de la agricultura de regadío incrementará la demanda de agua.

Por tanto, a la vez que aumenta la agricultura de regadío, una gran proporción de agua dulce tendrá que utilizarse en zonas urbanas e industrias, lo que irá en detrimento de la agricultura (Hamdi et al., 1995; Correia, 1999). Como consecuencia, para superar dicha escasez de agua y satisfacer la creciente demanda para una agricultura que deberá alimentar a una población en aumento, el uso de aguas de baja calidad (Tabla 5) sería una alternativa en muchos países (Oron et al., 2002). Sin embargo, el uso de este tipo de

agua trae consigo un descenso de la productividad de los cultivos, así como, un aumento de la salinización de los suelos. Por ello, aunque la baja calidad del agua no se opone a su potencial uso en agricultura, el estudio de los efectos de la salinidad sobre los cultivos y el uso de cultivares tolerantes es recomendable para mantener la productividad en niveles aceptables y para garantizar la sostenibilidad del suelo.

**Tabla 5.** Conductividad eléctrica (CE) de los distintos tipos de agua.

Clasificación del agua	CE (dS m <sup>-1</sup> )
Agua dulce	<0,6
Ligeramente salobre	0,6-1,5
Salobre	1,5-3,0
Moderadamente salina	3,0-8,0
Salina	8,0-15,0
Altamente salina	15,0-45,0

Fuente: Paranychianakis and Chartzoulakis (2005).

Por otra parte, el olivo es considerado una planta moderadamente tolerante a la salinidad (Rugini and Fedeli, 1990; Marín et al., 1995; Chartzoulakis, 2005), pudiéndose regar con agua de CE (1,8-2,5 dS m<sup>-1</sup>) superior a la tolerada por otros cultivos (Paranychianakis and Chartzoulakis, 2005). Además, según Bernstein (1965) el crecimiento del olivo se reduce sólo un 10% cuando la CE del suelo es de 4-6 dS m<sup>-1</sup>. Sin embargo, la tolerancia a la salinidad es cultivar dependiente, de ahí la importancia del estudio de los distintos cultivares del olivo (Chartzoulakis, 2005).

En estudios recientes realizados con cultivares de importancia en otros países, se ha observado que la tolerancia a la salinidad en olivo se asocia a un mecanismo de exclusión de iones de la parte aérea (Tattini et al., 1995; Chartzoulakis, 2005; Kchaou et al., 2010; Bader et al., 2015), por tanto, es necesario profundizar en los mecanismos

implicados en la tolerancia de cultivares españoles para poder seleccionar aquellos más tolerantes.

Sin embargo, la existencia en España de amplias zonas olivareras monovarietales, hace necesario el desarrollo de métodos que mejoren la tolerancia de estos cultivares, con la finalidad de optimizar su producción y minimizar los efectos adversos de la salinidad. Por tanto, el presente trabajo se centra, principalmente, en el cv. Picual, que es el más importante de nuestro país y actualmente ocupa 850.000 ha en Andalucía. En la provincia de Jaén, donde el cv. Picual ocupa el 99% de la superficie olivarera, la gran tradición de este cultivo se incrementa cada año, manifestando así su gran valor socioeconómico.



## **II. Objetivos**

---



El objetivo general de esta Tesis Doctoral es profundizar en los mecanismos de tolerancia que utiliza el olivo en respuesta a la salinidad. La hipótesis de partida se centra en estudiar las alteraciones en la fisiología de la planta y abordar los posibles sistemas de adaptación al estrés salino, tales como acúmulo de iones salinos en raíz y/o parte aérea, formación de osmolitos y cambios en el sistema de defensa antioxidante. Este objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar la tolerancia a la salinidad de distintos cultivares de olivo de importancia socioeconómica en la región Mediterránea.
2. Determinar la influencia del nivel de NaCl, en la respuesta del cv. Picual al estrés salino, en función del tiempo.
3. Estudiar la implicación de distintos reguladores del crecimiento en la tolerancia del cv. Picual a la salinidad.
  - 3.1. Influencia del pretratamiento con ácido giberélico, ácido indolacético, ácido salicílico y quinetina en la adaptación de estaquillas enraizadas del cv. Picual al estrés salino.
  - 3.2. Influencia del pretratamiento con ácido giberélico, ácido indolacético, ácido salicílico, espermidina y quinetina en la adaptación de plantas de 1 año del cv. Picual al estrés salino.
  - 3.3. Efecto de la aplicación exógena del ácido abscísico en plantas del cv. Picual en condiciones de salinidad.



## **III. Material y Métodos**

---



## 1. Material vegetal

La especie objeto de estudio en el presente trabajo ha sido *Olea europaea* L., glicófita de gran interés agrícola en la región Mediterránea.

**Tabla 6.** Denominación y características de los cultivares de *Olea europaea* utilizados en el presente trabajo.

Cultivar	Denominación y sinonimias	Aptitud	Difusión e importancia	Consideraciones agronómicas y comerciales
<b>Casta Cabra</b>	Hojiblanca, Casta de Lucena, Lucentino.	Doble aptitud	Tercer cultivar español en cuanto a superficie. Ocupa más de 265.000 ha en las provincias de Córdoba (43%), Málaga (30%), Sevilla (17%) y Granada (10%).	Productividad elevada y alternante. Contenido en aceite bajo pero muy apreciado por su calidad, aunque presenta baja estabilidad. Resistente a suelos calizos, sequía y tolerante al frío. Susceptible a repilo, tuberculosis y verticilosis.
<b>Cornicabra</b>	Cabrilla, Cornal, Cornatillo, Corneja, Cornetilla, Cornezuelo, Corniche, Longuera,	Doble aptitud	Segundo cultivar español en cuanto a superficie cultivada. Actualmente se cultiva en las provincias de Ciudad Real, Toledo, Madrid, Badajoz y Cáceres.	Fácil propagación por estaquillado semileñoso. Entrada en producción tardía, productividad elevada. Alto rendimiento graso y aceite de calidad, elevada estabilidad. Adaptación a suelos pobres y zonas secas y frías. Especialmente sensible a tuberculosis, verticilosis, repilo y mosca.
<b>Frantoio</b>	Bresa Fina, Comune, Corregiolo, Crognolo, Infrantoio, Laurino, Nostrato, Lunga,	Almazara	Principal cultivar italiano. Se cultiva en las regiones centrales de Italia. Presente en todo el mundo.	Productividad elevada y capacidad de adaptación a diferentes condiciones medio-ambientales. Sensible al frío. Capacidad de enraizamiento elevada. Contenido graso medio-elevado. Tolerante a verticilosis. Sensible a tuberculosis y mosca. Excelentes características organolépticas.
<b>Ocal</b>	Aceituna de Cártama, Gordal, Gordal Ecijano, Llorón	Doble aptitud	Cultivar difundido en Estepa y Campiña y en toda la provincia de Córdoba donde ocupa cerca de 5200 ha. También se localiza en Badajoz y Cádiz.	Productividad es media-elevada. Se destinan para la obtención de aceite por su elevado contenido graso y también para verdeo, por el gran tamaño de su fruto. Tolerante a la sequía y al frío y susceptible a repilo, mosca y tuberculosis.
<b>Picual</b>	Andaluza, Blanco, Corriente, de Aceite, Jabata, Lopereño, Marteño, Nevadillo, Nevado, Picúa, Salgar,	Almazara	Cultivar más importante de España. Ocupa en Andalucía más de 850.000 ha, en las provincias de Jaén (97%), Córdoba (38%) y Granada (40%). Es la base de las nuevas plantaciones en todo el país.	Fácil propagación vegetativa por estaca y por estaquillado semileñoso. Entrada en producción precoz. Productividad elevada y constante, rendimiento graso elevado y aceite de calidad media y estable. Tolerante a tuberculosis y lepra. Susceptible a repilo, verticilosis y mosca.
<b>Picudo</b>	Basta, Carrasqueño de Córdoba, Carrasqueño de Lucena, Castúo, Paseto, y Picudo Blando.	Doble aptitud	Uno de los principales cultivares españoles, aunque no es dominante en ninguna comarca. Cultivado en Córdoba, Granada, Málaga y Jaén.	Elevada capacidad de enraizamiento. Producción precoz y productividad elevada. Excelentes características organolépticas. Buen rendimiento graso. Tolerancia a suelos calizos y al exceso de humedad. Muy sensible a lepra y tuberculosis y sensible a repilo y verticilosis.

Fuente: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente y Barranco et al. (2008).

El material de partida fueron estaquillas enraizadas (Figuras 4 y 5), plantas de 6 meses y plantas de 1 año de edad, suministradas por Laserplant C.B. y Viveros Jarico S.L. Se han utilizado 5 cultivares españoles ('Casta Cabra', 'Cornicabra', 'Ocal', 'Picual' y 'Picudo') y el cultivar italiano 'Frantoio', cuyas características se destacan en la tabla 6.

## **2. Cultivo de las plantas**

En el vivero se seleccionaron plantas sanas y de tamaño uniforme, las cuales, ya en el laboratorio, se trasplantaron en macetas de 1 l de capacidad que contenían una mezcla de arena y perlita (1:3, v/v), sustrato inerte que permite el correcto desarrollo de la raíz y el mantenimiento de la humedad necesaria sin encharcar las raíces. Antes del trasplante, las raíces se lavaron con abundante agua para eliminar los restos del sustrato (Figuras 4 y 5). Además, las plantas de 6 y 12 meses se podaron para dejar un único tallo por planta.

En cada maceta se sembraron 2 plantas dispuestas con una separación equidistante entre ellas y los bordes del recipiente (Figura 6). Las plantas crecieron en condiciones controladas en cámara de cultivo con las siguientes condiciones ambientales:

- Intensidad luminosa:  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  proporcionada por tubos fluorescentes Sylvania Daylight F48T12/D/VHO, 115W y bombillas Osram Dulux Pro 8W/4000 K, Lumilux Cool White 440 lm, 220-240 V E27, 50/60 Hz.
- Fotoperíodo: 16 h luz / 8 h oscuridad.
- Temperatura:  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  día /  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$  noche.
- Humedad relativa: 55% día / 75% noche.



Las macetas se distribuyeron sobre la mesa de cultivo al azar, cambiándose periódicamente de lugar (Figura 6).



**Figura 4.** Estaguilla enraizada.



**Figura 5.** Estaquillas enraizadas con sustrato.



**Figura 6.** Macetas en la cámara de cultivo.

Las plantas se regaron 3 veces a la semana con solución nutritiva Hoagland 50% (Hoagland and Arnon, 1950), cuya composición se detalla en la tabla 7. El volumen empleado en el riego fue el suficiente para permitir el lavado por la parte inferior de las macetas.

**Tabla 7.** Composición de la solución nutritiva Hoagland 50%.

Macronutrientes		Micronutrientes	
KNO <sub>3</sub>	0,300 g	KCl	0,03700 g
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,470 g	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,00155 g
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,115 g	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,00034 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,123 g	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,00057 g
		CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,00012 g
		H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,00008 g
Secuestrene	0,00469 g		
Agua	1000 ml		

Se ajusta el pH a 6,5 ± 0,1.

### 3. Experimentos realizados

En todos los experimentos las plantas se mantuvieron durante 4 semanas en la cámara de cultivo como período de aclimatación, regándose con solución nutritiva Hoagland 50%. Cuando se aplicaron los tratamientos salinos, el NaCl fue añadido a la solución nutritiva de forma progresiva, para evitar el choque osmótico, a razón de 25 mM NaCl día<sup>-1</sup> hasta llegar a la concentración final. Las soluciones nutritivas con 50, 100 y 200 mM NaCl fueron clasificadas como moderadamente salinas, salinas o altamente salinas, respectivamente (Paranychianakis and Chartzoulakis, 2005); sus respectivas conductividades eléctricas fueron de 6,10, 10,56 y 18,12 dS m<sup>-1</sup>.

#### 3.1. Evaluación de la tolerancia a la salinidad en distintos cultivares de *O. europaea*

Como material de partida se utilizaron plantas de 6 meses de edad, de los

cultivares españoles, ‘Castacabra’, ‘Cornicabra’, ‘Ocal’, ‘Picual’ y ‘Picudo’ y, el cultivar italiano ‘Frantoio’.

Tras el período de aclimatación, se inició el tratamiento salino con NaCl. Las plantas de cada una de los cultivares utilizados fueron divididas aleatoriamente en dos grupos, un grupo control al que no se le aplicó NaCl (0 mM NaCl) y un grupo al que se le aplicó 200 mM NaCl. El tratamiento salino duró 12 semanas, tras las cuales se realizó la recogida de plantas.

El diseño experimental fue un factorial con 6 cultivares (‘Castacabra’, ‘Cornicabra’, ‘Frantoio’, ‘Ocal’, ‘Picual’ y ‘Picudo’) y 2 tratamientos salinos (0 y 200 mM NaCl), con 6 plantas por tratamiento, lo que supuso un total de 72 plantas.

Las determinaciones realizadas en este experimento fueron las siguientes:

a) Crecimiento

- Peso seco y fresco de hoja, tallo y raíz
- Elongación del tallo y área foliar total
- Expansión de la hoja

b) Intercambio gaseoso y estado hídrico de la planta

- Tasa de asimilación neta
- Conductividad estomática
- Transpiración
- Concentración de CO<sub>2</sub> interna

c) Determinaciones analíticas

- Contenido de nutrientes en hoja y raíz: carbono, nitrógeno, sodio, potasio,

calcio

- Contenido de pigmentos fotosintéticos: clorofila a, clorofila b, carotenoides
- Contenido de azúcares solubles totales
- Contenido de proteína soluble
- Contenido de prolina soluble
- Contenido de fenoles totales
- Concentración de grupos tiol

### **3.2. Efecto del estrés salino en estaquillas enraizadas de *O. europaea* cv. Picual**

En este experimento se utilizaron estaquillas enraizadas del cv. Picual que crecieron en macetas de 1 l de capacidad. Tras el período de aclimatación se iniciaron los tratamientos salinos con NaCl. Las plantas se dividieron aleatoriamente en 4 grupos a cada uno de los cuales se les aplicó distinta concentración de NaCl: 0 (plantas control), 50, 100 y 200 mM NaCl. Se realizaron 4 recogidas, a las 4, 7, 10 y 13 semanas después del inicio de los tratamientos salinos.

El diseño experimental fue un factorial con 4 tratamientos salinos (0, 50, 100 y 200 mM NaCl) y 4 recogidas (a las 4, 7, 10 y 13 semanas), con 6 plantas por recogida, lo que representó un total de 96 plantas.

Las determinaciones realizadas en este experimento fueron las siguientes:

#### a) Crecimiento

- Peso seco y fresco de hoja, tallo y raíz, y peso turgente de hoja
- Elongación del tallo y área foliar
- Número de hojas

- Expansión de la hoja
  
- b) Intercambio gaseoso y estado hídrico de la planta
  - Tasa de asimilación neta
  - Conductividad estomática
  - Concentración interna de CO<sub>2</sub>
  - Transpiración
  
- c) Determinaciones analíticas
  - Contenido de nutrientes en hoja y raíz: carbono, nitrógeno, sodio, potasio, calcio
  - Contenido de pigmentos fotosintéticos: clorofila a, clorofila b, carotenoides
  - Contenido de azúcares solubles totales
  - Contenido de aminoácidos libres
  - Contenido de proteína soluble
  - Contenido de prolina soluble
  - Contenido de nitrato
  - Capacidad antioxidante: DPPH<sup>·</sup>
  - Contenido de fenoles totales
  - Contenido de flavonoides

### **3.3. Importancia de los reguladores del crecimiento en la respuesta de estaquillas enraizadas de *O. europaea* cv. Picual frente al estrés salino**

Tras la aclimatación en la cámara de cultivo y previo a la aplicación del estrés salino, las estaquillas enraizadas se dividieron en 5 grupos, a 4 de ellos se les aplicó un

regulador del crecimiento, ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), ácido indolacético (AIA), ácido salicílico (AS) y quinetina (QUIN), mientras que el quinto se dejó sin pretratar (NP).

Los reguladores del crecimiento se aplicaron 2 veces por semana durante 3 semanas. Los reguladores, GA<sub>3</sub>, AIA y QUIN, se prepararon a 1 µM en agua destilada con Tween 20 1% (Chakrabarti and Mukherji, 2003) y, se aplicaron por pulverización a razón de 25 ml/planta. El AS se aplicó a través del riego a una concentración final de 0,5 mM/maceta (Palma et al., 2013). Después de 3 semanas se realizó una recogida por pretratamiento (6 plantas/pretratamiento) y, las plantas restantes se dividieron en 3 subgrupos a cada uno de los cuales se les aplicó una concentración de NaCl distinta (0, 100 ó 200 mM) durante 6 semanas, realizándose una recogida a las 3 y 6 semanas de exposición a la sal.

El diseño experimental fue un factorial con 5 pretratamientos (NP, GA<sub>3</sub>, AIA, AS y QUIN), 3 niveles de NaCl (0, 100 y 200 mM) y 2 recogidas, con 6 plantas por cada recogida, lo que supuso 180 plantas. Además, se realizó una recogida de 6 plantas/pretratamiento antes de aplicar el estrés salino, lo que sumó un total de 210 plantas.

Las determinaciones realizadas en este experimento fueron las siguientes:

a) Crecimiento

- Peso seco y fresco de hoja, tallo y raíz, y peso turgente de hoja
- Elongación del tallo y área foliar
- Número de hojas
- Expansión de la hoja

d) Determinaciones analíticas

- Contenido de nutrientes en hoja y raíz: sódico, potasio
- Contenido de pigmentos fotosintéticos: clorofila a, clorofila b, carotenoides
- Contenido de manitol, sacarosa, inositol, glucosa, fructosa
- Contenido de almidón
- Contenido de prolina soluble
- Contenido de poliaminas: espermina y espermidina
- Producción de etileno

### **3.4. Importancia de los reguladores del crecimiento en la respuesta de plantas de 1 año de *O. europaea* cv. Picual frente al estrés salino**

Tras la aclimatación en la cámara de cultivo y previo a la aplicación del estrés salino, las plantas de 1 año se dividieron en 6 grupos, a 5 de ellos se les aplicó un regulador del crecimiento, ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), ácido indolacético (AIA), ácido salicílico (AS), espermidina (SPD) y quinetina (QUIN), mientras que el sexto se dejó sin pretratar (NP).

Los reguladores del crecimiento se aplicaron 2 veces por semana durante 3 semanas. Los reguladores, GA<sub>3</sub>, AIA y QUIN, se prepararon a 1 µM en agua destilada con Tween 20 1% (Chakrabarti and Mukherji, 2003), y se aplicaron por pulverización a razón de 25 ml/planta. El AS y la SPD se aplicaron a través del riego a una concentración final de 0,5 mM/maceta (Palma et al., 2013; He et al., 2002). Pasadas 2 semanas, cada uno de los grupos de plantas pretratadas se dividió en 3 subgrupos, a cada uno de los cuales se les aplicó una concentración de NaCl distinta (0, 100 y 200 mM). Tras 4 semanas de exposición a la sal se realizó una única recogida.

El diseño experimental fue un factorial con 6 pretratamientos (NP, GA<sub>3</sub>, AIA, AS, SPD y QUIN) y 3 niveles de NaCl (0, 100 y 200 mM), con 5 plantas por pretratamiento y nivel de NaCl, lo que representó un total de 90 plantas.

Las determinaciones realizadas en este experimento fueron las siguientes:

a) Crecimiento

- Peso seco y fresco de hoja y tallo, y peso turgente de hoja
- Elongación del tallo y área foliar

b) Intercambio gaseoso y estado hídrico de la planta

- Tasa de asimilación neta
- Conductividad estomática
- Concentración interna de CO<sub>2</sub>
- Transpiración

c) Determinaciones analíticas

- Contenido de pigmentos fotosintéticos: clorofila a, clorofila b, carotenoides
- Actividades enzimáticas del metabolismo oxidativo: ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa, guaiacol peroxidasa
- Contenido de fenoles
- Contenido de flavonoides
- Contenido de prolina soluble
- Producción de etileno
- Capacidad antioxidante: capacidad de neutralización de radicales DPPH<sup>·</sup> y ABTS<sup>·+</sup>



### **3.5. Interacción entre el ácido abscísico y la salinidad en estaquillas enraizadas de *O. europaea* cv. Picual**

Tras el período de aclimatación, las plantas se dividieron en 3 grupos a cada uno de los cuales se les aplicó ácido abscísico (ABA) a una concentración diferente (0, 1 y 10  $\mu\text{M}$ ) a través del riego (Mullholland et al., 2003). A su vez, en cada nivel de ABA se hicieron 3 subgrupos a los que se les aplicó distintas concentraciones de NaCl (0, 100 y 200 mM). Después de 8 semanas, se dejó de aplicar el NaCl durante 3 semanas, período al final del cual se realizó la recogida de plantas.

El diseño experimental fue un factorial con 3 concentraciones de ABA (0, 1 y 10  $\mu\text{M}$  ABA) y 3 niveles de NaCl (0, 100 y 200 mM), con 10 plantas por tratamiento, lo que supuso un total de 90 plantas.

Las determinaciones realizadas en este experimento fueron las siguientes:

a) Crecimiento

- Peso seco y fresco de hoja, tallo y raíz, y peso turgente de hoja
- Elongación del tallo y área foliar
- Expansión de la hoja

d) Intercambio gaseoso y estado hídrico de la planta

- Tasa de asimilación neta
- Conductividad estomática
- Concentración interna de  $\text{CO}_2$
- Transpiración

e) Determinaciones analíticas

- Contenido de nutrientes en hoja y raíz: carbono, nitrógeno, sodio, potasio
- Actividades enzimáticas del metabolismo oxidativo: ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa, guaiacol peroxidasa
- Contenido de prolina soluble
- Contenido de glicina betaína

## **4. Metodología empleada**

### **4.1. Recolección de plantas**

En cada recogida, las plantas se seleccionaron al azar, se sacaron cuidadosamente de las macetas y las raíces se lavaron con abundante agua para eliminar los restos de sustrato. Posteriormente, se lavaron con agua destilada, secando el exceso con papel de filtro, y se mantuvieron a 4°C durante todo el proceso de manipulación. Se contó el número de hojas, se midió la longitud de los vástagos y se separó raíz, tallo y hoja, registrándose inmediatamente el peso fresco (PF). De cada planta se tomó una muestra de hoja (varias hojas totalmente formadas durante el período de tratamiento), mezclándolas por tratamiento homogéneamente troceadas, congelándolas en nitrógeno líquido y manteniéndolas a -80°C hasta su posterior utilización. Por último, se procedió al secado del material vegetal en estufa de corriente forzada de aire a 65°C durante 72 h. Pasado este tiempo, se determinó el peso seco (PS) de cada órgano. Para incluir el PS de las muestras de material fresco se utilizó un factor PS/PF con varias muestras por tratamiento, pesadas antes y después del secado.

### **4.2. Parámetros de crecimiento**

El crecimiento de la planta se determinó por acumulación de materia seca y por

elongación del tejido. Además para comparar el efecto de los tratamientos sobre los distintos órganos de la planta se calcularon relaciones entre ellos.

Para algunos parámetros de crecimiento, se calculó el porcentaje de inhibición utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición (\%)} = [(1 - (\text{salinizadas/control})) \times 100]$$

**a) Expansión foliar:** es la evolución del área de la hoja desde el inicio de desarrollo de la hoja hasta que alcanza el área final. Para su cálculo se utilizaron hojas que iniciaban su desarrollo en el momento de aplicar los tratamientos, realizándose determinaciones cada 2 ó 3 días (Vigo et al., 2005).

El área de la hoja se calculó utilizando las siguientes ecuaciones lineales:

$$\text{Para Casta Cabra: } Y = 0,695X + 0,139 \quad (r^2 = 0,980) \quad (1)$$

$$\text{Para Cornicabra: } Y = 0,732X - 0,061 \quad (r^2 = 0,984) \quad (2)$$

$$\text{Para Frantoio: } Y = 0,641X + 0,383 \quad (r^2 = 0,986) \quad (3)$$

$$\text{Para Ocal: } Y = 0,662X + 0,257 \quad (r^2 = 0,978) \quad (4)$$

$$\text{Para Picual: } Y = 0,639X + 0,304 \quad (r^2 = 0,987) \quad (5)$$

$$\text{Para Picudo: } Y = 0,688X + 0,014 \quad (r^2 = 0,986) \quad (6)$$

Donde,  $Y$  es el área foliar y  $X$  es el resultado de multiplicar el largo por el ancho de la hoja. Para la obtención de estas ecuaciones se utilizó el método descrito por Tattini et al. (1995). Se midió el largo y ancho de 100 hojas de cada uno de los cultivares estudiados. Para calcular estas ecuaciones, las hojas fueron digitalizadas mediante un escáner y procesadas con ImageJ 1.48v (National Institute of Health, USA) para calcular el área de la hoja. Las ecuaciones fueron verificadas para cada

cultivar, obteniéndose una alta correlación entre las áreas calculadas con las ecuaciones y las áreas obtenidas mediante el programa de análisis de imagen. Las correlaciones obtenidas para ambos métodos fueron las siguientes:  $r = 0,996, 0,997, 0,998, 0,996, 0,997$  y  $0,998$ , para ‘Casta Cabra’, ‘Cornicabra’, ‘Frantoio’, ‘Ocal’, ‘Picual’ y ‘Picudo’, respectivamente ( $P \leq 0,001$ ).

A partir de los datos de expansión foliar, se calculó la **tasa de expansión foliar**, que es el cociente entre el área final de la hoja y los días necesarios para alcanzarla (Guidi et al., 2008). Se expresa en  $\text{mm}^2 \text{ día}^{-1}$ .

**b) Área foliar de la planta (AF):** para agilizar la experimentación con el cv. Picual, el AF total de la planta se calculó utilizando la siguiente ecuación lineal:

$$Y = -0,602 + 35,43X \quad (r^2 = 0,995) \quad (7)$$

Donde,  $Y$  es el área foliar total por planta (AF) y  $X$  es peso fresco de la hoja por planta. Esta ecuación se obtuvo pesando 100 hojas del cv. Picual y calculando el AF utilizando la ecuación (5). La ecuación fue verificada, obteniéndose una correlación de  $0,997$  ( $P \leq 0,001$ ) entre las áreas obtenidas en función del largo y ancho de la hoja (5) y, las áreas obtenidas en función del peso fresco de la hoja (7).

**c) Elongación del tallo:** suma de la longitud de los brotes desarrollados.

**d) Relación R/PA:** es el peso seco (PS) de raíz respecto al peso seco de parte aérea.

$$\text{R/PA} = \text{PS raíz} / (\text{PS tallo} + \text{PS hoja})$$

**e) LMR** (siglas del inglés “leaf mass ratio”): es el PS de hoja respecto al PS total.

$$\text{LMR} = \text{PS hoja/PS total}$$

f) **SMR** (siglas del inglés “stem mass ratio”): es el PS de tallo respecto al PS total.

$$\text{SMR} = \text{PS tallo/PS total}$$

g) **RMR** (siglas del inglés “root mass ratio”): es el PS de raíz respecto al PS total.

$$\text{RMR} = \text{PS raíz/PS total}$$

h) **AGR** (siglas de inglés “absolute growth rate”): es la tasa de crecimiento absoluto. Se calculó según Solari et al. (2006) y se expresa en  $\text{mg día}^{-1}$ .

$$\text{AGR} = (\text{P}_2 - \text{P}_1) / (\text{t}_2 - \text{t}_1)$$

Donde,  $\text{P}_2$  es el PS final de la planta,  $\text{P}_1$  el PS inicial de la planta y,  $\text{t}_2$  y  $\text{t}_1$  son los tiempos final e inicial en que se evalúan las plantas.

i) **RGR** (siglas del inglés “relative growth rate”): es la tasa de crecimiento relativo. Se calculó según Solari et al. (2006) y se expresa en  $\text{mg g}^{-1} \text{ día}^{-1}$ .

$$\text{RGR} = (\ln \text{P}_2 - \ln \text{P}_1) / (\text{t}_2 - \text{t}_1)$$

Donde,  $\text{P}_2$  es el PS al final y  $\text{P}_1$ , el PS al inicio del intervalo de tiempo ( $\text{t}_2$  y  $\text{t}_1$ ).

j) **LAR** (siglas del inglés “leaf-area ratio”): es el área foliar de la planta (AF) respecto al PS total. Se calculó según Solari et al. (2006) y se expresa en  $\text{m}^2 \text{ kg}^{-1}$ .

$$\text{LAR} = \text{AF/PS total}$$

k) **NAR** (siglas del inglés “net assimilation rate”): es la tasa de asimilación neta. Se calculó según Solari et al. (2006) y se expresa en  $\text{g m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ .

$$\text{NAR} = \text{RGR/LAR}$$

**l) LMA** (siglas del inglés “leaf mass per unit area”): es el PS de hoja respecto al AF. Se calculó según Groom and Lamont (1999) y se expresa en  $\text{g dm}^{-2}$ .

$$\text{LMA} = \text{PS de hoja}/\text{AF}$$

**m) SLA** (siglas del inglés “specific leaf area”): es el área foliar específica de la planta. Se calculó según Dijkstra (1989) y se expresa en  $\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$ .

$$\text{SLA} = \text{AF}/\text{PS de hoja}$$

**n) D:** es la densidad de la hoja. Se calculó según Groom and Lamont (1999) y se expresa en  $\text{g kg}^{-1}$ .

$$\text{D} = (\text{PS de hoja}/\text{PF de hoja}) 1000$$

### 4.3. Intercambio gaseoso y estado hídrico de la planta

**a)** La **tasa de asimilación neta de  $\text{CO}_2$**  ( $P_n$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), **conductividad estomática** ( $g_s$ ,  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), **concentración interna de  $\text{CO}_2$**  ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ ) y **transpiración** ( $E$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), se determinaron con un medidor fotosintético portátil (Li-Cor 6400; LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA; Figura 7). Las medidas se realizaron en la cámara de cultivo entre 1 y 4 h después del inicio del fotoperíodo ( $\text{PAR} > 800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).



**Figura 7.** Medidor fotosintético portátil.

**b) PNUE:** es la eficiencia fotosintética en el uso del nitrógeno, parámetro que relaciona la  $P_n$  y la concentración de nitrógeno (N) de la hoja. se calculó según Cardona-Olarte et al. (2013) y se expresa en  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ N s}^{-1}$ .

$$\text{PNUE} = P_n/\text{N}$$

**c) Fotoinhibición ó inhibición fotosintética:** se calculó según López-Climent et al. (2008) utilizando el logaritmo neperiano para la normalización de los datos.

$$-\ln(P_n/C_i)$$

**d)** Para determinar el **estado hídrico de la planta** se utilizaron los índices descritos por Bacelar et al. (2006). Para ello, se seleccionaron 3 hojas maduras por tratamiento y se pesaron, obteniéndose el PF. A continuación, para calcular el peso turgente (PT), las hojas se introdujeron en tubos de ensayo de 25 x 150 mm que contenían agua destilada en sus 2/3 partes (15 ml), durante 24 h a 25°C en oscuridad. Pasado este tiempo, las hojas se secaron en una estufa de aire forzado a 65°C durante 72 h para determinar el PS.

**d.1) RWC** (siglas del inglés “relative water content”): es el contenido hídrico relativo expresado en %.

$$\text{RWC} = (\text{PF}-\text{PS})/(\text{PT}-\text{PS}) 100$$

**d.2) WCS** (siglas del inglés “water content at saturation”): es el contenido hídrico para la saturación expresado en  $\text{g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ PS}$ .

$$\text{WCS} = (\text{PT}-\text{PF})/\text{PS}$$

**d.3) WSD** (siglas del inglés “water saturation deficit”): es el déficit de saturación hídrico expresado en %.

$$\text{WSD} = (\text{PT}-\text{PF})/(\text{PT}-\text{PS}) 100$$

**d.4) S:** es la succulencia expresada en  $\text{mg H}_2\text{O cm}^{-2}$ .

$$\text{S} = (\text{PF}-\text{PS})/\text{AF}$$

#### **4.4. Determinaciones analíticas**

##### **4.4.1. Contenido de carbono y nitrógeno**

El contenido de carbono (C) y nitrógeno (N) se determinó en tejido vegetal seco y molido (2-5 mg) por análisis elemental (Thermo Finnigan CHN elemental analyzer, Model Flash EA 1112, Milán, Italy). Se realizaron 3 repeticiones y el contenido de nutriente se expresó en %.

##### **4.4.2. Contenido de $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ y $\text{Ca}^{2+}$**

El contenido de sodio ( $\text{Na}^+$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ) y calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) se determinó, según los Métodos Oficiales de Análisis del MAPA (Orden Ministerial 17/9/81, BOE nº 246; Soria, 2002), en tejido vegetal seco y molido (2 g), por espectrofotometría de emisión-absorción atómica (PerkinElmer AAnalyst 800). El material vegetal se incineró a  $450^\circ\text{C}$  durante 24h en un horno-mufla. Tras la incineración, la ceniza se dejó enfriar y se sometió a un proceso de hidrólisis ácida con 3 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada y 2 ml de  $\text{HCl}$  37%. La reacción se favoreció calentando los crisoles en una placa calefactora a  $250^\circ\text{C}$ . El contenido de cada crisol se filtró a través de filtros ALBET® (para análisis gravimétrico exento de cenizas), y se enrasó con  $\text{HCl}$  2% hasta 100 ml. El  $\text{Na}^+$  y el  $\text{K}^+$  se midieron por emisión no precisando para ello ningún tipo de lámpara, mientras que el  $\text{Ca}^{2+}$  se midió por absorción utilizando una lámpara específica para este elemento. Se realizaron 4 repeticiones y el contenido de nutriente se expresó en %.



### 4.4.3. Pigmentos fotosintéticos y fenoles totales

#### a) Preparación de extractos libres de células

La extracción se realizó según Arnon (1949). Se homogenizaron muestras de hoja en mortero con acetona 80% (v/v) en proporción 1:2 (p/v). El homogenado se filtró a través de 4 capas de gasa y se centrifugó a 2000 g durante 10 min a 4°C (Orto Alresa Digicen 20-R). El precipitado, se resuspendió (acetona 80%) y centrifugó 2 veces más. Todo el proceso de extracción se llevó a cabo en baño de hielo picado a una temperatura entre 0 y 4°C. Los 3 sobrenadantes obtenidos por muestra se mezclaron y se utilizaron como extracto crudo para la determinación de pigmentos fotosintéticos y fenoles totales. Se realizaron 4 repeticiones por muestra.

#### b) Pigmentos fotosintéticos

El cálculo del contenido de clorofila a, b y carotenoides se determinó utilizando las ecuaciones descritas por Wellburn (1994):

$$\text{Clorofila a (C}_a\text{)} = 12,21 \text{ Ab } 663,2 - 2,79 \text{ Ab } 646,8$$

$$\text{Clorofila b (C}_b\text{)} = 21,5 \text{ Ab } 646,8 - 5,1 \text{ Ab } 663,2$$

$$\text{Carotenoides (Car)} = (1000 \text{ Ab } 470 - 3,27 \text{ C}_a - 104 \text{ C}_b)/198$$

La absorbancia del extracto a 470, 646,8 y 663,2 nm se realizó en un espectrómetro Perkin-Elmer Lambda 19. Los resultados se expresan en  $\text{mg g}^{-1}$  PS.

#### c) Fenoles totales

La determinación de fenoles totales de la hoja se llevó a cabo mediante el método de Folin-Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965). A alícuotas de 0,250 ml de

extracto se le adicionaron 7 ml de agua destilada y 0,25 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu, se agitó y, pasados 3 min se añadieron 2 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20%, se agitó y se incubó a 25°C. Después de 1 h se midió la absorbancia a 720 nm en un espectrómetro Perkin-Elmer Lambda 19.

Para el cálculo del contenido de fenoles totales, se preparó una curva patrón con pirogalol en cantidades comprendidas entre 0,03 y 0,23 mg ml<sup>-1</sup>. Los resultados se expresan en mg g<sup>-1</sup> PS.

#### **4.4.4. Aminoácidos libres, azúcares solubles y almidón**

##### **a) Preparación de extractos libres de células**

La extracción de aminoácidos libres y azúcares solubles se realizó sobre hielo picado a una temperatura entre 0 y 4°C, siguiendo el método descrito por Irigoyen et al. (1992). El material vegetal se homogeneizó con etanol 95% (v/v) en una proporción 1:10 (p/v). El homogenizado se filtró a través de 4 capas de gasa y se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min a 4°C (Orto Alresa Digicen 20-R). El precipitado se resuspendió (etanol 70%) y centrifugó dos veces más. Los 3 sobrenadantes se mezclaron y se utilizaron como extracto crudo para la determinación de aminoácidos libres y azúcares solubles. El precipitado se guardó a -20°C para su posterior uso en la determinación de almidón. Se realizaron 4 repeticiones por extracto.

##### **b) Aminoácidos libres**

La determinación de aminoácidos libres se realizó según el método descrito por Rosen (1957). Se utilizaron alícuotas de 0,5 ml de extracto a las que se les adicionó 0,5 ml de etanol 70%, 0,5 ml de tampón acetato-cianida y 0,5 ml de ninhidrina 3%

(preparada en etilenglicolmonoetileter). Esta mezcla de reacción se agitó vigorosamente e incubó a 100°C en oscuridad. Pasados 15 min, se adicionaron 5 ml de isopropanol (2-propanol:agua, 1:1) y, tras agitar se dejó enfriar a temperatura ambiente antes de medir la absorbancia a 570 nm en un espectrómetro Perkin-Elmer Lambda 19.

Para el cálculo de la concentración de aminoácidos se preparó, siguiendo el mismo procedimiento, una curva patrón con L-glicina en cantidades comprendidas entre 1,5 y 30  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Los resultados se expresan en  $\mu\text{g g}^{-1}$  PS.

### **c) Azúcares solubles**

Se utilizaron alícuotas de 0,05 ml de extracto a las que se les adicionó 3 ml de antrona alcohólica (150 mg de antrona en una solución de 60 ml de etanol y 100 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado), y tras incubar a 50°C en baño termostatzado durante 30 min, se midió la absorbancia a 620 nm (Wise et al., 1955) en un espectrómetro Perkin-Elmer Lambda 19.

El cálculo de la concentración de azúcares solubles totales se realizó mediante una curva patrón con glucosa en cantidades comprendidas entre 0,2 y 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Los resultados se expresan en  $\text{mg g}^{-1}$  PS.

### **d) Almidón**

Para la determinación de almidón se realizó una digestión enzimática según el método descrito por Chow and Landhäusser (2004) para plantas leñosas. A 20 mg del precipitado obtenido se le adicionaron 2 ml de NaOH 0,1 N y se incubó a 50°C durante 30 min, agitándose cada 5 min. A continuación, se añadieron 2,5 ml de ácido acético 0,1 N (para neutralizar el pH) y 0,5 ml mezcla enzimática (1000 U de  $\alpha$ -amilasa y 5 U de

amiloglucosidasa preparada en tampón acetato sódico 0,05 M, pH 5,1). Se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min a 4°C (Orto Alresa Digicen 20-R) y, el sobrenadante se utilizó para la determinación de almidón. A alícuotas de 0,2 ml del sobrenadante se le adicionaron 2 ml del reactivo Peroxidasa-Glucosa Oxidasa/O-dianisidina y se dejaron 45 min en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 0,4 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 75% y se midió la absorbancia a 525 nm en un espectrómetro Perkin-Elmer Lambda 19. Se realizaron 4 repeticiones por muestra.

El cálculo de la concentración de almidón se realizó mediante una curva patrón con glucosa en cantidades comprendidas entre 10 y 150 µg ml<sup>-1</sup>. Los resultados se expresan en mg g<sup>-1</sup> PS.

#### **4.4.5. Proteína soluble, prolina soluble y grupos tiol**

##### **a) Preparación de extractos libres de células**

La extracción se realizó según el método descrito por Bates (1973), utilizando ácido sulfosalicílico 3% (p/v) en una proporción 1:10 (p/v). El material vegetal se homogeneizó en mortero sobre baño con hielo picado (0-4°C). Tras la homogeneización, se centrifugó a 2500 g durante 10 min a 4°C (Orto Alresa Digicen 20-R) y el sobrenadante obtenido se utilizó para la determinación de proteína, prolina y grupos tiol. Se realizaron 4 repeticiones por muestra.

##### **b) Proteína soluble**

Para la determinación de proteína soluble se utilizó el método descrito por Bradford (Bradford, 1976), basado en la unión del azul brillante de Coomassie G-250 a las proteínas. A alícuotas de 0,1 ml de extracto se les añadió 1 ml del reactivo Bradford

[Comassie Brilliant Blue G-250 0,01% (p/v), etanol 1,7% y ácido fosfórico 85% (p/v)]. A continuación se agitó y, pasados 2 min, se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrómetro Perkin-Elmer Lambda 19.

Para el cálculo de la concentración de proteínas se preparó una curva patrón con seroalbúmina bovina en cantidades comprendidas entre 10 y 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Los resultados se expresan en  $\text{mg g}^{-1}$  PS.

### **c) Prolina soluble**

Para la determinación de prolina soluble se siguió el método descrito por Bates (1973). A 1 ml de extracto se le adicionó 1 ml de ácido acético glacial y 1 ml de ninhidrina 2,5% (p/v) (preparada en ácido acético glacial y ácido ortofosfórico 85% en proporción 60/40 (v/v)). La mezcla de reacción se hirvió a 100°C durante 60 min, se paró con hielo durante 1 ó 2 min y, a continuación, se añadieron 2 ml de tolueno, se agitó vigorosamente y la fase superior obtenida se utilizó para medir la absorbancia a 520 nm en un espectrómetro Perkin-Elmer Lambda 19.

Para el cálculo de la concentración de prolina se preparó, siguiendo el mismo procedimiento, una curva patrón con prolina en cantidades comprendidas entre 0,5 y 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Los resultados se expresan en  $\mu\text{g g}^{-1}$  PS.

### **d) Grupos tiol**

El contenido total de grupos tiol se determinó según Ellman (1959). A 0,5 ml de extracto se le añadió 1 ml de ácido sulfosalicílico 4% (p/v), se agitó y se centrifugó a 20000 g durante 5 min a 4°C (Allegra X22R). A 1 ml del sobrenadante se le adicionó 4 ml de tampón fosfato 100 mM pH 8 y 70  $\mu\text{l}$  de DTNB 10 mM (preparado en etanol

absoluto). La mezcla se incubó en agitación durante 15 min. Pasado este tiempo, se midió la absorbancia a 412 nm en un espectrómetro Perkin-Elmer Lambda 19.

El cálculo del contenido en grupos –SH se realiza según la siguiente ecuación, usando el coeficiente de extinción  $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Ellman, 1959)

$$C=(\text{Abs}/\epsilon)D$$

Donde, C es la concentración en grupos –SH, Abs es la absorbancia,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción y D es el factor de dilución.

Los resultados se expresan en  $\text{nmol g}^{-1}$  PS.

#### **4.4.6. Glicina betaína**

La determinación de glicina betaína se realizó según el método descrito por Grieve and Grattan (1983). Se utilizó material vegetal molido, previamente secado a  $80^{\circ}\text{C}$  durante 4 días. La extracción se realizó con agua destilada en proporción 1/40 (p/v) a  $25^{\circ}\text{C}$ . Tras 24 h se filtró y se adicionó  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N en proporción 1/1 (v/v). Alícuotas de 0,5 ml de esta mezcla se mantuvieron 1 h en baño con hielo. A continuación, se añadieron 0,2 ml de KI- $\text{I}_2$  frío, se agitó y se mantuvo a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 16 h. Pasado este tiempo, se centrifugó a  $10000 \text{ g}$  a  $0^{\circ}\text{C}$  durante 15 min (Allegra X22R), se retiró el sobrenadante y, el precipitado se disolvió en 9 ml de 1,2-dicloroetano. Pasadas 2 h se midió la absorbancia a 365 nm. Se realizaron 5 repeticiones por muestra.

Para el cálculo de la concentración de glicina betaína se preparó una curva patrón con glicina betaína en cantidades comprendidas entre 50 y  $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Los resultados se expresan en  $\text{mg g}^{-1}$  PS.

#### 4.4.7. Nitrato

La concentración de nitrato se determinó según la metodología propuesta por Cataldo et al. (1975) con algunas modificaciones. Para la extracción, el material vegetal seco y molido se maceró en agua destilada con Tween 20 a 45°C durante 45 min (proporción 1:10, p/v). A continuación, se centrifugó a 5000 g durante 15 min (Orto Alresa Digicen 20-R). Para eliminar las clorofilas del sobrenadante se adicionaron 0,5 g de MgCO<sub>3</sub> o Ca(OH)<sub>2</sub>, se centrifugó y, el sobrenadante se utilizó como extracto crudo para la determinación de nitrato.

A alícuotas de 0,2 ml del extracto crudo se les adicionó 0,8 ml de ácido salicílico 5% (p/v) (preparado en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado) y se agitó vigorosamente. Después de 20 min a temperatura ambiente, se añadieron 19 ml de NaOH 2N y, se midió la absorbancia a 410 nm en un espectrómetro Perkin-Elmer Lambda 19. Se realizaron 5 repeticiones por muestra.

Para el cálculo de la concentración de nitrato se realizó una curva patrón con nitrato de sodio en cantidades comprendidas entre 5 y 300 µg ml<sup>-1</sup>. Los resultados se expresan en mg g<sup>-1</sup> PS.

#### 4.4.8. Poliaminas libres: espermidina y espermina

Para la determinación de poliaminas libres se siguió la técnica descrita por Bueno et al. (2015). El material vegetal (0,3 g de peso fresco de hoja) se homogeneizó con ácido perclórico (PCA) 0,2 N (1:4, p/v) y hexanodiamina como patrón interno (1:1, p/v) en un mortero preenfriado con nitrógeno líquido. El homogeneizado se centrifugó a 27000 g durante 10 min a 4°C (Allegra X22R). Alícuotas de 100 µl del sobrenadante se mezclaron con 200 µl de una solución saturada de carbonato sódico y 400 µl de cloruro

de dansilo ( $10 \text{ mg ml}^{-1}$  de acetona). La mezcla se incubó a  $60^\circ\text{C}$  durante 1 h y, posteriormente, se adicionaron  $100 \mu\text{l}$  de L-prolina ( $100 \text{ mg ml}^{-1}$ ). Después de 30 min, las poliaminas dansiladas se extrajeron con  $800 \mu\text{l}$  de tolueno (grado HPLC). A continuación, el extracto de tolueno se secó con nitrógeno seco y, el precipitado se disolvió en  $800 \mu\text{l}$  de acetonitrilo (grado HPLC). Finalmente, las muestras se filtraron a través de filtros Millipore HV-4 de  $0,45 \mu\text{m}$  de tamaño de poro (Darmstadt, Alemania) para su inmediato análisis. Se utilizaron alícuotas de  $20 \mu\text{l}$  para ser inyectadas en una columna de fase reversa ODS Speri-5 C<sub>18</sub> ( $8 \mu\text{M}$ ,  $4,6 \times 220 \text{ mm}$ ). El HPLC utilizado es un Shimadzu LC-10A (Kyoto, Japón) formado por dos bombas para la mezcla de gradiente, detector de fluorescencia (excitación a  $252 \text{ nm}$ , emisión a  $500 \text{ nm}$ ) y un recolector de muestras. El gradiente, formado con acetonitrilo y agua, es variable a lo largo del tiempo de corrida y su flujo es de  $1,5 \text{ ml min}^{-1}$ . Se realizaron 3 repeticiones por muestra.

El mismo procedimiento de dansilación se utilizó para las poliaminas patrones, espermidina (trihidrocloreuro) y espermina (tetrahidrocloreuro).

#### **4.4.9. Producción de etileno**

Muestras de  $0,25 \text{ g}$  de hoja se colocaron en frascos de  $5 \text{ ml}$  que contenían  $50 \mu\text{l}$  de agua destilada. Los frascos fueron sellados con tapón de caucho e incubados a  $30^\circ\text{C}$  en oscuridad durante. Después de 1 h, una alícuota de  $1 \text{ ml}$  fue inyectada en el cromatógrafo de gases HP 5890 (series II, Hewlett Packard, Palo Alto, USA) con un detector de ionización de llama y una columna de  $2 \text{ m} \times 4 \text{ mm}$  empaquetada con una malla de 50-80 Poropak-R. La temperatura del horno fue de  $100^\circ\text{C}$ , con un flujo de  $\text{N}_2$ ,  $\text{H}_2$ , y aire sintético de  $50 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $86 \text{ ml min}^{-1}$  y  $400 \text{ ml min}^{-1}$ , respectivamente. Se



realizaron 6 repeticiones por tratamiento.

La identificación del pico de etileno se realizó según el tiempo de retención estipulado con un estándar de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (99,9% de pureza) (Bueno et al., 2015).

#### 4.4.10. Polioles, sacarosa, glucosa y fructosa

La determinación de polioles (manitol e inositol), sacarosa, glucosa y fructosa por cromatografía gaseosa se realizó según Bartolozzi et al. (1997) con algunas modificaciones. El material vegetal (0,3 g de peso fresco de hoja) se homogeneizó con etanol 50% (1:10, p/v) y β-fenilglucopiranosido (2,5 g/100 ml) como patrón interno (1:1, p/v) en un mortero preenfriado con nitrógeno líquido. El homogeneizado se centrifugó a 1000 g durante 5 min a 4°C (Orto Alresa Digicen 20-R). El sobrenadante se diluyó hasta 15 ml con etanol 50%. Alícuotas de 1 ml de esta dilución se mezclaron con 0,5 ml de etanol 50% y se secaron en corriente de aire. Se realizaron 3 repeticiones por muestra.

**Tabla 8.** Soluciones utilizadas para la realización de las curvas patrón de glucosa, inositol, manitol, sacarosa, galactosa y fructosa (Bartolozzi et al., 1997).

	1	2	3	4	5	6	7
Glucosa	0,04	0,4	0,88	1,36	1,84	2,32	2,78
Inositol	1,28	1,2	0,96	0,72	0,36	0,24	0,01
Manitol	1,28	1,2	0,96	0,72	0,36	0,24	0,01
Sacarosa	0,08	0,8	1,76	2,72	3,68	4,64	5,36
Galactosa	2,78	2,32	1,84	1,36	0,88	0,4	0,04
Fructosa	2,78	2,32	1,84	1,36	0,88	0,4	0,04
<b>Total (mg)</b>	8,24	8,24	8,24	98,24	8,24	8,24	8,24

Para el cálculo de la concentración de manitol, inositol, sacarosa, glucosa y fructosa, se realizaron sendas curvas patrón en cantidades comprendidas entre 0,04 y 2,28 g. Para ello, se prepararon 7 soluciones con concentraciones variables de los intermedios a determinar (Tabla 8). Las soluciones se prepararon en un volumen total de

1,5 ml de etanol 50%, adicionado de imidazol 0,1 M pH 7 para evitar la hidrólisis de la sacarosa en fructosa y glucosa. A continuación, al igual que las muestras, se secaron con corriente de aire.

A los residuos deshidratados, tanto de muestras de tejido como de soluciones patrón, se les adicionó 0,4 ml de piridina, 0,2 ml de hexametildisilazane (HMDS) y 0,1 ml de trimetilclorosilano (TMCS) y, se incubaron a 60°C durante 2 h. Una vez enfriadas, se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

Alícuotas de 0,3 µl se inyectaron en el cromatógrafo de gases HP 5890 (series II, Hewlett Packard, Palo Alto, USA) con un detector de ionización de llama y una columna capilar de 30 m x 0,25 mm HP-5MS (Crosslinked 5% PHME Siloxane). Las temperaturas del inyector y detector fueron 280 y 320°C, respectivamente, con un flujo de He, H<sub>2</sub> y aire sintético de 2, 30 y 250 ml min<sup>-1</sup>, respectivamente.

#### **4.4.11. Flavonoides**

La extracción se realizó en mortero con metanol 80% en una proporción 1/20 (p/v). A continuación se filtró y, alícuotas de 0,25 ml del extracto se mezclaron con 1,50 ml de agua destilada y 0,15 ml de NaNO<sub>3</sub> 5%, se agitó y se dejó 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se adicionaron 0,30 ml de AlCl<sub>3</sub> 10%. Pasados 6 min, se añadió 1 ml de NaOH 1M y se diluyó con agua destilada hasta un volumen final de 5 ml. La absorbancia se midió a 510 nm en un espectrómetro Perkin-Elmer Lambda 19.

Para el cálculo de la concentración de flavonoides se preparó una curva patrón con catequina en cantidades comprendidas entre 0,01 y 0,25 mg ml<sup>-1</sup> (Karadeniz et al., 2005). Los resultados se expresan en mg g<sup>-1</sup> PS.

#### 4.4.12. Capacidad antioxidante

La actividad antioxidante de la hoja se determinó en función de la capacidad de neutralizar radicales libres (ABTS<sup>•+</sup> y DPPH<sup>•</sup>). Para ello se prepararon extractos con tejido seco molido y metanol en distintas proporciones p/v. Se realizaron 6 repeticiones por extracto.

La actividad antioxidante se calculó como porcentaje de inhibición, es decir, la cantidad de radical neutralizado por el extracto a una determinada proporción, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad antioxidante (\%)} = [(A_0 - A_1)/A_0] 100$$

Donde,  $A_0$  es la absorbancia de la mezcla disolvente-radical y,  $A_1$  es la absorbancia de la mezcla extracto-radical.

La actividad antioxidante se expresó como  $IC_{50}$  ( $mg\ ml^{-1}$ ), que se define como la dosis de extracto de hoja requerida para causar un 50% de neutralización de radical. Un valor de  $IC_{50}$  bajo corresponde con una mayor actividad antioxidante de la planta (Patro et al., 2005; Ksouri et al. 2007; Karray-Bouraoui et al., 2010).

##### a) Método del radical ABTS<sup>•+</sup>

La determinación de la capacidad antioxidante de la hoja para neutralizar el ABTS<sup>•+</sup> (Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico) se realizó según el método descrito por Re et al. (1999) con algunas modificaciones. La solución de ABTS<sup>•+</sup> se preparó con sal diamónica 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico 7 mM y  $(NH_4)_2S_2O_8$  2,45 mM, se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente durante 12 - 16 h y, posteriormente, se diluyó con metanol hasta obtener una absorbancia

estable de  $0,7 \pm 0,02$  a 745 nm (30°C) (Mensor et al., 2001). Los extractos se prepararon en metanol en proporciones variables (50, 100, 200, 400, 500 y 700  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). A continuación, a alícuotas de 0,3 ml de extracto se le añadieron 3 ml de la solución de ABTS<sup>•+</sup>, se mezcló y, se midió la absorbancia a 745 nm (la mezcla de reacción permanece estable durante 6 min).

#### **b) Método del radical DPPH<sup>•</sup>**

La determinación de la capacidad antioxidante de la hoja para neutralizar el DPPH<sup>•</sup> (2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo) se determinó según Hatano et al. (1988). Los extractos se prepararon en metanol en proporciones variables (10, 20, 30, 40 y 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). A continuación, a alícuotas de 2 ml de extracto se le añadieron 0,5 ml de la solución de DPPH<sup>•</sup> 0,2 mmol l<sup>-1</sup> preparada en metanol. La mezcla se agitó vigorosamente, se dejó reposar en oscuridad a temperatura ambiente. Después de 30 min se midió la absorbancia a 517 nm.

### **4.4.13. Actividades enzimáticas del metabolismo oxidativo**

#### **a) Preparación de extractos libres de células**

Para la extracción de las enzimas guaiacol peroxidasa (POD), ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión reductasa (GR) se siguió el método descrito por Agarwal et al. (2005). El medio de extracción fue tampón fosfato potásico 100 mM pH 7 adicionado de EDTANa<sub>2</sub> 1 mM y 5 mM de ácido ascórbico. Las hojas se homogeneizaron con medio de extracción (proporción 1:10, p/v) y polivinilpirrolidona (PVP) 1% en un mortero preenfriado con nitrógeno líquido. El homogeneizado se centrifugó a 19000 g durante 20 min a 4°C en una centrífuga Allegra X22R.

### **b) Valoración de la actividad guaiacol peroxidasa**

La actividad guaiacol peroxidasa (POD, EC 1.11.1.7) elimina el peróxido de hidrógeno utilizando guaiacol como donador de electrones, que es transformado en tetraguaiacol. En la determinación se utilizó el método descrito por Chance and Maehly (1955). La mezcla de reacción contenía, en un volumen total de de 3 ml, tampón fosfato potásico 10 mM pH 6,4, guaiacol 8 mM, peróxido de hidrógeno 2,75 mM y 50  $\mu$ l de extracto, que inicia la reacción. La absorbancia se midió a 470 nm a 25°C en un espectrómetro Perkin-Elmer Lambda 19. De cada extracto se prepararon 4 repeticiones y un blanco sin extracto.

La actividad POD se calculó utilizando el coeficiente de extinción del tetraguaiacol ( $26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) y se expresó en  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PF}$ .

### **c) Valoración de la actividad ascorbato peroxidasa**

La actividad ascorbato peroxidasa (APX, EC 1.11.1.11) elimina el peróxido de hidrógeno utilizando ascorbato, que se transforma en monodehidroascorbato. Esta enzima forma parte del ciclo ascorbato-glutation. La actividad se determinó según el método descrito por Nakano and Asada (1981). La mezcla de reacción contenía, en un volumen total de 1,6 ml, tampón fosfato potásico 100 mM pH 7, ácido ascórbico 0,5 mM, EDTANa<sub>2</sub> 0,1 mM, peróxido de hidrógeno 1,2 mM y 100  $\mu$ l del extracto, que inicia la reacción. La absorbancia se midió a 290 nm a 25°C en un espectrómetro Perkin-Elmer Lambda 19. De cada extracto se prepararon 4 repeticiones y un blanco sin extracto.

La actividad APX se calculó utilizando el coeficiente de extinción del ascorbato

(2,8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) y se expresó en μmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> PF.

#### **d) Valoración de la actividad glutatión reductasa**

La actividad glutatión reductasa (GR, EC 1.6.4.2) cataliza la formación de glutatión reducido a partir de glutatión oxidado. Al igual que la APX, la GR forma parte del ciclo ascorbato-glutation. Esta enzima se determinó según el método de Fryer et al. (1998) con algunas modificaciones. La mezcla de reacción contenía, en un volumen total de 1 ml, tampón fosfato potásico 100 mM pH 7, EDTANa<sub>2</sub> 1 mM, NADPH 0,2 mM, glutatión oxidado (GSSG) 1 mM y 70 μl del extracto, que inicia la reacción. La absorbancia se midió a 340 nm a 25°C en un espectrómetro Perkin-Elmer Lambda 19. De cada extracto se prepararon 4 repeticiones y un blanco sin extracto.

La actividad GR se calculó utilizando el coeficiente de extinción del NADPH (6,22 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) y se expresó en μmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> PF.

#### **e) Cálculo de las actividades enzimáticas**

El cálculo de las actividades enzimáticas se realiza según la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad } (\mu\text{mol min}^{-1}) = [(\Delta \text{ Abs min}^{-1}) V V_T] / (10^{-6} \epsilon d v)$$

Donde, Δ Abs min<sup>-1</sup> es el incremento medio de absorbancia por minuto, V es el volumen total de la mezcla de reacción, V<sub>T</sub> es el volumen total de extracto, ε es el coeficiente de extracción molar, d es el ancho de la cubeta (1 cm), v es el volumen de extracto en la mezcla y 10<sup>-6</sup> es el factor de conversión a μmoles.

### **5. Análisis estadístico**

En todos los experimentos se utilizó un diseño completamente al azar,

distribuyendo las macetas de forma aleatoria por la superficie de la mesa de cultivo. Los datos originales se sometieron a un análisis estadístico consistente en:

- a) Análisis de la varianza unifactorial o multifactorial con un mínimo de tres repeticiones por tratamiento.
- b) Cuando el valor  $P$  fue significativo ( $P \leq 0,05$ ), las medias de las fuentes de variación se compararon mediante un test de rango múltiple con un nivel de confianza del 95% (Tukey o LSD).
- c) Coeficientes de correlación simple entre variables.
- d) Coeficiente de determinación ( $\eta^2$ ), para evaluar el efecto relativo de cada fuente de variación por separado ó de su interacción sobre los parámetros determinados. Se calculó según Ostle (1963):

$$\eta^2 = \text{suma de cuadrados de una fuente de variación} / \text{suma de cuadrados total}$$

Para la realización del estudio estadístico se utilizaron los programas IBM SPSS Statistics 19 y Statgraphics Centurion (Versión XVI) disponibles en la Universidad de Jaén. Los resultados se presentaron en tablas de medias o en gráficas con el error estándar (SE).





## **IV. Resultados y Discusión**

---



# 1. Evaluación de la tolerancia a la salinidad en distintos cultivares de *O. europaea*

## 1.1. Resultados

### 1.1.1. Crecimiento vegetativo

El análisis estadístico (Tabla 1.1) mostró que todas las fuentes de variación (cultivar, NaCl y su interacción) tuvieron un efecto significativo sobre los parámetros de crecimiento determinados ( $P \leq 0,05$ ). Según el coeficiente de determinación ( $\eta^2$ ), la principal fuente de variación para peso seco (PS) de hoja, tallo y total, relación raíz/parte aérea (R/PA), elongación de tallo, área foliar (AF) total y área final de la hoja (AFH), fue la presencia de NaCl en el medio, mientras que, para PS de raíz la principal fuente de variación fue el cultivar.

**Tabla 1.1.** Valor  $F$  y coeficiente de determinación ( $\eta^2$ ) para cultivar, salinidad y su interacción (cultivar x salinidad), de peso seco (PS) de hoja, tallo, raíz y total, relación raíz/parte aérea (R/PA), elongación de tallo, área foliar (AF) total, área final de la hoja (AFH), relación de área foliar (LAR), área foliar específica (SLA), densidad de la hoja (D) y succulencia (S) de seis cultivares de olivo tratados con 0 (control) y 200 mM NaCl durante 12 semanas.

Parámetro	Fuente de variación					
	Cultivar		Salinidad		Cultivar x Salinidad	
	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$
PS hoja	10,24***	0,078	522,34***	0,796	4,47**	0,034
PS tallo	32,71***	0,234	380,73***	0,544	19,10***	0,136
PS raíz	44,26***	0,626	57,46***	0,162	2,94*	0,042
PS total	21,69***	0,178	420,18***	0,688	4,40**	0,036
R/PA	41,72***	0,111	1150,87***	0,634	2,59*	0,012
Elongación de tallo	22,68***	0,314	141,45***	0,391	9,36***	0,129
AF total	8,31***	0,122	225,35***	0,662	2,66*	0,039
AFH	8,76***	0,182	107,52***	0,446	5,90***	0,122
LAR	19,56***	0,334	122,70***	0,420	2,36*	0,040
SLA	5,93***	0,311	0,61 <sup>NS</sup>	-	1,00 <sup>NS</sup>	-
D	438,81***	0,733	243,55***	0,081	98,74***	0,165
S	1,14 <sup>NS</sup>	-	0,36 <sup>NS</sup>	-	1,17 <sup>NS</sup>	-

NS, \*, \*\*, \*\*\* indican diferencias no significativas o diferencias significativas para  $P \leq 0,05$ , 0,01 ó 0,001, respectivamente.

El PS de hoja, tallo y raíz, la relación R/PA y la elongación de tallo se muestran en la tabla 1.2. Según los valores medios para cada cultivar, 'Frantoio' fue el más vigoroso, ya que presentó una mayor elongación de tallo, así como PS de hoja, tallo y raíz. No se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre 'Frantoio' y 'Cornicabra' para estos parámetros de crecimiento, excepto para el PS de raíz. La menor elongación de tallo y el menor PS de hoja, tallo y total se observaron en 'Casta Cabra' y 'Picudo', lo que indica un crecimiento menos vigoroso de estos cultivares respecto a los demás.

Las plantas crecidas bajo condiciones salinas mostraron menor PS de hoja, tallo y raíz, así como menor elongación de tallo que las plantas control (0 mM NaCl) (Tabla 1.2). Entre estos parámetros, el PS tallo mostró la mayor inhibición (78%), seguido de la elongación de tallo (70%), PS de hoja (67%) y PS de raíz (23%); por lo tanto, el crecimiento del tallo fue más sensible a la salinidad que el de hoja y raíz.

Para un determinado parámetro, la interacción significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre el cultivar y la salinidad implica un comportamiento diferente de los cultivares cuando crecen en medio salino (Tabla 1.2). En presencia de NaCl, 'Frantoio' y 'Picudo' fueron los que mostraron la menor inhibición de PS hoja ( $\approx 62\%$ ), mientras que 'Ocal' fue el que mostró la mayor inhibición (77%). Además, 'Picudo' no redujo el PS de tallo, el PS de raíz y la elongación de tallo cuando creció en medio salino. Sin embargo, 'Cornicabra', 'Frantoio', 'Ocal' y 'Picual' inhibieron significativamente el crecimiento del tallo por la salinidad. El PS de tallo de plantas crecidas en medio salino mostró la mayor inhibición en 'Cornicabra' (87%); en el resto de cultivares la inhibición varió entre 70 ('Frantoio') y 83% ('Ocal'). La elongación de tallo se inhibió un 78, 77, 72 y 61% en 'Ocal', 'Cornicabra', 'Picual' y 'Frantoio', respectivamente. El crecimiento en

medio salino produjo un incremento significativo de la relación R/PA en todos los cultivares (Tabla 1.2), lo que implica un desequilibrio en el crecimiento, con menor desarrollo de la parte aérea respecto a la raíz. El cultivar que mostró mayor incremento de la relación R/PA fue ‘Casta Cabra’ (192%), mientras que ‘Picudo’ fue el que mostró menor incremento (103%).

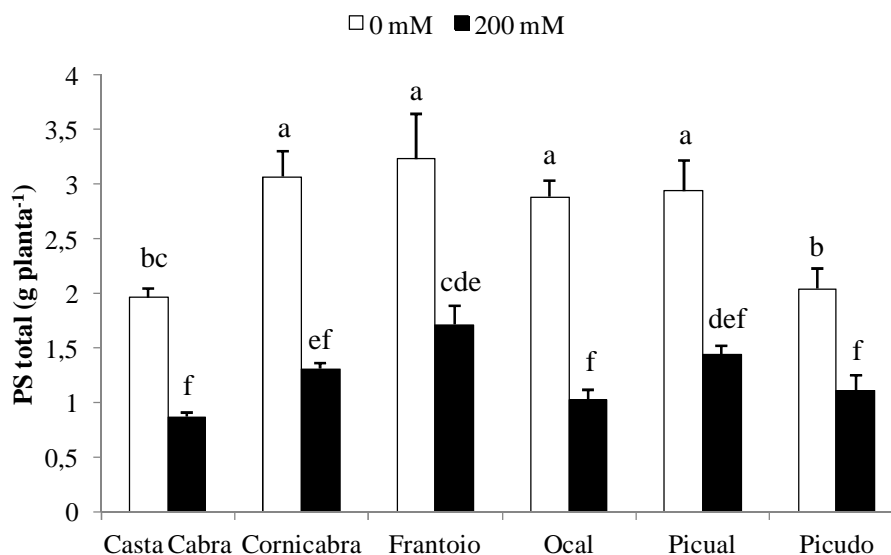
**Tabla 1.2.** Peso seco (PS) de hoja, tallo y raíz, relación raíz/parte aérea (R/PA) y elongación de tallo de seis cultivares de olivo tratados con 0 (control) y 200 mM NaCl durante 12 semanas.

	PS hoja (g planta <sup>-1</sup> )	PS tallo (g planta <sup>-1</sup> )	PS raíz (g planta <sup>-1</sup> )	R/PA	Elongación de tallo (cm planta <sup>-1</sup> )
<b>Cultivar</b>					
Casta Cabra	0,869 bc	0,093 c	0,450 c	0,677 b	5,42 d
Cornicabra	1,13 a	0,242 a	0,817 b	0,787 ab	19,40 a
Frantoio	1,12 a	0,220 a	1,13 a	1,08 a	16,98 ab
Ocal	1,09 ab	0,118 bc	0,744 b	0,885 ab	9,73 c
Picual	1,26 a	0,152 b	0,773 b	0,724 b	13,84 b
Picudo	0,777 c	0,071 c	0,725 b	1,05 a	4,48 d
<b>Salinidad</b>					
Control	1,56 a	0,246 a	0,875 a	0,497 b	17,88 a
200 mM	0,515 b	0,053 b	0,672 b	1,24 a	5,40 b
<b>Cultivar x Salinidad</b>					
Casta Cabra					
Control	1,32 bc	0,163 de	0,476 fg	0,334 g	7,85 de
200 mM	0,414 d	0,037 f	0,430 g	0,974 d	2,98 e
Cornicabra					
Control	1,68 ab	0,431 a	0,955 b	0,446 f	31,60 a
200 mM	0,573 d	0,054 f	0,680 def	1,07 c	7,20 de
Frantoio					
Control	1,62 ab	0,338 b	1,27 a	0,664 e	24,42 b
200 mM	0,614 d	0,102 ef	0,994 b	1,39 ab	9,54 d
Ocal					
Control	1,77 a	0,202 cd	0,911 bc	0,464 f	16,00 c
200 mM	0,412 d	0,035 f	0,576 efg	1,30 b	3,47 e
Picual					
Control	1,87 a	0,241 c	0,821 bcd	0,389 fg	21,55 b
200 mM	0,643 d	0,063 f	0,726 cde	1,05 cd	6,12 de
Picudo					
Control	1,12 c	0,103 ef	0,818 bcd	0,694 e	5,86 de
200 mM	0,433 d	0,037 f	0,632 defg	1,41 a	3,10 e

En cada columna, para cada fuente de variación (cultivar, salinidad o su interacción), las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Cuando consideramos el PS total (Figura 1.1) detectamos una inhibición

significativa ( $P \leq 0,05$ ) del crecimiento por la salinidad, siendo ‘Ocal’ el cultivar que presentó la mayor inhibición (65%), seguido de ‘Cornicabra’ (57%), ‘Casta Cabra’ (56%), ‘Picual’ (51%), ‘Frantoio’ (47%) y ‘Picudo’ (46%).



**Figura 1.1.** Peso seco (PS) total de seis cultivares de olivo tratados con 0 (control) y 200 mM NaCl durante 12 semanas. Los datos son medias  $\pm$  SE (n=6). Las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

El AF total y el LAR mostraron diferencias intraespecíficas (Tabla 1.3). El AF total se redujo significativamente en todos los cultivares por la salinidad, debido a la inhibición del crecimiento de la hoja y a su caída. El cv. Ocal mostró la mayor reducción del AF total (80%), mientras que ‘Cornicabra’ y ‘Picudo’ fueron los que mostraron la menor reducción ( $\approx 65\%$ ). Además, ‘Ocal’ presentó la mayor reducción en LAR (44%), seguido de ‘Picual’ (36%), ‘Picudo’ (35%) y ‘Frantoio’ (34%).

Los índices de esclerofilia, área foliar específica (SLA) y densidad de la hoja (D), al igual que el índice del estrés hídrico de la hoja, la succulencia (S), son parámetros de interés en plantas que crecen en condiciones de estrés hídrico, el cual viene implícito en un estrés salino. La S no se afectó de forma significativa por el cultivar y la salinidad

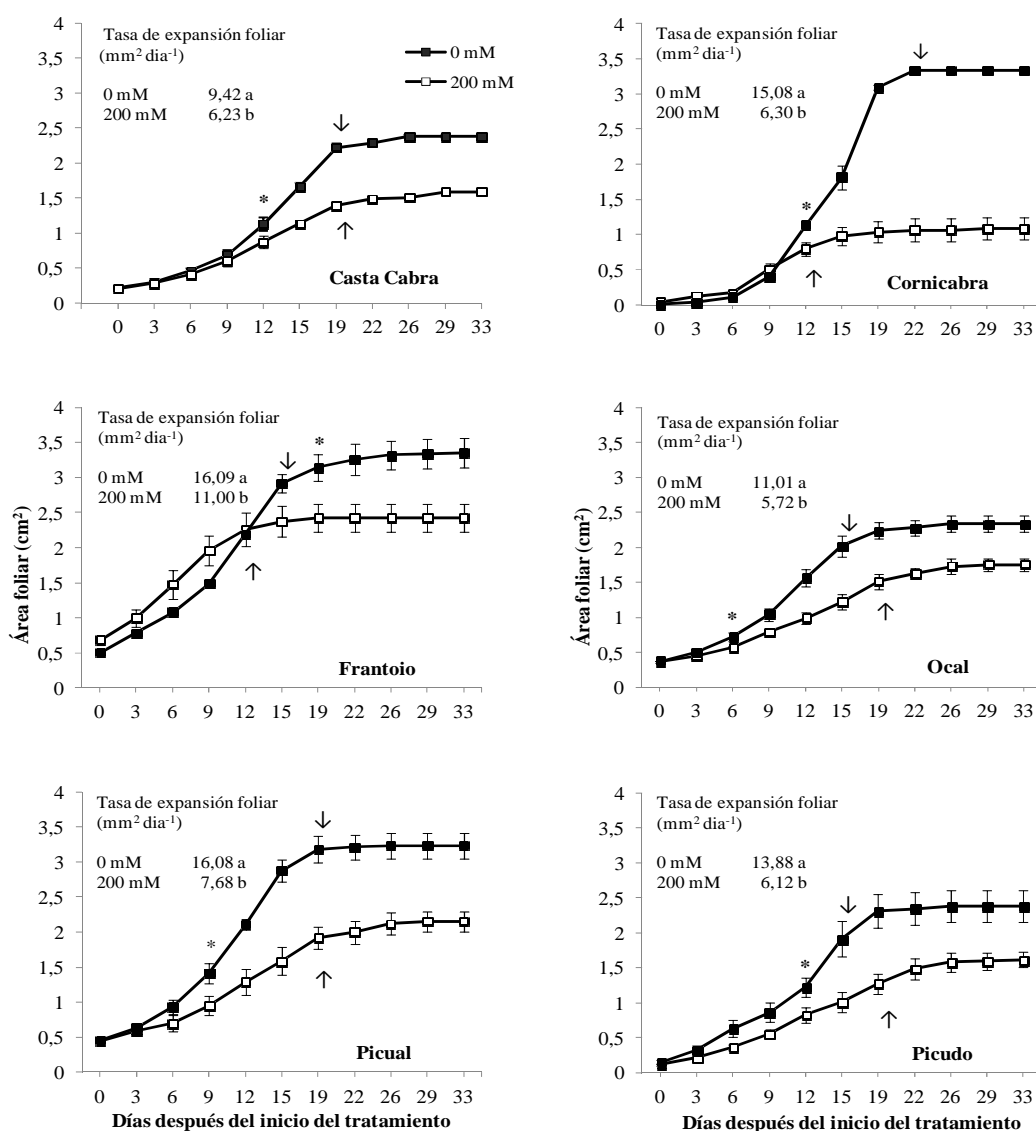
(Tablas 1.1 y 1.3). Además, la salinidad no influyó sobre la SLA, mientras que la D se afectó por todas las fuentes de variación. Sólo los cultivares ‘Casta Cabra’, ‘Frantoio’ y ‘Ocal’ incrementaron D un 18%, 7% y 4% ( $P \leq 0,05$ ), respectivamente.

**Tabla 1.3.** Área foliar (AF) total, relación de área foliar (LAR), área foliar específica (SLA), densidad de la hoja (D) y succulencia (S) de seis cultivares de olivo tratados con 0 (control) y 200 mM NaCl durante 12 semanas.

	AF total (cm <sup>2</sup> planta <sup>-1</sup> )	LAR (m <sup>2</sup> Kg <sup>-1</sup> )	SLA (m <sup>2</sup> Kg <sup>-1</sup> )	D (g Kg <sup>-1</sup> )	S (mg H <sub>2</sub> O cm <sup>-2</sup> )
<b>Cultivar</b>					
Casta Cabra	51,24 b	3,57 a	6,38 ab	400,24 d	20,88
Cornicabra	82,25 a	3,63 a	7,44 a	396,40 d	21,49
Frantoio	61,70 b	2,36 c	5,57 b	455,70 a	22,65
Ocal	61,37 b	2,75 bc	5,33 b	443,68 b	23,84
Picual	89,31 a	3,82 a	7,00 a	383,90 e	23,22
Picudo	49,96 b	2,99 b	6,45 ab	434,04 c	21,26
<b>Salinidad</b>					
Control	100,55 a	3,77 a	6,47	410,10 b	21,95
200 mM	31,39 b	2,60 b	6,25	427,89 a	22,50
<b>Cultivar x Salinidad</b>					
Casta Cabra					
Control	77,11 d	3,95 ab	5,94	367,32 f	22,48
200 mM	25,73 e	3,19 bcd	6,82	433,16 c	19,29
Cornicabra					
Control	122,15 ab	4,02 ab	7,29	396,61 d	20,83
200 mM	42,35 e	3,25 bc	7,58	396,19 d	22,15
Frantoio					
Control	92,93 cd	2,85 cde	5,74	439,26 c	23,53
200 mM	31,80 e	1,87 f	5,41	472,13 a	21,77
Ocal					
Control	102,37 bc	3,53 bc	5,75	435,14 c	22,73
200 mM	20,38 e	1,97 ef	4,91	452,21 b	24,96
Picual					
Control	136,00 a	4,66 a	7,34	385,28 e	21,86
200 mM	42,63 e	2,98 cd	6,62	382,52 e	24,57
Picudo					
Control	74,09 d	3,63 bc	6,74	436,97 c	20,26
200 mM	25,83 e	2,34 def	6,16	431,12 c	22,26

En cada columna, para cada fuente de variación (cultivar, salinidad o su interacción), las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

En la figura 1.2 se representa la expansión foliar. Como podemos observar, la aplicación de NaCl redujo la expansión de la hoja en todos los cultivares ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 1.2.** Expansión de la hoja y tasa de expansión foliar, de plantas de olivo tratadas con 0 (Control) y 200 mM NaCl. Los datos son medias  $\pm$  SE (n=6). Para cada cultivar, \* indica el valor a partir del cual se observaron diferencias significativas según el test de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). La flecha indica el día en que se estabilizó el crecimiento de la hoja (Tukey;  $P \leq 0,05$ ). Para la tasa de expansión foliar, en cada cultivar, las medias seguidas por distinta letra son significativamente diferentes según el test de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Esta inhibición se hace significativa ( $P \leq 0,05$ ) a partir de los 6 días en ‘Ocal’, 9 días en ‘Picual’, 12 días en ‘Casta Cabra’, ‘Cornicabra’ y ‘Picudo’ y, 19 días en ‘Frantoio’. Tras 33 días, el cultivar que redujo más la expansión foliar fue ‘Cornicabra’ (64%), mientras que ‘Frantoio’ y ‘Ocal’ fueron los que menos la inhibieron (25%); una inhibición intermedia mostraron ‘Picudo’ (32%), ‘Casta Cabra’ (34%) y ‘Picual’ (34%).



En plantas crecidas en condiciones de estrés salino, el número de días necesario para que la hoja alcance el área final (AFH) varió en función del cultivar; en unos cultivares descendió moderadamente ('Frantoio', 3 días), descendió drásticamente ('Cornicabra', 10 días), aumentó ('Ocal' y 'Picudo', 4 días) o no se modificó ('Casta Cabra' y 'Picual'). Por tanto, la tasa de expansión foliar (Figura 1.2) se inhibió en todos los cultivares ( $P \leq 0,05$ ), siendo 'Cornicabra' el que mostró la mayor inhibición (58%), mientras que 'Frantoio' fue el que menos se inhibió (32%).

### 1.1.2. Contenido de nutrientes

Atendiendo al análisis estadístico (Tabla 1.4), la principal fuente de variación para el contenido de carbono (C), nitrógeno (N) y relación C/N fue el cultivar.

**Tabla 1.4.** Valor  $F$  y coeficiente de determinación ( $\eta^2$ ) para cultivar, salinidad y su interacción (cultivar x salinidad), de contenido de carbono (C), nitrógeno (N), sodio ( $\text{Na}^+$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ) y calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y relación C/N y  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  en hoja y raíz de seis cultivares de olivo tratados con 0 (control) y 200 mM NaCl durante 12 semanas.

Parámetro	Fuente de variación					
	Cultivar		Salinidad		Cultivar x Salinidad	
	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$
C hoja	33,03***	0,502	33,60***	0,102	21,26***	0,323
N hoja	100,97***	0,659	158,43***	0,103	15,78***	0,060
C/N hoja	98,00**	0,590	184,15***	0,222	26,33***	0,159
C raíz	22,24***	0,631	7,51*	0,043	6,69**	0,190
N raíz	16,83***	0,589	5,20*	0,036	5,90**	0,207
C/N raíz	18,70***	0,591	12,81**	0,081	5,56**	0,176
$\text{Na}^+$ hoja	12974,32***	0,192	210413,02***	0,623	12432,34***	0,184
$\text{K}^+$ hoja	747,87***	0,363	3845,87***	0,373	537,43***	0,261
$\text{Ca}^{2+}$ hoja	2803,97***	0,321	26393,89***	0,605	633,90***	0,072
$\text{K}^+/\text{Na}^+$ hoja	300,27***	0,151	6886,98***	0,691	311,30***	0,156
$\text{Na}^+$ raíz	2931,63***	0,059	195285,06***	0,875	2655,69***	0,066
$\text{K}^+$ raíz	1025,08***	0,253	10600,16***	0,523	904,38***	0,223
$\text{Ca}^{2+}$ raíz	14740,26***	0,319	77076,75***	0,333	16104,56***	0,348
$\text{K}^+/\text{Na}^+$ raíz	209,91***	0,070	12893,88***	0,863	194,56***	0,065

NS, \*, \*\*, \*\*\* indican diferencias no significativas o diferencias significativas para  $P \leq 0,05$ , 0,01 ó 0,001, respectivamente.

La concentración de C en hoja fue mayor que en raíz en todos los cultivares

(Tabla 1.5). En relación al efecto de la salinidad, el C descendió en hoja y aumentó en raíz, mientras que en el caso del N ocurrió al contrario; sin embargo, la relación C/N aumentó en ambos órganos un 11%, aproximadamente.

**Tabla 1.5.** Contenido de carbono (C) y nitrógeno (N), y relación C/N en hoja y raíz de seis cultivares de olivo tratados con 0 (control) y 200 mM NaCl durante 12 semanas.

	C		N		C/N	
	Hoja	Raíz	Hoja	Raíz	Hoja	Raíz
<b>Cultivar</b>						
Casta Cabra	48,53 d	43,97 b	2,41 b	2,33 d	20,15 b	18,93 a
Cornicabra	49,49 ab	44,36 ab	2,13 cd	3,13 a	23,30 a	14,29 d
Frantoio	48,64 d	44,95 a	2,06 d	2,62 bc	23,70 a	17,26 b
Ocal	49,11 c	44,51 ab	2,20 c	2,53 cd	22,88 a	17,77 ab
Picual	49,18 bc	44,18 b	2,78 a	2,33 d	17,73 c	18,93 a
Picudo	49,52 a	42,61 c	2,09 cd	2,77 b	23,72 a	15,58 c
<b>Salinidad</b>						
Control	49,25 a	43,90 b	2,14 b	2,69 a	20,55 b	16,50 b
200 mM	48,90 b	44,29 a	2,42 a	2,55 b	23,29 a	17,76 a
<b>Cultivar x Salinidad</b>						
Casta Cabra						
Control	49,16 abc	44,28 bc	2,40 cde	2,43 cd	20,44 cd	18,26 b
200 mM	47,89 e	43,66 c	2,41 cd	2,23 d	19,87 de	19,60 a
Cornicabra						
Control	49,68 a	44,05 bc	2,29 def	2,90 b	21,68 bc	15,22 de
200 mM	49,30 ab	44,66 bc	1,98 h	3,37 a	24,93 a	13,37 f
Frantoio						
Control	48,34 de	44,90 a	2,21 ef	2,86 b	21,88 bc	15,71 cd
200 mM	48,94 bc	45,00 a	1,92 h	2,39 cd	25,53 a	18,81 ab
Ocal						
Control	49,05 bc	44,62 bc	2,52 bc	2,75 b	19,44 de	16,23 cd
200 mM	49,18 abc	44,40 bc	1,87 h	2,31 d	26,32 a	19,30 ab
Picual						
Control	49,61 a	43,92 bc	2,89 a	2,29 d	17,15 f	19,17ab
200 mM	48,74 cd	44,43 bc	2,67 b	2,38cd	18,30 ef	18,69 ab
Picudo						
Control	49,66 a	41,65 d	2,19 fg	2,90 b	22,68 b	14,39 ef
200 mM	49,39 ab	43,56 c	1,94 gh	2,63 bc	24,76 a	16,77 c

En cada columna, para cada fuente de variación (cultivar, salinidad o su interacción), las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

La interacción entre cultivar y salinidad fue significativa (Tabla 1.4), por tanto, se observaron diferencias en la respuesta a la salinidad entre diferentes cultivares. En raíz de plantas crecidas en medio salino, el contenido de C aumentó ( $P \leq 0,05$ ) en

‘Picudo’, mientras que el de N se incrementó en ‘Cornicabra’ (16%) y descendió en ‘Frantoio’ y ‘Ocal’ ( $\approx 16\%$ ). En hoja, el contenido de C aumentó por la salinidad en ‘Frantoio’ (1%) y descendió en ‘Casta Cabra’ y ‘Picual’, mientras que, el contenido de N descendió ( $P \leq 0,05$ ) en ‘Cornicabra’ (13%), ‘Frantoio’ (13%), ‘Ocal’ (26%) y ‘Picual’ (8%). Por tanto, con 200 mM NaCl, aumentó el N en raíz de ‘Cornicabra’ y el C en raíz de ‘Picudo’ y en hoja de ‘Frantoio’.

El análisis estadístico multifactorial de los contenidos de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y, relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  de hoja y raíz se muestran en la tabla 1.4. En general, la principal fuente de variación fue la salinidad ( $P \leq 0,001$ ), excepto para el  $\text{Ca}^{2+}$  en raíz, en el que las tres fuentes de variación tuvieron un efecto similar ( $\eta^2=0,319$ ,  $0,333$  y  $0,348$  para cultivar, NaCl y su interacción, respectivamente;  $P \leq 0,001$ ). En el caso del  $\text{K}^+$  en hoja es importante destacar que cultivar y NaCl influyeron de forma semejante ( $\eta^2=0,363$  y  $0,373$  para cultivar y NaCl, respectivamente;  $P \leq 0,001$ ).

La acumulación de diferentes iones en los órganos de la planta se determinó para conocer el efecto de la sal sobre la homeostasis iónica. Entre los cultivares estudiados, se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) en la acumulación de  $\text{Na}^+$  en raíz y hoja (Tabla 1.6). La concentración de  $\text{Na}^+$  en hoja mostró los niveles más elevados en ‘Picual’ (1,35%) y los más bajos en ‘Ocal’ (0,302%), mientras que en raíz, ‘Picudo’ mostró los niveles más elevados (2,71%) y, ‘Picual’ y ‘Frantoio’ los más bajos (1,56 y 1,59%, respectivamente).

El crecimiento en medio salino trajo consigo un incremento de la concentración de  $\text{Na}^+$  en raíz y hoja ( $P \leq 0,001$ ), aunque dicho incremento fue distinto para cada cultivar. Así, el  $\text{Na}^+$  aumentó más en hoja que en raíz en ‘Cornicabra’, ‘Picual’, ‘Frantoio’ y ‘Casta Cabra’, mientras que en ‘Ocal’ y ‘Picudo’, la concentración de  $\text{Na}^+$

aumentó más en raíz que en hoja.

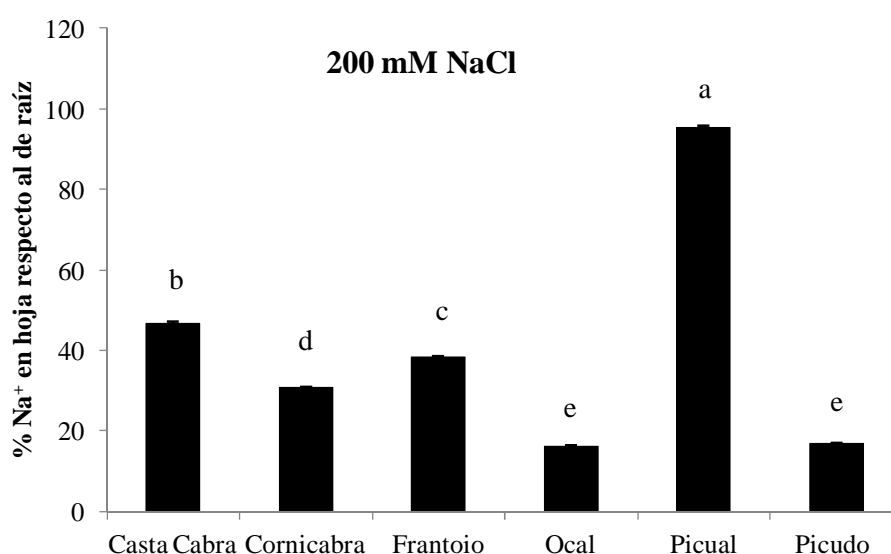
**Tabla 1.6.** Contenido de sodio (Na<sup>+</sup>), potasio (K<sup>+</sup>) y calcio (Ca<sup>2+</sup>) en hoja y raíz de seis cultivares de olivo tratados con 0 (control) y 200 mM NaCl durante 12 semanas.

	Na <sup>+</sup>		K <sup>+</sup>		Ca <sup>2+</sup>	
	Hoja	Raíz	Hoja	Raíz	Hoja	Raíz
<b>Cultivar</b>						
Casta Cabra	0,874 b	2,16 c	1,66 a	1,07 d	0,403 b	1,95 b
Cornicabra	0,571 c	2,22 b	1,28 d	2,07 a	0,359 c	2,48 a
Frantoio	0,544 d	1,59 e	1,34 c	1,08 d	0,282 f	1,34 d
Ocal	0,302 f	1,72 d	1,30 d	0,627 e	0,298 e	0,760 f
Picual	1,35 a	1,56 e	1,14 e	1,44 b	0,514 a	1,17 e
Picudo	0,467 e	2,71 a	1,42 b	1,28 c	0,341 d	1,67 c
<b>Salinidad</b>						
Control	0,066 b	0,493 b	1,52 a	1,90 a	0,472 a	2,13 a
200 mM	1,30 a	3,50 a	1,20 b	0,627 b	0,260 b	0,994 b
<b>Cultivar x Salinidad</b>						
Casta Cabra						
Control	0,076 gh	0,752 f	1,96 a	1,69 c	0,542 b	3,01b
200 mM	1,67 b	3,58 b	1,36 e	0,440 g	0,264 h	0,889h
Cornicabra						
Control	0,027 i	0,816 e	1,38 de	3,58 a	0,521 c	4,02 a
200 mM	1,11 c	3,63 b	1,01 f	0,570 f	0,198 i	0,945 g
Frantoio						
Control	0,043 i	0,458 g	1,47 c	1,54 d	0,366 g	1,63 d
200 mM	1,04 d	2,73 d	1,22 f	0,616 f	0,198 i	1,05 f
Ocal						
Control	0,070 h	0,154 i	1,38 de	0,836 e	0,411 f	0,768 i
200 mM	0,533 f	3,28 c	1,23 f	0,417 g	0,186 j	0,752 i
Picual						
Control	0,088 gh	0,384 h	1,52 b	2,06 b	0,566 a	1,79 c
200 mM	2,62 a	2,74 d	0,751 g	0,816 e	0,461 d	0,550 j
Picudo						
Control	0,094 g	0,395 h	1,42 cd	1,67 c	0,425 e	1,57 e
200 mM	0,840 e	5,03 a	1,43 c	0,904 e	0,257 h	1,78 c

En cada columna, para cada fuente de variación (cultivar, salinidad o su interacción), las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Además, según los valores obtenidos al calcular la concentración de Na<sup>+</sup> en hoja respecto a la de raíz (Figura 1.3), podemos dividir los cultivares en tres grupos. El primer grupo incluye sólo a 'Picual', el cual mostró una concentración similar de Na<sup>+</sup> en hoja y raíz. El segundo grupo incluye cultivares que acumulan Na<sup>+</sup> a altas concentraciones en la raíz, pero que incrementan el Na<sup>+</sup> más en hoja que en raíz (Tabla

1.6). Estos cultivares son ‘Casta Cabra’, ‘Cornicabra’ y ‘Frantoio’, los cuales mostraron una concentración de  $\text{Na}^+$  en hoja respecto a la de raíz de 47%, 31% y 38%, respectivamente. El tercer grupo incluye ‘Ocal’ y ‘Picudo’, los cuales se caracterizaron por una importante acumulación de  $\text{Na}^+$  en la raíz y una gran inhibición del transporte de éste a la hoja. Por tanto, ‘Picudo’ y ‘Ocal’ mostraron los mecanismos más efectivos de exclusión de  $\text{Na}^+$  con 200 mM NaCl.



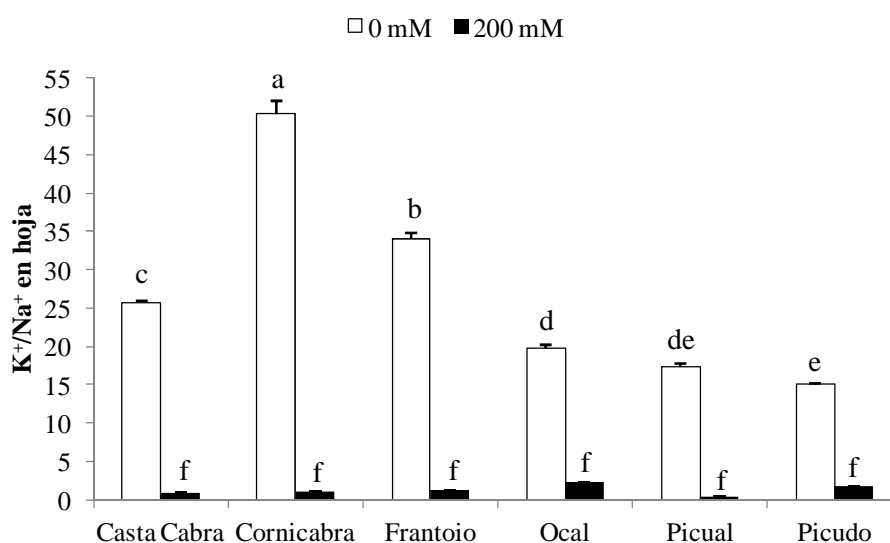
**Figura 1.3.** Porcentaje de concentración de sodio ( $\text{Na}^+$ ) en hoja (%PS) comparado con la concentración de sodio ( $\text{Na}^+$ ) en raíz (%PS), de seis cultivares de olivo tratados con 200 mM NaCl durante 12 semanas. Los datos son medias  $\pm$  SE (n=3). Las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

En contraste, la salinidad produjo un descenso de la concentración de  $\text{K}^+$  en hoja y raíz ( $P \leq 0,001$ ), siendo este descenso mucho mayor en raíz. La absorción de  $\text{K}^+$  se inhibió por el tratamiento salino en todos los cultivares. En ‘Picudo’ el descenso de la absorción de  $\text{K}^+$  sólo se manifestó significativamente ( $P \leq 0,001$ ) en raíz, donde la concentración de  $\text{K}^+$  descendió un 46%. Entre el resto de cultivares, ‘Ocal’ fue el que manifestó la menor reducción tanto en hoja como raíz (11% y 50%, respectivamente).

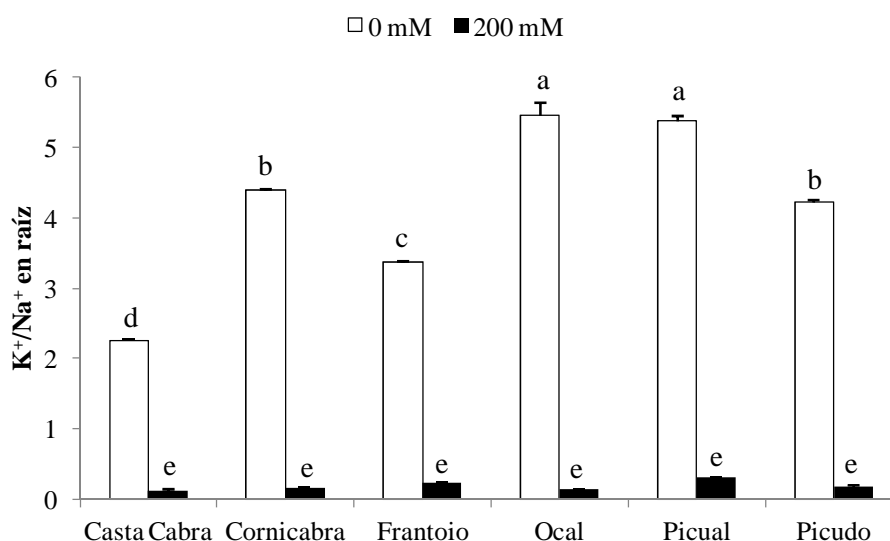
En los otros cultivares, el descenso de  $K^+$  osciló entre el 50 y 84% en raíz, y entre el 17 y 51% en hoja.

La relación  $K^+/Na^+$  descendió de forma significativa por el NaCl (Figuras 1.4 y 1.5). Este descenso fue mayor en raíz que en hoja en plantas de ‘Ocal’ y ‘Picudo’ crecidas con 200 mM NaCl. Además, ‘Ocal’ y ‘Picudo’ mostraron el menor descenso de la relación  $K^+/Na^+$  en hoja ( $\approx 88\%$ ), mientras que ‘Picual’ registró mayor (98%) al igual que ‘Cornicabra’.

El contenido de  $Ca^{2+}$  mostró una respuesta diferente a la salinidad en función del cultivar y del órgano (Tabla 1.6). El  $Ca^{2+}$  descendió en todos los cultivares, excepto en raíz de ‘Ocal’, donde no se redujo respecto a plantas control. En raíz de ‘Picudo’ aumentó un 13% ( $P \leq 0,001$ ).



**Figura 1.4.** Relación  $K^+/Na^+$  en hoja de seis cultivares de olivo tratados con 0 (control) y 200 mM NaCl durante 12 semanas. Los datos son medias  $\pm$  SE ( $n=3$ ). Las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 1.5.** Relación  $K^+/Na^+$  en raíz de seis cultivares de olivo tratados con 0 (control) y 200 mM NaCl durante 12 semanas. Los datos son medias  $\pm$  SE ( $n=3$ ). Las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

### 1.1.3. Intercambio gaseoso

La tasa de asimilación neta ( $P_n$ ) se vio influenciada principalmente por la salinidad ( $\eta^2=0,384$ ;  $P \leq 0,001$ ) y el cultivar ( $\eta^2=0,221$ ;  $P \leq 0,001$ ) (Tabla 1.7). Según los valores medios para salinidad, la  $P_n$  se redujo un 40% por la aplicación de 200 mM NaCl respecto a plantas control (Tabla 1.8). La comparación de los valores medios de la interacción entre cultivar y NaCl (Tukey;  $P \leq 0,05$ ), reveló que, en plantas control (0 mM), ‘Casta Cabra’ y ‘Frantoio’ mostraron los valores más elevados de  $P_n$  (11,12 y 11,31  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente) (Tabla 1.8). En todos los cultivares descendió la  $P_n$  por la salinidad, siendo ‘Frantoio’ el que mostró la mayor inhibición (57%). Por otro lado, ‘Casta Cabra’ sólo redujo la  $P_n$  un 20% en medio salino, alcanzando valores similares ( $P \leq 0,05$ ) a los que se detectaron para ‘Cornicabra’, ‘Ocal’, ‘Picual’ y ‘Picudo’ cuando crecieron en ausencia de NaCl. La inhibición de la  $P_n$  por la salinidad osciló

entre un 25% y 43% para el resto de cultivares.

**Tabla 1.7.** Valor  $F$  y coeficiente de determinación ( $\eta^2$ ) para cultivar, salinidad y su interacción (cultivar x salinidad), de tasa de asimilación neta ( $P_n$ ), conductividad estomática ( $g_s$ ), transpiración (E), concentración interna de  $\text{CO}_2$  (Ci) y eficiencia fotosintética en el uso del nitrógeno (PNUE) de seis cultivares de olivo tratados con 0 (control) y 200 mM NaCl durante 12 semanas.

Parámetro	Fuente de variación					
	Cultivar		Salinidad		Cultivar x Salinidad	
	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$
$P_n$	8,26***	0,221	72,02***	0,384	2,79*	0,074
$g_s$	10,22***	0,160	192,18***	0,602	3,15**	0,049
E	12,76***	0,156	241,73***	0,593	8,40***	0,103
Ci	18,22***	0,390	36,15***	0,155	9,29***	0,200
PNUE	7,87***	0,226	58,77***	0,337	3,21***	0,092

NS, \*, \*\*, \*\*\* indican diferencias no significativas o diferencias significativas para  $P \leq 0,05$ , 0,01 ó 0,001, respectivamente.

Según el estudio estadístico (Tabla 1.7) de los datos de conductividad estomática ( $g_s$ ), la principal fuente de variación fue la salinidad ( $\eta^2=0,602$ ;  $P \leq 0,001$ ). El análisis de la varianza multifactorial mostró un drástico descenso de la  $g_s$  en plantas crecidas en medio salino (82%). El cultivar que mostró valores más elevados de  $g_s$  fue ‘Frantoio’ ( $167,53 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

La interacción positiva entre cultivar y salinidad se manifestó en una gran variabilidad en la respuesta de la  $g_s$  al NaCl entre los cultivares estudiados; ‘Picual’ mostró la mayor inhibición (90%) y ‘Cornicabra’ y ‘Frantoio’ la menor ( $\approx 76\%$ ), a pesar de que ‘Frantoio’ mostró los niveles más elevados de  $g_s$  en plantas control ( $270,02 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). ‘Casta Cabra’, ‘Ocal’ y ‘Picudo’ redujeron su  $g_s$  en un porcentaje similar ( $\approx 84\%$ ).

En lo que respecta a la transpiración (E), si nos centramos en el cultivar, se pueden diferenciar 2 grupos (Tabla 1.8); ‘Casta Cabra’, ‘Cornicabra’ y ‘Picual’ con una E alta ( $1,94\text{-}1,57 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), frente a ‘Frantoio’, ‘Ocal’ y ‘Picudo’ que



mostraron una E baja ( $1,09-0,677 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). La salinidad redujo la E de forma similar a la  $g_s$  (82%), siendo ésta la principal fuente de variación ( $\eta^2=0,593$ ;  $P \leq 0,001$ ; tabla 1.7). La interacción entre ambas fuentes de variación, mostró que la mayor inhibición de la E por el estrés salino la presentó el cv. Picual (88%); en el resto de los cultivares la inhibición osciló entre 72% ('Cornicabra') y 87% ('Casta Cabra').

**Tabla 1.8.** Tasa de asimilación neta ( $P_n$ ), conductividad estomática ( $g_s$ ), transpiración (E), concentración interna de  $\text{CO}_2$  (Ci) y eficiencia fotosintética en el uso del nitrógeno (PNUE) de seis cultivares de olivo tratados con 0 (control) y 200 mM NaCl durante 12 semanas.

	$P_n$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	$g_s$ ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	E ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	Ci ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ )	PNUE ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ N}$ )
<b>Cultivar</b>					
Casta Cabra	10,02 a	90,87 b	1,94 a	286,14 c	36,66 a
Cornicabra	5,68 c	73,76 b	1,57 ab	642,99 a	25,24 bc
Frantoio	8,23 b	167,53 a	0,677 c	634,00 a	29,09 b
Ocal	5,98 c	69,14 b	1,09 bc	499,04 ab	19,97 c
Picual	7,53 b	88,01 b	1,77 a	382,12 bc	26,34 b
Picudo	7,08 bc	74,55 b	0,851 c	370,60 bc	29,02 b
<b>Salinidad</b>					
Control	9,25 a	159,53 a	2,24 a	384,22 b	33,86 a
200 mM	5,59 b	28,42 b	0,397 b	554,08 a	21,58 b
<b>Cultivar x Salinidad</b>					
Casta Cabra					
Control	11,12 a	157,23 b	3,43 a	338,23 d	38,19 ab
200 mM	8,92 b	24,50 d	0,457 e	234,06 d	35,12 ab
Cornicabra					
Control	8,01 bc	120,88 bc	2,45 b	457,82 cd	35,72 ab
200 mM	5,65 de	27,25 d	0,679 de	793,24 ab	14,77 e
Frantoio					
Control	11,31 a	270,02 a	1,29 cd	413,26 cd	38,86 a
200 mM	4,87 de	64,89 cd	0,191 e	854,75 a	19,32 de
Ocal					
Control	7,64 bc	119,76 bc	1,79 c	394,96 cd	24,19 cd
200 mM	4,33 e	18,29 d	0,394 e	603,11 bc	15,74 e
Picual					
Control	8,60 b	160,03 b	3,15 a	378,52 cd	30,37 bc
200 mM	6,46 cd	15,71 d	0,391 e	385,71 cd	22,30 de
Picudo					
Control	8,81 b	128,69 bc	1,54 c	322,52 d	35,82 ab
200 mM	5,34 de	20,42 d	0,266 e	418,68 cd	22,22 de

En cada columna, para cada fuente de variación (cultivar, salinidad o su interacción), las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Los valores de la concentración interna de CO<sub>2</sub> (Ci) vinieron condicionados principalmente por el cultivar ( $\eta^2=0,390$ ;  $P\leq 0,001$ ) (Tabla 1.7). Según el cultivar, ‘Cornicabra’, ‘Frantoio’ y ‘Ocal’ presentaron los niveles más elevados de CO<sub>2</sub> (Tabla 1.8). La interacción entre cultivar y salinidad reveló 2 tipos de respuesta ante el estrés salino; ‘Casta Cabra’, ‘Ocal’, ‘Picual’ y ‘Picudo’ no modificaron la Ci, mientras que ‘Cornicabra’ y ‘Frantoio’ la aumentaron. Es importante destacar que en el análisis estadístico multifactorial, los valores medios para salinidad aumentaron un 44% en plantas crecidas con 200 mM NaCl.

La eficiencia fotosintética en el uso del nitrógeno (PNUE) estuvo condicionada (Tabla 1.7) por la salinidad ( $\eta^2=0,337$ ;  $P\leq 0,001$ ) y el cultivar ( $\eta^2=0,226$ ;  $P\leq 0,001$ ). El cultivar que mostró una mayor PNUE fue ‘Casta Cabra’ (36,66  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ N}$ ). En general, el estrés salino descendió la PNUE (36%), sin embargo, la interacción positiva entre cultivar y salinidad ( $P\leq 0,001$ ) manifestó una respuesta diferente al estrés salino entre los cultivares. En ‘Casta Cabra’ no descendió la PNUE de forma significativa ( $P\leq 0,05$ ), al contrario de lo que ocurrió en el resto de cultivares; en ‘Cornicabra’ se redujo un 59%, seguido de ‘Frantoio’ (50%), ‘Picudo’ (38%), ‘Ocal’ (35%) y ‘Picual’ (27%).

#### **1.1.4. Pigmentos fotosintéticos**

El contenido de pigmentos fotosintéticos, clorofila a (C<sub>a</sub>), clorofila b (C<sub>b</sub>), carotenoides (Car) y clorofila total (C<sub>a+b</sub>), así como la relación clorofila total/carotenoides (C<sub>a+b</sub>/Car), se muestra en la tabla 1.10. Atendiendo al estudio estadístico (Tabla 1.9), la principal fuente de variación fue la presencia de sal en el medio.

**Tabla 1.9.** Valor  $F$  y coeficiente de determinación ( $\eta^2$ ), para cultivar, salinidad y su interacción (cultivar x salinidad), de contenido de clorofila a ( $C_a$ ), clorofila b ( $C_b$ ), carotenoides ( $Car$ ) y clorofila total ( $C_{a+b}$ ) y, relación clorofila total/carotenoides ( $C_{a+b}/Car$ ) en hoja de seis cultivares de olivo tratados con 0 (control) y 200 mM NaCl durante 12 semanas.

Parámetro	Fuente de variación					
	Cultivar		Salinidad		Cultivar x Salinidad	
	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$
$C_a$	48,18***	0,269	448,73***	0,502	33,70***	0,188
$C_b$	50,37***	0,278	454,52***	0,502	32,76***	0,181
$Car$	44,95***	0,292	363,94***	0,473	29,09***	0,189
$C_{a+b}$	48,86***	0,271	452,12***	0,502	33,50***	0,186
$C_{a+b}/Car$	16,89***	0,103	641,46***	0,783	11,49***	0,070

NS, \*, \*\*, \*\*\* indican diferencias no significativas o diferencias significativas para  $P \leq 0,05$ , 0,01 ó 0,001, respectivamente.

Entre los seis cultivares estudiados, ‘Picual’ y ‘Picudo’ fueron los que presentaron mayor y menor nivel de pigmentos fotosintéticos respectivamente (Tabla 1.10). El contenido de  $C_a$ ,  $C_b$ ,  $Car$  y  $C_{a+b}$  y  $C_{a+b}/Car$  descendió por la salinidad en todos los cultivares.

En presencia de sal, el cultivar Picual fue el que mayor descenso mostró en  $C_a$ ,  $C_b$ ,  $Car$  y  $C_{a+b}$  (57%, 55%, 52% y 57%, respectivamente) seguido por ‘Casta Cabra’, ‘Picudo’, ‘Frantoio’, ‘Cornicabra’ y ‘Ocal’. La salinidad no afectó al contenido de  $C_b$  y  $Car$  en ‘Ocal’. La relación  $C_{a+b}/Car$  descendió un 10% en ‘Picual’ seguido de ‘Picudo’ (8%), ‘Casta Cabra’ (6%), ‘Frantoio’ (6%), ‘Cornicabra’ (5%) y por último ‘Ocal’ (4%).

**Tabla 1.10.** Contenido de clorofila a ( $C_a$ ), clorofila b ( $C_b$ ), carotenoides (Car), clorofila total ( $C_{a+b}$ ) y relación clorofila total/carotenoides ( $C_{a+b}/\text{Car}$ ) en hoja de seis cultivares de olivo tratados con 0 (control) y 200 mM NaCl durante 12 semanas.

	$C_a$ (mg g <sup>-1</sup> PS)	$C_b$ (mg g <sup>-1</sup> PS)	Car (mg g <sup>-1</sup> PS)	$C_{a+b}$ (mg g <sup>-1</sup> PS)	$C_{a+b}/\text{Car}$
<b>Cultivar</b>					
Casta Cabra	2,08 b	0,827 b	0,653 b	2,90 b	4,40 a
Cornicabra	1,78 c	0,683 c	0,568 c	2,46 c	4,33 bc
Frantoio	1,76 c	0,701 c	0,567 c	2,46 c	4,31 bc
Ocal	1,75 c	0,690 c	0,569 c	2,44 c	4,28 cd
Picual	2,43 a	0,931 a	0,758 a	3,36 a	4,36 ab
Picudo	1,32 d	0,506 d	0,428 d	1,83 d	4,29 d
<b>Salinidad</b>					
Control	2,32 a	0,900 a	0,717 a	3,22 a	4,47 a
200 mM	1,39 b	0,546 b	0,463 b	1,94 b	4,17 b
<b>Cultivar x Salinidad</b>					
Casta Cabra					
Control	2,78 b	1,11 b	0,858 b	3,90 b	4,54 ab
200 mM	1,37 ef	0,542 e	0,447 fg	1,91 ef	4,27 d
Cornicabra					
Control	2,02 c	0,769 c	0,629 cd	2,79 c	4,44 bc
200 mM	1,54 e	0,596 e	0,501 ef	2,13 e	4,21 de
Frantoio					
Control	2,10 c	0,846 c	0,663 c	2,95 c	4,44 bc
200 mM	1,41 e	0,556 e	0,470 f	1,97 e	4,18 de
Ocal					
Control	1,95 cd	0,761 cd	0,619 cde	2,71 cd	4,37 c
200 mM	1,55 e	0,620 de	0,519 def	2,17 e	4,18 de
Picual					
Control	3,41 a	1,29 a	1,02 a	4,70 a	4,59 a
200 mM	1,45 e	0,575 e	0,491 f	2,03 e	4,13 ef
Picudo					
Control	1,63 de	0,626 de	0,511 ef	2,25 de	4,41 c
200 mM	1,02 f	0,387 f	0,345 g	1,41 f	4,06 f

En cada columna, para cada fuente de variación (cultivar, salinidad o su interacción), las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

### 1.1.5. Metabolitos e indicadores del estrés en la hoja

Los datos indicaron variabilidad significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre cultivares para azúcares, proteína, aminoácidos, prolina, fenoles totales y grupos tiol, siendo el cultivar la principal fuente de variación en todos los casos (Tablas 1.11 y 1.12).

**Tabla 1.11.** Valor  $F$  y coeficiente de determinación ( $\eta^2$ ), para cultivar, salinidad y su interacción (cultivar x salinidad), de contenido de azúcares, proteína, aminoácidos, prolina, fenoles totales y grupos tiol en hoja de seis cultivares de olivo tratados con 0 (control) y 200 mM NaCl durante 12 semanas.

Parámetro	Fuente de variación					
	Cultivar		Salinidad		Cultivar x Salinidad	
	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$
Azúcares	38,41***	0,617	58,07***	0,187	4,99**	0,080
Proteína	9842,82***	0,900	632,22***	0,011	972,35***	0,089
Aminoácidos	40,33***	0,625	72,36***	0,224	2,51*	0,039
Prolina	27,06***	0,643	10,36**	0,049	5,76***	0,137
Fenoles totales	892,45***	0,877	32,63***	0,010	106,72***	0,105
Grupos tiol	2096,11***	0,627	2987,96***	0,179	638,77***	0,191

NS, \*, \*\*, \*\*\* indican diferencias no significativas o diferencias significativas para  $P \leq 0,05$ , 0,01 ó 0,001, respectivamente.

Según el análisis multifactorial (Tabla 1.12), la salinidad provocó un descenso en todos los parámetros excepto en el contenido de fenoles totales, el cual aumentó un 5%. En lo que respecta al contenido de azúcares, ‘Cornicabra’ mostró el mayor descenso (32%), mientras que en ‘Frantoio’ y ‘Picual’ no se afectó. El contenido de proteína, mostró mayor variabilidad entre cultivares en respuesta a la salinidad: descendió en ‘Frantoio’ (33%), ‘Picudo’ (25%) y ‘Casta Cabra’ (16%), no se afectó en ‘Cornicabra’, y aumentó en ‘Ocal’ (27%) y ‘Picual’ (64%). De forma similar, el contenido de fenoles, aumentó por la salinidad en ‘Frantoio’, ‘Ocal’ y ‘Picual’, no se afectó en ‘Cornicabra’ y disminuyó en ‘Casta Cabra’ y ‘Picudo’. El efecto de la sal en el contenido de prolina sólo fue significativo ( $P \leq 0,05$ ) en ‘Casta Cabra’ y ‘Frantoio’ con una reducción del 42 y 55%, respectivamente; mientras que, en el contenido de aminoácidos, el efecto de la sal fue significativo en todos los cultivares, siendo ‘Picudo’ el que mostró el menor descenso (11%). Finalmente, el contenido de grupos tiol no se afectó por la salinidad en ‘Cornicabra’ y ‘Ocal’, mientras que en ‘Casta Cabra’, ‘Picual’, ‘Picudo’ y ‘Frantoio’ descendió un 34, 27, 22 y 11%, respectivamente.

**Tabla 1.12.** Contenido de azúcares, proteína, aminoácidos y prolina, fenoles totales y grupos tiol en hoja de seis cultivares de olivo tratados con 0 (control) y 200 mM NaCl durante 12 semanas.

	Azúcares (mg g <sup>-1</sup> PS)	Proteína (mg g <sup>-1</sup> PS)	Aminoácidos (µg g <sup>-1</sup> PS)	Prolina (µg g <sup>-1</sup> PS)	Fenoles totales (mg g <sup>-1</sup> PS)	Grupos tiol (nmol g <sup>-1</sup> PS)
<b>Cultivar</b>						
Casta Cabra	24,69 c	3,05 d	166,21 a	64,48 b	22,36 d	142,65 a
Cornicabra	44,00 a	3,42 c	147,47 a	79,32 b	24,23 c	108,05 c
Frantoio	25,73 c	8,26 a	142,80 a	40,80 c	36,96 a	98,13 d
Ocal	39,83 a	3,91 b	82,79 b	69,80 b	36,99 a	91,19 e
Picual	29,39 bc	1,42 f	167,90 a	102,19 a	17,21 e	125,27 b
Picudo	32,09 b	2,26 e	97,03 b	69,42 b	31,12 b	86,22 f
<b>Salinidad</b>						
Control	36,53 a	3,97 a	153,65 a	76,05 a	27,51 b	119,15 a
200 mM	28,72 b	3,47 b	114,42 b	65,95 b	28,78 a	98,01 b
<b>Cultivar x Salinidad</b>						
Casta Cabra						
Control	28,21 cdef	3,31 e	185,50 ab	81,71 abc	24,79 f	172,04 a
200 mM	21,16 g	2,79 f	146,92 def	47,25 de	19,93 g	113,01 c
Cornicabra						
Control	52,40 a	3,50 d	175,38 abc	82,79 abc	23,39 f	108,23 d
200 mM	35,59 bcd	3,35 de	119,57 fgh	74,84 bc	25,08 f	108,04 d
Frantoio						
Control	25,76 fg	9,89 a	160,04 cde	56,20 cd	32,55 d	103,58 e
200 mM	25,71 fg	6,62 b	125,56 fg	25,40 e	41,37 a	92,59 g
Ocal						
Control	44,33 ab	3,45 de	99,68 gh	64,42 cd	35,69 c	90,38 g
200 mM	35,34 cd	4,38 c	65,91 i	75,18 bc	38,30 b	92,55 g
Picual						
Control	31,61 cde	1,07 j	198,63 a	100,64 ab	14,67 h	145,02 b
200 mM	27,17 def	1,76 i	137,17 ef	103,75 a	19,75 g	105,40 de
Picudo						
Control	36,84 bc	2,58 g	102,69 gh	70,56 cd	33,96 cd	96,86 f
200 mM	27,34 def	1,93 h	91,38 hi	68,28 cd	28,28 e	75,61 h

En cada columna, para cada fuente de variación (cultivar, salinidad o su interacción), las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

**Tabla 1.13.a.** Matriz de correlaciones entre las variables estudiadas.

	PS tallo	PS raíz	PS total	R/PA	Elongación	AF total	LAR	AFH	SLA	D	S	C hoja	N hoja	C/N hoja	C raíz
PS hoja	0,854***	0,538 <sup>NS</sup>	0,953***	-0,900***	0,823**	0,978***	0,741**	0,822**	0,20 <sup>NS</sup>	-0,334 <sup>NS</sup>	-0,084 <sup>NS</sup>	0,324 <sup>NS</sup>	0,586*	-0,577*	0,011 <sup>NS</sup>
PS tallo		0,670*	0,920***	-0,726**	0,966***	0,858***	0,525 <sup>NS</sup>	0,894***	0,174 <sup>NS</sup>	-0,239 <sup>NS</sup>	-0,083 <sup>NS</sup>	0,226 <sup>NS</sup>	0,309 <sup>NS</sup>	-0,329 <sup>NS</sup>	0,149 <sup>NS</sup>
PS raíz			0,758**	-0,213 <sup>NS</sup>	0,719**	0,500 <sup>NS</sup>	-0,014 <sup>NS</sup>	0,697*	-0,096 <sup>NS</sup>	0,297 <sup>NS</sup>	0,125 <sup>NS</sup>	0,053 <sup>NS</sup>	-0,003 <sup>NS</sup>	-0,005 <sup>NS</sup>	0,250 <sup>NS</sup>
PS total				-0,77**	0,910***	0,927***	0,566 <sup>NS</sup>	0,890***	0,125 <sup>NS</sup>	-0,169 <sup>NS</sup>	-0,025 <sup>NS</sup>	0,248 <sup>NS</sup>	0,437 <sup>NS</sup>	-0,439 <sup>NS</sup>	0,113 <sup>NS</sup>
R/PA					-0,641***	-0,889***	-0,888***	0,639*	-0,332 <sup>NS</sup>	0,537 <sup>NS</sup>	0,228 <sup>NS</sup>	-0,208 <sup>NS</sup>	-0,656*	0,678*	0,125 <sup>NS</sup>
Elongación						0,850***	0,494 <sup>NS</sup>	0,860***	0,249 <sup>NS</sup>	-0,198 <sup>NS</sup>	-0,064 <sup>NS</sup>	0,212 <sup>NS</sup>	0,338 <sup>NS</sup>	-0,337 <sup>NS</sup>	-0,246 <sup>NS</sup>
AF total							0,811**	0,819**	0,362 <sup>NS</sup>	-0,416 <sup>NS</sup>	-0,150 <sup>NS</sup>	0,398 <sup>NS</sup>	0,619*	-0,596*	-0,049 <sup>NS</sup>
AFH									0,017 <sup>NS</sup>	-0,118 <sup>NS</sup>	-0,026 <sup>NS</sup>	0,223 <sup>NS</sup>	0,401 <sup>NS</sup>	-0,391 <sup>NS</sup>	0,050 <sup>NS</sup>
LAR									0,678*	-0,720**	-0,386 <sup>NS</sup>	0,343 <sup>NS</sup>	0,746**	-0,735**	-0,297 <sup>NS</sup>
SLA										-0,605*	-0,528 <sup>NS</sup>	0,262 <sup>NS</sup>	0,414 <sup>NS</sup>	-0,400 <sup>NS</sup>	-0,323 <sup>NS</sup>
D											-0,049 <sup>NS</sup>	-0,262 <sup>NS</sup>	-0,607*	0,599*	-0,006 <sup>NS</sup>
S												-0,012 <sup>NS</sup>	-0,074 <sup>NS</sup>	0,124 <sup>NS</sup>	0,541 <sup>NS</sup>
C hoja													-0,049 <sup>NS</sup>	0,160 <sup>NS</sup>	-0,351 <sup>NS</sup>
N hoja														-0,986***	-0,061 <sup>NS</sup>
C/N hoja															0,062 <sup>NS</sup>

NS, \*, \*\*, \*\*\* indica diferencias no significativas o significativas para  $P \leq 0,05, 0,01, 0,001$ .

**Tabla 1.13.b.** Matriz de correlaciones entre las variables estudiadas.

	N raíz	C/N raíz	Na <sup>+</sup> hoja	K <sup>+</sup> hoja	Ca <sup>2+</sup> hoja	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> hoja	Na <sup>+</sup> raíz	K <sup>+</sup> raíz	Ca <sup>2+</sup> raíz	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> raíz	P <sub>n</sub>	g <sub>s</sub>	E	Ci
PS hoja	0,167 <sup>NS</sup>	-0,227 <sup>NS</sup>	-0,703*	0,463 <sup>NS</sup>	0,787**	0,811**	-0,903***	0,718**	0,513 <sup>NS</sup>	0,951***	0,625*	0,809**	0,822**	-0,339 <sup>NS</sup>
PS tallo	0,257 <sup>NS</sup>	-0,295 <sup>NS</sup>	-0,632*	0,353 <sup>NS</sup>	0,631*	0,959***	-0,743**	0,857**	0,709**	0,747**	0,563 <sup>NS</sup>	0,780**	0,643*	-0,175 <sup>NS</sup>
PS raíz	0,362 <sup>NS</sup>	-0,379 <sup>NS</sup>	-0,363 <sup>NS</sup>	-0,111 <sup>NS</sup>	0,147 <sup>NS</sup>	0,511 <sup>NS</sup>	-0,513 <sup>NS</sup>	0,365 <sup>NS</sup>	0,114 <sup>NS</sup>	0,494 <sup>NS</sup>	0,202 <sup>NS</sup>	0,645*	0,046 <sup>NS</sup>	0,218 <sup>NS</sup>
PS total	0,257 <sup>NS</sup>	-0,306 <sup>NS</sup>	-0,668*	0,329 <sup>NS</sup>	0,659*	0,838***	-0,867***	0,710**	0,476 <sup>NS</sup>	0,889***	0,571 <sup>NS</sup>	0,856***	0,655*	-0,190 <sup>NS</sup>
R/PA	-0,138 <sup>NS</sup>	0,198 <sup>NS</sup>	0,604*	-0,572 <sup>NS</sup>	-0,845***	-0,771**	0,879***	-0,682*	-0,552 <sup>NS</sup>	-0,853***	-0,780**	-0,727**	-0,908***	0,522 <sup>NS</sup>
Elongación	0,259 <sup>NS</sup>	-0,269 <sup>NS</sup>	-0,539 <sup>NS</sup>	0,196 <sup>NS</sup>	0,548 <sup>NS</sup>	0,863***	-0,662*	0,792**	0,586 <sup>NS</sup>	0,717**	0,419 <sup>NS</sup>	0,692*	0,551***	-0,062 <sup>NS</sup>
AF total	0,191 <sup>NS</sup>	-0,247 <sup>NS</sup>	-0,651*	0,401 <sup>NS</sup>	0,813**	0,803**	-0,858***	0,791**	0,558 <sup>NS</sup>	0,937***	0,575 <sup>NS</sup>	0,745**	0,831***	-0,325 <sup>NS</sup>
AFH	-0,056 <sup>NS</sup>	-0,014 <sup>NS</sup>	0,577*	0,315 <sup>NS</sup>	0,678*	0,808**	-0,784**	0,782**	0,579*	0,743**	0,558 <sup>NS</sup>	0,803**	0,612*	-0,213 <sup>NS</sup>
LAR	0,143 <sup>NS</sup>	-0,195 <sup>NS</sup>	-0,387 <sup>NS</sup>	0,433 <sup>NS</sup>	0,837***	0,554 <sup>NS</sup>	-0,659*	0,659*	0,507 <sup>NS</sup>	0,732**	0,600*	0,457 <sup>NS</sup>	0,858***	-0,516 <sup>NS</sup>
SLA	0,389 <sup>NS</sup>	-0,387 <sup>NS</sup>	0,124 <sup>NS</sup>	-0,072 <sup>NS</sup>	0,365 <sup>NS</sup>	0,153 <sup>NS</sup>	-0,061 <sup>NS</sup>	0,423 <sup>NS</sup>	0,278 <sup>NS</sup>	0,219 <sup>NS</sup>	0,132 <sup>NS</sup>	-0,042 <sup>NS</sup>	0,290 <sup>NS</sup>	-0,175 <sup>NS</sup>
D	-0,077 <sup>NS</sup>	0,058 <sup>NS</sup>	-0,060 <sup>NS</sup>	-0,189 <sup>NS</sup>	-0,694*	-0,283 <sup>NS</sup>	0,222 <sup>NS</sup>	-0,436 <sup>NS</sup>	-0,436 <sup>NS</sup>	-0,199 <sup>NS</sup>	-0,720*	-0,108 <sup>NS</sup>	-0,632*	0,325 <sup>NS</sup>
S	-0,11 <sup>NS</sup>	0,185 <sup>NS</sup>	0,136 <sup>NS</sup>	-0,321 <sup>NS</sup>	-0,087 <sup>NS</sup>	-0,140 <sup>NS</sup>	0,079 <sup>NS</sup>	-0,282 <sup>NS</sup>	-0,311 <sup>NS</sup>	-0,199 <sup>NS</sup>	-0,281 <sup>NS</sup>	-0,029 <sup>NS</sup>	-0,171 <sup>NS</sup>	0,249 <sup>NS</sup>
C hoja	0,330 <sup>NS</sup>	-0,386 <sup>NS</sup>	-0,484 <sup>NS</sup>	0,181 <sup>NS</sup>	0,320 <sup>NS</sup>	0,252 <sup>NS</sup>	-0,222 <sup>NS</sup>	0,506 <sup>NS</sup>	0,448 <sup>NS</sup>	0,400 <sup>NS</sup>	-0,243 <sup>NS</sup>	0,030 <sup>NS</sup>	0,429 <sup>NS</sup>	0,191 <sup>NS</sup>
N hoja	-0,330 <sup>NS</sup>	0,291 <sup>NS</sup>	0,045 <sup>NS</sup>	0,071 <sup>NS</sup>	0,796**	0,244 <sup>NS</sup>	-0,517 <sup>NS</sup>	0,322 <sup>NS</sup>	0,089 <sup>NS</sup>	0,574 <sup>NS</sup>	0,500 <sup>NS</sup>	0,302 <sup>NS</sup>	0,579*	-0,629*
C/N hoja	0,304 <sup>NS</sup>	-0,259 <sup>NS</sup>	-0,061 <sup>NS</sup>	-0,096 <sup>NS</sup>	-0,787**	-0,284 <sup>NS</sup>	0,527 <sup>NS</sup>	-0,316 <sup>NS</sup>	-0,103 <sup>NS</sup>	-0,533 <sup>NS</sup>	-0,588*	-0,338 <sup>NS</sup>	-0,556 <sup>NS</sup>	0,692*
C raíz	-0,064 <sup>NS</sup>	0,225 <sup>NS</sup>	0,159 <sup>NS</sup>	-0,173 <sup>NS</sup>	-0,211 <sup>NS</sup>	0,013 <sup>NS</sup>	0,105 <sup>NS</sup>	-0,219 <sup>NS</sup>	-0,146 <sup>NS</sup>	-0,234 <sup>NS</sup>	-0,168 <sup>NS</sup>	0,033 <sup>NS</sup>	-0,102 <sup>NS</sup>	0,506 <sup>NS</sup>
N raíz		-0,980***	-0,271 <sup>NS</sup>	-0,024 <sup>NS</sup>	-0,093 <sup>NS</sup>	0,291 <sup>NS</sup>	-0,116 <sup>NS</sup>	0,214 <sup>NS</sup>	0,170 <sup>NS</sup>	0,194 <sup>NS</sup>	-0,022 <sup>NS</sup>	0,181 <sup>NS</sup>	0,003 <sup>NS</sup>	0,297 <sup>NS</sup>
C/N raíz			0,338 <sup>NS</sup>	-0,032 <sup>NS</sup>	0,002 <sup>NS</sup>	-0,352 <sup>NS</sup>	0,195 <sup>NS</sup>	-0,296 <sup>NS</sup>	-0,233 <sup>NS</sup>	-0,290 <sup>NS</sup>	-0,054 <sup>NS</sup>	-0,237 <sup>NS</sup>	-0,051 <sup>NS</sup>	-0,167 <sup>NS</sup>
Na <sup>+</sup> hoja				-0,745**	-0,337 <sup>NS</sup>	-0,685*	0,649*	-0,552 <sup>NS</sup>	-0,551 <sup>NS</sup>	-0,725**	-0,421 <sup>NS</sup>	-0,705*	-0,648*	0,098 <sup>NS</sup>
K <sup>+</sup> hoja					0,362 <sup>NS</sup>	0,479 <sup>NS</sup>	-0,414 <sup>NS</sup>	0,376 <sup>NS</sup>	0,596*	0,410 <sup>NS</sup>	0,632*	0,571 <sup>NS</sup>	0,702*	-0,329 <sup>NS</sup>
Ca <sup>2+</sup> hoja						0,653*	-0,746**	0,740**	0,580*	0,729**	0,655*	0,559 <sup>NS</sup>	0,845**	-0,601*
K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> hoja							-0,735**	0,882***	0,807**	0,724**	0,633*	0,754**	0,692*	-0,291 <sup>NS</sup>
Na <sup>+</sup> raíz								-0,607*	-0,385 <sup>NS</sup>	-0,896***	-0,694*	-0,826***	-0,753**	0,338 <sup>NS</sup>
K <sup>+</sup> raíz									0,890***	0,669*	0,471 <sup>NS</sup>	0,552 <sup>NS</sup>	0,710**	-0,282 <sup>NS</sup>
Ca <sup>2+</sup> raíz										0,415 <sup>NS</sup>	0,446 <sup>NS</sup>	0,436 <sup>NS</sup>	0,681*	-0,215 <sup>NS</sup>
K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> raíz											0,553 <sup>NS</sup>	0,727**	0,742**	-0,403 <sup>NS</sup>
P <sub>n</sub>												0,807**	0,640*	-0,667*
g <sub>s</sub>													0,623*	-0,290 <sup>NS</sup>
E														-0,385 <sup>NS</sup>

NS, \*, \*\*, \*\*\* indica diferencias no significativas o significativas para  $P \leq 0,05, 0,01, 0,001$ .



**Tabla 1.13.c.** Matriz de correlaciones entre las variables estudiadas.

	PNUE	Ca	C <sub>b</sub>	Car	C <sub>a+b</sub>	C <sub>a+b</sub> /Car	Azúcares	Proteína	Aminoácidos	Prolina	Fenoles	Tirol
PS hoja	0,560 <sup>NS</sup>	0,783 <sup>**</sup>	0,772 <sup>**</sup>	0,769 <sup>**</sup>	0,780 <sup>**</sup>	0,860 <sup>***</sup>	0,503 <sup>NS</sup>	0,078 <sup>NS</sup>	0,573 <sup>NS</sup>	0,300 <sup>NS</sup>	-0,177 <sup>NS</sup>	0,400 <sup>NS</sup>
PS tallo	0,593 <sup>*</sup>	0,576 <sup>NS</sup>	0,570 <sup>NS</sup>	0,563 <sup>NS</sup>	0,574 <sup>NS</sup>	0,709 <sup>**</sup>	0,530 <sup>NS</sup>	0,342 <sup>NS</sup>	0,607 <sup>*</sup>	0,158 <sup>NS</sup>	-0,115 <sup>NS</sup>	0,259 <sup>NS</sup>
PS raíz	0,175 <sup>NS</sup>	0,143 <sup>NS</sup>	0,138 <sup>NS</sup>	0,138 <sup>NS</sup>	0,141 <sup>NS</sup>	0,254 <sup>NS</sup>	0,253 <sup>NS</sup>	0,655 <sup>*</sup>	0,155 <sup>NS</sup>	-0,214 <sup>NS</sup>	0,338 <sup>NS</sup>	-0,287 <sup>NS</sup>
PS total	0,520 <sup>NS</sup>	0,653 <sup>*</sup>	0,645 <sup>*</sup>	0,641 <sup>*</sup>	0,651 <sup>*</sup>	0,758 <sup>**</sup>	0,479 <sup>NS</sup>	0,312 <sup>NS</sup>	0,525 <sup>NS</sup>	0,157 <sup>NS</sup>	-0,037 <sup>NS</sup>	0,224 <sup>NS</sup>
R/PA	-0,708 <sup>**</sup>	-0,804 <sup>**</sup>	-0,804 <sup>**</sup>	-0,790 <sup>**</sup>	-0,804 <sup>**</sup>	-0,933 <sup>***</sup>	-0,426 <sup>NS</sup>	0,076 <sup>NS</sup>	-0,664 <sup>*</sup>	-0,383 <sup>NS</sup>	0,365 <sup>NS</sup>	-0,640 <sup>*</sup>
Elongación	0,440 <sup>NS</sup>	0,551 <sup>NS</sup>	0,535 <sup>NS</sup>	0,540 <sup>NS</sup>	0,546 <sup>NS</sup>	0,625 <sup>NS</sup>	0,532 <sup>NS</sup>	0,316 <sup>NS</sup>	0,588 <sup>*</sup>	0,159 <sup>NS</sup>	-0,163 <sup>NS</sup>	0,170 <sup>NS</sup>
AF total	0,546 <sup>NS</sup>	0,796 <sup>**</sup>	0,774 <sup>**</sup>	0,779 <sup>**</sup>	0,790 <sup>**</sup>	0,855 <sup>***</sup>	0,540 <sup>NS</sup>	-0,027 <sup>NS</sup>	0,633 <sup>*</sup>	0,395 <sup>NS</sup>	-0,309 <sup>NS</sup>	0,420 <sup>NS</sup>
AFH	0,599 <sup>*</sup>	0,645 <sup>*</sup>	0,638 <sup>*</sup>	0,633 <sup>*</sup>	0,643 <sup>*</sup>	0,714 <sup>**</sup>	0,309 <sup>NS</sup>	0,325 <sup>NS</sup>	0,611 <sup>*</sup>	0,136 <sup>NS</sup>	-0,055 <sup>NS</sup>	0,284 <sup>NS</sup>
LAR	0,575 <sup>NS</sup>	0,759 <sup>**</sup>	0,734 <sup>**</sup>	0,738 <sup>**</sup>	0,752 <sup>**</sup>	0,812 <sup>**</sup>	0,380 <sup>NS</sup>	-0,439 <sup>NS</sup>	0,694 <sup>*</sup>	0,570 <sup>NS</sup>	-0,664 <sup>*</sup>	0,665 <sup>*</sup>
SLA	0,202 <sup>NS</sup>	0,213 <sup>NS</sup>	0,167 <sup>NS</sup>	0,188 <sup>NS</sup>	0,200 <sup>NS</sup>	0,2471 <sup>NS</sup>	0,227 <sup>NS</sup>	-0,517 <sup>NS</sup>	0,472 <sup>NS</sup>	0,450 <sup>NS</sup>	-0,766 <sup>**</sup>	0,266 <sup>NS</sup>
D	-0,255 <sup>NS</sup>	-0,551 <sup>NS</sup>	-0,545 <sup>NS</sup>	-0,554 <sup>NS</sup>	-0,549 <sup>NS</sup>	-0,402 <sup>NS</sup>	-0,136 <sup>NS</sup>	0,512 <sup>NS</sup>	-0,635 <sup>*</sup>	-0,806 <sup>**</sup>	0,802 <sup>**</sup>	-0,724 <sup>**</sup>
S	-0,465 <sup>NS</sup>	0,08 <sup>NS</sup>	0,037 <sup>NS</sup>	0,048 <sup>NS</sup>	0,016 <sup>NS</sup>	-0,269 <sup>NS</sup>	-0,054 <sup>NS</sup>	0,227 <sup>NS</sup>	-0,275 <sup>NS</sup>	0,336 <sup>NS</sup>	0,235 <sup>NS</sup>	-0,100 <sup>NS</sup>
C hoja	-0,147 <sup>NS</sup>	0,279 <sup>NS</sup>	0,235 <sup>NS</sup>	0,262 <sup>NS</sup>	0,267 <sup>NS</sup>	0,217 <sup>NS</sup>	0,639 <sup>*</sup>	-0,419 <sup>NS</sup>	-0,046 <sup>NS</sup>	0,454 <sup>NS</sup>	0,014 <sup>NS</sup>	0,051 <sup>NS</sup>
N hoja	0,417 <sup>NS</sup>	0,644 <sup>*</sup>	0,629 <sup>*</sup>	0,640 <sup>*</sup>	0,640 <sup>*</sup>	0,545 <sup>NS</sup>	0,014 <sup>NS</sup>	-0,435 <sup>NS</sup>	0,632 <sup>*</sup>	0,566 <sup>NS</sup>	-0,698 <sup>*</sup>	0,534 <sup>NS</sup>
C/N hoja	-0,505 <sup>NS</sup>	-0,594 <sup>*</sup>	-0,585 <sup>*</sup>	-0,589 <sup>*</sup>	-0,591 <sup>*</sup>	-0,550 <sup>NS</sup>	0,017 <sup>NS</sup>	0,366 <sup>NS</sup>	-0,646 <sup>*</sup>	-0,494 <sup>NS</sup>	0,686 <sup>*</sup>	-0,526 <sup>NS</sup>
C raíz	-0,366 <sup>NS</sup>	0,083 <sup>NS</sup>	0,113 <sup>NS</sup>	0,120 <sup>NS</sup>	0,091 <sup>NS</sup>	-0,147 <sup>NS</sup>	-0,102 <sup>NS</sup>	0,479 <sup>NS</sup>	0,144 <sup>NS</sup>	-0,150 <sup>NS</sup>	0,113 <sup>NS</sup>	0,060 <sup>NS</sup>
N raíz	-0,055 <sup>NS</sup>	-0,157 <sup>NS</sup>	-0,166 <sup>NS</sup>	-0,168 <sup>NS</sup>	-0,159 <sup>NS</sup>	0,037 <sup>NS</sup>	0,490 <sup>NS</sup>	0,185 <sup>NS</sup>	-0,134 <sup>NS</sup>	0,013 <sup>NS</sup>	0,135 <sup>NS</sup>	-0,244 <sup>NS</sup>
C/N raíz	-0,059 <sup>NS</sup>	0,150 <sup>NS</sup>	0,163 <sup>NS</sup>	0,169 <sup>NS</sup>	0,154 <sup>NS</sup>	-0,094 <sup>NS</sup>	-0,525 <sup>NS</sup>	-0,140 <sup>NS</sup>	0,141 <sup>NS</sup>	-0,028 <sup>NS</sup>	-0,149 <sup>NS</sup>	0,263 <sup>NS</sup>
Na <sup>+</sup> hoja	-0,412 <sup>NS</sup>	-0,552 <sup>NS</sup>	-0,549 <sup>NS</sup>	-0,532 <sup>NS</sup>	-0,551 <sup>NS</sup>	-0,704 <sup>*</sup>	-0,491 <sup>NS</sup>	-0,246 <sup>NS</sup>	-0,166 <sup>NS</sup>	0,032 <sup>NS</sup>	-0,269 <sup>NS</sup>	-0,210 <sup>NS</sup>
K <sup>+</sup> hoja	0,601 <sup>*</sup>	0,575 <sup>NS</sup>	0,591 <sup>*</sup>	0,557 <sup>NS</sup>	0,580 <sup>*</sup>	0,681 <sup>*</sup>	0,014 <sup>NS</sup>	0,073 <sup>NS</sup>	0,405 <sup>NS</sup>	-0,079 <sup>NS</sup>	-0,037 <sup>NS</sup>	0,588 <sup>*</sup>
Ca <sup>2+</sup> hoja	0,646 <sup>*</sup>	0,746 <sup>**</sup>	0,736 <sup>**</sup>	0,734 <sup>**</sup>	0,743 <sup>**</sup>	0,756 <sup>**</sup>	0,306 <sup>NS</sup>	-0,308 <sup>NS</sup>	0,705 <sup>*</sup>	0,629 <sup>*</sup>	-0,532 <sup>NS</sup>	0,625 <sup>*</sup>
K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> hoja	0,686 <sup>*</sup>	0,529 <sup>NS</sup>	0,531 <sup>NS</sup>	0,514 <sup>NS</sup>	0,530 <sup>NS</sup>	0,726 <sup>**</sup>	0,573 <sup>NS</sup>	0,280 <sup>NS</sup>	0,553 <sup>NS</sup>	0,178 <sup>NS</sup>	-0,099 <sup>NS</sup>	0,307 <sup>NS</sup>
Na <sup>+</sup> raíz	-0,619 <sup>*</sup>	-0,720 <sup>**</sup>	-0,725 <sup>**</sup>	-0,711 <sup>**</sup>	-0,722 <sup>*</sup>	-0,877 <sup>***</sup>	-0,420 <sup>NS</sup>	-0,182 <sup>NS</sup>	-0,488 <sup>NS</sup>	-0,203 <sup>NS</sup>	0,003 <sup>NS</sup>	-0,427 <sup>NS</sup>
K <sup>+</sup> raíz	0,620 <sup>*</sup>	0,537 <sup>NS</sup>	0,513 <sup>NS</sup>	0,513 <sup>NS</sup>	0,531 <sup>NS</sup>	0,664 <sup>*</sup>	0,579 <sup>*</sup>	-0,055 <sup>NS</sup>	0,621 <sup>*</sup>	0,379 <sup>NS</sup>	-0,329 <sup>NS</sup>	0,347 <sup>NS</sup>

NS, \*, \*\*, \*\*\* indica diferencias no significativas o significativas para  $P \leq 0,05, 0,01, 0,001$ .

**Tabla 1.13.d.** Matriz de correlaciones entre las variables estudiadas.

	PNUE	C <sub>a</sub>	C <sub>b</sub>	Car	C <sub>a+b</sub>	C <sub>a+b</sub> /Car	Azúcares	Proteína	Aminoácidos	Prolina	Fenoles	Tiol
Ca <sup>2+</sup> raíz	0,596*	0,434 <sup>NS</sup>	0,425 <sup>NS</sup>	0,412 <sup>NS</sup>	0,431 <sup>NS</sup>	0,551 <sup>NS</sup>	0,436 <sup>NS</sup>	-0,026 <sup>NS</sup>	0,579*	0,223 <sup>NS</sup>	-0,260 <sup>NS</sup>	0,434 <sup>NS</sup>
K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> raíz	0,537 <sup>NS</sup>	0,674*	0,653*	0,652*	0,668*	0,814**	0,572 <sup>NS</sup>	-0,033 <sup>NS</sup>	0,392 <sup>NS</sup>	0,271 <sup>NS</sup>	-0,098 <sup>NS</sup>	0,247 <sup>NS</sup>
P <sub>n</sub>	0,934***	0,589*	0,616*	0,575 <sup>NS</sup>	0,597	0,795**	-0,108 <sup>NS</sup>	0,228 <sup>NS</sup>	0,679*	0,071 <sup>NS</sup>	-0,297 <sup>NS</sup>	0,603*
g <sub>s</sub>	0,709**	0,664*	0,682*	0,654*	0,669*	0,813**	0,108 <sup>NS</sup>	0,510 <sup>NS</sup>	0,550 <sup>NS</sup>	0,007 <sup>NS</sup>	0,029 <sup>NS</sup>	0,383 <sup>NS</sup>
E	0,586*	0,901***	0,896***	0,890***	0,900***	0,906***	0,377 <sup>NS</sup>	-0,209 <sup>NS</sup>	0,701*	0,464 <sup>NS</sup>	-0,395 <sup>NS</sup>	0,782**
Ci	-0,717**	-0,271 <sup>NS</sup>	-0,273 <sup>NS</sup>	-0,251 <sup>NS</sup>	-0,272 <sup>NS</sup>	-0,412 <sup>NS</sup>	0,077 <sup>NS</sup>	0,339 <sup>NS</sup>	-0,302 <sup>NS</sup>	-0,340 <sup>NS</sup>	0,474 <sup>NS</sup>	-0,292 <sup>NS</sup>
PNUE		0,463 <sup>NS</sup>	0,476 <sup>NS</sup>	0,437 <sup>NS</sup>	0,466 <sup>NS</sup>	0,733**	-0,015 <sup>NS</sup>	0,142 <sup>NS</sup>	0,645*	0,033 <sup>NS</sup>	-0,305 <sup>NS</sup>	0,482 <sup>NS</sup>
C <sub>a</sub>			0,997***	0,998***	0,999***	0,888***	0,147 <sup>NS</sup>	-0,081 <sup>NS</sup>	0,743**	0,452 <sup>NS</sup>	-0,413 <sup>NS</sup>	0,803**
C <sub>b</sub>				0,998***	0,998***	0,889***	0,118 <sup>NS</sup>	-0,037 <sup>NS</sup>	0,742**	0,432 <sup>NS</sup>	-0,388 <sup>NS</sup>	0,821**
Car					0,999***	0,873***	0,136 <sup>NS</sup>	-0,067 <sup>NS</sup>	0,736**	0,457 <sup>NS</sup>	-0,405 <sup>NS</sup>	0,808**
C <sub>a+b</sub>						0,889***	0,139 <sup>NS</sup>	-0,069 <sup>NS</sup>	0,743**	0,446 <sup>NS</sup>	-0,407 <sup>NS</sup>	0,808**
C <sub>a+b</sub> /Car							0,274 <sup>NS</sup>	0,056 <sup>NS</sup>	0,708**	0,252 <sup>NS</sup>	-0,280 <sup>NS</sup>	0,703*
Azúcares								-0,165 <sup>NS</sup>	-0,074 <sup>NS</sup>	0,296 <sup>NS</sup>	0,103 <sup>NS</sup>	-0,135 <sup>NS</sup>
Proteína									-0,001 <sup>NS</sup>	-0,599*	0,579*	-0,189 <sup>NS</sup>
Aminoácidos										0,283 <sup>NS</sup>	-0,664*	0,783**
Prolina											-0,642*	0,401 <sup>NS</sup>
Fenoles												-0,555 <sup>NS</sup>

NS, \*, \*\*, \*\*\* indica diferencias no significativas o significativas para  $P \leq 0,05, 0,01, 0,001$ .

## **1.2. Discusión**

La salinidad redujo el crecimiento de todos los cultivares estudiados, siendo el efecto más pronunciado en ‘Ocal’, seguido por ‘Cornicabra’, ‘Casta Cabra’, ‘Picual’, ‘Frantoio’ y ‘Picudo’. El descenso del crecimiento en condiciones salinas, puede ser debido a la reducción del agua disponible por el efecto osmótico de las sales en el medio o a la excesiva acumulación de iones en los tejidos de la planta (Munns and Tester, 2008). Por otro lado, una tendencia al crecimiento moderada puede contribuir a la protección de la parte aérea de los efectos perjudiciales de la excesiva acumulación de iones tóxicos (Flowers and Yeo, 1995; Melgar et al., 2006). Por tanto, la menor inhibición del crecimiento en el cv. Picudo bajo condiciones salinas podría ser atribuida a su menor tamaño (Younis et al., 2000). En general, la inhibición del PS total en los seis cultivares estudiados fue menor que la descrita por Chartzoulakis (2005) para tres cultivares tolerantes a la salinidad (‘Kalamata’, ‘Megaritiki’ y ‘Kothreiki’). Por otra parte, el aumento de la relación R/PA por la salinidad en todos los cultivares refleja una mayor sensibilidad de la parte aérea de la planta al NaCl que la raíz. Resultados similares fueron descritos en otros cultivares de olivo (Chartzoulakis et al., 2002; Melgar et al., 2008, Kchaou et al., 2010, 2013). Según Shipley and Meziane (2002), modelos de crecimiento equilibrados asumen que la biomasa se localiza preferentemente en la parte de la planta de la que se obtienen los recursos en condiciones de crecimiento limitado, por ejemplo, la raíz en condiciones de salinidad. Por tanto, un aumento en la relación R/PA puede jugar un papel importante en la adaptación al estrés (Younis et al., 2000).

Otros estudios indican que, en olivo, el AF total es más sensible al estrés salino que el PS total (Chartzoulakis, 2005). De forma similar, en nuestro experimento, el

efecto de la salinidad fue mayor en el AF total que en el PS total en todos los cultivares estudiados, lo que se refleja en la reducción de LAR. Sin embargo, esta inhibición del AF total por la salinidad fue menor que la observada por Chartzoulakis (2005) en dos cultivares descritos como tolerantes a la salinidad ('Koroneiki' y 'Megaritiki'). El descenso del AF total en los cultivares estudiados se debió principalmente al descenso en el AFH (Figura 2.1; pág. 105), lo que se justifica por la elevada correlación positiva entre ambos parámetros ( $r=0,819$ ;  $P\leq 0,01$ ). De forma similar, Vigo et al., (2005) describieron un descenso en el tamaño final de la hoja como consecuencia del estrés salino en los cvs. Manzanilla de Sevilla (sensible) y Kalamata (tolerante). Por otra parte, el incremento de D puede deberse a la acumulación de iones en la hoja como describieron Greenway and Munns (1980).

El descenso del contenido total de N como consecuencia de la salinidad ha sido descrito en otras especies (Cambrollé et al., 2011; Shaheen et al., 2011; Tahammolkonan and Golchin, 2011). En nuestro experimento, el contenido de N descendió por la salinidad en hoja de 'Cornicabra', 'Frantoio', 'Ocal' y 'Picual'. El estrés salino afecta a diferentes etapas del metabolismo del N, como su absorción, asimilación y síntesis de aminoácidos y proteínas (Parida and Das, 2004). Por tanto, el descenso del contenido de N de la hoja pudo deberse a una reducción de los aminoácidos y de los pigmentos fotosintéticos (Tablas 1.10 y 1.12). Así mismo, la alta concentración de  $\text{Cl}^-$  en la solución nutritiva pudo inhibir la absorción de  $\text{NO}_3^{2-}$  por la raíz (White and Broadley, 2001). Sin embargo, en condiciones salinas, en raíz de 'Cornicabra' aumentó la concentración de N, sin embargo, en raíz de 'Picudo' aumentó la concentración de C. Una mayor acumulación de C ó N en raíz, en condiciones salinas, puede relacionarse con la acumulación de azúcares solubles y/o compuestos

nitrogenados como aminoácidos, compuestos cuaternarios del amonio y poliaminas (Parida and Das, 2005). Por otra parte, un incremento del N en los tejidos puede ser resultado de una inhibición del crecimiento mayor que la reducción de la absorción por la raíz (Loupassaki et al., 2002).

Marín et al. (1995) describieron el cv. Picual como tolerante a la salinidad (100 mM NaCl) basándose exclusivamente en la elongación de tallo. Sin embargo, Chartzoulakis (2005) afirma que la tolerancia a la salinidad en olivo está asociada a la exclusión y retención de iones en la raíz, lo que evita su transporte hacia la parte aérea. Según nuestros resultados para 200 mM NaCl, entre los cultivares estudiados, ‘Ocal’ y ‘Picudo’ fueron los más tolerantes a la salinidad, ya que en plantas salinizadas la concentración de  $\text{Na}^+$  en la raíz fue mayor que en hoja, mientras que ‘Picual’ fue el menos tolerante (Figura 1.8). De forma similar, Kchaou et al. (2010) detectaron gran variabilidad en cuanto a la acumulación y transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en raíz y parte aérea de otros cultivares españoles (‘Koroneiki’, ‘Arbequina I18’ y ‘Arbosana I43’) y tunecinos (‘Chemlali’ y ‘Chetoui’). Además, Tattini et al. (2008) afirmaron que la tolerancia a la salinidad no sólo está relacionada con la capacidad de exclusión de sales de la parte aérea sino también con la capacidad de mantener una adecuada relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  en los tejidos de crecimiento activo. Según estos criterios, ‘Frantoio’ fue descrita como tolerante a la salinidad por estos autores (Tattini et al., 1994, 2008). Los resultados presentados aquí están en consonancia con esta afirmación, ya que en condiciones salinas el menor descenso en la concentración de  $\text{K}^+$  en raíz tuvo lugar en ‘Picudo’ y ‘Ocal’, mientras que en hoja, ‘Picudo’ no mostró diferencias significativas respecto a plantas sin sal. Además, ‘Ocal’ y ‘Picudo’ mostraron el menor descenso en la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  en hoja. En olivo, una alta concentración de  $\text{K}^+$  en hoja facilita el ajuste

osmótico con menor consumo de energía que la acumulación de otros solutos compatibles como el manitol o la glucosa (Tattini et al., 1995). Numerosos estudios destacan la importancia de la retención de  $K^+$  en la raíz tras la exposición al NaCl y la relacionan positivamente con la mayor tolerancia de la planta al estrés salino (Chen et al., 2005, 2007; Cuin et al., 2008; Smethurst et al., 2008; Sun et al., 2009). El incremento del  $Ca^{2+}$  en el citosol ha sido descrito como una respuesta al estrés salino por diferentes autores (Munns and Tester, 2008; Maathuis et al., 2014). Este aumento del  $Ca^{2+}$  en el citosol actuaría activando una serie de proteínas que inhiben el transporte del  $Na^+$  de la raíz a la parte aérea (Liu and Zhu, 1997; Zhu et al., 1998; Blumwald et al., 2000; Ishitani et al., 2000; Shi et al., 2002), por lo que se supone que el  $Ca^{2+}$  está implicado en los mecanismos de exclusión y retención de iones en la raíz. Esto apoya la consideración de ‘Ocal’ y ‘Picudo’ como tolerantes a la salinidad, puesto que en estos cultivares no descendió el  $Ca^{2+}$  en la raíz; de hecho, en ‘Picudo’ aumentó (13%). Por tanto, podemos afirmar que entre los cultivares estudiados, los más tolerantes a la salinidad fueron ‘Picudo’ y ‘Ocal’, seguido de ‘Cornicabra’, ‘Frantoio’, ‘Casta Cabra’ y ‘Picual’.

La fotosíntesis ( $P_n$ ) se inhibió de forma variable en los seis cultivares estudiados (Tabla 1.8), este descenso de la  $P_n$  puede deberse, en parte, al descenso de clorofila por la salinidad (Tabla 1.10). Resultados similares han sido descritos por Ben Ahmed et al., (2010) en el cv. Chemlali de olivo, tolerante a la salinidad con 200 mM NaCl. Por otra parte, la significativa correlación positiva detectada entre la  $g_s$  y la  $P_n$  ( $r=0,807$ ;  $P\leq 0,01$ ) posicionan a la  $g_s$  como el principal factor limitante para la  $P_n$  bajo condiciones salinas (Tabla 1.8). El descenso de la  $g_s$  por la salinidad es una respuesta adaptativa frente al descenso del potencial hídrico en el entorno de las raíces (Zheng et al., 2002). Según

nuestros resultados, esto lo apoya la significativa correlación negativa observada entre  $P_n$  y D ( $r=-0,720$ ;  $P\leq 0,01$ ), índice de esclerofilia que aumenta con el descenso de la absorción de agua por la planta (Bacelar et al., 2006). Sin embargo, en ‘Cornicabra’ y ‘Frantoio’ la concentración interna de  $CO_2$  aumentó por el tratamiento salino, lo cual indica que, en estos cultivares, las limitaciones bioquímicas podrían predominar sobre las estomáticas en la inhibición de la  $P_n$ . Además, ‘Cornicabra’ y ‘Frantoio’ mostraron el menor descenso en la  $g_s$  (Tabla 1.8). Los resultados obtenidos para estos cultivares coinciden con lo descrito por otros autores, según los cuales, las limitaciones bioquímicas prevalecen sobre las estomáticas en situaciones de estrés salino intenso (Bongi and Loreto, 1989; Paranychianakis and Chartzoulakis, 2005). Sin embargo, otros estudios realizados en olivo en condiciones de estrés salino severo (200 mM NaCl) revelaron un descenso en la conductividad mesofílica y estomática pero no en la capacidad bioquímica de asimilación de  $CO_2$  (Centritto et al., 2003). En estudios con ‘Frantoio’ y otros cultivares griegos de olivo (‘Adramitini’, ‘Agouromanaki’, ‘Chalkidikis’, ‘Kerkiras’, ‘Throubolia’ y ‘Valanolia’), Loreto et al. (2003) y Tattini et al. (2009) afirmaron que la  $P_n$  y el contenido de iones salinos en la hoja no estaban relacionados.

En olivo, la reducción en el transporte de agua puede ser un mecanismo de protección de la parte aérea de la planta frente a los efectos perjudiciales del exceso de iones salinos (Chartzoulakis, 2005; Melgar et al., 2006). En nuestro experimento, ‘Picual’ fue el cultivar que mostró la mayor inhibición de la E, sin embargo, también fue el cultivar que mayor concentración de  $Na^+$  mostró en la hoja (Tabla 1.6). Según Tattini et al. (2008), en olivo, la reducción de la  $g_s$  y la E producida en situaciones de estrés salino, podría considerarse un mecanismo adaptativo más que una consecuencia

negativa del estrés. La salinidad provocó el descenso de PNUE en todos los cultivares estudiados excepto en 'Frantoio'. Resultados similares han sido descritos por Cardona-Olarte et al. (2013) en otras especies.

En lo que respecta a la respuesta de los pigmentos fotosintéticos al estrés salino, la clorofila descendió en todos los cultivares estudiados. Este efecto de la salinidad de la clorofila ha sido descrito en otras especies como girasol (Santos, 2004), trigo (Khatkar and Kuhad, 2000), tomate (Doganlar et al., 2010), Arabidopsis (Huang et al., 2005), maíz (Molazem et al., 2010) y colza (Rasheed et al., 2014), así como en otros cultivares de olivo (Ben Ahmed et al., 2009; Kchaou et al., 2013). El descenso en la clorofila es un síntoma de estrés oxidativo (Smirnoff, 1993) y puede ser resultado de la fotooxidación de los pigmentos, de un aumento de la degradación o de la inhibición de su síntesis (Smirnoff, 1993; Santos, 2004). El incremento en la degradación bajo condiciones de salinidad es producido por la mayor actividad clorofilasa, mientras que la inhibición de su síntesis se debe a una reducción en los niveles endógenos de ácido 5-aminolevulínico (ALA), precursor de la protoclorofilida que da lugar a la clorofila en presencia de luz (Santos, 2004). En nuestro experimento, el cv. Ocal, descrito como tolerante por su capacidad de exclusión de  $\text{Na}^+$  de la parte aérea (Figura 1.3), mostró el menor descenso de la clorofila, además, fue el único cultivar que no redujo el contenido de Car, los cuales han sido descritos como antioxidantes no enzimáticos implicados en la protección de la planta frente al estrés oxidativo (Mane et al., 2011; Yazici et al., 2008). Por otra parte, el hecho de que en 'Ocal' el contenido de Car no se viese afectado por la salinidad podría estar relacionado con el menor descenso de la clorofila total detectado en este cultivar, tal como indica la alta correlación positiva observada entre ambos parámetros ( $r=0,999$ ;  $P\leq 0,001$ ).



En todos los cultivares, la inhibición de la  $P_n$  por el estrés salino fue menor que la inhibición del crecimiento (Tablas 1.2 y 1.8). Según Geissler et al. (2009), en condiciones de estrés salino el consumo de energía aumenta por la activación de los mecanismos de adaptación al estrés, por ejemplo, la síntesis de solutos. Entre los solutos orgánicos compatibles determinados se encuentran los azúcares, los cuales descendieron por la salinidad en ‘Casta Cabra’, ‘Cornicabra’, ‘Ocal’ y ‘Picudo’, mientras que en ‘Frantoio’ y ‘Ocal’ no cambiaron. Sin embargo, otros autores describieron aumento de los azúcares solubles en el cv. Chemlali tolerante a la salinidad (Ben Ahmed et al., 2011).

Diferentes autores han identificado una serie de proteínas inducidas por la salinidad en varias especies (Hurkman et al., 1989; Pareek et al., 1997; Ali et al., 1999; Mansour, 2000), las cuales pueden constituir una forma de almacén de nitrógeno para su reutilización al finalizar la situación de estrés (Singh et al., 1987). Por otro lado, pueden jugar un importante papel en el ajuste osmótico. En nuestro experimento, la respuesta del contenido de proteínas solubles a la salinidad varía según el cultivar, siendo ‘Ocal’ y ‘Picual’ los cultivares que aumentaron su contenido. Según Bacelar et al. (2006), el aumento de las proteínas solubles observado en plantas de olivo sometidas a estrés, podría asociarse a un aumento de las enzimas del estrés oxidativo. Por otra parte, varios autores han descrito una acumulación de aminoácidos en plantas superiores en condiciones de estrés salino (Ashraf, 1994; Mansour, 2000); sin embargo, en este ensayo no se detectó aumento del contenido de aminoácidos en ninguno de los cultivares estudiados.

En muchas especies, la prolina se acumula en situaciones de estrés salino y puede contribuir a su tolerancia (Parida and Das, 2005; Ben Ahmed et al., 2009). En

olivo, según Petridis and Therios (2012), el aumento de prolina depende del nivel de NaCl y del cultivar. Según nuestros resultados, en ninguno de los cultivares estudiados aumentó la prolina con 200 mM NaCl. En contraste, Ben Ahmed et al. (2010, 2011) detectaron un aumento de prolina con 100 y 200 mM NaCl en el cv. Chemlali, tolerante a la salinidad. La acumulación de prolina en las hojas de plantas sometidas a estrés salino puede prevenir la desnaturalización de las proteínas de membrana actuando como chaperona (Ashraf and Foolad, 2007), además de mejorar el estado hídrico de la célula y su homeostasis (Gleeson et al., 2005, Parida and Das, 2005; Ben Ahmed et al., 2009). Por otro lado, también puede actuar como antioxidante eliminando los radicales libres y reduciendo, por tanto, el estrés oxidativo (Ashraf and Foolad, 2007).

Los compuestos fenólicos pueden actuar como antioxidantes mediante su capacidad para la destrucción de radicales libres (Arora et al., 2000; Blokhina et al., 2003). En nuestro experimento se detectó mayor acumulación de fenoles en la hoja de plantas salinizadas de 'Frantoio', 'Ocal' y 'Picual'. Resultados similares fueron descritos por Remorini et al. (2009) en el cultivar Cipressino.

Bartoli et al. (1999) observó que la concentración de grupos tiol en hoja de trigo se afectó por el estrés oxidativo. En nuestro estudio, la salinidad redujo el contenido de grupos tiol en 'Casta Cabra', 'Frantoio', 'Picual' y 'Picudo' (Tabla 1.12), debido probablemente, a la oxidación de grupos -SH no proteicos, lo cual aumenta la susceptibilidad de la membrana al daño por peroxidación lipídica y puede desencadenar efectos negativos de las especies reactivas del oxígeno en la función celular (Ali et al., 2005).

## 2. Efecto del estrés salino en estaquillas enraizadas de *O. europaea* cv. Picual

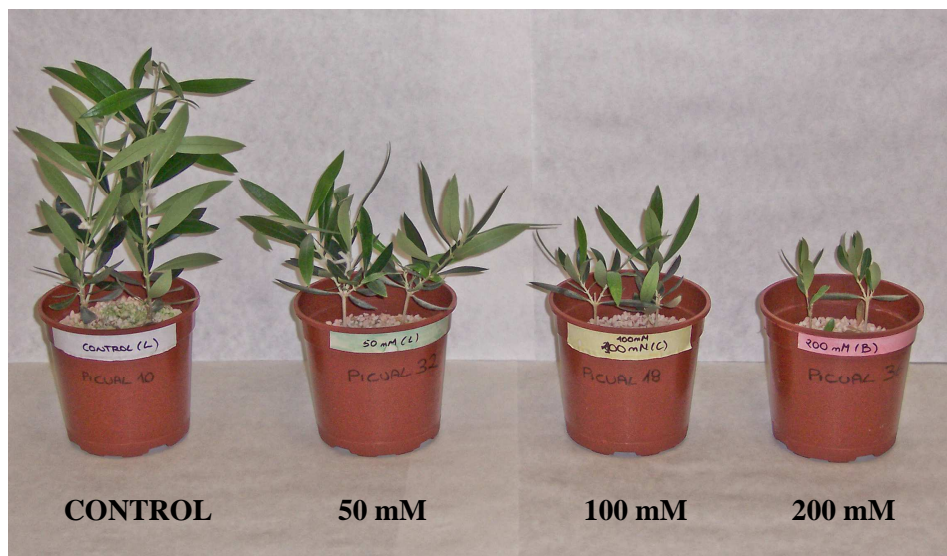
### 2.1. Resultados

#### 2.1.1. Crecimiento vegetativo

Los síntomas del estrés salino observados en las plantas fueron necrosis, abscisión foliar y reducción del crecimiento. La necrosis se observó en plantas con 100 y 200 mM NaCl, ésta comenzó en el ápice de la hoja y avanzó hacia el peciolo (Figura 2.1). La abscisión foliar se detectó en plantas crecidas con 200 mM NaCl; este síntoma no se relacionó necesariamente con la aparición de necrosis en la hoja, por tanto, algunas de las hojas caídas presentaban un aspecto similar al de plantas control. En cuanto a la reducción del crecimiento, ésta se observó tanto en la planta completa (Figura 2.2), como en cada uno de sus órganos por separado. El porcentaje de plantas afectadas y la severidad de los daños se incrementaron conforme aumentó el tiempo de exposición al NaCl.



**Figura 2.1.** Evolución de la necrosis de la hoja por efecto del estrés salino con 100 y 200 mM NaCl en plantas del cv. Picual. La hoja de la izquierda pertenece a plantas control.



**Figura 2.2.** Aspecto de plantas del cv. Picual tratadas con 0, 50, 100 y 200 mM NaCl durante 7 semanas. Plantas con 0 mM NaCl se utilizaron como control.

Las plantas crecidas con 200 mM NaCl no fueron capaces de resistir la situación de estrés, ralentizando sus funciones fisiológicas desde las 4 semanas de tratamiento salino para entrar en declive, de forma que la mortandad fue del 80% a las 7 semanas y del 100% a las 10 semanas.

El peso seco (PS) de hoja (Tabla 2.1) de plantas control y tratadas con 50 mM NaCl, alcanzó los valores máximos en la cuarta recogida (3,26 y 1,95 g planta<sup>-1</sup>, respectivamente). Con 100 mM el crecimiento de la hoja se estabilizó a las 10 semanas de exposición a la sal. Al final del experimento (13 semanas), el PS de hoja aumentó un 897, 563 y 209% respecto a la primera recogida (4 semanas) en plantas control, con 50 mM y 100 mM NaCl, respectivamente. Con 200 mM, durante 7 semanas, el PS de hoja sólo aumentó un 24% (0,190 g planta<sup>-1</sup>).

**Tabla 2.1.** Peso seco (PS) de hoja, tallo, raíz y total, relación raíz/parte aérea (R/PA), elongación de tallo, número de hojas, área foliar (AF) total y relación de área foliar (LAR) de plantas de olivo tratados con 0, 50, 100 y 200 mM NaCl durante 4, 7, 10 y 13 semanas. Plantas con 0 mM NaCl se utilizaron como control.

Parámetro	NaCl (mM)	Semanas tras la aplicación del NaCl			
		4	7	10	13
PS hoja (g planta <sup>-1</sup> )	0	0,327 a, D	0,801 a, C	1,41 a, B	3,26 a, A
	50	0,294 a, D	0,597 a, C	0,880 b, B	1,95 b, A
	100	0,268 a, B	0,325 b, B	0,694 b, A	0,828 c, A
	200	0,153 b, B	0,190 b, A	ND	ND
PS tallo (g planta <sup>-1</sup> )	0	0,187 a, C	0,250 a, BC	0,316 a, B	0,656 a, A
	50	0,180 a, C	0,235 ab, B	0,246 b, B	0,316 b, A
	100	0,183 a, B	0,191 bc, AB	0,197 c, AB	0,202 c, A
	200	0,170 b, A	0,170 c, A	ND	ND
PS raíz (g planta <sup>-1</sup> )	0	0,187 a, B	0,230 a, B	0,296 a, B	0,528 a, A
	50	0,149 ab, B	0,210 a, AB	0,251 a, A	0,261 b, A
	100	0,158 b, C	0,197 a, BC	0,224 a, AB	0,249 b, A
	200	0,130 b, A	0,089 b, B	ND	ND
PS total (g planta <sup>-1</sup> )	0	0,841 a, D	1,34 a, C	2,03 a, B	4,81 a, A
	50	0,766 a, C	1,18 a, BC	1,51 b, B	2,69 b, A
	100	0,676 b, B	0,837 b, B	1,18 b, A	1,35 c, A
	200	0,565 c, A	0,427 c, B	ND	ND
R/PA	0	0,366 b, A	0,229 b, B	0,173 b, B	0,136 b, C
	50	0,314 b, A	0,256 ab, B	0,225 a, B	0,115 b, C
	100	0,365 ab, A	0,379 ab, A	0,257 a, B	0,242 a, B
	200	0,411 a, A	0,249 a, A	ND	ND
Elongación de tallo (cm planta <sup>-1</sup> )	0	8,46 a, C	17,12 a, B	19,06 a, B	39,01 a, A
	50	6,12 b, C	11,62 b, BC	13,22 b, B	24,70 b, A
	100	5,95 b, AB	5,08 c, B	6,85 c, A	5,58 c, AB
	200	3,58 c, A	3,68 c, A	ND	ND
Nº hojas planta <sup>-1</sup>	0	20,80 a, C	25,60 a, BC	28,60 a, B	48,75 a, A
	50	17,50 ab, C	23,80 a, B	25,60 a, B	39,00 b, A
	100	15,75 b, A	17,00 b, A	19,00 b, A	20,50 c, A
	200	10,00 b, A	10,80 c, A	ND	ND
AF total (cm <sup>2</sup> planta <sup>-1</sup> )	0	28,59 a, C	29,94 a, C	46,76 a, B	114,84 a, A
	50	23,80 ab, B	23,12 b, B	28,39 b, B	77,10 b, A
	100	20,94 b, B	20,91 b, B	20,52 b, B	28,74 c, A
	200	13,94 c, A	5,58 c, B	ND	ND
LAR (m <sup>2</sup> kg <sup>-1</sup> )	0	5,09 a, B	6,06 a, A	5,88 a, A	5,81 b, A
	50	5,12 a, C	6,12 a, B	6,57 a, AB	6,73 a, A
	100	4,76 ab, B	5,39 b, AB	6,06 a, A	5,92 b, A
	200	4,21 b, B	5,80 ab, A	ND	ND

Para cada parámetro, en cada recogida, diferente letra minúscula indica diferencias significativas entre niveles de sal, mientras que en cada fila, diferente letra mayúscula indica diferencias significativas entre recogidas según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ). ND, no determinado.

A las 4 semanas de tratamiento, si comparamos los distintos niveles de sal, sólo las plantas crecidas con 200 mM NaCl mostraron una inhibición significativa del PS de hoja (53%); a las 7 semanas se observó dicha inhibición con 100 mM y 200 mM NaCl ( $\approx 68\%$ ), y a las 10 semanas, todas las plantas crecidas en presencia de sal (50 y 100 mM) mostraron un PS de hoja significativamente ( $P \leq 0,05$ ) inferior al de plantas control ( $\approx 44\%$ ). Al final del cultivo la reducción del PS de hoja fue del 40% en plantas con 50 mM y del 75% con 100 mM.

De forma similar a lo que ocurre en hoja, el PS de tallo (Tabla 2.1) en plantas control y con 50 mM NaCl alcanzó sus valores máximos al final del cultivo (0,656 y 0,316 g planta<sup>-1</sup>, respectivamente), mientras que, en plantas con 100 mM se alcanzó a las 7 semanas (0,191 g planta<sup>-1</sup>). Por tanto, en plantas con 100 mM NaCl la acumulación de materia seca en tallo se detuvo antes que la de hoja. Al final del cultivo, el PS del tallo aumentó un 251% en plantas control, un 75% con 50 mM y un 10% con 100 mM. En plantas con 200 mM NaCl no se detectó crecimiento del tallo en las determinaciones realizadas ( $P \leq 0,05$ ). Por tanto, la acumulación de materia seca en el tallo se detuvo antes que la de hoja con 100 y 200 mM NaCl.

Después de 4 semanas de exposición a la sal, sólo el tratamiento con 200 mM NaCl redujo de forma significativa ( $P \leq 0,05$ ) el PS de tallo un 9% respecto a plantas control. Tras 7 semanas, se observó una inhibición media del 28% en plantas crecidas con 100 y 200 mM. A partir de las 10 semanas, también con 50 mM se redujo el PS de tallo de forma significativa respecto al control (22%). Al final del experimento, la inhibición del PS de tallo fue del 52% y 69% para 50 y 100 mM, respectivamente.

En lo que respecta al PS de raíz (Tabla 2.1), en plantas control aumentó

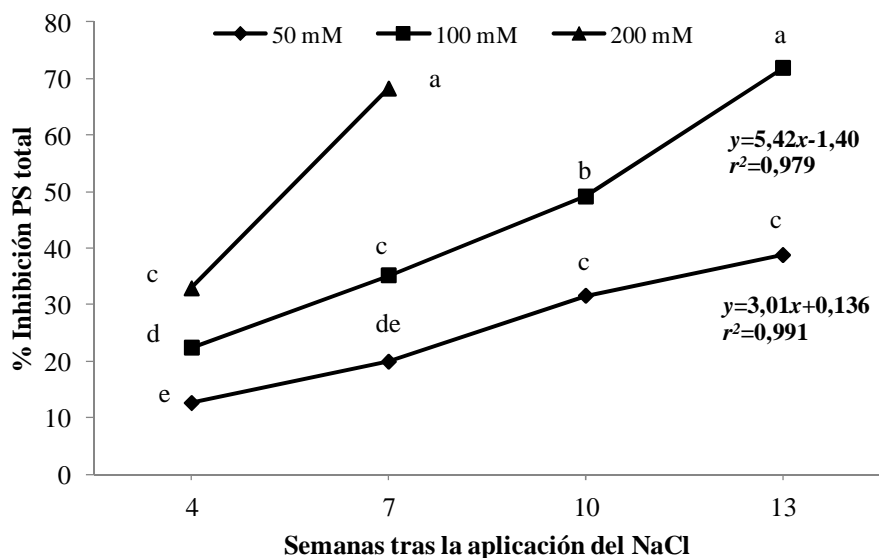
significativamente ( $P \leq 0,05$ ) en la última recogida ( $0,528 \text{ g planta}^{-1}$ ) respecto a las recogidas anteriores. En contraste, en plantas con 50 mM el crecimiento de la raíz se estabilizó a las 7 semanas de tratamiento y a las 10 semanas con 100 mM NaCl. Al final del experimento el PS de raíz aumentó un 182% en plantas control, un 75% con 50 mM y un 58% con 100 mM NaCl. En plantas crecidas con 200 mM se produjo un descenso del 31% del PS de raíz entre las 4 y 7 semanas.

Por otro lado, entre 50 y 100 mM NaCl no se observaron diferencias estadísticas para PS de raíz en ninguna de las recogidas, por lo que ambos niveles de NaCl afectaron de forma similar al crecimiento de la raíz durante las 13 semanas de experimentación. En la última recogida, el estrés salino con 50 y 100 mM NaCl provocó una reducción media del PS de raíz del 52%.

La evolución del PS total a lo largo del tiempo en plantas control, con 50 y 100 mM de NaCl fue similar a la descrita para el PS de hoja. Es importante destacar que el aumento del PS total de la planta al final del experimento respecto a la primera recogida, fue de un 472% en plantas control, un 251% en plantas crecidas con 50 mM y un 100% en las plantas crecidas con 100 mM NaCl. En el caso de 200 mM, el PS total de la planta se redujo un 24% entre las 4 y 7 semanas de tratamiento. A las 4 semanas de exposición a la sal ya se observó una inhibición del PS total con 100 mM y 200 mM (20% y 33%, respectivamente) comparado con el control; esta inhibición se mantuvo hasta el final del experimento, llegando a ser del 72% en plantas crecidas con 100 mM. En cambio, con 50 mM el descenso del PS total respecto al control se detectó a partir de las 10 semanas de tratamiento, siendo del 44% a las 13 semanas de exposición a la sal.

El análisis de regresión para 50 y 100 mM NaCl, mostró una elevada correlación

entre la inhibición del PS total y el tiempo de tratamiento salino (Figura 2.3). Según las ecuaciones obtenidas, para que se incremente un 10% la inhibición del PS total, con 50 mM se necesitan 3,3 semanas, mientras que, con 100 mM se necesitan 1,8 semanas, lo que supone 1,5 semanas más con 50 mM que con 100 mM.



**Figura 2.3.** Porcentaje de inhibición del PS total de plantas de olivo tratados con 50, 100 ó 200 mM NaCl durante 4, 7, 10 y 13 semanas. Plantas con 0 mM NaCl se utilizaron como control. Los datos son medias  $\pm$  SE (n=6). Diferente letra indica diferencias significativas según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ). ND, no determinado.

Por otra parte, con 200 mM NaCl la inhibición del PS total a las 4 semanas de tratamiento, no mostró diferencias significativas respecto a la inhibición con 100 y 50 mM NaCl a las 7 y 10 semanas, respectivamente (Figura 2.3). A las 7 semanas de tratamiento con 200 mM, la inhibición del PS total fue del 68%, según las ecuaciones de regresión obtenidas, el tiempo necesario para alcanzar dicha inhibición sería de 13 y 23 semanas con 100 y 50 mM NaCl, respectivamente. En el caso de 100 mM, este dato queda verificado por el análisis estadístico realizado a los datos obtenidos.

A diferencia de lo descrito para el PS, la relación raíz/parte aérea (R/PA)



disminuyó a lo largo del tiempo debido al mayor desarrollo de la parte aérea respecto a la raíz (Tabla 2.1). Las plantas control y las crecidas con 50 mM mostraron una evolución similar durante las semanas de tratamiento, de forma que, a las 13 semanas la relación R/PA se redujo un 63% respecto a la primera recogida (4 semanas). Con 100 mM NaCl la relación R/PA se estabilizó tras 10 semanas de tratamiento, mientras que, con 200 mM se mantuvo en las dos recogidas realizadas (4 y 7 semanas de tratamiento).

La comparación entre los distintos tratamientos de NaCl para cada recogida, mostró un aumento de la relación R/PA por la salinidad. Esto se debe a una mayor inhibición del crecimiento de la parte aérea en relación al de la raíz en presencia de NaCl. A las 4 y 7 semanas de tratamiento, en las plantas crecidas con 200 mM se detectó un incremento significativo respecto al control de la relación R/PA (12 y 9% para 4 y 7 semanas, respectivamente). Sin embargo, tras 10 semanas de tratamiento, las plantas crecidas con 50 mM y 100 mM NaCl incrementaron su relación R/PA una media del 39% respecto al control. En cambio, a las 13 semanas sólo el tratamiento con 100 mM aumentó la relación R/PA respecto al control (78%).

La evolución en el tiempo del número de hojas por planta (Tabla 2.1) fue diferente según el nivel de sal. Las plantas control y crecidas con 50 mM NaCl alcanzaron el mayor número de hojas en la última recogida (48,75 y 39,00 hojas planta<sup>-1</sup>, respectivamente), lo que supuso un incremento del 134 y 123%, respectivamente, en comparación con la primera recogida. En cambio, las plantas que crecieron con 100 mM y 200 mM NaCl no mostraron ninguna variación a lo largo del experimento.

Atendiendo al nivel de NaCl aplicado, el tratamiento con 50 mM sólo redujo de forma significativa ( $P \leq 0,05$ ) el número de hojas respecto al control a las 13 semanas de

exposición a la sal (20%). Sin embargo, con 100 mM y 200 mM NaCl la disminución en el número de hojas fue significativa desde el principio del experimento; tras 13 semanas, las plantas crecidas con 100 mM mostraron un descenso del 58% respecto al control, mientras que las crecidas con 200 mM mostraron un descenso del 58% a las 7 semanas de tratamiento.

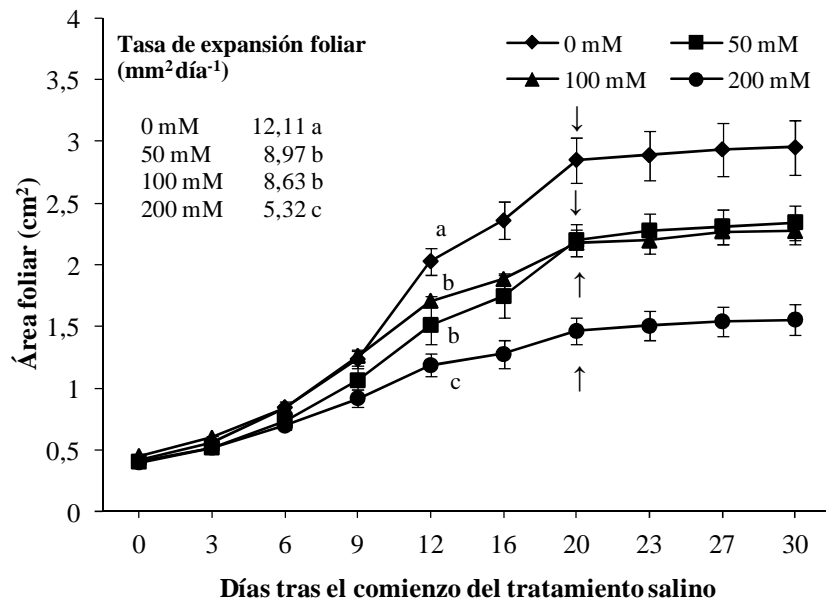
En plantas no salinizadas, el área foliar (AF) total aumentó con el tiempo, aunque no se detectó ningún cambio ( $P \leq 0,05$ ) durante las 7 primeras semanas de crecimiento; al final del experimento, el AF total de plantas control aumentó un 302%. En plantas crecidas con 50 mM y 100 mM NaCl, el AF total no aumentó significativamente hasta las 13 semanas de tratamiento (224 y 37 %, respectivamente). En cambio, con 200 mM, a las 7 semanas de tratamiento el AF total descendió un 60% respecto a la primera recogida (4 semanas).

En plantas con 100 y 200 mM NaCl, el AF total fue significativamente menor que el control en todas las recogidas; mientras que, con 50 mM las diferencias significativas respecto al control se hicieron patentes a partir de la segunda recogida (7 semanas). También cabe destacar que entre 50 mM y 100 mM los valores de AF total no fueron estadísticamente diferentes ( $P \leq 0,05$ ) hasta las 13 semanas de tratamiento. La inhibición final por la salinidad fue del 33 y 75% para 50 y 100 mM, respectivamente.

La evolución del crecimiento en función de la expansión se llevó a cabo en tallo y hoja. La elongación de tallo siguió la misma tendencia en el tiempo que el PS de tallo, aumentando un 361% en plantas sin sal y un 304% con 50 mM NaCl al final del cultivo (Tabla 2.1). En contraste, en plantas con 13 semanas de crecimiento con 100 mM NaCl, la elongación de tallo no mostró diferencias ( $P \leq 0,05$ ) respecto a la primera recogida (4

semanas). En consecuencia, en plantas control, con 50 y 100 mM NaCl, la acumulación de materia seca en tallo durante 13 semanas aumentó en mayor proporción que su elongación. Con 200 mM, la elongación no varió en el tiempo, al igual que ocurrió con el PS de tallo.

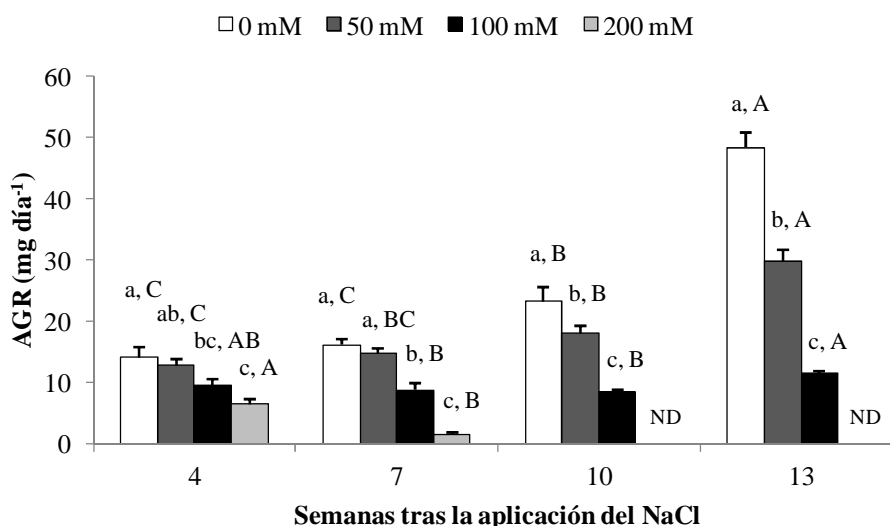
En todas las recogidas se observó un descenso de la elongación de tallo por la salinidad. A las 13 semanas de tratamiento las plantas crecidas con 50 y 100 mM NaCl inhibieron la elongación de tallo respecto a plantas no salinizadas (control) un 37% y 86%, respectivamente.



**Figura 2.4.** Expansión de la hoja y tasa de expansión foliar de plantas de olivo tratadas con 0, 50, 100 y 200 mM NaCl durante 13 semanas. Plantas con 0 mM NaCl se utilizaron como control. Los datos son medias  $\pm$  SE (n=8). Las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test de LSD ( $P \leq 0,05$ ). La flecha indica el día en el que se estabiliza el crecimiento de la hoja (LSD,  $P \leq 0,05$ ). Para la tasa de expansión foliar, las medias seguidas por distinta letra son significativamente diferentes según el test de LSD ( $P \leq 0,05$ ).

Como podemos observar en la figura 2.4, todos los tratamientos salinos

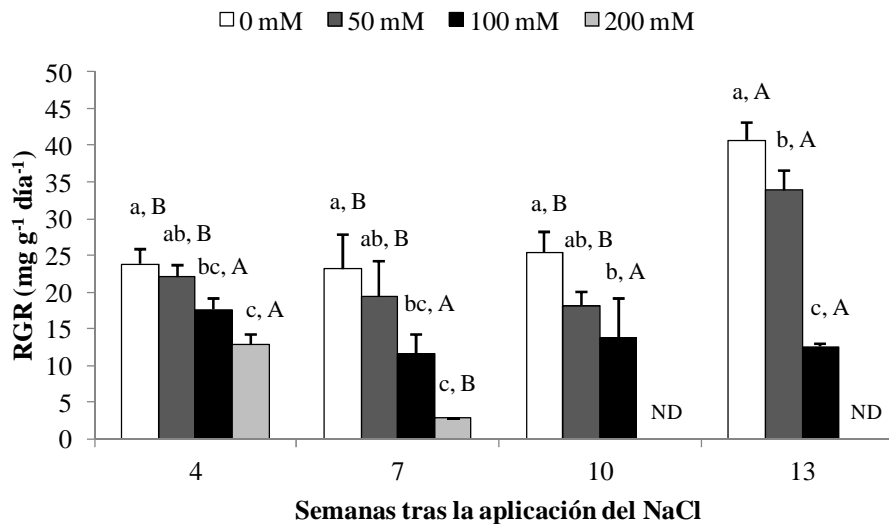
inhibieron la expansión de la hoja ( $P \leq 0,05$ ). A partir de los 12 días de tratamiento, esta inhibición se hace significativa ( $P \leq 0,05$ ) respecto a plantas control en todos los niveles de NaCl ensayados. Es importante destacar que la expansión foliar en plantas crecidas con 50 y 100 mM NaCl no mostró diferencias significativas. La inhibición al final de la expansión fue de, aproximadamente, un 27% con 50 y 100 mM NaCl y del 56% con 200 mM. Según el análisis estadístico, el tiempo necesario para que la hoja alcance el área final fue 20 días para todos los tratamientos. La tasa de expansión foliar se redujo con todos los niveles de sal, siendo el tratamiento con 200 mM el que mayor reducción mostró (56%), seguido de 50 y 100 mM ( $\approx 27\%$ ).



**Figura 2.5.** Tasa de crecimiento absoluto (AGR) de plantas de olivo tratados con 0, 50, 100 y 200 mM NaCl durante 4, 7, 10 y 13 semanas. Plantas con 0 mM NaCl se utilizaron como control. Los datos son medias  $\pm$  SE ( $n=6$ ). En cada recogida, diferente letra minúscula indica diferencias significativas entre niveles de NaCl. Para cada nivel de NaCl, diferente letra mayúscula indica diferencias significativas entre recogidas según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ). ND, no determinado.

Para profundizar en el efecto de la salinidad sobre el crecimiento de la planta a lo largo del tiempo se determinaron las tasas de crecimiento absoluto (AGR) y

crecimiento relativo (RGR) (Figuras 2.5 y 2.6). En plantas control y con 50 mM, los valores para ambas tasas aumentaron en función del tiempo, alcanzándose los valores máximos en la última recogida. En contraste, con 200 mM se redujeron ambas tasas, al igual que el PS total de la planta. Sin embargo, en plantas con 100 mM, la AGR fue menor ( $P \leq 0,05$ ) a las 7 y 10 semanas de tratamiento en comparación a las 13 semanas ( $\approx 24\%$ ), momento en el cual se observaron valores similares a los de la primera recogida ( $11,38 \text{ mg día}^{-1}$ ), mientras que, la RGR no varió ( $P \leq 0,05$ ) durante el período de experimentación ( $\approx 13,86 \text{ mg g}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ).

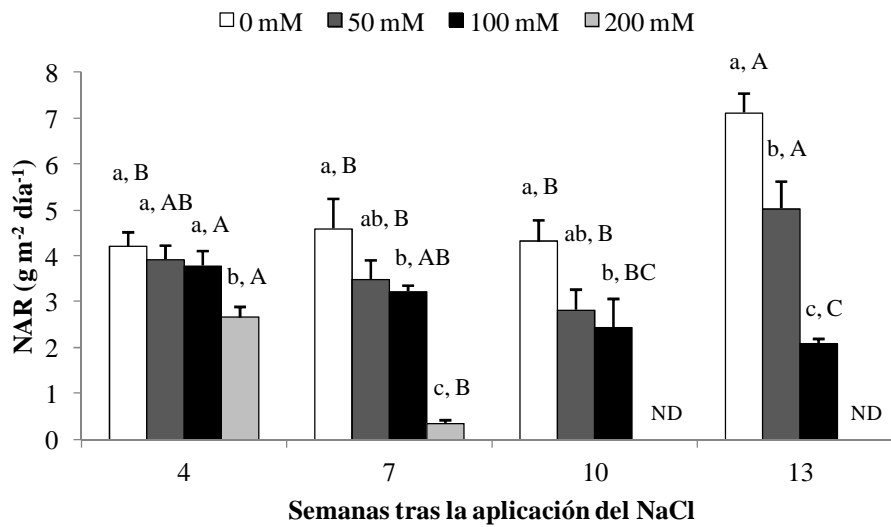


**Figura 2.6.** Tasa de crecimiento relativo (RGR) de plantas de olivo tratados con 0, 50, 100 y 200 mM NaCl durante 4, 7, 10 y 13 semanas. Plantas con 0 mM NaCl se utilizaron como control. Los datos son medias  $\pm$  SE ( $n=6$ ). En cada recogida, diferente letra minúscula indica diferencias significativas entre niveles de NaCl. Para cada nivel de NaCl, diferente letra mayúscula indica diferencias significativas entre recogidas según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ). ND, no determinado.

Atendiendo a la concentración de sal, con 50 mM NaCl la AGR se redujo significativamente respecto al control a partir de las 10 semanas, mientras que, en la RGR esto ocurre en la última recogida, donde se detectaron reducciones del 38% y 17%

para AGR y RGR, respectivamente. Con 100 y 200 mM NaCl, según el estudio estadístico, ambas tasas descendieron desde la primera recogida. Tras 13 semanas de tratamiento con 100 mM, la AGR mostró un mayor descenso respecto a plantas control (76%) que la RGR (69%).

El descenso de la RGR por la salinidad puede deberse a aspectos fisiológicos o morfológicos de la planta. Para contrastar ambos aspectos, la RGR se disecciona en dos componentes ( $RGR=LAR \times NAR$ ), uno morfológico (relación de área foliar= $LAR$ ) y otro fisiológico (tasa de asimilación neta= $NAR$ ). Ambos componentes se representan en la tabla 2.1 y figura 2.7. Como podemos observar,  $LAR$  (Tabla 2.1) mostró una tendencia a aumentar en el tiempo, estabilizándose a las 7 semanas en plantas control y con 100 mM, y a las 10 semanas con 50 mM, por tanto, a partir de este momento se equilibra el crecimiento de área foliar respecto a la acumulación de materia seca en la planta. Sin embargo  $NAR$ , aumentó en la última recogida en plantas control y con 50 mM NaCl, mientras que con 100 y 200 mM descendió. La comparación entre tratamientos salinos al final del cultivo mostró que en plantas con 50 mM NaCl se redujo menos la superficie foliar que el PS total de la planta, lo que se manifestó en un aumento significativo de  $LAR$  respecto a plantas control y con 100 mM NaCl ( $\approx 15\%$ ). En lo que respecta a  $NAR$ , descendió por la salinidad en todos los casos; este descenso se hizo significativo ( $P \leq 0,05$ ) a las 4 semanas con 200 mM, a las 7 semanas con 100 mM y a las 13 semanas con 50 mM NaCl. Al final del cultivo,  $NAR$  (Figura 2.7) descendió un 71% y 29% con 100 mM y 50 mM NaCl, respectivamente. Con 200 mM, tras 7 semanas la inhibición de  $NAR$  fue del 92%.



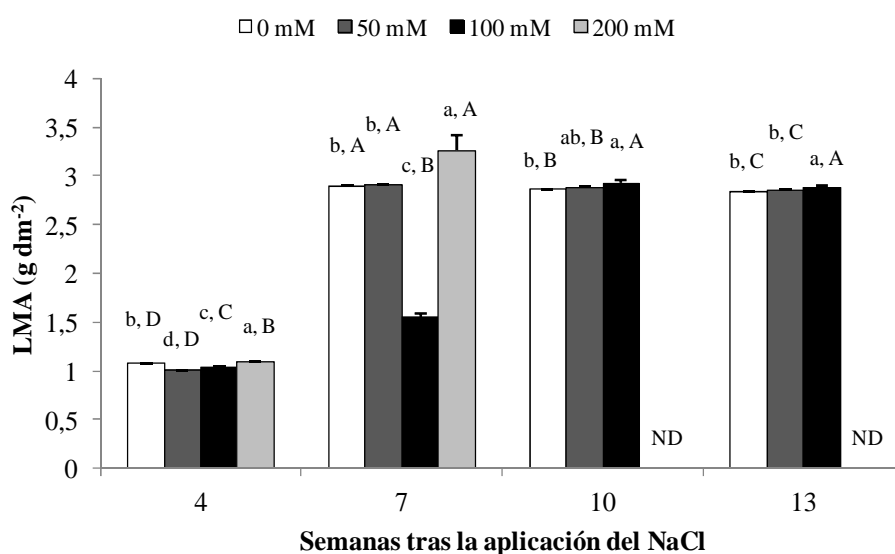
**Figura 2.7.** Tasa de asimilación neta (NAR) de plantas de olivo tratados con 0, 50, 100 y 200 mM NaCl durante 4, 7, 10 y 13 semanas. Plantas con 0 mM NaCl se utilizaron como control. Los datos son medias  $\pm$  SE ( $n=6$ ). En cada recogida, diferente letra minúscula indica diferencias significativas entre niveles de NaCl. Para cada nivel de NaCl, diferente letra mayúscula indica diferencias significativas entre recogidas según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ). ND, no determinado.

El cálculo de las correlaciones entre RGR y NAR o LAR, nos permitió conocer la participación relativa de los aspectos morfológicos o fisiológicos de la planta en la respuesta al estrés salino en el tiempo (Tabla 2.8). El aspecto fisiológico representado por NAR, fue el único que mostró una correlación estadísticamente significativa ( $r=0,881$ ;  $P \leq 0,001$ ) con la RGR, explicando el 77% de su descenso.

Puesto que LAR no se correlacionó con RGR, nos centramos en uno de sus componentes (masa foliar por unidad de área = LMA), ya que ( $LAR = LMF \times LMA$ ). En este caso, LMA mostró una correlación negativa con la RGR ( $r=-0,749$ ;  $P \leq 0,001$ ; Tabla 2.8), explicando el 56% de las diferencias observadas entre tratamientos salinos.

En lo que respecta a LMA (Figura 2.8), los máximos valores se alcanzaron a las 7 semanas en plantas control, con 50 mM y 200 mM NaCl (2,89, 2,91 y 3,26  $g\ dm^{-2}$ ,

respectivamente). En cambio, las plantas crecidas con 100 mM alcanzaron los valores máximos a partir de las 10 semanas de tratamiento, los cuales se mantuvieron hasta el final del cultivo. Sin embargo, si comparamos los valores a las 13 semanas con los observados a las 4 semanas, podemos afirmar que LMA aumentó en todos los casos ( $\approx 176\%$  en control y con 50 mM y  $177\%$  con 100 mM NaCl).



**Figura 2.8.** Masa foliar por unidad de área (LMA) de plantas de olivo tratados con 0, 50, 100 y 200 mM NaCl durante 4, 7, 10 y 13 semanas. Plantas con 0 mM NaCl se utilizaron como control. Los datos son medias  $\pm$  SE (n=6). En cada recogida, diferente letra minúscula indica diferencias significativas entre niveles de NaCl. Para cada nivel de NaCl, diferente letra mayúscula indica diferencias significativas entre recogidas según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ). ND, no determinado.

Al final del cultivo, la LMA de plantas con 50 mM no mostró diferencias significativas respecto al control, mientras que, en plantas con 100 mM aumentó un 1% respecto al control ( $P \leq 0,05$ ). Sin embargo, los valores más elevados de LMA se observaron a las 7 semanas de tratamiento con 200 mM NaCl ( $3,26 \text{ g dm}^{-2}$ ), que supone un incremento del 13% respecto a plantas control.



### 2.1.2. Contenido de nutrientes

El contenido de carbono (C), nitrógeno (N) y relación carbono/nitrógeno (C/N) se analizó en hoja y raíz, a las 13 semanas de exposición a la sal (Tabla 2.2). Según el análisis estadístico, el contenido de C fue mayor ( $P \leq 0,05$ ) en hoja que en raíz en todas las concentraciones de sal ensayadas. Comparando los tratamientos salinos se detectó un descenso del contenido de C en hoja con 50 y 100 mM NaCl del 2%, aproximadamente. En cambio, en raíz, con 100 mM el contenido de C aumentó respecto al control (2%).

**Tabla 2.2.** Contenido de carbono (C), nitrógeno (N) y relación carbono/nitrógeno (C/N) en hoja y raíz de plantas de olivo tratados con 0, 50 y 100 mM NaCl durante 13 semanas. Plantas con 0 mM NaCl se utilizaron como control.

NaCl (mM)	C (%)		N (%)		C/N	
	Hoja	Raíz	Hoja	Raíz	Hoja	Raíz
0	48,68 a	40,91 b *	1,96 b	2,53 a *	24,92 a	16,16 c *
50	47,81 b	40,78 b *	2,71 a	2,24 b *	17,63 b	18,21 b
100	47,59 b	41,96 a *	2,77 a	2,06 c *	17,17 b	20,32 a *

Para cada parámetro, diferente letra minúscula indica diferencias significativas entre niveles de sal, mientras que, para cada parámetro, en cada fila, \* indica diferencias significativas entre hoja y raíz según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

El C de hoja y raíz se correlacionó con la mayoría de los parámetros de crecimiento (Tabla 2.8). El C de hoja mostró una correlación positiva máxima con el PS total ( $r=0,923$ ;  $P \leq 0,001$ ) y PS de hoja ( $r=0,910$ ;  $P \leq 0,001$ ). Además se correlacionó negativamente con el  $\text{Na}^+$  de hoja ( $r=-0,961$ ;  $P \leq 0,001$ ) y raíz ( $r=-0,974$ ;  $P \leq 0,001$ ), y positivamente con el  $\text{K}^+$  de hoja y raíz ( $r=0,933$  y  $0,963$ , respectivamente;  $P \leq 0,001$ ). El signo de la correlación de C de raíz fue opuesto al mencionado para C de hoja.

En cuanto al contenido de nitrógeno (N), en plantas control, fue mayor en raíz que en hoja, mientras que en plantas salinizadas ocurrió lo contrario (Tabla 2.2). El estudio estadístico reveló un incremento del contenido de N en hoja de plantas crecidas

en medio salino, independientemente de su concentración ( $\approx 40\%$ ), mientras que en raíz, descendió un 11 y 18% con 50 y 100 mM NaCl, respectivamente.

El contenido de N de hoja se correlacionó de forma negativa con el  $K^+$  de hoja y raíz, así como con la mayoría de los parámetros de crecimiento (Tabla 2.8), y positivamente con el  $Na^+$  en hoja y raíz ( $r=0,947$  y  $0,975$ , respectivamente;  $P \leq 0,001$ ). De forma similar a lo que ocurre con el C, las correlaciones que mostró el N de raíz fueron de signo opuesto a las del N de hoja.

En plantas crecidas en medio salino, la relación C/N mostró diferencias significativas respecto al control tanto en hoja como en raíz, lo que implica un desequilibrio entre C y N en ambos órganos. Por otro lado, la salinización con 50 ó 100 mM NaCl no influyó en la respuesta de la relación C/N en hojas, disminuyendo ambos niveles por igual ( $\approx 30\%$ ). Sin embargo en raíz, la relación C/N aumentó un 12% con 50 mM NaCl y un 26% con 100 mM. Es importante destacar que con 50 mM NaCl, la relación C/N no mostró diferencias significativas entre hoja y raíz. En contraste, en plantas control, la relación C/N de hoja fue mayor en hoja que en raíz, mientras que, en plantas con 100 mM fue mayor en raíz. Por tanto, en condiciones de salinidad se favorece el acúmulo de N en hoja mientras que en raíz se acumula C.

Como podemos observar en la tabla 2.3, tras 13 semanas de tratamiento salino, el contenido de  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  fue mayor en raíz que en hoja en todos los casos, exceptuando el contenido de  $Ca^{2+}$  en plantas control, donde no se observaron diferencias significativas entre hoja y raíz. El contenido de  $Na^+$  aumentó por la salinidad en hoja y raíz; en hoja, aumentó un 1107% con 50 mM y un 1755% con 100 mM NaCl, mientras que en raíz aumentó un 669% y un 905% con 50 y 100 mM NaCl,

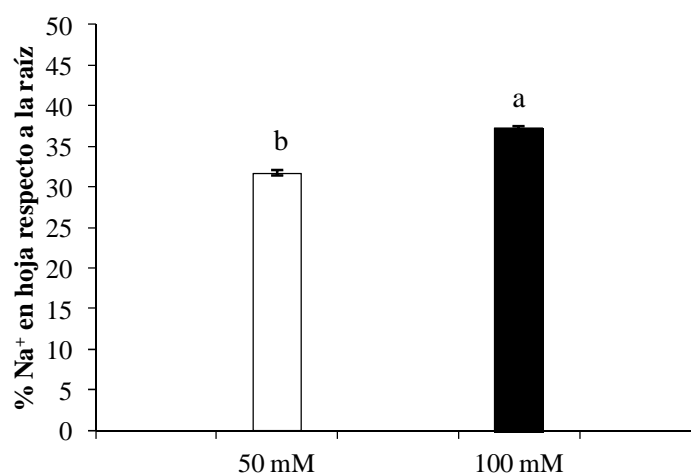
respectivamente.

**Tabla 2.3.** Contenido de sodio ( $\text{Na}^+$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ) y calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y, relación potasio/sodio ( $\text{K}^+/\text{Na}^+$ ) en hoja y raíz de plantas de olivo tratados con 0, 50 y 100 mM NaCl durante 13 semanas. Plantas con 0 mM NaCl se utilizaron como control.

NaCl (mM)	$\text{Na}^+$ (%)		$\text{K}^+$ (%)		$\text{Ca}^{2+}$ (%)		$\text{K}^+/\text{Na}^+$	
	Hoja	Raíz	Hoja	Raíz	Hoja	Raíz	Hoja	Raíz
0	0,076 c	0,376 c *	0,904 a	2,57 a *	0,327 b	0,331 c	19,07 a	6,83 a *
50	0,917 b	2,89 b *	0,626 b	1,39 b *	0,297 c	0,643 b *	0,682 b	0,480 b *
100	1,41 a	3,78 a *	0,566 b	1,10 c *	0,350 a	2,20 a *	0,402 c	0,292 c *

Para cada parámetro, diferente letra minúscula indica diferencias significativas entre niveles de sal, mientras que, para cada parámetro, en cada fila, \* indica diferencias significativas entre hoja y raíz según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

Sin embargo, es interesante destacar que el contenido de  $\text{Na}^+$  en hoja representa el 32% respecto al de raíz en plantas crecidas con 50 mM (Figura 2.9), mientras que en plantas crecidas con 100 mM NaCl, el  $\text{Na}^+$  en hoja representa el 37% respecto al de raíz; por tanto, con ambos niveles de NaCl está habiendo retención de  $\text{Na}^+$  en la raíz. Esta retención fue mayor con 50 mM que con 100 mM NaCl ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 2.9.** Porcentaje de concentración de sodio ( $\text{Na}^+$ ) en hoja (%PS) comparado con la concentración de sodio ( $\text{Na}^+$ ) de la raíz (%PS) de plantas de olivo tratados con 50 y 100 mM NaCl durante 13 semanas. Los datos son medias  $\pm$  SE ( $n=3$ ). Las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test de LSD ( $P \leq 0,05$ ).

El contenido de  $K^+$  descendió significativamente ( $P \leq 0,05$ ) con el estrés salino tanto en hoja como en raíz. En hoja, descendió en término medio un 34% para ambos niveles de sal (50 y 100 mM NaCl). En raíz, los niveles de  $K^+$  descendieron en mayor proporción que en hoja, siendo esta reducción del 46% en plantas con 50 mM y del 57% con 100 mM NaCl.

En consecuencia, el equilibrio entre  $K^+$  y  $Na^+$  no se mantiene, lo que se manifiesta por un descenso de la relación  $K^+/Na^+$  por la salinidad. En hoja, la aplicación de 50 mM NaCl redujo un 96% la relación  $K^+/Na^+$ , mientras que, con 100 mM esta reducción fue del 98%. En raíz de plantas crecidas con 50 mM el descenso fue del 93% y en plantas con 100 mM del 96%. En todos los casos, la relación  $K^+/Na^+$  mostró valores superiores en hoja que en raíz.

El contenido de  $Ca^{2+}$  en hoja fue menor que en raíz ( $P \leq 0,05$ ) en plantas crecidas con sal (50 y 100 mM), sin embargo, en plantas sin sal el porcentaje de  $Ca^{2+}$  fue el mismo en hoja y raíz ( $\approx 0,33\%$ ). El contenido de  $Ca^{2+}$  en hoja, varió según el nivel de NaCl, aumentó respecto al control en plantas crecidas con 100 mM (7%), mientras que se redujo un 9% en plantas crecidas con 50 mM. Sin embargo en la raíz, el estrés salino aumentó el contenido de  $Ca^{2+}$  con ambos tratamientos (94 y 565% con 50 y 100 mM NaCl, respectivamente).

### **2.1.3. Estado hídrico de la planta**

Los parámetros relacionados con el estado hídrico de la planta se exponen en la tabla 2.4. Con 50 mM NaCl, no se observaron diferencias significativas respecto al control en contenido hídrico para la saturación (WCS), déficit de saturación hídrico (WSD) y contenido hídrico relativo (RWC). Sin embargo, con 100 mM el WCS y el

WSD aumentaron respecto al control (217 y 117%, respectivamente;  $P \leq 0,05$ ), mientras que el RWC descendió un 6% ( $P \leq 0,05$ ). Por tanto, sólo con 100 mM NaCl se afectó el estado hídrico de la planta.

**Tabla 2.4.** Contenido hídrico relativo (RWC), contenido hídrico para la saturación (WCS), déficit de saturación hídrico (WSD), succulencia (S) y transpiración (E) en hoja de plantas de olivo tratadas con 0, 50 y 100 mM NaCl durante 13 semanas. Plantas con 0 mM NaCl se utilizaron como control.

NaCl (mM)	RWC (%)	WCS (g H <sub>2</sub> O g <sup>-1</sup> PS)	WSD (%)	S (mg H <sub>2</sub> O cm <sup>-2</sup> )	E (mmol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )
0	94,97 a	0,063 b	5,03 b	15,88 c	4,60 a
50	93,95 a	0,114 b	6,05 b	17,30 b	2,41 b
100	89,10 b	0,200 a	10,90 a	17,52 a	1,08 c

Para cada parámetro, las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

La succulencia (S) de las hojas aumentó un 9% con 50 mM y un 10% con 100 mM NaCl debido al descenso del AFH, como muestra la correlación negativa que presentan ambos parámetros ( $r = -0,614$ ;  $P \leq 0,01$ ), que explica el 38% de las diferencias observadas entre tratamientos salinos. En contraste, la transpiración (E) descendió un 48 y 76% con 50 y 100 mM NaCl, respectivamente. La E se correlacionó positivamente con la  $g_s$  ( $r = 0,873$ ;  $P \leq 0,001$ ) y con la  $P_n$  ( $r = 0,473$ ;  $P \leq 0,05$ ).

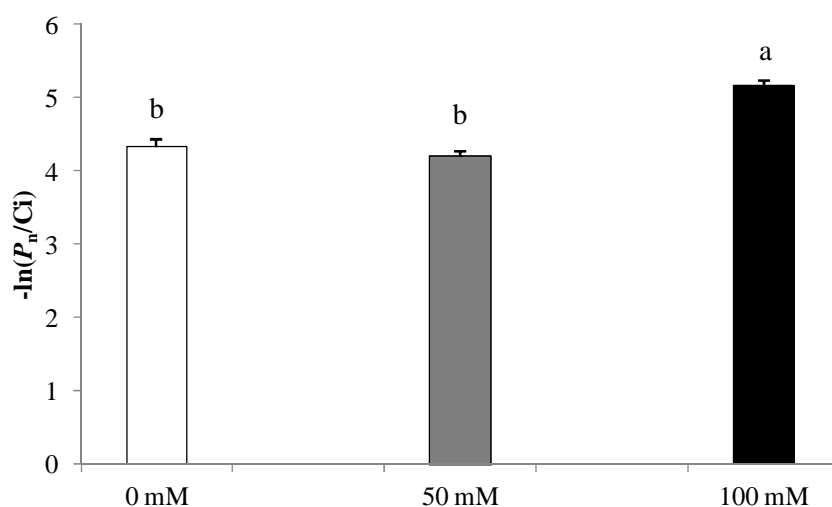
#### 2.1.4. Intercambio gaseoso

En general, 13 semanas después del inicio de los tratamientos, todos los parámetros de intercambio gaseoso se afectaron por la sal (Tabla 2.5). La tasa de asimilación neta ( $P_n$ ) descendió un 51% con 100 mM NaCl. En el caso de la conductividad estomática ( $g_s$ ), ambos tratamientos salinos la redujeron por igual respecto a plantas control ( $\approx 74\%$ ). La concentración interna de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ) aumentó con 100 mM, incrementando su valor un 15% respecto al control.

**Tabla 2.5.** Tasa de asimilación neta ( $P_n$ ), conductividad estomática ( $g_s$ ), concentración de  $\text{CO}_2$  interna (Ci) y eficiencia fotosintética en el uso del nitrógeno (PNUE) en plantas de olivo tratadas con 0, 50 y 100 mM NaCl durante 13 semanas. Plantas con 0 mM NaCl se utilizaron como control.

NaCl (mM)	$P_n$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	$g_s$ ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	Ci ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ )	PNUE ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ N}$ )
0	5,03 a	187,76 a	369,09 b	13,64 a
50	5,62 a	61,84 b	371,45 b	11,17 b
100	2,44 b	34,30 b	425,59 a	4,24 c

Para cada parámetro, las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 2.10.** Fotoinhibición de plantas de olivo tratados con 0, 50 y 100 mM NaCl durante 13 semanas. Plantas con 0 mM NaCl se utilizaron como control. Los datos son medias  $\pm$  SE ( $n=6$ ). En cada recogida, diferente letra minúscula indica diferencias significativas entre niveles de NaCl. Para cada nivel de NaCl, diferente letra mayúscula indica diferencias significativas entre recogidas según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ). ND, no determinado.

Como indicador de la inhibición fotosintética en respuesta a la salinidad se calculó la relación entre la  $P_n$  y la Ci (Figura 2.10). Con la finalidad de clarificar la influencia de la salinidad en el descenso de la fotosíntesis se calculó el  $-\ln(P_n/C_i)$ . La sal indujo un aumento de este parámetro sólo con niveles de 100 mM NaCl, que representaron un incremento significativo del 20% respecto a plantas control.

La respuesta al estrés salino de la eficiencia fotosintética en el uso del nitrógeno

(PNUE), descendió en función del nivel de NaCl, un 18% con 50 mM y un 69% con 100 mM NaCl. Este descenso de la PNUE con 100 mM NaCl se debió principalmente al descenso de la  $P_n$ , puesto que los niveles de N en hoja aumentaron por igual para 50 y 100 mM NaCl.

### 2.1.5. Pigmentos fotosintéticos

En cuanto al contenido de pigmentos fotosintéticos la respuesta observada dependió del nivel de sal ensayado. En la tabla 2.6 podemos observar que el tratamiento con 50 mM NaCl aumentó de forma significativa ( $P \leq 0,05$ ) el contenido de clorofila a ( $C_a$ ) (21%), clorofila b ( $C_b$ ) (31%), carotenoides (Car) (19%) y clorofila total ( $C_{a+b}$ ) (24%) respecto a plantas control. Sin embargo, el tratamiento con 100 mM NaCl redujo un 16% el contenido de  $C_a$  y un 18% el de Car tras 13 semanas de tratamiento. La relación clorofila total/carotenoides ( $C_{a+b}/\text{Car}$ ) y la relación  $C_a/C_b$  no se afectaron por la salinidad.

**Tabla 2.6.** Contenido de clorofila a ( $C_a$ ), clorofila b ( $C_b$ ), carotenoides (Car), clorofila total ( $C_{a+b}$ ), relación clorofila total/carotenoides ( $C_{a+b}/\text{Car}$ ) y relación clorofila a/clorofila b ( $C_a/C_b$ ) en hoja de plantas de olivo tratados con 0, 50 y 100 mM NaCl durante 13 semanas. Plantas con 0 mM NaCl se utilizaron como control.

NaCl	$C_a$ (mg g <sup>-1</sup> PS)	$C_b$ (mg g <sup>-1</sup> PS)	Car (mg g <sup>-1</sup> PS)	$C_{a+b}$ (mg g <sup>-1</sup> PS)	$C_{a+b}/\text{Car}$	$C_a/C_b$
0 mM	2,33 b	1,04 b	0,774 b	3,36 b	2,25 a	4,34 a
50 mM	2,82 a	1,36 a	0,922 a	4,18 a	2,12 a	4,52 a
100 mM	1,95 c	0,92 b	0,632 c	2,87 c	2,12 a	4,54 a

Para cada parámetro, las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

### 2.1.6. Metabolitos e indicadores del estrés en la hoja

En la tabla 2.7 se exponen los resultados obtenidos para distintos solutos que

pueden participar en el ajuste osmótico en plantas sometidas a estrés salino. Como podemos observar, la respuesta varió entre solutos.

**Tabla 2.7.** Contenido de azúcares, aminoácidos, prolina, glicina betaína (GB), proteína y nitrato de hoja de plantas de olivos tratados con 0, 50 y 100 mM NaCl durante 13 semanas. Plantas con 0 mM NaCl se utilizaron como control.

NaCl	Azúcares (mg g <sup>-1</sup> PS)	Aminoácidos (μg g <sup>-1</sup> PS)	Prolina (μg g <sup>-1</sup> PS)	GB (mg g <sup>-1</sup> PS)	Proteína (mg g <sup>-1</sup> PS)	Nitrato (mg g <sup>-1</sup> PS)
0 mM	30,93 ab	197,26 c	114,29 b	2,96 a	2,31 b	12,36 a
50 mM	32,91 a	395,58 b	73,51 c	2,82 ab	1,97 c	9,36 b
100 mM	29,64 b	538,28 a	294,78 a	2,65 b	2,98 a	8,96 b

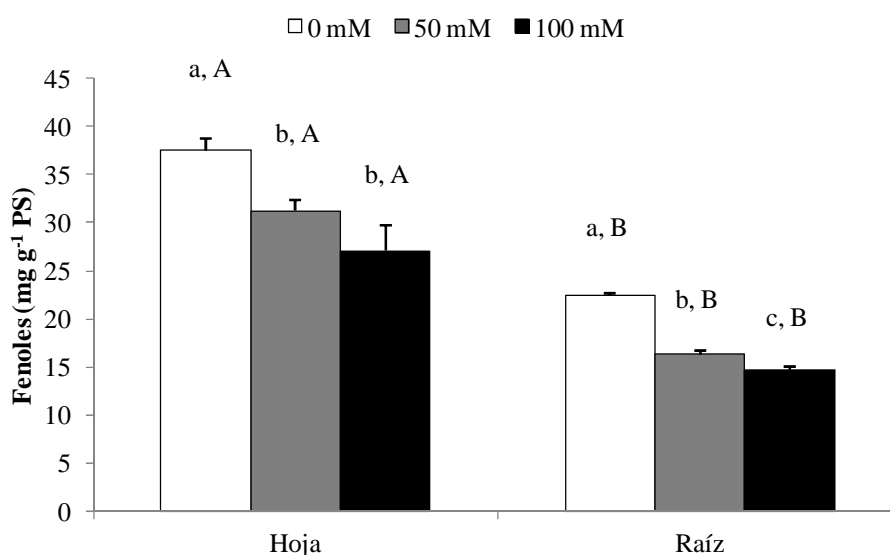
Para cada parámetro, las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

A las 13 semanas de exposición al NaCl, las plantas tratadas con 100 mM mostraron un 10% menos de azúcares solubles que las plantas tratadas con 50 mM, sin embargo ninguno de los tratamientos mostró diferencias significativas respecto al control. El contenido de aminoácidos respecto al control aumentó un 100% con 50 mM y un 173% con 100 mM NaCl. Además, determinamos el contenido de prolina, metabolito implicado en el ajuste osmótico de muchas especies de plantas. Las plantas tratadas con 100 mM NaCl acumularon un 158% más prolina que las plantas sin sal, en cambio, las plantas con 50 mM mostraron un descenso del 36%. En el caso de la glicina betaína (GB), con 100 mM NaCl se redujo un 10% respecto al control ( $P \leq 0,05$ ). El contenido de proteína mostró una tendencia similar a la del contenido de prolina; aumentó un 29% respecto al control con 100 mM y se redujo un 15% con 50 mM NaCl. Otro soluto determinado, en este caso inorgánico, fue el nitrato, el cual descendió una media del 25% con 50 y 100 mM NaCl. Por tanto, la acumulación de solutos osmóticamente activos por la salinidad dependió del nivel de NaCl ensayado; así, con 50 mM se acumularon aminoácidos, mientras que con 100 mM se acumularon



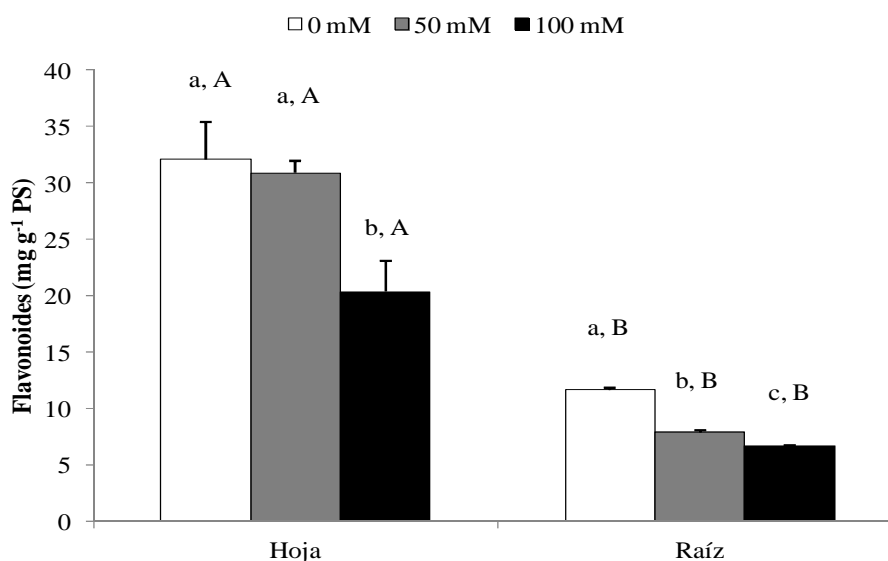
aminoácidos, prolina y proteínas.

En general, el contenido de fenoles y flavonoides fue mayor en hoja que en raíz (Figuras 2.11 y 2.12). Por efecto de la salinidad, el contenido de fenoles de hoja descendió en mayor proporción que el de flavonoides, mientras que en raíz ocurrió lo contrario. En hoja, los niveles de fenoles descendieron aproximadamente un 77% respecto al control con 50 y 100 mM NaCl; en raíz, este descenso fue del 27% para 50 mM y del 35% para 100 mM NaCl.



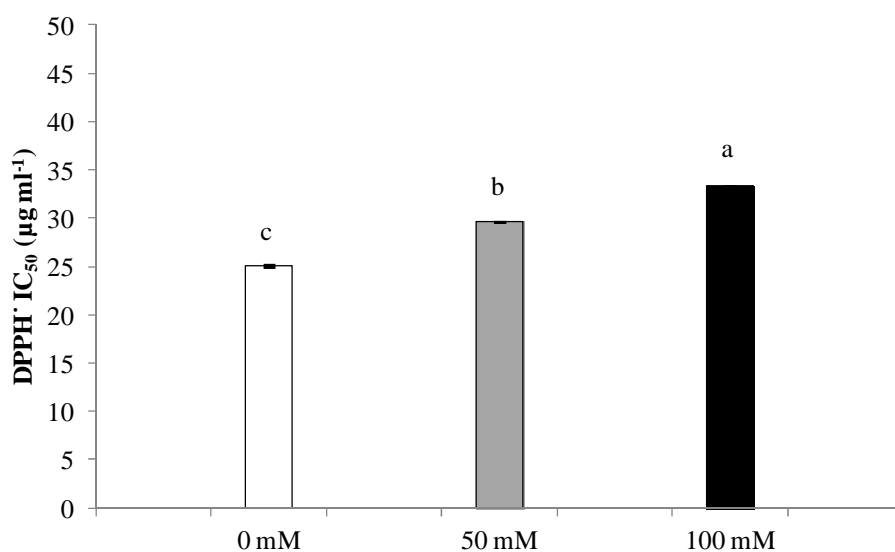
**Figura 2.11.** Contenido de fenoles en hoja y raíz de plantas de olivo tratados con 0, 50 y 100 mM NaCl durante 13 semanas. Plantas con 0 mM NaCl se utilizaron como control. Los datos son medias  $\pm$  SE ( $n=8$ ). Para cada órgano, diferente letra minúscula indica diferencias significativas entre niveles de sal, mientras que, para cada nivel de NaCl, diferente letra mayúscula, indica diferencias significativas entre hoja y raíz según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ). ND, no determinado.

En contraste, el contenido de flavonoides se redujo en mayor medida en raíz que en hoja; en hoja sólo se redujo con 100 mM NaCl (37%), mientras que, en raíz descendió un 32% con 50 mM y un 43% con 100 mM NaCl.

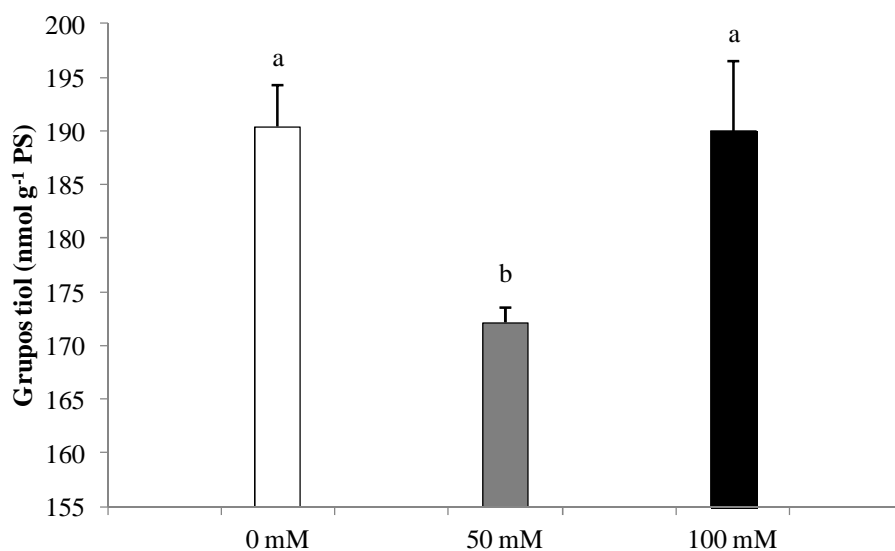


**Figura 2.12.** Contenido de flavonoides en hoja y raíz de plantas de olivo tratados con 0, 50 y 100 mM NaCl durante 13 semanas. Plantas con 0 mM NaCl se utilizaron como control. Los datos son medias  $\pm$  SE ( $n=8$ ). Para cada órgano, diferente letra minúscula indica diferencias significativas entre niveles de sal, mientras que, para cada nivel de NaCl, diferente letra mayúscula, indica diferencias significativas entre hoja y raíz según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ). ND, no determinado.

La capacidad antioxidante, evaluada por la capacidad de captación de radicales DPPH $\cdot$  de extractos de hoja, y la concentración de grupos tiol de proteína soluble, se representan en las figuras 2.13 y 2.14. Como podemos observar, el IC $_{50}$  de la capacidad de neutralización de radicales DPPH $\cdot$  aumentó un 18% con 50 mM y un 33% con 100 mM NaCl, esto significa que, la capacidad antioxidante descendió, un 18% con 50 mM y un 33% con 100 mM NaCl, respecto a plantas control. La concentración de grupos tiol descendió con 50 mM NaCl un 10% ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 2.13.** Actividad de barrido de radicales libres DPPH<sup>·</sup>, expresado como IC<sub>50</sub>, en hoja de plantas de olivo tratados con 0, 50 y 100 mM NaCl durante 13 semanas. Plantas con 0 mM NaCl se utilizaron como control. Los datos son medias ± SE (n=6). Las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test de LSD ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 2.14.** Contenido de grupos tiol en hoja de plantas de olivo tratados con 0, 50 y 100 mM NaCl durante 13 semanas. Plantas con 0 mM NaCl se utilizaron como control. Los datos son medias ± SE (n=6). Las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test de LSD ( $P \leq 0,05$ ).

**Tabla 2.8.a.** Matriz de correlaciones entre las variables estudiadas.

	PS tallo	PS raíz	PS total	R/PA	Elongación	Nº hojas	AF total	AFH	LAR	AGR	RGR	NAR	LMA	Na <sup>+</sup> hoja	Na <sup>+</sup> raíz
PS hoja	0,948 <sup>***</sup>	0,707 <sup>**</sup>	0,922 <sup>***</sup>	-0,806 <sup>***</sup>	0,924 <sup>***</sup>	0,914 <sup>***</sup>	0,938 <sup>***</sup>	0,646 <sup>**</sup>	-0,122 <sup>NS</sup>	0,988 <sup>***</sup>	0,919 <sup>***</sup>	0,910 <sup>***</sup>	-0,737 <sup>***</sup>	-0,962 <sup>***</sup>	-0,944 <sup>***</sup>
PS tallo		0,691 <sup>**</sup>	0,867 <sup>***</sup>	-0,666 <sup>**</sup>	0,889 <sup>***</sup>	0,803 <sup>***</sup>	0,837 <sup>***</sup>	0,699 <sup>**</sup>	-0,297 <sup>NS</sup>	0,930 <sup>***</sup>	0,808 <sup>***</sup>	0,801 <sup>***</sup>	-0,636 <sup>**</sup>	-0,912 <sup>***</sup>	-0,920 <sup>***</sup>
PS raíz			0,810 <sup>***</sup>	-0,417 <sup>NS</sup>	0,582 <sup>*</sup>	0,547 <sup>*</sup>	0,761 <sup>***</sup>	0,631 <sup>**</sup>	-0,514 <sup>*</sup>	0,685 <sup>**</sup>	0,548 <sup>*</sup>	0,758 <sup>***</sup>	-0,586 <sup>*</sup>	-0,716 <sup>***</sup>	-0,742 <sup>***</sup>
PS total				-0,748 <sup>***</sup>	0,867 <sup>***</sup>	0,849 <sup>***</sup>	0,966 <sup>***</sup>	0,538 <sup>*</sup>	-0,250 <sup>NS</sup>	0,931 <sup>***</sup>	0,851 <sup>***</sup>	0,954 <sup>***</sup>	-0,774 <sup>***</sup>	-0,938 <sup>***</sup>	-0,930 <sup>***</sup>
R/PA					-0,775 <sup>***</sup>	-0,887 <sup>***</sup>	-0,816 <sup>***</sup>	-0,263 <sup>NS</sup>	-0,351 <sup>NS</sup>	-0,813 <sup>***</sup>	-0,851 <sup>***</sup>	-0,811 <sup>***</sup>	0,895 <sup>***</sup>	0,768 <sup>***</sup>	0,708 <sup>**</sup>
Elongación						0,842 <sup>***</sup>	0,875 <sup>***</sup>	0,499 <sup>*</sup>	-0,017 <sup>NS</sup>	0,963 <sup>***</sup>	0,957 <sup>***</sup>	0,849 <sup>***</sup>	-0,717 <sup>***</sup>	-0,865 <sup>***</sup>	-0,834 <sup>***</sup>
Nº hojas							0,877 <sup>***</sup>	0,442 <sup>NS</sup>	0,130 <sup>NS</sup>	0,911 <sup>**</sup>	0,886 <sup>***</sup>	0,870 <sup>***</sup>	-0,758 <sup>***</sup>	-0,879 <sup>***</sup>	-0,840 <sup>***</sup>
AF total								0,590 <sup>*</sup>	-0,087 <sup>NS</sup>	0,938 <sup>***</sup>	0,899 <sup>***</sup>	0,990 <sup>***</sup>	-0,795 <sup>***</sup>	-0,928 <sup>***</sup>	-0,898 <sup>***</sup>
AFH									-0,387 <sup>NS</sup>	0,573 <sup>*</sup>	0,458 <sup>NS</sup>	0,587 <sup>*</sup>	-0,259 <sup>NS</sup>	-0,568 <sup>*</sup>	-0,587 <sup>*</sup>
LAR										-0,098 <sup>NS</sup>	0,148 <sup>NS</sup>	-0,055 <sup>NS</sup>	-0,164 <sup>NS</sup>	0,235 <sup>NS</sup>	0,335 <sup>NS</sup>
AGR											0,952 <sup>***</sup>	0,908 <sup>***</sup>	-0,749 <sup>***</sup>	-0,954 <sup>***</sup>	-0,931 <sup>***</sup>
RGR												0,881 <sup>***</sup>	-0,749 <sup>***</sup>	-0,844 <sup>***</sup>	-0,789 <sup>***</sup>
NAR													-0,817 <sup>***</sup>	-0,883 <sup>***</sup>	-0,853 <sup>***</sup>
Na <sup>+</sup> hoja														0,701 <sup>**</sup>	0,675 <sup>**</sup>
Na <sup>+</sup> raíz															0,993 <sup>***</sup>

NS, \*, \*\*, \*\*\* indica diferencias no significativas o significativas para  $P \leq 0,05, 0,01, 0,001$ .

**Tabla 2.8.b.** Matriz de correlaciones entre las variables estudiadas.

	K <sup>+</sup> hoja	K <sup>+</sup> raíz	Ca <sup>2+</sup> hoja	Ca <sup>2+</sup> raíz	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> hoja	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> raíz	C hoja	C raíz	N hoja	N raíz	C/N hoja	C/N raíz	RWC	WCS
PS hoja	0,883 <sup>***</sup>	0,924 <sup>***</sup>	-0,366 <sup>NS</sup>	-0,889 <sup>***</sup>	0,864 <sup>***</sup>	0,870 <sup>***</sup>	0,910 <sup>***</sup>	-0,728 <sup>***</sup>	-0,871 <sup>***</sup>	0,912 <sup>***</sup>	0,861 <sup>***</sup>	-0,915 <sup>***</sup>	0,746 <sup>***</sup>	-0,816 <sup>***</sup>
PS tallo	0,864 <sup>***</sup>	0,917 <sup>***</sup>	-0,148 <sup>NS</sup>	-0,734 <sup>***</sup>	0,895 <sup>***</sup>	0,897 <sup>***</sup>	0,895 <sup>***</sup>	-0,540 <sup>*</sup>	-0,897 <sup>***</sup>	0,845 <sup>***</sup>	0,892 <sup>***</sup>	-0,823 <sup>***</sup>	0,633 <sup>**</sup>	-0,746 <sup>***</sup>
PS raíz	0,685 <sup>**</sup>	0,747 <sup>***</sup>	0,056 <sup>NS</sup>	-0,498 <sup>*</sup>	0,759 <sup>***</sup>	0,758 <sup>***</sup>	0,732 <sup>***</sup>	-0,316 <sup>NS</sup>	-0,718 <sup>***</sup>	0,660 <sup>**</sup>	0,710 <sup>**</sup>	-0,620 <sup>**</sup>	0,460 <sup>NS</sup>	-0,586 <sup>*</sup>
PS total	0,851 <sup>***</sup>	0,908 <sup>***</sup>	-0,264 <sup>NS</sup>	-0,827 <sup>***</sup>	0,871 <sup>***</sup>	0,874 <sup>***</sup>	0,923 <sup>***</sup>	-0,608 <sup>**</sup>	-0,875 <sup>***</sup>	0,830 <sup>***</sup>	0,870 <sup>***</sup>	-0,821 <sup>***</sup>	0,699 <sup>**</sup>	-0,801 <sup>***</sup>
R/PA	-0,602 <sup>***</sup>	-0,657 <sup>**</sup>	0,656 <sup>**</sup>	0,913 <sup>***</sup>	-0,552 <sup>*</sup>	-0,562 <sup>*</sup>	-0,683 <sup>**</sup>	0,836 <sup>***</sup>	0,581 <sup>*</sup>	-0,736 <sup>***</sup>	-0,574 <sup>*</sup>	0,790 <sup>***</sup>	-0,883 <sup>***</sup>	0,821 <sup>***</sup>
Elongación	0,762 <sup>***</sup>	0,805 <sup>***</sup>	-0,426 <sup>NS</sup>	-0,853 <sup>***</sup>	0,736 <sup>***</sup>	0,742 <sup>***</sup>	0,820 <sup>***</sup>	-0,697 <sup>**</sup>	-0,753 <sup>***</sup>	0,787 <sup>***</sup>	0,744 <sup>***</sup>	-0,805 <sup>***</sup>	0,806 <sup>***</sup>	-0,828 <sup>***</sup>
Nº hojas	0,773 <sup>***</sup>	0,805 <sup>***</sup>	-0,517 <sup>*</sup>	-0,917 <sup>***</sup>	0,720 <sup>***</sup>	0,729 <sup>***</sup>	0,801 <sup>***</sup>	-0,812 <sup>***</sup>	-0,727 <sup>***</sup>	0,865 <sup>***</sup>	0,716 <sup>***</sup>	-0,890 <sup>***</sup>	0,714 <sup>***</sup>	-0,746 <sup>***</sup>
AF total	0,806 <sup>***</sup>	0,865 <sup>***</sup>	-0,448 <sup>NS</sup>	-0,912 <sup>***</sup>	0,795 <sup>***</sup>	0,800 <sup>***</sup>	0,873 <sup>***</sup>	-0,740 <sup>***</sup>	-0,809 <sup>***</sup>	0,829 <sup>***</sup>	0,803 <sup>***</sup>	-0,849 <sup>***</sup>	0,766 <sup>***</sup>	-0,823 <sup>***</sup>
AFH	0,541 <sup>*</sup>	0,592 <sup>**</sup>	0,022 <sup>NS</sup>	-0,406 <sup>NS</sup>	0,595 <sup>**</sup>	0,594 <sup>**</sup>	0,556 <sup>*</sup>	-0,262 <sup>NS</sup>	-0,564 <sup>*</sup>	0,506 <sup>*</sup>	0,556 <sup>*</sup>	-0,477 <sup>*</sup>	0,248 <sup>NS</sup>	-0,357 <sup>NS</sup>
LAR	-0,372 <sup>NS</sup>	-0,393 <sup>NS</sup>	-0,757 <sup>***</sup>	-0,233 <sup>NS</sup>	-0,526 <sup>*</sup>	-0,514 <sup>*</sup>	-0,370 <sup>NS</sup>	-0,445 <sup>NS</sup>	0,489 <sup>*</sup>	-0,172 <sup>NS</sup>	-0,495 <sup>*</sup>	0,054 <sup>NS</sup>	0,237 <sup>NS</sup>	-0,046 <sup>NS</sup>
AGR	0,867 <sup>***</sup>	0,906 <sup>***</sup>	-0,392 <sup>NS</sup>	-0,899 <sup>***</sup>	0,843 <sup>***</sup>	0,849 <sup>***</sup>	0,912 <sup>***</sup>	-0,727 <sup>***</sup>	-0,855 <sup>***</sup>	0,889 <sup>***</sup>	0,846 <sup>***</sup>	-0,896 <sup>***</sup>	0,780 <sup>***</sup>	-0,832 <sup>***</sup>
RGR	0,712 <sup>***</sup>	0,745 <sup>***</sup>	-0,595 <sup>**</sup>	-0,930 <sup>***</sup>	0,648 <sup>**</sup>	0,656 <sup>**</sup>	0,774 <sup>***</sup>	-0,803 <sup>***</sup>	-0,672 <sup>**</sup>	0,769 <sup>***</sup>	0,660 <sup>**</sup>	-0,810 <sup>***</sup>	0,816 <sup>***</sup>	-0,809 <sup>***</sup>
NAR	0,748 <sup>***</sup>	0,815 <sup>***</sup>	-0,440 <sup>NS</sup>	-0,883 <sup>***</sup>	0,748 <sup>***</sup>	0,753 <sup>***</sup>	0,837 <sup>***</sup>	-0,710 <sup>**</sup>	-0,754 <sup>***</sup>	0,775 <sup>***</sup>	0,749 <sup>***</sup>	-0,796 <sup>***</sup>	0,745 <sup>***</sup>	-0,790 <sup>***</sup>

NS, \*, \*\*, \*\*\* indica diferencias no significativas o significativas para  $P \leq 0,05, 0,01, 0,001$ .

**Tabla 2.8.c.** Matriz de correlaciones entre las variables estudiadas.

	K <sup>+</sup> hoja	K <sup>+</sup> raíz	Ca <sup>2+</sup> hoja	Ca <sup>2+</sup> raíz	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> hoja	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> raíz	C hoja	C raíz	N hoja	N raíz	C/N hoja	C/N raíz	RWC	WCS
LMA	-0,533*	-0,621**	0,443 <sup>NS</sup>	0,769***	-0,566*	-0,571*	-0,680**	0,647**	0,565*	-0,640**	-0,564*	0,673**	-0,883***	0,827***
Na <sup>+</sup> hoja	-0,931***	-0,981***	0,285 <sup>NS</sup>	0,868***	-0,936***	-0,940***	-0,961***	0,683**	0,947***	-0,942***	-0,938***	0,932***	-0,722***	0,810***
Na <sup>+</sup> raíz	-0,956***	-0,996***	0,1710 <sup>NS</sup>	0,803***	-0,971***	-0,974***	-0,974***	0,600**	0,975***	-0,936***	-0,968***	0,910***	-0,670**	0,774***
K <sup>+</sup> hoja		0,964***	-0,101 <sup>NS</sup>	-0,717***	0,949***	0,954***	0,929***	-0,549*	-0,957***	0,947***	0,952***	-0,903***	0,539*	-0,667**
K <sup>+</sup> raíz			-0,112 <sup>NS</sup>	-0,760***	0,984***	0,986***	0,963***	-0,562*	-0,984***	0,936***	0,977***	-0,903***	0,627**	-0,742***
Ca <sup>2+</sup> hoja				0,715***	0,065 <sup>NS</sup>	0,053 <sup>NS</sup>	-0,085 <sup>NS</sup>	0,861***	-0,000 <sup>NS</sup>	-0,299 <sup>NS</sup>	0,011 <sup>NS</sup>	0,434 <sup>NS</sup>	-0,572*	0,447 <sup>NS</sup>
Ca <sup>2+</sup> raíz					-0,638**	-0,648**	-0,747***	0,925***	0,674**	-0,822***	-0,661**	0,882***	-0,832***	0,830***
K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> hoja						0,100***	0,960***	-0,407 <sup>NS</sup>	-0,990***	0,882***	0,986***	-0,824***	0,534*	-0,670**
K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> raíz							0,962***	-0,419 <sup>NS</sup>	-0,991***	0,890***	0,987***	-0,8323***	0,541*	-0,676**
C hoja								-0,488*	-0,964***	0,866***	0,963***	-0,825***	0,649**	-0,751***
C raíz									0,446*	-0,734***	-0,430 <sup>NS</sup>	0,826***	-0,750***	0,697***
N hoja										-0,885***	-0,999***	0,836***	-0,552*	0,685**
N raíz											0,873***	-0,988***	0,671**	-0,748***
C/N hoja												-0,822***	0,543*	-0,675**
C/N raíz													-0,724***	0,774***
RWC														-0,909***

NS, \*, \*\*, \*\*\* indica diferencias no significativas o significativas para  $P \leq 0,05, 0,01, 0,001$ .

**Tabla 2.8.d.** Matriz de correlaciones entre las variables estudiadas.

	RWC	WCS	WSD	S	E	P <sub>n</sub>	g <sub>s</sub>	Ci	PNUE	C <sub>a</sub>	C <sub>b</sub>	Car	C <sub>a+b</sub>	C <sub>a+b</sub> /Car
PS hoja	0,746***	-0,816***	-0,746***	-0,810***	0,844***	0,641**	0,889***	-0,531*	0,888***	0,350 <sup>NS</sup>	0,173 <sup>NS</sup>	0,401 <sup>NS</sup>	0,288 <sup>NS</sup>	-0,622**
PS tallo	0,633**	-0,746***	-0,633**	-0,909***	0,790***	0,530*	0,876***	-0,483*	0,787***	0,139 <sup>NS</sup>	-0,019 <sup>NS</sup>	0,192 <sup>NS</sup>	0,081 <sup>NS</sup>	-0,632**
PS raíz	0,460 <sup>NS</sup>	-0,586*	-0,460 <sup>NS</sup>	-0,757***	0,725***	0,334 <sup>NS</sup>	0,778***	-0,268 <sup>NS</sup>	0,649**	-0,080 <sup>NS</sup>	-0,133 <sup>NS</sup>	0,002 <sup>NS</sup>	-0,102 <sup>NS</sup>	-0,639**
PS total	0,699**	-0,801***	-0,699**	-0,913***	0,898***	0,604**	0,920***	-0,570*	0,869***	0,260 <sup>NS</sup>	0,105 <sup>NS</sup>	0,316 <sup>NS</sup>	0,205 <sup>NS</sup>	-0,622**
R/PA	-0,883***	0,821***	0,883***	0,600**	-0,699**	-0,734***	-0,650**	0,560*	-0,829***	-0,660**	-0,475*	-0,682**	-0,601**	0,394 <sup>NS</sup>
Elongación	0,806***	-0,828***	-0,806***	-0,783***	0,7470***	0,763***	0,777***	-0,697**	0,913***	0,350 <sup>NS</sup>	0,111 <sup>NS</sup>	0,374 <sup>NS</sup>	0,265 <sup>NS</sup>	-0,590*
Nº hojas	0,714***	-0,746***	-0,714***	-0,767***	0,763***	0,654**	0,770***	-0,625**	0,854***	0,497*	0,324 <sup>NS</sup>	0,529*	0,439 <sup>NS</sup>	-0,462 <sup>NS</sup>
AF total	0,766***	-0,823***	-0,766***	-0,854***	0,868***	0,688**	0,868***	-0,599**	0,905***	0,435 <sup>NS</sup>	0,267 <sup>NS</sup>	0,488*	0,378 <sup>NS</sup>	-0,601**
AFH	0,248 <sup>NS</sup>	-0,357 <sup>NS</sup>	-0,248 <sup>NS</sup>	-0,614**	0,430 <sup>NS</sup>	0,228 <sup>NS</sup>	0,529*	-0,284 <sup>NS</sup>	0,431 <sup>NS</sup>	0,012 <sup>NS</sup>	-0,017 <sup>NS</sup>	0,083 <sup>NS</sup>	0,001 <sup>NS</sup>	-0,491*
LAR	0,237 <sup>NS</sup>	-0,046 <sup>NS</sup>	-0,237 <sup>NS</sup>	0,460 <sup>NS</sup>	-0,249 <sup>NS</sup>	0,354 <sup>NS</sup>	-0,400 <sup>NS</sup>	-0,132 <sup>NS</sup>	0,069 <sup>NS</sup>	0,734***	0,713***	0,681**	0,739***	0,422 <sup>NS</sup>
AGR	0,780***	-0,832***	-0,780***	-0,881***	0,843***	0,698**	0,879***	-0,600**	0,919***	0,358 <sup>NS</sup>	0,153 <sup>NS</sup>	0,401 <sup>NS</sup>	0,286 <sup>NS</sup>	-0,634**
RGR	0,816***	-0,809***	-0,816***	-0,711***	0,757***	0,819***	0,735***	-0,655**	0,937***	0,547*	0,337 <sup>NS</sup>	0,575*	0,476*	-0,516*

NS, \*, \*\*, \*\*\* indica diferencias no significativas o significativas para  $P \leq 0,05, 0,01, 0,001$ .

**Tabla 2.8.e.** Matriz de correlaciones entre las variables estudiadas.

	RWC	WCS	WSD	S	E	$P_n$	$g_s$	Ci	PNUE	$C_a$	$C_b$	Car	$C_{a+b}$	$C_{a+b}/Car$
NAR	0,745***	-0,790***	-0,745***	-0,810***	0,840***	0,658**	0,829***	-0,610**	0,873***	0,442 <sup>NS</sup>	0,299 <sup>NS</sup>	0,493*	0,395 <sup>NS</sup>	-0,533*
LMA	-0,883***	0,827***	0,883***	0,591**	-0,703**	-0,658**	-0,630**	0,502*	-0,780***	-0,501*	-0,369 <sup>NS</sup>	-0,530*	-0,459 <sup>NS</sup>	0,364 <sup>NS</sup>
Na <sup>+</sup> hoja	-0,722***	0,810***	0,722***	0,960***	-0,8923***	-0,566*	-0,935***	0,489*	-0,853***	-0,274 <sup>NS</sup>	-0,084 <sup>NS</sup>	-0,326 <sup>NS</sup>	-0,206 <sup>NS</sup>	0,658**
Na <sup>+</sup> raíz	-0,670**	0,774***	0,670**	0,982***	-0,883***	-0,485*	-0,950***	0,444 <sup>NS</sup>	-0,801***	-0,167 <sup>NS</sup>	0,010 <sup>NS</sup>	-0,222 <sup>NS</sup>	-0,102 <sup>NS</sup>	0,675 <sup>NS</sup>
K <sup>+</sup> hoja	0,539*	-0,667**	-0,539*	-0,948***	0,753***	0,400 <sup>NS</sup>	0,931***	-0,367 <sup>NS</sup>	0,700**	0,063 <sup>NS</sup>	-0,114 <sup>NS</sup>	0,127 <sup>NS</sup>	-0,003 <sup>NS</sup>	-0,755***
K <sup>+</sup> raíz	0,627**	-0,742***	-0,627**	-0,986***	0,865***	0,437 <sup>NS</sup>	0,946***	-0,403 <sup>NS</sup>	0,768***	0,100 <sup>NS</sup>	-0,073 <sup>NS</sup>	0,156 <sup>NS</sup>	0,036 <sup>NS</sup>	-0,686**
Ca <sup>2+</sup> hoja	-0,572*	0,447 <sup>NS</sup>	0,572*	0,040 <sup>NS</sup>	-0,238 <sup>NS</sup>	-0,776***	-0,084 <sup>NS</sup>	0,463 <sup>NS</sup>	-0,594**	-0,925***	-0,771***	-0,909***	-0,882***	0,043 <sup>NS</sup>
Ca <sup>2+</sup> raíz	-0,832***	0,830***	0,832***	0,713***	-0,779***	-0,809***	-0,717***	0,611**	-0,928***	-0,685**	-0,475*	-0,712***	-0,616**	0,476*
K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> hoja	0,534*	-0,670**	-0,534*	-0,984***	0,829***	0,304 <sup>NS</sup>	0,941***	-0,331 <sup>NS</sup>	0,665**	-0,058 <sup>NS</sup>	-0,204 <sup>NS</sup>	0,002 <sup>NS</sup>	-0,115 <sup>NS</sup>	-0,683**
K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> raíz	0,541*	-0,676**	-0,541*	-0,985***	0,829***	0,313 <sup>NS</sup>	0,943***	-0,337 <sup>NS</sup>	0,672**	-0,047 <sup>NS</sup>	-0,196 <sup>NS</sup>	0,013 <sup>NS</sup>	-0,105 <sup>NS</sup>	-0,688**
C hoja	0,649**	-0,751***	-0,649**	-0,963***	0,875***	0,436 <sup>NS</sup>	0,958***	-0,430 <sup>NS</sup>	0,747***	0,118 <sup>NS</sup>	-0,039 <sup>NS</sup>	0,177 <sup>NS</sup>	0,060 <sup>NS</sup>	-0,667**
C raíz	-0,750***	0,697**	0,750***	0,484*	-0,548*	-0,813***	-0,483*	0,542*	-0,834***	-0,770***	-0,56*	-0,783***	-0,703**	0,370 <sup>NS</sup>
N hoja	-0,552*	0,685**	0,552*	0,981***	-0,835***	-0,354 <sup>NS</sup>	-0,958***	0,353 <sup>NS</sup>	-0,683**	0,001 <sup>NS</sup>	0,165 <sup>NS</sup>	-0,060 <sup>NS</sup>	0,064 <sup>NS</sup>	0,715***
N raíz	0,671**	-0,748***	-0,671**	-0,890***	0,745***	0,529*	0,861***	-0,431 <sup>NS</sup>	0,798***	0,236 <sup>NS</sup>	0,032 <sup>NS</sup>	0,289 <sup>NS</sup>	0,162 <sup>NS</sup>	-0,704**
C/N hoja	0,543*	-0,675**	-0,543*	-0,975***	0,827***	0,344 <sup>NS</sup>	0,958***	-0,350 <sup>NS</sup>	0,667**	-0,008 <sup>NS</sup>	-0,170 <sup>NS</sup>	0,053 <sup>NS</sup>	-0,070 <sup>NS</sup>	-0,718***
C/N raíz	-0,724***	0,774***	0,724***	0,846***	-0,745***	-0,617**	-0,820***	0,470*	-0,846***	-0,361 <sup>NS</sup>	-0,145 <sup>NS</sup>	-0,407 <sup>NS</sup>	-0,285 <sup>NS</sup>	0,662**
RWC		-0,909***	-1,000***	-0,573*	0,667**	0,770**	0,581*	-0,555*	0,850***	0,538*	0,299 <sup>NS</sup>	0,545*	0,456 <sup>NS</sup>	-0,443 <sup>NS</sup>
WCS			0,909***	0,741**	-0,780***	-0,737***	-0,720***	0,501*	-0,879***	-0,456 <sup>NS</sup>	-0,262 <sup>NS</sup>	-0,484*	-0,390 <sup>NS</sup>	0,497*
WSD				0,573*	-0,667**	-0,770***	-0,581*	0,555*	-0,850***	-0,538*	-0,299 <sup>NS</sup>	-0,545*	-0,456 <sup>NS</sup>	0,443 <sup>NS</sup>
S					-0,869***	-0,393 <sup>NS</sup>	-0,950***	0,398 <sup>NS</sup>	-0,733***	-0,054 <sup>NS</sup>	0,096 <sup>NS</sup>	-0,113 <sup>NS</sup>	0,002 <sup>NS</sup>	0,662**
E						0,473*	0,873***	-0,319 <sup>NS</sup>	0,797***	0,286 <sup>NS</sup>	0,181 <sup>NS</sup>	0,326 <sup>NS</sup>	0,251 <sup>NS</sup>	-0,407 <sup>NS</sup>
$P_n$							0,399 <sup>NS</sup>	-0,719***	0,876***	0,700**	0,471*	0,716***	0,625**	-0,447 <sup>NS</sup>
$g_s$								-0,360 <sup>NS</sup>	0,723***	0,069 <sup>NS</sup>	-0,075 <sup>NS</sup>	0,138 <sup>NS</sup>	0,015 <sup>NS</sup>	-0,715***
Ci									-0,667**	-0,351 <sup>NS</sup>	-0,086 <sup>NS</sup>	-0,341 <sup>NS</sup>	-0,256 <sup>NS</sup>	0,446 <sup>NS</sup>
PNUE										0,526*	0,302 <sup>NS</sup>	0,556*	0,449 <sup>NS</sup>	-0,559*
$C_a$											0,930***	0,992***	0,990***	0,103 <sup>NS</sup>
$C_b$												0,931***	0,972***	0,335 <sup>NS</sup>
Car													0,985***	0,024 <sup>NS</sup>
$C_{a+b}$														0,193 <sup>NS</sup>

NS, \*, \*\*, \*\*\* indica diferencias no significativas o significativas para  $P \leq 0,05, 0,01, 0,001$ .

**Tabla 2.8.f.** Matriz de correlaciones entre las variables estudiadas.

	C <sub>a</sub> /C <sub>b</sub>	Azúcares	Aminoácidos	Prolina	GB	Proteína	Nitrato	Fenoles hoja	Fenoles raíz	Flavonoides hoja	Flavonoides raíz	DPPH'	Tiol
PS hoja	0,392 <sup>NS</sup>	0,215 <sup>NS</sup>	-0,908 <sup>***</sup>	-0,705 <sup>**</sup>	0,628 <sup>**</sup>	-0,583 <sup>*</sup>	0,916 <sup>***</sup>	0,624 <sup>**</sup>	0,915 <sup>***</sup>	0,435 <sup>NS</sup>	0,942 <sup>***</sup>	-0,973 <sup>***</sup>	-0,077 <sup>NS</sup>
PS tallo	0,426 <sup>NS</sup>	0,074 <sup>NS</sup>	-0,861 <sup>***</sup>	-0,507 <sup>*</sup>	0,632 <sup>**</sup>	-0,379 <sup>NS</sup>	0,944 <sup>***</sup>	0,553 <sup>*</sup>	0,910 <sup>***</sup>	0,273 <sup>NS</sup>	0,928 <sup>NS</sup>	-0,904 <sup>***</sup>	-0,070 <sup>NS</sup>
PS raíz	0,287 <sup>NS</sup>	-0,227 <sup>NS</sup>	-0,726 <sup>***</sup>	-0,258 <sup>NS</sup>	0,401 <sup>NS</sup>	-0,092 <sup>NS</sup>	0,767 <sup>***</sup>	0,411 <sup>NS</sup>	0,728 <sup>***</sup>	0,010 <sup>NS</sup>	0,782 <sup>***</sup>	-0,705 <sup>**</sup>	-0,175 <sup>NS</sup>
PS total	0,382 <sup>NS</sup>	0,181 <sup>NS</sup>	-0,951 <sup>***</sup>	-0,625 <sup>**</sup>	0,549 <sup>*</sup>	-0,488 <sup>*</sup>	0,896 <sup>***</sup>	0,653 <sup>**</sup>	0,905 <sup>***</sup>	0,403 <sup>NS</sup>	0,919 <sup>***</sup>	-0,941 <sup>***</sup>	-0,057 <sup>NS</sup>
R/PA	-0,242 <sup>NS</sup>	-0,461 <sup>NS</sup>	0,734 <sup>***</sup>	0,885 <sup>***</sup>	-0,556 <sup>*</sup>	0,796 <sup>***</sup>	-0,618 <sup>**</sup>	-0,667 <sup>**</sup>	-0,721 <sup>***</sup>	-0,654 <sup>**</sup>	-0,680 <sup>**</sup>	0,813 <sup>***</sup>	0,145 <sup>NS</sup>
Elongación	0,543 <sup>*</sup>	0,372 <sup>NS</sup>	-0,898 <sup>***</sup>	-0,719 <sup>***</sup>	0,635 <sup>**</sup>	-0,666 <sup>**</sup>	0,812 <sup>***</sup>	0,519 <sup>*</sup>	0,815 <sup>***</sup>	0,415 <sup>NS</sup>	0,810 <sup>***</sup>	-0,887 <sup>***</sup>	-0,026 <sup>NS</sup>
Nº hojas	0,286 <sup>NS</sup>	0,379 <sup>NS</sup>	-0,825 <sup>***</sup>	-0,799 <sup>***</sup>	0,639 <sup>**</sup>	-0,689 <sup>**</sup>	0,777 <sup>***</sup>	0,576 <sup>*</sup>	0,813 <sup>***</sup>	0,518 <sup>*</sup>	0,817 <sup>***</sup>	-0,906 <sup>***</sup>	-0,129 <sup>NS</sup>
AF total	0,340 <sup>NS</sup>	0,287 <sup>NS</sup>	-0,910 <sup>***</sup>	-0,758 <sup>***</sup>	0,602 <sup>**</sup>	-0,637 <sup>**</sup>	0,842 <sup>***</sup>	0,597 <sup>**</sup>	0,860 <sup>***</sup>	0,441 <sup>NS</sup>	0,891 <sup>***</sup>	-0,948 <sup>***</sup>	-0,097 <sup>NS</sup>
AFH	0,156 <sup>NS</sup>	-0,123 <sup>NS</sup>	-0,435 <sup>NS</sup>	-0,229 <sup>NS</sup>	0,475 <sup>**</sup>	-0,100 <sup>NS</sup>	0,638 <sup>**</sup>	0,098 <sup>NS</sup>	0,546 <sup>*</sup>	-0,143 <sup>NS</sup>	0,631 <sup>**</sup>	-0,556 <sup>*</sup>	-0,162 <sup>NS</sup>
LAR	-0,305 <sup>NS</sup>	0,651 <sup>**</sup>	0,208 <sup>NS</sup>	-0,510 <sup>**</sup>	-0,005 <sup>NS</sup>	-0,611 <sup>**</sup>	-0,443 <sup>NS</sup>	-0,075 <sup>NS</sup>	-0,327 <sup>NS</sup>	0,301 <sup>NS</sup>	-0,360 <sup>NS</sup>	0,154 <sup>NS</sup>	-0,314 <sup>NS</sup>
AGR	0,462 <sup>NS</sup>	0,275 <sup>NS</sup>	-0,939 <sup>***</sup>	-0,726 <sup>***</sup>	0,616 <sup>**</sup>	-0,627 <sup>**</sup>	0,899 <sup>***</sup>	0,617 <sup>**</sup>	0,908 <sup>***</sup>	0,459 <sup>NS</sup>	0,918 <sup>***</sup>	-0,968 <sup>***</sup>	-0,026 <sup>NS</sup>
RGR	0,397 <sup>NS</sup>	0,451 <sup>NS</sup>	-0,876 <sup>***</sup>	-0,844 <sup>***</sup>	0,546 <sup>*</sup>	-0,793 <sup>***</sup>	0,729 <sup>***</sup>	0,573 <sup>*</sup>	0,761 <sup>***</sup>	0,510 <sup>*</sup>	0,774 <sup>***</sup>	-0,882 <sup>***</sup>	-0,102 <sup>NS</sup>
NAR	0,272 <sup>NS</sup>	0,283 <sup>NS</sup>	-0,870 <sup>***</sup>	-0,743 <sup>***</sup>	0,582 <sup>*</sup>	-0,616 <sup>**</sup>	0,796 <sup>***</sup>	0,576 <sup>*</sup>	0,817 <sup>***</sup>	0,419 <sup>NS</sup>	0,840 <sup>***</sup>	-0,906 <sup>***</sup>	-0,121 <sup>NS</sup>
LMA	-0,179 <sup>NS</sup>	-0,226 <sup>NS</sup>	0,721 <sup>***</sup>	0,702 <sup>**</sup>	-0,456 <sup>NS</sup>	0,581 <sup>*</sup>	-0,608 <sup>**</sup>	-0,687 <sup>**</sup>	-0,719 <sup>***</sup>	-0,525 <sup>*</sup>	-0,642 <sup>**</sup>	0,742 <sup>***</sup>	0,122 <sup>NS</sup>
Na <sup>+</sup> hoja	-0,446 <sup>NS</sup>	-0,180 <sup>NS</sup>	0,924 <sup>***</sup>	0,652 <sup>**</sup>	-0,599 <sup>**</sup>	0,524 <sup>*</sup>	-0,950 <sup>***</sup>	-0,676 <sup>**</sup>	-0,969 <sup>***</sup>	-0,506 <sup>*</sup>	-0,978 <sup>***</sup>	0,995 <sup>***</sup>	-0,062 <sup>NS</sup>
Na <sup>+</sup> raíz	-0,459 <sup>NS</sup>	-0,095 <sup>NS</sup>	0,910 <sup>***</sup>	0,559 <sup>*</sup>	-0,584 <sup>*</sup>	0,421 <sup>NS</sup>	-0,974 <sup>***</sup>	-0,669 <sup>**</sup>	-0,981 <sup>***</sup>	-0,460 <sup>NS</sup>	-0,986 <sup>***</sup>	0,977 <sup>***</sup>	-0,100 <sup>NS</sup>
K <sup>+</sup> hoja	0,518 <sup>*</sup>	0,002 <sup>NS</sup>	-0,859 <sup>***</sup>	-0,450 <sup>NS</sup>	0,603 <sup>**</sup>	-0,331 <sup>NS</sup>	0,959 <sup>***</sup>	0,633 <sup>**</sup>	0,936 <sup>***</sup>	0,418 <sup>NS</sup>	0,951 <sup>***</sup>	-0,916 <sup>***</sup>	0,162 <sup>NS</sup>
K <sup>+</sup> raíz	0,473 <sup>*</sup>	0,039 <sup>NS</sup>	-0,889 <sup>***</sup>	-0,498 <sup>*</sup>	0,582 <sup>*</sup>	-0,361 <sup>NS</sup>	0,979 <sup>***</sup>	0,655 <sup>**</sup>	0,975 <sup>***</sup>	0,429 <sup>NS</sup>	0,987 <sup>***</sup>	-0,959 <sup>***</sup>	0,111 <sup>NS</sup>
Ca <sup>2+</sup> hoja	-0,010 <sup>NS</sup>	-0,682 <sup>**</sup>	0,307 <sup>NS</sup>	0,873 <sup>***</sup>	-0,338 <sup>NS</sup>	0,932 <sup>***</sup>	-0,035 <sup>NS</sup>	-0,201 <sup>NS</sup>	-0,116 <sup>NS</sup>	-0,472 <sup>*</sup>	-0,172 <sup>NS</sup>	0,374 <sup>NS</sup>	0,304 <sup>NS</sup>
Ca <sup>2+</sup> raíz	-0,306 <sup>NS</sup>	-0,497 <sup>*</sup>	0,828 <sup>***</sup>	0,935 <sup>***</sup>	-0,586 <sup>*</sup>	0,864 <sup>***</sup>	-0,699 <sup>**</sup>	-0,597 <sup>**</sup>	-0,763 <sup>***</sup>	-0,614 <sup>*</sup>	-0,787 <sup>***</sup>	0,910 <sup>***</sup>	0,117 <sup>NS</sup>
K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> hoja	0,472 <sup>*</sup>	-0,076 <sup>NS</sup>	-0,845 <sup>***</sup>	-0,350 <sup>NS</sup>	0,522 <sup>*</sup>	-0,199 <sup>NS</sup>	0,979 <sup>***</sup>	0,626 <sup>**</sup>	0,963 <sup>***</sup>	0,349 <sup>NS</sup>	0,960 <sup>***</sup>	-0,898 <sup>***</sup>	0,175 <sup>NS</sup>
K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> raíz	0,474 <sup>*</sup>	-0,069 <sup>NS</sup>	-0,849 <sup>***</sup>	-0,361 <sup>NS</sup>	0,529 <sup>*</sup>	-0,211 <sup>NS</sup>	0,981 <sup>***</sup>	0,630 <sup>**</sup>	0,965 <sup>***</sup>	0,356 <sup>NS</sup>	0,962 <sup>***</sup>	-0,903 <sup>***</sup>	0,173 <sup>NS</sup>
C hoja	0,446 <sup>NS</sup>	0,078 <sup>NS</sup>	-0,912 <sup>***</sup>	-0,507 <sup>*</sup>	0,491 <sup>*</sup>	-0,365 <sup>NS</sup>	0,962 <sup>***</sup>	0,666 <sup>**</sup>	0,980 <sup>***</sup>	0,439 <sup>NS</sup>	0,948 <sup>***</sup>	-0,936 <sup>***</sup>	0,192 <sup>NS</sup>
C raíz	-0,243 <sup>NS</sup>	-0,517 <sup>*</sup>	0,629 <sup>**</sup>	0,923 <sup>***</sup>	-0,606 <sup>**</sup>	0,901 <sup>***</sup>	-0,485 <sup>*</sup>	-0,457 <sup>NS</sup>	-0,540 <sup>*</sup>	-0,571 <sup>*</sup>	-0,601 <sup>**</sup>	0,747 <sup>***</sup>	0,234 <sup>NS</sup>
N hoja	-0,498 <sup>*</sup>	0,024 <sup>NS</sup>	0,870 <sup>***</sup>	0,395 <sup>NS</sup>	-0,539 <sup>*</sup>	0,2575 <sup>NS</sup>	-0,982 <sup>***</sup>	-0,636 <sup>**</sup>	-0,963 <sup>***</sup>	-0,376 <sup>NS</sup>	-0,967 <sup>***</sup>	0,913 <sup>***</sup>	-0,187 <sup>NS</sup>
N raíz	0,492 <sup>*</sup>	0,099 <sup>NS</sup>	-0,837 <sup>***</sup>	-0,607 <sup>**</sup>	0,682 <sup>**</sup>	-0,490 <sup>*</sup>	0,907 <sup>***</sup>	0,629 <sup>**</sup>	0,906 <sup>***</sup>	0,481 <sup>*</sup>	0,932 <sup>***</sup>	-0,942 <sup>***</sup>	0,029 <sup>NS</sup>
C/N hoja	0,497 <sup>*</sup>	-0,031 <sup>NS</sup>	-0,866 <sup>***</sup>	-0,381 <sup>NS</sup>	0,537 <sup>*</sup>	-0,245 <sup>NS</sup>	0,979 <sup>***</sup>	0,633 <sup>**</sup>	0,959 <sup>***</sup>	0,368 <sup>NS</sup>	0,960 <sup>***</sup>	-0,904 <sup>***</sup>	0,202 <sup>NS</sup>
C/N raíz	-0,463 <sup>NS</sup>	-0,191 <sup>NS</sup>	0,832 <sup>***</sup>	0,701 <sup>**</sup>	-0,697 <sup>**</sup>	0,601 <sup>**</sup>	-0,860 <sup>***</sup>	-0,621 <sup>**</sup>	-0,872 <sup>***</sup>	-0,522 <sup>*</sup>	-0,908 <sup>***</sup>	0,946 <sup>***</sup>	0,026 <sup>NS</sup>
RWC	0,427 <sup>NS</sup>	0,408 <sup>NS</sup>	-0,716 <sup>***</sup>	-0,809 <sup>***</sup>	0,511 <sup>*</sup>	-0,753 <sup>***</sup>	0,586 <sup>*</sup>	0,572 <sup>*</sup>	0,692 <sup>**</sup>	0,586 <sup>*</sup>	0,624 <sup>**</sup>	-0,762 <sup>***</sup>	-0,003 <sup>NS</sup>
WCS	-0,360 <sup>NS</sup>	-0,298 <sup>NS</sup>	0,812 <sup>***</sup>	0,768 <sup>***</sup>	-0,500 <sup>*</sup>	0,637 <sup>**</sup>	-0,717 <sup>***</sup>	-0,567 <sup>*</sup>	-0,777 <sup>***</sup>	-0,434 <sup>NS</sup>	-0,741 <sup>***</sup>	0,834 <sup>***</sup>	0,118 <sup>NS</sup>
WSD	-0,427 <sup>NS</sup>	-0,408 <sup>NS</sup>	0,716 <sup>***</sup>	0,809 <sup>***</sup>	-0,511 <sup>*</sup>	0,753 <sup>***</sup>	-0,586 <sup>*</sup>	-0,572 <sup>*</sup>	-0,692 <sup>***</sup>	-0,586 <sup>*</sup>	-0,624 <sup>**</sup>	0,762 <sup>***</sup>	0,003 <sup>NS</sup>
S	-0,437 <sup>NS</sup>	-0,004 <sup>NS</sup>	0,878 <sup>***</sup>	0,455 <sup>NS</sup>	-0,543 <sup>*</sup>	0,296 <sup>NS</sup>	-0,974 <sup>***</sup>	-0,620 <sup>**</sup>	-0,958 <sup>***</sup>	-0,363 <sup>NS</sup>	-0,968 <sup>***</sup>	0,932 <sup>***</sup>	-0,108 <sup>NS</sup>

NS, \*, \*\*, \*\*\* indica diferencias no significativas o significativas para  $P \leq 0,05, 0,01, 0,001$ .

**Tabla 2.8.g.** Matriz de correlaciones entre las variables estudiadas.

	C <sub>a</sub> /C <sub>b</sub>	Azúcares	Aminoácidos	Prolina	GB	Proteína	Nitrato	Fenoles hoja	Fenoles raíz	Flavonoides hoja	Flavonoides raíz	DPPH'	Tiol
E	0,205 <sup>NS</sup>	0,167 <sup>NS</sup>	-0,851 <sup>***</sup>	-0,608 <sup>**</sup>	0,313 <sup>NS</sup>	-0,456 <sup>NS</sup>	0,807 <sup>***</sup>	0,690 <sup>**</sup>	0,864 <sup>***</sup>	0,488 <sup>*</sup>	0,873 <sup>***</sup>	-0,888 <sup>***</sup>	-0,036 <sup>NS</sup>
P <sub>n</sub>	0,357 <sup>NS</sup>	0,508 <sup>*</sup>	-0,692 <sup>**</sup>	-0,835 <sup>***</sup>	0,499 <sup>*</sup>	-0,846 <sup>***</sup>	0,420 <sup>NS</sup>	0,353 <sup>NS</sup>	0,458 <sup>NS</sup>	0,332 <sup>NS</sup>	0,493 <sup>*</sup>	-0,634 <sup>**</sup>	-0,283 <sup>NS</sup>
g <sub>s</sub>	0,443 <sup>NS</sup>	0,021 <sup>NS</sup>	-0,903 <sup>***</sup>	-0,469 <sup>*</sup>	0,531 <sup>*</sup>	-0,318 <sup>NS</sup>	0,959 <sup>***</sup>	0,636 <sup>**</sup>	0,938 <sup>***</sup>	0,358 <sup>NS</sup>	0,951 <sup>***</sup>	-0,915 <sup>***</sup>	0,084 <sup>NS</sup>
Ci	-0,556 <sup>*</sup>	-0,438 <sup>NS</sup>	0,559 <sup>*</sup>	0,590 <sup>**</sup>	-0,701 <sup>**</sup>	0,605 <sup>**</sup>	-0,422 <sup>NS</sup>	-0,120 <sup>NS</sup>	-0,418 <sup>NS</sup>	-0,225 <sup>NS</sup>	-0,393 <sup>NS</sup>	0,529 <sup>*</sup>	-0,034 <sup>NS</sup>
PNUE	0,423 <sup>NS</sup>	0,372 <sup>NS</sup>	-0,888 <sup>***</sup>	-0,833 <sup>***</sup>	0,584 <sup>*</sup>	-0,762 <sup>***</sup>	0,731 <sup>***</sup>	0,554 <sup>*</sup>	0,768 <sup>***</sup>	0,445 <sup>NS</sup>	0,800 <sup>NS</sup>	-0,894 <sup>***</sup>	-0,202 <sup>NS</sup>
C <sub>a</sub>	-0,241 <sup>NS</sup>	0,597 <sup>**</sup>	-0,273 <sup>NS</sup>	-0,855 <sup>***</sup>	0,154 <sup>NS</sup>	-0,859 <sup>***</sup>	0,016 <sup>NS</sup>	0,310 <sup>NS</sup>	0,135 <sup>NS</sup>	0,506 <sup>*</sup>	0,157 <sup>NS</sup>	-0,352 <sup>NS</sup>	-0,287 <sup>NS</sup>
C <sub>b</sub>	-0,572 <sup>*</sup>	0,457 <sup>NS</sup>	-0,081 <sup>NS</sup>	-0,664 <sup>**</sup>	-0,096 <sup>NS</sup>	-0,638 <sup>**</sup>	-0,151 <sup>NS</sup>	0,230 <sup>NS</sup>	-0,033 <sup>NS</sup>	0,346 <sup>NS</sup>	-0,001 <sup>NS</sup>	-0,154 <sup>NS</sup>	-0,415 <sup>NS</sup>
Car	-0,238 <sup>NS</sup>	0,550 <sup>*</sup>	-0,327 <sup>NS</sup>	-0,859 <sup>***</sup>	0,178 <sup>NS</sup>	-0,844 <sup>***</sup>	0,083 <sup>NS</sup>	0,341 <sup>NS</sup>	0,191 <sup>NS</sup>	0,478 <sup>*</sup>	0,224 <sup>NS</sup>	-0,402 <sup>NS</sup>	-0,315 <sup>NS</sup>
C <sub>a+b</sub>	-0,371 <sup>NS</sup>	0,554 <sup>*</sup>	-0,204 <sup>NS</sup>	-0,796 <sup>***</sup>	0,061 <sup>NS</sup>	-0,789 <sup>***</sup>	-0,047 <sup>NS</sup>	0,285 <sup>NS</sup>	0,073 <sup>NS</sup>	0,454 <sup>NS</sup>	0,099 <sup>NS</sup>	-0,283 <sup>NS</sup>	-0,341 <sup>NS</sup>
C <sub>a+b</sub> /Car	-0,772 <sup>***</sup>	0,108 <sup>NS</sup>	0,692 <sup>**</sup>	0,258 <sup>NS</sup>	-0,644 <sup>**</sup>	0,208 <sup>NS</sup>	-0,755 <sup>***</sup>	-0,298 <sup>NS</sup>	-0,667 <sup>**</sup>	-0,062 <sup>NS</sup>	-0,710 <sup>**</sup>	0,649 <sup>**</sup>	-0,153 <sup>NS</sup>
C <sub>a</sub> /C <sub>b</sub>		0,087 <sup>NS</sup>	-0,485 <sup>*</sup>	-0,161 <sup>NS</sup>	0,600 <sup>**</sup>	-0,226 <sup>NS</sup>	0,512 <sup>*</sup>	0,117 <sup>NS</sup>	0,450 <sup>NS</sup>	0,169 <sup>NS</sup>	0,428 <sup>NS</sup>	-0,435 <sup>NS</sup>	0,428 <sup>NS</sup>
Azúcares			-0,261 <sup>NS</sup>	-0,658 <sup>**</sup>	0,112 <sup>NS</sup>	-0,755 <sup>***</sup>	-0,019 <sup>NS</sup>	-0,043 <sup>NS</sup>	0,045 <sup>NS</sup>	0,316 <sup>NS</sup>	0,044 <sup>NS</sup>	-0,233 <sup>NS</sup>	-0,172 <sup>NS</sup>
Aminoácidos				0,636 <sup>**</sup>	-0,498 <sup>*</sup>	0,541 <sup>*</sup>	-0,890 <sup>***</sup>	-0,622 <sup>**</sup>	-0,888 <sup>***</sup>	-0,376 <sup>NS</sup>	-0,906 <sup>***</sup>	0,930 <sup>**</sup>	0,031 <sup>NS</sup>
Prolina					-0,456 <sup>NS</sup>	0,961 <sup>***</sup>	-0,426 <sup>NS</sup>	-0,449 <sup>NS</sup>	-0,517 <sup>*</sup>	-0,597 <sup>**</sup>	-0,531 <sup>*</sup>	0,717 <sup>***</sup>	0,201 <sup>NS</sup>
GB						-0,416 <sup>NS</sup>	0,618 <sup>**</sup>	0,172 <sup>NS</sup>	0,562 <sup>*</sup>	0,192 <sup>NS</sup>	0,581 <sup>*</sup>	-0,620 <sup>**</sup>	-0,023 <sup>NS</sup>
Proteína							-0,284 <sup>NS</sup>	-0,352 <sup>NS</sup>	-0,375 <sup>NS</sup>	-0,605 <sup>**</sup>	-0,392 <sup>NS</sup>	0,597 <sup>**</sup>	0,137 <sup>NS</sup>
Nitrato								0,585 <sup>*</sup>	0,964 <sup>***</sup>	0,298 <sup>NS</sup>	0,974 <sup>***</sup>	-0,926 <sup>***</sup>	0,094 <sup>NS</sup>
Fenoles hoja									0,704 <sup>**</sup>	0,777 <sup>***</sup>	0,652 <sup>**</sup>	-0,669 <sup>**</sup>	0,113 <sup>NS</sup>
Fenoles raíz										0,479 <sup>*</sup>	0,961 <sup>***</sup>	-0,947 <sup>***</sup>	0,143 <sup>NS</sup>
Flavonoides hoja											0,385 <sup>NS</sup>	-0,518 <sup>*</sup>	0,359 <sup>NS</sup>
Flavonoides raíz												-0,965 <sup>***</sup>	-0,002 <sup>NS</sup>
DPPH'													-0,007 <sup>NS</sup>

NS, \*, \*\*, \*\*\* indica diferencias no significativas o significativas para  $P \leq 0,05, 0,01, 0,001$ .



## **2.2. Discusión**

La muerte de las plantas del cv. Picual después de 7 semanas crecidas con 200 mM NaCl fue verificada en experimentos posteriores presentados en este trabajo (pág. 239). En contraste, en plantas de mayor edad (6 meses), crecidas en las mismas condiciones, no se detectó muerte por salinidad (pág. 148), esto puede deberse al estado fisiológico de la planta en el momento de aplicar el NaCl. De forma similar, en plantas de 12 meses de otros cultivares de olivo no se detectó mortandad (Chartzoulakis et al., 2002; Kchaou et al., 2010).

El descenso del crecimiento en el cv. Picual por efecto del estrés salino se ha verificado en todos los parámetros determinados, con todos los niveles de NaCl ensayados. Resultados similares han sido descritos para otros cultivares de olivo (Chartzoulakis, 2005; Vigo et al., 2005; Perica et al., 2008; Kchaou et al. 2010, 2013; Bader et al., 2015). El descenso de la acumulación de materia seca en plantas con 100 y 200 mM NaCl se debió esencialmente al descenso de la acumulación de materia en la parte aérea (tallo + hoja), lo que se manifestó por un incremento de la relación R/PA. Esto confirma los resultados descritos por Melgar et al. (2007) para el cv. Arbequina, descrito como tolerante a la salinidad (Benlloch et al., 1994). Sin embargo, con niveles de 50 mM de NaCl durante 13 semanas, raíz y parte aérea mostraron una sensibilidad similar, por lo que la relación R/PA se mantuvo en la misma razón que en plantas sin sal. Perica et al. (2008) describen resultados similares en plantas de 1 año de otros cultivares de olivo, tolerantes ('Frantoio'), moderadamente tolerantes ('Manzanilla') y sensibles ('Leccino') a la salinidad, y cultivares autóctonos de Croacia no clasificados por su tolerancia, crecidos con 66 mM NaCl durante 12 semanas. Además, es importante destacar que, un comportamiento similar de la relación R/PA fue descrito

por Chartzoulakis et al. (2002) en plantas de 1 año, de 6 cultivares griegos con distinto grado de tolerancia a la salinidad, tratadas con 50, 100 y 200 mM NaCl durante 8 semanas. Por otra parte, Perica et al. (2008) describen mayor sensibilidad a la salinidad de la elongación de tallo que del número de hojas, al igual que ocurre con el cv. Picual (Tabla 2.1). Otros autores relacionan esta mayor sensibilidad de la elongación de tallo a una mayor acumulación de Na<sup>+</sup> en el tallo que en hoja (Tattini, 1994; Chartzoulakis et al., 2002; Perica et al., 2008). Munns and Tester (2008) diferenciaron dos fases para explicar la respuesta del crecimiento a la salinidad. En la primera fase, la reducción del crecimiento se debe al déficit hídrico que tiene lugar inmediatamente después de la aplicación de la sal, mientras que en la segunda fase, se debe a la acumulación de iones salinos en los tejidos a niveles tóxicos. Para que se dé esta segunda fase se necesita un período de tiempo que depende de la intensidad del estrés y de la tolerancia a la salinidad. Nuestros resultados verifican esta afirmación, ya que, cuanto menor es el nivel de sal, mayor tiempo de exposición es necesario para producir un mismo descenso de materia seca. Por ejemplo, para descender el PS total un 50% fueron necesarias 9,5 semanas con 100 mM, mientras que, con 50 mM fueron necesarias 7,1 semanas más (16,6 semanas).

Según los resultados obtenidos, el AF total mostró una mayor correlación positiva con el número de hojas ( $r=0,877$ ;  $P\leq 0,001$ ) que con el AFH ( $r=0,590$ ;  $P\leq 0,01$ ). Por tanto, el descenso del AF total por la salinidad se debió principalmente al descenso del inicio de nuevas hojas más que el descenso del tamaño final de la hoja, al igual que describen Vigo et al. (2005) para los cvs. Manzanilla de Sevilla y Kalamata, sensible y tolerante a la salinidad, respectivamente. En plantas con 200 mM NaCl, se observó caída de hoja, al igual que describen Kchaou et al. (2010) en cultivares sensibles y

tolerantes a la salinidad. Sin embargo, estos autores también describen caída de hoja con 100 mM NaCl en todos los cultivares, lo que contrasta con los datos obtenidos en nuestro experimento para el cv. Picual. Bader et al. (2015) afirman que el impacto que se produce en la planta por la salinidad puede conducir a su completa defoliación.

Según Chartzoulakis (2005) el AF total es más sensible a la salinidad que el PS total, lo cual coincide con lo observado con 100 y 200 mM NaCl en el cv. Picual (Tabla 2.1). Resultados similares fueron descritos por Melgar et al. (2008) en plantas de 'Arbequina' tratadas con 100 mM NaCl.

El descenso de la RGR por la salinidad se debió más al descenso de su componente fisiológico (NAR) que a su componente morfológico (LAR), que no descendió con 50 ni con 100 mM NaCl. Según Zhao et al. (2007), NAR es considerado un índice de la capacidad fotosintética de la planta por unidad de área foliar, por tanto, la inhibición de NAR puede estar relacionada con un descenso en la tasa fotosintética (Cheeseman, 1988) o con un aumento en la respiración (Schwarz and Gale, 1981). En nuestro experimento la fotosíntesis por planta ( $P_n \times AF$  total) descendió por la salinidad, mientras que en plantas control fue 23,54 nmol CO<sub>2</sub> planta<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, en plantas con 50 mM fue 15,95 nmol CO<sub>2</sub> planta<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> y en plantas con 100 mM NaCl fue 5,01 nmol CO<sub>2</sub> planta<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. Sin embargo, la fotosíntesis por área foliar ( $P_n$ ) no descendió con 50 mM NaCl, por lo que con este nivel de sal el descenso de RGR se podría asociar a un aumento de la respiración en respuesta al estrés salino.

En el cv. Picual, el C de la hoja descendió por la salinidad (Tabla 2.2). Resultados similares fueron descritos por Cordovilla et al. (2014) en plantas de tomillo sometidas a estrés salino (50 y 100 mM NaCl). Además, en consonancia con lo descrito

por estos autores para tomillo, los niveles de C en el cv. Picual aumentaron en raíz con 100 mM NaCl. En plantas con estrés hídrico, el descenso de C en hoja junto con su incremento en raíz, podría justificarse por la traslocación de C desde hoja a raíz (Hunt et al., 1996). De hecho, en el cv. Picual se detectó una correlación negativa entre el C de raíz y de hoja ( $r=-0,488$ ;  $P\leq 0,05$ ) (Tabla 2.8). Además, con 100 mM NaCl el descenso del C en hoja (2%) fue igual al aumento del C en raíz (2%).

La reducción del crecimiento de las plantas por la salinidad se ha asociado a una menor capacidad para mantener una concentración adecuada de nutrientes esenciales (Zidan et al., 1992; Cordovilla et al., 1995). Según Lewis (1986), el exceso de NaCl interfiere en la adquisición y utilización de N. En nuestro experimento, la salinidad trajo consigo un incremento del contenido de N en hoja a la vez que descendió en raíz (Tabla 2.2). El incremento de N en los tejidos puede deberse a mayor inhibición del crecimiento que de la absorción por la raíz (Loupassaki et al., 2002). De hecho, en el cv. Picual el PS de hoja descendió por la salinidad en mayor proporción que el de raíz (Tabla 2.1). Por otra parte, el aumento de N en un tejido en condiciones de estrés salino podría asociarse a la acumulación de compuestos nitrogenados (Parida and Das, 2005). En nuestro experimento, se detectó acúmulo de aminoácidos, a la vez que descendió la concentración de nitrato y de glicina betaína por la salinidad (Tabla 2.7). El descenso de la concentración de nitrato pudo deberse a la inhibición de su absorción por el  $\text{Cl}^-$  (White and Broadley, 2001).

El contenido de  $\text{Na}^+$  en hoja y raíz se correlacionó negativamente con todos los parámetros de crecimiento, excepto con la relación R/PA y la LMA, con los que se correlacionó positivamente, y con la LAR, con la que no se correlacionó (Tabla 2.8). La correlación más alta detectada fue con el PS de hoja ( $r=-0,962$  ó  $-0,943$ , para  $\text{Na}^+$  de

hoja y raíz, respectivamente;  $P \leq 0,001$ ). Por tanto, el crecimiento descendió por el acúmulo de  $\text{Na}^+$  en los tejidos. Además se afectó más parte aérea que raíz. Perica et al. (2008) también describieron una correlación negativa entre el contenido de  $\text{Na}^+$  en hoja y el PS de hoja, tallo y raíz, la elongación de tallo y el número de hojas para otros cultivares de olivo crecidos con 33, 66, 100 y 166 mM NaCl. Además, Kchaou et al. (2010) encontraron una correlación negativa entre el  $\text{Na}^+$  de hoja y el AF total en un ensayo realizado con los cvs. Chemlali, Chetoui, Koroneiki, Arbequina y Arbosana crecidos con 50, 100 y 200 mM NaCl.

En estudios previos, se han asociado niveles superiores al 0,4% de  $\text{Na}^+$  en hoja de olivo con reducción del crecimiento y daño en hoja (Klein et al., 1994; Tattini et al., 1992; Kchaou et al., 2010). En el cv. Picual estos niveles se superaron con todas las concentraciones de NaCl tras 13 semanas de tratamiento (Tabla 2.3). Bader et al. (2015) describieron niveles superiores al 0,4% de  $\text{Na}^+$  en cultivares sensibles a la salinidad ('Meski' y 'Ascolana') crecidos con 100 y 150 mM NaCl, mientras que en el cv. Picholine, tolerante a la salinidad, fue inferior. En contraste, Chartzoulakis et al. (2002) encontraron niveles inferiores al 0,4% de  $\text{Na}^+$  en hoja de distintos cultivares griegos tolerantes ('Kalamata', 'Kothreiki' y 'Megaritiki') y moderadamente tolerantes ('Koroneiki', 'Mastoidis' y 'Amphissis') a la salinidad crecidos con 100 mM NaCl. En el cv. Picual, aunque los niveles de  $\text{Na}^+$  en hoja fueron superiores al 0,4%, el porcentaje de  $\text{Na}^+$  en hoja respecto a la raíz con 100 mM NaCl (Figura 2.9) se encontró en niveles inferiores a los descritos por Bader et al. (2015) para los cultivares sensibles a la salinidad.

En estudios previos, el cv. Picual ha sido descrito como tolerante a la salinidad en función de la inhibición del crecimiento con 100 mM NaCl (Marín et al., 1995). Sin

embargo, según Greenway and Munns (1980), la tolerancia a la salinidad de las glicofitas está asociada a la capacidad de limitar la absorción y/o transporte de iones salinos desde la rizosfera a la parte aérea. Posteriormente, Tattini et al. (1994) y Chartzoulakis (2005) indicaron que la tolerancia en olivo se asocia con un mecanismo efectivo de exclusión de iones y de retención de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en la raíz. En el caso del cv. Picual, se acumuló más  $\text{Na}^+$  en raíz que en hoja (Figura 2.9). Por tanto, nuestros resultados confirman la conclusión de Marín et al. (1995) con el cv. Picual. Además, en el cv. Picual con 50 mM se acumuló más  $\text{Na}^+$  en raíz (68% más que en hoja) que con 100 mM (63% más que en hoja). Chartzoulakis et al. (2005) comentan que con 25 y 50 mM NaCl la exclusión de  $\text{Na}^+$  puede ser efectiva independientemente de la tolerancia del cultivar, y que con 100 y 200 mM NaCl, el  $\text{Na}^+$  se transporta y acumula en la parte aérea, apareciendo síntomas de toxicidad en los cultivares que no son tolerantes a la salinidad. Sin embargo Kchaou et al. (2010), describieron diferente capacidad de exclusión de  $\text{Na}^+$  con 50 mM NaCl entre distintos cultivares, siendo efectivo en los más tolerantes.

El  $\text{Na}^+$  de hoja y raíz se correlacionó negativamente con el  $\text{K}^+$  de hoja y raíz y positivamente con el  $\text{Ca}^{2+}$  de raíz (Tabla 2.8). Por tanto, el  $\text{K}^+$  descendió en hoja y raíz por la salinidad (Tabla 2.3), lo que pudo deberse a la interferencia del  $\text{Na}^+$  en la absorción del  $\text{K}^+$  a nivel de raíz (Rus et al., 2001; Bandeh-hagh et al., 2008). Bader et al. (2015) también describieron un descenso del  $\text{K}^+$  en hoja y raíz del cv. Ascolana, sensible a la salinidad. Sin embargo, estos mismos autores describieron un descenso del  $\text{K}^+$  por la salinidad sólo en raíz de otro cultivar sensible ('Meski') y tolerante ('Picholine'). De igual forma, Vigo et al. (2005) detectaron un descenso del  $\text{K}^+$  por la salinidad en hoja y raíz de 'Chondrolia Chalkidikis' y 'Manzanilla de Sevilla'. Según

estos autores, dichos cultivares son más sensibles que el cv. Kalamata (tolerante), en el cual sólo se detectó un descenso del  $K^+$  en raíz. En otros cultivos, se relaciona la capacidad de retención del  $K^+$  en raíz con la tolerancia a la salinidad para distintos cultivares (Smethurst et al., 2008; Sun et al., 2009).

El aumento de  $Na^+$  y descenso de  $K^+$  trajo consigo un descenso de la relación  $K^+/Na^+$  (Tabla 2.3). Tattini et al. (2008) afirman que la tolerancia del olivo a la salinidad se basa en la capacidad de exclusión de la sal de la raíz y en su habilidad para mantener una apropiada relación  $K^+/Na^+$  en los tejidos en crecimiento. De hecho, la relación  $K^+/Na^+$  es considerada por algunos autores un índice de toxicidad (Chaparzadeh et al., 2003), puesto que el  $Na^+$  compite con el  $K^+$  por la unión a enzimas e inhibe su actividad (Maathuis, 2009). Bader et al. (2015), describieron bajos niveles de la relación  $K^+/Na^+$  en hoja de cultivares sensibles a la salinidad y altos en un cultivar tolerante. Igualmente, Chartzoulakis et al. (2005) describieron niveles más altos de  $K^+/Na^+$  en los cultivares más tolerantes. Sin embargo, Perica et al. (2008) detectaron niveles similares de  $K^+/Na^+$  en cultivares tolerantes y sensibles a la salinidad. Estos autores describen una reducción de la relación  $K^+/Na^+$  de hoja para 'Frantoio' (tolerante) similar a la descrita para el cv. Picual en este trabajo. Igualmente, Melgar et al. (2007) describieron un descenso de la relación  $K^+/Na^+$  en hoja de plantas enraizadas de 'Arbequina', también descrito como tolerante a la salinidad (Chartzoulakis, 2005).

El exceso de  $Na^+$  desplaza al  $Ca^{2+}$  de la membrana, lo que implica un cambio en la selectividad de absorción de  $K^+$  frente a  $Na^+$  (Cramer et al., 1985). Por tanto, el  $Ca^{2+}$  juega un importante papel en la tolerancia a la salinidad ya que limita el efecto tóxico del  $Na^+$  a nivel de membrana. En condiciones de estrés salino, el  $Ca^{2+}$  aumentó principalmente en raíz (Tabla 2.3). De forma similar, Bader et al. (2015) describieron un

aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  por la salinidad en raíz, del cv. Ascolana (sensible); aunque estas pautas no se repitieron para los cvs. Picholine (tolerante) y Meski (sensible). Por otra parte, Melgar et al. (2007) no describieron aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  en hoja de plantas enraizadas del cv. Arbequina con 100 mM NaCl, al contrario de lo que ocurrió en el cv. Picual. Vigo et al. (2005), detectaron un descenso del  $\text{Ca}^{2+}$  por la salinidad en hoja y raíz de los cvs. Chondrolia Chalkidikis y Manzanilla de Sevilla, mientras que, en el cv. Kalamata, descrito por estos autores como el más tolerante de los tres, sólo se detectó este descenso en hoja.

En el cv. Picual, el RWC sólo descendió con niveles elevados de sal (100 mM NaCl) (Tabla 2.4). Resultados similares fueron descritos por Ben Ahmed et al. (2009) para el cultivar tolerante 'Chemlali'. Esto indica una pérdida de turgencia de la hoja, lo que limitaría la expansión celular (Katerji et al., 1997). De hecho, el RWC se correlacionó positivamente con los parámetros de crecimiento en expansión y de acumulación de materia seca, al igual que con la  $P_n$  (Tabla 2.8). De hecho, el RWC y la  $P_n$  sólo descendieron con 100 mM NaCl. En consonancia con estos resultados, Lawlor and Cornic (2002), afirman que, en plantas superiores, el descenso de la  $P_n$  y el RWC están asociados. A pesar del descenso del RWC, aumentó la S de la hoja por la salinidad, lo que puede deberse a la mayor sensibilidad del crecimiento en expansión de la hoja que la acumulación de materia seca.

Una vez que el  $\text{Na}^+$  llega al xilema en la raíz, la corriente de la transpiración lo transporta hasta la parte aérea, de donde es difícil recircular de nuevo hasta la raíz, puesto que el movimiento del  $\text{Na}^+$  en el floema se hace en muy pequeñas cantidades (Munns et al., 2006). Por tanto, el descenso de la E constituye un mecanismo para reducir la carga de iones en plantas que crecen en medio salino (Romero-Aranda et al.,



2001). En el cv. Picual, el descenso de la E fue proporcional al nivel de NaCl (Tabla 2.4). De hecho, la E presentó una correlación negativa elevada con los niveles de Na<sup>+</sup> en hoja y raíz ( $r=-0,893$  ó  $-0,883$ , respectivamente;  $P\leq 0,001$ ). En consonancia con estos resultados, Melgar et al. (2008) describieron un descenso de la E en plantas de 6 meses del cv. Picual crecidas con 100 mM NaCl, en contraste, en plantas del cv. Koroneiki, considerado menos tolerante, no descendió.

La  $P_n$ , junto con el crecimiento, se encuentran entre los principales procesos afectados por la salinidad (Munns et al., 2006). Este efecto puede deberse a la menor disponibilidad del CO<sub>2</sub> por descenso de la difusión a través de los estomas y mesófilo (Flexas et al., 2004, 2007) y a la acumulación de iones en los tejidos (Chartzoulakis et al., 2002). En nuestro caso, ambos tratamientos salinos redujeron la  $g_s$ , pero sólo con 100 mM se redujo la  $P_n$  (Tabla 2.5). Remorini et al. (2009), también describen un descenso de la  $P_n$  y la  $g_s$  con 125 mM NaCl en el cv. Cipressino. Según Chaves et al. (2009), bajo estrés moderado ( $\approx 50$  mM), un descenso de la  $g_s$  puede tener un efecto protector ya que permite a la planta ahorrar agua y mejorar la eficiencia en su uso. En relación a la  $P_n$ , Chartzoulakis et al. (2002) describieron una respuesta similar en cultivares de olivo moderadamente tolerantes ('Amphissis' y 'Koroneiki') y tolerantes ('Kothreiki' y 'Kalamata') a la salinidad; según estos autores, con 100 y 200 mM NaCl (100 y 200 mM) la  $P_n$  descendió, mientras que con 50 mM no se afectó. En contraste, estos mismos autores describen un descenso de la  $P_n$  con 50, 100 y 200 mM NaCl en los cvs. Mastoidis (moderadamente tolerante) y Megaritiki (tolerante). De forma similar, Kchaou et al. (2013) describieron un descenso de la  $P_n$  con 50, 100 y 200 mM NaCl en los cvs. Chetoui (sensible), Koroneiki (moderadamente tolerante), Arbequina (tolerante) y Arbosana (moderadamente tolerante); mientras que en el cv. Chemlali (tolerante), la

$P_n$  sólo se afectó con 200 mM. Según Farquhar and Sharkey (1982), cuando la  $g_s$  es la principal responsable del descenso de la  $P_n$  se detecta un descenso de la  $C_i$ . Sin embargo, en nuestro ensayo la  $C_i$  aumentó por la salinidad (Tabla 2.5). Resultados similares han sido descritos para distintos genotipos de cítricos (Lopez-Climent et al., 2008). Por tanto, el sistema fotosintético es diferentemente afectado bajo estas condiciones adversas, y limitaciones no estomáticas son también importantes con 100 mM NaCl. Por otro lado, el aumento de la densidad de la hoja (LMA; tabla 2.8) con 100 mM, podría limitar la difusión del  $CO_2$  a través del mesófilo (desde la cavidad subestomática hasta los cloroplastos) (Parkhurst, 1994, Syvertsen et al., 1995), afirmación que se justifica en nuestros datos por la correlación negativa existente entre la LMA y la  $P_n$  ( $r=-0,658$ ;  $P\leq 0,01$ ). Además, en el cv. Picual la  $P_n$  se correlacionó negativamente con el  $Na^+$  de la hoja ( $r=-0,566$ ;  $P\leq 0,05$ ) y positivamente con los pigmentos fotosintéticos. Por lo que, el descenso de la  $P_n$  también pudo deberse a un efecto directo de los iones salinos sobre las células del mesófilo y al descenso de la  $C_{a+b}$  (100 mM NaCl). En estudios realizados por otros autores, también se relacionó el descenso de la  $P_n$  con el de clorofila; con 100 y 200 mM en el cv. Chemlali (tolerante) (Ben Ahmed et al., 2010), y con 100 y 125 mM en los cvs. Arbequina (tolerante), Koroneiki (moderadamente tolerante) y Ascolana (sensible), y con 75 mM NaCl en Arbequina (tolerante) (Petridis and Therios, 2012). En contraste, Melgar et al. (2008) no observaron ningún efecto con 100 mM en los cvs. Picual y Koroneiki. Según Kchaou et al. (2013), la  $C_{a+b}$  no mostró una respuesta clara a la salinidad ya que aumentó o descendió en función del cultivar ('Chemlali', 'Chetoui', 'Koroneiki', 'Arbequina' y 'Arbosana').

El descenso de la  $P_n$  y el aumento del N en hoja en condiciones de estrés salino,

trajo consigo un aumento de la PNUE, al igual que se ha descrito para otras especies de plantas (Cardona-Olarte et al., 2013).

En las plantas en las que la exclusión de iones es el principal mecanismo de tolerancia a la salinidad, la sal debe mantenerse fuera de los meristemos (principalmente de la parte aérea) y de las hojas que se están expandiendo y fotosintetizando. Para ello, acumulan solutos orgánicos y/o iones inorgánicos, en sus células; de esta forma, descienden su potencial hídrico sin descenso de la turgencia de la célula (Ashraf, 2004). Entre los solutos determinados en el cv. Picual, sólo los aminoácidos incrementaron en función del nivel de NaCl ensayado. Por tanto, la osmorregulación por acúmulo de aminoácidos podría ser una estrategia predominante del cv. Picual para adaptarse al estrés salino hasta niveles de 100 mM NaCl. Resultados similares han sido descritos para otras especies de glicofitas (Di Martino et al., 2003; Chen et al., 2007).

En relación a otros solutos determinados, la respuesta dependió del nivel de NaCl; así, prolina y proteína soluble se acumularon sólo con 100 mM NaCl (Tabla 2.7). La acumulación de proteína soluble ha sido asociada por otros autores con la formación de proteínas inducidas por el estrés salino (LEA), las cuales protegen la estructura y componentes celulares (Sairam and Tyagi, 2004). La prolina además de ser un soluto osmóticamente activo, interviene en la eliminación de radicales libres, estabiliza las estructuras subcelulares y regula el potencial redox en condiciones de estrés (Tuteja, 2007). La acumulación de prolina en hoja también ha sido descrita por Petridis and Therios (2012) en cultivares de olivo tolerantes ('Arbequina'), moderadamente tolerantes ('Zard' y 'Koroneiki') y sensibles ('Acolana'). Aunque según los resultados descritos por estos autores, el nivel de NaCl al cual se acumuló prolina varió entre los cultivares. Además, Ben Ahmed et al. (2010) describieron acumulación de prolina en el

cv. Chemlali (tolerante) con 100 y 200 mM NaCl. Estos autores también detectaron acúmulo de azúcares solubles en hoja, en contraste a lo observado en el cv. Picual (Tabla 2.7)

Una de las principales consecuencias del estrés salino es el estrés oxidativo producido por el aumento de las especies reactivas del oxígeno (ROS) causantes de daño en las membranas y otras estructuras celulares (Goreta et al., 2007). En condiciones normales, las ROS son eliminadas por varios mecanismos de defensa antioxidantes, existiendo un equilibrio entre la producción y eliminación de moléculas ROS (Foyer and Noctor, 2005). Este equilibrio se perturba por el estrés salino, incrementándose las ROS, lo que lleva a la planta a producir antioxidantes para eliminarlas (Grace, 2005). Entre estos antioxidantes, se incluyen fenoles y flavonoides (Blokhina et al., 2003; Løvdaal et al., 2010). En general, se ha descrito que en las plantas la síntesis de fenoles y su acumulación es estimulada en respuesta a un estrés biótico o abiótico (Dixon and Paiva, 1995; Naczki and Shahidi, 2004), como el estrés salino (Navarro et al., 2006). Sin embargo, nuestros resultados mostraron un descenso del contenido de fenoles y flavonoides con la salinidad (50 mM y 100 mM NaCl) en todos los órganos estudiados, excepto en hoja con 50 mM. En contraste, Petridis et al. (2012) detectaron acumulación de fenoles en hoja y raíz de varios cultivares de olivo con distinto grado de tolerancia a la salinidad; estos autores, describen aumento de fenoles en hoja con 75 y 125 mM NaCl y en raíz con 75 mM, excepto en 'Arbequina', el único tolerante que utilizaron, en el cual en hoja sólo se acumularon fenoles con 125 mM NaCl y en raíz no se acumuló.

Puesto que, en el cv. Picual, los compuestos fenólicos no intervinieron en la destrucción de radicales libres en condiciones de estrés salino, determinamos la

capacidad antioxidante del extracto de hoja, utilizando DPPH<sup>•</sup> (Figura 2.13). Los resultados mostraron un descenso de la capacidad antioxidante conforme aumentó el nivel de NaCl, al contrario de lo que describe Demiral et al. (2011) para el cv. Gemlik.

### 3. Importancia de los reguladores del crecimiento en la respuesta de estaquillas enraizadas de *O. europaea* cv. Picual frente al estrés salino

#### 3.1. Resultados

##### 3.1.1. Crecimiento vegetativo

Los parámetros relacionados con el crecimiento de la planta, peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco (PS) de raíz, relación raíz/parte aérea (R/PA), elongación de tallo, área foliar (AF) total y número de hojas se detallan en las tablas 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 y 3.5.

Según el análisis estadístico (Tabla 3.1), la principal fuente de variación para el PSPA y el PS de raíz a las 3 semanas de tratamiento fue el regulador ( $\eta^2=0,253$  y  $0,422$ , respectivamente;  $P\leq 0,001$ ), seguido en ambos casos por la salinidad ( $\eta^2=0,170$  y  $0,253$ , respectivamente;  $P\leq 0,001$ ) y su interacción ( $\eta^2=0,104$  y  $0,064$ , respectivamente;  $P\leq 0,001$ ); mientras que, a las 6 semanas, el PSPA se afectó principalmente por la interacción ( $\eta^2=0,225$ ;  $P\leq 0,001$ ), seguido de cerca por el regulador y la salinidad ( $\eta^2=0,176$  y  $0,169$ , respectivamente;  $P\leq 0,001$ ). En cambio, el PS de raíz se afectó principalmente por el regulador y la salinidad ( $\eta^2=0,230$  y  $0,278$ , respectivamente;  $P\leq 0,001$ ) y en menor medida por su interacción ( $\eta^2=0,145$ ;  $P\leq 0,001$ ).

Según los valores medios para cada regulador, en plantas pretratadas con QUIN y GA<sub>3</sub> se observaron los valores más altos de PSPA a las 3 y 6 semanas de exposición a la sal (Tabla 3.3). Los pretratamientos con AIA y AS no tuvieron un efecto significativo ( $P\leq 0,05$ ) en ninguna de las recogidas. Atendiendo al nivel de sal (100 y 200 mM NaCl),

a las 3 semanas, el PSPA se redujo un 15% con 100 mM y un 26% con 200 mM. A las 6 semanas, ambos niveles de sal redujeron el PSPA por igual ( $\approx 21\%$ ).

**Tabla 3.1.** Valor  $F$  y coeficiente de determinación ( $\eta^2$ ) para regulador, salinidad y su interacción (regulador x salinidad), del peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco (PS) de raíz, relación raíz/parte aérea (R/PA), elongación de tallo, área foliar (AF) total y número de hojas de plantas de olivo pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 3 semanas.

Parámetro	Fuente de variación					
	Regulador		Salinidad		Regulador x Salinidad	
	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$
PSPA	10,07 <sup>***</sup>	0,253	13,55 <sup>***</sup>	0,170	2,07 <sup>*</sup>	0,104
PS raíz	30,43 <sup>***</sup>	0,422	36,43 <sup>***</sup>	0,253	2,31 <sup>*</sup>	0,064
R/PA	8,35 <sup>***</sup>	0,259	5,40 <sup>**</sup>	0,084	1,22 <sup>NS</sup>	-
Elongación	5,45 <sup>***</sup>	0,100	51,30 <sup>***</sup>	0,473	2,21 <sup>*</sup>	0,081
AF total	5,94 <sup>***</sup>	0,146	22,89 <sup>***</sup>	0,281	2,26 <sup>*</sup>	0,111
Nº hojas	5,18 <sup>**</sup>	0,128	23,01 <sup>***</sup>	0,285	2,49 <sup>*</sup>	0,123

NS, \*, \*\*, \*\*\* indican diferencias no significativas o diferencias significativas para  $P \leq 0,05$ , 0,01 ó 0,001, respectivamente.

**Tabla 3.2.** Valor  $F$  y coeficiente de determinación ( $\eta^2$ ) para regulador, salinidad y su interacción (regulador x salinidad), del peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco (PS) de raíz, relación raíz/parte aérea (R/PA), elongación de tallo, área foliar (AF) total, área final de la hoja (AFH), número de hojas y tasa de expansión foliar de plantas de olivo pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 6 semanas.

Parámetro	Fuente de variación					
	Regulador		Salinidad		Regulador x Salinidad	
	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$
PSPA	7,65 <sup>***</sup>	0,176	14,71 <sup>***</sup>	0,169	4,91 <sup>***</sup>	0,225
PS raíz	12,44 <sup>***</sup>	0,230	30,09 <sup>***</sup>	0,278	3,92 <sup>***</sup>	0,145
R/PA	4,36 <sup>**</sup>	0,135	2,13 <sup>NS</sup>	-	4,08 <sup>***</sup>	0,252
Elongación	8,45 <sup>***</sup>	0,147	51,75 <sup>***</sup>	0,451	2,15 <sup>*</sup>	0,075
AF total	16,85 <sup>***</sup>	0,265	27,70 <sup>***</sup>	0,218	7,00 <sup>***</sup>	0,220
AFH	6,13 <sup>***</sup>	0,100	67,28 <sup>***</sup>	0,550	5,10 <sup>***</sup>	0,166
Nº hojas	2,83 <sup>*</sup>	0,062	37,94 <sup>***</sup>	0,417	2,46 <sup>*</sup>	0,108
Expansión	3,91 <sup>**</sup>	0,082	54,48 <sup>***</sup>	0,573	2,56 <sup>*</sup>	0,108

NS, \*, \*\*, \*\*\* indican diferencias no significativas o diferencias significativas para  $P \leq 0,05$ , 0,01 ó 0,001, respectivamente.

**Tabla 3.3.** Peso seco de parte aérea (PSPA) y peso seco (PS) de raíz de plantas de olivo pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 3 y 6 semanas. Plantas no pretratadas (NP) y con 0 mM NaCl se utilizaron como control.

	PSPA (g planta <sup>-1</sup> )			PS raíz (g planta <sup>-1</sup> )		
	Semanas tras la aplicación del NaCl			Semanas tras la aplicación del NaCl		
	0	3	6	0	3	6
<b>Regulador</b>						
NP		0,912 b	1,15 b		0,239 c	0,366 b
GA <sub>3</sub>		1,13 a	1,38 a		0,317 b	0,363 b
AIA		0,855 b	1,05 b		0,219 c	0,251 c
AS		0,889 b	1,15 b		0,242 c	0,380 b
QUIN		1,24 a	1,45 a		0,370 a	0,444 a
<b>Salinidad</b>						
0 mM		1,17 a	1,43 a		0,330 a	0,453 a
100 mM		0,989 b	1,19 b		0,281 b	0,339 b
200 mM		0,862 c	1,08 b		0,222 c	0,290 c
<b>Regulador x Salinidad</b>						
Control	0,733	1,24 a	1,65 a	0,18	0,294 de	0,502 ab
NP+100	-	0,756 d	0,969 ef	-	0,233 f	0,320 def
NP+200	-	0,737 d	0,795 f	-	0,189 f	0,276 fg
GA <sub>3</sub> +0	0,818	1,28 a	1,48 abc	0,25	0,386 ab	0,433 bc
GA <sub>3</sub> +100	-	1,27 a	1,37 abc	-	0,352 bc	0,393 cde
GA <sub>3</sub> +200	-	0,846 cd	1,29 bcd	-	0,214 f	0,264 fg
AIA+0	0,731	0,966 bcd	1,05 def	0,20	0,241 ef	0,300 ef
AIA+100	-	0,816 d	1,20 cde	-	0,206 f	0,257 fg
AIA+200	-	0,785 d	0,903 ef	-	0,209 f	0,197 g
AS+0	0,703	1,09 abc	1,60 a	0,22	0,296 de	0,566 a
AS+100	-	0,863 cd	0,984 ef	-	0,234 f	0,322 def
AS+200	-	0,712 d	0,865 f	-	0,197 f	0,251 fg
QUIN+0	0,928	1,25 a	1,40 abc	0,17	0,432 a	0,465 bc
QUIN+100	-	1,24 a	1,41 abc	-	0,376 ab	0,405 cd
QUIN+200	-	1,23 ab	1,52 ab	-	0,301 cd	0,463 bc

En cada columna, para cada fuente de variación (regulador, salinidad o su interacción), las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

Tras 3 semanas de pretratamiento con reguladores del crecimiento (0 semanas), no se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0,01$ ) para el PSPA. Según la interacción entre regulador y salinidad, en plantas NP, el PSPA se inhibió en un porcentaje medio del 40% por la salinidad tras 3 semanas de exposición a la sal, mientras que, a las 6 semanas la inhibición media fue del 46%. A las 3 semanas, el pretratamiento con AIA



redujo un 22% ( $P \leq 0,05$ ) el PSPA de plantas con 0 mM NaCl respecto a plantas control. En contraste, el PSPA de plantas con 100 y 200 mM NaCl no se inhibió respecto al control en las pretratadas con QUIN, por tanto, el pretratamiento con QUIN las protegió frente al efecto negativo de la salinidad sobre el PSPA. Algo parecido ocurrió en plantas con 100 mM pretratadas con GA<sub>3</sub>. Este efecto se mantuvo a las 6 semanas de tratamiento salino; además, en plantas con 200 mM NaCl, el pretratamiento con GA<sub>3</sub> sólo inhibió el PSPA un 22% respecto a plantas control, por lo que se mejoró el crecimiento respecto a plantas NP.

Atendiendo a los valores medios para cada regulador, el pretratamiento con QUIN incrementó el PS de raíz a las 3 (55%) y 6 (21%) semanas de tratamiento respecto a plantas NP (Tabla 3.3). Con GA<sub>3</sub> se incrementó un 33% a las 3 semanas, pero no se afectó a las 6 semanas. Con AIA y AS, el PS de raíz no varió a las 3 semanas, mientras que, a las 6 semanas se redujo un 31% con AIA. El aumento de la sal en el medio trajo consigo un descenso del PS de raíz del 15 y 33% con 100 y 200 mM NaCl a las 3 semanas; esta reducción del PS de raíz fue mayor a las 6 semanas de tratamiento salino (25 y 36% con 100 y 200 mM, respectivamente).

Al igual que ocurrió con el PSPA, el PS de raíz no varió por los pretratamientos antes de la aplicación del NaCl (0 semanas). Según los valores para la interacción, en plantas NP, la aplicación de 100 y 200 mM redujo por igual el PS de raíz a las 3 y 6 semanas ( $\approx 28$  y  $41\%$ , respectivamente). A las 3 semanas de tratamiento salino, el PS de raíz aumentó respecto al control en plantas con 0 y 100 mM NaCl ( $\approx 25\%$ ) pretratadas con GA<sub>3</sub> ( $\approx 25\%$ ) y QUIN ( $\approx 37\%$ ). Además, con 200 mM, las pretratadas con QUIN no mostraron diferencias ( $P \leq 0,05$ ) respecto al control. A las 6 semanas de tratamiento, sólo con 200 mM se mejoró la respuesta respecto a plantas NP en las pretratadas con QUIN,

las cuales incrementaron el PS de raíz un 68% respecto a plantas NP con 200 mM NaCl ( $P \leq 0,05$ ).

**Tabla 3.4.** Relación raíz/parte aérea (R/PA) y elongación de tallo de plantas de olivo pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 3 y 6 semanas. Plantas no pretratadas (NP) y con 0 mM NaCl se utilizaron como control.

	R/PA			Elongación de tallo (cm planta <sup>-1</sup> )		
	Semanas tras la aplicación del NaCl			Semanas tras la aplicación del NaCl		
	0	3	6	0	3	6
<b>Regulador</b>						
NP		0,240 b	0,333 a		10,70 b	13,85 d
GA <sub>3</sub>		0,272 a	0,305 ab		12,68 a	16,31 bc
AIA		0,211 b	0,254 c		12,59 a	17,35 ab
AS		0,282 a	0,283 bc		10,85 b	14,19 cd
QUIN		0,281 a	0,324 ab		13,88 a	19,26 a
<b>Salinidad</b>						
0 mM		0,270 a	0,281		15,28 a	20,79 a
100 mM		0,267 a	0,315		12,25 b	15,56 b
200 mM		0,235 b	0,304		8,89 c	12,23 c
<b>Regulador x Salinidad</b>						
Control	0,206 bc	0,258	0,250 de	9,73	13,43 cde	19,90 ab
NP+100	-	0,248	0,372 abc	-	11,48 def	11,93 def
NP+200	-	0,215	0,377 ab	-	7,18 h	9,72 ef
GA <sub>3</sub> +0	0,340 a	0,297	0,297 cd	8,00	15,48 abc	20,87 ab
GA <sub>3</sub> +100	-	0,294	0,304 bcd	-	14,13 bcd	15,38 cd
GA <sub>3</sub> +200	-	0,225	0,316 bcd	-	8,42 gh	12,68 de
AIA+0	0,169 c	0,194	0,301 cd	10,60	16,67 ab	20,49 ab
AIA+100	-	0,214	0,214 e	-	10,23 fg	18,86 abc
AIA+200	-	0,224	0,246 de	-	10,87 efg	12,71 de
AS+0	0,251 b	0,298	0,291 d	7,78	13,08 cde	21,28 a
AS+100	-	0,285	0,274 de	-	12,38 def	12,58 de
AS+200	-	0,262	0,284 de	-	7,10 h	8,72 f
QUIN+0	0,181 c	0,305	0,265 de	8,30	17,76 a	21,40 a
QUIN+100	-	0,291	0,412 a	-	13,00cdef	19,06 abc
QUIN+200	-	0,248	0,295 d	-	10,88 efg	17,32 bc

En cada columna, para cada fuente de variación (regulador, salinidad o su interacción), las medias seguidas por la distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

Según el análisis multifactorial (Tablas 3.1 y 3.2), la relación R/PA estuvo condicionada principalmente por el regulador en la primera recogida, realizada a las tres semanas ( $\eta^2=0,259$ ;  $P \leq 0,001$ ); la interacción entre regulador y salinidad no fue

significativa. En contraste, a las 6 semanas, la relación R/PA estuvo condicionada principalmente por dicha interacción ( $\eta^2=0,252$ ;  $P\leq 0,001$ ), seguida de cerca por el regulador ( $\eta^2=0,135$ ;  $P\leq 0,001$ ); en este caso, el efecto de la salinidad no fue significativo. Según los valores medios para cada regulador (Tabla 3.4), a las 3 semanas con GA<sub>3</sub>, AS y QUIN, la relación R/PA aumentó aproximadamente un 16%, en cambio, no hubo efecto con AIA. A las 6 semanas, la relación R/PA descendió en torno a un 19% con AIA y AS. Según la salinidad, a las 3 semanas de tratamiento con 200 mM NaCl se redujo la relación R/PA un 13%.

A diferencia del PSPA y del PS de raíz, en la relación R/PA sí se detectó una influencia del pretratamiento antes de la exposición a la sal. Las plantas pretratadas con GA<sub>3</sub> aumentaron su relación R/PA un 16% comparado con plantas NP. No hubo efecto significativo con AIA, AS y QUIN.

Según los valores medios para la interacción (regulador x salinidad), a las 6 semanas de exposición a la sal, en plantas NP, la salinidad (100 y 200 mM) incrementó la relación R/PA aproximadamente un 50%. En cuanto a los pretratamientos, ninguno de los reguladores mostró diferencias significativas respecto al control independientemente del nivel de sal, excepto con QUIN y 100 mM NaCl que aumentó la relación R/PA un 65% ( $P\leq 0,05$ ) respecto a plantas control; sin embargo, si lo comparamos con plantas NP con 100 y 200 mM, no se detectaron diferencias.

El análisis estadístico mostró que la principal fuente de variación para la elongación de tallo fue la salinidad (Tablas 3.1 y 3.2), responsable de un 47 y 45% del efecto observado a las 3 y 6 semanas, respectivamente ( $\eta^2=0,473$  y  $0,451$ , respectivamente;  $P\leq 0,001$ ). Durante todo el experimento, los pretratamientos con GA<sub>3</sub>,

AIA y QUIN incrementaron la elongación respecto a plantas NP; en cambio, el pretratamiento con AS no mostró efecto sobre este parámetro (Tabla 3.4). Según la salinidad, los valores medios descendieron con 100 y 200 mM NaCl un 20 y 42%, respectivamente, a las 3 semanas y un 25 y 41%, respectivamente, a las 6 semanas de exposición a la sal.

De forma similar al PSPA y al PS de raíz, no se detectaron diferencias en la elongación de tallo entre plantas pretratadas y NP tras 3 semanas de pretratamiento con reguladores del crecimiento. En plantas NP, la elongación de tallo sólo se inhibió con 100 mM a las 6 semanas (40%), mientras que, con 200 mM NaCl, se inhibió tanto a las 3 como a las 6 semanas de exposición al NaCl (46 y 51%, respectivamente). Tras 3 semanas, las plantas crecidas en ausencia de sal (0 mM NaCl) con AIA y QUIN aumentaron la elongación de tallo una media del 28% respecto al control. Además, con QUIN las plantas salinizadas (100 y 200 mM NaCl) no mostraron diferencias respecto al control, al igual que ocurrió con 200 mM y AIA, 100 mM y GA<sub>3</sub>, y 100 mM y AS. A las 6 semanas, con 0 y 100 mM, las plantas con AIA y QUIN no mostraron diferencias respecto al control ( $P \leq 0,05$ ); con 200 mM NaCl esto sólo ocurrió con QUIN.

En lo que respecta a la hoja, se estudiaron dos parámetros: AF total y número de hojas. Como muestran las tablas 3.1 y 3.2, a las 3 semanas ambos parámetros estuvieron condicionados principalmente por la salinidad ( $\eta^2=0,281$  y  $0,285$ , respectivamente;  $P \leq 0,001$ ), seguidos por el regulador y la interacción entre ambos. A las 6 semanas, el número de hojas también estuvo condicionado principalmente por la salinidad, responsable del 42% del efecto observado ( $\eta^2=0,417$ ;  $P \leq 0,001$ ), mientras que, el AF total estuvo condicionada en mayor medida por la interacción entre regulador y salinidad ( $\eta^2=0,265$ ;  $P \leq 0,001$ ), aunque regulador y salinidad tuvieron una influencia

similar ( $\eta^2=0,235$  y  $0,193$ , respectivamente;  $P\leq 0,001$ ).

**Tabla 3.5.** Área foliar (AF) total y número de hojas de plantas de olivo pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 3 y 6 semanas. Plantas no pretratadas (NP) y con 0 mM NaCl se utilizaron como control.

	AF total (cm <sup>2</sup> planta <sup>-1</sup> )			Nº hojas planta <sup>-1</sup>		
	Semanas tras la aplicación del NaCl			Semanas tras la aplicación del NaCl		
	0	3	6	0	3	6
<b>Regulador</b>						
NP		64,51 b	78,23 c		19,72 b	23,19 ab
GA <sub>3</sub>		75,52 a	86,91 b		22,28 a	26,39 a
AIA		61,35 b	65,31 d		19,61 b	24,61 ab
AS		63,71 b	71,74 cd		16,67 c	20,91 b
QUIN		73,11 a	96,57 a		19,83 ab	21,47 b
<b>Salinidad</b>						
0 mM		77,50 a	91,55 a		23,03 a	29,68 a
100 mM		66,92 b	80,62 b		19,27 b	23,37 b
200 mM		58,50 c	67,08 c		16,57 c	16,89 c
<b>Regulador x Salinidad</b>						
Control	46,70 ab	77,13 abc	106,68 a	18,67	21,33 bcd	30,40 ab
NP+100	-	59,57 de	69,50 de	-	19,00 cde	22,00 cde
NP+200	-	56,83 e	58,51 efg	-	18,83 def	17,17 ef
GA <sub>3</sub> +0	54,06 ab	81,98 ab	89,37 bc	17,17	28,50 a	36,50 a
GA <sub>3</sub> +100	-	80,30 abc	92,29 abc	-	23,17 bc	22,00 cde
GA <sub>3</sub> +200	-	64,28 de	79,08 cd	-	15,17 ef	17,17 ef
AIA+0	44,63 ab	78,29 abc	74,26 d	19,67	24,17 b	36,50 a
AIA+100	-	53,84 e	73,64 d	-	18,00 def	25,00 bcd
AIA+200	-	51,92 e	48,01 g	-	16,67 ef	17,67 ef
AS+0	38,51 b	63,83 de	97,79 ab	15,67	17,83 def	30,67 ab
AS+100	-	71,49 bcd	66,03 def	-	17,50 def	19,67 de
AS+200	-	55,82 e	51,41 fg	-	14,67 f	12,40 f
QUIN+0	61,48 a	86,27 a	89,66 bc	16,17	23,33 b	22,83 cde
QUIN+100	-	69,39 cd	101,66 ab	-	18,67 def	22,17 cde
QUIN+200	-	63,66 de	98,40 ab	-	17,50 def	19,40 de

En cada columna, para cada fuente de variación (regulador, salinidad o su interacción), las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P\leq 0,05$ ).

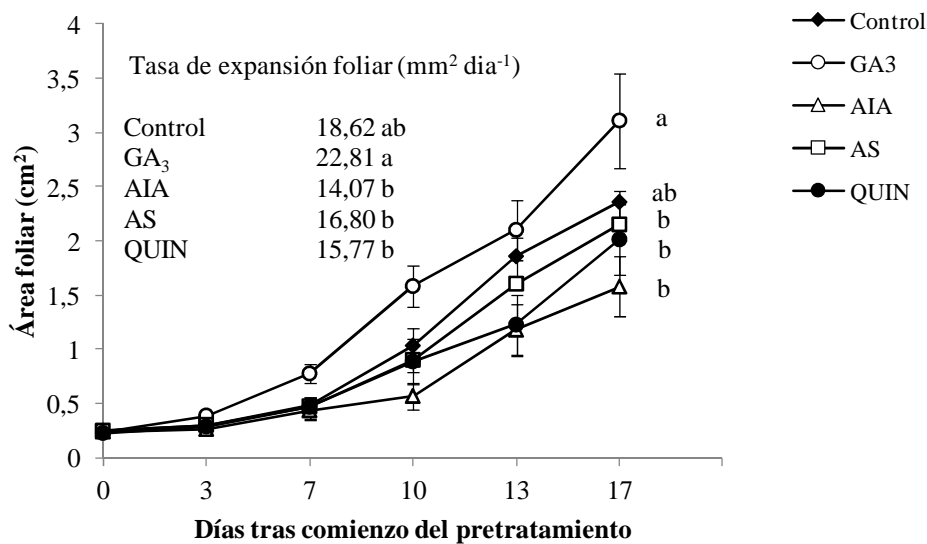
Según los valores medios para cada regulador (Tabla 3.5), las plantas pretratadas con GA<sub>3</sub> y QUIN aumentaron el AF total una media del 25% a las 3 semanas, y un 11 y 23%, respectivamente, a las 6 semanas. Con AIA, el AF total descendió un 16% a las 6 semanas. La salinidad indujo un descenso de los valores medios función del nivel de

sal, tanto a las 3 como a las 6 semanas.

Antes de la aplicación del NaCl (0 semanas) no se detectaron diferencias entre los pretratamientos y las plantas control, aunque sí se observó una mayor AF total ( $P \leq 0,05$ ) en plantas con QUIN comparado con plantas con AS. En cuanto a la interacción entre el regulador y la salinidad, se detectó un comportamiento distinto entre los pretratamientos en respuesta al estrés salino. En plantas NP, la salinidad redujo el AF total aunque no se observaron diferencias entre ambos niveles de sal; a las 3 semanas, la reducción media fue del 24% y a las 6 semanas del 40%. A las 3 semanas, en plantas crecidas sin sal, sólo las pretratadas con AS inhibieron el AF total respecto al control (17%;  $P \leq 0,05$ ). Con 100 mM, las plantas con GA<sub>3</sub>, AS y QUIN no mostraron diferencias respecto a plantas control, sin embargo, sólo con GA<sub>3</sub> aumentó el AF total respecto a plantas NP con 100 mM NaCl. A las 6 semanas, con 0 mM NaCl se detectó un descenso del AF total con GA<sub>3</sub> y QUIN ( $\approx 16\%$ ), en contraste, con 100 y 200 mM NaCl no se observaron cambios respecto al control, excepto con 200 mM y GA<sub>3</sub>, donde a pesar de que se redujo, mostró niveles superiores de AF total a los detectados en plantas con 200 mM NP ( $P \leq 0,05$ ).

A las 3 semanas, los valores medios de número de hojas para cada regulador mostraron un aumento en plantas con GA<sub>3</sub> (13%) y un descenso en plantas con AS (15%); con AIA y QUIN no se observaron diferencias respecto a plantas NP. A las 6 semanas, ningún regulador mostró diferencias respecto a plantas NP. Si consideramos la salinidad, el N° de hojas descendió en función del nivel de sal (100 y 200 mM NaCl); este descenso fue mayor a las 6 semanas (21 y 43% con 100 y 200 mM, respectivamente) que a las 3 semanas (16 y 28% con 100 y 200 mM, respectivamente). Antes del comienzo del tratamiento salino, el número de hojas no varió entre los

reguladores y las plantas NP. En cuanto a la interacción entre regulador y salinidad, en plantas NP, a las 6 semanas, se redujo el N° de hojas una media del 35% con 100 y 200 mM NaCl. A las 3 semanas de exposición a la sal, con GA<sub>3</sub> y 0 mM se observó el mayor número de hojas (28,50), que supuso un 37% más que el control. Con 100 mM, ningún pretratamiento mostró diferencias respecto al control; en cambio, con 200 mM todos los pretratamientos redujeron el número de hojas comparado con el control, aunque no mostraron diferencias respecto a plantas con 200 mM NP. A las 6 semanas, con QUIN, independientemente del nivel de sal, el número de hojas se redujo respecto a plantas control ( $\approx 29\%$ ), sin que se observaran diferencias respecto a plantas salinizadas NP. El resto de plantas pretratadas mostraron un comportamiento similar a las NP, excepto las plantas con AIA y 100 mM que no mostraron diferencias respecto al control ( $P \leq 0,05$ ) en el N° de hojas.



**Figura 3.1.** Expansión de la hoja y tasa de expansión foliar de plantas de olivo durante las 3 semanas de pretratamiento con reguladores del crecimiento. Las plantas control no se pretrataron. Los datos son medias  $\pm$  SE ( $n=4$ ). Para la expansión foliar, al final del pretratamiento, distinta letra indica diferencias significativas según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ). Para la tasa de expansión foliar, en cada pretratamiento, las medias seguidas por distinta letra indica diferencias significativas según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

Con el objeto de profundizar en el efecto de la salinidad y los reguladores del crecimiento sobre la hoja, se estudió su expansión durante el período de pretratamiento con reguladores y de exposición al NaCl, así como la tasa de expansión foliar y el área final de la hoja (AFH). Como podemos observar en la figura 3.1, durante los pretratamientos ningún regulador mostró diferencias respecto al control en la tasa de expansión foliar, ni en el AFH alcanzada. Sin embargo, es destacable que las plantas con GA<sub>3</sub> mostraron una tasa de expansión foliar (18,62 mm<sup>2</sup> día<sup>-1</sup>) y AFH (3,11 cm<sup>2</sup>) significativamente ( $P \leq 0,05$ ) superiores a la del resto de reguladores.

**Tabla 3.6.** Área final de la hoja (AFH) y tasa de expansión foliar de plantas de olivo pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 6 semanas.

	AFH (cm <sup>2</sup> hoja <sup>-1</sup> )	Tasa de expansión foliar (mm <sup>2</sup> día <sup>-1</sup> )
<b>Regulador</b>		
NP	2,95 ab	14,27 ab
GA <sub>3</sub>	2,98 ab	13,78 ab
AIA	2,19 c	10,08 c
AS	2,62 bc	12,27 bc
QUIN	3,24 a	15,32 a
<b>Salinidad</b>		
0 mM	3,69 a	18,52 a
100 mM	3,04 b	14,04 b
200 mM	1,66 c	6,87 c

En cada columna, para cada fuente de variación (regulador o salinidad), las medias seguidas por distinta letra estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

Según el coeficiente de determinación ( $\eta^2$ ), el AFH y la tasa de expansión foliar están determinados principalmente por la salinidad ( $\eta^2=0,550$  y  $0,573$ , respectivamente;  $P \leq 0,001$ ; tabla 3.2). Según los valores medios para cada regulador, el AFH y tasa de expansión foliar sólo descendieron respecto a plantas NP en plantas con AIA y AS ( $\approx 18$  y  $\approx 21\%$ , respectivamente). En el caso de la salinidad, ambos parámetros descendieron

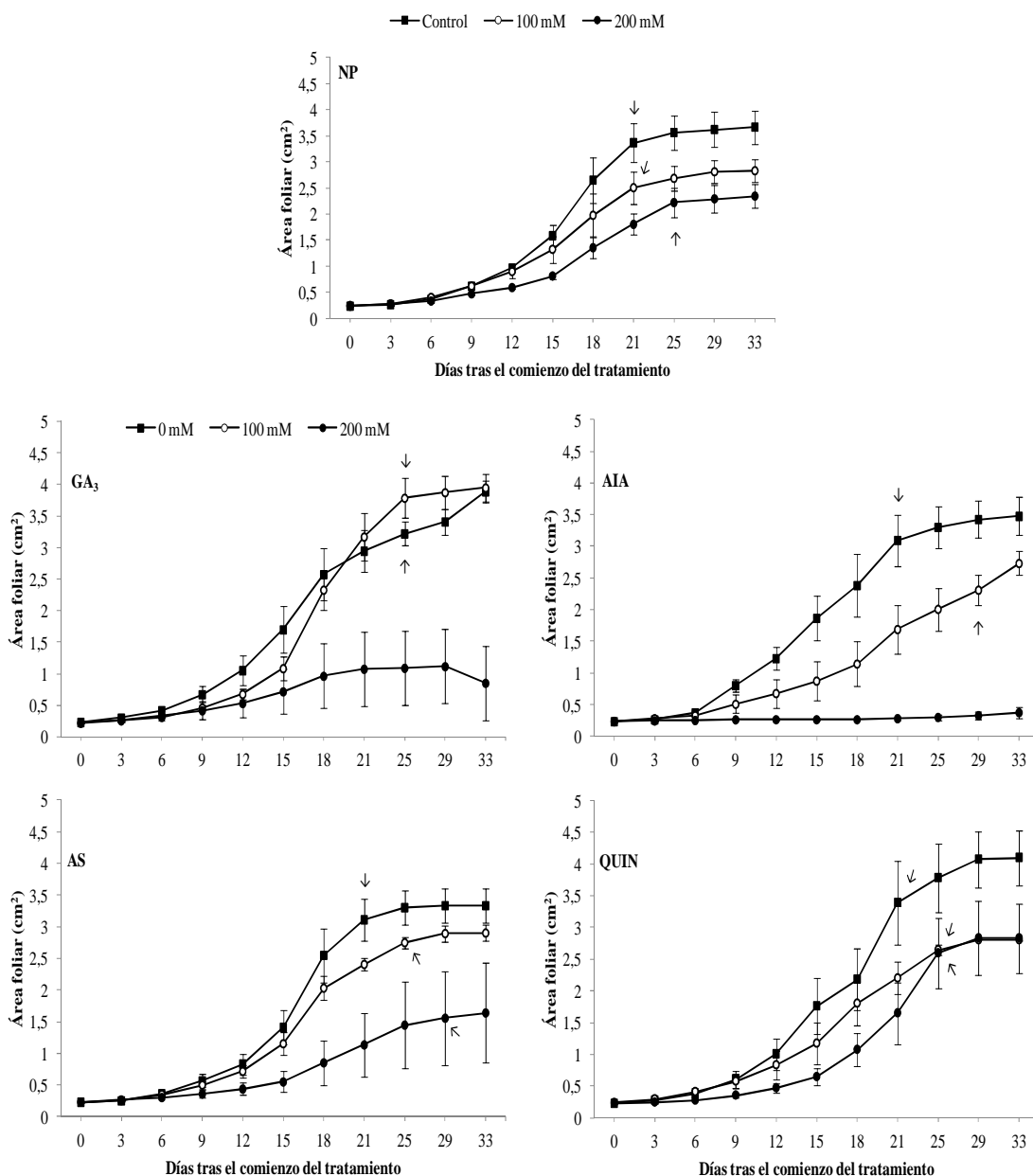


en función del nivel de NaCl (Tabla 3.6).

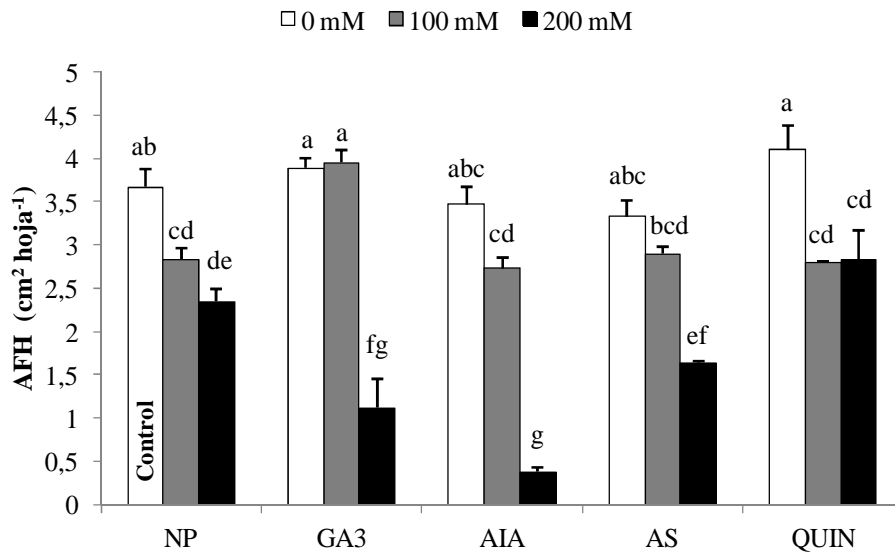
Como muestra la figura 3.2, las hojas de plantas crecidas sin sal alcanzaron su AFH a los 21 días, excepto las plantas con GA<sub>3</sub> que la alcanzaron a los 25 días. Con 100 mM, el tiempo necesario para alcanzar el AFH se retrasó respecto a plantas control 4 días con GA<sub>3</sub>, AS y QUIN (25 días) y 8 días con AIA (29 días); en plantas NP el número de días no varió respecto al control. Con 200 mM, este retraso fue de 4 días en plantas NP y con QUIN (25 días) ó de 8 días con AS (29 días). Es importante destacar que en plantas con GA<sub>3</sub> y AIA no hubo expansión de la hoja durante los 33 días de crecimiento en condiciones salinas ( $P \leq 0,05$ ).

El AFH alcanzada se representa en la figura 3.3. Todas las plantas crecidas en ausencia de sal mostraron el mismo AFH, independientemente del pretratamiento. Con 100 mM, se detectó un descenso medio del AFH del 24% en plantas NP, con AIA y QUIN, mientras que, con 200 mM este descenso se detectó en todos los casos ( $\approx 29\%$  para NP y QUIN;  $\approx 62\%$  para GA<sub>3</sub> y AS y  $90\%$  para AIA).

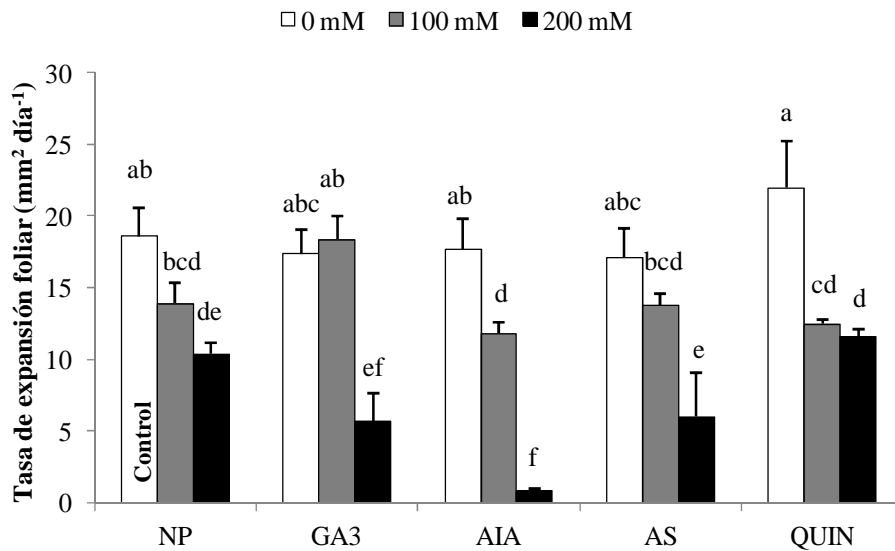
La tasa de expansión foliar (figura 3.4), en plantas NP y pretratadas con GA<sub>3</sub> y AS, solo descendió por la aplicación de 200 mM; este descenso fue del 44% en plantas NP y en torno al 56% en plantas con GA<sub>3</sub> y AS. Con AIA y QUIN ambos niveles de sal redujeron la tasa de expansión foliar respecto al control (37 y 95% con 100 y 200 mM, respectivamente, con AIA;  $\approx 35\%$  con QUIN).



**Figura 3.2.** Expansión de la hoja de plantas de olivo pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 6 semanas. Plantas no pretratadas (NP) y con 0 mM NaCl se utilizaron como control. Los datos son medias  $\pm$  SE (n=4). La flecha indica el día en que se estabilizó el crecimiento de la hoja según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 3.3.** Área final de la hoja (AFH) de plantas de olivo pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 6 semanas. Plantas no pretratadas (NP) y con 0 mM NaCl se utilizaron como control. Los datos son medias  $\pm$  SE (n=4). Las medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 3.4.** Tasa de expansión foliar de plantas de olivo pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 6 semanas. Plantas no pretratadas (NP) y con 0 mM NaCl se utilizaron como control. Los datos son medias  $\pm$  SE (n=4). Las medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

### 3.1.2. Contenido de nutrientes

Como podemos observar en la tabla 3.7, la principal fuente de variación para todos los iones determinados fue la salinidad, excepto en el porcentaje de  $\text{Na}^+$  de la hoja respecto al de la raíz, en el que la principal fuente de variación fue el regulador ( $\eta^2=0,832$ ;  $P\leq 0,001$ ).

**Tabla 3.7.** Valor  $F$  y coeficiente de determinación ( $\eta^2$ ) para regulador, salinidad y su interacción (regulador x salinidad), del contenido de sodio ( $\text{Na}^+$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ), relación potasio/sodio ( $\text{K}^+/\text{Na}^+$ ) en hoja y raíz y, porcentaje de  $\text{Na}^+$  en hoja respecto a la raíz ( $\%\text{Na}^+$ ) de plantas de olivo pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 6 semanas.

Parámetro	Fuente de variación					
	Regulador		Salinidad		Regulador x Salinidad	
	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$
$\text{Na}^+$ hoja	7,32 <sup>***</sup>	0,063	176,72 <sup>***</sup>	0,763	4,40 <sup>***</sup>	0,076
$\text{K}^+$ hoja	4,28 <sup>***</sup>	0,093	48,16 <sup>***</sup>	0,525	3,12 <sup>**</sup>	0,136
$\text{K}^+/\text{Na}^+$ hoja	395,20 <sup>***</sup>	0,096	5461,41 <sup>***</sup>	0,666	482,68 <sup>***</sup>	0,235
$\text{Na}^+$ raíz	5583,69 <sup>***</sup>	0,034	303326,69 <sup>***</sup>	0,927	3142,31 <sup>***</sup>	0,038
$\text{K}^+$ raíz	3684,71 <sup>***</sup>	0,087	74381,80 <sup>***</sup>	0,879	702,34 <sup>***</sup>	0,033
$\text{K}^+/\text{Na}^+$ raíz	8422,73 <sup>***</sup>	0,065	204638,24 <sup>***</sup>	0,786	9687,77 <sup>***</sup>	0,149
$\%\text{Na}^+$	52,00 <sup>***</sup>	0,832	0,08 <sup>NS</sup>	-	2,95 <sup>*</sup>	0,047

NS, \*, \*\*, \*\*\* indican diferencias no significativas o diferencias significativas para  $P\leq 0,05$ , 0,01 ó 0,001, respectivamente.

Según los valores medios para cada regulador (Tabla 3.8), el contenido de  $\text{Na}^+$  de hoja se redujo por igual en todos los pretratamientos respecto al control ( $\approx 21\%$ ). En raíz, sin embargo, sí se observaron diferencias entre los pretratamientos con reguladores del crecimiento; las plantas con  $\text{GA}_3$  mostraron la mayor reducción frente a plantas NP (25%), seguidas por AS (23%) y QUIN (20%). En cambio con AIA, el contenido de  $\text{Na}^+$  de raíz se incrementó un 7%. La presencia de sal en el medio provocó un aumento del contenido de  $\text{Na}^+$  proporcional al nivel de sal; este aumento fue mayor en raíz que en hoja (434 y 548% para 100 y 200 mM en hoja, 630 y 776% para 100 y 200 mM en raíz).

**Tabla 3.8.** Contenido de sodio ( $\text{Na}^+$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ) y relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  ( $\text{K}^+/\text{Na}^+$ ) de hoja y raíz de plantas de olivo pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 6 semanas. Plantas no pretratadas (NP) y con 0 mM NaCl se utilizaron como control.

	$\text{Na}^+$ (%)		$\text{K}^+$ (%)		$\text{K}^+/\text{Na}^+$	
	Hoja	Raíz	Hoja	Raíz	Hoja	Raíz
<b>Regulador</b>						
NP	1,06 a	2,99 b	1,12 a	1,98 b	2,96 c	1,03 d
GA <sub>3</sub>	0,835 b	2,19 e	1,01 c	1,35 e	4,12 b	1,62 b
AIA	0,708 b	3,20 a	1,14 a	2,00 a	2,47 d	0,83 e
AS	0,696 b	2,34 d	1,09 ab	1,48 c	2,00 e	2,02 a
QUIN	0,829 b	2,40 c	1,03 bc	1,41 d	5,83 a	1,24 c
<b>Salinidad</b>						
0 mM	0,193 c	0,437 c	1,24 a	2,92 a	8,58 a	3,44 a
100 mM	1,03 b	3,19 b	1,04 b	1,14 b	0,956 b	0,374 b
200 mM	1,25 a	3,83 a	0,960 c	0,877 c	0,894 b	0,225 c
<b>Regulador x Salinidad</b>						
Control	0,185 hi	0,282 j	1,40 a	3,35 a	7,57 c	2,38 d
NP+100	1,40 ab	4,12 e	0,966 fg	1,55 f	0,688 ij	0,486 f
NP+200	1,59 a	4,37 a	0,986 fg	1,04 j	0,633 ij	0,239 i
GA <sub>3</sub> +0	0,107 hi	0,551 l	1,17 bcd	2,36 e	10,95 b	4,28 b
GA <sub>3</sub> +100	1,13 cde	2,83 f	0,876 g	1,21 i	0,536 j	0,47 g
GA <sub>3</sub> +200	1,27 bcd	3,20 e	0,983 fg	0,486 o	0,863 hij	0,152 j
AIA+0	0,239 hi	0,369 i	1,19 bc	3,27 b	5,00 d	1,77 e
AIA+100	0,799 fg	3,66 d	1,04 def	1,47 g	1,28 fg	0,402 g
AIA+200	1,08 de	4,09 b	1,18 bc	1,27 h	1,11 fgh	0,309 h
AS+0	0,363 h	0,488 m	1,30 ab	2,68 d	3,57 e	5,50 a
AS+100	0,769 g	2,73 g	0,954 fg	0,822 l	1,34 f	0,301 h
AS+200	0,953 efg	3,81 c	1,03 ef	0,951 k	1,09 fgh	0,249 i
QUIN+0	0,071 i	0,447 k	1,13 cde	2,93 c	15,79 a	3,28 c
QUIN+100	1,05 def	2,63 h	0,965 fg	0,666 m	0,936 ghi	0,253 i
QUIN+200	1,36 abc	3,66 d	1,01 efg	0,636 n	0,765 hij	0,174 j

En cada columna, para cada fuente de variación (regulador, salinidad o su interacción), las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

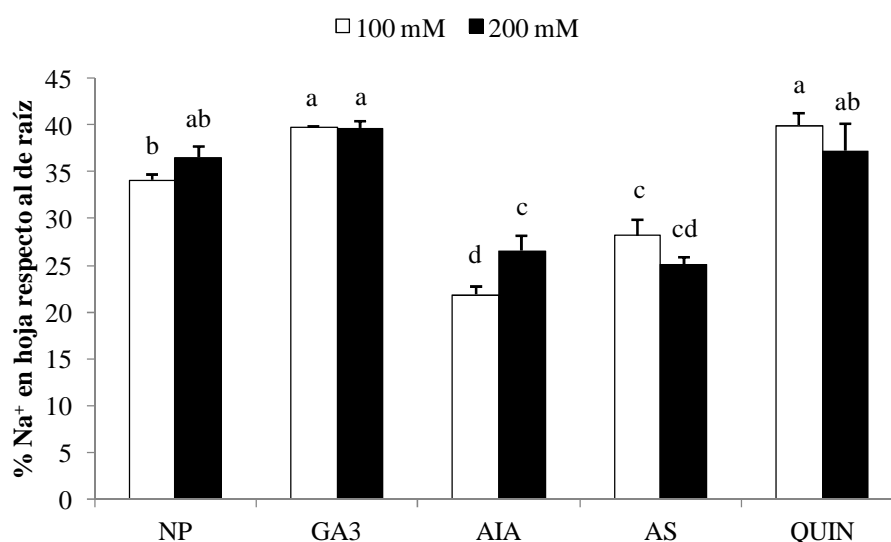
La interacción significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre regulador y salinidad mostró una respuesta distinta entre pretratamientos frente al estrés salino. En hoja, todas las plantas pretratadas crecidas en ausencia de sal mostraron el mismo ( $P \leq 0,05$ ) contenido de  $\text{Na}^+$  que el control (Tabla 3.8). Por otra parte, en plantas NP y pretratadas con GA<sub>3</sub> y con AS no se observaron diferencias entre 100 y 200 mM NaCl. En estos casos, la salinidad

incrementó el contenido de  $\text{Na}^+$  en hoja respecto al control una media del 708, 549 y 365% en plantas NP, con  $\text{GA}_3$  y con AS, respectivamente. Sin embargo, es importante destacar que si comparamos cada nivel de sal, las plantas con  $\text{GA}_3$  y AS acumularon menos  $\text{Na}^+$  en la hoja que las NP. En el caso de AIA y QUIN sí se observaron diferencias significativas entre 100 y 200 mM; con 100 mM el contenido de  $\text{Na}^+$  aumentó respecto al control una media del 400% con AIA y QUIN, mientras que, con 200 mM los respectivos incrementos fueron del 484 y 635%. Con estos reguladores, las plantas salinizadas también mostraron valores inferiores a las NP, excepto con QUIN y 200mM NaCl.

En cuanto al contenido de  $\text{Na}^+$  de raíz, en plantas NP, a diferencia de la hoja, con 200 mM se acumulo más  $\text{Na}^+$  que con 100 mM NaCl ( $P \leq 0,05$ ) comparado con el control (1361 y 1450% con 100 y 200 mM, respectivamente). Además las plantas NP con 200 mM mostraron el valor más elevado (4,37%). Al igual que plantas NP, con todos los reguladores se detectaron diferencias entre los tratamientos salinos. Con 100 mM, el regulador que menos incrementó su contenido de  $\text{Na}^+$  de raíz respecto al control fue QUIN (833%), seguido por AS,  $\text{GA}_3$  y AIA (868, 903 y 1198%, respectivamente); mientras que, con 200 mM el que menos  $\text{Na}^+$  acumuló fue  $\text{GA}_3$  (1034%), seguido por QUIN, AS y AIA (1198, 1251 y 1350%, respectivamente).

Como podemos observar en la figura 3.5, en plantas NP, el contenido de  $\text{Na}^+$  de la hoja respecto al de la raíz fue, en término medio, del 35% con 100 y 200 mM NaCl. En cuanto a los reguladores del crecimiento, podemos diferenciar dos grupos; uno formado por  $\text{GA}_3$  y QUIN, cuyos porcentajes de acumulación de  $\text{Na}^+$  en hoja respecto a la raíz no mostraron diferencias entre 100 y 200 mM y tampoco respecto a plantas NP con 200 mM. El segundo grupo estaría formado por AIA y AS, en los que se detectaron

porcentajes de acumulación de  $\text{Na}^+$  respecto a la raíz inferiores ( $P \leq 0,05$ ) a los de plantas NP con 100 y 200 mM NaCl (22 y 26% con 100 y 200 mM para AIA,  $\approx 27\%$  para AS con ambos niveles de sal), por tanto, con estos reguladores hubo una mayor acumulación de  $\text{Na}^+$  en raíz que en plantas NP. Es interesante señalar que en experimentos previos (Figura 1.3, pág. 77), las plantas tratadas con 200 mM NaCl del cv. Picual mostraron un porcentaje de  $\text{Na}^+$  en hoja respecto al de raíz muy superior (95%) al observado en el presente experimento; esto puede deberse al tiempo de exposición al NaCl y a la posible entrada de la planta en la fase iónica del estrés salino después de 6 semanas de crecimiento con NaCl.



**Figura 3.5.** Porcentaje de concentración de sodio ( $\text{Na}^+$ ) en hoja (%PS) comparado con la concentración de sodio ( $\text{Na}^+$ ) de la raíz (%PS), de plantas de olivo pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 6 semanas. Los datos son medias  $\pm$  SE ( $n=4$ ). Las medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

En relación al contenido de  $\text{K}^+$ , atendiendo a los valores medios para cada regulador (Tabla 3.8), en hoja disminuyó respecto a plantas NP por los pretratamientos con  $\text{GA}_3$  y QUIN ( $\approx 9\%$ ), mientras que, con AIA y AS no se observaron diferencias. En

raíz, el contenido de  $K^+$  aumentó un 1% respecto a plantas NP por el pretratamiento con AIA, en cambio, descendió con el resto de reguladores (25, 29 y 32% para AS, QUIN, y  $GA_3$ , respectivamente). Para salinidad, el contenido de  $K^+$  en hoja y raíz se redujo en función del nivel de sal adicionado, siendo mayor esta reducción en raíz (61 y 70% con 100 y 200 mM, respectivamente) que en hoja (16 y 22% con 100 y 200 mM, respectivamente).

En hoja de las plantas crecidas sin NaCl, sólo las pretratadas con AS no mostraron diferencias respecto al control, el resto de pretratamientos redujeron el contenido de  $K^+$  en hoja una media del 17%. En plantas NP, 100 y 200 mM descendieron por igual el contenido de  $K^+$  en hoja ( $\approx 30\%$ ), al igual que ocurrió en plantas con  $GA_3$ , AS y QUIN ( $\approx 33$ , 29 y 29%, respectivamente). Con AIA el contenido de  $K^+$  en hoja descendió un 26% con 100 mM y un 15% con 200 mM. Los valores para plantas con AIA y 200 mM NaCl fueron un 20% superiores a los de plantas NP con 200 mM NaCl.

En raíz, el nivel de  $K^+$  más elevado se observó en plantas control (3,35%). Con 100 mM, la mayor reducción del contenido de  $K^+$  se detectó en el pretratamiento con QUIN (80%), seguido por AS (75%),  $GA_3$  (64%), AIA (56%) y, por último, plantas NP (54%). Con 200 mM, el pretratamiento con  $GA_3$  fue el que mostró una mayor reducción (85%), seguido por QUIN (81%), AS (72%), NP (69%) y AIA (62%).

Los valores medios para cada regulador de la relación  $K^+/Na^+$  aumentaron respecto a plantas NP, en los pretratamientos con QUIN (97%) y  $GA_3$  (39%) y, descendieron con AIA (16%) y AS (32%). En raíz, fueron las plantas con AS las que mayor relación  $K^+/Na^+$  mostraron (96% mayor que plantas NP); con  $GA_3$  y QUIN



aumentó respecto a NP un 57 y 20%, respetivamente, mientras que, con AIA descendió un 19%. El tratamiento con 100 y 200 mM NaCl redujo la relación  $K^+/Na^+$  en hoja una media del 72%. En raíz, con 100 mM descendió un 89% y con 200 mM NaCl un 94%.

En hoja, las plantas crecidas sin sal (0 mM NaCl) con QUIN fueron las que mostraron una mayor relación  $K^+/Na^+$  (15,79), la cual fue un 109% superior a la de plantas control. En plantas con 0 mM NaCl, las pretratadas con AIA y AS mostraron una relación  $K^+/Na^+$  inferior a la de plantas control ( $P \leq 0,05$ ). Para un mismo pretratamiento, no se observaron diferencias entre la relación  $K^+/Na^+$  de plantas con 100 y 200 mM NaCl. Es importante destacar que, en plantas salinizadas, los pretratamientos con AIA y AS aumentaron la relación  $K^+/Na^+$  respecto a plantas NP ( $\approx 84\%$ ), mientras que con el resto de pretratamientos no se observaron diferencias ( $P \leq 0,05$ ).

En raíz, todos los reguladores aumentaron la relación  $K^+/Na^+$  respecto al control en ausencia de sal, excepto con AIA, donde se redujo un 26%. La relación  $K^+/Na^+$  más elevada la presentaron las plantas con AS (5,50). Con 100 mM, el mayor descenso de la relación  $K^+/Na^+$  respecto al control, tuvo lugar en plantas con QUIN (89%), seguidos por plantas con AS (87%), AIA y  $GA_3$  ( $\approx 82\%$ ), y NP (79%). Con 200 mM, fueron las plantas con  $GA_3$  y QUIN las que descendieron la relación  $K^+/Na^+$  en mayor proporción ( $\approx 93\%$ ), seguidas por plantas NP y con AS ( $\approx 89\%$ ), y plantas con AIA (87%).

### 3.1.3. Estado hídrico de la planta

La fuente de variación que más influyó en los índices relacionados con el estado hídrico de la hoja, contenido hídrico relativo (RWC), contenido hídrico para la saturación (WCS) y déficit de saturación hídrico (WSD), fue la salinidad ( $\eta^2=0,491$ , 0,724 y 0,411, respectivamente;  $P \leq 0,001$ ), seguida en todos los casos por el regulador

( $\eta^2=0,116$ , 0,084 y 0,125, respectivamente;  $P\leq 0,001$ ) y por la interacción entre ambos ( $\eta^2=0,079$ , 0,038 y 0,095, respectivamente;  $P\leq 0,05$ ) (Tabla 3.9).

**Tabla 3.9.** Valor  $F$  y coeficiente de determinación ( $\eta^2$ ) para regulador, salinidad y su interacción (regulador x salinidad), del contenido hídrico relativo (RWC), contenido hídrico para la saturación (WCS) y déficit de saturación hídrico (WSD) de plantas de olivo pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 6 semanas.

Parámetro	Fuente de variación					
	Regulador		Salinidad		Regulador x Salinidad	
	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$
RWC	6,90***	0,116	58,58***	0,491	2,36*	0,079
WCS	10,20***	0,084	175,94***	0,724	2,29*	0,038
WSD	6,35***	0,125	41,77***	0,411	2,42*	0,095

NS, \*, \*\*, \*\*\* indican diferencias no significativas o diferencias significativas para  $P\leq 0,05$ , 0,01 ó 0,001, respectivamente.

**Tabla 3.10.** Contenido hídrico relativo (RWC), contenido hídrico para la saturación (WCS) y déficit de saturación hídrico (WSD) en hoja de plantas de olivo pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 6 semanas.

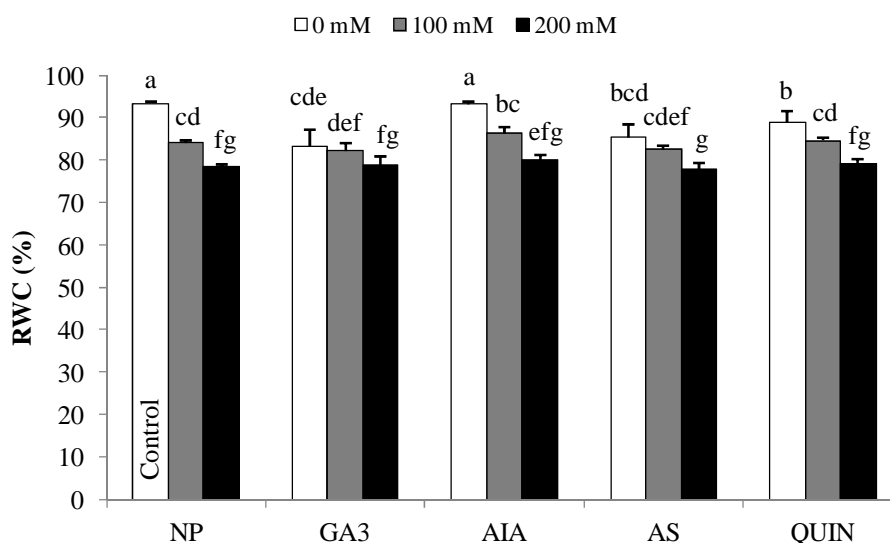
	RWC (%)	WCS (g H <sub>2</sub> O g <sup>-1</sup> PS)	WSD (%)
<b>Regulador</b>			
NP	85,30 ab	0,312 bc	14,39 c
GA <sub>3</sub>	81,36 d	0,396 a	18,99 a
AIA	86,53 a	0,301 c	13,61 c
AS	81,86 cd	0,340 b	18,20 ab
QUIN	84,15 bc	0,294 c	15,78 bc
<b>Salinidad</b>			
0 mM	88,78 a	0,206 c	11,72 c
100 mM	83,93 b	0,308 b	15,85 b
200 mM	78,81 c	0,472 a	21,01 a

En cada columna, para cada fuente de variación (regulador o salinidad), las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P\leq 0,05$ ).

Las plantas pretratadas con AIA y QUIN no mostraron diferencias en el RWC respecto a plantas NP (Tabla 3.10), mientras que en plantas con GA<sub>3</sub> y AS se redujo ( $\approx 4\%$ ). El WCS sólo aumentó con GA<sub>3</sub> (27%), en contraste, en el resto de reguladores

no se detectaron diferencias respecto a plantas NP. En el caso del WSD, aumentó con GA<sub>3</sub> y AS ( $\approx 29\%$ ), mientras que, con el resto de reguladores no varió. La salinidad redujo el RWC un 5% con 100 mM y un 11% con 200 mM NaCl; en contraste, el WCS y el WSD aumentaron con 100 (49 y 35%, respectivamente) y 200 mM (129 y 79%, respectivamente).

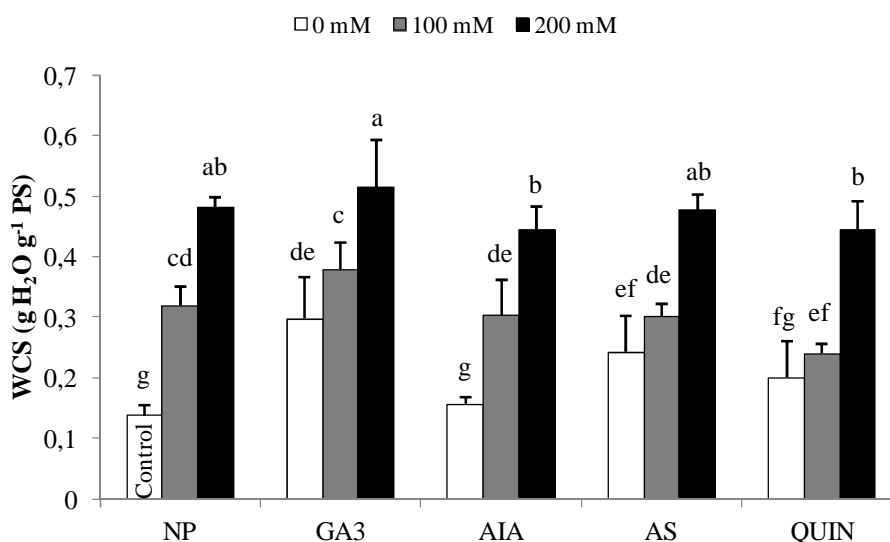
Los valores más elevados de RWC (Figura 3.6) se observaron en plantas control y con AIA crecidas sin sal ( $\approx 93,31\%$ ). En el resto de pretratamientos sin NaCl, se redujo respecto a plantas control. El RWC en plantas con 100 mM descendió una media del 10% y una media del 12% con 200 mM, tanto en plantas NP como con reguladores del crecimiento.



**Figura 3.6.** Contenido hídrico relativo (RWC) en hoja de plantas de olivo pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 6 semanas. Plantas no pretratadas (NP) y con 0 mM NaCl se utilizaron como control. Los datos son medias  $\pm$  SE (n=6). Las medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

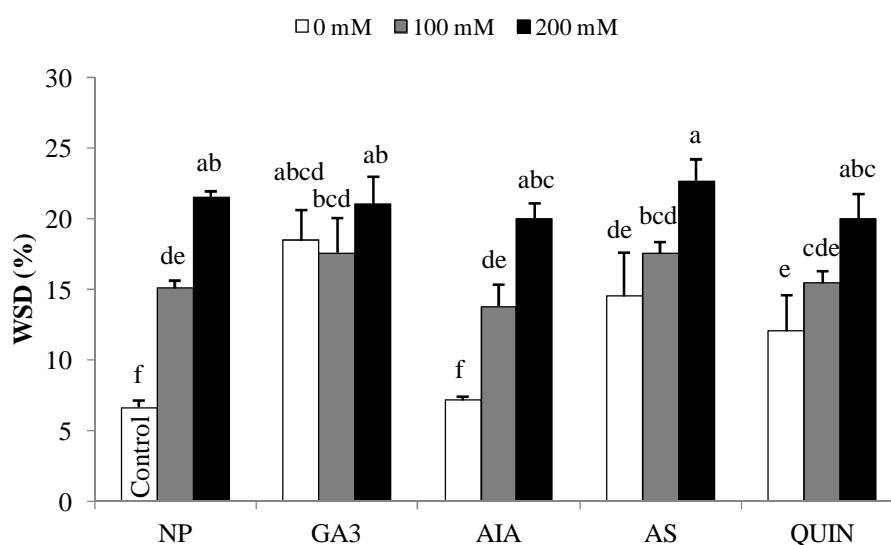
El efecto de la sal sobre el WCS y el WSD fue el opuesto al observado en el

RWC. En cuanto al WCS (Figura 3.7), en ausencia de sal, con GA<sub>3</sub> y AS aumentó, aproximadamente, un 93% respecto al control; mientras que, con AIA y QUIN, no se observaron diferencias ( $P \leq 0,05$ ). Con 100 y 200 mM NaCl, tanto plantas pretratadas como plantas NP incrementaron el WCS respecto al control; con 100 mM sólo se observaron diferencias respecto a plantas NP en plantas con QUIN, en las cuales se redujo un 25%, mientras que, con 200 mM las diferencias no fueron significativas ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 3.7.** Contenido hídrico para la saturación (WCS) en hoja de plantas de olivo pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 6 semanas. Plantas no pretratadas (NP) y con 0 mM NaCl se utilizaron como control. Los datos son medias  $\pm$  SE (n=6). Las medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

En plantas sin sal (0 mM NaCl), el WSD aumentó con GA<sub>3</sub>, AS y QUIN (Figura 3.8). Con 100 mM NaCl, el WSD aumentó ( $P \leq 0,05$ ) en todos los casos respecto al control, sin embargo, ningún regulador del crecimiento mostró diferencias comparado con plantas NP, al igual que ocurrió con 200 mM NaCl.



**Figura 3.8.** Déficit de saturación hídrico (WSD) en hoja de plantas de olivo pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 6 semanas. Plantas no pretratadas (NP) y con 0 mM NaCl se utilizaron como control. Los datos son medias  $\pm$  SE (n=6). Las medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

### 3.1.4. Pigmentos fotosintéticos

En relación al contenido de pigmentos fotosintéticos (Tabla 3.11), la variación de clorofila total ( $C_{a+b}$ ), carotenoides (Car) y relación clorofila a/clorofila b ( $C_a/C_b$ ) estuvo condicionada principalmente por el regulador ( $\eta^2=0,748$ ,  $0,833$  y  $0,734$ , respectivamente;  $P \leq 0,001$ ). Sin embargo, la relación clorofila total/carotenoides ( $C_{a+b}/Car$ ) se afectó principalmente por la interacción entre el regulador y la salinidad ( $\eta^2=0,672$ ;  $P \leq 0,001$ ).

Como podemos observar en la tabla 3.12, los valores medios de  $C_{a+b}$  aumentaron en plantas con GA<sub>3</sub>, AS ( $\approx 49\%$ ) y QUIN (69%) y descendieron en las pretratadas con AIA (18%). Los valores medios para la salinidad descendieron un 2% con 100 mM y un 6% con 200 mM de NaCl.

**Tabla 3.11.** Valor  $F$  y coeficiente de determinación ( $\eta^2$ ) para regulador, salinidad y su interacción (regulador x salinidad), del contenido de clorofila total ( $C_{a+b}$ ), carotenoides (Car), relación clorofila a/clorofila b ( $C_a/C_b$ ) y relación clorofila total/carotenoides ( $C_{a+b}/Car$ ) en hoja de plantas de olivo pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 6 semanas.

Parámetro	Fuente de variación					
	Regulador		Salinidad		Regulador x Salinidad	
	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$
$C_{a+b}$	4481,98***	0,748	89,63***	0,007	728,44***	0,243
Car	3706,54***	0,833	58,80***	0,007	349,72***	0,157
$C_a/C_b$	850,28***	0,734	90,19***	0,039	125,55***	0,217
$C_{a+b}/Car$	239,62***	0,180	372,28***	0,140	448,17***	0,672

NS, \*, \*\*, \*\*\* indican diferencias no significativas o diferencias significativas para  $P \leq 0,05$ , 0,01 ó 0,001, respectivamente.

Según la interacción entre regulador y salinidad, el contenido de  $C_{a+b}$  en plantas NP se redujo un 22% con 100 mM y un 42% con 200 mM NaCl (Tabla 3.12). En cuanto a los reguladores, las plantas pretratadas con GA<sub>3</sub>, AS y QUIN incrementaron el contenido de  $C_{a+b}$  respecto al control con 0, 100 y 200 mM, observándose el valor más alto en plantas con QUIN y 200 mM (4,04 mg g<sup>-1</sup> PS). En contraste, las plantas pretratadas con AIA redujeron el contenido de  $C_{a+b}$  un 6, 57 y 45% con 0, 100 y 200 mM, respectivamente. Además, con GA<sub>3</sub> AS y QUIN, la  $C_{a+b}$  aumentó con la salinidad comparado con sus respectivas plantas pretratadas sin sal, mientras que, con AIA descendió.

El contenido de Car se afectó por los reguladores de crecimiento de la misma forma que la  $C_{a+b}$ , aumentando con GA<sub>3</sub> AS y QUIN (54, 46 y 72%, respectivamente) y descendiendo con AIA (16%). El contenido de Car varió de forma diferente según el nivel de sal, aumentando un 1% con 100 mM y descendiendo un 4% con 200 mM de NaCl.

**Tabla 3.12.** Contenido de clorofila total ( $C_{a+b}$ ), carotenoides (Car), relación clorofila a/clorofila b ( $C_a/C_b$ ) y relación clorofila total/carotenoides ( $C_{a+b}/Car$ ) en hoja de plantas de olivo pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 6 semanas. Plantas no pretratadas (NP) y con 0 mM NaCl se utilizaron como control.

	$C_{a+b}$ (mg g <sup>-1</sup> PS)	Car (mg g <sup>-1</sup> PS)	$C_a/C_b$	$C_{a+b}/Car$
<b>Regulador</b>				
NP	2,23 c	0,518 d	2,60 c	4,26 b
GA <sub>3</sub>	3,31 b	0,797 b	2,79 b	4,14 c
AIA	1,82 d	0,435 e	2,55 d	4,09 d
AS	3,33 b	0,756 c	2,91 a	4,39 a
QUIN	3,77 a	0,892 a	2,92 a	4,24 b
<b>Salinidad</b>				
0 mM	2,97 a	0,685 b	2,76 b	4,35 a
100 mM	2,91 b	0,695 a	2,80 a	4,13 c
200 mM	2,79 c	0,659 c	2,71 c	4,18 b
<b>Regulador x Salinidad</b>				
Control	2,84 g	0,609 h	2,71 g	4,66 a
NP+100	2,20 i	0,527 j	2,68 h	4,17 f
NP+200	1,65 j	0,418 k	2,42 l	3,94 j
GA <sub>3</sub> +0	2,90 f	0,732 f	2,82 f	3,96 j
GA <sub>3</sub> +100	3,85 b	0,891 b	2,92 cd	4,32 d
GA <sub>3</sub> +200	3,17 e	0,769 e	2,64 i	4,13 g
AIA+0	2,68 h	0,591 i	2,48 k	4,54 b
AIA+100	1,21 l	0,324 m	2,55 j	3,73 k
AIA+200	1,56 k	0,389 l	2,62 i	4,00 i
AS+0	2,94 f	0,689 g	2,81 f	4,28 e
AS+100	3,50 cd	0,795 cd	2,94 bc	4,40 c
AS+200	3,54 c	0,785 d	2,97 a	4,51 b
QUIN+0	3,48 d	0,806 c	2,96 ab	4,32 d
QUIN+100	3,81 b	0,938 a	2,89 e	4,06 h
QUIN+200	4,04 a	0,931 a	2,90 de	4,33 d

En cada columna, para cada fuente de variación (regulador, salinidad o su interacción), las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

Al igual que la  $C_{a+b}$ , en la interacción entre regulador y salinidad, el contenido de Car aumentó respecto al control con GA<sub>3</sub>, AS y QUIN, independientemente del nivel de sal, y se redujo con AIA. En plantas NP, el contenido de Car descendió por la salinidad en menor proporción que el contenido de  $C_{a+b}$ ; este descenso fue del 13% con 100 mM NaCl y del 31% con 200 mM. Los valores más altos de Car se detectaron en

plantas salinizadas y pretratadas con QUIN ( $\approx 0,934 \text{ mg g}^{-1} \text{ PS}$ ).

Para conocer el efecto del estrés salino sobre la  $C_a$  y la  $C_b$  se calculó la relación  $C_a/C_b$  (Tabla 3.12). Los pretratamientos con GA<sub>3</sub>, AS y QUIN incrementaron los valores medios de la relación  $C_a/C_b$ , este aumento fue del 7% en el caso de GA<sub>3</sub> y, aproximadamente, un 12% en el caso de AS y QUIN comparado con plantas NP; en contraste, con AIA descendió un 2%. El efecto de la salinidad sobre la relación  $C_a/C_b$  fue diferente según el nivel de sal; con 100mM se incremento un 1% respecto a plantas crecidas sin sal, mientras que, con 200 mM descendió un 2%.

En cuanto a la interacción entre regulador y salinidad, en plantas NP, los tratamientos con 100 y 200 mM redujeron la relación  $C_a/C_b$  un 1 y 11%, respectivamente, comparado con el control. Con AS y QUIN, la relación  $C_a/C_b$  aumentó en todos los casos respecto al control, lo que indica un descenso de la  $C_b$  respecto a la  $C_a$ . Los valores más elevados se detectaron en plantas con AS y 200 mM (2,97) y en plantas con QUIN y 0 mM NaCl (2,96). En contraste, con AIA se redujo la relación  $C_a/C_b$  respecto al control con 0, 100 y 200 mM (8, 6 y 3%, respectivamente). En el caso de GA<sub>3</sub>, la relación  $C_a/C_b$  varió dependiendo del nivel de sal, aumentando en 0 y 100 mM (4 y 8%, respectivamente) y descendiendo en 200 mM (3%); a pesar de este descenso, la relación  $C_a/C_b$  en plantas con GA<sub>3</sub> y 200 mM fue mayor que la de plantas NP con 200 mM NaCl.

Atendiendo a los reguladores del crecimiento, la relación  $C_{a+b}/C_{ar}$ , en plantas con QUIN no mostró diferencias ( $P \leq 0,05$ ) respecto a plantas NP, descendió con GA<sub>3</sub> y AIA (3 y 4%, respectivamente) y, se incremento con AS (3%). La salinidad redujo la relación  $C_{a+b}/C_{ar}$  con 100 mM (5%) más que con 200 mM NaCl (4%).



En cuanto a la interacción entre regulador y salinidad, el valor más alto para la relación  $C_{a+b}/Car$  se detectó en plantas control (4,66). En plantas NP con 100 y 200 mM NaCl disminuyó un 10 y 15%, respectivamente. La relación  $C_{a+b}/Car$  descendió en mayor o menor medida, dependiendo del nivel de sal con todos los reguladores del crecimiento; con 100 mM, la menor reducción se detectó en AS (5%), seguido por GA<sub>3</sub> (7%), QUIN (13%) y AIA (20%); en el caso de AS y GA<sub>3</sub> la reducción fue menor que en plantas NP con 100 mM NaCl. Con 200 mM, al igual que con 100 mM, la menor reducción se observó en AS (3%), seguido por QUIN (7%), GA<sub>3</sub> (11%) y AIA (14%). Además, con 200 mM NaCl, en todos los pretratamientos se alcanzó una mayor relación  $C_{a+b}/Car$  que en plantas NP.

### 3.1.5. Metabolitos e indicadores del estrés en la hoja

En experimentos previos expuestos en este trabajo, no se detectaron cambios en el contenido de azúcares solubles totales de la hoja por el estrés salino, por tanto, en este experimento se analizaron los azúcares por separado.

En las tablas 3.13 y 3.14 se exponen los resultados obtenidos para los distintos azúcares analizados. Según el análisis multifactorial (Tabla 3.13), el contenido de manitol, sacarosa e inositol estuvo condicionado principalmente por la salinidad, responsable del 76, 82 y 53% del efecto observado, respectivamente ( $P \leq 0,001$ ). Para la glucosa, la principal fuente de variación fue la interacción entre regulador y la salinidad ( $\eta^2=0,408$ ;  $P \leq 0,001$ ), seguido muy de cerca por la salinidad y el regulador ( $\eta^2=0,303$  y  $0,233$ , respectivamente;  $P \leq 0,001$ ); mientras que, para la fructosa lo fue el regulador ( $\eta^2=0,633$ ;  $P \leq 0,01$ ). En lo que respecta al almidón, su contenido se afectó por el regulador y por la interacción entre regulador y salinidad en la misma medida ( $\eta^2=0,375$

y 0,372, respectivamente;  $P \leq 0,001$ ), aunque el efecto de la salinidad también tuvo un papel importante ( $\eta^2=0,233$ ;  $P \leq 0,001$ ). En el caso de la relación manitol/glucosa (Man/Glc), la principal fuente de variación fue la salinidad ( $\eta^2=0,501$ ;  $P \leq 0,001$ ), seguida por la interacción ( $\eta^2=0,359$ ;  $P \leq 0,001$ ) y finalmente por el regulador ( $\eta^2=0,125$ ;  $P \leq 0,001$ ).

**Tabla 3.13.** Valor  $F$  y coeficiente de determinación ( $\eta^2$ ) para regulador, salinidad y su interacción (regulador x salinidad), del contenido de manitol, sacarosa, inositol, glucosa, fructosa, almidón y relación manitol/glucosa (Man/Glc) en hoja de plantas de olivo pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 6 semanas.

Parámetro	Fuente de variación					
	Regulador		Salinidad		Regulador x Salinidad	
	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$
Manitol	8,98 <sup>***</sup>	0,047	294,34 <sup>***</sup>	0,764	14,44 <sup>***</sup>	0,150
Sacarosa	2,30 <sup>NS</sup>	-	151,43 <sup>***</sup>	0,825	3,11 <sup>*</sup>	0,068
Inositol	7,93 <sup>***</sup>	0,114	72,81 <sup>***</sup>	0,528	8,58 <sup>***</sup>	0,249
Glucosa	31,02 <sup>***</sup>	0,233	80,58 <sup>***</sup>	0,303	27,15 <sup>***</sup>	0,408
Fructosa	959,41 <sup>***</sup>	0,633	264,41 <sup>***</sup>	0,087	208,60 <sup>***</sup>	0,275
Almidón	217,11 <sup>***</sup>	0,375	270,43 <sup>***</sup>	0,233	107,92 <sup>***</sup>	0,372
Man/Glc	60,91 <sup>***</sup>	0,125	489,89 <sup>***</sup>	0,501	87,74 <sup>***</sup>	0,359

NS, \*, \*\*, \*\*\* indican diferencias no significativas o diferencias significativas para  $P \leq 0,05$ , 0,01 ó 0,001, respectivamente.

Según los valores medios para cada regulador, el contenido de manitol mostró los valores más elevados en plantas pretratadas con AIA y QUIN ( $\approx 13\%$  mayor que plantas NP; tabla 3.14). Por otra parte, el contenido de manitol se incrementó con 100 y 200 mM NaCl ( $\approx 75\%$ ). En cuanto a las interacciones, en plantas NP la aplicación de 100 mM NaCl provocó un aumento del manitol (32%) respecto al control, mientras que, con 200 mM se mantuvieron los mismos niveles ( $P \leq 0,05$ ). En el caso de los reguladores, todas las plantas pretratadas crecidas sin sal presentaron valores inferiores al control; en contraste, todas las plantas salinizadas y pretratadas con reguladores del crecimiento incrementaron el contenido de manitol comparado con el control y con sus respectivas plantas con regulador sin sal. Con 100 mM, el contenido de manitol se

incrementó respecto al control un porcentaje medio del 46% en los pretratamientos con AIA, AS y QUIN, mientras que, con GA<sub>3</sub> este incremento fue del 32%. Con 200 mM, en los pretratamientos con GA<sub>3</sub>, AIA y QUIN aumentó en torno al 55%, mientras que, con AS aumentó un 21%.

**Tabla 3.14.** Contenido de manitol, sacarosa, inositol, glucosa y fructosa en hoja de plantas de olivo pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 6 semanas. Plantas no pretratadas (NP) y con 0 mM NaCl se utilizaron como control.

	Manitol (mg g <sup>-1</sup> PS)	Sacarosa (mg g <sup>-1</sup> PS)	Inositol (mg g <sup>-1</sup> PS)	Glucosa (mg g <sup>-1</sup> PS)	Fructosa (mg g <sup>-1</sup> PS)
<b>Regulador</b>					
NP	25,41 cd	11,49	0,999 a	33,40 a	14,53 e
GA <sub>3</sub>	26,89 bc	10,90	0,810 b	19,41 b	16,44 d
AIA	28,53 ab	10,33	1,02 a	31,96 a	22,56 a
AS	24,94 d	10,29	0,679 b	22,58 b	17,94 c
QUIN	28,77 a	11,12	0,785 b	33,74 a	18,59 b
<b>Salinidad</b>					
0 mM	17,95 b	12,76 a	1,22 a	24,31 b	19,26 a
100 mM	31,66 a	12,64 a	0,820 b	22,49 b	17,94 b
200 mM	31,11 a	7,08 b	0,534 c	37,85 a	16,84 c
<b>Regulador x Salinidad</b>					
Control	22,52 e	13,40 ab	1,59 a	23,10 de	15,21 g
NP+100	29,79 cd	14,17 a	0,905 cd	45,24 a	14,60 h
NP+200	23,92 e	6,90 e	0,502 fgh	31,85 bc	13,79 i
GA <sub>3</sub> +0	17,32 fg	12,35 bcd	0,862 cde	14,96 f	21,58 bc
GA <sub>3</sub> +100	29,64 cd	13,46 ab	0,874 cde	19,34 def	14,70 h
GA <sub>3</sub> +200	33,70 ab	6,91 e	0,694 defg	23,92 d	13,05 j
AIA+0	17,79 f	13,13 abc	1,66 a	30,77 c	22,05 b
AIA+100	32,06 bc	11,17 d	1,01 bc	14,99 f	21,87 b
AIA+200	35,74 a	6,70 e	0,401 h	50,13 a	23,76 a
AS+0	14,62 g	11,17 d	0,757 cdef	15,59 f	19,79 d
AS+100	32,85 ab	11,60 cd	0,690 defg	15,58 f	17,19 f
AS+200	27,35 d	8,09 e	0,590 fgh	36,56 bc	16,85 f
QUIN+0	17,54 f	13,77 ab	1,25 b	37,12 b	17,68 e
QUIN+100	33,94 ab	12,81 abcd	0,618 efgh	17,32 ef	21,34 c
QUIN+200	34,83 ab	6,79 e	0,482 gh	46,77 a	16,75 f

En cada columna, para cada fuente de variación (regulador, salinidad o su interacción), las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

En cuanto a la sacarosa, la aplicación de 200 mM descendió su contenido un 44%, sin embargo con 100 mM NaCl no hubo diferencias respecto a 0 mM NaCl. La

interacción entre regulador y salinidad reveló un descenso de la sacarosa con 200 mM NaCl tanto en plantas NP como en las pretratadas con reguladores del crecimiento ( $\approx 47\%$ ), mientras que, con 100 mM este descenso solo tuvo lugar en plantas con AIA y AS ( $\approx 11\%$ ). Además, las plantas con AS crecidas en ausencia de sal redujeron su contenido de sacarosa respecto al control un 17%.

Atendiendo a los valores medios para cada regulador, el contenido de inositol descendió con GA<sub>3</sub>, AS y QUIN ( $\approx 24\%$ ). En lo que respecta a la salinidad, descendió en proporción al nivel de sal (33 y 56% para 100 y 200 mM NaCl, respectivamente). Según la interacción entre regulador y salinidad, en plantas NP el contenido de inositol se redujo con 100 (43%,  $P \leq 0,05$ ) y 200 mM NaCl (68%,  $P \leq 0,05$ ) respecto a plantas control. Con GA<sub>3</sub> y AS descendió respecto al control por igual con todos los niveles de NaCl ensayados, mientras que, con AIA descendió solo con 100 y 200 mM NaCl (36 y 75%, respectivamente). En plantas con QUIN sin NaCl descendió un 21%, mientras que, con 100 y 200 mM el descenso medio fue del 65%.

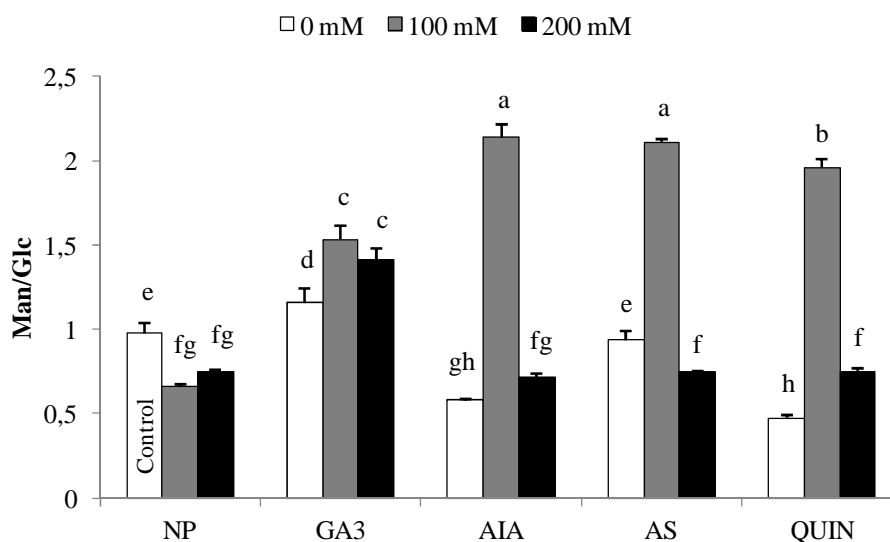
Según los valores medios para cada regulador, el contenido de glucosa en plantas pretratadas con GA<sub>3</sub> y AS descendió respecto a plantas NP ( $\approx 37\%$ ), mientras que, con AIA y QUIN no varió ( $P \leq 0,05$ ). En cuanto a la salinidad, el contenido de glucosa aumentó solo con 200 mM (56%). La comparación de medias en la interacción, mostró que la respuesta al NaCl del contenido de glucosa varió entre pretratamientos (Tabla 3.14). En plantas sin sal, aumentó respecto al control con AIA (33%) y QUIN (61%) y, descendió con GA<sub>3</sub> y AS ( $\approx 34\%$ ). En plantas crecidas con 100 mM, el contenido de glucosa aumentó en plantas NP (96%;  $P \leq 0,05$ ), descendió con AIA y AS ( $\approx 34\%$ ) y no se observaron diferencias respecto al control con GA<sub>3</sub> y QUIN. En plantas con 200 mM, se incrementó en todos los casos, excepto con GA<sub>3</sub>, que no mostró

diferencias respecto al control. Con 200 mM NaCl el mayor incremento se observó con QUIN y AIA ( $\approx 109\%$ ).

Todos los reguladores del crecimiento aumentaron el contenido de fructosa hasta valores superiores a los de plantas NP. El pretratamiento que más lo incrementó fue AIA (55%), seguido por QUIN (28%), AS (23%) y finalmente  $GA_3$  (13%). El estrés salino redujo el contenido de fructosa proporcionalmente al nivel de sal (7 y 12% con 100 y 200 mM NaCl, respectivamente). Según la interacción entre regulador y salinidad, en plantas NP la aplicación de 100 mM NaCl disminuyó el contenido de fructosa un 4%, mientras que, con 200 mM lo disminuyó un 9%. Con AIA, AS y QUIN, el contenido de fructosa aumentó ( $P \leq 0,05$ ) con 0, 100 y 200 mM NaCl, observándose en plantas pretratadas con AIA los mayores incrementos ( $\approx 44\%$  para 0 y 100 mM; 56% para 200 mM de NaCl). En cambio con  $GA_3$ , el contenido de fructosa aumentó un 42% con 0 mM y se redujo con 100 y 200 mM (3 y 14%, respectivamente).

En consecuencia, podemos afirmar que en plantas no sometidas a estrés salino, se favoreció la acumulación de fructosa y glucosa; mientras que la fructosa se acumuló con todos los reguladores del crecimiento, la glucosa sólo se acumuló con AIA y QUIN. Cuando las plantas crecieron en condiciones de estrés salino sin reguladores del crecimiento (NP), aumentaron manitol y glucosa con 100 mM, y sólo glucosa con 200 mM NaCl. Sin embargo, la aplicación de reguladores del crecimiento influyó en esta respuesta, de forma que, con 200 mM se acumuló manitol y con 100 mM sus niveles se incrementaron respecto a los de plantas NP. En relación a la glucosa, con 200 mM se incrementó su acumulación respecto a plantas NP por la aplicación de AIA y QUIN. Además, la fructosa aumentó sus niveles en plantas con 100 mM pretratadas con AIA, AS y QUIN.

Los contenidos de manitol y glucosa se correlacionaron positivamente con el contenido de  $\text{Na}^+$  en hoja, siendo más alta la correlación con el manitol ( $P \leq 0,001$ ) (Tabla 3.18.b). Sin embargo, el contenido de  $\text{Na}^+$  en hoja mostró una correlación negativa con los contenidos de sacarosa, inositol, fructosa y almidón.



**Figura 3.10.** Relación manitol/glucosa (Man/Glc) en hoja de plantas de olivo pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 6 semanas. Plantas no pretratadas (NP) y con 0 mM NaCl se utilizaron como control. Los datos son medias  $\pm$  SE ( $n=3$ ). Las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

Con el fin de comparar la respuesta de distintos tipos de azúcares frente al pretratamiento con reguladores del crecimiento y el estrés salino calculamos la relación manitol/glucosa (Man/Glc) (Tabla 3.15; Figura 3.10). Este parámetro, según los valores medios, aumentó respecto a plantas NP con todos los reguladores del crecimiento y con 100 mM NaCl respecto a 0 mM (104%).

**Tabla 3.15.** Contenido de almidón y relación manitol/glucosa (Man/Glc) en hoja de plantas de olivo pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 6 semanas.

	Almidón (mg g <sup>-1</sup> PS)	Man/Glc
<b>Regulador</b>		
NP	12,73 c	0,795 e
GA <sub>3</sub>	13,27 c	1,37 a
AIA	3,87 d	1,14 c
AS	24,26 a	1,26 b
QUIN	16,29 b	1,06 d
<b>Salinidad</b>		
0 mM	17,98 a	0,824 b
100 mM	15,51 a	1,68 a
200 mM	6,77 b	0,873 b

En cada columna, para cada fuente de variación (regulador o salinidad), las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

En plantas NP, en condiciones de estrés salino, se favoreció el acúmulo de glucosa respecto al de manitol, lo cual se manifestó en un descenso de la relación Man/Glc ( $\approx 27\%$ ). En cuanto a los pretratamientos, el efecto de la salinidad fue diferente según el regulador. En plantas crecidas sin sal (0 mM NaCl), las pretratadas con AIA y QUIN redujeron la relación Man/Glc aproximadamente un 46%, con GA<sub>3</sub> aumentó un 19% y con AS no se observaron diferencias ( $P \leq 0,05$ ) respecto al control. Con 100 mM, todos los pretratamientos incrementaron la relación Man/Glc respecto al control, puesto que se favoreció la acumulación de manitol y/o los niveles de glucosa descendieron; con AIA y AS aumentó en torno al 117%, con QUIN un 101% y con GA<sub>3</sub> un 57%. Los valores más elevados se observaron con AIA y AS ( $\approx 2,12\%$ ). En contraste, con 200 mM todos los reguladores mostraron una relación Man/Glc menor que el control e igual a plantas NP (200 mM), excepto las plantas con GA<sub>3</sub> que la incrementaron un 45% ( $P \leq 0,05$ ) respecto a plantas control. Es interesante destacar que las plantas con GA<sub>3</sub>

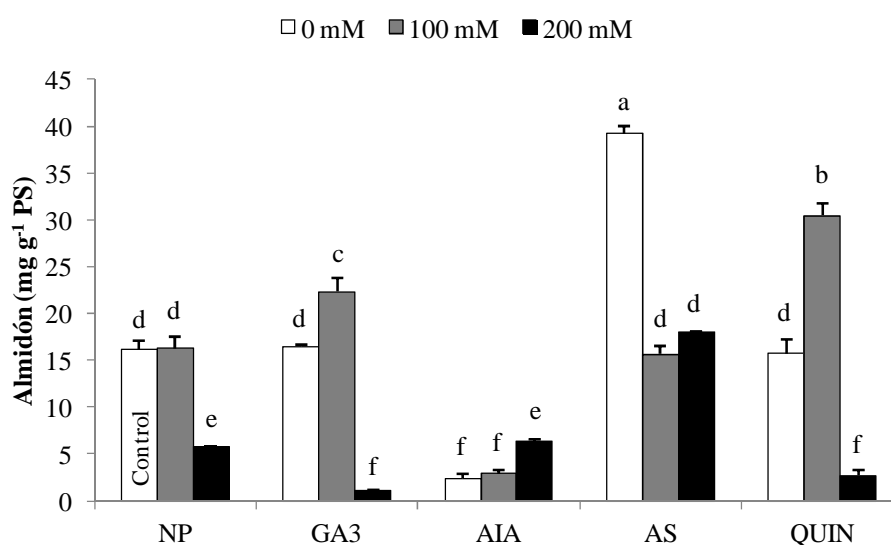
incrementaron la relación Man/Glc independientemente del nivel de NaCl.

El contenido de almidón aumentó respecto a plantas NP en las pretratadas con AS (91%), QUIN (28%) y descendió en las pretratadas con AIA (70%) (Tabla 3.15). Atendiendo a los valores medios para cada nivel de NaCl, sólo descendió con 200 mM (62%).

Como podemos observar en la figura 3.9, la sal afectó al contenido de almidón de forma diferente en cada pretratamiento. En plantas crecidas sin sal, las pretratadas con AIA redujeron un 85% el contenido de almidón, mientras que, con AS se incrementó un 143% ( $P \leq 0,05$ ), observándose en estas plantas el valor más alto (39,18 mg g<sup>-1</sup> PS). Con GA<sub>3</sub> y QUIN no se observaron diferencias respecto al control ( $P \leq 0,05$ ). En plantas NP, los niveles de almidón sólo descendieron respecto al control con 200 mM NaCl (64%). En plantas con GA<sub>3</sub> y QUIN, el contenido de almidón varió de forma diferente según el nivel de sal, con 100 mM se incrementó un 38 y 89%, respectivamente, y con 200 mM descendió en torno al 88% en ambos pretratamientos. Con AIA, 100 y 200 mM NaCl redujeron el contenido de almidón respecto al control un 82 y 61 %, respectivamente; sin embargo si lo comparamos con plantas con AIA y 0 mM, la aplicación de 200 mM lo aumentó un 161%. En cuanto al AS, el contenido de almidón de plantas con 100 y 200 mM no mostró diferencias respecto al control, en cambio, respecto a plantas con AS crecidas en ausencia de sal (0 mM NaCl) descendió ( $\approx 57\%$ ,  $P \leq 0,05$ ).

El contenido de almidón se correlacionó de forma negativa con el contenido de glucosa ( $r = -0,399$ ;  $P \leq 0,001$ ; tabla 3.18.b) y de forma positiva con la sacarosa ( $r = 0,447$ ;  $P \leq 0,001$ ).





**Figura 3.9.** Contenido de almidón en hoja de plantas de olivo pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 6 semanas. Plantas no pretratadas (NP) y con 0 mM NaCl se utilizaron como control. Los datos son medias  $\pm$  SE (n=4). Las medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

Otro metabolito importante a tener en cuenta en condiciones de estrés salino es la prolina. Atendiendo al análisis estadístico, la fuente de variación que mayor efecto tuvo sobre su contenido fue el regulador ( $\eta^2=0,695$ ;  $P \leq 0,001$ ), seguido por la interacción entre regulador y salinidad ( $\eta^2=0,212$ ;  $P \leq 0,001$ ) (Tabla 3.16). Según los valores medios para cada regulador (Tabla 3.17), el AIA fue el único regulador que redujo el contenido de prolina respecto a plantas NP (17%). Con GA<sub>3</sub> y AS aumentó una media del 60% y con QUIN un 20%. La salinidad incrementó el contenido de prolina sólo con 100 mM (12%). En lo que respecta a la interacción, las plantas NP crecidas con 100 mM aumentaron el contenido de prolina un 17% respecto al control. Las plantas pretratadas con GA<sub>3</sub> y AS aumentaron la prolina con todos los niveles de sal. Es interesante destacar que con AS, las plantas con sal incrementaron el contenido de prolina respecto a plantas con AS sin NaCl, sin embargo, con GA<sub>3</sub> ocurrió lo

contrario. Las plantas pretratadas con QUIN incrementaron el contenido de prolina con 100 y 200 mM (58 y 16%, respectivamente). Con AIA no se detectaron diferencias respecto al control con 0 y 100 mM NaCl, mientras que, con 200 mM NaCl se redujo un 21%. Por tanto, los pretratamientos que favorecieron el acúmulo de prolina en condiciones de estrés salino (100 y 200 mM), en comparación con plantas NP, fueron GA<sub>3</sub>, AS y QUIN

Las poliaminas estudiadas en este trabajo fueron espermina (SPM) y espermidina (SPD). La SPM estuvo condicionada principalmente por el regulador ( $\eta^2=0,626$ ;  $P\leq 0,001$ ), mientras que en la SPD, fue la interacción entre regulador y salinidad la principal fuente de variación ( $\eta^2=0,380$ ;  $P\leq 0,001$ ) (Tabla 3.16).

**Tabla 3.16.** Valor  $F$  y coeficiente de determinación ( $\eta^2$ ) para regulador, salinidad y su interacción (regulador x salinidad), del contenido de prolina, espermina (SPM), espermidina (SPD) y producción de etileno en hoja de plantas de olivo pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 6 semanas.

Parámetro	Fuente de variación					
	Regulador		Salinidad		Regulador x Salinidad	
	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$
Prolina	141,56***	0,695	15,29***	0,037	21,64***	0,212
SPM	43,29***	0,626	2,48 <sup>NS</sup>	-	6,69***	0,193
SPD	2,77*	0,111	2,89 <sup>NS</sup>	-	4,75***	0,380
Etileno	47,86***	0,475	32,36***	0,161	8,93***	0,177

NS, \*, \*\*, \*\*\* indican diferencias no significativas o diferencias significativas para  $P\leq 0,05$ , 0,01 ó 0,001, respectivamente.

Las plantas pretratadas con GA<sub>3</sub> no mostraron diferencias respecto a plantas NP ( $P\leq 0,05$ ) en el contenido de SPM, en cambio, redujeron un 30% el contenido de SPD. Con AIA y QUIN, el contenido de SPM aumentó respecto a plantas NP en torno a un 58%, mientras que con AS aumentó un 196%. En contraste, la SPD de plantas con AIA, AS y QUIN no mostró diferencias respecto a plantas NP ( $P\leq 0,05$ ). Según los valores medios para salinidad, 100 y 200 mM no afectaron al contenido de SPM comparado con

0 mM NaCl. Sin embargo, si comparamos ambos niveles de sal, detectamos un descenso del 13% con 200 mM respecto a 100 mM NaCl. En el caso de la SPD, con 100 mM se redujo un 23%, mientras que, con 200 mM no varió.

**Tabla 3.17.** Contenido de prolina, espermina (SPM), espermidina (SPD) y producción de etileno en hoja de plantas de olivo pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 6 semanas. Plantas no pretratadas (NP) y con 0 mM NaCl se utilizaron como control.

	Prolina ( $\mu\text{g g}^{-1}$ PS)	SPM ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ PS)	SPD ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ PS)	Etileno ( $\text{nl g}^{-1}$ PF $\text{h}^{-1}$ )
<b>Regulador</b>				
NP	154,51 c	0,355 d	0,345 a	3,13 a
GA <sub>3</sub>	247,99 a	0,442 cd	0,240 b	1,63 bc
AIA	128,69 d	0,570 b	0,389 a	2,84 a
AS	246,03 a	1,05 a	0,340 ab	1,38 c
QUIN	186,18 b	0,556 bc	0,379 a	1,82 b
<b>Salinidad</b>				
0 mM	186,13 b	0,619 ab	0,390 a	2,27 b
100 mM	208,37 a	0,630 a	0,300 b	1,62 c
200 mM	183,54 b	0,538 b	0,326 ab	2,59 a
<b>Regulador x Salinidad</b>				
Control	144,81 hi	0,425 cd	0,319 bcd	2,46 cd
NP+100	169,47 fg	0,307 de	0,304 cd	2,47 cd
NP+200	149,26 ghi	0,331 cde	0,411 abc	4,46 a
GA <sub>3</sub> +0	297,61 a	0,463 cd	0,438 abc	1,59 fg
GA <sub>3</sub> +100	238,40 c	0,527 c	0,203 de	1,17 gh
GA <sub>3</sub> +200	207,97 de	0,336 cde	0,080 e	2,14 de
AIA+0	137,29 i	0,748 b	0,349 bcd	3,67 b
AIA+100	133,90 ij	0,770 b	0,324 bcd	1,88 ef
AIA+200	114,90 j	0,193 e	0,492 ab	2,98 c
AS+0	189,52 ef	1,03 a	0,270 cd	1,59 fg
AS+100	270,84 b	1,05 a	0,330 bcd	0,96 fg
AS+200	277,72 ab	1,08 a	0,421 abc	1,59 h
QUIN+0	161,44 gh	0,424 cd	0,575 a	2,05 def
QUIN+100	229,24 cd	0,495 cd	0,337 bcd	1,63 efg
QUIN+200	167,85 fg	0,748 b	0,226 de	1,77 ef

En cada columna, para cada fuente de variación (regulador, salinidad o su interacción), las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

Según la interacción entre regulador y salinidad, en plantas NP el estrés salino no tuvo ningún efecto sobre el contenido de poliaminas (SPM y SPD). Con AS, se

observó un incremento significativo ( $P \leq 0,05$ ) del contenido de SPM, independientemente del nivel de sal, comparado con plantas control ( $\approx 148\%$ ). El pretratamiento con  $GA_3$  no afectó al contenido de SPM con ninguno de los niveles de NaCl ensayado. Con AIA, en 0 y 100 mM aumentó aproximadamente un 79%, mientras que con 200 mM se redujo un 54%. Con QUIN, la SPM solo aumentó con 200 mM NaCl (76%). La SPD, descendió en plantas pretratadas con  $GA_3$  y con 200 mM NaCl (75%) y aumentó en plantas con QUIN sin sal (80%).

El análisis estadístico mostró que la principal fuente de variación para la producción de etileno fue el regulador ( $\eta^2=0,475$ ;  $P \leq 0,001$ ). Según los valores medios para cada regulador, en comparación con plantas NP, las pretratadas con  $GA_3$ , AS y QUIN descendieron significativamente ( $P \leq 0,05$ ) la producción de etileno, mientras que, las pretratadas con AIA no mostraron diferencias estadísticas. Para salinidad, el etileno se redujo un 29% con 100 mM, en cambio aumentó un 14% con 200 mM.

Según la interacción entre regulador y salinidad, en comparación con plantas control, la producción de etileno en plantas crecidas sin NaCl descendió con  $GA_3$  y AS ( $\approx 35\%$ ), aumentó con AIA (49%) y no mostró diferencias ( $P \leq 0,05$ ) con QUIN. Con 100 mM, la producción de etileno descendió con todos los reguladores (52, 23, 61 y 34% para  $GA_3$ , AIA, AS, QUIN, respectivamente). Con 200 mM, las plantas NP incrementaron la producción de etileno un 81% respecto al control, además mostraron el valor más elevado ( $4,46 \text{ nl g}^{-1} \text{ PF h}^{-1}$ ); con AS y QUIN se redujo ( $P \leq 0,05$ ) un 35 y 28%, respectivamente, mientras que, con  $GA_3$  y AIA no se observaron diferencias significativas.

**Tabla 3.18.a.** Matriz de correlaciones entre las variables estudiadas.

	PS raíz	R/PA	Elongación	AF total	Nº hojas	AFH	Expansión	Na <sup>+</sup> hoja	K <sup>+</sup> hoja	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> hoja	Na <sup>+</sup> raíz	K <sup>+</sup> raíz	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> raíz	RWC	WCS
PS PA	0,650***	-0,012 <sup>NS</sup>	0,464***	0,780***	0,520***	0,442***	0,415***	-0,314**	0,276**	0,342**	-0,475***	0,277**	0,431***	0,240*	-0,306**
PS raíz		0,022 <sup>NS</sup>	0,545***	0,671***	0,435***	0,518***	0,522***	-0,371***	0,319**	0,420***	-0,551***	0,392***	0,573***	0,295**	-0,394***
R/PA			-0,172 <sup>NS</sup>	0,060 <sup>NS</sup>	-0,070 <sup>NS</sup>	0,073 <sup>NS</sup>	0,081 <sup>NS</sup>	0,349***	-0,264*	-0,247*	0,151 <sup>NS</sup>	-0,218*	-0,137 <sup>NS</sup>	-0,085 <sup>NS</sup>	0,102 <sup>NS</sup>
Elongación				0,536***	0,572***	0,495***	0,524***	-0,568***	0,395***	0,585***	-0,667***	0,558***	0,570***	0,586***	-0,558***
AF total					0,431***	0,573***	0,576***	-0,248*	0,228*	0,317**	-0,491***	0,304**	0,398***	0,354***	-0,370***
Nº hojas						0,522***	0,498***	-0,480***	0,348***	0,522***	-0,567***	0,535***	0,561***	0,376***	-0,445***
AFH							0,930***	-0,489***	0,135 <sup>NP</sup>	0,518***	-0,637***	0,557***	0,513***	0,464***	-0,611***
Expansión								-0,506***	0,211*	0,555***	-0,684***	0,621***	0,550***	0,527***	-0,643***
Na <sup>+</sup> hoja									-0,521***	-0,885***	0,848***	-0,761***	-0,703***	-0,547***	0,638***
K <sup>+</sup> hoja										0,678***	-0,628***	0,734***	0,637***	0,489***	-0,475***
K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> hoja											-0,894***	0,861***	0,784***	0,581***	-0,642***
Na <sup>+</sup> raíz												-0,846***	-0,826***	-0,627***	0,735***
K <sup>+</sup> raíz													0,755***	0,703***	-0,731***
K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> raíz														0,380***	-0,517***
RWC															-0,775***
WCS															

NS, \*, \*\*, \*\*\* indica diferencias no significativas o significativas para  $P \leq 0,05, 0,01, 0,001$ .

**Tabla 3.18.b.** Matriz de correlaciones entre las variables estudiadas.

	WSD	C <sub>a+b</sub>	Car	C <sub>a</sub> /C <sub>b</sub>	C <sub>a+b</sub> /Car	Manitol	Sacarosa	Inositol	Glucosa	Fructosa	Almidón	Prolina	SPM	SPD	Etileno
PS PA	-0,182*	0,348***	0,360***	0,281**	0,140 <sup>NS</sup>	-0,204 <sup>NS</sup>	0,229*	0,192 <sup>NS</sup>	-0,303**	0,014 <sup>NS</sup>	0,291**	0,066 <sup>NS</sup>	0,039 <sup>NS</sup>	-0,135 <sup>NS</sup>	-0,316**
PS raíz	-0,245*	0,401***	0,394***	0,377***	0,279**	-0,421***	0,337**	0,203*	-0,235*	-0,054 <sup>NS</sup>	0,484***	0,071 <sup>NS</sup>	0,103 <sup>NS</sup>	-0,097 <sup>NS</sup>	-0,289**
R/PA	0,124 <sup>NS</sup>	0,130 <sup>NS</sup>	0,174 <sup>NS</sup>	-0,039 <sup>NS</sup>	-0,082 <sup>NS</sup>	0,078 <sup>NS</sup>	0,025 <sup>NS</sup>	-0,171 <sup>NS</sup>	0,040 <sup>NS</sup>	-0,192 <sup>NS</sup>	0,165 <sup>NS</sup>	0,159 <sup>NS</sup>	-0,164 <sup>NS</sup>	-0,116 <sup>NS</sup>	0,138 <sup>NS</sup>
Elongación	-0,510***	0,129 <sup>NS</sup>	0,138 <sup>NS</sup>	0,084 <sup>NS</sup>	0,065 <sup>NS</sup>	-0,441***	0,423***	0,458***	-0,308**	0,390***	0,225*	-0,117 <sup>NS</sup>	0,040 <sup>NS</sup>	0,034 <sup>NS</sup>	-0,179 <sup>NS</sup>
AF total	-0,292**	0,417***	0,418***	0,271**	0,232*	-0,245*	0,290**	0,255*	-0,281**	-0,112 <sup>NS</sup>	0,249*	0,027 <sup>NS</sup>	0,002 <sup>NS</sup>	-0,233*	-0,253*
Nº hojas	-0,327**	-0,076 <sup>NS</sup>	-0,064 <sup>NS</sup>	-0,070 <sup>NS</sup>	-0,032 <sup>NS</sup>	-0,452***	0,440***	0,396***	-0,426***	0,285**	0,211*	0,024 <sup>NS</sup>	0,013 <sup>NS</sup>	0,044 <sup>NS</sup>	-0,112 <sup>NS</sup>
AFH	-0,430***	0,313**	0,295**	0,267*	0,270*	-0,560***	0,717***	0,546***	-0,399***	-0,033 <sup>NS</sup>	0,343***	0,166 <sup>NS</sup>	0,160 <sup>NS</sup>	0,050 <sup>NS</sup>	-0,169 <sup>NS</sup>
Expansión	-0,475***	0,281**	0,256*	0,223*	0,310**	-0,600***	0,720***	0,589***	-0,359***	-0,051 <sup>NS</sup>	0,338**	0,094 <sup>NS</sup>	0,099 <sup>NS</sup>	0,017 <sup>NS</sup>	-0,119 <sup>NS</sup>
Na <sup>+</sup> hoja	0,465***	-0,107 <sup>NS</sup>	-0,066 <sup>NS</sup>	-0,212*	-0,311**	0,652***	-0,519***	-0,620***	0,372***	-0,438***	-0,256*	-0,090 <sup>NS</sup>	-0,236*	-0,268*	0,208*
K <sup>+</sup> hoja	-0,408***	-0,201 <sup>NS</sup>	-0,259*	-0,154 <sup>NS</sup>	0,281**	-0,537***	0,166 <sup>NS</sup>	0,479***	-0,012 <sup>NS</sup>	0,319**	0,128 <sup>NS</sup>	-0,322**	-0,006 <sup>NS</sup>	0,253*	0,217*
K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> hoja	-0,496***	0,040 <sup>NS</sup>	0,005 <sup>NS</sup>	0,070 <sup>NS</sup>	0,289**	-0,764***	0,469***	0,664***	-0,226*	0,315**	0,133 <sup>NS</sup>	0,000 <sup>NS</sup>	-0,002 <sup>NS</sup>	0,340**	0,016 <sup>NS</sup>
Na <sup>+</sup> raíz	0,561***	-0,271**	-0,233*	-0,169 <sup>NS</sup>	-0,437***	0,780***	-0,579***	-0,694***	0,406***	-0,251*	-0,356***	-0,068 <sup>NS</sup>	-0,133 <sup>NS</sup>	-0,138 <sup>NS</sup>	0,107 <sup>NS</sup>
K <sup>+</sup> raíz	-0,646***	-0,141 <sup>NS</sup>	-0,212*	-0,146 <sup>NS</sup>	0,380***	-0,825***	0,572***	0,807***	-0,113 <sup>NS</sup>	0,256*	0,175 <sup>NS</sup>	-0,295**	-0,008 <sup>NS</sup>	0,294**	0,199 <sup>NS</sup>
K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> raíz	-0,323**	0,059 <sup>NS</sup>	0,056 <sup>NS</sup>	0,146 <sup>NS</sup>	0,136 <sup>NS</sup>	-0,852***	0,386***	0,366***	-0,324**	0,273**	0,504***	0,084 <sup>NS</sup>	0,143 <sup>NS</sup>	0,202 <sup>NS</sup>	-0,113 <sup>NS</sup>
RWC	-0,874***	-0,061 <sup>NS</sup>	-0,116 <sup>NS</sup>	-0,129 <sup>NS</sup>	0,315**	-0,432***	0,621***	0,754***	-0,192 <sup>NS</sup>	0,233*	0,104 <sup>NS</sup>	-0,284**	-0,007 <sup>NS</sup>	0,085 <sup>NS</sup>	0,087 <sup>NS</sup>
WCS	0,759***	-0,062 <sup>NS</sup>	-0,023 <sup>NS</sup>	-0,058 <sup>NS</sup>	-0,313**	0,504***	-0,757***	-0,714***	0,334**	-0,325**	-0,339**	0,132 <sup>NS</sup>	-0,090 <sup>NS</sup>	-0,157 <sup>NS</sup>	0,056 <sup>NS</sup>
WSD		0,053 <sup>NS</sup>	0,107 <sup>NS</sup>	0,126 <sup>NS</sup>	-0,307**	0,384***	-0,556***	-0,693***	0,178 <sup>NS</sup>	-0,185 <sup>NS</sup>	-0,098 <sup>NS</sup>	0,316**	0,005 <sup>NS</sup>	-0,070 <sup>NS</sup>	-0,107 <sup>NS</sup>
C <sub>a+b</sub>			0,987***	0,812***	0,569***	0,013 <sup>NS</sup>	0,161 <sup>NS</sup>	-0,036 <sup>NS</sup>	-0,125 <sup>NS</sup>	-0,267*	0,381***	0,583***	0,315**	-0,214*	-0,551***
Car				0,810***	0,435***	0,049 <sup>NS</sup>	0,143 <sup>NS</sup>	-0,116 <sup>NS</sup>	-0,164 <sup>NS</sup>	-0,233*	0,395***	0,621***	0,258*	-0,221*	-0,571***
C <sub>a</sub> /C <sub>b</sub>					0,366***	0,053 <sup>NS</sup>	0,218*	-0,184 <sup>NS</sup>	-0,099 <sup>NS</sup>	-0,082 <sup>NS</sup>	0,544***	0,635***	0,361***	0,045 <sup>NS</sup>	-0,750***
C <sub>a+b</sub> /Car						-0,267*	0,245*	0,452***	0,121 <sup>NS</sup>	-0,289**	0,175*	0,107 <sup>NS</sup>	0,348***	-0,070 <sup>NS</sup>	-0,107 <sup>NS</sup>
Manitol							-0,401***	-0,526***	0,241*	-0,107 <sup>NS</sup>	-0,328**	-0,010 <sup>NS</sup>	-0,134 <sup>NS</sup>	-0,266*	-0,175 <sup>NS</sup>
Sacarosa								0,686***	-0,350***	0,105 <sup>NS</sup>	0,447***	0,115 <sup>NS</sup>	-0,001 <sup>NS</sup>	0,096 <sup>NS</sup>	-0,240*
Inositol									-0,167 <sup>NS</sup>	0,058 <sup>NS</sup>	-0,055 <sup>NS</sup>	-0,266*	-0,025 <sup>NS</sup>	0,088 <sup>NS</sup>	0,144 <sup>NS</sup>
Glucosa										-0,086 <sup>NS</sup>	-0,399***	-0,436***	-0,318**	0,207*	0,370***
Fructosa											0,075 <sup>NS</sup>	-0,124 <sup>NS</sup>	0,131 <sup>NS</sup>	0,362***	-0,022 <sup>NS</sup>
Almidón												0,407***	0,275**	0,049 <sup>NS</sup>	-0,436***
Prolina													0,365***	-0,083 <sup>NS</sup>	-0,592***
SPM														-0,076 <sup>NS</sup>	-0,391***
SPD															0,189 <sup>NS</sup>

NS, \*, \*\*, \*\*\* indica diferencias no significativas o significativas para  $P \leq 0,05, 0,01, 0,001$ .

### **3.2. Discusión**

El efecto adverso que produce la salinidad sobre el crecimiento y desarrollo del olivo ha sido descrito por diferentes autores (Perica et al., 2008; Kchaou et al., 2010, 2013; Bader et al., 2015) y, más concretamente, en el cv. Picual por Melgar et al. (2008). Sin embargo, como se pone de manifiesto en experimentos anteriores presentados en este trabajo, el efecto de la salinidad depende del grado de tolerancia del cultivar, del nivel de sal y del tiempo de exposición. En general, en el cv. Picual, la inhibición del crecimiento se acentuó con el tiempo de exposición y el nivel de sal (Tablas 3.3, 3.4 y 3.5).

Según Kaya et al. (2009), la reducción del crecimiento en condiciones de estrés salino puede ser el resultado de un desequilibrio hormonal, por tanto, la aplicación exógena de reguladores del crecimiento podría contrarrestar el efecto negativo de la salinidad. De hecho, en otros cultivos se ha descrito mejora del crecimiento en condiciones de estrés salino por la aplicación de diferentes reguladores del crecimiento (Kaya et al., 2009). En plantas enraizadas del cv. Picual, los reguladores del crecimiento que favorecieron el crecimiento en presencia de NaCl fueron QUIN, GA<sub>3</sub> y AIA. En general, las plantas pretratadas con QUIN incrementaron el PSPA (100 y 200 mM), PS de raíz (200 mM), AF total (100 y 200 mM) y elongación de tallo (100 y 200 mM); con GA<sub>3</sub> se incrementó el PSPA (100 y 200 mM) y AF total (100 y 200 mM), mientras que, con AIA sólo aumentó la elongación de tallo (100 mM). Otros autores también describieron una mejora del crecimiento en plantas con reguladores de crecimiento; así Wu et al. (2012), observaron un aumento del peso fresco y seco y de la altura por la aplicación de QUIN en plantas de berenjena sometidas a estrés salino (90 mM NaCl). Khan et al. (2010) detectaron mayor PSPA y AF por la aplicación de GA<sub>3</sub> en plantas de

lino en condiciones de salinidad (150 mM NaCl). De forma similar, Shomeili et al. (2011) observaron un incremento del PS de plantas de caña de azúcar con GA<sub>3</sub>. Por otro lado, El-Samad (2013) describe incremento del crecimiento de plantas de trigo salinizadas por la aplicación de GA<sub>3</sub> y AIA, siendo más efectivo el GA<sub>3</sub> que el AIA.

En contraste, en el cv. Picual la aplicación de AS no mejoró ninguno de los parámetros de crecimiento estudiados. Sin embargo, las plantas con AS y AIA fueron las que mostraron la mayor capacidad de exclusión de sal (Figura 3.5), puesto que acumularon mayor cantidad de Na<sup>+</sup> en la raíz evitando así su transporte hacia la parte aérea. Por tanto, y de acuerdo a la afirmación de Flowers and Yeo (1995), el descenso del crecimiento por la salinidad puede suponer un mecanismo de tolerancia que proteja a la parte aérea de la acumulación excesiva de iones salinos. Esto se confirma con la elevada correlación negativa observada entre el Na<sup>+</sup> de raíz y PSPA ( $r=-0,475$ ,  $P\leq 0,001$ ), PS de raíz ( $r=-0,551$ ,  $P\leq 0,001$ ), elongación de tallo ( $r=-0,667$ ,  $P\leq 0,001$ ), AF total ( $r=-0,491$ ,  $P\leq 0,001$ ), número de hojas ( $r=-0,567$ ,  $P\leq 0,001$ ), AFH ( $r=-0,637$ ,  $P\leq 0,001$ ) y expansión de la hoja ( $r=-0,684$ ,  $P\leq 0,001$ ) (Tabla 3.18.a). De hecho en el cv. Picual, la menor capacidad de exclusión se observó en plantas con GA<sub>3</sub> y QUIN que fueron las que aumentaron su crecimiento en condiciones de estrés salino.

Según Chartzoulakis (2005), una mayor capacidad de exclusión de iones salinos, se asocia con una mayor tolerancia del olivo al estrés salino. Por lo tanto, los pretratamientos con AS AIA mejoraron la tolerancia del cv. Picual al estrés salino. En consonancia con estos resultados, otros autores han descrito un descenso de la acumulación de iones salinos en hoja por la aplicación de AS (Gunes et al., 2007; Syeed et al., 2011). Por otra parte, Iqbal and Ashraf (2007) describieron mejora del crecimiento de plantas de trigo sometidas a estrés salino y menor absorción de Na<sup>+</sup> por



la raíz, por la aplicación de AIA.

El  $\text{Na}^+$  interfiere en la absorción de  $\text{K}^+$  por la raíz (Bandeh-hagh et al., 2008), en consecuencia, en el cv. Picual el contenido de  $\text{K}^+$  descendió por la salinidad, siendo este descenso mayor en raíz que en hoja en todos los casos; de hecho, el  $\text{K}^+$  de hoja y raíz se correlaciona de forma negativa con el  $\text{Na}^+$  de hoja y raíz. Por tanto, la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  también descendió con la salinidad en ambos órganos. Esto es importante, puesto que Tattini et al. (2008) relacionan la tolerancia a la salinidad no sólo con la capacidad de exclusión de sales de la parte aérea sino también con la capacidad de mantener una apropiada relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  en los tejidos en crecimiento activo. De hecho, las plantas del cv. Picual pretratadas con AS y AIA fueron las que menos  $\text{Na}^+$  acumularon en hoja y las que menos redujeron la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ . Este efecto del AS también ha sido descrito en otras especies vegetales, así, en pepino se ha descrito menor acumulación de  $\text{Na}^+$  y mayor acumulación de  $\text{K}^+$  en hoja y raíz de plantas sometidas a estrés salino por la aplicación de AS (Baninasab and Baghbanha, 2013). Además, en plantas de trigo bajo estrés salino (80 mM), la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  aumenta en proporción a la concentración de AS aplicado (Kaydan et al., 2007).

En el cv. Picual, el descenso del RWC, junto con el aumento del WCS y el WSD, indica la pérdida de agua por la planta en situación de estrés salino. Resultados similares describieron Ben Ahmed et al. (2009) y Remorini et al. (2009) para otros cultivares de olivo. Según Katerji et al. (1997), el descenso del RWC indica una pérdida de turgencia de la hoja, lo cual limita la expansión celular; de hecho, el RWC se correlacionó de forma positiva con los parámetros de crecimiento estudiados, excepto con la relación R/PA. La mejora del estado hídrico por la aplicación de reguladores del crecimiento ha sido descrita por Gadallah et al. (1999) (QUIN en trigo), Khan et al.

(2010) ( $GA_3$  en lino) y Agami et al. (2013) (AS en maíz) entre otros. Sin embargo, en nuestro experimento ninguno de los reguladores del crecimiento mejoró el estado hídrico de la planta en condiciones de salinidad.

El efecto adverso de la salinidad sobre el contenido de pigmentos fotosintéticos ha sido descrito previamente en otros cultivares de olivo (Ben Ahmed et al., 2009, 2010, 2011; Kchaou et al., 2013). Según Smirnoff (1993), se trata de un síntoma del estrés oxidativo producido en condiciones de salinidad y puede ser resultado de la destrucción o inhibición en la síntesis de clorofila. En condiciones de estrés salino, un descenso de la relación  $C_a/C_b$  tuvo lugar en plantas NP y con AIA (Tabla 3.12), lo que indica mayor sensibilidad de la  $C_a$  al estrés salino que la  $C_b$ . Según Mane et al. (2011), el descenso de la relación  $C_a/C_b$  por la salinidad indica que la  $C_a$  podría ser reemplazada por la  $C_b$ . Además, en el cv. Picual, descendió la relación  $C_{a+b}/Car$  en todos los casos por la salinidad. Esto es importante, puesto que Parida and Das (2005), describen los Car como antioxidantes no enzimáticos implicados en la protección de las plantas frente al estrés oxidativo. Por tanto, su acumulación protegería a la planta frente al estrés oxidativo que se genera en condiciones de estrés salino. En el cv. Picual, los pretratamientos con  $GA_3$ , AS y QUIN aumentaron Car y  $C_{a+b}$  en condiciones de salinidad. En el caso de la QUIN podría ser debido a la capacidad de esta fitohormona para reducir la actividad clorofilasa, estimular el desarrollo de los cloroplastos y la síntesis de pigmentos (Chernyad'ev, 2009). Resultados similares a los nuestros fueron descritos en plantas de trigo y arroz sometidas a estrés salino y tratadas con QUIN (Gadallah, 1999). Saeedipour (2014), también describe mejora de la concentración de clorofila en condiciones de estrés salino por la aplicación de AIA y ninguna mejora por la aplicación de  $GA_3$ , en contraste a lo que ocurre con el cv. Picual. Sin embargo, en

plantas de lino con 150 mM NaCl, Khan et al. (2010) observaron una mejora del contenido de clorofila por la aplicación de GA<sub>3</sub>. Por otra parte, Moussa et al. (2003) detectaron un aumento de los pigmentos fotosintéticos por la aplicación de AS en plantas de maíz crecidas con sal (50, 100 y 150 mM NaCl).

Glucosa, manitol, fructosa, inositol, sacarosa y almidón, en orden decreciente de abundancia, son algunos de los azúcares presentes en la hoja de olivo (Flora and Madore, 1993; Romani et al., 1994). Según Tattini et al. (1996), en hoja de olivo la concentración de manitol y glucosa aumenta con la salinidad, mientras que, el resto de azúcares no se afectan. Los resultados obtenidos para plantas NP del cv. Picual coinciden, en parte, con lo descrito por estos autores ya que en condiciones de estrés salino, glucosa y manitol aumentaron, aunque en el caso del manitol sólo con 100 mM NaCl, y el resto de azúcares descendieron (Tabla 3.14). Esto podría implicar que los azúcares totales solubles no se modifiquen por la salinidad, explicándose de esta forma los resultados expuestos en las tablas 1.12 y 2.7 (pág. 92 y 117, respectivamente) de este trabajo. El aumento de glucosa fue mayor que el de manitol en plantas NP, lo cual dio lugar al descenso de la relación Man/Glc con la salinidad; en contraste, según Tattini et al. (1996), en condiciones de salinidad, la acumulación de manitol tiene lugar antes que la de glucosa, aumentando, por tanto, la relación Man/Glc; esto puede deberse a que la formación de nuevos asimilados del carbono se dirige preferentemente hacia el manitol a expensas de la glucosa (Gucci et al., 1998, 1999). Estos resultados sí coinciden con lo observado en plantas pretratadas y crecidas con 100 mM NaCl, lo que indica que con este nivel de sal todos los reguladores del crecimiento favorecieron la acumulación de manitol. AIA y AS fueron los pretratamientos que más aumentaron la relación Man/Glc. Además, con GA<sub>3</sub>, también se favoreció la formación de manitol en el caso de plantas

crecidas con 200 mM. La acumulación de manitol juega un papel importante en la bioquímica de las plantas de olivo sometidas a estrés salino (Tattini et al., 1996; Rejškova et al., 2007), ya que puede actuar como soluto compatible contribuyendo al ajuste osmótico (Tattini et al., 1996, 2002) o como antioxidante capaz de eliminar los radicales hidroxilo (Shen et al., 1997; Seki et al., 2007).

Según Parida et al. (2002), además de azúcares, en condiciones de estrés salino también se acumula almidón; dicha afirmación contradice nuestros resultados en plantas NP. Sin embargo, con GA<sub>3</sub> y QUIN sí se observó acumulación de almidón con 100 mM NaCl. Javid et al. (2011), en arroz, describen un incremento del almidón con la aplicación exógena de AIA y QUIN en condiciones de salinidad; nuestros resultados con QUIN y 100 mM NaCl coinciden con lo descrito por estos autores.

Numerosos autores han descrito una mayor acumulación de prolina que de otros aminoácidos en plantas sometidas a estrés salino (Wyn Jones, 1981; Ashraf, 1993, 1994; Ali et al., 1999; Abraham et al., 2003), ya que este aminoácido, además de contribuir al ajuste osmótico, interviene en la eliminación de radicales libres, contribuye a la estabilidad de la membrana y regula el potencial redox (Tuteja, 2007). En olivo, también se ha descrito aumento de prolina en situaciones de estrés salino, aunque el nivel de sal a partir del cual se acumula este aminoácido depende del cultivar (Petridis and Therios, 2012). En consonancia con lo descrito por estos autores, en el cv. Picual se acumuló prolina con 100 mM, pero no con 200 mM NaCl, resultados que se confirman con los datos obtenidos en otros ensayos del presente trabajo (Tabla 1.12; pág. 92). Sin embargo, la aplicación de GA<sub>3</sub>, AS y QUIN incrementó el contenido de prolina con todos los niveles de NaCl. Según Iqbal et al. (2014), las fitohormonas o la interacción entre ellas, regulan el metabolismo de la prolina mediante la acumulación de N o Ca<sup>2+</sup>.

Tuna et al. (2008) y Khan et al. (2010) describen un incremento de prolina en plantas salinizadas de maíz y lino por la aplicación de GA<sub>3</sub>. En contraste, Kaya et al. (2006) describen una reducción de la prolina en plantas salinizadas de maíz. Según Palma et al. (2009), la tolerancia a la salinidad en plantas de judía a las que se les aplicó AS se relacionó con la acumulación de prolina y glicina betaína. Alsokari (2011), describe un aumento de prolina en plantas de *Vigna sinensis* no estresadas por la aplicación de QUIN, aunque en plantas salinizadas la aplicación de QUIN no favoreció su acumulación.

El efecto del estrés salino sobre el metabolismo de las poliaminas varía según la especie y según el tiempo de exposición (Ashraf and Harris, 2004). Prakash and Prathapasanen (1988) detectaron un descenso de los niveles de poliaminas en plántulas de arroz crecidas en condiciones de estrés salino. En contraste, El-Shintinanawy (2000) observó un aumento del contenido en SPM y SPD en plantas de trigo en estrés salino. En nuestro experimento, el contenido de SPM y SPD no se afectó por la salinidad en plantas NP. Las plantas pretratadas con AS incrementaron notablemente el contenido de SPM, independientemente de si crecieron con o sin NaCl (Tabla 3.17). Palma et al. (2013), observaron que en plantas de alfalfa no se acumuló SPD ni SPM en condiciones de estrés salino (200 mM NaCl) por la aplicación de AS. Según estos autores, en presencia de AS, se indujo la síntesis de etileno, lo cual explicaría el descenso de poliaminas, ya que ambas comparten precursor. En el cv. Picual, el aumento de SPM en plantas pretratadas con AS coincide con una inhibición en la producción de etileno. De hecho, la SPM se correlacionó negativamente con el etileno (Tabla 3.18.b).

## 4. Importancia de los reguladores del crecimiento en la respuesta de plantas de 1 año de *O. europaea* cv. Picual frente al estrés salino

### 4.1. Resultados

#### 4.1.1. Crecimiento vegetativo

El análisis estadístico mostró que la principal fuente de variación para el peso seco (PS) de hoja y el área foliar (AF) total fue la salinidad, con un coeficiente de determinación ( $\eta^2$ ) de 0,635 y 0,717, respectivamente (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1.** Valor  $F$  y coeficiente de determinación ( $\eta^2$ ) para regulador, salinidad y su interacción (regulador x salinidad), del peso seco (PS) de hoja, área foliar (AF) total, PS de tallo, elongación de tallo y relación raíz/parte aérea (R/PA) de plantas de olivo de 1 año pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 4 semanas.

Parámetro	Fuente de variación					
	Regulador		Salinidad		Regulador x Salinidad	
	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$
PS hoja	3,66**	0,060	97,10***	0,635	2,12*	0,069
AF total	5,77***	0,048	216,31***	0,717	6,98***	0,116
PS tallo	20,46***	0,356	32,19***	0,224	4,82***	0,168
Elongación	2,77*	0,079	29,83***	0,339	3,04**	0,173
R/PA	4,09**	0,080	49,81***	0,390	6,36***	0,249

NS, \*, \*\*, \*\*\* indican diferencias no significativas o diferencias significativas para  $P \leq 0,05$ , 0,01 ó 0,001, respectivamente.

Según los valores medios para cada regulador, en plantas pretratadas con AIA, AS, SPD y QUIN se observaron los valores más altos de PS de hoja y AF total (Tabla 4.2). Atendiendo a la salinidad, el PS de hoja y el AF total se redujeron en función del nivel de NaCl aplicado (100 y 200 mM NaCl).

Según la interacción entre regulador y salinidad, el PS de hoja de plantas crecidas sin NaCl aumentó un 29% respecto al control cuando se aplicó AIA y QUIN

(Tabla 4.2). En plantas NP y con 100 mM NaCl, el PS de hoja no mostró diferencias respecto a plantas control ( $P \leq 0,05$ ). En plantas pretratadas con GA<sub>3</sub>, la aplicación de 100 mM NaCl descendió el PS de hoja un 42% respecto a plantas control. Por otro lado, el tratamiento con 200 mM redujo el PS de hoja en todos los casos; las plantas NP y pretratadas con GA<sub>3</sub> y SPD mostraron la mayor inhibición ( $\approx 62\%$  respecto a plantas control), mientras que, las pretratadas con AIA, AS y QUIN fueron las que menos lo inhibieron ( $\approx 37\%$ ), de forma que, los valores del PS de hoja fueron, aproximadamente, un 133% superiores a los de plantas NP.

En plantas crecidas sin NaCl, con AIA y AS se observó un incremento medio del AF total del 30% respecto a plantas control. Con 100 mM NaCl, el AF total se inhibió en mayor proporción en plantas NP y pretratadas con GA<sub>3</sub>, AIA y QUIN ( $\approx 73\%$ ). Las plantas pretratadas con AS y SPD no inhibieron el AF total respecto a plantas control. El tratamiento con 200 mM NaCl inhibió el AF total en todos los casos; las plantas NP y las pretratadas con AS y SPD mostraron una inhibición media del 67% respecto al control, mientras que, las plantas con QUIN inhibieron el AF total un 23%. Finalmente, las pretratadas con GA<sub>3</sub> y AIA mostraron una inhibición intermedia ( $\approx 54\%$ ).

En relación al crecimiento del tallo, la variación del PS estuvo condicionada principalmente por el regulador ( $\eta^2=0,356$ ;  $P \leq 0,001$ ), seguido por la salinidad ( $\eta^2=0,224$ ;  $P \leq 0,001$ ) y la interacción entre ambos ( $\eta^2=0,168$ ;  $P \leq 0,001$ ). Sin embargo, la elongación descendió principalmente por la salinidad ( $\eta^2=0,339$ ;  $P \leq 0,001$ ) y la interacción entre salinidad y regulador ( $\eta^2=0,173$ ;  $P \leq 0,01$ ) (Tabla 4.1). Por tanto, los valores medios de elongación de tallo para cada regulador (Tabla 4.2) no mostraron diferencias ( $P \leq 0,05$ ) respecto a plantas NP. En contraste, el PS de tallo se afectó por el pretratamiento con reguladores del crecimiento, aumentando en las plantas con AIA

(24%) y descendiendo en las pretratadas con SPD (39%).

**Tabla 4.2.** Peso seco (PS) de hoja, área foliar (AF) total, PS de tallo, elongación de tallo y relación raíz/parte aérea (R/PA) de plantas de olivo de 1 año pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 4 semanas. Plantas no pretratadas (NP) y con 0 mM NaCl se utilizaron como control.

	PS hoja (g planta <sup>-1</sup> )	AF total (cm <sup>2</sup> planta <sup>-1</sup> )	PS tallo (g planta <sup>-1</sup> )	Elongación (cm planta <sup>-1</sup> )	R/PA
<b>Regulador</b>					
NP	0,630 b	57,17 c	0,190 b	19,92 abc	0,253 c
GA <sub>3</sub>	0,681 b	62,60 bc	0,182 b	21,21 ab	0,247 c
AIA	0,813 a	69,85 ab	0,235 a	21,96 a	0,266 bc
AS	0,813 a	76,16 a	0,196 b	17,01 c	0,296 a
SPD	0,740 ab	70,76 a	0,116 c	18,02 bc	0,282 ab
QUIN	0,839 a	71,25 a	0,186 b	18,22 bc	0,251 c
<b>Salinidad</b>					
0 mM	1,069 a	96,84 a	0,218 a	22,98 a	0,225 c
100 mM	0,730 b	69,46 b	0,186 b	20,89 a	0,254 b
200 mM	0,459 c	37,59 c	0,149 c	14,29 b	0,320 a
<b>Regulador x Salinidad</b>					
Control	0,907 cde	86,04 b	0,211 bcd	24,72 abc	0,176 i
NP+100	0,739 ef	66,18 d	0,218 bc	25,95 ab	0,198 hi
NP+200	0,244 i	19,30 f	0,142 efg	9,10 f	0,386 a
GA <sub>3</sub> +0	1,094 abc	93,51 b	0,235 ab	25,07 abc	0,222 fghi
GA <sub>3</sub> +100	0,535 fgh	55,98 d	0,152 efg	20,22 cd	0,240 efgh
GA <sub>3</sub> +200	0,413 hi	38,30 e	0,159 ef	18,35 d	0,279 cde
AIA+0	1,151 ab	110,20 a	0,231 ab	27,67 a	0,216 ghi
AIA+100	0,696 efg	58,84 d	0,239 ab	20,37 bcd	0,290 cd
AIA+200	0,594 fgh	40,53 e	0,236 ab	17,83 de	0,293 cd
AS+0	1,113 abc	113,41 a	0,268 a	22,01 bcd	0,269 def
AS+100	0,820 de	82,01 bc	0,210 bcd	18,42 d	0,321 bc
AS+200	0,507 gh	33,05 ef	0,111 gh	10,06 f	0,300 cd
SPD+0	0,955 bcd	95,08 b	0,155 ef	18,95 d	0,231 fgh
SPD+100	0,875 de	84,12 b	0,123 fg	22,45 abcd	0,260 defg
SPD+200	0,391 hi	33,09 ef	0,070 h	12,65 ef	0,355 ab
QUIN+0	1,197 a	82,78 bc	0,207 bcd	19,50 cd	0,234 efgh
QUIN+100	0,716 efg	69,66 cd	0,174 de	17,94 de	0,213 ghi
QUIN+200	0,605 fgh	66,30 d	0,177 cde	17,22 de	0,305 cd

En cada columna, para cada fuente de variación (regulador, salinidad o su interacción), las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

La comparación de medias en la interacción (Tabla 4.2), mostró que el crecimiento del tallo varió entre pretratamientos. En plantas sin NaCl, el PS aumentó



respecto al control en las pretratadas con AS (27%), mientras que con SPD descendió (26%); además, las plantas con SPD también descendieron la elongación de tallo un 25%. Por tanto, un determinado regulador del crecimiento no afectó por igual a todos los parámetros de crecimiento, ni todos los parámetros de crecimiento respondieron por igual a distintos reguladores. Así, según el análisis estadístico ( $P \leq 0,05$ ), en ausencia de sal, las plantas con AIA incrementaron el PS de hoja y el AF total, las plantas con QUIN aumentaron el PS de hoja y las plantas con AS aumentaron el AF total y el PS de tallo. En contraste, las plantas con SPD descendieron el PS de tallo.

Por otra parte, la respuesta al estrés salino dependió del pretratamiento. Con 100 mM NaCl, el PS y la elongación de tallo no descendieron en plantas NP, mientras que, con 200 mM descendieron un 33 y 63%, respectivamente. El hecho de que, en plantas NP con 100 mM NaCl no se afecten algunos parámetros de crecimiento, puede deberse a que el tiempo de exposición a la sal fue de 4 semanas, mientras que, en otros experimentos presentados en este trabajo el tiempo de exposición fue mayor. El PS de tallo de plantas pretratadas con GA<sub>3</sub> (100 y 200 mM), AS (200 mM), SPD (100 mM) y QUIN (100 y 200 mM) no mostró diferencias significativas respecto a plantas NP con 200 mM NaCl. En contraste, en plantas pretratadas con AIA no se inhibió el PS de tallo respecto al control con ningún nivel de NaCl, ni la elongación de tallo con 100 mM NaCl. Además, es interesante destacar que en plantas con QUIN, el crecimiento de tallo (PS y elongación) no mostró diferencias ( $P \leq 0,05$ ) entre plantas salinizadas y no salinizadas. Las plantas con AIA, al igual que las plantas con GA<sub>3</sub> y QUIN fueron los que mostraron un menor descenso de la elongación ( $\approx 28\%$ ). Por tanto, las plantas pretratadas con AIA, GA<sub>3</sub> y QUIN, cuando se sometieron a estrés salino con 200 mM NaCl, elongaron su tallo un 95% más que las que no fueron pretratadas.

En consecuencia, la importancia del pretratamiento en la respuesta al estrés salino estuvo condicionada por el nivel de NaCl. Con 100 mM, en comparación con plantas NP, las plantas con AS y SPD aumentaron su AF total; por otro lado, el PS de tallo descendió con GA<sub>3</sub> y SPD y, su elongación con AS y QUIN. Sin embargo, un descenso del crecimiento en condiciones de estrés salino, no tiene que suponer una desventaja para la planta (0 mM de plantas con SPD), pudiendo ser un mecanismo de adaptación. Con 200 mM, los pretratamientos con AIA y QUIN mejoraron el PS de hoja, el AF total, el PS de tallo y la elongación, respecto a plantas NP; con GA<sub>3</sub> mejoró el AF total y la elongación de tallo; finalmente, con AS se mejoró el PS de hoja. En contraste, con 200 mM NaCl, el pretratamiento con SPD inhibió el PS de tallo más que NP. Por tanto, en lo que respecta a los parámetros de crecimiento, el pretratamiento que trajo consigo un menor descenso del crecimiento en condiciones de estrés salino fue AIA, seguido por QUIN, GA<sub>3</sub> y AS.

Con la finalidad de comparar el crecimiento de la parte aérea respecto al de raíz, en respuesta al estrés salino y al pretratamiento con reguladores del crecimiento, calculamos la relación raíz/parte aérea (R/PA). Según el análisis multifactorial (Tabla 4.1), en la relación R/PA la principal fuente de variación fue la salinidad ( $\eta^2=0,390$ ;  $P\leq 0,001$ ) seguida por la interacción entre regulador y salinidad ( $\eta^2=0,249$ ;  $P\leq 0,001$ ). En los valores medios para cada regulador, la relación R/PA mostró los valores más elevados en plantas pretratadas con AS y SPD (Tabla 4.2). La reducción del crecimiento en condiciones de estrés salino se dejó notar más en el desarrollo de la parte aérea que en el de la raíz, lo que se manifiesta en un aumento de la relación R/PA, que llegó a ser un 42% mayor en plantas con 200 mM que en plantas con 0 mM NaCl.

En plantas crecidas en ausencia de NaCl, la relación R/PA aumentó en torno a un 39% ( $P \leq 0,05$ ) en las pretratadas con AS, SPD y QUIN, cuando se comparan con plantas control. Con 100 mM NaCl, la relación R/PA aumentó respecto al control en las plantas pretratadas con GA<sub>3</sub> y SPD ( $\approx 42\%$ ) y con AIA y AS ( $\approx 73\%$ ). En plantas pretratadas con GA<sub>3</sub>, SPD y QUIN, la relación R/PA no mostró diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre 100 y 0 mM NaCl. Con 200 mM NaCl las plantas NP y pretratadas con SPD incrementaron su relación R/PA, en término medio, un 110%, seguidas de las pretratadas con GA<sub>3</sub>, AIA, AS y QUIN ( $\approx 67\%$ ). Es importante destacar, que en las pretratadas con GA<sub>3</sub>, AIA y AS no se detectaron diferencias entre plantas con 100 y 200 mM NaCl.

#### 4.1.2. Estado hídrico de la planta

Los índices relacionados con el estado hídrico de la hoja se exponen en las tablas 4.3 y 4.4. El contenido hídrico relativo (RWC) y el déficit de saturación hídrico (WSD) estuvieron condicionados principalmente por la salinidad, responsable del 51 y 54% respectivamente ( $\eta^2 = 0,511$  y  $0,540$ ;  $P \leq 0,001$ ); en ambos índices la interacción entre regulador y salinidad no fue significativa ( $P \leq 0,05$ ).

**Tabla 4.3.** Valor  $F$  y coeficiente de determinación ( $\eta^2$ ) para regulador, salinidad y su interacción (regulador x salinidad), del contenido hídrico relativo (RWC), contenido hídrico para la saturación (WCS), déficit de saturación hídrico (WSD) y transpiración (E) de plantas de olivo de 1 año pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 4 semanas.

Parámetro	Fuente de variación					
	Regulador		Salinidad		Regulador x Salinidad	
	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$
RWC	13,07***	0,190	87,72***	0,511	1,22 <sup>NS</sup>	-
WCS	7,02***	0,174	27,04***	0,268	2,28*	0,113
WSD	13,42***	0,183	98,88***	0,540	1,12 <sup>NS</sup>	-
E	102,39***	0,371	320,40***	0,465	13,57***	0,098

NS, \*, \*\*, \*\*\* indican diferencias no significativas o diferencias significativas para  $P \leq 0,05$ , 0,01 ó 0,001, respectivamente.

Los pretratamientos con GA<sub>3</sub>, SPD y QUIN incrementaron el RWC respecto a plantas NP, mientras que el WSD descendió en todos los pretratamientos, excepto con AIA y AS (Tabla 4.4). Según la salinidad, los valores medios variaron en función del nivel de NaCl; el RWC descendió (10 y 13% para 100 y 200 mM NaCl, respectivamente), y el WSD aumentó (53 y 88% para 100 y 200 mM NaCl, respectivamente).

Para el contenido hídrico para la saturación (WCS), la principal fuente de variación fue la salinidad ( $\eta^2=0,268$ ;  $P\leq 0,001$ ), seguida del regulador ( $\eta^2=0,174$ ;  $P\leq 0,001$ ) y la interacción entre ambos ( $\eta^2=0,113$ ;  $P\leq 0,05$ ) (Tabla 4.3). La salinidad produjo un aumento del WCS, aunque no se detectaron diferencias significativas entre 100 y 200 mM NaCl. Es importante destacar que el regulador que mostró un descenso significativo del WCS respecto a NP fue la QUIN (28%).

La interacción significativa entre regulador y salinidad mostró un comportamiento distinto entre los pretratamientos en respuesta al estrés salino. En plantas NP, la aplicación de 100 mM incrementó el WCS un 45% respecto al control. Sin embargo, las plantas pretratadas con AIA, SPD y QUIN crecidas con NaCl no mostraron diferencias significativas respecto al control en sus valores de WCS, mientras que, las pretratadas con GA<sub>3</sub> y AS los incrementaron con ambos niveles de NaCl por igual ( $\approx 61$ ). De hecho, en todos los casos no se observaron diferencias significativas entre 100 y 200 mM NaCl. En consecuencia, los pretratamientos con AIA, SPD y QUIN mejoraron el balance hídrico de la hoja en condiciones de estrés salino. En plantas crecidas sin NaCl, el WCS descendió respecto a plantas control en las pretratadas con GA<sub>3</sub> y QUIN ( $\approx 33\%$ ).

**Tabla 4.4.** Contenido hídrico relativo (RWC), contenido hídrico para la saturación (WCS), déficit de saturación hídrico (WSD) y transpiración (E) de plantas de olivo de 1 año pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 4 semanas. Plantas no pretratadas (NP) y con 0 mM NaCl se utilizaron como control.

	RWC (%)	WCS (g H <sub>2</sub> O g <sup>-1</sup> PS)	WSD (%)	E (mmol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )
<b>Regulador</b>				
NP	73,39 c	0,478 bc	26,61 a	0,354 f
GA <sub>3</sub>	80,50 ab	0,500 ab	19,50 cd	0,803 c
AIA	75,32 c	0,448 bc	24,68 ab	0,605 d
AS	74,38 c	0,563 a	25,62 a	1,02 a
SPD	78,93 b	0,404 cd	21,98 bc	0,470 e
QUIN	82,31 a	0,344 d	17,69 d	0,945 b
<b>Salinidad</b>				
0 mM	84,58 a	0,334 b	15,41 c	1,05 a
100 mM	76,38 b	0,503 a	23,62 b	0,663 b
200 mM	71,46 c	0,531 a	29,00 a	0,386 c
<b>Regulador x Salinidad</b>				
Control	81,82	0,388 cdef	18,18	0,607 de
NP+100	74,15	0,563 ab	25,85	0,328 gh
NP+200	64,20	0,484 bcde	35,80	0,125 i
GA <sub>3</sub> +0	88,33	0,266 gh	11,67	1,20b
GA <sub>3</sub> +100	80,01	0,567 ab	19,98	0,720 d
GA <sub>3</sub> +200	73,15	0,666 a	26,85	0,491 efg
AIA+0	83,23	0,349 efgh	16,77	0,852 c
AIA+100	74,02	0,471 bcdef	25,98	0,530 efg
AIA+200	68,72	0,524 bc	31,81	0,433 fgh
AS+0	81,53	0,416 cdef	18,47	1,57 a
AS+100	71,49	0,703 a	28,51	0,947 c
AS+200	70,14	0,569 ab	29,86	0,543 ef
SPD+0	83,94	0,340 fgh	16,06	0,596 de
SPD+100	78,28	0,371 defgh	21,71	0,501 efg
SPD+200	74,58	0,498 bcd	28,17	0,311 h
QUIN+0	88,67	0,246 h	11,33	1,47 a
QUIN+100	80,30	0,343 efgh	19,69	0,949 c
QUIN+200	77,95	0,440 bcdef	22,05	0,410 gh

En cada columna, para cada fuente de variación (regulador, salinidad o su interacción), las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

El RWC, el WCS y el WSD se correlacionaron significativamente con los parámetros de crecimiento (Tabla 4.16.a). Esta correlación presentó valores numéricos máximos con los parámetros relacionados con la hoja, especialmente con el PS de hoja.

De hecho, el WCS sólo se correlacionó con el PS de hoja y el AF total. Los coeficientes de correlación del PS de hoja con el RWC, el WCS y el WSD fueron 0,813 ( $P \leq 0,001$ ), -0,654 ( $P \leq 0,01$ ) y -0,832 ( $P \leq 0,001$ ), respectivamente. Además, el RWC se correlacionó positivamente con la E ( $r=0,693$ ;  $P \leq 0,01$ ), la  $g_s$  ( $r=0,585$ ;  $P \leq 0,05$ ) y la  $P_n$  ( $r=0,696$ ;  $P \leq 0,01$ ), mientras que, el WSD se correlacionó negativamente ( $r=-0,706$ , -0,599 y -0,736, para la E, la  $g_s$  y la  $P_n$ , respectivamente;  $P \leq 0,01$ , para la E y la  $g_s$ , y  $P \leq 0,001$  para la  $P_n$ ).

En el caso de la E, la principal fuente de variación fue la salinidad ( $\eta^2=0,465$ ;  $P \leq 0,001$ ), seguida por el regulador ( $\eta^2=0,371$ ;  $P \leq 0,001$ ; Tabla 4.3). Las plantas que presentaron un valor medio más elevado para la E fueron las pretratadas con AS (1,02 mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). En los valores medios de la interacción podemos observar que, en plantas crecidas sin sal, la E aumentó respecto al control en los pretratamientos con GA<sub>3</sub> (97%), AIA (39%), AS y QUIN ( $\approx 49\%$ ). Igualmente, para cada uno de los niveles de NaCl ensayados, las plantas pretratadas mostraron mayor E que las NP, excepto las pretratadas con AIA y SPD crecidas con 100 mM que no mostraron diferencias significativas respecto a las NP. La E mostró la correlación más alta con la  $g_s$  (Tabla 4.16.a), de forma que se explica el 85% de su descenso.

### 4.1.3. Intercambio gaseoso

En la tabla 4.6 se exponen los parámetros de intercambio gaseoso. La principal fuente de variación para la tasa de asimilación neta ( $P_n$ ), la conductividad estomática ( $g_s$ ) y la eficiencia fotosintética en el uso del nitrógeno (PNUE) fue la salinidad ( $P \leq 0,001$ ; Tabla 4.5), la cual indujo un descenso de los valores medios en función del nivel de NaCl. Este descenso fue más acentuado en la  $g_s$ , seguido por la  $P_n$  y la PNUE

(Tabla 4.6). Según los valores medios para cada regulador, la  $P_n$  se incrementó respecto a plantas NP en las pretratadas con GA<sub>3</sub>, AIA y AS. Para la PNUE, todos los pretratamientos mostraron valores significativamente superiores a los de plantas NP. Algo parecido ocurrió con la  $g_s$ , con excepción de las pretratadas con SPD, las cuales no presentaron diferencias significativas respecto a plantas NP.

**Tabla 4.5.** Valor  $F$  y coeficiente de determinación ( $\eta^2$ ) para regulador, salinidad y su interacción (regulador x salinidad), de tasa de asimilación neta ( $P_n$ ), conductividad estomática ( $g_s$ ), concentración interna de CO<sub>2</sub> (Ci), eficiencia fotosintética en el uso del nitrógeno (PNUE) y fotoinhibición de plantas de olivo de 1 año pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 4 semanas.

Parámetro	Fuente de variación					
	Regulador		Salinidad		Regulador x Salinidad	
	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$
$P_n$	4,23**	0,072	70,42***	0,482	4,01***	0,137
$g_s$	43,99***	0,291	165,36***	0,437	11,58***	0,153
Ci	255,23***	0,577	43,29***	0,039	75,68***	0,342
PNUE	8,31***	0,087	113,03***	0,472	12,16***	0,254
Fotoinhibición	33,46***	0,283	64,10***	0,217	20,60***	0,348

NS, \*, \*\*, \*\*\* indican diferencias no significativas o diferencias significativas para  $P \leq 0,05$ , 0,01 ó 0,001, respectivamente.

En el caso de la concentración interna de CO<sub>2</sub> (Ci), la principal fuente de variación fue el regulador ( $\eta^2=0,577$ ;  $P \leq 0,001$ ), seguido por la interacción entre regulador y salinidad ( $\eta^2=0,342$ ;  $P \leq 0,001$ ; Tabla 4.5).

En los valores medios por regulador, observamos que las plantas NP mostraron los niveles más elevados de la Ci (715,26  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ; Tabla 4.6), por tanto, las plantas pretratadas mostraron los niveles de la Ci significativamente ( $P \leq 0,05$ ) inferiores a los de plantas NP. El mayor descenso lo presentaron las plantas con GA<sub>3</sub> (61%), seguidas por las plantas con AIA y QUIN ( $\approx 51\%$ ), con SPD (45%) y AS (38%).

**Tabla 4.6.** Tasa de asimilación neta ( $P_n$ ), conductividad estomática ( $g_s$ ), concentración interna de  $\text{CO}_2$  (Ci) y eficiencia fotosintética en el uso del nitrógeno (PNUE) de plantas de olivo de 1 año pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 4 semanas. Plantas no pretratadas (NP) y con 0 mM NaCl se utilizaron como control.

	$P_n$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	$g_s$ ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	Ci ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ )	PNUE ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ N s}^{-1}$ )
<b>Regulador</b>				
NP	3,08 c	20,03 d	715,26 a	17,38 d
GA <sub>3</sub>	4,12 a	36,10 b	276,57 e	22,91 bc
AIA	3,54 abc	27,76 c	350,11 d	21,05 c
AS	3,68 ab	50,92 a	446,18 b	26,14 a
SPD	2,99 c	19,46 d	392,30 c	23,99 ab
QUIN	3,21 bc	33,89 b	354,56 d	21,42 bc
<b>Salinidad</b>				
0 mM	4,60 a	48,38 a	393,59 b	28,61 a
100 mM	3,59 b	29,46 b	399,80 b	24,30 b
200 mM	2,13 c	16,24 c	474,10 a	13,54 c
<b>Regulador x Salinidad</b>				
Control	5,26 a	31,76 de	499,80 e	25,62 b
NP+100	2,96 def	18,44 ghi	720,53 b	14,13 e
NP+200	1,01 g	9,89 i	925,44 a	12,40 e
GA <sub>3</sub> +0	5,37 a	59,19 b	352,12 ijk	31,10 a
GA <sub>3</sub> +100	3,77 cd	31,09 e	338,42 ijkl	21,95 bc
GA <sub>3</sub> +200	3,23 def	18,01 ghi	139,17 n	15,69 de
AIA+0	3,90 bcd	39,95 cd	416,59 fg	25,27 bc
AIA+100	3,82 bcd	24,38 efg	306,68 klm	23,33 bc
AIA+200	2,90 def	18,94 fgh	327,08 jkl	14,55 e
AS+0	4,82 ab	87,87 a	399,06 fgh	32,59 a
AS+100	3,91 bcd	43,79 c	379,93 ghi	31,52 a
AS+200	2,32 f	21,11 fgh	559,54 d	14,31 e
SPD+0	4,53 abc	27,12 ef	260,57 m	35,76 a
SPD+100	3,64 cd	18,42 ghi	298,74 lm	32,29 a
SPD+200	0,80 g	12,85 hi	617,59 c	3,91 f
QUIN+0	3,70 cd	44,39 c	433,38 f	21,32 bc
QUIN+100	3,42 de	40,66 c	354,51 hij	22,59 bc
QUIN+200	2,52 ef	16,63 ghi	275,79 m	20,36 cd

En cada columna, para cada fuente de variación (regulador, salinidad o su interacción), las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

Según los valores medios para la interacción (regulador x salinidad), en plantas sin NaCl, la  $P_n$  descendió respecto a plantas control en aquellas pretratadas con AIA y QUIN ( $\approx 28\%$ ). En plantas NP, la  $P_n$  se inhibió en función del nivel de sal ensayado. En



general, en los pretratamientos con GA<sub>3</sub>, AIA y QUIN no se observaron diferencias entre los valores de la  $P_n$  de plantas con 100 y 200 mM. En estos casos, la  $P_n$  no mostró diferencias ( $P \leq 0,05$ ) respecto a plantas NP con 100 mM, por lo que la inhibición de la  $P_n$  fue inferior ( $P \leq 0,05$ ) al de plantas NP con 200 mM. Además, en plantas con AS y 200 mM NaCl, la  $P_n$  no mostró diferencias respecto al resto de pretratamientos con este nivel de NaCl. Por tanto, en plantas con 200 mM pretratadas con GA<sub>3</sub>, AIA, QUIN y AS se mantuvieron niveles de  $P_n$  superiores a los de plantas NP. En contraste, la  $P_n$  de plantas pretratadas con SPD y crecidas con 200 mM no mostró diferencias respecto a la de plantas NP con 200 mM, siendo ambas las que mostraron una mayor inhibición de  $P_n$  respecto a plantas control ( $\approx 83\%$ ). Es importante destacar que en plantas con AIA, no se observaron diferencias ( $P \leq 0,05$ ) entre plantas con 0, 100 y 200 mM NaCl, por tanto con este pretratamiento no se puso de manifiesto la inhibición de la  $P_n$  por adición de NaCl.

La  $P_n$  mostró una significativa correlación positiva con la  $g_s$  ( $r=0,678$ ,  $P \leq 0,01$ ; tabla 4.16.a), explicando, por tanto un 46% del descenso de ésta. La  $g_s$  aumentó respecto al control en plantas sin NaCl con GA<sub>3</sub> (86%), AS (177%) y QUIN (41%). Además, con QUIN el tratamiento con 100 mM NaCl y 0 mM presentaron la misma  $g_s$  ( $\approx 42,52$  mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). En plantas con 100 mM NaCl, la mayor inhibición de la  $g_s$  respecto a plantas control se detectó en las NP y pretratadas con SPD ( $\approx 42\%$ ); en las pretratadas con GA<sub>3</sub> y AIA, no se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) respecto a plantas control, manteniendo por tanto, la misma abertura estomática que éstas, mientras que, las pretratadas con AS y QUIN mostraron una  $g_s$  superior a la de plantas control ( $\approx 33$ ). Sin embargo, con 200 mM NaCl la  $g_s$  descendió en todos los pretratamientos hasta valores similares a los de plantas NP con 200 mM, excepto con AIA y AS, cuyos valores no mostraron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) respecto a

plantas NP con 100 mM NaCl.

En plantas NP, la Ci aumentó respecto a plantas control un 44% con 100 mM y un 85% con 200 mM NaCl. Por otro lado, en todos los pretratamientos los niveles de la Ci fueron inferiores ( $P \leq 0,05$ ) a los de plantas NP para un mismo nivel de NaCl. Además, la tendencia de la Ci frente al NaCl dependió del pretratamiento; bajó con la salinidad en plantas con GA<sub>3</sub> (200 mM NaCl), AIA (100 y 200 mM NaCl) y QUIN (100 y 200 mM NaCl) y aumentó con 200 mM NaCl en plantas con AS y SPD. Los niveles más elevados de la Ci se encontraron en plantas NP con 200 mM NaCl (925,44  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ), mientras que los niveles más bajos los presentaron plantas con GA<sub>3</sub> y 200 mM NaCl (139,17  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ).

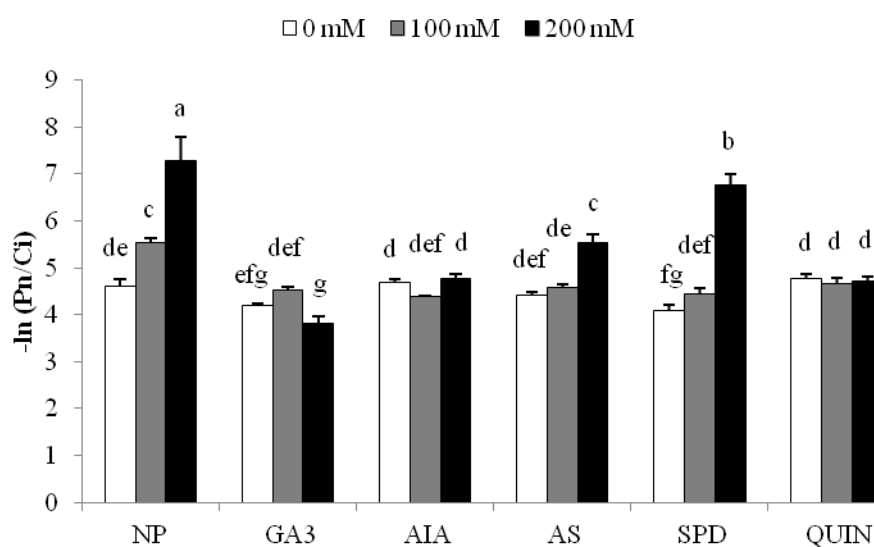
En lo que respecta a la PNUE, en plantas sin NaCl aumentó respecto al control, en las pretratadas con GA<sub>3</sub>, AS y SPD ( $\approx 29\%$ ). Con 100 mM, la PNUE no descendió en plantas pretratadas con GA<sub>3</sub>, AIA y QUIN, mientras que en las NP descendió un 44%; además, con AS y SPD se incrementó aproximadamente un 24%. En consecuencia, con 100 mM NaCl todas las plantas pretratadas mantuvieron una relación adecuada entre tasa de asimilación neta de CO<sub>2</sub> y nitrógeno total de la hoja. Sin embargo, con 200 mM NaCl descendió en todos los pretratamientos, siendo las plantas con QUIN en las que menos descendió (20%).

La  $P_n$  mostró una elevada correlación negativa con  $-\ln(P_n/C_i)$  ( $r = -0,816$ ,  $P \leq 0,001$ ) explicando el 66% del descenso de la fotosíntesis. Este indicador de la fotoinhibición estuvo condicionado principalmente por la interacción entre regulador y salinidad (R x S) ( $\eta^2 = 0,348$ ;  $P \leq 0,001$ ), seguido por el regulador y la salinidad ( $\eta^2 = 0,283$  y  $0,217$ , respectivamente;  $P \leq 0,001$ ; Tabla 4.5).

**Tabla 4.7.** Fotoinhibición de plantas de olivo de 1 año pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 4 semanas. Plantas no pretratadas (NP) y con 0 mM NaCl se utilizaron como control.

Regulador						Salinidad		
NP	GA <sub>3</sub>	AIA	AS	SPD	QUIN	0 mM	100 mM	200 mM
5,81 a	4,17 d	4,61 c	4,85 bc	5,10 b	4,72 c	4,46 c	4,69 b	5,48 a

Para cada fuente de variación (regulador o salinidad), las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 4.1.** Fotoinhibición de plantas de olivo de 1 año pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 4 semanas. Plantas no pretratadas (NP) y con 0 mM NaCl se utilizaron como control. Los datos son medias  $\pm$  SE (n=4). Las medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

Según el análisis estadístico multifactorial ( $P \leq 0,05$ ), las plantas NP fueron las que mostraron una mayor fotoinhibición (5,81), mientras que las pretratadas con GA<sub>3</sub> fueron las que mostraron un menor nivel (4,17; Tabla 4.7). El descenso de la fotoinhibición respecto a plantas NP fue del 14%, aproximadamente, para plantas con AS y SPD, del 20%, aproximadamente, para plantas con AIA y QUIN y, del 28% para plantas con GA<sub>3</sub>. Si nos centramos en el efecto de la salinidad, la fotoinhibición

aumentó en función del nivel de NaCl ( $P \leq 0,05$ ); con 100 mM se incrementó un 5% respecto a 0 mM NaCl, mientras que con 200 mM el incremento fue del 23%.

La comparación de datos en función de la interacción entre regulador y salinidad se representa en la figura 4.1. Como podemos observar, el indicador de la fotoinhibición mostró valores comprendidos entre 4,09 y 4,78 para plantas crecidas sin NaCl; además, en plantas con SPD descendió un 11% ( $P \leq 0,05$ ) respecto a plantas control. Con 100 mM NaCl, la fotoinhibición aumentó sólo en plantas NP (20%;  $P \leq 0,05$ ). Sin embargo, con 200 mM aumentó en plantas NP (58%) y pretratadas con AS (20%) y SPD (47%). En consecuencia, las plantas pretratadas con GA<sub>3</sub>, AIA y QUIN no aumentaron la fotoinhibición respecto al control con ninguno de los niveles de NaCl ensayados, mientras que en las pretratadas con AS y SPD la fotoinhibición se evitó sólo con 100 mM NaCl.

#### **4.1.4. Pigmentos fotosintéticos**

Como podemos observar en la tabla 4.8, la principal fuente variación para clorofila a ( $C_a$ ), carotenoides ( $Car$ ) y clorofila total ( $C_{a+b}$ ) fue el pretratamiento con reguladores del crecimiento ( $\eta^2=0,404$ ,  $0,498$  y  $0,405$ , respectivamente;  $P \leq 0,001$ ), siguiéndole muy de cerca la interacción entre regulador y salinidad ( $R \times S$ ) ( $\eta^2=0,379$ ,  $0,372$  y  $0,375$ , para  $C_a$ ,  $Car$  y  $C_{a+b}$ , respectivamente;  $P \leq 0,001$ ).

En el caso de la clorofila b ( $C_b$ ) ocurrió al revés, estuvo condicionada principalmente por la interacción entre el regulador y la salinidad ( $R \times S$ ), ( $\eta^2=0,406$ ;  $P \leq 0,001$ ), seguido por el regulador ( $\eta^2=0,369$ ;  $P \leq 0,001$ ). Sin embargo, la relación clorofila total/carotenoides ( $C_{a+b}/Car$ ) estuvo condicionada por  $R \times S$  ( $\eta^2=0,425$ ;  $P \leq 0,001$ ), seguido por la salinidad ( $\eta^2=0,294$ ;  $P \leq 0,001$ ).

**Tabla 4.8.** Valor  $F$  y coeficiente de determinación ( $\eta^2$ ) para regulador, salinidad y su interacción (regulador x salinidad), del contenido de clorofila a ( $C_a$ ), clorofila b ( $C_b$ ), carotenoides (Car) y clorofila total ( $C_{a+b}$ ), y relación clorofila total/carotenoides ( $C_{a+b}/\text{Car}$ ) en hoja de plantas de olivo de 1 año pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 4 semanas.

Parámetro	Fuente de variación					
	Regulador		Salinidad		Regulador x Salinidad	
	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$
$C_a$	777,34***	0,404	1016,30***	0,211	365,26***	0,379
$C_b$	124,25***	0,369	162,77***	0,193	68,36***	0,406
Car	426,86***	0,498	250,31***	0,117	159,31***	0,372
$C_{a+b}$	689,95***	0,405	905,12***	0,213	319,45***	0,375
$C_{a+b}/\text{Car}$	5,66***	0,096	43,15***	0,294	12,46***	0,425

NS, \*, \*\*, \*\*\* indican diferencias no significativas o diferencias significativas para  $P \leq 0,05$ , 0,01 ó 0,001, respectivamente.

En el análisis estadístico en función del regulador (Tabla 4.9), las plantas pretratadas con QUIN mostraron los niveles más elevados de pigmentos fotosintéticos ( $C_a$ ,  $C_b$ , Car y  $C_{a+b}$ ). En el caso de la  $C_a$  no se observaron diferencias entre las plantas pretratadas con GA<sub>3</sub> y QUIN. En cambio, en plantas pretratadas con QUIN se detectó el valor más bajo de la relación  $C_{a+b}/\text{Car}$ .

Por otra parte, la salinidad redujo la  $C_a$ , la  $C_b$ , los Car y la  $C_{a+b}$  de forma proporcional a la concentración de NaCl. El valor de la relación  $C_{a+b}/\text{Car}$  también disminuyó con la sal, pero no hubo diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre plantas crecidas con 100 y 200 mM NaCl.

En cuanto a la interacción, la aplicación de 100 y 200 mM NaCl provocó un descenso de la  $C_a$ , la  $C_b$ , los Car, la  $C_{a+b}$  y la relación  $C_{a+b}/\text{Car}$  respecto al control en plantas NP (Tabla 4.9). Los pretratamientos con GA<sub>3</sub> y QUIN aumentaron significativamente ( $P \leq 0,05$ ) el contenido de  $C_a$  y Car respecto a plantas control con todos los niveles de sal (0, 100 y 200 mM NaCl). En plantas con GA<sub>3</sub>, el contenido de  $C_a$  aumentó un 7, 15 y 32% con 0, 100 y 200 mM NaCl, respectivamente, mientras que,

el contenido de Car aumentó, aproximadamente, un 11% con 0 y 100 mM, y un 39% con 200 mM NaCl.

**Tabla 4.9.** Contenido en clorofila a ( $C_a$ ), clorofila b ( $C_b$ ), carotenoides (Car), clorofila total ( $C_{a+b}$ ) y relación clorofila total/carotenoides ( $C_{a+b}/Car$ ) en hoja de plantas de olivo de 1 año pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 4 semanas. Plantas no pretratadas (NP) y con 0 mM NaCl se utilizaron como control.

	$C_a$ (mg g <sup>-1</sup> PS)	$C_b$ (mg g <sup>-1</sup> PS)	Car (mg g <sup>-1</sup> PS)	$C_{a+b}$ (mg g <sup>-1</sup> PS)	$C_{a+b}/Car$
<b>Regulador</b>					
NP	2,09 d	0,885 e	0,721 e	2,96 e	4,09 b
GA <sub>3</sub>	3,12 a	1,16 b	1,01 b	4,31 b	4,25 a
AIA	2,06 d	0,766 f	0,685 f	2,83 f	4,13 ab
AS	2,75 b	0,994 c	0,885 c	3,74 c	4,21 ab
SPD	2,41 c	0,936 d	0,811 d	3,34 d	4,10 b
QUIN	3,17 a	1,21 a	1,10 a	4,38 a	3,95 c
<b>Salinidad</b>					
0 mM	2,99 a	1,13 a	0,949 a	4,13 a	4,36 a
100 mM	2,61 b	0,978 b	0,886 b	3,59 b	4,04 b
200 mM	2,19 c	0,863 c	0,773 c	3,06 c	3,96 b
<b>Regulador x Salinidad</b>					
Control	2,64 g	1,23 cd	0,840 e	3,84 fg	4,63 a
NP+100	1,92 i	0,783 i	0,704 g	2,71 j	3,87 efgh
NP+200	1,69 j	0,641 jk	0,618 h	2,33 l	3,77 ghi
GA <sub>3</sub> +0	2,83 ef	1,04 g	0,912 d	3,95 ef	4,24 bcd
GA <sub>3</sub> +100	3,05 d	1,14 ef	0,948 d	4,19 d	4,43 ab
GA <sub>3</sub> +200	3,49 c	1,29 bc	1,17 b	4,78 c	4,08 de
AIA+0	2,65 g	0,934 h	0,846 e	3,58 h	4,27 bcd
AIA+100	1,77 j	0,671 j	0,634 h	2,44 kl	3,85 fgh
AIA+200	1,76 j	0,691 j	0,575 i	2,46 k	4,27 bcd
AS+0	3,68 b	1,32 b	1,13 b	5,00 b	4,42 ab
AS+100	3,11 d	1,08 fg	1,04 c	4,20 d	4,06 def
AS+200	1,45 k	0,575 k	0,487 j	2,02 m	4,16 cd
SPD+0	2,27 h	0,854 i	0,735 fg	3,12 i	4,25 bcd
SPD+100	3,03 d	1,14 ef	0,946 d	4,17 d	4,41 b
SPD+200	1,92 i	0,816 i	0,753 f	2,73 j	3,63 i
QUIN+0	3,88 a	1,43 a	1,23 a	5,31 a	4,32 bc
QUIN+100	2,77 f	1,05 g	1,04 c	3,82 g	3,65 hi
QUIN+200	2,86 e	1,16 de	1,04 c	4,03 e	3,87 efg

En cada columna, para cada fuente de variación (regulador, salinidad o su interacción), las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

En plantas con QUIN, el contenido de  $C_a$  aumentó un 47, 5 y 8% con 0, 100 y 200 mM NaCl, respectivamente, y el contenido de Car aumentó un 46% con 0 mM y un 24% con 100 y 200 mM NaCl. Además, en el caso del pretratamiento con GA<sub>3</sub>, las plantas crecidas con sal aumentaron la  $C_a$  respecto a plantas crecidas en ausencia de sal (8 y 23% para 100 y 200 mM, respectivamente). El contenido de  $C_a$  y de Car en plantas con AS, aumentó respecto al control con 0 y 100 mM NaCl, sin embargo, con 200 mM, mostraron los valores más bajos (1,45 y 0,49 mg g<sup>-1</sup> PS, respectivamente). En contraste, en plantas con SPD, la  $C_a$  y los Car descendieron respecto al control con 0 (14 y 13%, respectivamente) y 200 mM NaCl (27 y 11%, respectivamente), mientras que, con 100 mM aumentaron (15 y 12%, respectivamente).

El contenido de  $C_b$ , disminuyó significativamente ( $P \leq 0,05$ ) respecto a plantas control en plantas con GA<sub>3</sub> (15 y 7% para 0 y 100 mM NaCl, respectivamente), AIA (24 y ≈45% para 0 y 100 y 200 mM NaCl, respectivamente), AS (12 y 53% para 100 y 200 mM NaCl, respectivamente), SPD (31, 7 y 33% para 0, 100 y 200 mM NaCl, respectivamente) y QUIN (15% para 100 mM NaCl); además, aumentó en plantas con 0 mM NaCl pretratadas con AS (7%) y QUIN (16%). Es interesante destacar que en plantas con QUIN sin NaCl se observaron los niveles más elevados de  $C_a$  (3,88 mg g<sup>-1</sup> PS),  $C_b$  (1,43 mg g<sup>-1</sup> PS) y Car (1,23 mg g<sup>-1</sup> PS), seguidos por las plantas con AS, cuyos respectivos valores fueron 3,68, 1,32 y 1,13 mg g<sup>-1</sup> PS. Por tanto, el contenido de  $C_{a+b}$  en ausencia de sal presentó los valores más altos en plantas con AS (5,00 mg g<sup>-1</sup> PS) y QUIN (5,31 mg g<sup>-1</sup> PS). En plantas salinizadas, el contenido de  $C_{a+b}$  aumentó por los pretratamientos con GA<sub>3</sub> (9 y 24% con 100 y 200 mM, respectivamente), AS (9% con 100 mM), SPD (8% con 100 mM) y QUIN (5% con 200 mM).

En lo que respecta a la relación  $C_{a+b}/Car$ , descendió con todos los niveles de sal

ensayados (0, 100 y 200 mM NaCl) respecto a plantas control, excepto en plantas con GA<sub>3</sub> crecidas con 100 mM y en plantas con AS y 0 mM NaCl.

#### 4.1.5. Enzimas del estrés oxidativo

Los datos obtenidos para las enzimas antioxidantes, ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR) y guaiacol peroxidasa (POD), se exponen en la tabla 4.11 y figuras 4.2, 4.3 y 4.4. Todas las fuentes de variación influyeron en los datos obtenidos para estas enzimas (Tabla 4.10). Para la APX, la principal fuente de variación fue la salinidad ( $\eta^2=0,493$ ;  $P\leq 0,001$ ), seguida por la interacción entre regulador y salinidad ( $\eta^2=0,264$ ;  $P\leq 0,001$ ) y el regulador ( $\eta^2=0,180$ ;  $P\leq 0,001$ ). En el caso de la POD y GR el efecto estuvo más repartido entre las tres fuentes de variación. En la POD, prácticamente por igual, la salinidad y la interacción fueron las principales responsables de la variación detectada ( $\eta^2=0,376$  y  $0,368$ , respectivamente;  $P\leq 0,001$ ), seguidas por el regulador ( $\eta^2=0,241$ ;  $P\leq 0,001$ ). Finalmente, la GR se afectó principalmente por la interacción entre regulador y salinidad ( $\eta^2=0,426$ ;  $P\leq 0,001$ ), mientras que el regulador y la salinidad mostraron un efecto similar ( $\eta^2=0,271$  y  $0,248$ , respectivamente;  $P\leq 0,001$ ).

**Tabla 4.10.** Valor  $F$  y coeficiente de determinación ( $\eta^2$ ) para regulador, salinidad y su interacción (regulador x salinidad), de la actividad ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR) y guaiacol peroxidasa (POD) en hoja de plantas de olivo de 1 año pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 4 semanas.

Parámetro	Fuente de variación					
	Regulador		Salinidad		Regulador x Salinidad	
	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$
APX	30,84***	0,180	211,49***	0,493	22,61***	0,264
GR	52,74***	0,271	120,72***	0,248	41,48***	0,426
POD	163,92***	0,241	639,25***	0,376	125,11***	0,368

NS, \*, \*\*, \*\*\* indican diferencias no significativas o diferencias significativas para  $P\leq 0,05$ ,  $0,01$  ó  $0,001$ , respectivamente.

Según el análisis de la varianza multifactorial (Tabla 4.11), en la POD los



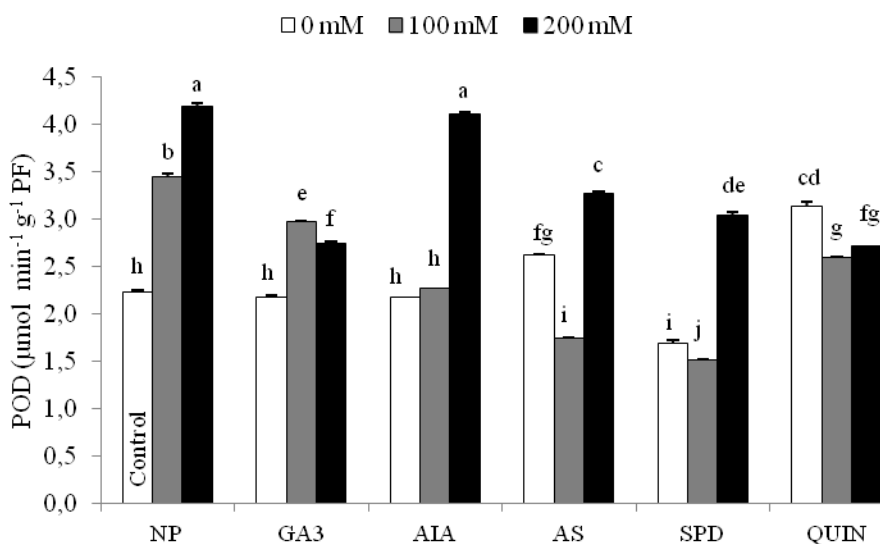
niveles superiores los presentaron las plantas NP ( $3,29 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PF}$ ); por tanto, el pretratamiento indujo un descenso de la actividad de esta enzima. Este descenso fue aproximadamente, del 14% para AIA y QUIN, del 20% para  $\text{GA}_3$ , del 23% para AS y del 37% para SPD. La GR aumentó un 20% respecto a plantas NP en el pretratamiento con QUIN, mientras que con AIA, AS y SPD descendió un 20, 57 y 35%, respectivamente; en plantas con  $\text{GA}_3$ , no mostró diferencias respecto a NP, al igual que ocurrió con la APX. La APX, en comparación con plantas NP, aumentó un 39% con AIA y aproximadamente, un 17% con SPD y QUIN; en las pretratadas con  $\text{GA}_3$  y AS no se observaron diferencias ( $P \leq 0,05$ ) respecto a plantas NP. En cuanto a la salinidad, la actividad de las tres enzimas aumentó con 100 y 200 mM NaCl respecto a 0 mM. La GR fue la que mostró un mayor aumento por la salinidad (107 y 89% para 200 y 100 mM NaCl, respectivamente), seguida por la APX (84 y 35% para 200 y 100 mM NaCl, respectivamente) y la POD (43 y 4% para 200 y 100 mM NaCl, respectivamente).

**Tabla 4.11.** Actividad ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR) y guaiacol peroxidasa (POD) en hoja de plantas de olivo de 1 año pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 4 semanas. Plantas no pretratadas (NP) y con 0 mM NaCl se utilizaron como control.

	APX ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PF}$ )	GR ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PF}$ )	POD ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PF}$ )
<b>Regulador</b>			
NP	1,84 c	0,396 b	3,29 a
$\text{GA}_3$	1,69 c	0,356 bc	2,63 c
AIA	2,56 a	0,318 c	2,86 b
AS	1,74 c	0,171 e	2,54 d
SPD	2,15 b	0,258 d	2,08 e
QUIN	2,17 b	0,477 a	2,82 b
<b>Salinidad</b>			
0 mM	1,45 c	0,199 c	2,34 c
100 mM	1,96 b	0,377 b	2,43 b
200 mM	2,67 a	0,412 a	3,35 a

En cada columna, para cada fuente de variación (regulador o salinidad), las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

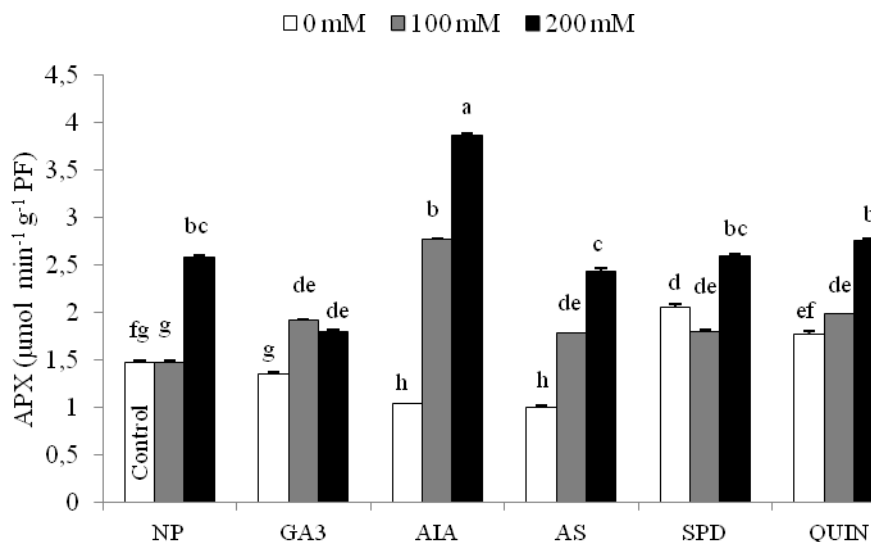
Como resultado de la interacción significativa ( $P \leq 0,001$ ) entre regulador y salinidad, cada uno de los pretratamientos tuvo un efecto diferente en plantas crecidas con sal.



**Figura 4.2.** Actividad guaiacol peroxidasa (POD) en hoja de plantas de olivo de 1 año pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl). Plantas no pretratadas (NP) y con 0 mM NaCl se utilizaron como control. Los datos son medias  $\pm$  SE (n=4). Las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

La actividad POD (Figura 4.2) se incrementó respecto a plantas control por los pretratamientos con AS y QUIN (17 y 41%, respectivamente) y descendió con SPD (24%). La aplicación de 100 y 200 mM NaCl, trajo consigo un incremento de la actividad enzimática en plantas NP y pretratadas con GA<sub>3</sub>, mientras que en plantas con AIA, AS y SPD, sólo niveles de 200 mM NaCl incrementaron significativamente la actividad de la POD. Con 100 mM NaCl, la mayor actividad enzimática se alcanzó en plantas NP, incrementándose un 55% respecto al control. Con 200 mM, la actividad fue máxima en plantas NP y con AIA ( $\approx 4,15 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PF}$ ), lo que supone un incremento del 86% respecto a plantas control. Con QUIN, aunque con 100 y 200 mM

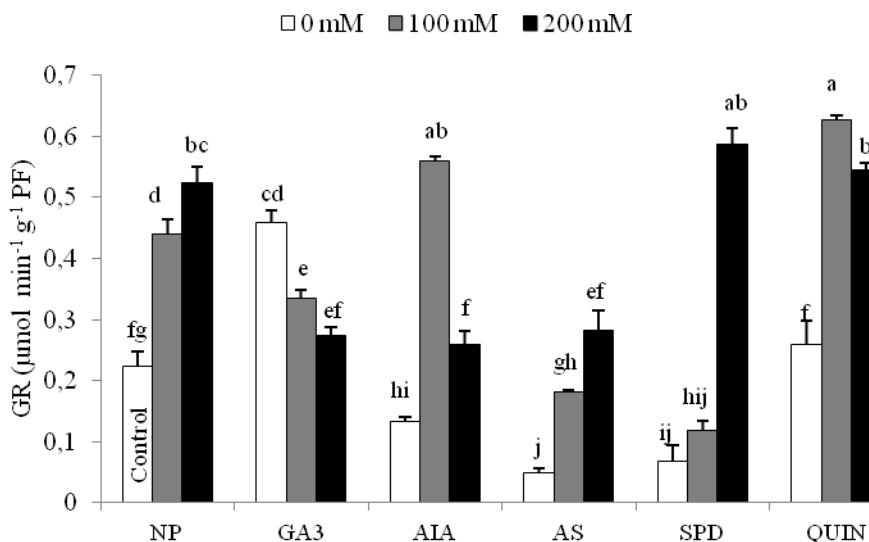
fue un 19% superior a los de plantas control ( $P \leq 0,05$ ), los niveles alcanzados supusieron un descenso significativo del 15% respecto a 0 mM NaCl en dicho pretratamiento.



**Figura 4.3.** Actividad ascorbato peroxidasa (APX) en hoja de plantas de olivo de 1 año pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 4 semanas. Plantas no pretratadas (NP) y con 0 mM NaCl se utilizaron como control. Los datos son medias  $\pm$  SE ( $n=4$ ). Las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

En lo que respecta a la actividad de la APX (Figura 4.3), con 0 mM, descendió respecto al control en plantas con AIA y AS ( $\approx 31\%$ ) y aumentó en plantas con SPD (39%). La adición de 100 mM NaCl al medio, no incrementó la APX en plantas NP respecto al control, mientras que, en las pretratadas con AIA se incrementó un 87%, y en las pretratadas con GA<sub>3</sub>, AS, SPD y QUIN, aproximadamente, un 27%. La máxima actividad se alcanzó en plantas con 200 mM pretratadas con AIA ( $3,87 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PF}$ ). La aplicación de 200 mM NaCl además estimuló la actividad APX en plantas NP y con SPD y QUIN ( $\approx 79\%$ ) hasta niveles similares a los presentados por plantas con AIA y 100 mM NaCl; con AS se incrementó un 65% respecto al control, mientras que, en

plantas con GA<sub>3</sub> no se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre 100 y 200 mM NaCl.



**Figura 4.4.** Actividad glutatión reductasa (GR) en hoja de plantas de olivo de 1 año pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 4 semanas. Plantas no pretratadas (NP) y con 0 mM NaCl se utilizaron como control. Los datos son medias  $\pm$  SE (n=4). Las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

La enzima GR (Figura 4.4), en ausencia de NaCl (0 mM), se estimuló respecto al control por la aplicación de GA<sub>3</sub> (105%), descendió con AIA, SPD ( $\approx 55\%$ ) y AS (77%), y no varió con QUIN. La aplicación de NaCl indujo una respuesta distinta según el pretratamiento. En plantas NP, con AIA, AS y QUIN se estimuló con 100 y 200 mM NaCl respecto a los niveles basales de enzima con 0 mM NaCl en los respectivos pretratamientos. Sin embargo, esto no siempre supuso alcanzar niveles superiores a los de plantas control. Así, en plantas con AIA (200 mM NaCl) y con AS (100 y 200 mM NaCl), la actividad de la GR no mostró diferencias ( $P \leq 0,05$ ) respecto a plantas control. Sin embargo, en las pretratadas con AIA y QUIN se alcanzaron los niveles máximos

con 100 mM NaCl, al igual que ocurrió en el pretratamiento con SPD y 200 mM NaCl ( $\approx 0,591 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PF}$ ). En plantas NP, la GR se estimuló respecto al control con 100 y 200 mM NaCl (98 y 135%, respectivamente) hasta alcanzar niveles similares a los de plantas con GA<sub>3</sub> y 0 mM NaCl. De hecho, en el pretratamiento con GA<sub>3</sub>, la aplicación de 100 y 200 mM NaCl trajo consigo un descenso de la actividad enzimática respecto a 0 mM, de forma que, con 200 mM NaCl no se observaron diferencias ( $P \leq 0,05$ ) respecto a plantas control.

Por tanto, el pretratamiento con AIA favoreció la actividad APX hasta niveles superiores a los de plantas NP para 100 y 200 mM NaCl, mientras que, en la GR esto ocurrió en plantas pretratadas con QUIN. En contraste, en la POD el pretratamiento con reguladores del crecimiento no trajo consigo ninguna mejora respecto a plantas NP.

#### 4.1.6. Metabolitos e indicadores del estrés en la hoja

El contenido de fenoles, flavonoides, prolina y la producción de etileno estuvieron condicionados principalmente por la interacción entre regulador y salinidad ( $\eta^2 = 0,443, 0,480, 0,544$  ó  $0,415$ , respectivamente;  $P \leq 0,001$ ) y por el regulador en el caso de fenoles, prolina y producción de etileno ( $\eta^2 = 0,404, 0,361$  ó  $0,332$ , respectivamente;  $P \leq 0,001$ ). En los flavonoides, regulador y salinidad tuvieron un efecto similar ( $\eta^2 = 0,245$  ó  $0,259$ , respectivamente;  $P \leq 0,001$ ) (Tabla 4.12).

El contenido de fenoles por regulador (Tabla 4.13), fue superior al de plantas NP en las pretratadas con AIA (35%), e inferior en las pretratadas con AS (11%). Sin embargo, el contenido de flavonoides y prolina mostró los mayores niveles en plantas con GA<sub>3</sub>; sus respectivos incrementos respecto a plantas NP fueron 12 y 57%. En contraste, las plantas con QUIN presentaron los niveles más bajos de flavonoides (14,29

mg g<sup>-1</sup> PS) y prolina (268,76 µg g<sup>-1</sup> PS). En relación a la producción de etileno, las plantas NP y con AS mostraron los valores más altos ( $\approx 4,35$  nl g<sup>-1</sup> PF h<sup>-1</sup>), mientras que, con el resto de pretratamientos descendió significativamente ( $P \leq 0,05$ ) respecto a plantas NP; este descenso fue del 31% para plantas con GA<sub>3</sub>, del 47% para plantas con SPD y del 67%, aproximadamente, para plantas con AIA y QUIN. Por tanto, en plantas con QUIN coincidieron los niveles más bajos de flavonoides, prolina y etileno.

**Tabla 4.12.** Valor  $F$  y coeficiente de determinación ( $\eta^2$ ) para regulador, salinidad y su interacción (regulador x salinidad), de contenido de fenoles, flavonoides, prolina y producción de etileno en hoja de plantas de olivo de 1 año pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 4 semanas.

Parámetro	Fuente de variación					
	Regulador		Salinidad		Regulador x Salinidad	
	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$
Fenoles	235,19 <sup>***</sup>	0,404	193,82 <sup>***</sup>	0,133	128,92 <sup>***</sup>	0,443
Flavonoides	164,33 <sup>***</sup>	0,245	433,60 <sup>***</sup>	0,259	161,06 <sup>***</sup>	0,480
Prolina	284,91 <sup>***</sup>	0,361	161,03 <sup>***</sup>	0,081	215,01 <sup>***</sup>	0,544
Etileno	37,85 <sup>***</sup>	0,332	27,13 <sup>***</sup>	0,095	23,67 <sup>***</sup>	0,415

NS, \*, \*\*, \*\*\* indican diferencias no significativas o diferencias significativas para  $P \leq 0,05$ , 0,01 ó 0,001, respectivamente.

La aplicación de NaCl aumentó el contenido de fenoles y flavonoides. En el caso de los flavonoides, este aumento fue proporcional al incremento de la concentración de NaCl en el medio (100 y 200 mM), mientras que, en el caso de los fenoles no se apreciaron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre ambos tratamientos salinos. En contraste, el contenido de prolina se redujo un 4% con 100 mM y un 21% con 200 mM NaCl respecto a plantas sin sal (0 mM NaCl). La producción de etileno, se incrementó respecto a 0 mM sólo con 100 mM NaCl (67%).

**Tabla 4.13.** Contenido de fenoles, flavonoides, prolina y etileno en hoja de plantas de olivo de 1 año pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 4 semanas. Plantas no pretratadas (NP) y con 0 mM NaCl se utilizaron como control.

	Fenoles (mg g <sup>-1</sup> PS)	Flavonoides (mg g <sup>-1</sup> PS)	Prolina (µg g <sup>-1</sup> PS)
<b>Regulador</b>			
NP	51,33 b	17,92 b	324,73 d
GA <sub>3</sub>	51,94 b	20,07 a	497,34 a
AIA	69,26 a	16,60 c	383,13 b
AS	45,66 c	17,93 b	344,17 c
SPD	51,88 b	16,46 c	389,99 b
QUIN	50,84 b	14,29 d	268,76 e
<b>Salinidad</b>			
0 mM	47,49 b	14,85 c	399,77 a
100 mM	56,51 a	17,51 b	382,55 b
200 mM	56,45 a	19,21 a	321,74 c
<b>Regulador x Salinidad</b>			
Control	48,53 fg	18,64 def	316,39 f
NP+100	42,79 hi	12,84 j	362,75 e
NP+200	62,67 c	22,27 b	295,05 fgh
GA <sub>3</sub> +0	56,90 de	15,45 h	580,05 a
GA <sub>3</sub> +100	54,56 e	19,35 cd	550,59 b
GA <sub>3</sub> +200	44,34 h	25,42 a	361,38 e
AIA+0	57,14 de	14,87 hi	491,31 c
AIA+100	82,09 a	16,68 g	188,03 j
AIA+200	68,54 b	18,25 f	470,05 c
AS+0	44,50 h	16,66 g	416,39 d
AS+100	51,07 f	18,06 f	312,53 f
AS+200	41,41 i	19,07 cde	303,59 fg
SPD+0	48,24 g	14,57 i	308,85 f
SPD+100	50,02 fg	19,73 c	581,60 a
SPD+200	57,39 d	15,07 hi	279,51 h
QUIN+0	29,65 j	8,90 k	285,61 gh
QUIN+100	58,52 d	18,53 ef	299,79 fgh
QUIN+200	64,36 c	15,44 h	220,87 i

En cada columna, para cada fuente de variación (regulador, salinidad o su interacción), las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

En la interacción entre regulador y salinidad (Tabla 4.13) se observó que, en plantas con 0 mM NaCl los pretratamientos con GA<sub>3</sub> y AIA incrementaron el contenido de fenoles respecto al control (17 y 18%, respectivamente), mientras que, los pretratamientos con AS y QUIN lo redujeron (8 y 39%, respectivamente). La aplicación

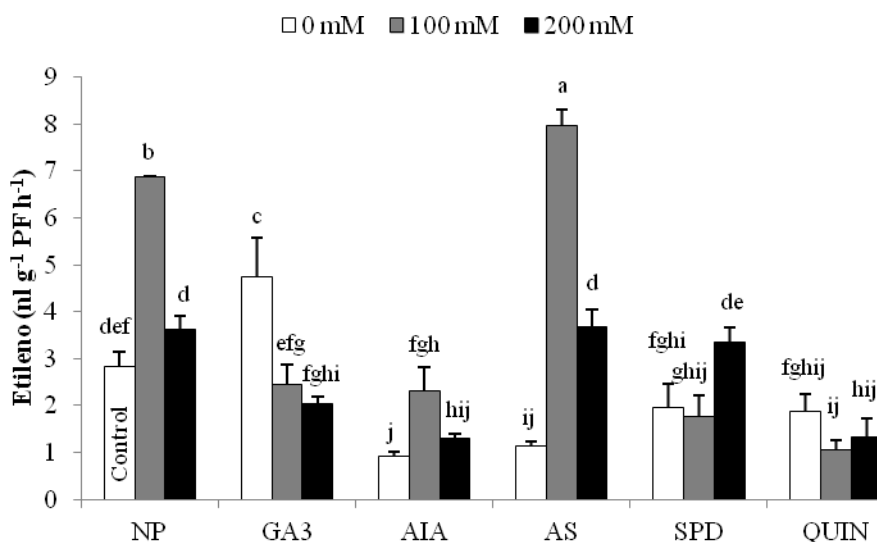
de NaCl en plantas NP trajo consigo aumento del contenido de fenoles respecto al control con 200 mM NaCl (29%) y descenso con 100 mM (12%). En plantas pretratadas con reguladores del crecimiento, este parámetro aumentó respecto a 0 mM NaCl, en plantas con 100 y 200 mM NaCl de los pretratamientos con AIA y QUIN, en plantas con 100 mM del pretratamiento con AS, y en plantas con 200 mM del pretratamiento con SPD. En comparación con los niveles alcanzados en plantas NP, con 100 mM, los niveles de fenoles fueron superiores en todos los pretratamientos, sin embargo, con 200 mM esto sólo ocurrió en plantas con AIA.

En ausencia de NaCl, el contenido de flavonoides (Tabla 4.13), descendió respecto al control por el pretratamiento en todos los casos. En plantas NP con NaCl, al igual que ocurrió con el contenido de fenoles, aumentó respecto a plantas control con 200 mM (19%) y descendió con 100 mM (31%). En contraste, en plantas pretratadas con reguladores del crecimiento, el contenido de flavonoides aumentó por la adición de 100 y 200 mM NaCl, excepto en plantas con SPD y 200 mM, en las cuales se mantuvieron los mismos niveles que con 0 mM NaCl; con 100 mM fue superior en todos los pretratamientos respecto a plantas NP, sin embargo, con 200 mM sólo en plantas con GA<sub>3</sub>.

En lo que respecta al contenido de prolina en hoja (Tabla 4.13), en plantas con 0 mM NaCl, aumentó en los pretratamientos con GA<sub>3</sub> (83%), AIA (55%) y AS (32%), y descendió con QUIN (10%). En plantas NP aumentó un 14% con 100 mM NaCl en comparación con plantas control. En plantas con GA<sub>3</sub>, descendió con el aumento de la salinidad, aunque los niveles fueron siempre superiores a los de plantas NP para una misma concentración de NaCl. En plantas con AIA, con 100 mM descendió un 41% respecto al control, mientras que, con 200 mM aumentó un 49%, manteniéndose en



niveles similares a los de plantas con 0 mM NaCl. En plantas con AS, con 100 y 200 mM NaCl el contenido de prolina no mostró diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) respecto a plantas control, sin embargo, los niveles fueron inferiores a los de plantas sin NaCl ( $\approx 26\%$ ). En el pretratamiento con SPD, las plantas con 100 mM NaCl aumentaron los niveles de prolina un 84% respecto a plantas control; en contraste, con 200 mM, descendió hasta niveles similares a los de plantas NP con 200 mM NaCl. Finalmente, el pretratamiento con QUIN, descendió los niveles de prolina en plantas con 200 mM NaCl hasta niveles inferiores a los de plantas control y NP con 200 mM NaCl.



**Figura 4.5.** Producción de etileno en hoja de plantas de olivo de 1 año pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 4 semanas. Plantas no pretratadas (NP) y con 0 mM NaCl se utilizaron como control. Los datos son medias  $\pm$  SE ( $n=6$ ). Las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

La producción de etileno se representa en la figura 4.5. Como podemos observar, en plantas NP sólo con 100 mM NaCl se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) respecto al control, aumentando un 142%. Un comportamiento similar mostraron las plantas pretratadas con AS y crecidas con 100 mM NaCl, en las cuales la producción de

etileno se incrementó un 180% respecto al control. En el pretratamiento con GA<sub>3</sub>, el etileno aumentó un 66% con 0 mM NaCl, mientras que, con 100 y 200 mM no se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) respecto al control. Con QUIN, la producción de etileno se inhibió con 100 y 200 mM NaCl; con SPD esto ocurrió con 100 mM y con AIA fue con 0 y 200 mM NaCl.

#### 4.1.7. Capacidad antioxidante

El IC<sub>50</sub> del DPPH<sup>·</sup> estuvo condicionado principalmente por la interacción entre regulador y salinidad ( $\eta^2=0,557$ ;  $P \leq 0,001$ ) y la salinidad ( $\eta^2=0,389$ ;  $P \leq 0,001$ ) (Tabla 4.14). En el caso del IC<sub>50</sub> del ABTS<sup>·+</sup> es interesante destacar que el regulador, la salinidad y la interacción entre ambos (R x S) tuvieron un efecto similar ( $\eta^2=0,318$ , 0,292 ó 0,389, respectivamente;  $P \leq 0,001$ ).

**Tabla 4.14.** Valor  $F$  y coeficiente de determinación ( $\eta^2$ ) para regulador, salinidad y su interacción (regulador x salinidad), de la actividad de barrido de radicales libres DPPH<sup>·</sup> y ABTS<sup>·+</sup> en hoja de plantas de olivo de 1 año pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 4 semanas.

Parámetro	Fuente de variación					
	Regulador		Salinidad		Regulador x Salinidad	
	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$	Valor $F$	$\eta^2$
DPPH IC <sub>50</sub>	426,59***	0,389	102,99***	0,037	305,00***	0,557
ABTS IC <sub>50</sub>	5061,81***	0,318	11628,22***	0,292	3101,40***	0,389

NS, \*, \*\*, \*\*\* indican diferencias no significativas o diferencias significativas para  $P \leq 0,05$ , 0,01 ó 0,001, respectivamente.

Según el regulador, en ambos parámetros, el mayor valor de IC<sub>50</sub> se detectó en plantas pretratadas con QUIN, mientras que los valores más bajos correspondieron a plantas NP; además, en plantas pretratadas con AIA, el IC<sub>50</sub> del DPPH<sup>·</sup> no mostró diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) respecto a plantas NP (Tabla 4.15). Atendiendo a la salinidad, el IC<sub>50</sub> del DPPH<sup>·</sup> descendió un 12% con 100 mM y un 19% con 200 mM

respecto a 0 mM. En cambio, en el caso del ABTS<sup>•+</sup>, el IC<sub>50</sub> aumentó un 5% con 100 mM NaCl y descendió un 37% con 200 mM.

**Tabla 4.15.** Actividad de barrido de radicales libres (DPPH<sup>•</sup> y ABTS<sup>•+</sup>) en hoja de plantas de olivo de 1 año pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 4 semanas. Plantas no pretratadas (NP) y con 0 mM NaCl se utilizaron como control.

	DPPH IC <sub>50</sub> (µg ml <sup>-1</sup> )	ABTS IC <sub>50</sub> (µg ml <sup>-1</sup> )
<b>Regulador</b>		
NP	31,66 e	328,67 f
GA <sub>3</sub>	53,86 c	434,55 d
AIA	30,20 e	346,34 e
AS	59,07 b	446,49 c
SPD	49,07 d	559,68 b
QUIN	69,17 a	595,59 a
<b>Salinidad</b>		
0 mM	54,55 a	505,72 b
100 mM	48,02 b	531,57 a
200 mM	43,94 c	318,37 c
<b>Regulador x Salinidad</b>		
Control	30,95 i	280,65 m
NP+100	44,23 g	402,92 h
NP+200	19,80 k	302,43 k
GA <sub>3</sub> +0	52,40 f	561,99 d
GA <sub>3</sub> +100	56,83 e	453,24 g
GA <sub>3</sub> +200	52,34 f	288,41 l
AIA+0	39,37 h	380,83 i
AIA+100	30,14 i	359,08 j
AIA+200	21,08 k	299,12 k
AS+0	55,58 ef	402,05 h
AS+100	63,34 d	646,25 c
AS+200	58,31 e	291,17 l
SPD+0	101,44 a	889,96 a
SPD+100	20,52 k	559,26 d
SPD+200	25,26 j	229,82 n
QUIN+0	47,56 g	518,82 e
QUIN+100	73,07 c	768,67 b
QUIN+200	86,88 b	499,29 f

En cada columna, para cada fuente de variación (regulador, salinidad o su interacción), las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

En la interacción entre regulador y salinidad, los niveles basales (0 mM NaCl) del IC<sub>50</sub> de DPPH<sup>·</sup> y ABTS<sup>·+</sup> fueron superiores respecto a plantas control en todos los pretratamientos. Sin embargo, los niveles detectados con 100 y 200 mM NaCl estuvieron condicionados por el pretratamiento (Tabla 4.15). En el caso del DPPH<sup>·</sup>, el IC<sub>50</sub> de plantas NP aumentó respecto al control un 43% con 100 mM NaCl, mientras que, con 200 mM descendió un 36% ( $P \leq 0,05$ ). En los pretratamientos con GA<sub>3</sub>, AS y QUIN, el IC<sub>50</sub> fue superior al de plantas control en todos los niveles de NaCl ensayados (0, 100 y 200 mM). En cambio, el IC<sub>50</sub> de plantas pretratadas con AIA, no mostró diferencias ( $P \leq 0,05$ ) respecto al de plantas control con 100 mM NaCl, mientras que, con 200 mM descendió un 32% hasta niveles similares a los de plantas NP con 200 mM. Con SPD, 100 y 200 mM NaCl redujeron el IC<sub>50</sub> respecto al control (34 y 18%, respectivamente).

En relación al ABTS<sup>·+</sup>, las plantas NP con 100 y 200 mM NaCl, incrementaron el IC<sub>50</sub> respecto a plantas control un 44 y 8%, respectivamente. Por otro lado, con 100 mM NaCl sólo las plantas con AIA presentaron valores de IC<sub>50</sub> inferiores a los de plantas NP. En cambio, con 200 mM NaCl, el IC<sub>50</sub> descendió respecto a plantas NP en las pretratadas con GA<sub>3</sub>, AS y SPD, no se modificó con AIA y aumentó (78%) con QUIN. Es importante destacar que en plantas con SPD, la aplicación de 200 mM NaCl trajo consigo un descenso significativo ( $P \leq 0,05$ ) del IC<sub>50</sub> respecto a plantas control (18%).

**Tabla 4.16.a.** Matriz de correlaciones entre las variables estudiadas.

	Área	PS tallo	Elongación	R/PA	RWC	WCS	WSD	E	$P_n$	$g_s$	Ci	PNUE	$-\ln(P_n/Ci)$	$C_a$	$C_b$
PS Hoja	0,938***	0,613**	0,736***	-0,657**	0,813***	-0,654**	-0,832***	0,774***	0,783***	0,722***	-0,305 <sup>NS</sup>	0,733***	-0,552*	0,522*	0,480*
Área		0,577*	0,777***	-0,647**	0,775***	-0,551*	-0,793***	0,701**	0,816***	0,739***	-0,357 <sup>NS</sup>	0,835***	-0,595**	0,553*	0,516*
PS tallo			0,647**	-0,426 <sup>NS</sup>	0,302 <sup>NS</sup>	-0,206 <sup>NS</sup>	-0,349 <sup>NS</sup>	0,536*	0,647**	0,624**	-0,213 <sup>NS</sup>	0,446 <sup>NS</sup>	-0,484*	0,276 <sup>NS</sup>	0,228 <sup>NS</sup>
Elongación				-0,808***	0,629**	-0,345 <sup>NS</sup>	-0,652**	0,394 <sup>NS</sup>	0,759***	0,441*	-0,341 <sup>NS</sup>	0,547*	-0,615**	0,397 <sup>NS</sup>	0,410 <sup>NS</sup>
R/PA					-0,714***	0,459 <sup>NS</sup>	0,741***	-0,393 <sup>NS</sup>	-0,741***	-0,355 <sup>NS</sup>	0,303 <sup>NS</sup>	-0,456 <sup>NS</sup>	0,596**	-0,323 <sup>NS</sup>	-0,389 <sup>NS</sup>
RWC						-0,757***	-0,995***	0,693**	0,696**	0,585**	-0,405*	0,575*	-0,544*	0,601**	0,621**
WCS							0,754***	-0,447 <sup>NS</sup>	-0,388 <sup>NS</sup>	-0,359 <sup>NS</sup>	0,071 <sup>NS</sup>	-0,392 <sup>NS</sup>	0,157 <sup>NS</sup>	-0,220 <sup>NS</sup>	-0,250 <sup>NS</sup>
WSD								-0,706**	-0,736***	-0,599**	0,424*	-0,617**	0,587*	-0,614**	-0,628**
E									0,64**	0,924***	-0,312 <sup>NS</sup>	0,565*	-0,476*	0,713***	0,623**
$P_n$										0,678**	-0,534*	0,840***	-0,816***	0,507*	0,504*
$g_s$											-0,225 <sup>NS</sup>	0,613**	-0,428 <sup>NS</sup>	0,593**	0,510*
Ci												-0,507*	0,897***	-0,171 <sup>NS</sup>	-0,403 <sup>NS</sup>
PNUE													-0,703**	0,493*	0,426 <sup>NS</sup>
$-\ln(P_n/Ci)$														-0,355 <sup>NS</sup>	-0,506*
$C_a$															0,964***
$C_b$															

NS, \*, \*\*, \*\*\* indica diferencias no significativas o significativas para  $P \leq 0,05, 0,01, 0,001$ .

**Tabla 4.16.b.** Matriz de correlaciones entre las variables estudiadas.

	Car	C <sub>a+b</sub>	C <sub>a+b</sub> /Car	APX	GR	POD	Fenoles	Flavonoides	Prolina	Etileno	DPPH <sup>•</sup>	ABTS <sup>•+</sup>
PS Hoja	0,408*	0,519*	0,558*	-0,535*	-0,342 <sup>NS</sup>	-0,355 <sup>NS</sup>	-0,344 <sup>NS</sup>	-0,616**	0,316 <sup>NS</sup>	-0,135 <sup>NS</sup>	0,197 <sup>NS</sup>	0,429 <sup>NS</sup>
Área	0,455*	0,550*	0,533*	-0,589*	-0,359 <sup>NS</sup>	-0,443 <sup>NS</sup>	-0,264 <sup>NS</sup>	-0,464 <sup>NS</sup>	0,345 <sup>NS</sup>	-0,119 <sup>NS</sup>	0,302 <sup>NS</sup>	0,502*
PS tallo	0,201 <sup>NS</sup>	0,268 <sup>NS</sup>	0,324 <sup>NS</sup>	-0,247 <sup>NS</sup>	-0,034 <sup>NS</sup>	-0,018 <sup>NS</sup>	0,125 <sup>NS</sup>	-0,294 <sup>NS</sup>	0,137 <sup>NS</sup>	-0,006 <sup>NS</sup>	0,005 <sup>NS</sup>	0,061 <sup>NS</sup>
Elongación	0,310 <sup>NS</sup>	0,406 <sup>NS</sup>	0,495*	-0,527*	-0,143 <sup>NS</sup>	-0,266 <sup>NS</sup>	-0,108 <sup>NS</sup>	-0,340 <sup>NS</sup>	0,501*	-0,011 <sup>NS</sup>	-0,003 <sup>NS</sup>	0,183 <sup>NS</sup>
R/PA	-0,254 <sup>NS</sup>	-0,343 <sup>NS</sup>	-0,498*	0,383 <sup>NS</sup>	0,033 <sup>NS</sup>	0,043 <sup>NS</sup>	0,339 <sup>NS</sup>	0,337 <sup>NS</sup>	-0,353 <sup>NS</sup>	0,133 <sup>NS</sup>	-0,230 <sup>NS</sup>	-0,332 <sup>NS</sup>
RWC	0,542*	0,616**	0,456 <sup>NS</sup>	-0,479*	-0,113 <sup>NS</sup>	-0,344 <sup>NS</sup>	-0,347 <sup>NS</sup>	-0,571*	0,304 <sup>NS</sup>	-0,313 <sup>NS</sup>	0,363 <sup>NS</sup>	0,467 <sup>NS</sup>
WCS	-0,182 <sup>NS</sup>	-0,235 <sup>NS</sup>	-0,234 <sup>NS</sup>	0,147 <sup>NS</sup>	-0,049 <sup>NS</sup>	0,142 <sup>NS</sup>	0,069 <sup>NS</sup>	0,535*	-0,155 <sup>NS</sup>	0,496*	-0,073 <sup>NS</sup>	-0,367 <sup>NS</sup>
WSD	-0,547*	-0,628**	-0,489*	0,471*	0,123 <sup>NS</sup>	0,329 <sup>NS</sup>	0,350 <sup>NS</sup>	0,548*	-0,317 <sup>NS</sup>	0,315 <sup>NS</sup>	-0,382 <sup>NS</sup>	-0,489*
E	0,634**	0,700**	0,420 <sup>NS</sup>	-0,522*	-0,240 <sup>NS</sup>	-0,219 <sup>NS</sup>	-0,410 <sup>NS</sup>	-0,410 <sup>NS</sup>	0,237 <sup>NS</sup>	-0,153 <sup>NS</sup>	0,269 <sup>NS</sup>	0,344 <sup>NS</sup>
P <sub>n</sub>	0,373 <sup>NS</sup>	0,514*	0,691**	-0,470*	-0,301 <sup>NS</sup>	-0,450 <sup>NS</sup>	-0,182 <sup>NS</sup>	-0,177 <sup>NS</sup>	0,386 <sup>NS</sup>	-0,065 <sup>NS</sup>	0,280 <sup>NS</sup>	0,416 <sup>NS</sup>
g <sub>s</sub>	0,508*	0,582*	0,408 <sup>NS</sup>	-0,576*	-0,244 <sup>NS</sup>	-0,215 <sup>NS</sup>	-0,269 <sup>NS</sup>	-0,278 <sup>NS</sup>	0,289 <sup>NS</sup>	-0,070 <sup>NS</sup>	0,241 <sup>NS</sup>	0,273 <sup>NS</sup>
Ci	-0,289 <sup>NS</sup>	-0,457 <sup>NS</sup>	0,076 <sup>NS</sup>	0,200 <sup>NS</sup>	-0,022 <sup>NS</sup>	-0,141 <sup>NS</sup>	0,092 <sup>NS</sup>	-0,165 <sup>NS</sup>	0,004 <sup>NS</sup>	-0,219 <sup>NS</sup>	-0,306 <sup>NS</sup>	-0,390 <sup>NS</sup>
PNUE	0,376 <sup>NS</sup>	0,483*	0,556*	-0,362 <sup>NS</sup>	-0,398 <sup>NS</sup>	-0,583*	-0,115 <sup>NS</sup>	-0,127 <sup>NS</sup>	0,335 <sup>NS</sup>	-0,061 <sup>NS</sup>	0,406 <sup>NS</sup>	0,676**
-ln(P <sub>n</sub> /Ci)	-0,098 <sup>NS</sup>	-0,466 <sup>NS</sup>	-0,143 <sup>NS</sup>	0,092 <sup>NS</sup>	0,186 <sup>NS</sup>	0,103 <sup>NS</sup>	-0,041 <sup>NS</sup>	0,014 <sup>NS</sup>	-0,194 <sup>NS</sup>	-0,088 <sup>NS</sup>	-0,188 <sup>NS</sup>	-0,440 <sup>NS</sup>
C <sub>a</sub>	0,966***	0,998***	0,426 <sup>NS</sup>	-0,526*	-0,287 <sup>NS</sup>	-0,294 <sup>NS</sup>	-0,484*	-0,090 <sup>NS</sup>	0,268 <sup>NS</sup>	-0,226 <sup>NS</sup>	0,273 <sup>NS</sup>	0,305 <sup>NS</sup>
C <sub>b</sub>	0,941***	0,978***	0,456 <sup>NS</sup>	-0,464 <sup>NS</sup>	-0,223 <sup>NS</sup>	-0,232 <sup>NS</sup>	-0,491*	-0,092 <sup>NS</sup>	0,202 <sup>NS</sup>	-0,249 <sup>NS</sup>	0,238 <sup>NS</sup>	0,223 <sup>NS</sup>
Car		0,967***	0,197 <sup>NS</sup>	-0,401 <sup>NS</sup>	-0,084 <sup>NS</sup>	-0,207 <sup>NS</sup>	-0,415 <sup>NS</sup>	-0,086 <sup>NS</sup>	0,120 <sup>NS</sup>	-0,198 <sup>NS</sup>	0,326 <sup>NS</sup>	0,330 <sup>NS</sup>
C <sub>a+b</sub>			0,435 <sup>NS</sup>	-0,516*	-0,268 <sup>NS</sup>	-0,283 <sup>NS</sup>	-0,486*	-0,094 <sup>NS</sup>	0,261 <sup>NS</sup>	-0,229 <sup>NS</sup>	0,267 <sup>NS</sup>	0,290 <sup>NS</sup>
C <sub>a+b</sub> /Car				-0,531*	-0,735***	-0,379 <sup>NS</sup>	-0,398 <sup>NS</sup>	-0,025 <sup>NS</sup>	0,567*	-0,214 <sup>NS</sup>	-0,045 <sup>NS</sup>	0,006 <sup>NS</sup>
APX					0,602**	0,362 <sup>NS</sup>	0,511*	0,084 <sup>NS</sup>	-0,552*	-0,041 <sup>NS</sup>	0,048 <sup>NS</sup>	-0,017 <sup>NS</sup>
GR						0,523*	0,431 <sup>NS</sup>	-0,088 <sup>NS</sup>	-0,405 <sup>NS</sup>	0,136 <sup>NS</sup>	0,059 <sup>NS</sup>	0,020 <sup>NS</sup>
POD							-0,163 <sup>NS</sup>	-0,077 <sup>NS</sup>	-0,325 <sup>NS</sup>	0,179 <sup>NS</sup>	-0,086 <sup>NS</sup>	-0,306 <sup>NS</sup>
Fenoles								0,221 <sup>NS</sup>	-0,125 <sup>NS</sup>	-0,136 <sup>NS</sup>	-0,225 <sup>NS</sup>	-0,122 <sup>NS</sup>
Flavonoides									0,117 <sup>NS</sup>	-0,025 <sup>NS</sup>	-0,188 <sup>NS</sup>	-0,268 <sup>NS</sup>
Prolina										-0,058 <sup>NS</sup>	-0,211 <sup>NS</sup>	0,055 <sup>NS</sup>
Etileno											-0,032 <sup>NS</sup>	0,008 <sup>NS</sup>
DPPH <sup>•</sup>												0,703**

NS, \*, \*\*, \*\*\* indica diferencias no significativas o significativas para  $P \leq 0,05, 0,01, 0,001$ .

## **4.2. Discusión**

El descenso del crecimiento del cv. Picual por la salinidad (Tabla 4.1), confirma los resultados obtenidos por Melgar et al. (2008) para este mismo cultivar. Además, en trabajos recientes se ha descrito descenso del crecimiento en otros cultivares tolerantes y sensibles a la salinidad (Perica et al., 2008; Kchaou et al., 2010, 2013; Bader et al., 2015).

Al igual que ocurre en el cv. Picual (Tabla 4.2), el aumento del crecimiento de la planta por aplicación de reguladores del crecimiento, ha sido descrito en diferentes cultivos (Khan et al., 2010; Hayat et al., 2012; Agami, 2013; Iqbal and Ashraf, 2013). En el cv. Picual, los reguladores que promovieron el crecimiento fueron AIA, QUIN y AS. Sin embargo, para algunos reguladores del crecimiento, en condiciones de estrés salino la respuesta del crecimiento vino determinada por el nivel de NaCl. Las diferencias entre 100 y 200 mM NaCl pueden deberse a que el estrés iónico, implicado en el estrés salino, depende de la intensidad del estrés y de la tolerancia a la salinidad (Munns and Tester, 2008). De hecho, en experimentos anteriores presentados en este trabajo (pág. 110), se comprobó que en estaquillas enraizadas de 'Picual', las plantas con 100 mM necesitaron 6 semanas más de exposición a la sal que con 200 mM para ejercer el mismo efecto sobre el crecimiento de la planta.

Kaya et al. (2009), afirmaron que la reducción del crecimiento de la planta por la salinidad puede ser mitigado por la aplicación de reguladores del crecimiento. Sin embargo, en el cv. Picual, con 100 mM NaCl algunos parámetros de crecimiento descendieron más en plantas pretratadas con GA<sub>3</sub>, SPD, AS y QUIN que en plantas NP (Tabla 4.2); con 200 mM esto sólo ocurrió con SPD. Otros autores también han descrito

un efecto negativo de la aplicación de AS 0,1 mM sobre el crecimiento de plantas de guisante en condiciones de estrés salino (70 mM NaCl) (Barba-Espin et al., 2011). Según Prasch and Sonnewald (2015), el descenso del crecimiento puede deberse a la adaptación de la planta a las condiciones de estrés, ya que parte de la energía y nutrientes que la planta utiliza para crecer en condiciones óptimas, debe desviarlos para procesos de defensa en condiciones de estrés. Además, un descenso del crecimiento puede proteger la parte aérea de la excesiva acumulación de iones salinos (Flowers and Yeo, 1995), y por lo tanto, mejorar la tolerancia a la salinidad. De hecho, la relación R/PA aumentó con 200 mM en todos los casos y con 100 mM, en las plantas pretratadas con GA<sub>3</sub>, SPD, AIA y AS. Según Younis et al. (2000), el aumento de la relación R/PA puede jugar un papel importante en la adaptación de la planta al estrés.

Por otro lado, con 200 mM NaCl, se observó un alivio del efecto negativo del estrés salino sobre el crecimiento de plantas del cv. Picual por el pretratamiento con AIA, seguidas por las pretratadas con QUIN, GA<sub>3</sub> y AS. Autores como Syeed et al. (2011), Wu et al. (2012) y El-Samad (2013) describieron resultados similares en plantas de mostaza, berenjena y trigo con AS, GA<sub>3</sub>, QUIN y AIA, respectivamente. Además, Iqbal and Ashraf (2013) describieron descenso del efecto inhibitor del estrés salino sobre el crecimiento de cultivares de trigo (tolerantes y no tolerantes) pretratados con GA<sub>3</sub>.

Según Flexas et al. (2007), un descenso de la disponibilidad de CO<sub>2</sub> para la  $P_n$  puede deberse a un descenso de la difusión de este a través de los estomas y mesófilo. Según nuestros resultados, en el cv. Picual, el descenso de  $P_n$  en plantas sin sal con AIA y QUIN pudo deberse a efectos del mesófilo más que al cierre estomático; esto es porque en estas plantas la  $g_s$  y la E no descendieron en comparación con plantas control



(Tabla 4.6), a la vez que la acumulación de materia seca en hoja aumentó en mayor proporción que en plantas control (Tabla 4.2).

El descenso del crecimiento de muchas especies de plantas sujetas a estrés ambiental, esta con frecuencia asociado a una reducción de la capacidad fotosintética de la planta (Moradi and Ismail, 2007; Naeem et al., 2010; Wu et al., 2012). De hecho, en nuestro trabajo con el cv. Picual observamos una correlación positiva de la  $P_n$  con todos los parámetros de crecimiento (Tabla 4.16.a). El descenso de la  $P_n$  por la salinidad en olivo, ha sido ampliamente descrito (Chartzoulakis, 2005; Melgar et al., 2008; Ben Ahmed et al., 2011; Kchaou et al., 2013). En este aspecto, los pretratamientos GA<sub>3</sub>, AIA, QUIN y AS mejoraron la capacidad fotosintética del cv. Picual ( $\approx 71\%$ ) en plantas con 200 mM NaCl (Tabla 4.6). En otros cultivos, también se ha descrito menor reducción de la asimilación de CO<sub>2</sub> por la aplicación exógena de GA<sub>3</sub>, QUIN y AS (Wu et al., 2012; Khan et al., 2010; Iqbal and Ashraf, 2013; Bastam et al., 2013). Syeed et al. (2011) describen mejora de la actividad fotosintética y descenso de la abertura estomática ( $g_s$ ) por la aplicación de AS 0,5 mM a un cultivar sensible de mostaza crecido con 50 mM NaCl. En contraste, en plantas salinizadas del cv. Picual,  $g_s$  mantuvo niveles más elevados que plantas NP cuando se pretrataron con AS. Resultados similares han sido descritos por Bastam et al. (2013) para plantas de pistacho con 60 y 90 mM NaCl. Además Wu et al. (2012), publicaron un aumento de  $g_s$  por la aplicación de QUIN en plantas de berenjena con 90 mM NaCl. En el cv. Picual pretratado con QUIN se obtuvieron resultados similares con 100 mM NaCl (Tabla 4.6). Otros autores, también describen aumento de  $g_s$  por la aplicación de GA<sub>3</sub> en otras especies vegetales en condiciones de estrés salino (Khan et al., 2010).

La correlación positiva entre la  $P_n$  y la  $g_s$  indica que el cierre estomático es

responsable, en parte, de la reducción de la  $P_n$  en condiciones de estrés. Sin embargo, el diferente comportamiento de la  $C_i$  entre los distintos pretratamientos en respuesta a la salinidad indica que el sistema fotosintético se afecta de diferente manera bajo estas condiciones adversas y que las limitaciones no estomáticas son también muy importantes, especialmente en plantas NP y pretratadas con AS y SPD (Loreto et al, 2003; López-Climent et al., 2008). De hecho, estos tres tipos de plantas fueron los que mostraron fotoinhibición con uno (100 mM NaCl; AS y SPD) o los dos niveles de NaCl (100 y 200 mM NaCl; NP; Figura 4.1).

Por otro lado, la  $g_s$  presentó una elevada correlación positiva con la E ( $r=0,924$ ,  $P\leq 0,001$ ), explicando el 85% del descenso de la E. La elevada E en plantas salinizadas del cv. Picual por los pretratamientos con GA<sub>3</sub> y QUIN, está en consonancia con los resultados publicados por Iqbal et al. (2013) y Zhu et al. (2012) para otras especies.

La inhibición de la fotosíntesis por la salinidad puede traer consigo una saturación de la cadena transportadora de electrones en el cloroplasto y, en consecuencia, aumentar el estrés oxidativo por aumento de la reacción de Mehler (Koyro et al., 2008; Yazici et al., 2008). En estas circunstancias las especies reactivas del oxígeno (ROS) desnaturalizan las proteínas LHC, liberando las clorofilas que tienen ligadas, las cuales serán destruidas por las clorofilasas (Shah, 2007). Esto explicaría el descenso de pigmentos fotosintéticos observado en el cv. Picual por el estrés salino (Tabla 4.9). Esta respuesta al estrés salino también ha sido descrita para otros cultivares, tolerantes y sensibles, del olivo (Ben Ahmed et al., 2010; Kchaou et al., 2010) y para otros cultivos (Gadallah, 1999; Khan et al., 2010; Alsokari, 2011; Pazuki et al., 2013). La pérdida de clorofila, es por tanto, considerada como un marcador de estrés salino a nivel celular (Singh and Dubey, 1995).

Por otro lado, el descenso de clorofila puede ser resultado de una inhibición de su biosíntesis. Esta inhibición puede estar mediada por el aumento de la producción de etileno en condiciones de estrés salino, como se ha descrito para trigo (Khan, 2003). En el caso del cv. Picual, sólo hubo aumento de la producción de etileno en plantas con 100 mM NaCl NP y con AS (Figura 4.5).

La aplicación de GA<sub>3</sub>, AS y QUIN produjo un incremento de los pigmentos fotosintéticos en plantas no estresadas (Tabla 4.9). Estos resultados confirman los descritos por otros autores para otros cultivos (Gadallah, 1999; Pazuki et al., 2013; Agami, 2013). Además, en plantas estresadas pretratadas con GA<sub>3</sub> y QUIN los niveles de C<sub>a</sub> y Car se mantuvieron en niveles superiores a los de plantas NP sin sal (Tabla 4.9). Por tanto, ambas hormonas parecen tener un importante efecto en la estabilidad de estos pigmentos. Las plantas con AS y SPD ejercieron el mismo efecto pero sólo con 100 mM NaCl. Igualmente, otros autores han descrito, para otros cultivos, mejora de los niveles de pigmentos fotosintéticos en condiciones de estrés salino por la aplicación de QUIN, GA<sub>3</sub> y AS (Gadallah, 1999; Khan, 2010; Agami, 2013). En estudios realizados por otros autores, se ha demostrado que las GA<sub>3</sub> alivian el efecto del estrés salino sobre los pigmentos (Shah, 2007). Esto puede ser atribuido a que las GA<sub>3</sub> mejoran la ultraestructura de los plastidios asociada con la retención de clorofila, evitándose así su degradación por las clorofilasas y retrasándose la senescencia (Shah, 2007). De forma similar, el AS previene la degradación del cloroplasto, retrasando la senescencia y abscisión de la hoja (Kulaeva et al., 1991). En lo que respecta a la QUIN, también se ha demostrado que modera el descenso de los pigmentos fotosintéticos (Kulaeva, 1982; Kusnetsov et al., 1994; Kulaeva and Kuznetsov, 2002; Chernyad'ev and Monakhova, 2003). Las citoquininas intervienen en la regulación de los genes que codifican para las

enzimas que intervienen en la síntesis de pigmentos (Kusnetsov et al., 1994).

Las plantas que crecen en ambientes salinos, además de enfrentarse a un estrés osmótico, producido por la acumulación de sales en el medio, para absorber agua, y a una toxicidad iónica, producida por la acumulación de sales en la planta, deben enfrentarse a un estrés oxidativo. Esto es por la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) ( $O_2^{\cdot-}$ ;  $H_2O_2$ ,  $HO^{\cdot}$  y  $^1O_2$ ). Las ROS alteran la integridad de las membranas celulares, así como, la actividad de numerosas enzimas y el funcionamiento de la maquinaria fotosintética (Serrano et al., 1999). Para eliminar las ROS, y por tanto, evitar el daño oxidativo, las plantas poseen mecanismos de defensa enzimáticos y no enzimáticos. El  $H_2O_2$  puede ser sustrato de varias enzimas tales como la catalasa, localizada en los peroxisomas, o las peroxidasas del citosol y cloroplastos. Entre las peroxidasas tenemos la APX y la POD. Feierabend (2005) y Foyer (1996) describen la APX como la más importante, también localizada en los cloroplastos de los tejidos verdes. Según los datos obtenidos para el cv. Picual, en plantas NP la actividad POD alcanzó niveles superiores a los de la APX en condiciones de estrés salino. Por tanto, en plantas NP, la POD fue de gran importancia en la eliminación del  $H_2O_2$ . Sin embargo, el pretratamiento con reguladores del crecimiento no aumentó la actividad POD en situaciones de estrés salino. Karray-Bouraoui et al. (2010), describen en dos cultivares de cártamo con diferente tolerancia a la salinidad, un aumento de la actividad POD en condiciones salinas (50 mM NaCl).

El aumento de la APX por la salinidad ha sido previamente descrito en olivo y en otras especies vegetales (Valderrama et al., 2006; Ben Ahmed et al., 2009, 2010; Leyva et al., 2011; Syeed et al., 2011). Ben Ahmed et al. (2010), detectaron un aumento de la actividad APX con 100 y 200 mM NaCl, en el cv. Chemlali de olivo, descrito

como tolerante a la salinidad (Bouaziz, 1990; Chartzoulakis, 2005). En contraste, Melgar et al. (2009) describieron un descenso de la APX por la aplicación de 150 mM NaCl en el cv. Allora. Mittova et al. (2004) publicaron resultados similares en otras especies vegetales. En el cv. Picual con 100 mM NaCl, la actividad APX sólo se incrementó en plantas pretratadas con reguladores del crecimiento, destacándose el pretratamiento con AIA, con el cual se alcanzaron los valores más elevados, al igual que ocurrió en plantas con 200 mM NaCl (Figura 4.3). En consecuencia, el pretratamiento con AIA puede jugar un importante papel en la tolerancia a la salinidad del cv. Picual, por su mejora de la actividad antioxidante. En estudios realizados por Syeed et al. (2011) con mostaza, se asoció una mayor actividad APX y GR con la tolerancia a la salinidad. Estos mismos autores, detectaron un aumento de estas actividades en estrés con 50 mM NaCl, por la aplicación de AS. En el caso del cv. Picual, el pretratamiento con AS sólo mejoró la respuesta de la APX en estrés con 100 mM NaCl. Por otro lado, en nuestro experimento, los pretratamientos con AIA y QUIN trajeron consigo una mejora en los niveles de la actividad GR en plantas sometidas a estrés salino con 100 mM NaCl. Ambas enzimas, APX y GR, forman parte del ciclo ascorbato-glutation, en el cual se detoxifica el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a expensas del NAD(P)H. Por lo que, la regeneración del glutatión reducido por la GR en condiciones de estrés salino con 100 mM NaCl, es más efectiva en plantas pretratadas con AIA. El incremento de la actividad GR en respuesta al estrés salino también ha sido descrita en otras especies (Mostofa et al., 2015), y en plántulas de olivo in vitro (Valderrama et al., 2006).

Entre los principales antioxidantes no enzimáticos se incluyen los flavonoides, antocianinas, compuestos fenólicos y carotenoides (Türkan and Demiral, 2009). En el cv. Picual, los fenoles de la hoja en plantas NP aumentaron sólo con 200 mM NaCl

(Tabla 4.13). Sin embargo, en otros cultivares de olivo ('Zard', 'Ascolana', 'Koroneiki', 'Arbequina' y 'Cipressino') se describió un aumento de los fenoles totales con niveles inferiores de NaCl (Remorini et al., 2009; Petridis et al., 2012). Esto ocurrió en el cv. Picual cuando se pretrató con GA<sub>3</sub>, AIA, AS, SPD y QUIN. Además, con 200 mM NaCl los niveles de fenoles totales de plantas pretratadas con AIA fueron superiores a los de plantas NP. Por tanto, el pretratamiento con AIA favoreció la producción de fenoles en condiciones de estrés salino.

Los flavonoides de plantas NP del cv. Picual, tuvieron un comportamiento similar al de los fenoles, aumentando sólo con 200 mM NaCl. En el cv. Cipressino tampoco se detectó aumento de los flavonoides con niveles de NaCl inferiores a 200 mM (Remorini et al., 2009). No obstante, en el cv. Picual se promovió su producción en condiciones de estrés salino con 100 mM NaCl por el pretratamiento con SPD, y con 200 mM NaCl por el pretratamiento con GA<sub>3</sub>. Esto es importante, pues los flavonoides contribuyen a la eliminación de los radicales libres (Yamasaki et al., 1997; Babu et al., 2003; Tattini et al., 2004; Agati et al., 2007).

Numerosos estudios describen la prolina como una molécula de bajo peso molecular que se acumula en situaciones de estrés salino contribuyendo así a la osmorregulación de la planta (Munns and Tester, 2008; Iqbal et al., 2014). Además, la prolina ha sido descrita en plantas superiores como un antioxidante que contribuye a eliminar los radicales libres producidos durante el estrés (Khedr et al., 2003; Kholer et al., 2009; Iqbal et al., 2014). Según nuestros resultados para el cv. Picual, en plantas NP se acumuló prolina en hoja sólo con 100 mM NaCl. Resultados similares fueron descritos por Demiral et al. (2011) para el cv. Gemlik. En contraste, Ben Ahmed et al. (2010, 2011) describieron acúmulo de prolina con 200 mM NaCl en el cv. Chemlali,

tolerante a la salinidad. Según Ben Ahmed et al. (2009), la acumulación de prolina en olivo se relaciona con la eficiencia del mecanismo de tolerancia a la salinidad. Por tanto, es probable que la duración y grado de síntesis de prolina se relacionen con el nivel de tolerancia a la salinidad y con la estrategia bioquímica del cultivar. Los pretratamientos con AIA, GA<sub>3</sub> y AS favorecieron el acúmulo de prolina con 200 mM NaCl, y por tanto, favorecieron su tolerancia a la salinidad. Iqbal et al. (2014) sugirieron que la aplicación de fitohormonas puede influir en la tolerancia a la salinidad regulando el metabolismo de la prolina a través del aumento del contenido de N ó Ca<sup>2+</sup>. En el cv. Picual, con 100 mM NaCl, las plantas que acumularon más prolina en hoja fueron las pretratadas con SPD (Tabla 4.13). Un efecto similar fue observado por Parvin et al. (2014) en ginseng (150 mM NaCl) y por Roychoudhury (2011) en arroz (200 mM NaCl). Parvin et al. (2014) sugieren que el efecto de la SPD puede estar relacionado con la disponibilidad de sustrato, ya que poliaminas y prolina tienen como precursores comunes el glutamato, la arginina y la ornitina.

El etileno es una hormona implicada en la respuesta de las plantas a diferentes tipos de estrés (Morgan and Drew, 1997; Cao et al., 2007). En plantas NP del cv. Picual, al igual que ocurría con los niveles de prolina, sólo se incrementó su producción por el estrés salino con 100 mM NaCl. En condiciones de estrés salino, el etileno está implicado en la homeostasis regulando la expresión de los genes de la H<sup>+</sup>-ATPasa que controlan el movimiento del Na<sup>+</sup> a través de la membrana plasmática, así como otros procesos fisiológicos como la regulación del pH intracelular, apertura estomática y elongación celular (Cosgrove, 1997; Yang et al., 2003); además, puede ser responsable de la senescencia y la abscisión producida por el déficit hídrico. En el cv. Picual, salvo en el caso del AS, el pretratamiento con reguladores del crecimiento no favoreció la

producción de etileno por el estrés salino. De forma similar a lo que ocurrió en el cv. Picual, la producción de etileno en trigo, en condiciones de estrés salino, descendió por la aplicación de GA<sub>3</sub> (El-Samad, 2013)

Un valor de IC<sub>50</sub> bajo para DPPH<sup>•</sup> y ABTS<sup>•+</sup> refleja una mejora en la captación de radicales libres (Molyneux, 2004; Subhasree et al., 2009; Karray-Bouraoui et al., 2010; Demiral et al., 2011). En el cv. Picual, la capacidad de barrido de radicales libres se mejoró en plantas con 100 mM NaCl pretratadas con AIA y SPD. En el caso de los radicales catiónicos (ABTS<sup>•+</sup>), la mayor capacidad de barrido con 100 mM NaCl se obtuvo por el pretratamiento con AIA; con 200 mM esto ocurrió con SPD, GA<sub>3</sub> y AS. Según Parvin et al. (2014), la aplicación exógena de AS redujo las ROS en ginseng. Por otra parte, en el cv. Picual el pretratamiento con QUIN trajo consigo la menor capacidad para eliminar radicales libres. En contraste, Chakrabarti and Mukherji (2003) afirmaron que, en soja, la QUIN actúa eliminando los radicales libres o que podría estar implicada en un mecanismo antioxidante relacionado con la protección de la purina frente a la degradación.



## 5. Interacción entre el ácido abscísico y la salinidad en estaquillas enraizadas de *O. europaea* cv. Picual

### 5.1. Resultados

#### 5.1.1. Crecimiento vegetativo

Las plantas que crecieron con 200 mM NaCl, cuando no se les aplicó ABA (0  $\mu$ M ABA) alcanzaron el 100% de mortandad a las 8 semanas de estrés salino, mientras que con 1 y 10  $\mu$ M ABA la mortandad fue del 70 y 60%, respectivamente.

Según los parámetros de crecimiento estudiados (Tablas 5.1 y 5.2), las plantas crecidas con 0  $\mu$ M ABA y 100 mM NaCl durante 8 semanas, fueron capaces de igualar su crecimiento al de plantas control tras 3 semanas de recuperación (sin NaCl), excepto en la elongación de tallo y en la masa foliar por unidad de área (LMA), que mostraron una reducción del 46 y 9%, respectivamente.

La relación peso seco (PS) de hoja/PS total (LMR) de plantas crecidas con ABA (1 y 10  $\mu$ M) y 0 mM NaCl no mostró diferencias ( $P \leq 0,05$ ) respecto al control (Tabla 5.1). Las plantas crecidas con 1  $\mu$ M ABA y NaCl (100 y 200 mM) inhibieron la LMR una media del 39%, mientras que, con 10  $\mu$ M de ABA sólo se inhibió con 200 mM NaCl (46%). En cuanto a la relación peso seco (PS) de tallo/PS total (SMR), sólo las plantas crecidas con 1  $\mu$ M ABA y 100 mM NaCl y, 10  $\mu$ M ABA y 200 mM NaCl mostraron diferencias respecto al control, incrementando este parámetro aproximadamente un 68% ( $P \leq 0,05$ ). La relación peso seco (PS) de raíz/PS total (RMR) aumentó por la aplicación de 10  $\mu$ M ABA en plantas sin NaCl. Por tanto, la aplicación de 10  $\mu$ M ABA favoreció la acumulación de materia seca en raíz respecto a tallo y hoja.

Con 1  $\mu\text{M}$  ABA, la RMR aumentó un 52 y 141% con 100 y 200 mM NaCl, respectivamente; además, el valor más alto de la RMR se detectó en plantas con 1  $\mu\text{M}$  ABA y 200 mM NaCl (0,335). Con 10  $\mu\text{M}$  ABA se observó un incremento medio del 45% para los tres niveles de sal ensayados. En consecuencia, en plantas tratadas con ABA, la aplicación de NaCl afectó más al PS de la hoja que al del tallo y raíz.

El peso seco (PS) total, se redujo respecto al control en plantas crecidas con 1  $\mu\text{M}$  ABA y NaCl (100 y 200 mM) y con 10  $\mu\text{M}$  ABA sin sal y con 200 mM NaCl ( $\approx 49\%$ ;  $P \leq 0,05$ ).

**Tabla 5.1.** Relación peso seco (PS) de hoja/PS total (LMR), PS de tallo/PS total (SMR), PS de raíz/PS total (RMR) y raíz/parte aérea (R/PA), y PS total de plantas de olivo tratadas con ABA (0, 1 y 10  $\mu\text{M}$  ABA) durante 11 semanas, de las cuales 8 crecieron en condiciones de estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl). Plantas con 0  $\mu\text{M}$  ABA y 0 mM NaCl se utilizaron como control.

	LMR	SMR	RMR	R/PA	PS total (g planta <sup>-1</sup> )
Control	0,567 ab	0,272 bc	0,139 d	0,149 d	1,89 a
0 $\mu\text{M}$ ABA+100	0,641 a	0,202 c	0,154 cd	0,196 cd	1,66 ab
0 $\mu\text{M}$ ABA+200	ND	ND	ND	ND	ND
1 $\mu\text{M}$ ABA+0	0,577ab	0,243 bc	0,161 cd	0,192 cd	1,53 abc
1 $\mu\text{M}$ ABA+100	0,349 c	0,440 a	0,211 b	0,224 bc	1,21 bcd
1 $\mu\text{M}$ ABA+200	0,343 c	0,321 b	0,335 a	0,510 a	0,719 d
10 $\mu\text{M}$ ABA+0	0,534 b	0,264 bc	0,211 b	0,220 bc	1,17 cd
10 $\mu\text{M}$ ABA+100	0,523 b	0,267 bc	0,185 bc	0,216 bc	1,46 abc
10 $\mu\text{M}$ ABA+200	0,306 c	0,470 a	0,208 b	0,266 b	0,776 d

Para cada parámetro, las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ). ND, no determinado.

La relación raíz/parte aérea (R/PA) aumentó en torno a un 57% respecto al control en plantas con 10  $\mu\text{M}$  ABA (0, 100 y 200 mM NaCl). Con 1  $\mu\text{M}$  ABA, con 100 mM NaCl aumentó hasta niveles similares a los de plantas con 10  $\mu\text{M}$  ABA mientras que y con 200 mM aumentó un 242%. Por lo que en las condiciones de experimentación se favoreció el crecimiento de la raíz más que el de la parte aérea. Según los datos

presentados, el descenso del crecimiento de la parte aérea se debió principalmente al descenso del crecimiento de la hoja, lo que a su vez se justifica por la elevada correlación negativa observada entre la relación R/PA y los parámetros de crecimiento de la hoja ( $r=-0,512$  y  $-0,552$ ,  $P\leq 0,001$ , para la LMR y el AF total, respectivamente; Tabla 5.7).

En lo que respecta al crecimiento por expansión, la elongación de tallo se redujo tanto por la aplicación de ABA como por el estrés salino (Tabla 5.2). En el caso de plantas crecidas con 0 y 100 mM NaCl, independientemente de la concentración de ABA (0, 1 y 10  $\mu\text{M}$ ), la inhibición de la elongación de tallo fue, aproximadamente, del 59%. Con 200 mM NaCl y ABA (1 y 10  $\mu\text{M}$ ), la inhibición fue en torno al 87% ( $P\leq 0,05$ ). Es interesante destacar que, en plantas con 10  $\mu\text{M}$  ABA, no se observaron diferencias entre los niveles sal ensayados, y que con 1  $\mu\text{M}$  ABA sólo se detectaron diferencias entre 0 y 200 mM NaCl ( $P\leq 0,05$ ).

**Tabla 5.2.** Elongación de tallo, área foliar (AF) total, masa foliar por unidad de área (LMA), relación de área foliar (LAR) y densidad de la hoja (D) de plantas de olivo tratadas con ABA (0, 1 y 10  $\mu\text{M}$  ABA) durante 11 semanas, de las cuales 8 crecieron en condiciones de estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl). Plantas con 0  $\mu\text{M}$  ABA y 0 mM NaCl se utilizaron como control.

	Elongación de tallo (cm planta <sup>-1</sup> )	AF total (cm <sup>2</sup> planta <sup>-1</sup> )	LMA (g dm <sup>-2</sup> )	LAR (m <sup>2</sup> kg <sup>-1</sup> )	D (g Kg <sup>-1</sup> )
Control	19,97 a	96,20 a	1,11 a	5,10 ab	327,77 ab
0 $\mu\text{M}$ ABA+100	10,74 b	81,98 ab	1,01 c	5,40 a	278,96 bc
0 $\mu\text{M}$ ABA+200	ND	ND	ND	ND	ND
1 $\mu\text{M}$ ABA+0	8,42 b	82,47 ab	1,03 b	5,59 a	365,25 a
1 $\mu\text{M}$ ABA+100	7,56 bc	49,52 cd	0,954 d	4,16 bc	282,40 bc
1 $\mu\text{M}$ ABA+200	2,75 c	27,70 d	0,891 e	3,85 c	264,20 c
10 $\mu\text{M}$ ABA+0	7,30 bc	56,63 bcd	1,00 c	5,34 a	279,86 bc
10 $\mu\text{M}$ ABA+100	6,64 bc	75,90 abc	0,976 d	5,38 a	310,18 abc
10 $\mu\text{M}$ ABA+200	2,45 c	54,65 bcd	0,568 f	6,07 a	265,87 c

Para cada parámetro, las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P\leq 0,05$ ). ND, no determinado.

El área foliar (AF) total se redujo respecto al control una media del 51% ( $P \leq 0,05$ ) por la aplicación de 1  $\mu\text{M}$  de ABA y NaCl (100 y 200 mM), así como, por la aplicación de 10  $\mu\text{M}$  ABA en plantas sin sal y con 200 mM NaCl (Tabla 5.2). En plantas con 1  $\mu\text{M}$  ABA no se detectaron diferencias entre 100 y 200 mM NaCl, así mismo, en plantas con 10  $\mu\text{M}$  ABA no se detectaron diferencias entre los niveles de NaCl ensayados (0, 100 y 200 mM NaCl).

De igual forma que en la elongación de tallo, la masa foliar por unidad de área (LMA) se redujo en todos los casos. Con 0  $\mu\text{M}$  ABA y 100 mM NaCl, la LMA descendió un 9% respecto al control. Con 1  $\mu\text{M}$  ABA descendió un 7, 14 y 20% con 0, 100 y 200 mM NaCl, respectivamente, mientras que, con 10  $\mu\text{M}$  ABA, los respectivos descensos fueron del 10, 13 y 49% ( $P \leq 0,05$ ). El valor más bajo de LMA se detectó en plantas con 10  $\mu\text{M}$  ABA y 200 mM NaCl (0,568 g dm<sup>-2</sup>).

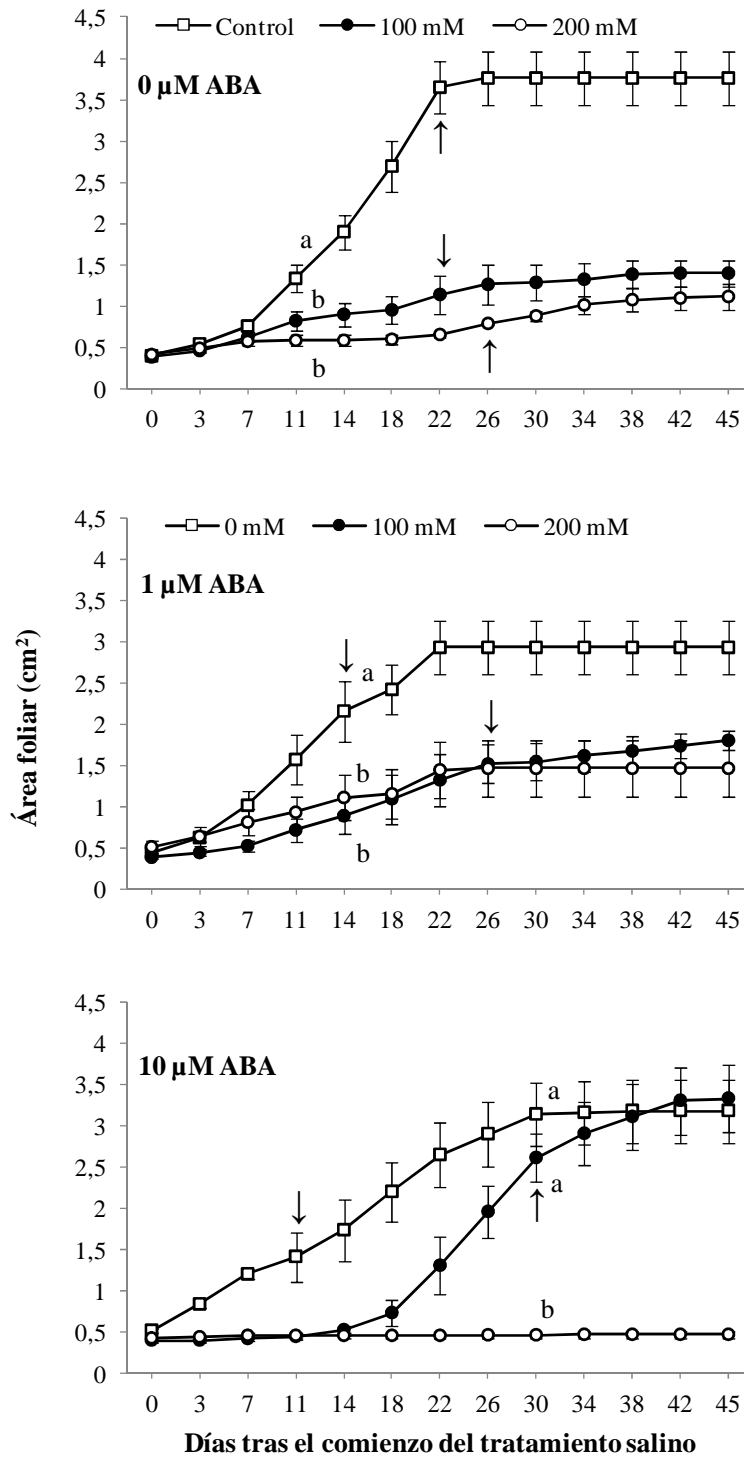
En el caso de la relación de área foliar (LAR), las plantas con 0  $\mu\text{M}$  ABA y 100 mM NaCl no mostraron diferencias respecto al control. Igualmente, las plantas con ABA no mostraron diferencias respecto al control, excepto las crecidas con 1  $\mu\text{M}$  de ABA y 200 mM NaCl, que redujeron la LAR un 24% ( $P \leq 0,05$ ). Podemos destacar que, con 1  $\mu\text{M}$  ABA, las plantas sometidas a estrés salino redujeron la LAR respecto a las no salinizadas; en cambio, con 10  $\mu\text{M}$  ABA el estrés salino no tuvo ningún efecto.

En cuanto a la densidad (D) de la hoja, sólo las plantas crecidas con 200 mM NaCl y ABA (1 y 10  $\mu\text{M}$  de ABA) mostraron un descenso medio del 19% comparado con el control (Tabla 5.2), aunque no mostraron diferencias respecto a plantas con 100 mM NaCl sin ABA. Es interesante destacar que, en plantas con 1  $\mu\text{M}$  ABA, 100 y 200 mM NaCl redujeron ( $P \leq 0,05$ ) la D respecto a plantas crecidas en ausencia de sal (0 mM

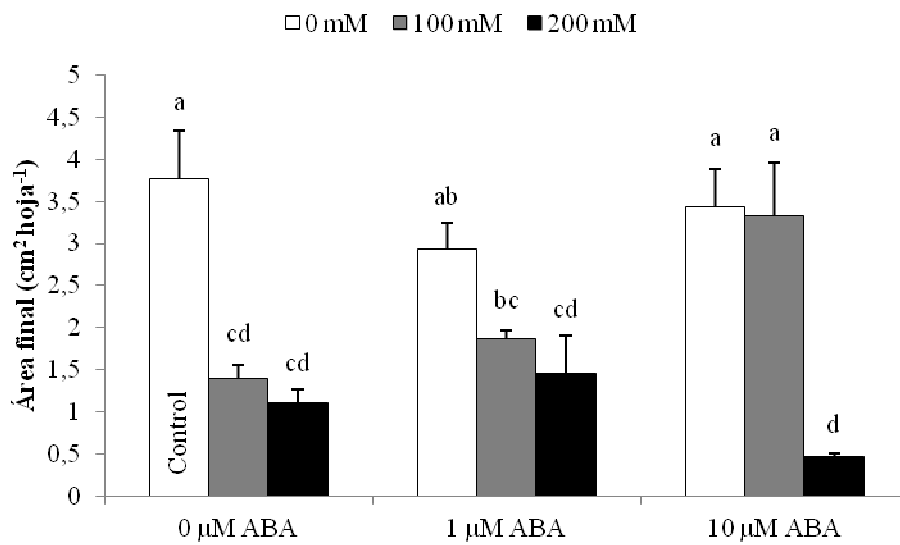
NaCl); en cambio, con 10  $\mu$ M ABA, la salinidad no tuvo ningún efecto.

En la figura 5.1 se representa la expansión de la hoja medida durante los 45 primeros días de exposición a la sal. Como podemos observar, la aplicación de NaCl (100 y 200 mM NaCl) inhibió la expansión de la hoja ( $P \leq 0,05$ ) en plantas con 0 y 1  $\mu$ M ABA, mientras que, con 10  $\mu$ M ABA sólo lo hizo 200 mM NaCl. Estas diferencias se mantuvieron constantes hasta el final, a partir de los 11, 14 y 30 días para plantas con 0, 1 y 10  $\mu$ M ABA, respectivamente. En plantas crecidas en ausencia de sal (0 mM NaCl), el número de días necesario para que la hoja alcance el área final varió en función del nivel de ABA; en plantas sin ABA fue de 22 días, mientras que, con ABA el número de días se redujo a 8 y 11 con 1 y 10  $\mu$ M ABA, respectivamente. En plantas crecidas con 100 mM NaCl, los días necesarios fueron 22, 26 y 30 para plantas con 0, 1 y 10  $\mu$ M ABA, respectivamente. Con 200 mM NaCl, las plantas sin ABA necesitaron 30 días para alcanzar su área final, en cambio, en plantas con ABA (1 y 10  $\mu$ M ABA) el área final no se modificó significativamente ( $P \leq 0,05$ ) a lo largo de los 45 días.

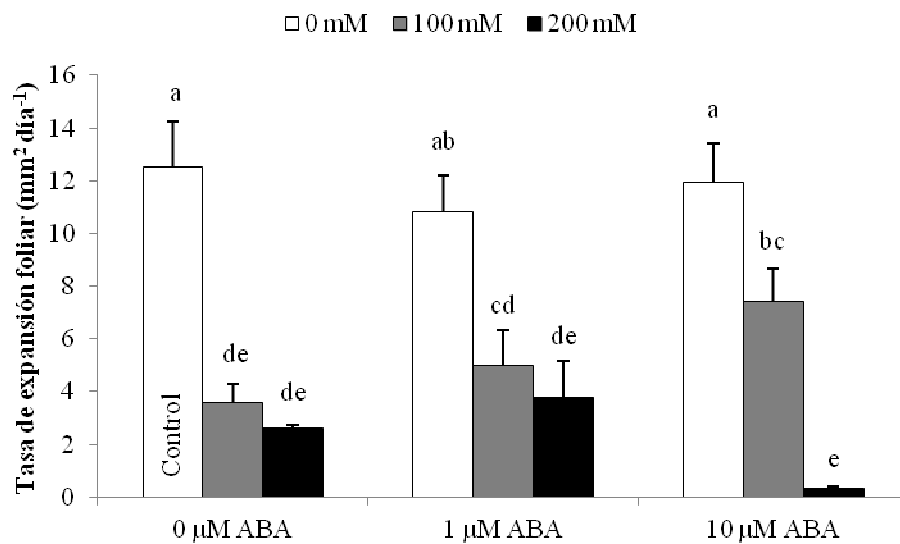
En las figuras 5.2 y 5.3 se representan dos parámetros relacionados con la expansión foliar, el área final de la hoja (AFH) y la tasa de expansión foliar. El AFH (Figura 5.2) no se afectó por la aplicación de ABA en plantas crecidas en ausencia de sal (0 mM NaCl), en cambio, se redujo un 62%, aproximadamente, por la aplicación de 100 y 200 mM NaCl en plantas con 0 y 1  $\mu$ M ABA. En plantas con 10  $\mu$ M ABA, la inhibición del AFH sólo se observó con 200 mM NaCl (87%;  $P \leq 0,05$ ).



**Figura 5.1.** Expansión de la hoja de plantas de olivo tratadas con ABA (0, 1 y 10 μM ABA) y crecidas en condiciones de estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl). Plantas con 0 μM ABA y 0 mM NaCl se utilizaron como control. Los datos son medias ± SE (n=4). Para cada concentración de ABA, distinta letra indica diferencias significativas según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ). La flecha indica el día en que se estabilizó el crecimiento de la hoja (LSD,  $P \leq 0,05$ ).



**Figura 5.2.** Área final de la hoja (AFH) de plantas de olivo tratadas con ABA (0, 1 y 10 µM ABA) durante 11 semanas, de las cuales 8 crecieron en condiciones de estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl). Plantas con 0 µM ABA y 0 mM NaCl se utilizaron como control. Las barras representan SE (n=4). Las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 5.3.** Tasa de expansión foliar de plantas de olivo tratadas con ABA (0, 1 y 10 µM ABA) durante 11 semanas, de las cuales 8 crecieron en condiciones de estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl). Plantas con 0 µM ABA y 0 mM NaCl se utilizaron como control. Las barras representan SE (n=4). Las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

La tasa de expansión foliar (Figura 5.3) respondió al estrés salino y al ABA de forma similar al AFH. En plantas sin ABA (0  $\mu\text{M}$ ) y con 1  $\mu\text{M}$  ABA, 100 y 200 mM NaCl inhibieron por igual la tasa de expansión foliar respecto al control ( $\approx 70\%$ ,  $P \leq 0,05$ ). En cambio, con 10  $\mu\text{M}$  ABA se inhibió un 41% con 100 mM y un 97% con 200 mM NaCl, además, con 200 mM se detectó la menor tasa de expansión foliar ( $0,352 \text{ mm}^2 \text{ día}^{-1}$ ).

### 5.1.2. Contenido de nutrientes

El contenido de carbono (C), nitrógeno (N) y relación carbono/nitrógeno (C/N) se analizó en hoja y raíz (Tabla 5.3). Según el análisis estadístico, el contenido de C y la relación C/N fue mayor ( $P \leq 0,05$ ) en hoja que en raíz en todos los casos, excepto en plantas con 10  $\mu\text{M}$  ABA y 200 mM NaCl, en las que no se observaron diferencias en el contenido de C entre los dos órganos. En contraste, el contenido de N siempre fue mayor en raíz.

**Tabla 5.3.** Contenido de carbono (C), nitrógeno (N) y relación carbono/nitrógeno (C/N) en hoja y raíz de plantas de olivo tratadas con ABA (0, 1 y 10  $\mu\text{M}$  ABA) durante 11 semanas, de las cuales 8 crecieron en condiciones de estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl). Plantas con 0  $\mu\text{M}$  ABA y 0 mM NaCl se utilizaron como control.

	C (%)		N (%)		C/N	
	Hoja	Raíz	Hoja	Raíz	Hoja	Raíz
Control	45,82 a	38,09 d *	1,97 e	3,03 ab *	23,26 a	12,57 g *
0 $\mu\text{M}$ ABA+100	44,81 cd	42,57 b *	2,34 a	2,86 bc *	19,15 f	14,88 c *
0 $\mu\text{M}$ ABA+200	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1 $\mu\text{M}$ ABA+0	45,86 a	41,12 c*	2,30 ab	2,88 bc *	19,94 d	14,23 e *
1 $\mu\text{M}$ ABA+100	45,17 bc	42,96 ab *	2,05 de	2,96 abc *	22,03 b	14,51 d *
1 $\mu\text{M}$ ABA+200	43,20 e	41,29 c *	2,14 cd	2,78 c *	20,19 c	14,85 c *
10 $\mu\text{M}$ ABA+0	45,51 ab	42,75 ab *	1,97 e	2,78 c *	23,10 a	15,38 b *
10 $\mu\text{M}$ ABA+100	44,59 d	43,35 a *	2,20 abc	3,10 a *	20,27 c	13,98 f *
10 $\mu\text{M}$ ABA+200	42,85 e	43,38 a	2,20 bc	2,40 d *	19,48 e	18,15 a *

En cada columna, las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ), mientras que, en cada fila, \* indica diferencias significativas entre hoja y raíz según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ). ND, no determinado



En plantas crecidas con 100 mM NaCl, el contenido de C no se afectó por el nivel de ABA ensayado (0, 1 y 10  $\mu$ M), mostrando una reducción media del 2% respecto a plantas control. Por otra parte, las plantas con ABA no redujeron su contenido de C respecto al control ( $P \leq 0,05$ ), sin embargo, las plantas con ABA y 200 mM lo redujeron una media del 6%. A diferencia de lo que ocurre en hoja, el contenido de C en raíz aumentó respecto al control por la aplicación de ABA y/o NaCl. Los menores incrementos se encontraron en plantas con 1  $\mu$ M ABA sin sal y con 200 mM NaCl ( $\approx 8\%$ ).

En plantas sin ABA, El contenido de N en hoja aumentó por la aplicación de 100 mM NaCl (19%). Con 1  $\mu$ M ABA, el contenido de N aumentó en plantas con 0 y 200 mM NaCl (17 y 9%, respectivamente). En el caso de las plantas con 10  $\mu$ M ABA, se observó un aumento en plantas salinizadas de, aproximadamente, un 12% respecto plantas control. En cuanto a la raíz, las plantas sin ABA no descendieron el contenido de N por la aplicación de 100 mM NaCl. Igualmente, la aplicación de 10  $\mu$ M ABA trajo consigo un descenso medio del 8%. Sin embargo, cuando se aplicó ABA y NaCl, el contenido de N solo descendió con 200 mM NaCl, siendo las plantas con 10  $\mu$ M ABA las que mostraron los valores más bajos (2,40%).

La relación C/N descendió en hoja (18%) y aumentó en raíz (18%) de plantas con 0  $\mu$ M ABA y 100 mM NaCl, por lo que en hoja se favoreció la acumulación de compuestos nitrogenados. Sin embargo, el ABA produjo un efecto diferente según el órgano y el nivel de sal; en el caso de 1  $\mu$ M ABA, la relación C/N en hoja descendió en un 14, 5 y 13% con 0, 100 y 200 mM NaCl, respectivamente; mientras que, en raíz aumentó un 13, 15 y 18% con 0, 100 y 200 mM NaCl, respectivamente. En plantas con 10  $\mu$ M ABA, la relación C/N en hoja se redujo un 13 y 16% con 100 y 200 mM NaCl,

respectivamente, mientras que, en plantas crecidas sin NaCl no hubo diferencias respecto al control ( $P \leq 0,05$ ); en cambio, en raíz se incrementó un 22, 11 y 44% en plantas con 0, 100 y 200 mM NaCl. De hecho, en plantas con 10  $\mu$ M y 200 mM NaCl se detectaron los valores más elevados (18,15%).

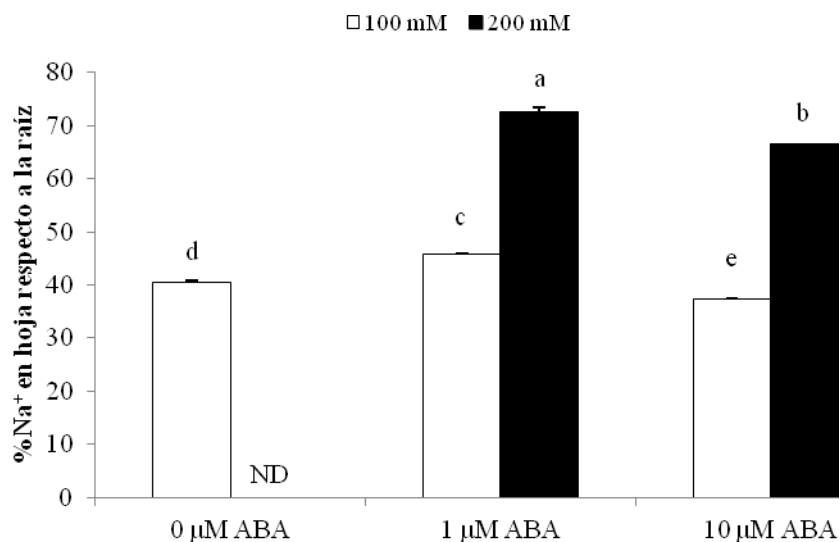
Como podemos observar en la tabla 5.4, el contenido de  $\text{Na}^+$  fue mayor ( $P \leq 0,05$ ) en raíz que en hoja en todos los casos. Además, después de 3 semanas de crecimiento sin NaCl, el  $\text{Na}^+$  fue mayor en plantas con ABA y/o NaCl que en plantas control, para ambos órganos. En plantas sin ABA, el contenido de  $\text{Na}^+$  en hoja y raíz aumentó un 560 y 331%, respectivamente. En raíz, con 100 mM NaCl, aumentó un 525% con 1  $\mu$ M ABA y un 728% con 10  $\mu$ M ABA, mientras que, con 200 mM NaCl los respectivos incrementos fueron 917% y 953%. El contenido de  $\text{Na}^+$  en hoja, aumentó con 100 mM un 974 y 1059% con 1 y 10  $\mu$ M ABA, respectivamente, mientras que, con 200 mM los incrementos fueron del 2687 y 2549% con 1 y 10  $\mu$ M ABA, respectivamente.

**Tabla 5.4.** Contenido de sodio ( $\text{Na}^+$ ) y potasio ( $\text{K}^+$ ) y relación potasio/sodio ( $\text{K}^+/\text{Na}^+$ ) en hoja y raíz de plantas de olivo tratadas con ABA (0, 1 y 10  $\mu$ M ABA) durante 11 semanas, de las cuales 8 crecieron en condiciones de estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl). Plantas con 0  $\mu$ M ABA y 0 mM NaCl se utilizaron como control.

	$\text{Na}^+$ (%)		$\text{K}^+$ (%)		$\text{K}^+/\text{Na}^+$ (%)	
	Hoja	Raíz	Hoja	Raíz	Hoja	Raíz
Control	0,094 g	0,355 g *	1,19 b	3,30 a *	12,68 a	9,30 a *
0 $\mu$ M ABA+100	0,620 e	1,53 e *	1,15 c	1,55 d *	1,86 d	1,01 d *
0 $\mu$ M ABA+200	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1 $\mu$ M ABA+0	0,479 f	0,640 f *	1,47 a	3,14 b *	3,06 b	4,91 b *
1 $\mu$ M ABA+100	1,01 d	2,22 d *	0,963 d	0,537 f *	0,954 e	0,242 f *
1 $\mu$ M ABA+200	2,62 a	3,61 b *	0,589 f	0,410 g *	0,225 g	0,113 g
10 $\mu$ M ABA+0	0,454 f	0,642 f *	1,20 b	1,84 c *	2,64 c	2,87 c *
10 $\mu$ M ABA+100	1,09 c	2,94 c *	0,824 e	1,02 e *	0,749 f	0,348 e *
10 $\mu$ M ABA+200	2,49 b	3,74 a *	0,525 g	1,01 e *	0,211 g	0,270 f *

En cada columna, las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ), mientras que, en cada fila, \* indica diferencias significativas entre hoja y raíz según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ). ND, no determinado

El contenido de  $\text{Na}^+$  en hoja respecto al de la raíz fue de un 40% (Figura 5.4), resultados similares a los descritos en otros apartados del presente trabajo (Figuras 2.9 y 3.5, pág. 121 y 165, respectivamente). En plantas con 100 mM NaCl y ABA, se detectó una respuesta diferente según la concentración de la hormona. Con 1  $\mu\text{M}$  ABA, el porcentaje de  $\text{Na}^+$  en hoja respecto a la raíz fue un 13% mayor que en plantas sin ABA, mientras que, con 10  $\mu\text{M}$  ABA fue un 8% menor. En plantas con 200 mM NaCl y 1  $\mu\text{M}$  ABA, se observó el mayor porcentaje de  $\text{Na}^+$  en hoja respecto a la raíz (72%), seguido por plantas con 10  $\mu\text{M}$  ABA (67%). Por tanto, la mayor acumulación de  $\text{Na}^+$  en la raíz en plantas con 100 mM se detectó con 10  $\mu\text{M}$  ABA.



**Figura 5.4.** Porcentaje de concentración de sodio ( $\text{Na}^+$ ) en hoja (%PS) comparado con la concentración de sodio ( $\text{Na}^+$ ) de la raíz (%PS), de plantas de olivo tratadas con ABA (0, 1 y 10  $\mu\text{M}$  ABA) durante 11 semanas, de las cuales 8 crecieron en condiciones de estrés salino (100 y 200 mM NaCl). Las barras representan SE (n=3). Las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ).

En el caso del  $\text{K}^+$ , su contenido fue mayor en raíz que en hoja ( $P \leq 0,05$ ), excepto en plantas con 1  $\mu\text{M}$  ABA y NaCl (Tabla 5.4). A diferencia de lo que ocurrió con el

$\text{Na}^+$ , el contenido de  $\text{K}^+$  en hoja y raíz de plantas crecidas sin ABA y con 100 mM NaCl descendió respecto al control (3 y 53%, respectivamente) tras el período de recuperación del estrés salino. En hoja de plantas sin sal, la aplicación de 1  $\mu\text{M}$  ABA incrementó el contenido de  $\text{K}^+$  (0 mM NaCl), mientras que en raíz lo redujo con ambos niveles de ABA (1 y 10  $\mu\text{M}$ ). En plantas con ABA y NaCl, el contenido de  $\text{K}^+$  descendió en los dos órganos comparado con el control. Los valores más altos de  $\text{K}^+$  en hoja se detectaron en plantas con 1  $\mu\text{M}$  ABA y 0 mM NaCl (1,47%), mientras que en raíz, esto ocurrió en plantas control (3,30%).

La relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  descendió con 100 mM NaCl en plantas sin ABA en hoja y raíz ( $P \leq 0,05$ ), siendo mayor el descenso en raíz (89%) que en hoja (85%) (Tabla 5.4). Esto indica una mayor acumulación de  $\text{Na}^+$  que de  $\text{K}^+$  en plantas crecidas con sal. En hoja y raíz, el descenso de la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  se acentuó en plantas crecidas con sal y ABA.

### **5.1.3. Estado hídrico de la planta**

El contenido hídrico relativo (RWC), descendió respecto al control en plantas sin ABA (0  $\mu\text{M}$  ABA) con 100 mM NaCl y en plantas con 1  $\mu\text{M}$  ABA y 200 mM NaCl (aproximadamente un 14%). Además, no se observaron diferencias entre los niveles de NaCl ensayados para una misma concentración de ABA. También podemos destacar que, las plantas con ABA y NaCl no mostraron diferencias respecto a plantas con 100 mM NaCl sin ABA.

En cuanto a la succulencia (S), tras 3 semanas de recuperación, las plantas crecidas sin ABA y con 100 mM NaCl no mostraron diferencias respecto al control (Tabla 5.5), al igual que ocurrió en plantas con 1  $\mu\text{M}$  ABA sin NaCl y con 10  $\mu\text{M}$  ABA

para todos los niveles de NaCl ensayados (0, 100 y 200 mM). Sólo plantas crecidas con sal y 1  $\mu$ M ABA incrementaron la S respecto al control una media del 78% ( $P \leq 0,05$ ).

**Tabla 5.5.** Contenido hídrico relativo (RWC), succulencia (S) y transpiración (E) en hoja de plantas de olivo tratadas con ABA (0, 1 y 10  $\mu$ M ABA) durante 11 semanas, de las cuales 8 crecieron en condiciones de estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl). Plantas con 0  $\mu$ M ABA y 0 mM NaCl se utilizaron como control.

	RWC (%)	S (mg H <sub>2</sub> O cm <sup>-2</sup> )	E (mmol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )
Control	89,12 a	16,18 b	3,18 a
0 $\mu$ M ABA+100	73,63 b	14,77 b	1,41 bc
0 $\mu$ M ABA+200	ND	ND	ND
1 $\mu$ M ABA+0	79,97 ab	14,00 b	1,71 b
1 $\mu$ M ABA+100	80,02 ab	26,79 a	2,15 b
1 $\mu$ M ABA+200	79,13 b	30,83 a	0,764 cd
10 $\mu$ M ABA+0	81,50 ab	15,23 b	0,401 d
10 $\mu$ M ABA+100	81,83 ab	19,19 b	0,604 cd
10 $\mu$ M ABA+200	82,63 ab	19,20 b	0,386 d

Para cada parámetro, las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ). ND, no determinado.

La transpiración (E) descendió, en todos los casos, respecto a plantas control ( $P \leq 0,05$ ). Con 100 mM sin ABA, la reducción fue del 56%; con 1  $\mu$ M ABA, fue aproximadamente del 39% con 0 y 100 mM y del 76% con 200 mM NaCl. Finalmente, con 10  $\mu$ M ABA la reducción media de la E fue del 85%.

#### 5.1.4. Intercambio gaseoso

En general, tras la fase de recuperación del estrés salino, los parámetros de intercambio gaseoso de plantas crecidas sin ABA y con 100 mM NaCl, no mostraron diferencias respecto a plantas control, excepto la conductividad estomática ( $g_s$ ) que mantuvo una reducción del 77% (Tabla 5.6, figura 5.4).

La tasa de asimilación neta ( $P_n$ ) no varió por la aplicación de ABA (1 y 10  $\mu$ M)

respecto a plantas control (Tabla 5.6). El efecto del estrés salino con 100 mM NaCl no se modificó por la aplicación de ABA, por lo que no se observaron diferencias ( $P \leq 0,05$ ) entre 0, 1 y 10  $\mu\text{M}$  ABA. De forma similar, con 200 mM NaCl no se observaron diferencias en la  $P_n$  de plantas con 1 y 10  $\mu\text{M}$  ABA, descendiendo en ambas un promedio del 47% respecto a plantas control.

**Tabla 5.6.** Tasa de asimilación neta ( $P_n$ ), conductividad estomática ( $g_s$ ), concentración interna de  $\text{CO}_2$  (Ci) y eficiencia fotosintética en el uso del nitrógeno (PNUE) de plantas de olivo tratadas con ABA (0, 1 y 10  $\mu\text{M}$  ABA) durante 11 semanas, de las cuales 8 crecieron en condiciones de estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl). Plantas con 0  $\mu\text{M}$  ABA y 0 mM NaCl se utilizaron como control.

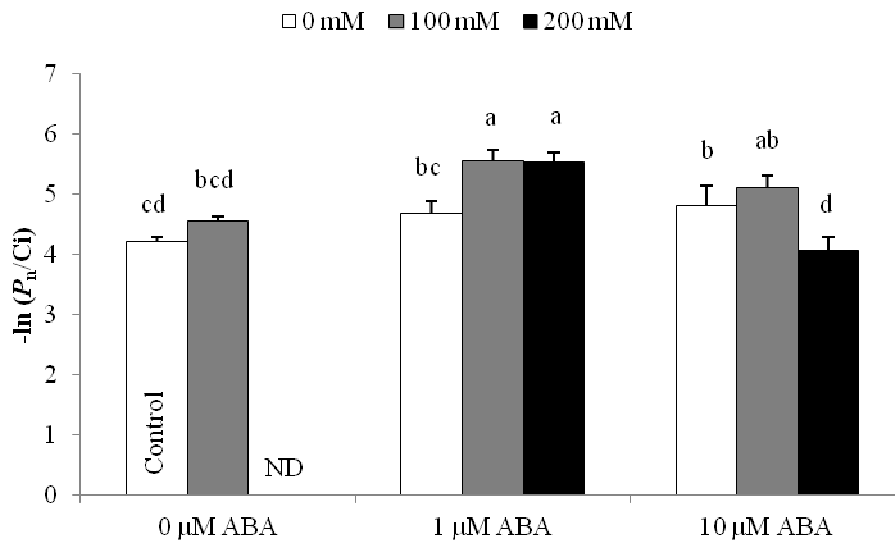
	$P_n$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	$g_s$ ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	Ci ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ )	PNUE ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ N s}^{-1}$ )
Control	5,15 a	159,83 a	356,50 cd	27,98 b
0 $\mu\text{M}$ ABA+100	4,61 ab	36,93 cd	415,81 bc	21,92 bc
0 $\mu\text{M}$ ABA+200	ND	ND	ND	ND
1 $\mu\text{M}$ ABA+0	4,57 ab	85,73 b	358,98 cd	25,09 bc
1 $\mu\text{M}$ ABA+100	3,31 bc	67,85 bc	944,31 a	16,53 c
1 $\mu\text{M}$ ABA+200	2,89 c	22,57 d	538,52 b	16,79 c
10 $\mu\text{M}$ ABA+0	4,54 ab	10,95 d	273,79 d	29,22 b
10 $\mu\text{M}$ ABA+100	3,75 abc	16,41 d	502,04 b	24,65 bc
10 $\mu\text{M}$ ABA+200	2,55 c	8,88 d	134,20 e	56,97 a

Para cada parámetro, las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ). ND, no determinado.

Según lo descrito anteriormente, la  $g_s$  fue el único parámetro de intercambio gaseoso que descendió en plantas sin ABA por la aplicación de 100 mM NaCl (Tabla 5.6). La  $g_s$  de plantas con 1  $\mu\text{M}$  ABA (0 y 100 mM NaCl) se redujo, aproximadamente, un 55%, mientras que, con 1  $\mu\text{M}$  ABA y 200 mM, y 10  $\mu\text{M}$  ABA (0, 100 y 200 mM NaCl) se redujo un promedio del 89% ( $P \leq 0,05$ ). A excepción de plantas con 1  $\mu\text{M}$  ABA y sin NaCl, no se observaron diferencias entre plantas con sin ABA con 100 mM NaCl y plantas con ABA.

En plantas crecidas en ausencia de NaCl, el ABA no afectó a la concentración

interna de CO<sub>2</sub> (Ci); mientras que con NaCl y 1 μM ABA, la Ci aumentó un 165 y 51% con 100 y 200 mM NaCl, respectivamente ( $P \leq 0,05$ ). La mayor Ci se detectó en plantas con 1 μM ABA y 100 mM NaCl (944,31 μmol CO<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup>). Con 10 μM ABA, el efecto fue diferente según el nivel de sal ensayado, con 100 mM Ci aumentó un 41%, mientras que con 200 mM NaCl descendió un 63% comparado con el control.



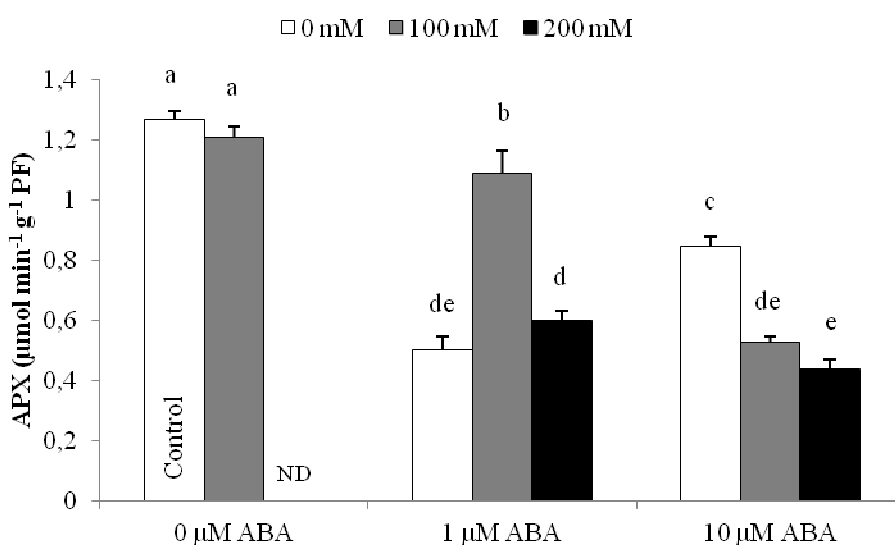
**Figura 5.5.** Fotoinhibición de plantas de olivo tratadas con ABA (0, 1 y 10 μM ABA) durante 11 semanas, de las cuales 8 crecieron en condiciones de estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl). Plantas con 0 μM ABA y 0 mM NaCl se utilizaron como control. Las barras representan SE (n=4). Las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ). ND, no determinado.

El  $-\ln(P_n/C_i)$  es un indicador de la inhibición fotosintética (Figura 5.5). Este parámetro se correlacionó negativamente con la  $P_n$  ( $r = -0,504$ ,  $P \leq 0,001$ ) y positivamente ( $r = 0,579$ ,  $P \leq 0,001$ ) con  $C_i$  (Tabla 5.7). Tras 3 semanas de recuperación, las plantas con 0 μM ABA y 100 mM NaCl no mostraron diferencias respecto al control; sin embargo, la aplicación de 1 μM ABA aumentó la fotoinhibición, aproximadamente, un 32% con 100 y 200 mM NaCl, mientras que, con 10 μM ABA aumentó, aproximadamente, un 18% con 0 y 100 mM NaCl.

En lo que respecta a la eficiencia fotosintética en el uso del nitrógeno (PNUE), con 1  $\mu\text{M}$  ABA no se detectaron diferencias entre 0, 100 y 200 mM NaCl, pero sí se detectó un descenso significativo de PNUE respecto al control con 100 y 200 mM ( $\approx 40\%$ ,  $P \leq 0,05$ ; Tabla 5.6). Con 10  $\mu\text{M}$  ABA, plantas crecidas con 0 y 100 mM NaCl no alteraron el valor de PNUE comparado con el control, sin embargo con 200 mM aumentó un 124%.

### 5.1.5. Enzimas del estrés oxidativo

Los resultados obtenidos para las enzimas antioxidantes ascorbato peroxidasa (APX) y guaiacol peroxidasa (POD) se exponen en las figuras 5.6 y 5.7.

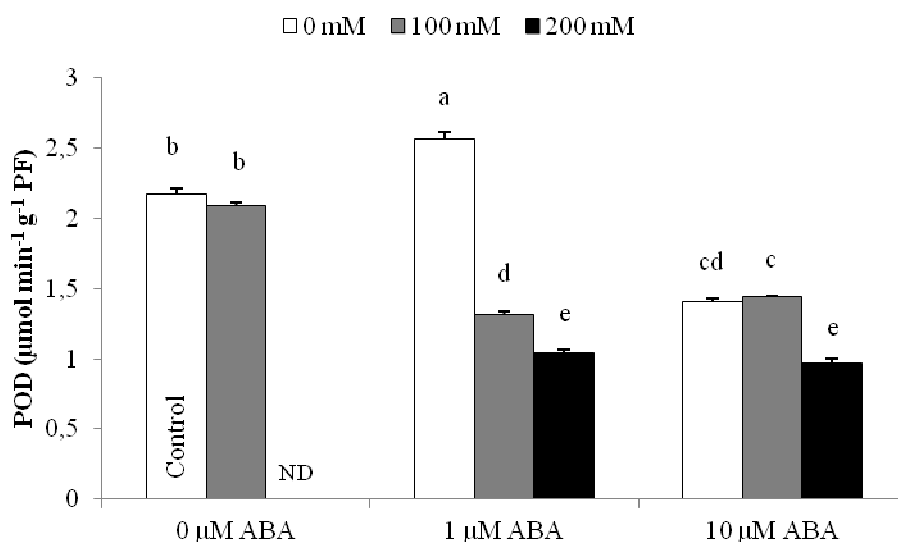


**Figura 5.6.** Actividad ascorbato peroxidasa (APX) en hoja de plantas de olivo tratadas con ABA (0, 1 y 10  $\mu\text{M}$  ABA) durante 11 semanas, de las cuales 8 crecieron en condiciones de estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl). Plantas con 0  $\mu\text{M}$  ABA y 0 mM NaCl se utilizaron como control. Las barras representan SE (n=4). Las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ). ND, no determinado.

En plantas sin ABA, la actividad APX no mostró diferencias respecto al control



por la aplicación de 100 mM NaCl. Por otra parte, en plantas sin NaCl, la aplicación de ABA produjo un descenso de la APX del 61% para plantas con 1  $\mu$ M ABA y del 33% para plantas con 10  $\mu$ M ABA. Además, en plantas con 10  $\mu$ M ABA la aplicación de 100 y 200 mM NaCl favoreció el descenso de la actividad APX respecto al control ( $\approx$ 62%). Sin embargo, con 1  $\mu$ M la respuesta a la aplicación de NaCl fue distinta; con 100 mM NaCl sólo descendió un 14% respecto al control, siendo un 118% superior al de plantas sin NaCl; con 200 mM NaCl, la APX alcanzó niveles similares a los de 0 mM ( $P \leq 0,05$ ).



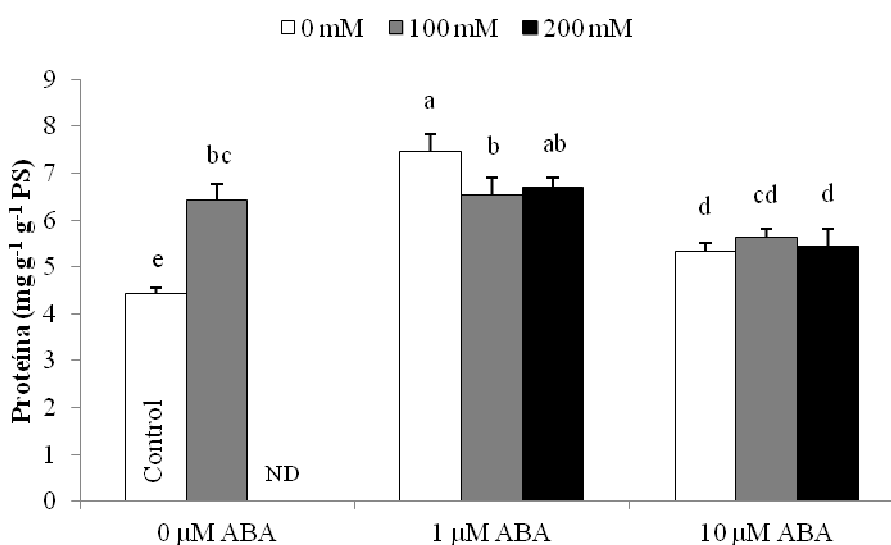
**Figura 5.7.** Actividad guaiacol peroxidasa (POD) en hoja de plantas de olivo tratadas con ABA (0, 1 y 10  $\mu$ M ABA) durante 11 semanas, de las cuales 8 crecieron en condiciones de estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl). Plantas con 0  $\mu$ M ABA y 0 mM NaCl se utilizaron como control. Las barras representan SE (n=4). Las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ). ND, no determinado.

Al igual que la APX, la actividad de la POD tampoco se afectó con 0  $\mu$ M ABA y 100 mM NaCl, y descendió con 1 y 10  $\mu$ M ABA en todos los casos, excepto con 1  $\mu$ M ABA y 0 mM NaCl, que aumentó su actividad un 18% ( $P \leq 0,05$ ) respecto al control. La máxima reducción de la actividad POD se observó en plantas con ABA (1 y 10  $\mu$ M) y

200 mM NaCl ( $\approx 54\%$ ).

### 5.1.6. Metabolitos e indicadores del estrés en la hoja

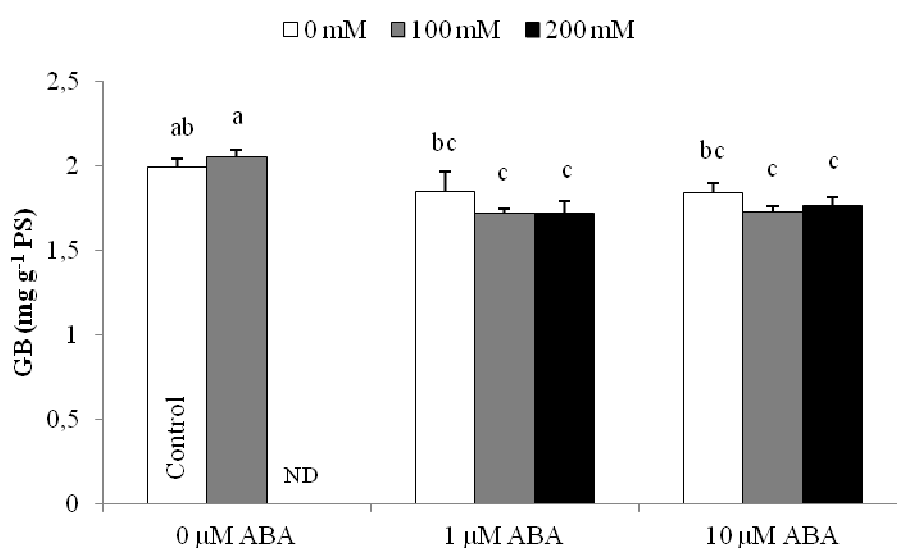
El contenido de proteína soluble aumentó un 44% sin ABA y con 100 mM NaCl (Figura 5.8). Por otra parte, con 1 y 10  $\mu\text{M}$  ABA también aumentó el contenido de proteína, pero en diferente medida dependiendo de su concentración; con 1  $\mu\text{M}$  ABA aumentó un 68% con 0 mM y una media del 49% con 100 y 200 mM NaCl; además, las plantas crecidas con 1  $\mu\text{M}$  ABA y NaCl no mostraron diferencias respecto a plantas sin ABA con 100 mM NaCl. Con 10  $\mu\text{M}$  ABA, el contenido de proteína aumentó por igual con todos los niveles de NaCl ( $\approx 23\%$ ;  $P \leq 0,05$ ).



**Figura 5.8.** Contenido de proteína soluble en hoja de plantas de olivo tratadas con ABA (0, 1 y 10  $\mu\text{M}$  ABA) durante 11 semanas, de las cuales 8 crecieron en condiciones de estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl). Plantas con 0  $\mu\text{M}$  ABA y 0 mM NaCl se utilizaron como control. Las barras representan SE ( $n=4$ ). Las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ). ND, no determinado.

En plantas sin ABA, la glicina betaína (GB) de plantas con 100 mM NaCl no

mostró diferencias respecto a plantas control (Figura 5.9), al igual que ocurrió en plantas con 1 y 10  $\mu\text{M}$  ABA sin NaCl (0 mM). Sin embargo, las plantas con ABA (1 y 10  $\mu\text{M}$ ) y NaCl (100 y 200 mM) redujeron el contenido de GB una media del 13% ( $P \leq 0,05$ ) respecto al control. Es interesante señalar que la GB de plantas con ABA, no varió por el nivel de ABA y/o NaCl ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 5.9.** Contenido de glicina betaína (GB) en hoja de plantas de olivo tratadas con ABA (0, 1 y 10  $\mu\text{M}$  ABA) durante 11 semanas, de las cuales 8 crecieron en condiciones de estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl). Plantas con 0  $\mu\text{M}$  ABA y 0 mM NaCl se utilizaron como control. Las barras representan SE ( $n=4$ ). Las medias seguidas por distinta letra son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P \leq 0,05$ ). ND, no determinado.

**Tabla 5.7.a.** Matriz de correlaciones entre las variables estudiadas.

	SMR	RMR	PS total	R/PA	Elongación	AF total	LMA	LAR	D	Expansión	Área final	C hoja	C raíz	N hoja	N raíz
LMR	-0,828***	-0,551***	0,622***	-0,512***	0,474***	0,643***	0,617***	0,392**	0,349*	0,479***	0,431**	0,672***	-0,451**	0,152 <sup>NS</sup>	0,385**
SMR		0,181 <sup>NS</sup>	-0,424**	0,166 <sup>NS</sup>	-0,314*	-0,386**	-0,587***	-0,241 <sup>NS</sup>	-0,328*	-0,401**	-0,377**	-0,459**	0,491***	-0,187 <sup>NS</sup>	-0,358*
RMR			-0,626***	0,895***	-0,524***	-0,609***	-0,310*	-0,266 <sup>NS</sup>	-0,467***	-0,401**	-0,376**	-0,589***	0,084 <sup>NS</sup>	-0,069 <sup>NS</sup>	-0,273 <sup>NS</sup>
PS total				-0,548***	0,587***	0,587***	0,508***	0,205 <sup>NS</sup>	0,400**	0,369**	0,365*	0,491***	-0,195 <sup>NS</sup>	0,043 <sup>NS</sup>	0,442**
R/PA					-0,458**	-0,552***	-0,330*	-0,315*	-0,335*	-0,362*	-0,349*	-0,619***	-0,038 <sup>NS</sup>	0,033 <sup>NS</sup>	-0,299*
Elongación						0,430**	0,552***	0,068 <sup>NS</sup>	0,430**	0,465***	0,437**	0,414**	-0,084 <sup>NS</sup>	-0,225 <sup>NS</sup>	0,258 <sup>NS</sup>
AF total							0,324*	0,401**	0,270 <sup>NS</sup>	0,332*	0,316*	0,383**	-0,131 <sup>NS</sup>	-0,040 <sup>NS</sup>	0,249 <sup>NS</sup>
LMA								-0,175 <sup>NS</sup>	0,414**	0,658***	0,639***	0,753***	-0,296*	-0,177 <sup>NS</sup>	0,777***
LAR									0,196 <sup>NS</sup>	0,048 <sup>NS</sup>	0,018 <sup>NS</sup>	0,047 <sup>NS</sup>	-0,015 <sup>NS</sup>	0,253 <sup>NS</sup>	-0,252 <sup>NS</sup>
D										0,595***	0,540***	0,401**	-0,023 <sup>NS</sup>	0,159 <sup>NS</sup>	0,353*
Expansión											0,955***	0,499***	0,180 <sup>NS</sup>	-0,368*	0,455**
Área final												0,435**	0,239 <sup>NS</sup>	-0,353*	0,513***
C hoja													-0,405**	0,050 <sup>NS</sup>	0,520***
C raíz														-0,568***	-0,088 <sup>NS</sup>
N hoja															-0,082 <sup>NS</sup>

NS, \*, \*\*, \*\*\* indica diferencias no significativas o significativas para  $P \leq 0,05, 0,01, 0,001$ .

**Tabla 5.7.b.** Matriz de correlaciones entre las variables estudiadas.

	C/N hoja	C/N raíz	Na <sup>+</sup> hoja	Na <sup>+</sup> raíz	K <sup>+</sup> hoja	K <sup>+</sup> raíz	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> hoja	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> raíz	RWC	S	E	P <sub>n</sub>	g <sub>s</sub>
LMR	-0,133 <sup>NS</sup>	-0,488***	-0,705***	-0,654***	0,697***	0,699***	0,389**	0,339*	-0,059 <sup>NS</sup>	-0,642***	0,184 <sup>NS</sup>	0,586***	0,223 <sup>NS</sup>
SMR	0,100 <sup>NS</sup>	0,479***	0,484***	0,478***	-0,527***	-0,551***	-0,249 <sup>NS</sup>	-0,213 <sup>NS</sup>	0,006 <sup>NS</sup>	0,424**	-0,042 <sup>NS</sup>	-0,429**	-0,109 <sup>NS</sup>
RMR	0,135 <sup>NS</sup>	0,238 <sup>NS</sup>	0,702***	0,590***	-0,586***	-0,564***	-0,462***	-0,426**	-0,130 <sup>NS</sup>	0,631***	-0,356*	-0,456**	-0,372**
PS total	-0,017 <sup>NS</sup>	-0,503***	-0,625***	-0,537***	0,531***	0,428**	0,487***	0,453**	0,169 <sup>NS</sup>	-0,504***	0,476***	0,470***	0,464***
R/PA	0,005 <sup>NS</sup>	0,248 <sup>NS</sup>	0,749***	0,617***	-0,595***	-0,483***	-0,443**	-0,401**	-0,166 <sup>NS</sup>	0,676***	-0,320*	-0,463***	-0,344*
Elongación	0,255 <sup>NS</sup>	-0,522***	-0,623***	-0,615***	0,477***	0,288*	0,734***	0,706***	0,216 <sup>NS</sup>	-0,331*	0,542***	0,339*	0,578***
AF total	-0,130 <sup>NS</sup>	-0,309*	-0,517***	-0,449**	0,440**	0,433**	0,443**	0,423**	0,276 <sup>NS</sup>	-0,579***	0,338*	0,417**	0,347*
LMA	0,326*	-0,924***	-0,818***	-0,770***	0,759***	0,398**	0,553***	0,500***	0,032 <sup>NS</sup>	-0,209 <sup>NS</sup>	0,500***	0,530***	0,508***
LAR	-0,294*	0,250 <sup>NS</sup>	-0,133 <sup>NS</sup>	-0,124 <sup>NS</sup>	0,144 <sup>NS</sup>	0,338*	0,048 <sup>NS</sup>	0,050 <sup>NS</sup>	0,090 <sup>NS</sup>	-0,649***	-0,025 <sup>NS</sup>	0,293*	-0,013 <sup>NS</sup>
D	-0,067 <sup>NS</sup>	-0,407**	-0,467***	-0,467***	0,534***	0,374**	0,375**	0,388**	0,234 <sup>NS</sup>	-0,354*	0,319*	0,397**	0,387**
Expansión	0,419**	-0,600***	-0,670***	-0,672***	0,586**	0,228 <sup>NS</sup>	0,536***	0,521***	0,308*	-0,338*	0,255 <sup>NS</sup>	0,456**	0,311*
Área final	0,397**	-0,643***	-0,620***	-0,552***	0,470**	0,120 <sup>NS</sup>	0,478***	0,461**	0,295*	-0,281**	0,219 <sup>NS</sup>	0,368*	0,268 <sup>NS</sup>

NS, \*, \*\*, \*\*\* indica diferencias no significativas o significativas para  $P \leq 0,05, 0,01, 0,001$ .

**Tabla 5.7.c.** Matriz de correlaciones entre las variables estudiadas.

	C/N hoja	C/N raíz	Na <sup>+</sup> hoja	Na <sup>+</sup> raíz	K <sup>+</sup> hoja	K <sup>+</sup> raíz	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> hoja	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> raíz	RWC	S	E	P <sub>n</sub>	g <sub>s</sub>
C hoja	0,040 <sup>NS</sup>	-0,578 <sup>***</sup>	-0,878 <sup>***</sup>	-0,787 <sup>***</sup>	0,916 <sup>***</sup>	0,703 <sup>***</sup>	0,245 <sup>NS</sup>	0,172 <sup>NS</sup>	-0,178 <sup>NS</sup>	-0,435 <sup>**</sup>	0,307 <sup>*</sup>	0,566 <sup>***</sup>	0,259 <sup>NS</sup>
C raíz	0,500 <sup>***</sup>	0,145 <sup>NS</sup>	0,178 <sup>NS</sup>	0,206 <sup>NS</sup>	-0,381 <sup>**</sup>	-0,690 <sup>***</sup>	0,053 <sup>NS</sup>	0,100 <sup>NS</sup>	0,467 <sup>***</sup>	0,152 <sup>NS</sup>	-0,099 <sup>NS</sup>	-0,207 <sup>NS</sup>	0,004 <sup>NS</sup>
N hoja	-0,866 <sup>***</sup>	0,182 <sup>NS</sup>	0,166 <sup>NS</sup>	0,245 <sup>NS</sup>	0,053 <sup>NS</sup>	0,480 <sup>***</sup>	-0,421 <sup>**</sup>	-0,416 <sup>**</sup>	-0,601 <sup>***</sup>	-0,167 <sup>NS</sup>	-0,184 <sup>NS</sup>	-0,080 <sup>NS</sup>	-0,205 <sup>NS</sup>
N raíz	0,214 <sup>NS</sup>	-0,882 <sup>***</sup>	-0,584 <sup>***</sup>	-0,406 <sup>**</sup>	0,428 <sup>**</sup>	0,077 <sup>NS</sup>	0,358 <sup>*</sup>	0,322 <sup>*</sup>	0,079 <sup>NS</sup>	0,020 <sup>NS</sup>	0,455 <sup>**</sup>	0,435 <sup>**</sup>	0,408 <sup>**</sup>
C/N hoja		-0,303 <sup>*</sup>	-0,252 <sup>NS</sup>	-0,339 <sup>*</sup>	0,053 <sup>NS</sup>	-0,464 <sup>***</sup>	0,430 <sup>**</sup>	0,415 <sup>**</sup>	0,385 <sup>**</sup>	0,190 <sup>NS</sup>	0,226 <sup>NS</sup>	0,132 <sup>NS</sup>	0,257 <sup>NS</sup>
C/N raíz			0,664 <sup>***</sup>	0,545 <sup>***</sup>	-0,540 <sup>***</sup>	-0,143 <sup>NS</sup>	-0,502 <sup>***</sup>	-0,467 <sup>***</sup>	-0,106 <sup>NS</sup>	0,040 <sup>NS</sup>	-0,526 <sup>***</sup>	-0,395 <sup>**</sup>	-0,516 <sup>***</sup>
Na <sup>+</sup> hoja				0,926 <sup>***</sup>	-0,898 <sup>***</sup>	-0,601 <sup>***</sup>	-0,615 <sup>***</sup>	-0,552 <sup>***</sup>	-0,109 <sup>NS</sup>	0,541 <sup>***</sup>	-0,493 <sup>***</sup>	-0,658 <sup>***</sup>	-0,513 <sup>***</sup>
Na <sup>+</sup> raíz					-0,917 <sup>***</sup>	-0,628 <sup>***</sup>	-0,710 <sup>***</sup>	-0,663 <sup>***</sup>	-0,164 <sup>NS</sup>	0,532 <sup>***</sup>	-0,508 <sup>***</sup>	-0,643 <sup>***</sup>	-0,575 <sup>***</sup>
K <sup>+</sup> hoja						0,791 <sup>***</sup>	0,439 <sup>**</sup>	0,389 <sup>**</sup>	-0,055 <sup>NS</sup>	-0,540 <sup>***</sup>	0,408 <sup>**</sup>	0,610 <sup>***</sup>	0,438 <sup>**</sup>
K <sup>+</sup> raíz							0,187 <sup>NS</sup>	0,144 <sup>NS</sup>	-0,258 <sup>NS</sup>	-0,641 <sup>***</sup>	0,135 <sup>NS</sup>	0,486 <sup>***</sup>	0,162 <sup>NS</sup>
K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> hoja								0,995 <sup>***</sup>	0,365 <sup>*</sup>	-0,171 <sup>NS</sup>	0,324 <sup>*</sup>	0,471 <sup>***</sup>	0,774 <sup>***</sup>
K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> raíz									0,198 <sup>NS</sup>	-0,262 <sup>NS</sup>	0,253 <sup>NS</sup>	0,431 <sup>**</sup>	0,778 <sup>***</sup>
RWC										-0,097 <sup>NS</sup>	0,211 <sup>NS</sup>	0,177 <sup>NS</sup>	0,285 <sup>*</sup>
S											-0,048 <sup>NS</sup>	-0,467 <sup>***</sup>	-0,152 <sup>NS</sup>
E												0,242 <sup>NS</sup>	0,885 <sup>***</sup>
P <sub>n</sub>													0,322 <sup>*</sup>

NS, \*, \*\*, \*\*\* indica diferencias no significativas o significativas para  $P \leq 0,05, 0,01, 0,001$ .

**Tabla 5.7.d.** Matriz de correlaciones entre las variables estudiadas.

	Ci	PNUE	$-\ln(P_n/Ci)$	APX	POD	Proteína	GB
LMR	-0,186 <sup>NS</sup>	-0,151 <sup>NS</sup>	-0,280 <sup>NS</sup>	0,308 <sup>*</sup>	0,703 <sup>***</sup>	-0,028 <sup>NS</sup>	0,540 <sup>***</sup>
SMR	0,108 <sup>NS</sup>	0,250 <sup>NS</sup>	0,123 <sup>NS</sup>	-0,164 <sup>NS</sup>	-0,534 <sup>***</sup>	-0,100 <sup>NS</sup>	-0,377 <sup>**</sup>
RMR	0,196 <sup>NS</sup>	-0,103 <sup>NS</sup>	0,444 <sup>**</sup>	-0,318 <sup>*</sup>	-0,634 <sup>***</sup>	0,314 <sup>*</sup>	-0,568 <sup>***</sup>
PS total	0,024 <sup>NS</sup>	-0,081 <sup>NS</sup>	-0,218 <sup>NS</sup>	0,388 <sup>**</sup>	0,604 <sup>***</sup>	-0,152 <sup>NS</sup>	0,491 <sup>**</sup>
R/PA	0,117 <sup>NS</sup>	-0,094 <sup>NS</sup>	0,400 <sup>**</sup>	-0,357 <sup>*</sup>	-0,566 <sup>***</sup>	0,318 <sup>*</sup>	-0,462 <sup>***</sup>
Elongación	-0,012 <sup>NS</sup>	-0,171 <sup>NS</sup>	-0,256 <sup>NS</sup>	0,595 <sup>***</sup>	0,549 <sup>***</sup>	-0,310 <sup>*</sup>	0,501 <sup>***</sup>
AF total	-0,196 <sup>NS</sup>	0,085 <sup>NS</sup>	-0,358 <sup>*</sup>	0,237 <sup>NS</sup>	0,552 <sup>***</sup>	-0,117 <sup>NS</sup>	0,369 <sup>**</sup>
LMA	0,288 <sup>*</sup>	-0,571 <sup>***</sup>	0,169 <sup>NS</sup>	0,564 <sup>***</sup>	0,687 <sup>***</sup>	0,033 <sup>NS</sup>	0,371 <sup>**</sup>

NS, \*, \*\*, \*\*\* indica diferencias no significativas o significativas para  $P \leq 0,05, 0,01, 0,001$ .

**Tabla 5.7.e.** Matriz de correlaciones entre las variables estudiadas.

	Ci	PNUE	$-\ln(P_n/Ci)$	APX	POD	Proteína	GB
LAR	-0,473 <sup>***</sup>	0,465 <sup>***</sup>	-0,536 <sup>***</sup>	-0,136 <sup>NS</sup>	0,177 <sup>NS</sup>	-0,012 <sup>NS</sup>	0,151 <sup>NS</sup>
D	-0,024 <sup>NS</sup>	-0,045 <sup>NS</sup>	-0,197 <sup>NS</sup>	-0,048 <sup>NS</sup>	0,607 <sup>***</sup>	0,054 <sup>NS</sup>	0,268 <sup>NS</sup>
Expansión	-0,078 <sup>NS</sup>	-0,195 <sup>NS</sup>	-0,039 <sup>NS</sup>	0,147 <sup>NS</sup>	0,474 <sup>***</sup>	-0,242 <sup>NS</sup>	0,225 <sup>NS</sup>
Área final	-0,030 <sup>NS</sup>	-0,242 <sup>NS</sup>	0,069 <sup>NS</sup>	0,131 <sup>NS</sup>	0,383 <sup>**</sup>	-0,285 <sup>*</sup>	0,153 <sup>NS</sup>
C hoja	0,181 <sup>NS</sup>	-0,371 <sup>**</sup>	0,029 <sup>NS</sup>	0,469 <sup>***</sup>	0,733 <sup>***</sup>	0,180 <sup>NS</sup>	0,448 <sup>**</sup>
C raíz	0,018 <sup>NS</sup>	0,275 <sup>NS</sup>	0,032 <sup>NS</sup>	-0,330 <sup>*</sup>	-0,481 <sup>***</sup>	-0,422 <sup>**</sup>	-0,506 <sup>***</sup>
N hoja	-0,107 <sup>NS</sup>	0,028 <sup>NS</sup>	-0,075 <sup>NS</sup>	-0,305 <sup>*</sup>	0,250 <sup>NS</sup>	0,485 <sup>***</sup>	0,115 <sup>NS</sup>
N raíz	0,484 <sup>***</sup>	-0,476 <sup>***</sup>	0,254 <sup>NS</sup>	0,367 <sup>*</sup>	0,429 <sup>**</sup>	-0,033 <sup>NS</sup>	0,103 <sup>NS</sup>
C/N hoja	0,244 <sup>NS</sup>	-0,128 <sup>NS</sup>	0,177 <sup>NS</sup>	0,387 <sup>**</sup>	-0,218 <sup>NS</sup>	-0,445 <sup>**</sup>	-0,117 <sup>NS</sup>
C/N raíz	-0,461 <sup>**</sup>	0,615 <sup>***</sup>	-0,301 <sup>*</sup>	-0,476 <sup>***</sup>	-0,554 <sup>***</sup>	-0,021 <sup>NS</sup>	-0,210 <sup>NS</sup>
Na <sup>+</sup> hoja	-0,039 <sup>NS</sup>	0,255 <sup>NS</sup>	0,175 <sup>NS</sup>	-0,587 <sup>***</sup>	-0,774 <sup>***</sup>	0,163 <sup>NS</sup>	-0,509 <sup>***</sup>
Na <sup>+</sup> raíz	0,119 <sup>NS</sup>	0,192 <sup>NS</sup>	0,258 <sup>NS</sup>	-0,546 <sup>***</sup>	-0,790 <sup>***</sup>	0,142 <sup>NS</sup>	-0,545 <sup>***</sup>
K <sup>+</sup> hoja	-0,020 <sup>NS</sup>	-0,271 <sup>NS</sup>	-0,146 <sup>NS</sup>	0,397 <sup>**</sup>	0,877 <sup>***</sup>	0,176 <sup>NS</sup>	0,494 <sup>***</sup>
K <sup>+</sup> raíz	-0,359 <sup>*</sup>	-0,032 <sup>NS</sup>	-0,378 <sup>**</sup>	0,195 <sup>NS</sup>	0,816 <sup>***</sup>	0,249 <sup>NS</sup>	0,616 <sup>***</sup>
K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> hoja	-0,177 <sup>NS</sup>	-0,027 <sup>NS</sup>	-0,396 <sup>**</sup>	0,565 <sup>***</sup>	0,559 <sup>***</sup>	-0,523 <sup>***</sup>	0,492 <sup>***</sup>
K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> raíz	-0,203 <sup>NS</sup>	0,005 <sup>NS</sup>	-0,403 <sup>**</sup>	0,493 <sup>***</sup>	0,533 <sup>***</sup>	-0,516 <sup>***</sup>	0,448 <sup>**</sup>
RWC	-0,128 <sup>NS</sup>	0,231 <sup>NS</sup>	-0,227 <sup>NS</sup>	0,005 <sup>NS</sup>	0,005 <sup>NS</sup>	-0,435 <sup>**</sup>	0,032 <sup>NS</sup>
S	0,442 <sup>**</sup>	-0,234 <sup>NS</sup>	0,565 <sup>***</sup>	-0,125 <sup>NS</sup>	-0,536 <sup>***</sup>	0,151 <sup>NS</sup>	-0,554 <sup>***</sup>
E	0,231 <sup>NS</sup>	-0,254 <sup>NS</sup>	-0,083 <sup>NS</sup>	0,599 <sup>***</sup>	0,530 <sup>***</sup>	-0,037 <sup>NS</sup>	0,211 <sup>NS</sup>
P <sub>n</sub>	-0,021 <sup>NS</sup>	0,285 <sup>*</sup>	-0,504 <sup>***</sup>	0,384 <sup>**</sup>	0,561 <sup>***</sup>	-0,173 <sup>NS</sup>	0,473 <sup>***</sup>
g <sub>s</sub>	0,113 <sup>NS</sup>	-0,156 <sup>NS</sup>	-0,178 <sup>NS</sup>	0,520 <sup>***</sup>	0,584 <sup>***</sup>	-0,162 <sup>NS</sup>	0,274 <sup>NS</sup>
Ci		-0,469 <sup>***</sup>	0,579 <sup>***</sup>	0,312 <sup>*</sup>	-0,117 <sup>NS</sup>	0,302 <sup>*</sup>	-0,267 <sup>NS</sup>
PNUE			-0,719 <sup>***</sup>	-0,286 <sup>*</sup>	-0,206 <sup>NS</sup>	-0,305 <sup>*</sup>	0,016 <sup>NS</sup>
$-\ln(P_n/Ci)$				-0,064 <sup>NS</sup>	-0,286 <sup>*</sup>	0,341 <sup>*</sup>	-0,420 <sup>**</sup>
APX					0,333 <sup>*</sup>	-0,263 <sup>NS</sup>	0,514 <sup>***</sup>
POD						0,175 <sup>NS</sup>	0,578 <sup>***</sup>
Proteína							-0,275 <sup>NS</sup>

NS, \*, \*\*, \*\*\* indica diferencias no significativas o significativas para  $P \leq 0,05, 0,01, 0,001$ .

## **5.2. Discusión**

Las estaquillas enraizadas no toleraron niveles de 200 mM NaCl durante 8 semanas, resultados que confirman los obtenidos en el apartado 3.1.1. del presente trabajo (pág. 148). Por otra parte, en las plantas con ABA descendió la mortandad, poniéndose de manifiesto la importancia del ABA en condiciones de estrés. De hecho, el ABA es considerada la “hormona del estrés” (Keskin et al., 2010) ya que tiene un importante papel en la respuesta o en la adaptación de la planta al estrés (Sharma et al., 2005). La acumulación de ABA en situaciones de estrés salino ha sido descrita por varios autores (Zhang et al., 2006; Szepesi et al., 2009). Zörb et al. (2014) encontraron un incremento de la concentración de ABA por la salinidad en hoja de híbridos de maíz resistentes. Resultados similares fueron descritos en genotipos de tomate resistentes a la salinidad (Amjad et al., 2014).

En plantas del cv. Picual con 100 mM NaCl sin ABA, el crecimiento se recuperó tras 3 semanas de crecimiento sin NaCl, a excepción de la elongación de tallo (Tabla 5.2), parámetro descrito como uno de los más sensibles a la salinidad en el presente trabajo. Según Zacarías and Lafuente (2008), la inhibición del crecimiento es la respuesta más común de las células al ABA. En el cv. Picual, la aplicación de 1  $\mu$ M ABA descendió la elongación de tallo, mientras que la aplicación de 10  $\mu$ M ABA también redujo el PS total, elongación de tallo y AF de la planta, al igual que ocurrió en plantas crecidas con ABA y NaCl. Esta inhibición del crecimiento, incluso después del periodo de recuperación sin NaCl, puede ser consecuencia del efecto del ABA sobre la extensibilidad de la pared celular (Zacarías and Lafuente, 2008). Por otra parte, en estudios realizados en otras especies vegetales, la reducción del crecimiento de la hoja en condiciones de salinidad, se relaciona con el incremento de la concentración de ABA

en hoja (He and Cramer, 1996; Montero et al., 1998; Cramer and Quarrie, 2002).

Por otra parte, el incremento de la relación R/PA por el ABA y NaCl, se debió principalmente al descenso del crecimiento de la PA (Tabla 5.3), lo que se confirma por la alta correlación positiva detectada entre la relación R/PA y RMR ( $r=0,895$ ,  $P\leq 0,001$ ; tabla 5.7.a). Sin embargo, en condiciones de estrés salino, también se ha descrito un incremento de los niveles de ABA en raíz (Jia et al., 2002). Según Creelman et al. (1990), el hecho de que la raíz no detenga su crecimiento en condiciones de estrés salino, se debe a la diferente sensibilidad al ABA, ya sea de origen endógeno o exógeno, de los distintos tejidos de la planta.

En lo que respecta al contenido de nutrientes, en plantas sin ABA, la aplicación de NaCl trajo consigo el descenso del contenido de C en hoja y su aumento en raíz. Resultados similares fueron descritos por Cordovilla et al. (2014) en plantas de tomillo sometidas a estrés salino.

En el cv. Picual, el aumento del contenido de N en hoja por efecto de la salinidad y del ABA, puede deberse a la acumulación de compuestos nitrogenados en respuesta al estrés (Parida and Das, 2005). Entre los compuestos nitrogenados que se acumulan en plantas en respuesta al estrés osmótico se encuentran las proteínas (Ashraf and Harris, 2004). De hecho, el contenido de N en hoja mostró una correlación positiva con el contenido de proteína ( $r=0,485$ ,  $P\leq 0,001$ ). Sin embargo, en raíz de plantas sin ABA, el contenido de N igualó los niveles de plantas control tras las 3 semanas de crecimiento sin 100 mM NaCl, al contrario de lo que ocurrió en plantas del cv. Picual que no disfrutaron de este periodo de recuperación (Tabla 2.2, pág. 119).

Tras el período de 3 semanas de recuperación sin NaCl, las plantas que crecieron



con 100 mM NaCl sin ABA mostraron un contenido de Na<sup>+</sup> mayor que el control. Sin embargo, el contenido de Na<sup>+</sup> en estas plantas fue menor que el observado en otros experimentos del presente trabajo (Tabla 2.3, pág. 121 y Tabla 3.8, pág. 163), lo cual pudo deberse a las 3 semanas de recuperación en las que no se aplicó NaCl.

El mayor contenido de Na<sup>+</sup> en raíz comparado con la hoja en plantas sin ABA confirma la efectividad del mecanismo de exclusión de iones y de retención de Na<sup>+</sup> en la raíz en el cv. Picual al igual que se ha descrito para otros cultivares de olivo (Tattini et al., 1994; Chartzoulakis, 2005). La aplicación de 10 μM ABA mejoró la efectividad de este mecanismo con 100 mM NaCl produciéndose una mayor acumulación de Na<sup>+</sup> en raíz que en hoja (Figura 5.4). De acuerdo con nuestros resultados, Khadri et al. (2007) relacionan la influencia positiva del ABA en la adaptación al estrés salino en judía, con una reducción de la concentración de Na<sup>+</sup> y la inhibición del transporte hacia la parte aérea. De igual forma, en estudios realizados por Gurmani et al. (2007; 2013) con trigo y arroz, el contenido de Na<sup>+</sup> descendió por la aplicación de ABA en condiciones de estrés salino.

Varios estudios han mostrado que el ABA regula los canales de K<sup>+</sup> en raíces de diferentes especies vegetales (Roberts and Snowman, 2000). De hecho, en estudios realizados por Gurmani et al. (2013) en arroz, se demostró que la aplicación de ABA contribuyó al mantenimiento de los niveles de K<sup>+</sup> en plantas sometidas a estrés salino. En contraste, en otras especies no se ha encontrado una relación entre los niveles de ABA y de K<sup>+</sup> (Khadri et al., 2007; Cabot et al., 2009). Resultados similares se han obtenido para el cv. Picual, en el cual la aplicación de 1 μM ABA (sin NaCl) incrementó el contenido de K<sup>+</sup> en hoja, mientras que con 10 μM ABA no se afectó. Además, cuando a la vez se aplicaron ABA y NaCl, el contenido de K<sup>+</sup> descendió en

mayor proporción en plantas con 10  $\mu\text{M}$  ABA. Esto explica el descenso de la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  observado en plantas con ABA y NaCl. En contraste, Bohra et al. (1995) observaron un aumento de la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  en respuesta a la aplicación de ABA en plantas de arroz sometidas a estrés salino.

Al igual que el crecimiento, el intercambio gaseoso no mostró diferencias respecto al control en plantas con 100 mM NaCl sin ABA tras el período de recuperación, exceptuando la  $g_s$  que descendió (Tabla 5.6). Desde el punto de vista de la tolerancia a la salinidad y a otros tipos de estrés, la función del ABA se relaciona con la regulación del balance hídrico de la planta y la tolerancia al estrés osmótico (Chávez and González, 2009). Según Wilkinson and Davies (2010), el ABA limita la transpiración mediante el cierre estomático y, por tanto, la pérdida de agua. Este cierre estomático trae consigo un descenso de la  $g_s$ , que es el efecto más conocido del ABA y ha sido descrito por varios autores en otras especies (Gómez-Cadenas et al., 2003, Wang et al., 2011). Nuestros resultados confirman lo expuesto anteriormente, ya que la aplicación de ABA redujo la  $E$  y la  $g_s$ , independientemente de que las plantas crecieran o no con NaCl, siendo este descenso mayor con 10  $\mu\text{M}$  ABA. Además, la aplicación de ABA y NaCl no afectó al RWC, excepto en plantas con 1  $\mu\text{M}$  ABA y 200 mM NaCl que lo redujeron.

Por otra parte, la correlación positiva observada entre la  $P_n$  y la  $g_s$  ( $r=0,322$ ,  $P \leq 0,05$ ; Tabla 5.7.c) indica que el cierre solo contribuye un 10% al descenso de la  $P_n$ . Resultados similares fueron descritos por Gómez-Cadenas et al. (2003) en cítricos crecidos con 10  $\mu\text{M}$  ABA y 100 mM NaCl, llegando a la conclusión de que el ABA podría tener un papel protector del aparato fotosintético en plantas sometidas a estrés salino, al igual que ha sido descrito para otras especies en condiciones de estrés hídrico

y salino (Popova et al., 1995; Rajasekaran and Blake, 1999).

Un efecto secundario de la salinidad es la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Koprivova et al., 2008), que pueden causar daños en diferentes estructuras y funciones celulares (Del Río, 2006). Para protegerse del daño oxidativo las plantas activan mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Gill and Tuteja, 2010). Entre las enzimas antioxidantes se incluyen la APX y la POD que transforman el  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y  $O_2$ . En olivo, el aumento de la actividad APX por la salinidad ha sido descrito en los cvs Manzanillo (Valderrama et al., 2006) y Chemlali (Ben Ahmed et al., 2009). En contraste, en el cv. Allora se observó un descenso de la APX (Melgar et al., 2009). En el cv. Picual, las plantas crecidas con 100 mM NaCl sin ABA mostraron la misma actividad APX y POD que plantas control tras el período de recuperación, a diferencia de lo que ocurrió para la POD en plantas sometidas a estrés salino sin periodo de recuperación (Figura 4.2, pág. 216). Según Synkova and Pospíšilová (2002), el ABA incrementa la producción de ROS, lo cual induce la expresión de genes que codifican para SOD y CAT y mejoran la actividad de enzimas como SOD, CAT, APX y POX (Jiang and Zhang, 2001, 2002). Sin embargo, en el cv. Picual solo aumentó la actividad APX y POD en plantas con 1  $\mu$ M ABA crecidas sin sal.

La salinidad induce la formación de proteínas solubles entre las que se encuentran las proteínas LEA (del inglés, *late embryogenesis-abundant*) (Ashraf, 2004). Estas proteínas también son inducidas por el ABA (Zacarías and Lafuente, 2008). Según Sairam and Tyagi (2004), las proteínas LEA se producen en las plantas a consecuencia del estrés hídrico causado por una alta concentración de sal y, protegen la estructura y componentes celulares. En el cv. Picual, el contenido de proteína soluble de

la hoja aumentó por la aplicación de ABA, tanto en plantas salinizadas como en plantas sin sal, siendo este aumento mayor en plantas con 1  $\mu\text{M}$  ABA. En cuanto a plantas sin ABA, la aplicación de NaCl (100 mM) también trajo consigo un aumento del contenido de proteína.

La GB ha sido descrita como uno de los osmolitos que más se acumulan en diferentes especies de plantas, en respuesta a diferentes tipos de estrés, entre ellos el estrés salino (Ashraf and Harris, 2004; Ashraf and Foolad, 2007). Sin embargo, otros autores no observaron relación entre la acumulación de GB y la tolerancia a la salinidad de especies de los géneros *Triticum*, *Agropyron* y *Elymus* (Wyn Jones et al., 1984). En nuestro experimento, tras la recuperación del estrés salino, las plantas con 0  $\mu\text{M}$  ABA y 100 mM NaCl mostraron el mismo contenido de GB que el control, sin embargo, la aplicación de ABA y sal redujo el contenido de GB, respecto a plantas sin ABA. En contraste, otros autores describen un aumento de la GB en plantas de sorgo tratadas con ABA y sometidas a estrés salino, respectivamente (Saneoka et al., 2001; Zhang et al., 2012).

## **V. Discusión General**

---



Todos los cultivares estudiados en el presente trabajo descendieron el crecimiento a consecuencia del estrés salino, al igual que han descrito otros autores para otros cultivares de olivo (Chartzoulakis, 2005; Vigo et al., 2005; Perica et al., 2008; Kchaou et al., 2010, 2013; Bader et al., 2015). Entre los cultivares estudiados, 'Picudo' fue el que menos redujo su crecimiento, seguido por 'Frantoio', 'Picual', 'Casta Cabra', 'Cornicabra' y 'Ocal'. Sin embargo, el descenso del PS total en estos cultivares fue inferior al descrito por Chartzoulakis (2005) en otros cultivares tolerantes a la salinidad (Chartzoulakis et al., 2002). Para que el descenso del PS total se incremente un 10%, estaquillas enraizadas del cv. Picual, necesitarían 1,5 semanas más de exposición con 50 mM que con 100 mM NaCl. Por tanto, la reducción del crecimiento varió en función del tiempo de exposición al NaCl, al igual que describe Chartzoulakis (2005) en otros cultivares de olivo. Además, en el cv. Picual, con 200 mM NaCl las estaquillas enraizadas ralentizaron su crecimiento hasta alcanzar el 100% de mortandad a las 8 semanas. Sin embargo, la adición de ABA junto con el NaCl descendió la mortandad un 30 y 40% con 1 y 10  $\mu$ M ABA, respectivamente.

Los órganos que más redujeron su crecimiento al regarse con un medio salino y/o altamente salino fueron hoja y tallo. Esto se manifestó en un incremento de la relación R/PA, respuesta considerada como un mecanismo de adaptación al estrés (Younis et al., 2000), lo que confirma resultados descritos por otros autores en cultivares tolerantes ('Kalamata', 'Kothreiki', 'Megaritiki', 'Picual' y 'Chemlali'), moderadamente tolerantes ('Koroneiki', 'Mastoidis' y 'Amphissis') y sensibles a la salinidad ('Chetoui') (Chartzoulakis et al., 2002; Melgar et al., 2008; Kchaou et al., 2011; 2013). En contraste, estaquillas enraizadas del cv. Picual regadas con un medio moderadamente salino durante 13 semanas, redujeron el crecimiento de raíz y parte

aérea de forma similar, resultando una relación R/PA equivalente a la de plantas crecidas sin NaCl. Estos resultados confirman los descritos por Perica et al. (2008) en plantas de 1 año de cultivares de olivo tolerantes y sensibles a la salinidad ('Frantoio', 'Leccino', 'Manzanilla' y otros cultivares de Croacia no catalogados en su tolerancia), crecidas en condiciones similares. Igualmente, Charzoulakis et al. (2002) no detectaron cambio en la relación R/PA de plantas de 1 año de cultivares griegos con distinta tolerancia a la salinidad ('Koroneiki', 'Mastoidis', 'Kalamata', 'Amphissis' y 'Kothreiki') regados con 50 mM NaCl durante 8 semanas.

El efecto de la salinidad sobre el crecimiento se hizo notar más sobre el AF total que sobre el PS total, al igual que describe Charzoulakis (2005) para los cvs. Koroneiki (moderadamente tolerante) y Megaritikiki (tolerante); aunque, el descenso descrito por estos autores fue superior al observado en los cultivares utilizados en este estudio. Este descenso del AF total, se relacionó con un descenso del AFH y de formación de nuevas hojas. Resultados similares han sido descritos para los cvs. Manzanilla de Sevilla (sensible) y Kalamata (tolerante) (Vigo et al., 2005). En plantas con 200 mM NaCl, la caída de hoja contribuyó al descenso de AF total, al igual que describen otros autores tanto para cultivares sensibles y tolerantes (Kchaou et al., 2010).

La reducción del crecimiento en condiciones de estrés salino puede ser contrarrestada por la aplicación de reguladores del crecimiento, según comentan Kaya et al. (2009). En el cv. Picual, esto estuvo condicionado por el estado fisiológico de la planta (estaquillas enraizadas o plantas de 1 año) y el nivel de NaCl (100 y 200 mM NaCl). En estaquillas enraizadas, el efecto negativo del estrés salino (100 y 200 mM NaCl) sobre el crecimiento se alivió, principalmente, por los pretratamientos con QUIN (PSPA, PS de raíz, AF total y elongación de tallo) y GA<sub>3</sub> (PSPA y AF total); sin



embargo, en plantas de 1 año solo se mejoró la respuesta frente al estrés salino con 200 mM NaCl por el pretratamiento con AIA (PS de hoja, AF total y, PS y elongación de tallo), seguido por QUIN (PS de hoja, AF total y elongación de tallo), GA<sub>3</sub> (AF total y elongación de tallo) y AS (PS de hoja). Por otro lado, en plantas de 1 año con 100 mM NaCl los pretratamientos con GA<sub>3</sub>, SPD, AS y QUIN incrementaron la inhibición del crecimiento respecto a la causada solo por el estrés salino.

El descenso del crecimiento en condiciones de estrés salino puede ser una respuesta de adaptación de la planta, que debe desviar parte de su energía a la defensa frente al estrés (Prasch and Sonnewald, 2015). Por tanto, algunos autores consideran que una reducción en el crecimiento de la planta no se relaciona necesariamente con una menor tolerancia, ya que, una tendencia al crecimiento moderada puede contribuir a la protección de la parte aérea de los efectos perjudiciales de la excesiva acumulación de iones salinos (Flowers and Yeo, 1995; Melgar et al., 2006). Esto es importante, puesto que, la tolerancia a la salinidad en olivo se asocia a la exclusión y retención de Na<sup>+</sup> en la raíz, lo que evita su transporte a la parte aérea (Tattini et al., 1994; Chartzoulakis, 2005; Kchaou et al., 2010). Entre los cultivares estudiados en este trabajo, ‘Picudo’ y ‘Ocal’ fueron los más tolerantes en medio altamente salino (200 mM NaCl), acumulando un 84% más de Na<sup>+</sup> en raíz que en hoja. Además, ‘Picudo’ y ‘Ocal’ mostraron la menor y mayor reducción del crecimiento, respectivamente. Le siguen en tolerancia los cvs. ‘Casta Cabra’, ‘Cornicabra’ y ‘Frantoio’ que acumularon entre un 53 y un 63% más Na<sup>+</sup> en raíz que en hoja, aunque los incrementos de Na<sup>+</sup> fueron superiores en hoja que en raíz. Finalmente, el cv. Picual mostró una concentración similar de Na<sup>+</sup> en hoja y raíz. Por tanto, en plantas de 6 meses del cv. Picual con 200 mM NaCl durante 12 semanas, no fue efectiva la exclusión y retención de Na<sup>+</sup> en raíz. Sin embargo, en estaquillas

enraizadas del cv. Picual crecidas con 50 y 100 mM NaCl durante 13 semanas, las respectivas concentraciones de Na<sup>+</sup> en hoja en relación a las de raíz fueron 32 y 37%, aunque los incrementos de Na<sup>+</sup> fueron más elevados en hoja que en raíz. Además, cuando estaquillas enraizadas del cv. Picual crecieron sólo durante 6 semanas con 100 y 200 mM NaCl, se acumuló un 65% más Na<sup>+</sup> en raíz que en hoja y el incremento de Na<sup>+</sup> fue mayor en raíz que en hoja. Por tanto, en el cv. Picual, la limitación del transporte de Na<sup>+</sup> hacia la parte aérea dependió del nivel de NaCl y del tiempo de exposición. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos por Marín et al. (1995), quienes clasificaron al cv. Picual como tolerante al estrés salino con 100 mM NaCl durante 7 semanas, basándose en la elongación de tallo. En relación a la tolerancia a la salinidad del olivo, según Chartzoulakis et al. (2005), con niveles de NaCl inferiores a 50 mM, la exclusión de Na<sup>+</sup> puede ser efectiva independientemente de la tolerancia del cultivar, mientras que con 100 y 200 mM NaCl, el Na<sup>+</sup> se transporta y acumula en la parte aérea, apareciendo síntomas de toxicidad en los cultivares que no son tolerantes a la salinidad. En contraste, en estudios más recientes se afirma que la exclusión de Na<sup>+</sup> con 50 mM NaCl es efectiva en cultivares tolerantes del olivo (Kchaou et al., 2010).

Por otra parte, estaquillas enraizadas del cv. Picual presentaron un alto porcentaje de mortandad a las 7 semanas de tratamiento con 200 mM NaCl, por lo que esto podría deberse a la entrada de la planta en la fase iónica del estrés salino por la acumulación de Na<sup>+</sup> en hoja a concentraciones tóxicas (Munns and Tester, 2008). El hecho de que en plantas de 6 meses no se observara esta mortandad se asociaría a una mayor sensibilidad al estrés salino de estaquillas enraizadas. De forma similar, en estudios realizados por Bouaziz (1990) y Parida and Das (2005) concluyeron que la sensibilidad al estrés salino está condicionada por la edad de la planta.

El pretratamiento, de estaquillas enraizadas del cv. Picual, con AIA y AS aumentó la capacidad de exclusión de  $\text{Na}^+$  de la parte aérea con 100 y 200 mM NaCl, mientras que, los pretratamientos que favorecieron el crecimiento en condiciones de estrés salino ( $\text{GA}_3$  y QUIN) no mejoraron el mecanismo de exclusión. Esto confirma para el cv. Picual, que el descenso del crecimiento por la salinidad puede suponer un mecanismo de tolerancia que protege la parte aérea de la acumulación de iones salinos (Flower and Yeo, 1995). Por otra parte, la aplicación de 10  $\mu\text{M}$  ABA favoreció la exclusión de  $\text{Na}^+$  de la parte aérea en medio salino (100 mM). Resultados similares fueron descritos por otros autores para otros cultivos (Khadri et al., 2007; Gurmani et al., 2007, 2013).

Distintos autores implican al  $\text{Ca}^{2+}$  en el mecanismo de exclusión y retención de iones en la raíz (Liu and Zhu, 1997; Blumwald et al., 2000; Ishitani et al., 2000; Shi et al., 2002), lo que apoya los resultados obtenidos para los cvs. Picudo y Ocal, ya que en estos cultivares el  $\text{Ca}^{2+}$  no descendió en raíz por la alta salinidad (200 mM NaCl), de hecho, en 'Picudo' aumentó. De forma similar, Vigo et al. (2005) no describieron descenso del  $\text{Ca}^{2+}$  de raíz en el cv. Kalamata (tolerante). En el caso del cv. Picual, el  $\text{Ca}^{2+}$  aumentó en hoja y raíz de estaquillas enraizadas crecidas en medio salino (100 mM NaCl). Sin embargo, otros autores no relacionaron el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en raíz en condiciones de estrés salino con la tolerancia (Melgar et al., 2007; Bader et al., 2015).

El  $\text{Na}^+$  interfiere con la absorción de  $\text{K}^+$  por la raíz (Bandeh-hagh et al., 2008), por tanto, en los cultivares estudiados la concentración de  $\text{K}^+$  descendió por la salinidad (excepto en hoja del cv. Picudo). El aumento de  $\text{Na}^+$  y el descenso de  $\text{K}^+$  trajo consigo un descenso de la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ , relación considerada por algunos autores como un índice de toxicidad (Chaparzadeh et al., 2003). En el caso del cv. Picual, la relación

$K^+/Na^+$  se redujo por la salinidad, independientemente de la edad de la planta, siendo este descenso inferior en raíz que en hoja. Perica et al. (2008) describieron una reducción de la relación  $K^+/Na^+$  en hoja de 'Frantoio' (tolerante) similar a la descrita para el cv. Picual. Según Tattini et al. (2008), la tolerancia a la salinidad del olivo está relacionada, no sólo con la capacidad de exclusión de  $Na^+$  de la parte aérea, sino también con el mantenimiento de una apropiada relación  $K^+/Na^+$  en los tejidos en crecimiento activo. De hecho, los cvs. Picudo y Ocal, que mostraron la mayor capacidad de exclusión de  $Na^+$ , fueron los que menos descendieron la relación  $K^+/Na^+$  de hoja, aunque dicha relación no mostró diferencias entre cultivares. En consonancia con nuestros resultados, Perica et al. (2008) publicaron una relación  $K^+/Na^+$  similar entre cultivares sensibles y tolerantes crecidos en estrés salino. En contraste, otros autores han descrito una relación  $K^+/Na^+$  en hoja más alta en cultivares de olivo tolerantes que en cultivares sensibles (Bader et al., 2015, Chartzoulakis et al., 2005). De forma similar, los pretratamientos con AIA y AS, que mejoraron la tolerancia a la salinidad en estaquillas enraizadas del cv. Picual, aumentaron la relación  $K^+/Na^+$  de hoja.

La  $P_n$ , al igual que el crecimiento, es uno de los principales procesos que se afectan por la salinidad (Munns et al., 2006). Según nuestros resultados para el cv. Picual, con 100 y 200 mM NaCl hubo descenso de la  $P_n$ , sin embargo, en los ensayos realizados con 50 mM NaCl la fotosíntesis no se afectó. Resultados similares fueron descritos por Chartzoulakis et al. (2002) para cultivares moderadamente tolerantes ('Amphisis' y 'Koroneiki') y tolerantes ('Kothreiki' y 'Kalamata') a la salinidad. En contraste, Kchaou et al. (2013) describen descenso de la  $P_n$  con 50, 100 y 200 mM en los cvs. Chetoui (sensible), Koroneiki (moderadamente tolerante), Arbequina (tolerante) y Arbosana (moderadamente tolerante). Sin embargo, el pretratamiento de plantas de 1

año del cv. Picual con GA<sub>3</sub>, AIA, QUIN y AS aumentó la  $P_n$  en plantas con 200 mM NaCl. En otros cultivos también se ha descrito aumento de la capacidad fotosintética con GA<sub>3</sub>, QUIN y AS (Khan et al., 2010; Wu et al., 2012; Iqbal and Ashraf 2013; Bastam et al., 2013).

El descenso de la  $P_n$  por la salinidad puede deberse a un descenso de la disponibilidad de CO<sub>2</sub> o a un efecto directo de los iones en las células del mesófilo (Flexas et al., 2004, 2007; Chartzoulakis et al., 2002). En el cv. Picual, la  $g_s$  descendió en todos los niveles de NaCl ensayados, por lo que el cierre estomático contribuyó a la reducción de la  $P_n$ . Este descenso de la  $g_s$  por la salinidad es una respuesta adaptativa de la planta frente al descenso del potencial hídrico en el entorno de las raíces (Zheng et al., 2002). Cuando el descenso de la  $P_n$  se debe al descenso de la  $g_s$ , la  $C_i$  desciende (Farquhar and Sharkey, 1982), sin embargo, en el cv. Picual la  $C_i$  aumentó con 100 y 200 mM NaCl. Por tanto, con estos niveles de sal, limitaciones bioquímicas, por la acumulación de iones en los tejidos, podrían estar contribuyendo al descenso de la  $P_n$  (Chartzoulakis et al., 2002). Estos resultados coinciden con los descritos por otros autores para otros cultivares de olivo en condiciones de estrés salino intenso (Bongi and Loreto, 1989; Paranychianakis and Chartzoulakis, 2005). Sin embargo, en plantas de 1 año del cv. Picual, descendió la  $C_i$  con 100 y 200 mM NaCl por los pretratamientos con GA<sub>3</sub>, AIA y QUIN, mientras que, en los pretratamientos con AS y SPD solo descendió  $C_i$  con 100 mM NaCl. Por tanto, en estos casos no aumenta la fotoinhibición.

Por otra parte, en el cv. Picual el descenso de clorofila con 100 y 200 mM NaCl también pudo contribuir al descenso de la  $P_n$ . Resultados similares han sido descritos por otros autores en otros cultivares de olivo tolerantes y sensibles a la salinidad (Ben Ahmed et al., 2009, 2010, 2011; Petridis and Therios, 2012; Kchaou et al., 2013). El

descenso de la clorofila es un síntoma del estrés oxidativo, pudiendo ser resultado de la fotooxidación de los pigmentos, de un aumento de la degradación o de la inhibición de su síntesis (Smirnoff, 1993; Santos, 2004).

La aplicación de QUIN, GA<sub>3</sub> y AS provocó un aumento del contenido clorofila en el cv. Picual, independientemente de la edad de la planta, con 100 y 200 mM NaCl. Resultados similares han sido descritos por otros autores para otros cultivos en condiciones de estrés salino (Gadallah, 1999; Khan, 2010; Agami, 2013). En el caso de la QUIN, regulador que aumentó el contenido de pigmentos en mayor proporción, puede deberse a la capacidad de esta fitohormona para reducir la actividad clorofilasa y estimular la síntesis de pigmentos (Chernyad'ev, 2009). Por otra parte, Shah (2007) relaciona la GA<sub>3</sub> con la mejora de la ultraestructura de los plastidios asociada con la retención de clorofila, evitándose así su degradación; mientras que, Kulaeva et al. (1991) describe la prevención de la degradación del cloroplasto por el AS.

En olivo la reducción del transporte de agua en condiciones de estrés salino, puede ser un mecanismo de protección de la parte aérea frente al exceso de iones salinos (Chartzoulakis, 2005; Melgar et al., 2006). Por tanto, la reducción de la  $g_s$  y la E por la salinidad podría considerarse un mecanismo adaptativo más que una consecuencia negativa del estrés (Tatini et al., 2008). Según Chaves et al. (2009), un descenso de la  $g_s$  en medio moderadamente salino (50 mM NaCl), como ocurre con el cv. Picual, puede tener un efecto protector ya que le permite a la planta mejorar la eficiencia en el uso del agua. De hecho, plantas del cv. Picual crecidas con 50 mM NaCl no redujeron el contenido hídrico de la hoja (RWC). Sin embargo, con 100 y 200 mM NaCl se redujo tanto en estaquillas enraizadas como en plantas de 1 año. El descenso del RWC con 100 y 200 mM NaCl también ha sido descrito en los cvs. Chemlali (Ben Ahmed et al.

2009) y Cipressino (Remorini et al., 2009).

La acumulación de solutos por las células de plantas que crecen en condiciones de estrés salino se ha descrito en numerosas especies (Paranychianakis et al., 2005), entre las que se encuentra el olivo (Gucci and Tattini, 1997). En plantas superiores, entre los osmolitos compatibles descritos se encuentran azúcares, aminoácidos y proteínas (Mansour, 2000; Abraham et al., 2003; Ashraf, 2004; Munns and Tester, 2008; Iqbal et al., 2014). En el caso del cv. Picual, el crecimiento en medio altamente salino (200 mM NaCl) trajo consigo un aumento de los niveles de proteína de la hoja, mientras que en medio salino (100 mM NaCl) también aumentaron aminoácidos y prolina. En estudios realizados por Demiral et al. (2011), la prolina tuvo un comportamiento similar en el cv. Gemlik. En contraste, Ben Ahmed et al. (2010, 2011) describieron acúmulo de prolina con ambos niveles de NaCl en el cv. Chemlali (tolerante). Por tanto, el aumento de prolina depende del nivel de NaCl y del cultivar, tal y como afirman Petridis and Therios (2012). Por otra parte, en el cv. Picual la síntesis de prolina podría estar relacionada con el nivel de tolerancia a la salinidad (el mecanismo de exclusión funcionó hasta 100 mM NaCl).

Por otro lado, en condiciones de estrés salino, el pretratamiento con GA<sub>3</sub> favoreció la acumulación de prolina respecto a las plantas sin pretratamiento, independientemente de la edad de la planta (estaquillas enraizadas y plantas de 1 año). Además, en función de la edad de la planta, la prolina también aumentó con otros reguladores del crecimiento. En estaquillas enraizadas esto ocurrió por los pretratamientos con AS y QUIN, mientras que en plantas de un año, se favoreció su acumulación con AIA y AS en 200 mM NaCl y con SPD en 100 mM NaCl. Esto podría deberse a que las fitohormonas pueden influir en la tolerancia a la salinidad regulando el

metabolismo de la prolina a través del aumento del contenido de N o Ca (Iqbal et al., 2014).

Los azúcares totales de la hoja no aumentaron por la salinidad. Sin embargo, el análisis por separado mostró que, en el estaquillas enraizadas del cv. Picual aumentaron los niveles de glucosa (100 y 200 mM NaCl) mientras que los de fructosa y sacarosa descendieron. Además, aumentaron los niveles de manitol (100 mM NaCl). En estudios previos, Tattini et al. (1996) también observaron aumento de glucosa y manitol. El manitol tiene una especial relevancia en la bioquímica del olivo en condiciones de salinidad (Tattini et al., 1996; Rejškova et al., 2007), ya que, además de contribuir al ajuste osmótico (Tattini et al., 1996, 2002), también actúa como antioxidante capaz de eliminar radicales libres (Shen et al., 1997; Seki et al., 2007) al igual que se ha descrito para la prolina (Ashraf and Foolad, 2007). Por otra parte, los pretratamientos con QUIN y AS favorecieron el acúmulo de manitol con 100 y 200 mM NaCl respecto a plantas sin pretratar. En plantas con GA<sub>3</sub> y AIA esto sólo ocurrió con 200 mM. Además, todos los reguladores del crecimiento incrementaron la relación Man/Glc con 100 mM NaCl favoreciendo la acumulación de manitol respecto a la de glucosa.

Las plantas que crecen en condiciones de estrés salino, también deben enfrentarse a un estrés oxidativo por la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Koyro et al., 2008; Yazici et al., 2008). Para evitar el daño oxidativo es necesario la eliminación de las ROS a través de mecanismos de enzimáticos y no enzimáticos. Para comprobar si en condiciones de estrés salino se mantiene el equilibrio entre la producción y eliminación de las ROS, se determinó la capacidad antioxidante en la hoja. Los resultados obtenidos para el cv. Picual mostraron que la capacidad antioxidante, en función de la neutralización de radicales DPPH<sup>·</sup>, se incrementó con 200



mM, pero no con 50 y 100 mM. Por otra parte, los pretratamientos con AIA y SPD aumentaron la capacidad antioxidante con 100 mM NaCl.

Los fenoles y flavonoides se encuentran entre los principales antioxidantes no enzimáticos (Türkan and Demiral, 2009) y contribuyen a la eliminación de radicales libres (Arora et al., 2000; Blokhina et al., 2003; Tattini et al., 2004; Agati et al., 2007). Según los resultados obtenidos en este trabajo, la respuesta de los fenoles al estrés salino dependió del cultivar y del nivel de NaCl. Así, con 200 mM NaCl sólo se incrementaron los niveles de fenoles en 'Frantoio', 'Ocal' y 'Picual'. Sin embargo, en 'Picual' con 50 y 100 mM NaCl descendieron. En contraste, en otros cultivares de olivo ('Zard', 'Ascolana', 'Koroneiki', 'Arbequina' y 'Cipressino') se ha descrito aumento de fenoles con niveles inferiores a 200 mM NaCl (Remorini et al., 2009; Petridis et al., 2012). El comportamiento de los flavonoides, fue similar al de fenoles, excepto con 50 mM que no descendió. Resultados similares fueron descritos por Remorini et al. (2009) en el cv. Cipressino.

El pretratamiento de plantas de 1 año del cv. Picual con AIA, trajo consigo aumento de los fenoles con 100 y 200 mM NaCl, mientras que, los pretratamientos con GA<sub>3</sub>, AS, SPD y QUIN solo favorecieron su acumulación con 100 mM. De forma similar, los flavonoides se incrementaron en los pretratamientos con GA<sub>3</sub> y AS para 100 y 200 mM NaCl, mientras que con el resto de reguladores sólo se incrementaron en 100 mM NaCl. Esto es importante puesto que fenoles y flavonoides contribuyen a la eliminación de radicales libres que se generan en las células a consecuencia del estrés (Arora et al., 2000; Blokhina et al., 2003; Tattini et al., 2004; Agati et al., 2007).

En respuesta al estrés oxidativo, además de los antioxidantes no enzimáticos, las

plantas poseen mecanismos de defensa enzimáticos. Nuestros resultados para el cv. Picual, mostraron un aumento de las actividades POD y GR con el estrés salino (100 y 200 mM NaCl), mientras que la actividad APX aumentó sólo con 200 mM. Además, la POD se incrementó por la salinidad en mayor proporción que la APX, por tanto, tuvo un papel más importante en la eliminación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El aumento de la actividad APX y GR en olivo por la salinidad ha sido descrito por otros autores en otros cultivares (Valderrama et al., 2006; Ben Ahmed et al., 2010). Ben Ahmed et al. (2010) detectaron aumento de la actividad APX en el cv. Chemlali (tolerante), tanto con 100 como con 200 mM NaCl; mientras que, en el cv. Allora descendió con 150 mM NaCl (Melgar et al., (2009). El pretratamiento del cv. Picual con reguladores del crecimiento tuvo un efecto diferente entre las distintas enzimas. La actividad APX de plantas con 100 mM NaCl, aumentó en todos los pretratamientos respecto a plantas sin pretratar. Además, con AIA esto también ocurrió con 200 mM NaCl. De hecho, en el pretratamiento con AIA, la APX alcanzó una actividad similar a la POD en plantas sin pretratar. Sin embargo, en cuanto a la otra peroxidasa estudiada, la POD, ninguno de los pretratamientos mejoró su actividad en condiciones de estrés salino respecto a plantas NP. En el caso de la actividad GR, los pretratamientos con AIA y QUIN mejoraron la respuesta de plantas con 100 mM NaCl.

## **VI. Conclusiones**

---



1. Los cultivares utilizados en este estudio muestran variabilidad en la tolerancia al estrés salino. Los cultivares más tolerantes a 200 mM de NaCl son 'Picudo' y 'Ocal', que acumulan más Na<sup>+</sup> en raíz que en hoja, inhiben el transporte de Na<sup>+</sup> a la parte aérea, descienden en menor proporción la relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> de la hoja y no reducen el Ca<sup>2+</sup> de la raíz.
2. La tolerancia a la salinidad de estaquillas enraizadas del cv. Picual está condicionada por el tiempo de exposición y el nivel de NaCl. A las 6 semanas de exposición, se acumula más Na<sup>+</sup> en raíz que en hoja con 100 y 200 mM de NaCl, limitándose su transporte hacia la parte aérea, mientras que, a las 8 semanas, las plantas con 200 mM no sobreviven y las plantas con 100 mM incrementan el Na<sup>+</sup> de la hoja en mayor proporción que el de la raíz.
3. Los pretratamientos con ácido salicílico y ácido indolacético, mejoran la tolerancia a las 6 semanas con 100 y 200 mM de NaCl de estaquillas enraizadas del cv. Picual, favoreciendo la acumulación de Na<sup>+</sup> en raíz respecto a hoja, la inhibición de su transporte hacia la parte aérea, su menor acumulación en hoja y raíz, y un menor descenso de la relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> de la hoja.
4. La supervivencia del cv. Picual a 200 mM de NaCl está condicionada por la edad de la planta, siendo menos resistente en etapas tempranas de su desarrollo. Así, estaquillas enraizadas mueren a las 8 semanas, mientras que, plantas de 6 meses sobreviven a 12 semanas de exposición.

5. La aplicación de 10  $\mu\text{M}$  de ácido abscísico aumenta la supervivencia a las 8 semanas con 200 mM de NaCl, y la retención de  $\text{Na}^+$  en la raíz con 100 mM de NaCl de estaquillas enraizadas del cv. Picual.
6. En hoja del cv. Picual con 100 mM de NaCl, se aprecia una tendencia a la acumulación de metabolitos osmóticamente activos, tales como, aminoácidos, prolina, proteína, glucosa y manitol.
7. El pretratamiento con ácido giberélico, favorece la acumulación de prolina en condiciones de estrés salino, en estaquillas enraizadas y plantas de 1 año del cv. Picual.
8. En hoja de estaquillas enraizadas del cv. Picual, se favorece la acumulación de glucosa respecto a manitol en respuesta al estrés salino. El pretratamiento con reguladores del crecimiento influye en los patrones de acumulación de ambos metabolitos. Con 100 mM se favorece la acumulación de manitol respecto a glucosa con todos los reguladores del crecimiento ensayados, mientras que con 200 mM esto ocurre sólo con ácido giberélico.
9. En plantas de 1 año del cv. Picual, las enzimas del estrés oxidativo, POD, APX y GR, aumentan en respuesta al estrés salino, siendo la actividad POD de mayor relevancia que la APX en la eliminación del peróxido de hidrógeno. El pretratamiento con ácido indolacético incrementa la actividad APX con 100 y 200 mM de NaCl.

## **VII. Bibliografía**

---





- Abraham E, Rigo G, Szekely G, Nagy R, Koncz C, Szabados L (2003) Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 51: 363-372
- Abdullah Z, Ahmad R (1990) Effect of pre- and post-kinetin treatments on salt tolerance of different potato cultivars growing on saline soils. *Journal of Agronomy and Crop Science* 165: 94-102
- Agami RA (2013) Alleviating the adverse effects of NaCl stress in maize seedlings by pretreating seeds with salicylic acid and 24-epibrassinolide. *South Africa Journal of Botany* 88: 171-177
- Agarwal S, Sairam RK, Srivastava GC, Maena RC (2005) Changes in antioxidant enzymes activity and oxidative stress by abscisic acid and salicylic acid in wheat genotypes. *Plant Biology* 49: 541-550
- Agati G, Matteini P, Goti A, Tattini M (2007) Chloroplast-located flavonoids can scavenge singlet oxygen. *New Phytologist* 174: 77-89
- Al-Absi K, Qrunfleh M, Abu-Sharar T (2003) Mechanism of salt tolerance of two olive (*Olea Europaea* L.) Cultivars as related to electrolyte concentration and toxicity. *Acta Horticulturae* 618: 281-290
- Alcazar R, Marco F, Cuevas JC, Patron M, Ferrando A, Carrasco P (2006) Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnology Letters* 28: 1867-1876
- Ali G, Srivastava PS, Iqbal M (1999) Proline accumulation, protein pattern and photosynthesis in regenerants grown under NaCl stress. *Plant Biology* 42: 89-95

- Ali MB, Hahn EJ, Paek KY (2005) Effects of temperature on oxidative stress defense systems, lipid peroxidation and lipoxygenase activity in *Phalaenopsis*. *Plant Physiology Biochemistry* 43: 213-223
- Alsokari SS (2011) Synergistic effect of kinetin and spermine on some physiological aspects of seawater stressed *Vigna sinensis* plant. *Saudi Journal of Biological Sciences* 18 (1):37-44
- Aragües R, Puy J, Royo A, Espada JL (2005) Three-year field response of young olive trees (*Olea europaea* L, cv. Arbequina) to soil salinity: trunk growth and leaf ion accumulation. *Plant Soil* 271: 265-273
- Arora A, Byrem TD, Nair MG, Strasburg GM (2000) Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 373 (1): 102-109
- Arnon DT (1949) Copper enzyme in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24: 1-15
- Ashraf M (1993) Effect of sodium chloride on water relations and some organic osmotica in arid zone plant species *Melilotus indica* (L.) *All Der Tropenlandwirt* 94: 95-102
- Ashraf M (1994) Breeding for salinity tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13: 17-42
- Ashraf M (2004) Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. *Flora* 199: 361-376

- Ashraf M, Harris PJC (2004) Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science* 166: 3-16
- Ashraf M, Foolad MR (2007) Roles of glycinebetaine and proline in improving plant abiotic stress tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 59: 206-216
- Babu S, Akhtar TA, Lampi MA, Tripuranthakam S, Dixon GR, Greenberg BM (2003) Similar stress responses are elicited by copper and ultraviolet radiation in the aquatic plant *Lemna gibba*: implication of reactive oxygen species as common signal. *Plant and Cell Physiology* 44: 1320-1329
- Bacelar EA, Santos DL, Moutinho-Pereira JM, Gonçaves BC, Ferreira HF, Correia CM (2006) Immediate responses and adaptative strategies of three olive cultivars under contrasting water availability regimes: changes on structure and chemical composition of foliage and oxidative damage. *Plant Science* 170: 596-605
- Bader B, Aissaoui F, Kmicha I, Ben Salem A, Chehab H, Gargouri K, Boujnah D, Chaieb M (2015) Effects of salinity stress water desalination, olive tree (*Olea europaea* L. cvs 'Picholine', 'Meski' and 'Ascolana') growth and ion accumulation. *Desalination* 364: 46-52
- Bandeh-hagh A, Toorchi M, Mohammadi A, Chaparzadeh N, Salekdeh H, Kazemnia H (2008) Growth and osmotic adjustment of canola genotypes in response to salinity. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 6 (2): 201-208
- Baninasab B, Baghbanha MR (2013) Influence of salicylic acid pre-treatment on emergence and early seedling growth of cucumber (*Cucumis sativus*) under salt stress. *International Journal of Plant Production* 7 (2): 187-206

- Barba-Espín G, Clemente-Moreno MJ, Alvarez S, García-Legaz MF, Hernández JA, Díaz-Vivancos P (2011) Salicylic acid negatively affects the response to salt stress in pea plants. *Plant Biology* 13: 909-917
- Barciszewski J, Siboska G, Rattan SIS, Clark BFC (2000) Occurrence, biosynthesis and proteins of kinetin (N6-furfuryl-adenine). *Plant and Growth Regulation* 32: 257-265
- Barranco D, Fernández-Escobar R, Rallo L (eds.) (2008). *El Cultivo del olivo* (8ª Ed). Junta de Andalucía y Ediciones Mundi-Prensa
- Bartoli G, Simontacchi M, Tambussi E, Beltrano J, Montaldi E, Puntarulo S (1999) Drought and watering-dependent oxidative stress: effect on antioxidant content in *Triticum aestivum* L. leaves. *Journal of Experimental Botany* 50: 373-381
- Bartolozzi F, Bertazza G, Bassi D, Cristoferi G (1997) Simultaneous determination of soluble sugars and organic acids as their trimethylsilyl derivatives in apricot fruits by gas-liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 758: 99-107
- Bastam N, Baninasab B, Ghobadi C (2013) Improving salt tolerance by exogenous application of salicylic acid in seedlings of pistachio. *Plant growth regulation* 69: 275-284
- Bates LS (1973) Rapid determination of free proline water stress studies. *Plant Soil* 39: 205-207
- Ben Ahmed C, Ben Rouina B, Sensoy S, Boukhriss M, Ben Abdullah F (2009) Saline water irrigation effects on antioxidant defense system and proline accumulation in leaves and roots of field-grown olive. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 11484-11490

- Ben Ahmed C, Rouina BB, Sensoy S, Boukhriss Mekki, Ben Abdullah F (2010) Exogenous proline effects on photosynthetic performance and antioxidant defense system of young olive tree. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 4216-4222
- Ben Ahmed C, Magdich S, Ben Rouina B, Sensoy S, Boukhris M, Ben Abdullah F (2011) Exogenous proline effects on water relations and ions contents in leaves and roots of young olive. *Amino Acids* 40: 565-573
- Benlloch M, Arboleda F, Barranco D, Fernandez-Escobar R (1991) Response of young olive trees to sodium and boron excess in irrigation water. *HortScience* 26: 867-870
- Benlloch M, Marín L, Fernandez-Escobar R (1994) Salt tolerance of various olive varieties. *Acta Horticulturae* 356: 215-217
- Bernstein L (1965) Salt tolerance of fruit crops. USDA, Agricultural Research, Agricultural International Bulletin 292
- Bohra JS, Dorffling H, Dorffling K (1995) Salinity tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) with reference to endogenous and exogenous abscisic acid. *Journal of Agronomy and Crop Science* 174: 79-86
- Borsani O, Valpuesta V, Botella MA (2001) Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology* 126: 1024-1030
- Boucherau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science* 140: 103-125

- Blokhina O, Virolainen E, Fagestedt KV (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annales Botanici Fenici* 91: 179-194
- Blumwald E, Aharon GS, Apse MP (2000) Sodium transport in plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 140-51
- Bongi G, Loreto F (1989) Gas-exchange properties of salt-stressed olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Plant Physiology* 90: 533-545
- Bouaziz A (1990) Behaviour of some olives varieties irrigated with brackish water and grown intensively in the central part of Tunisia. *Acta Horticulturae* 286: 247-250
- Boucaud J, Ungar IA (1976) Hormonal control of germination under saline conditions of three halophyte taxa in genus *Sueda*. *Physiology Plantarum* 36: 197-200
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254
- Briccoli Bati C, Basta P, Tocci C, Turco D (1994) Influenza dell'irrigazione con acqua salmastra su giovani piante di olivo. *Olivae* 53: 35-38
- Bueno M, Lendinez ML, Aparicio C, Cordovilla MP (2015) Effect of salinity on polyamines and ethylene in *Atriplex prostrata* and *Plantago coronopus*. *Biologia Plantarum* 59 (3): 596-600
- Cabot C, Sibole JV, Barcelo J, Poschenrieder C (2009) Abscisic acid decreases leaf Na<sup>+</sup> exclusion in salt treated *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Plant Growth Regulation* 28: 187-192

- Cao WH, Liu J, He XJ, Mu RL, Zhou HL, Chen SY, Zhang JS (2007) Modulation of ethylene responses affects plant salt-stress responses. *Plant Physiology* 143: 707-719
- Cambrollé J, Mateos-Naranjo E, Redondo-Gómez S, Luque T, Figueroa ME (2011) Growth, reproductive and photosynthetic responses to copper in the yellow-horned poppy, *Glaucium flavum* Crantz. *Environmental and Experimental Botany* 71: 57-64
- Cardona-Olarte P, Krauss KW, Twilley RR (2013) Leaf gas exchange and nutrient use efficiency help explain the distribution of two neotropical mangroves under contrasting flooding and salinity. *International Journal of Forestry Research* 2013: 524-625
- Cataldo DA, Haroon M, Schrader LE, Youngs VL (1975) Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 6: 71-80
- Centritto M, Loreto F, Chartzoulakis K (2003) The use of low [CO<sub>2</sub>] to estimate diffusional and non-diffusional limitations of photosynthetic capacity of salt-stressed olive saplings. *Plant, Cell & Environment* 26: 585-594
- Chance B, Maehly C (1955) Assay of catalase and peroxidases. *Methods in Enzymology* 11: 764-775
- Chakrabarti N, Mukherji S (2003) Alleviation of NaCl stress by pretreatment with phytohormones in *Vigna radiata*. *Biologia Plantarum* 46 (4): 589-594
- Chaparzadeh N, Khavari-Nejad RA, Navari-Izzo F, Izzo R (2003) Water relations and ionic balance in *Calendula officinalis* L. under salinity conditions. *Agrochimica* 47: 69-79

- Chartzoulakis K, Loupassaki M, Bertaki M, Androulakis I (2002) Effects of NaCl salinity on growth, ion content and CO<sub>2</sub> assimilation rate of six olive cultivars. *Scientia Horticulturae* 96: 235-247
- Chartzoulakis K (2005) Salinity and olive: Growth, salt tolerance, photosynthesis and yield. *Agricultural Water Management* 78: 108-121
- Chattopadhyay MK, Tiwari BS, ChatopadhyayG, Bose A, Sengupta ND, Gosh B (2002) Protective role of exogenous polyamines on salinity-stressed rice (*Oryza sativa*) plants. *Physiologia Plantarum* 116: 192-1999
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* 103: 551-560
- Chávez L, González LM (2009) Mecanismos involucrados en la tolerancia de las plantas a la salinidad. *Información Técnica Económica Agraria* 105 (4): 231-256
- Cheeseman JM (1988) Mechanism of salinity tolerance in plants. *Plant Physiology* 87: 547-864
- Chen Z, Newman I, Zhou M, Mendham N, Zhang G, Shabala S (2005) Screening plants for salt tolerance by measuring K<sup>+</sup> flux: a case study for barley. *Plant Cell and Environment* 28: 1230-46
- Chen Z, Zhou MX, Newman IA, Mendham NJ, Zhang GP, Shabala S (2007) Potassium and sodium relations in salinized barley tissues as a basis of differential salt tolerance. *Functional Plant Biology* 34: 150-62
- Chernyad'ev II, Monakhova OF (2003) Effects of cytokinins preparations on the pools



- of pigments and proteins of wheat cultivars differing in their tolerance to water stress. *Applied Biochemistry and Microbiology* 39: 524-531
- Chernyad'ev II (2009) The protective action of cytokinins on the photosynthetic machinery and productivity of plants under stress (review). *Applied Biochemistry and Microbiology* 45: 351-362
- Chinusamy V, Jagendorf A, Zhu J (2005) Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science* 45: 437-448
- Chow PS, Landhäusser SM (2004) A method for routine measurements of total sugar and starch content in woody plant tissues. *Tree physiology* 24: 1129-1136
- Cordovilla P, Ligeró F, Lluch C (1995) Influence of host genotypes on growth, symbiotic performance and nitrogen assimilation in faba bean (*Vicia faba* L.) under salt stress. *Plant and Soil* 172: 289-297
- Cordovilla MP, Bueno M, Aparicio C, Urrestarazu M (2014) Effects of salinity and the interaction between *Thymus vulgaris* and *Lavandula angustifolia* on growth, ethylene production and essential oil contents. *Journal of Plant Nutrition* 37: 875-888
- Correia FN (1999) Water resources in Mediterranean region. *Water Internacional* 20: 176-187
- Cosgrove DJ (1997) Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *Plant Cell* 9: 1031-1041
- Cramer GR, Läuchli A, Polito VS (1985) Displacement of  $\text{Ca}^{2+}$  by  $\text{Na}^{+}$  from the plasmalemma of root cells. *Plant Physiology* 79: 207-211

- Cramer GR, Lynch J, Läuchli A, Epstein E (1987) Influx of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> into roots of salt-stressed cotton seedlings. Effects of supplemental Ca<sup>2+</sup>. *Plant Physiology* 83: 510-516
- Cramer GR, Quarrie SA (2002) Abscisic acid is correlated with the leaf growth inhibition of four genotypes of maize differing in their response to salinity. *Functional Plant Biology* 29: 111-115
- Creelman RA, Mason HS, Bensen RJ, Boyer JS, Mullet JE (1990) Water deficit and abscisic acid cause differential inhibition of shoot versus root growth in soybean seedlings. *Plant Physiology* 92: 205-214.
- Cuin TA, Betts SA, Chalmandrier R, Shabala S (2008) A root's ability to retain K<sup>+</sup> correlates with salt tolerance in wheat. *Journal of Experimental Botany* 59: 2697-706
- Del Río LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB (2006) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology* 141: 330-335
- Demiral T, Turkan I (2005) Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline contents in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 53: 247-257
- Demiral MA, Aktas Uygun D, Uygun M, Kasirga E, Karagozler AA (2011) Biochemical response of *Olea europea* cv. Gemlik to short-term salt stress. *Turkish Journal of Biology* 35: 433-442
- Di Martino C, Delfine S, Pizzuto R, Loreto F, Fuggi A (2003) Free amino acids and glycine betaine in leaf osmoregulation of spinach responding to increasing salt stress.

- New Phytologist 158: 455-463
- Dijkstra P (1989) Cause and effect of differences in specific leaf area. In: Lambers H, Cambridge L, Konings H, Pons L (eds.). Causes and consequences of variation in growth rate and productivity of higher plants. The Hague, SPB Academic Publishing. The Netherlands, 125-140
- Dixon RA, Paiva N (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1085-1097
- Doganlar ZB, Demir K, Basak H, Gul I (2010) Effects of salt stress on pigment and total soluble protein contents of three different tomato cultivars. *African Journal of Agricultural Research* 5: 2056-2065
- Dunlap JR, Binzel ML (1996) NaCl reduces indole-3-acetic acid levels in the roots of tomato plants independent of stress-induced abscisic acid. *Plant Physiology* 112: 379-384
- Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82: 70-77
- El-Samad, HMA (2013) The physiological response of wheat plants to exogenous application of gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) or indole-3-acetic acid (IAA) with endogenous ethylene under salt stress conditions. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry* 5 (4): 58-64
- El-Shintinanawy F (2000) Photosynthesis in two wheat cultivars differing in salt susceptibility. *Photosynthetica* 38: 615-620

El-Sayed Emtithal H, El-Said ME, ME, El-Sherif AH, Sari El-Diem SA (1996)

Chemical studies on the salt tolerance of some olive cultivars. *Olivae* 64: 52-57

Fahad S, Bano A (2012) Effect of salicylic acid on physiological and biochemical

characterization of maize grown in saline area. *Pakistan Journal of Botany* 44 (4):

1433-1438

Fahad S, Hussain S, Bano A, Saud S, Hassan S, Shan D, Khan FA, Khan F, Chen Y,

Wu C, Tabassum MA, Chun Mx Afzal M, Jan A, Jan MT, Huang J (2014) Potential

role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses:

consequences for changing environment. *Environmental Science and Pollution* 22:

4907-4921

Fahad S, Nie L, Chen Y, Wu C, Xiong D, Saud S, Hongyan L, Cui K, Huang J (2015)

Crop Plant hormones and environmental stress. *Sustainable Agriculture Review* 15:

371-400

FAO (2008) Global Network on Integrated Soil Management for Sustainable Use of

Salt-affected Soils, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome,

Italy

Farquhar GD, Sharkey TD (1982) Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual*

*Review of Plant Physiology* 33: 317-345

Fatma M, Khan MIR, Masood A, Khan NA (2013) Coordinate changes in assimilatory

sulphate reduction are correlated to salt tolerance: involvement of phytohormones.

*Annual Review and Research in Biology* 3: 267-295

Feierabend J (2005) Catalases in plants: molecular and functional properties and role in

- stress defense. In: Smirnoff N (ed.). Antioxidant and reactive oxygen species in plants. Blackwell publishers, Oxford, pp 101-140
- Flexas J, Medrano H (2002) Energy dissipation in C<sub>3</sub> plants under drought. *Functional Plant Biology* 29: 1209-1215
- Flexas J, Bota J, Loreto F, Cornic G, Sharkey TD (2004) Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C<sub>3</sub> plants. *Plants Biology* 6: 269-279
- Flexas J, Díaz-Espejo A, Galmés J, Kaldenhoff R, Medrano H, Ribas-Cabo M (2007) Rapid variations of mesophyll conductance in response to change in CO<sub>2</sub> concentration around leaves. *Plant, Cell & Environment* 30: 1284-1298
- Flora LL, Madore MA (1993) Stachyose and mannitol transport in olive (*Olea europaea* L.). *Planta* 189: 484-490
- Flowers TJ, Yeo AR (1995). Breeding for salinity resistance in crop plants: Where next?. *Australian Journal of Plant Physiology* 22: 875-884
- Foyer, CH (1996) Oxygen processing in photosynthesis. *Biochemical Society Transactions* 24: 427-433
- Foyer CH, Noctor G (2005) Oxidant and antioxidant signalling in plants: re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environmental* 28: 1056-1071
- Fryer MJ, Andrews JR, Oxborough K, Clower DA, Baker NR (1998) Relationship between CO<sub>2</sub> assimilation, photosynthetic electron transport and active O<sub>2</sub>

- metabolism in leaves of maize in the field during periods of low temperature. *Plant Physiology* 116: 571-580
- Gadallah MAA (1999) Effects of kinetin on growth, grain yield and some mineral elements in wheat plants growing under excess salinity and oxygen deficiency. *Plant Growth Regulation* 27: 63-74
- Geissler N, Hussin S, Koyro HW (2009) Interactive effects of NaCl salinity and elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentration on growth, photosynthesis, water relations and chemical composition of the potential cash crop halophyte *Aster tripolium* L. *Environmental and Experimental Botany* 65: 220-231
- Ghassemi F, Jakeman AJ, Nix HA (1995) Salinization of land and water resources: human causes, extent management and case studies. Sydney, Australia/Wallingford, UK, UNSW Press/CAB International
- Gill S, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930
- Grace SC (2005) Phenolics as antioxidants. In: Smirnoff N (ed.). *Antioxidant and reactive oxygen species in plants*. Blackwell, UK, pp 141-168
- Greenway H, Munns R (1980) Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Annual Review of Plant Physiology* 31: 149-190
- Grieve CM, Grattan SR (1983) Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *Plant and Soil* 70: 303-307
- Groom PK, Lamont BB (1999) Which common indices of sclerophylly best reflect

differences in leaf structure? *Ecoscience* 6: 471-474

Gleeson D, Lelu-Walter MA, Parkinson M (2005) Overproduction of proline in transgenic hybrid larch (*Larix x Leptoeuropaea* (Dengler)) cultures renders them tolerant to cold, salt and frost

Gomez-Cadenas A, Arbona V, Jacas J, Primo-Millo E, Talon M (2003) Abscisic acid reduces leaf abscission and increases salt tolerance in citrus plants. *Journal of Plant and Growth Regulation* 21: 234-240

Goreta S, Leskovar J, Jifon L (2007) Gas exchange, water status, and growth of pepper seedlings exposed to transient water deficit stress are differentially altered by antitranspirants. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 132 (5): 603-610

Gucci R, Tattini M (1997) Salinity tolerance in olive. *Horticultural Reviews* 21: 177-214

Gucci R, Moing A, Gravano E, Gaudillère JP (1998) Partitioning of photosynthetic carbohydrates in leaves of salt-stressed olive plants. *Australian Journal of Plant Physiology* 25 (5): 571-579

Gucci R, Massai R, Casano S, Mazzoleni S (1999) *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology: Official Journal of the Societa Botanica Italiana* /abstract content 133 (2): 117-128

Guidi L, Degl'Innocenti E, Remorini D, Massai R, Tattini M (2008) Interactions of water stress and solar irradiance on the physiology and biochemistry of *Ligustrum vulgare*. *Tree Physiology* 28: 873-883

- Gunes A, Inal A, Alpaslam M, Erslan F, Bagsi EG, Cicek N (2007) Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *Journal of Plant Physiology* 164: 728-736
- Gurmani AR, Bano A, Salim M (2007) Effect of abscisic acid and benzyladenine on growth and ion accumulation of wheat under salinity stress. *Pakistan Journal of Botany* 39 (1): 141-149
- Gurmani AR, Bano A, Ullah N, Khan H, Jahangir M, Flowers TJ (2013) Exogenous abscisic acid (ABA) and silicon (Si) promote salinity tolerance by reducing sodium ( $\text{Na}^+$ ) transport and bypass flow in rice (*Oryza sativa indica*). *Australian Journal of Crop Science* 7: 1219-1226
- Hadiarto T, Tran LS (2011) Progress studies of drought-responsive genes in rice. *Plant Cell Reports* 30: 297-310
- Hamdi A, Abu-Zeid MF, Lacirignola C (1995) Water crisis in the Mediterranean: Agricultural water demand management. *Water International* 20: 176-187
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 463-499
- Hatano T, Kagawa H, Yasuhara T, Okuda T (1988) Two new flavonoids and other constituents in licorice root their relative astringency and radical scavenging effect. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 36: 2090-2097
- Hayat Q, Hayat S, Alyemeni MN, Ahmad A (2012) Salicylic acid mediated changes in



- growth, photosynthesis, nitrogen metabolism and antioxidant defense system in *Cicer arietinum* L. *Plant Soil Environment* 58 (9): 417-423
- He T, Cramer GR (1996) Abscisic acid concentrations are correlated with leaf area reductions in two salt-stressed rapid cycling *Brassica* species. *Plant Soil* 179: 25-33
- He L, Nada K, Tachibana S (2002) Effects of spermidine pretreatment through the roots on growth and photosynthesis of chilled cucumber plants (*Cucumis sativus* L.). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 71 (4): 490-498
- Hamayun M, Khan SA, Khan AL, Shin JH, Ahmad B, Shin DH, Lee IJ (2010) Exogenous gibberellic acid reprograms soybean to higher growth and salt stress tolerance. *Journal of agricultural and Food Chemistry* 58: 7226-7232
- Hisamatsu T, Koshioka M, Kubota S, Fujime Y, King RW, Mander LN (2000) The role of gibberellin in the control of growth and flowering in *Matthiola incana*. *Physiologia Plantarum* 109: 97-105
- Hoagland, DR, Arnon DL (1950) The water culture methods for growing plants without soil. Berkeley, CA, USA, The College of Agriculture, University of California, California Agriculture Experiment Station 32 p (Bulletin 347)
- Hoque M, Haque S (2002) Effects of GA<sub>3</sub> and its mode of application on morphology and yield parameters of mungbean (*Vigna radiate* L.). *Pakistan Journal of Biological Sciences* 5: 281-283
- Huang J, Wang JF, Wang QH, Zhang HS (2005) Identification of a rice zinc finger protein whose expression is transiently induced by drought, cold but not by salinity and abscisic acid. *DNA Sequence* 16: 130-136

- Hunt HW, Elliot ET, Detling JK, Morgan JA, Chen DX (1996) Responses of a C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> perennial grass to elevated CO<sub>2</sub> and climate change. *Global Change Biology* 2: 35-47
- Hurkman WJ, Fornari CS, Tanaka CK (1989) A comparison of the effect of salt on polypeptide and translatable mRNA in roots of a salt tolerant and salt sensitive cultivar of barley. *Plant Physiology* 90: 1444-1456
- Irigoyen JJ, Emerich DW, Sanchez Díaz M (1992) Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia Plantarum* 84: 55-60
- Iqbal M, Ashraf M (2007) Seed treatment with auxins modulates growth and ion partitioning in salt-stressed wheat plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 49: 1003-1015
- Iqbal N, Nazar R, Iqbal MRK, Masood A, Nefees AK (2011) Role of gibberellins in regulation of source sink relations under optimal and limiting environmental conditions. *Current Science* 100: 998-1007
- Iqbal N, Khan NA, Nazar R, Teixeira da Silva JA (2012) Ethylene stimulated photosynthesis results from increased nitrogen and sulfur assimilation in mustard types that differ in photosynthetic capacity. *Environmental and Experimental Botany* 78: 84-90
- Iqbal N, Masood A, Khan NA (2012) Phytohormones in salinity tolerance: ethylene and gibberellins cross talk. In: Khan N, Nazar R, Iqbal N, Anjum NA (eds.). *Phytohormones and abiotic stress tolerance in plants*. Springer, Berlin, pp 77-98

- Iqbal M, Ashraf M (2013) Gibberellic acid mediated induction of salt tolerance in wheat plants: growth, ionic partitioning, photosynthesis, yield and hormonal homeostasis.
- Iqbal N, Umar S, Khan NA, Khan MIR (2014) A new perspective of phytohormones in salinity tolerance: Regulation of proline metabolism. *Environmental and Experimental Botany* 100: 34-42
- Ishitani M, Liu J, Halfter U, Kim CS, Shi W, Zhu JK (2000) SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *Plant Cell* 12: 1667-1678
- Javid MG, Sorooshzadeh A, Moradi F, Modarres Sanavy SAM, Allahdadi I (2011) The role of phytohormones in alleviating salt stress in crop plants. *Australian Journal of Crop Science* 5 (6): 726-734
- Jia W, Wang Y, Zhang S, Zhang J (2002) Salt -stress-induced ABA accumulation is more sensitively triggered in roots than in shoots. *Journal of Experimental Botany* 53: 2201-2206
- Jiang M, Zhang J (2001) Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defense system and oxidative damages in leaves of maize seedlings. *Plant and Cell Physiology* 42: 1265-1273
- Jiang M, Zhang J (2002) Role of abscisic acid in water stress induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Free Radical Research* 36: 1001-1015
- Kakimoto T (2003) Biosynthesis of cytokinins. *Journal of Plant Research* 116: 233-239
- Kang D, Seo Y, Lee JD, Ishii R, Kim KU, Shin DH, Park SK, Lee I (2005) Jasmonic acid differentially affects growth, ion uptake and abscisic acid concentration in salt-

- tolerant and salt-sensitive rice cultivars. *Journal of Agronomy and Crop Science* 191: 273-282
- Karadeniz F, Burdurlu HS, Koca N, Soyer Y (2005) Antioxidant activity of selected fruits and vegetables grown in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 29: 297-303
- Karray-Bouraoui N, Harbaoui, Rabhi M, Jallali I, Ksouri R, Attia H, Msilini N, Lachaâl M (2010) Different antioxidant responses to salt stress in two different provenances of *Carthamus tinctorius* L. *Acta Physiologiae Plantarum* 33 (4): 1435-1444
- Katerji N, Van Hoorn JW, Hamdy A, Mastrorilli M, Mou Karzel E (1997) Osmotic adjustment of sugar beets in response to soil salinity and its influence on stomatal conductance, growth and yield, growth and yield. *Agricultural Water Management* 34: 57-69
- Kaya MD, Okçu G, Atak M, Cikili I, Kolsarici O (2006) Seed treatment to overcome salt and drought stress during germination in sun flower (*Helianthus Annuus* L.) *European Journal of Agronomy* 24: 721-730
- Kaya C, Tuna AL, Yokas I (2009) The role of plant hormones in plants under salinity stress tasks. *Vegetation Sciences* 44: 45-50
- Kaydan D, Yağmur M, Okçut N (2007) Effects of salicylic acid on the growth and some physiological characters in salt stressed wheat (*Triticum aestivum* L.). *Tarım Bilimleri Dergisi* 13 (2): 114-119
- Kchaou H, Larbi A, Gargouri K, Chaieb M, Morales F, Msallem M (2010) Assessment of tolerance to NaCl salinity of five olive cultivars, based on growth characteristics

- and Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> exclusion mechanisms. *Scientia Horticulturae* 124: 306-315
- Kchaou H, Larbi A, Chaieb M, Sagardoy R, Msallem M, Morales F (2013) Genotypic differentiation in the stomatal response to salinity and contrasting photosynthetic and photoprotection responses in five olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae* 160: 129-138
- Keskin BC, Sarikaya AT, Yuksel B, Memon AR (2010) Abscisic acid regulated gene expression in bread wheat. *Australian Journal of Crop Science* 4: 617-625
- Khatkar D, Kuhad MS (2000) Short-term salinity induced changes in two wheat cultivars at different growth stages. *Biologia Plantarum* 43: 629-632
- Khadri M, Tejera NA, Lluch C (2007) Sodium chloride-ABA interaction in two common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars differing in salinity tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 60: 211-218
- Khan W, Prithiviraj B, Smith D (2003) Photosynthetic response of corn and soybean to foliar application of salicylates. *Journal of Plant Physiology* 160: 485-492
- Khan MN, Siddiqui MH, Mohammad F, Naeem M, Masroor M, Khan A (2010) Calcium chloride and gibberellic acid protect linseed (*Linum usitatissimum* L.) from NaCl stress by inducing antioxidative defence system and osmoprotectant accumulation. *Acta Physiologiae Plantarum* 32: 121-132
- Khedr AHA, Abbas MA, Wahid AAA, Quick WP, Abogadallah GM (2003) Proline induces the expression of salt-stress responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancratium maritimum* L., to salt-stress. *Journal of Experimental Botany* 54: 2553-62

- Khodary SEA (2004) Effect of salicylic acid on growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism in salt stressed maize plants. *International Journal of Agricultura and Biology* 13 (2): 14-19
- Kholer JJ, Hernandez A, Caravaca F, Roldan A (2009) Induction of antioxidants enzymes is involved in the greater effectiveness of a PGPR versus AM fungi with respect to increasing the tolerance of lettuce to severe salt stress. *Environmental and Experimental Botany* 65: 245-252
- Klein I, Ben-Tal Y, Lavee S, David I (1994) Saline irrigation of cv. Manzanillo and Uomo di Piccione trees. *Acta Horticulturae* 356: 176-218
- Koprivova A, North KA, Kopriza S (2008) Complex signalling network in regulation of adenosine 5'-phosphosulfate reductase by salt stress in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology* 146: 1408-1420
- Koyro HW, Geisler N, Hussain S, Huchzermeyer B (2008) Survival extreme: life strategies of halophytes –the long way from system ecology, whole plant physiology, cell biochemistry and molecular aspects back to sustainable utilization at field sites. In: Abdely C, Öztürk M, Achraf M, Grigon C (eds.). *Biosaline agriculture and high salinity tolerance*, Birkhäuser, Basel, Boston, Berlin, pp 1-20
- Ksouri R, Megdiche W, Debez A, Falleh H, Grignon C, Abdely C (2007) Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 244-249
- Kubis J (2001) Polyamines and “scavenging system”: Influence of exogenous spermidine on Halliwell-Asada pathway enzyme activity in barley leaves under

- water deficit. *Acta Physiologiae Plantarum* 23: 335-341
- Kubis J (2008) Exogenous spermidine differentially alters activities of some scavenging system enzymes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and superoxide radical levels in water-stressed cucumber leaves. *Journal of Plant Physiology* 165: 397-406
- Kulaeva ON (1982) Gormona'naya regulyatsiya fiziologicheskikh protsessov u rastenii na urovne sinteza RNK i belka (Hormonal Regulation Of Physiological Processes in Plant at the level of RNA and Protein Synthesis) 41 st Timiryazev Memorial Lecture, Moscow: Nauka
- Kulaeva ON, Burkhanova EA, Fedina AB, Khokhlova VA, Bokebayeva GA, Vorbrodt HM, Adam G (1991) Effect of brassinosteroids on protein synthesis and plant-cell ultrastructure under stress conditions. Food and Agriculture Organization of the United Nations
- Kulaeva ON, Kuznetsov VV (2002) Recent advances and horizons of the cytokinin studying. *Russian Journal of Plant Physiology* 49 (4): 626-640
- Kumar B, Singh B (1996) Effect of plant hormones on growth and yield of wheat irrigated with saline water. *Annals of Agricultural Research* 17: 209-212
- Kusnetsov VV, Oelmuller R, Sarwat MI, Porfirova SA, Cherepneva GN, Herrman RG, Kulaeva ON (1994) Cytokinins, abscisic acid and light affect accumulation of chloroplast proteins in *Lupinus luteus* cotyledons without notable effect on steady-state mRNA levels. *Planta* 194 (2): 318-327
- Larcher W (1995) *Physiological Plant Ecology*. Springer-Verlag, Berlín

- Lehman J, Atzorn R, Bruckner R, Reinbothe C, Leopold J, Wasternack C, Parthier B (1995) Accumulation of jasmonate, abscisic acid, specific transcripts and proteins in osmotically stressed barley leaf segments. *Planta* 197: 156-162
- Lawlor DW, Cornic G (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plants Cell Environment* 25: 275-294
- Lewis OAM, (1986) The processing of inorganic nitrogen by the plant. In: Arnold E (ed.). *Plants and Nitrogen*, London: Butterworth, pp. 21-41
- Leyva R, Sánchez-Rodríguez E, Ríos JJ, Rubio-Wilhelmi MM, Romero L, Ruiz JM, Blasco B (2011) Beneficial effects of exogenous iodine in lettuce plants subjected to salinity stress. *Plant Science* 181 (2): 195-202
- Liu J, Zhu JK (1997) An *Arabidopsis* mutant that requires increased calcium for potassium nutrition and salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94: 14960-14964
- Liu JH, Kitashiba H, Wang J, Ban Y, Moriguchi T (2007) Polyamines and their ability to provide environment stress tolerance to plants. *Plant Biotechnology Journal* 24: 117-26
- Lopez-Climent MF, Arbona V, Pérez-Clemente MR, Gómez-Cadenas A (2008) Relationship between salt tolerance and photosynthetic machinery performance in citrus. *Environmental and Experimental Botany* 62: 176-184
- Loreto F, Centritto M, Chartzoulakis K (2003) Photosynthetic limitations in olive cultivars with different sensitivity to salt stress. *Plant, Cell & Environment* 26: 595-



- Løvdaal T, Olsen KM, Slimestad R, Verheul M, Lillo C (2010) Synergetic effects of nitrogen depletion, temperature, and light on the content of phenolic compounds and gene expression in leaves of tomato. *Phytochemistry* 71 (5-6): 605-13
- Loupassaki MH, Chartzoulakis KS, Digalaki NB, Androulakis II (2002) Effects of salt stress on concentration of nitrogen, phosphorus, potassium, calcium, magnesium, and sodium in leaves, shoots, and roots of six olive cultivars. *Journal of Plant Nutrition* 25 (11): 2457-2482
- Maathuis FJM (2009) Physiological functions of mineral macronutrients. *Plant Biology* 12 (3): 250-258
- Maathuis FJM, Ahmad I, Patishtan J (2014) Regulation of Na<sup>+</sup> fluxes in plants. *Frontiers of Plants Science* 5: 467-480
- Maggio A, Barbieri G, Raimondi G, De Pascale S (2010) Contrasting effects of GA<sub>3</sub> treatments on tomato plants exposed to increasing salinity. *Journal of Plant Growth Regulation* 29: 63-72
- Mahajan S, Tuteja N (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444: 139-158
- Maiti SK (1995) Some experimental studies on ecological aspects of reclamation in Jharia coalfield. PhD. Dissertation, Indian School of Mines, Dhanbad.
- Mane AV, Saratale GD, Karadge BA, Samant JS (2011) Studies on the effects of salinity on growth, polyphenol content and photosynthetic response in *Vetiveria*

- zizanioides* (L.). Emirates Journal of Food and Agriculture 23: 59-70
- Mansour MMF (2000) Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. Plant Biology 43: 491-500
- Marín L, Benlloch M, Fernandez-Escobar R (1995) Screening of olive cultivars for salt tolerance. Scientia Horticulturae 64: 113-116
- Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants, 2nd ed. London: Academic Press.
- McCord JM (2000) The evolution of free radicals and oxidative stress. American Journal of Medicine 108: 652-659
- Melgar JC, Benlloch M, Fernández-Escobar R (2006) Calcium increases sodium exclusion in olive plants. Scientia Horticulturae 109: 303-305
- Melgar JC, Syvertsen JP, Martinez V, García-Sánchez F (2007) The relative salt tolerance of 'Rangpur' seedlings and 'Arbequina' olive cuttings. Proceedings of the Florida State Horticultural Society 120: 79-84
- Melgar JC, Syvertsen JP, García-Sánchez F (2008) Can elevated CO<sub>2</sub> improve salt tolerance in olive trees? Journal of Plant Physiology 165: 631-640
- Melgar JC, Guidi L, Remorini D, Agati G, Degl'Inocenti Elena, Castelli S, Baratto MC, Faraloni C, Tattini M (2009) Antioxidant defenses and oxidative damage in salt-treated olive plants under contrasting sunlight irradiance. Tree Physiology 29: 1187-1198
- Mensor LL, Menzes FS, Leitao GG, Reis AS, Dos Santos TC, Coube CS (2001)

- Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Physioterapy Research* 15: 127-30
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (2015) Anuario de Estadística Avance 2014. Madrid
- Mittova V, Guy M, Tal M, Volokita M (2004) Salinity up-regulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*
- Molazem D, Qurbanov EM, Dunyamaliyev SA (2010) Role of proline, Na and chlorophyll content in salt tolerance of corn (*Zea mays* L.). *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science* 9: 319-324
- Molyneux P (2004) The use of the free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science Tecnology* 26 (2): 211-219
- Montero E, Cabot C, Poschenrieder Ch, Barceló J (1998) Relative importance of osmotic-stress and ion-specific effects of ABBA-mediated inhibition of leaf expansion growth in *Phaseolus vulgaris*. *Plant, Cell & Environment* 21: 54-62
- Moons A, Prisen E, Bauw G, Montagu MV (1997) Antagonistic effects of abscisic acid and jasmonates on salt-inducible transcripts in rice roots. *Plant Cell* 9:243-259.
- Moradi F, Ismail AM (2007) Responses of photosynthesis, chlorophyll fluorescence and ROS-Scavenging system to salt stress during seedling and reproductive stages in rice. *Annals of Botany* 99 (6): 1161-1173

- Morgan PW (1990) Effects of abiotic stresses on plant hormone systems. In: Alscher RG, Cumming JR (eds.). Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanism. Wiley-Liss, New York
- Morgan PW, Drew MC (1997) Ethylene and plant responses to stress. *Physiologia Plantarum* 100: 620-630
- Mostofa MG, Fujita M, Phan Tran LS (2015) Nitric oxide mediates hydrogen peroxide- and salicylic acid-induced salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant Growth Regulation* 77 (3): 265-277
- Moussa HR, Khodary SEA (2003) Effect of salicylic acid on the growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism in salt stressed maize plants. *Radiology and Nuclear Medicine* 35 (27): 179-187
- Mulholland BJ, Taylor IB, Jackson AC, Thompson AJ (2003) Can ABA mediate responses of salinity stressed tomato. *Environmental and Experimental Botany* 50: 17-18
- Munns R, James RA, Läuchli A (2006) Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany* 57: 1025-1043
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681
- Naczek M, Shahidi F (2004) Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* 1054: 95-111
- Naeem MS, Jin ZL, Wan GL, Liu D, Liu HB, Yoneyama K, Zhou WJ (2010) 5-

- Aminolevulinic acid improves photosynthetic gas exchange capacity and ion uptake under salinity stress in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Soil* 332: 405-415
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. *Plant and Cell Physiology* 22: 867-880
- Naqvi SSM, Ansari R, Kuawada AN (1982) Responses of salt stressed wheat seedlings to kinetin. *Plant Science Letters* 26: 279-283
- Navarro JM, Flores P, Garrido C, Martinez V (2006) Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at ripening stages, as affected by salinity. *Food Chemistry* 96: 66-73
- Nazar R, Iqbal N, Syeed S, Khan NA (2011) Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under salt stress by enhancing nitrogen and sulfur assimilation and antioxidant metabolism differentially in two mungbean cultivars. *Journal of Plant Physiology* 168: 807-815
- Nilsen E, Orcutt DM (1996) *The physiology of plants under stress – abiotic factors*. Wiley, New York pp 118-130
- Oron G, DeMalach Y, Gilerman L, David I, Lurie S (2002) Effect of water salinity and irrigation technology on yield and quality of pears. *Biosystem Engineering* 81: 237-247
- Ostle B (1963) *Statistic in Research*. America, Iowa, USA: The Iowa State University Press
- Palma F, Lluch C, Iribarne C, García-Garrido JM, Garcia NAT (2009) Combined effect

- of salicylic acid and salinity on some antioxidant activities, oxidative stress and metabolite accumulation in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Growth Regulation* 58: 307-331
- Palma F, López-Gómez M, Tejera NA, Lluch C (2013) Salicylic acid improves the salinity tolerance of *Medicago sativa* in symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* by preventing nitrogen fixation inhibition. *Plant Science* 208: 75-82
- Paranychianakis NV, Chartzoulakis KS (2005) Irrigation of Mediterranean crops with saline water. *Physiology to Management Practices* 106: 171-187
- Pareek A, Singla SL, Grover A (1997) Salt responsive proteins/genes in crop plants. In: Jaiwal PK, Singh RP, Gulati A (eds.). *Strategies for Improving Salt Tolerance in Higher Plants*, Oxford and IBH Publication Co., New Delhi, pp 365-391
- Parida AK, Das AB, Das P (2002) NaCl stress causes changes in photosynthetic pigments, proteins and other metabolic components in the leaves of a true mangrove, *Bruguiera parviflora* in hydroponic cultures *Journal of Plant Biology* 45: 28-36
- Parida AK, Das AB (2004) Defense potentials to NaCl in a mangrove *Bruguiera parviflora*: differential changes of isoforms of some antioxidant enzymes. *Journal of Plant Physiology* 161: 531-542
- Parida AK, Das AB (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60: 324-349
- Parkhurst F (1994) Diffusion of CO<sub>2</sub> and other gases inside leaves. *New Phytologist* 126 (3): 449-479

- Parvin S, Khorolragchaa A, Kim IJ, Yang DC (2014) Spermidine alleviates the growth of saline-stressed ginseng seedlings through antioxidative defense system. *Gene* 537: 70-78
- Patro BS, Bauri AK, Mishra S, Chattopadhyay S (2005) Antioxidant activity of *Myristica malabarica* extracts and their constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 6912-6918
- Pazuki A, Mohammad S, Aflaki F (2013) Interaction of salinity and phytohormones on wheat photosynthetic traits and membrane stability. *Agriculture (Pol'nohospodárstvo)* 59 (1): 33-41
- Peleg Z, Blumwald E (2011) Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 290-295
- Perica S, Goreta S, Selak GV (2008) Growth, biomass allocation and leaf ion concentration of seven olive (*Olea europaea* L) cultivars under increased salinity. *Scientia Horticulturae* 117: 123-129
- Petridis A, Therios I, Samouris G, Tananaki Ch (2012) Salinity-induced changes in phenolic compounds in leaves and roots of four olive cultivars (*Olea europaea* L.) and their relationship to antioxidant activity. *Environmental and Experimental Botany* 79: 37-43
- Popova LP, Stoinova ZG, Maslenkova LT (1995) Involvement of abscisic acid in photosynthetic process in *Hordeum vulgare* L. during salinity stress. *Journal of Growth Plant Regulation* 4: 2011-2018
- Prakash L, Prathapasenan G (1988) Putrescine reduces NaCl-induced inhibition of

- germination and early seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). Australian Journal of Plant Physiology 15 (6): 761-767
- Prakash L, Prathapasenan G (1990) Interactive effect of NaCl salinity and gibberellic acid on shoot growth, content of abscisic acid and gibberellin-like substances and yield of rice (*Oryza sativa* L. var GR-3). Proceeding: Plant Sciences 100 (3): 173-181
- Prasch CM, Sonnewald U (2015) Signaling events in plants: Stress factors in combination change the picture. Environmental and Experimental Botany 114: 4-14
- Rajasekaran LR, Blake TJ (1999) New plant growth regulators protect photosynthesis and enhance growth under drought of jack pine seedlings. Journal of Plant Growth Regulation 18: 175-181
- Rasheed R, Ashraf MA, Parveen S, Iqbal M, Hussain I (2014) effect of salt stress on different growth and biochemical attributes in two Canola (*Brassica napus* L.) cultivars. Communications in Soil Science and Plant Analysis 45: 669-679
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine 26 (10): 1231-1427
- Rejšková A, Patková L, Stodulková E, Lipavská H (2007) The effect of abiotic stresses on carbohydrate status of olive shoots (*Olea europaea* L.) under in vitro conditions. Journal of Plant Physiology 164: 174-184
- Roberts SK, Snowman BN (2000) The effects of ABA on channel-mediated K(+) transport across higher plant roots. Journal of Experimental Botany 51(350): 1585-



1594

- Remorini D, Melgar JC, Guidi L, Delg'Innocenti E, Castelli S, Traversi ML, Massai R, Tattini M (2009) Interaction effects of root-zone salinity and solar irradiance on the physiology and biochemistry of *Olea europaea*. *Environmental and Experimental Botany* 65: 210-219
- Romani A, Baldi A, Tattini M, Vincieri FF (1994) Extraction, purification procedures and HPLC-RI analysis of carbohydrates in olive (*Olea europea* L.) plants. *Chromatographia* 39: 35-39
- Romero-Aranda R, Soria T, Cuartero J (2001) Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. *Plant Science* 160 (2): 265-272
- Rosen H (1957) A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 67: 10-15
- Roy P, Niyogy K, Sengupta DN, Ghosh B (2005) Spermidine treatment to rice seedlings recovers salinity stress induced damage of plasma membrane and PM-bound  $H^+$  ATP<sub>ase</sub> in salt-tolerant and salt-sensitive rice cultivars. *Plant Science* 168: 583-91
- Roy ST, Negrão S, Tester M (2014) Salt resistant crop plants. *Current Opinion in Biotechnology* 26: 115-124
- Roychoudhury A, Basu S, Sengupta DN (2011) Amelioration of salinity stress by exogenously applied spermidine or spermine in three varieties of indica rice differing in their level of salt tolerance. *Journal of Plant Physiology* 168: 317–328.

- Rugini E, Fedeli E (1990). Olive as an oilseed crop. In: Bajaj YPS (ed.). Legumes and Oilseed Crops, Sorubger-Verlag, Berlín vol. 10, pp 593-641
- Rus AM, Estañ MT, Gisbert C, Garcia-Sorgo B, Serrano R, Caro M, Moreno V, Bolarín MC (2001) Expressing the yeast HAL1 gene in tomato increases fruit yield and enhances K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> selectivity under salt stress
- Ryu H, Cho YG (2015) Plants hormones in salt stress tolerance. Journal of Plant Biology 58: 147-155
- Saeedipour S (2014) The combined effects of salinity and foliar spray of different hormones on some biological aspects, dry matter accumulation and yield in two varieties of Indica rice differing in their level of salt tolerance. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences 84 (3): 721-733
- Sairam RK, Tyagi A (2004) Physiology and molecular biology of salt stress tolerance in plants. Current Science 86: 407-421
- Sakhabutdinova AR, Fatkhutdinova DR, Bezrukova MV, Shakirova FM (2003) Salicylic acid prevents the damaging action of stress factors on wheat plants. Bulgarian Journal of Plant Physiology.
- Saneoka H, Ishiguro S, Moghaieb REA (2001) Effect of salinity and abscisic acid on accumulation of glycinebetaine and betaine aldehyde dehydrogenase mRNA in Sorghum leaves (*Sorghum bicolor* ). Journal of Plant Physiology 158: 853-859
- Santos CV (2004) Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. Scientia Horticulturae 103: 93-99

- Schwarz M, Gale J (1981) Maintenance respiration and carbon balance of plants at low levels of sodium chloride salinity. *Journal of Experimental Botany* 32: 933-941
- Seki M, Umezawa T, Urano K, Shinozaki K (2007) Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 10 (3): 296-302
- Serrano R, Mulet JM, Rios G, Marquez JA, De Larrinoa IF, Leube MP, Mendizabal I, Pascual-Alhuir A, Proft M, Ros R, Montesinos C (1999) A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *Journal of Experimental Botany* 50: 1023-1036
- Shah SH (2007) Effects of salt stress on mustard as affected by gibberellic acid application. *General and Applied Plant Physiology* 33 (1-2): 97-106
- Shaheen MA, Hegazi AA, Hmnam SA (2011) Effect of salinity treatments on vegetative characteristics and leaves chemical content of transplants of five olive cultivars. *Journal of Horticultural Science and Ornamental Plants* 3: 143-151
- Sharma N, Abrams SR, Waterer DR (2005) Uptake, movement, activity, and persistence of an abscisic acid analog (80 acetylene ABA methyl ester) in marigold and tomato. *Journal of Plant Growth Regulation* 24: 28-35
- Shen B, Jensen RG, Bohnert HJ (1997) Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *American Society of Plant Biologists* 115 (2): 527-532
- Shi H, Zhu K (2002) *SOS4*, a pyridoxal kinase gene, is required for root hair development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 129 (2): 585-593
- Simon-Sardaki L, Kocsy G, Sébástien Z (2002) Effect of salt stress on free amino acid

and polyamine content in cereals. *Acta Biologica Szegedensis* 46 (3-4): 73-75

Singh NK, Bracken CA, Hasegawa PM, Anda AK, Buckel S, Hermodson MA, Pfankoch F, Regnier FE, Bressan RA (1987) Characterization of osmotin. A thaumatin-like protein associated with osmotic adjustment in plant cells. *Plant Physiology* 85: 529-536

Singh AK, Dubey RS (1995) Changes in chlorophyll a and b contents and activities of photosystems 1 and 2 in rice seedlings induced by NaCl. *Food and Agriculture Organization of United Nations* 31 (4): 145-157

Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158

Shipley B, Meziane D (2002) The balanced-growth hypothesis and the allometry of leaf and root biomass allocation. *Functional Ecology* 16: 326-33

Shomeili M, Nabipour M, Meskarbashe M, Memari HB (2011) Effects of gibberellic acid on sugarcane plants exposed to salinity under a hydroponic system. *African Journal of Plant Science* 5: 609-616

Skirycz A, Inzé D (2010) More from less: plant growth under limited water. *Current Opinion in Biotechnology* 21: 197-203

Smethurst CF, Rix K, Garnett T, Auricht G, Bayart A, Lane P (2008) Multiple traits associated with salt tolerance in lucerne: revealing the underlying cellular mechanisms. *Functional Plant Biology* 35: 640-50

- Smirnoff N (1993) The role of active oxygen in the response to water deficit and desiccation. *New Phytologist* 125: 27-58
- Solari LI, Jhonson S, Dejong TM (2006) Hydraulic conductance characteristics of peach (*Prunus persica*) trees on different rootstocks are related to biomass production and distribution. *Tree Physiology* 26: 1343-1350
- Stefanouadaki E, Williams M, Chartzoulakis K, Harwood J (2009) Olive oil qualitative parameters after orchard irrigation with saline water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 1421-1425
- Subhasree B, Baskar R, Laxmi Keerthana R, Lijina Susan R, Rajasekaran P (2009) Evaluation of antioxidant potential in selected green leafy vegetables. *Food Chemistry* 115: 1213-1220
- Sun J, Dai S, Wang R, Chen S, Li N, Zhou X (2009) Calcium mediates root  $K^+/Na^+$  homeostasis in poplar species differing in salt tolerance. *Tree Physiology* 29: 1175-86
- Syeed S, Anjum NA, Nazar R, Iqbal N, Masood A, Khan NA (2011) Salicylic acid-mediated changes in photosynthesis, nutrients content and antioxidant metabolism in two mustard (*Brassica juncea* L.) cultivars differing in salt tolerance. *Acta Physiologiae Plantarum* 33: 877-886
- Synkova H, Pospíšilová J (2002) In vitro pre cultivation of tobacco affects the response of antioxidative enzymes to in vitro acclimation. *Journal of Plant Physiology* 159: 781-789
- Syvertsen JP, Lloyd J, McConchie C, Kriedemann PE, Farquhar GD (1995) On the

- relationship between leaf anatomy and CO<sub>2</sub> diffusion through the mesophyll of hypostomatous leaves. *Plant, Cell & Environment* 18 (2): 149-157
- Szabolcs I (1989) *Salt-affected Soils*, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 274
- Szepesi A, Csiszar J, Gemes K, Horvarth E, Horvat F, Simon LM, Tari I (2009) Salicylic improves de acclimation to salt stress by stimulating abscisic aldehyde oxidase activity and abscisic acid accumulation, and increases Na<sup>+</sup> contents of the leaves without toxicity symptoms in *Solanum lycopersicum* L. *Journal of Plant Physiology* 166: 914-925
- Tahammolkonan M, Golchin A (2011) Effect of different levels of salinity stress on two olive cultivars. *Advances in Environmental Biology* 5 (8): 2322-2325
- Tang W, Newton RJ (2005) Polyamines reduce salt-induced oxidative damage by increasing the activities of antioxidant enzymes and decreasing lipid peroxidation in Virginia pine. *Plant Growth Regulation* 46: 31-43
- Tanji KK (1990) *Agricultural salinity assessment and management*. American Society Civil Engineering, ASCE Manual and Reports on Engineering Practice N°. 71, ASCE, New York
- Tattini M, Bertoni P, Caselli S (1992). Genotypic responses of olive plants to sodium chloride. *Journal of Plant Nutrition* 15: 1465-1485
- Tattini M (1994) Ionics relation of aeroponically-grown olive genotypes during salt stress. *Plant Soil* 161: 251-256
- Tattini M, Gucci R, Coradeschi MA, Ponzio C, Everard JD (1995) Growth, gas

- exchange and ion content in *Olea europaea* plants during salinity stress and subsequent relief. *Plant Physiology* 95: 203-210
- Tattini M, Gucci R, Coradeschi MA, Romani A, Baldi, Everard JD (1996). Changes in non-estructural carbohydrates in olive (*Olea Europaea*) leaves during root zone salinity stress. *Plant Physiology* 98: 117-124
- Tattini M, Montagni G, Traversi ML (2002) Gas Exchange, water relations and osmotic adjustment in *Phyllirea latifolia* grown at various salinity concentrations. *Tree Physiology* 22: 403-412
- Tattini M, Galardi C, Pinelli P, Massai R, Rumorini D, Agati G (2004) Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. *New Phytologist* 163: 547-561
- Tattini M, Traversi ML (2008) On the mechanism of salt tolerance in olive (*Olea europaea* L.) under low- or high-Ca<sup>2+</sup> supply. *Environmental and Experimental Botany* 65: 72-81
- Tattini M, Melgar JC, Traversi ML (2008) Responses of *Olea europaea* to high salinity: a brief -ecophysiological- review. *Advances in Horticultural Science* 22 (3): 1-15
- Tattini M, Traversi ML, Castelli S, Biricolti S, Guidi L, Massai R (2009) Contrasting response mechanisms to root-zone salinity in three co-occurring Mediterranean woody evergreens: a physiological and biochemical study. *Functional Plant Biology* 36 (6): 551-563
- Therios IN, Misopolinos ND (1988) Genotypic response to sodium chloride salinity of four major olive cultivars (*Olea europaea* L.). *Plant Soil* 106: 105-111

- Tuna AL, Kaya C, Dikilitas M, Higgs DEB (2008) The combined effects of gibberellic acid and salinity on some antioxidant enzyme activities, plant growth parameters and nutritional status in maize plants. *Environmental and experimental Botany* 62(1): 1-9
- Türkan I, Demiral T (2009) Recent developments in understanding salinity tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 67: 2-9
- Tuteja N (2007) Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods in Enzymology* 428: 419-438
- Uceda M, Hermoso M (2008) La calidad del aceite de olive. In: Barranco D, Fernandez-Escobar R, Rallo L (eds.). *El cultivo del olivo* (8ª ed)
- USDA-ARS (2008) Research Databases. Bibliography on salt tolerance. George E. Brown, Jr. Salinity Lab. US Dep. Agric., Agric. Res. Serv. Riverside, CA. <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8908>
- Valderrama R, Corpas FJ, Carreras A, Gómez-Rodríguez MV, Chaki M, Pedrajas JR, Fernández-Ocaña A, Del Río LA, Barroso JB (2006) The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants. *Plant, Cell & Environment* 29: 1449-1459
- Verma S, Mishra SN (2005) Putrescine alleviation of growth in salt stressed *Brassica juncea* by inducing antioxidative defense system. *Journal of Plant Physiology* 162: 669-677
- Vigo C, Therios IN, Bosabalidis AM (2005) Plant growth, nutrient concentration and leaf anatomy of olive plants irrigated with diluted seawater. *Journal of Plants Nutrition* 28: 1001-1021



- Wang Y, Ma F, Li M, Liang D, Zou J (2011) Physiological responses of kiwi fruit plants to exogenous ABA under drought conditions. *Plant Growth Regulation* 64: 63-74
- Weisman Z, Itzahak D, Ben Dom N (2004) Optimization of saline water level for sustainable Barnea olive and oil production in desert conditions. *Scientia Horticulturae* 100: 257-266
- Wellburn AR (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Plant Physiology* 144: 307-313
- White PJ, Broadley MR (2001) Chloride in soils and its uptake and movement within the plant: a review. *Annals of Botany* 88 (6): 967-988
- Wicke B, Smeets E, Dornburg V, Vashev B, Gaiser T, Turkenburg W, Faaij A (2011) The global technical and economic potential of bioenergy from salt-affected soils. *Energy & Environmental Science* 4: 2669-2681
- Wise CS, Dimler RJ, Davis HA, Rist CE (1955) Determination of easily hydrolyzable fructose units dextran preparations. *Analytical Chemistry* 27 (1): 33-36
- Wilkinson S, Davies WJ (2010) Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant Cell & Environment* 33: 510-525
- Wu X, Zhu Z, Li X, Zha Z (2012) Effects of cytokinin on photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence parameters and antioxidative system in seedlings of eggplant (*Solanum melongena* L.) under salinity stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 34: 2105-2114

- Wyn Jones RG (1981) Salt tolerance. In: Jhonson CB (ed.). Physiological process limiting plant productivity-Butterworths, London, pp 271-292
- Wyn Jones RG, Gorham J, McDonell E (1984) Organic and inorganic solute contents as selection criteria for salt tolerance in the *Triticeae*. Food and Agriculture Organization of the United Nations
- Xu Y, Chang PL, Liu D, Narasimhan ML, Raghothama KG, Hasegawa PM, Bressan RA (1994) Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell* 6: 1077-1085
- Yamaguchi S (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual Review of Plant Physiology* 59: 225-251
- Yamasaki H, Sakihama Y, Ikehara N (1997) Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Plant Physiologist* 115: 1405-1412
- Yang YL, Zhang F, He WL, Wang XM, Zhang LX (2003) Iron mediated inhibition of H<sup>+</sup>-ATPase in plasma membrane vesicles isolated from wheat roots. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60: 1249-1257
- Yazici I, Türkan I, Sekmen AH, Demiral T (2008) Salinity tolerance of purslane (*Portulaca oleracea* L.) is achieved by enhanced antioxidative system, lower level of lipid peroxidation and proline accumulation. *Environmental and Experimental Botany* 61: 49-57
- Younis ME, El-Shahaby OE, Abo-Hamed SA, Ibrahim AH (2000) Effects of water stress on growth, pigment and <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> assimilation in three sorghum cultivars. *Journal*

- of Agronomy and Crop Science 185: 73-82
- Yuan S, Lin HH (2008) Role of salicylic acid in plant abiotic stress. *Zeitschrift fur Naturforschung section C. A Journal of Biosciences* 63: 313-320
- Zacarías L, Lafuente MT (2008) Etileno, ácido abscísico y otros reguladores del desarrollo. In: Azcón-Bieto J, Talón M (eds.). *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGraw Hill Interamericana, Madrid pp 445-465
- Zahir ZA, Asghar HN, Arshad M (2001) Cytokinin and its precursors for improving growth and yield of rice. *Soil Biology & Biochemistry* 33: 405-408
- Zarrouk M, Marzouk B, Ben Miled Daoud D, Cherif A (1996) Oil accumulation in olives and effect of salt on their composition. *Olivae* 61: 41-45
- Zidan I, Shaviv A, Ravina I, Neuman PM (1992) Does salinity inhibit maize leaf growth by reducing tissue concentration of essential mineral nutrients. *Journal of Plant Nutrition* 15: 1407-1419
- Zhang J, Jia W, Yang J, Ismail AM (2006) Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crop Research* 97: 111-119
- Zhang L, Gao M, Hu J, Zhang X, Wang K, Ashraf M (2012) Modulation role of abscisic acid (ABA) on growth, water relations and glycinebetaine metabolism in two maize (*Zea mays* L.) cultivars under drought stress. *International Journal of Molecular Sciences* 13: 3189-3202
- Zhao HJ, Lin XW, Shi HZ, Chang SM (1995) The regulating effect of phenolic compounds on the physiological characteristics and yield of soybeans. *Acta*

Agronomica Sinica 21: 351-355

Zhao GQ, Ma BL, Ren CZ (2007) Growth, gas exchange chlorophyll fluorescence and ion content of naked oat in response to salinity. Crop Science 47: 303-307

Zheng GQ, Xu X, Xu YZ, Liu ZL (2002) The effect of salt stress on the stomatal and non-stomatal limitation of photosynthesis of *Lycium barbarum*. Acta Botanica Boreal-Occident Sinica 22: 1355-1359

Zhu JK, Liu J, Xiong L (1998) Genetic of salt tolerance in *Arabidopsis*: evidence for critical role of potassium nutrition. American Society of Plant Physiologists 10 (7): 1181-1191

Zhu JK (2001) Plant salt tolerance. Trends Plant Science 6: 66-71

Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. Annual Review Plant Biology 53: 247-273

Zörb C, Senbayram M, Peiter E (2014) Potassium in agriculture – status and perspectives. Journal of Plant Physiology 171: 656-69

## **VIII. Anexo**

---



# Comparative Physiological Analysis of Salinity Effects in Six Olive Genotypes

Carolina Aparicio

Department of Animal Biology, Plant Biology and Ecology, University of Jaen, Jaen, Spain

Miguel Urrestarazu

Centro de Investigación BITAL, University of Almeria, E-04120, Almeria, Spain

María del Pilar Cordovilla<sup>1</sup>

Department of Animal Biology, Plant Biology and Ecology, University of Jaen, Jaen, Spain

*Additional index words.* compatible solutes, *Olea europaea*, potassium content, sodium content, total phenol

**Abstract.** Changes caused by NaCl salinity on growth, gas exchange, chemical composition, and oxidative stress symptoms have been measured in six olive (*Olea europaea* L.) cultivars (Casta Cabra, Cornicabra, Frantoio, Ocal, Picual, and Picudo) grown in nutrient solution in a growth chamber pot experiment. Six-month-old plants were transplanted to a sand–perlite culture and irrigated with half-strength Hoagland nutrient solution containing 0 and 200 mM NaCl for 12 weeks. Salinity significantly depressed growth and leaf gas exchange, but to a different degree in each cultivar, Picudo was the cultivar that showed less growth inhibition. The effectiveness of Na<sup>+</sup> exclusion mechanism in the roots differed significantly among studied cultivars, working effectively in ‘Ocal’ and ‘Picudo’ and being less efficient in ‘Picual’. Furthermore, ‘Picudo’ showed the ability to maintain the concentration of leaf K<sup>+</sup> under the stress condition. ‘Ocal’ accumulated phenolic compounds and did not reduce carotenoid or total thiol concentration under saline stress. Between the cultivars studied, ‘Picudo’ and ‘Ocal’ were the most tolerant.

In the Mediterranean region, the olive is considered to be the most important fruit tree in the area (International Olive Oil Council, 2003). In this region, olive tree cultivation is being extended to irrigated land where salinity is becoming a major problem as a result of a high rate of evaporation and insufficient leaching (Calero et al., 2013; Chartzoulakis, 2005). In addition, water scarcity in the Mediterranean basin restricts the availability of fresh water for crop irrigation. To overcome water shortages and to satisfy the increasing water demand for agricultural development, the use of saline water may become an unavoidable necessity.

Olive is considered moderately tolerant to salinity (Demiral, 2005), although the response of plants to saline stress is a genotypic-dependent characteristic (Chartzoulakis et al., 2002; Weissbein et al., 2008). The olive tree’s ability to acclimate to saline stress includes morphological, anatomical, and physiological alterations at the leaf level (Tattini et al., 1995). However, tolerance to NaCl in olive is mostly related to the salt exclusion mechanism at the root level, which prevents sodium (Na<sup>+</sup>) accumulation in leaf tissue as well as the ability of the olive to maintain an essential

potassium (K<sup>+</sup>)/Na<sup>+</sup> ratio (Chartzoulakis et al., 2002).

Salt stress inhibits photosynthesis in olive trees, attributable mainly to stomatal closure (Loreto et al., 2003) and salt ion accumulation (Melgar et al., 2008), whereas the ensuing limitation of CO<sub>2</sub> assimilation triggers the overreduction of the photosynthetic electron chain. As a reaction, to avoid photoinhibition, electron transfer along the photosynthetic chain is directed to oxygen acceptors other than water (Munns and Tester, 2008). This excessive reducing power prompts the production of reactive oxygen species (ROS) that triggers lipid peroxidation, DNA damage, inhibition of photosynthesis, and disturbance in mineral nutrient status (Cordovilla et al., 2014; Turan and Tripathy, 2012).

The accumulation of low-molecular-weight osmolytes such as carbohydrates and amino acids is a well-known adaptive mechanism in plants against saline stress (Iqbal et al., 2014; Munns and Tester, 2008). Moreover, it has been reported that proline protects higher plants against osmotic stress not only by facilitating the retention of water in the cytoplasm, but also by functioning as an oxygen radical scavenger and by displaying an antioxidant activity (Iqbal et al., 2014).

The fresh water scarcity in the Mediterranean basin for crop irrigation, the socioeconomic importance of cultivation olive, and the lack of studies comparing olive cultivars of less than a year in controlled conditions were

the leading decisive factors to carry out this research. In fact, olive plants of less than 1 year in the nurseries could be irrigated with saline water to help overcome water shortages. Therefore, the main aim of this study is to compare the salinity tolerance of six olive genotypes of great socioeconomic importance in the Mediterranean region. In an effort to elucidate the adaptive strategies of young olive plants to salinity salt accumulation (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) in roots and leaves, leaf concentration of photosynthetic pigments (chlorophylls, carotenoids), free amino acids, free proline, total soluble carbohydrates, total phenols, and total thiols were measured. Also, the effects of salinity on growth and gas exchange rates [net CO<sub>2</sub> assimilation rate and stomatal conductance (g<sub>s</sub>)] were assessed.

## Materials and Methods

### *Plant material and growth conditions.*

This study was conducted with five autochthonous Spanish cultivars (Casta Cabra, Cornicabra, Ocal, Picual, and Picudo) and one Italian cultivar (Frantoio). Uniform, 6-month-old rooted plants (Viveros Laserplant CB, Córdoba, Spain) were transplanted to 1.5-L pots containing a sand–perlite mixture (1:3, v/v). Plants were well established by watering three times per week with 100 mL of half-strength Hoagland’s solution (Hoagland and Arnon, 1950). After 4 weeks, salt treatments were started by daily applying 25 mM NaCl in the nutrient solution to reach the final NaCl concentration of 200 mM, whereas the salt-free control plant (0 mM) continued to receive only nutrient solution. The salinity treatments lasted 12 weeks, the experiment ending when the plants were 10 months old. The experimental design was a six × two factorial (six cultivars × two salt treatments) with six replicate plants in each treatment using a complete random design in a growth chamber with a 16–8-h light–dark cycle, 25 to 20 °C day–night temperature, relative humidity 55% to 75%, and photosynthetic photon flux density (400 to 700 nm) of 500 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>.

*Plant growth and leaf parameters.* At the end of the experiment, all plants were gently removed from the substrate, roots were washed with distilled water, and partitioned into different organs. After the measurement of fresh weight, shoot length, and total leaf area (LA) of each plant, roots, stems, and leaves were dried at 65 °C for 72 h in a forced-air oven and the dry weight (DW) was determined. LA was determined using the method established by Tattini et al. (1995). The area of each leaf was calculated according to the following regressions equations:

For ‘Casta Cabra’:

$$Y = 0.695X + 0.139 (r^2 = 0.980)$$

For ‘Cornicabra’:

$$Y = 0.732X - 0.061 (r^2 = 0.984)$$

For ‘Frantoio’:

$$Y = 0.641X + 0.383 (r^2 = 0.986)$$

Received for publication 13 May 2014. Accepted for publication 25 May 2014.

<sup>1</sup>To whom reprint requests should be addressed; e-mail mpilar@ujaen.es.

For 'Ocal':

$$Y = 0.662X + 0.257 (r^2 = 0.978)$$

For 'Picual':

$$Y = 0.639X + 0.304 (r^2 = 0.987)$$

For 'Picudo':

$$Y = 0.688X + 0.014 (r^2 = 0.986)$$

where Y is leaf area and X is the product length  $\times$  width.

The concentrations of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> in leaf and root were measured with an emission-absorption spectrophotometer (Perkin Elmer AAnalyst 800) after the tissue had been dry-ashed for 24 h at 450 °C and suspended in 37% HCl.

*Biochemical analysis.* Net CO<sub>2</sub> assimilation rate ( $P_n$ ) and  $g_s$  were measured at saturating

light photosynthetically active radiation greater than 800  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) on the youngest fully expanded leaves of six plants per treatment using a portable photosynthesis system (LI-COR 6400; LI-COR Inc., Lincoln, NE). Measurements were made between 1 and 4 h after the beginning of the photoperiod. Leaf sections were homogenized in 80% acetone (Arnon, 1949) for chlorophyll (Chl),

Table 1. Effects of salinity (0 or 200 mM NaCl) on shoot length, total dry weight (DW), root/shoot ratio (Rt/Sh), leaf area (LA), CO<sub>2</sub> assimilation rate ( $P_n$ ), stomatal conductance ( $g_s$ ), and photosynthetic pigments of six olive cultivars 12 weeks after saline treatments started.<sup>z</sup>

	Shoot length (cm/plant)	Total DW (g/plant)	Rt/Sh	LA (cm <sup>2</sup> /plant)	$P_n$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )	$g_s$ (mmol·m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup> )	Chl <sub>(a+b)</sub> (mg·g <sup>-1</sup> DW)	Car (mg·g <sup>-1</sup> DW)
Casta Cabra								
0	7.85 de	1.96 bc	0.33 g	77.11 d	11.12 a	157.23 b	3.90 b	0.86 b
200	2.98 e	0.87 f	0.97 d	25.73 e	8.92 b	24.50 d	1.91 ef	0.45 fg
Cornicabra								
0	31.60 a	3.06 a	0.45 f	122.15 ab	8.01 bc	120.88 bc	2.79 c	0.63 cd
200	7.20 de	1.31 ef	1.07 c	42.35 e	5.65 de	27.25 d	2.13 e	0.50 ef
Frantoio								
0	24.42 b	3.23 a	0.66 e	92.93 cd	11.31 a	270.02 a	2.95 c	0.66 c
200	9.54 d	1.71 cde	1.39 ab	31.80 e	4.87 de	64.89 cd	1.97 e	0.47 f
Ocal								
0	16.00 c	2.88 a	0.46 f	102.37 bc	7.64 bc	119.76 bc	2.71 cd	0.62 cde
200	3.47 e	1.02 f	1.30 b	20.38 e	4.33 de	18.29 d	2.17 e	0.52 def
Picual								
0	21.55 b	2.94 a	0.39 fg	136.00 a	8.60 b	160.03 b	4.70 a	1.02 a
200	6.12 de	1.43 def	1.05 cd	42.63 e	6.46 cd	15.71 d	2.03 e	0.49 f
Picudo								
0	5.86 de	2.04 b	0.69 e	74.09 d	8.81 b	128.69 bc	2.25 de	0.51 ef
200	3.10 e	1.10 f	1.41 a	25.83 e	5.34 de	20.42 d	1.41 f	0.34 g

<sup>z</sup>Values are mean of six replicates for shoot length, total DW, Rt/Sh, LA,  $P_n$ , and  $g_s$ , and four replicates for photosynthetic pigments. Within each column, means followed by the same letters are not significantly different at 5%.

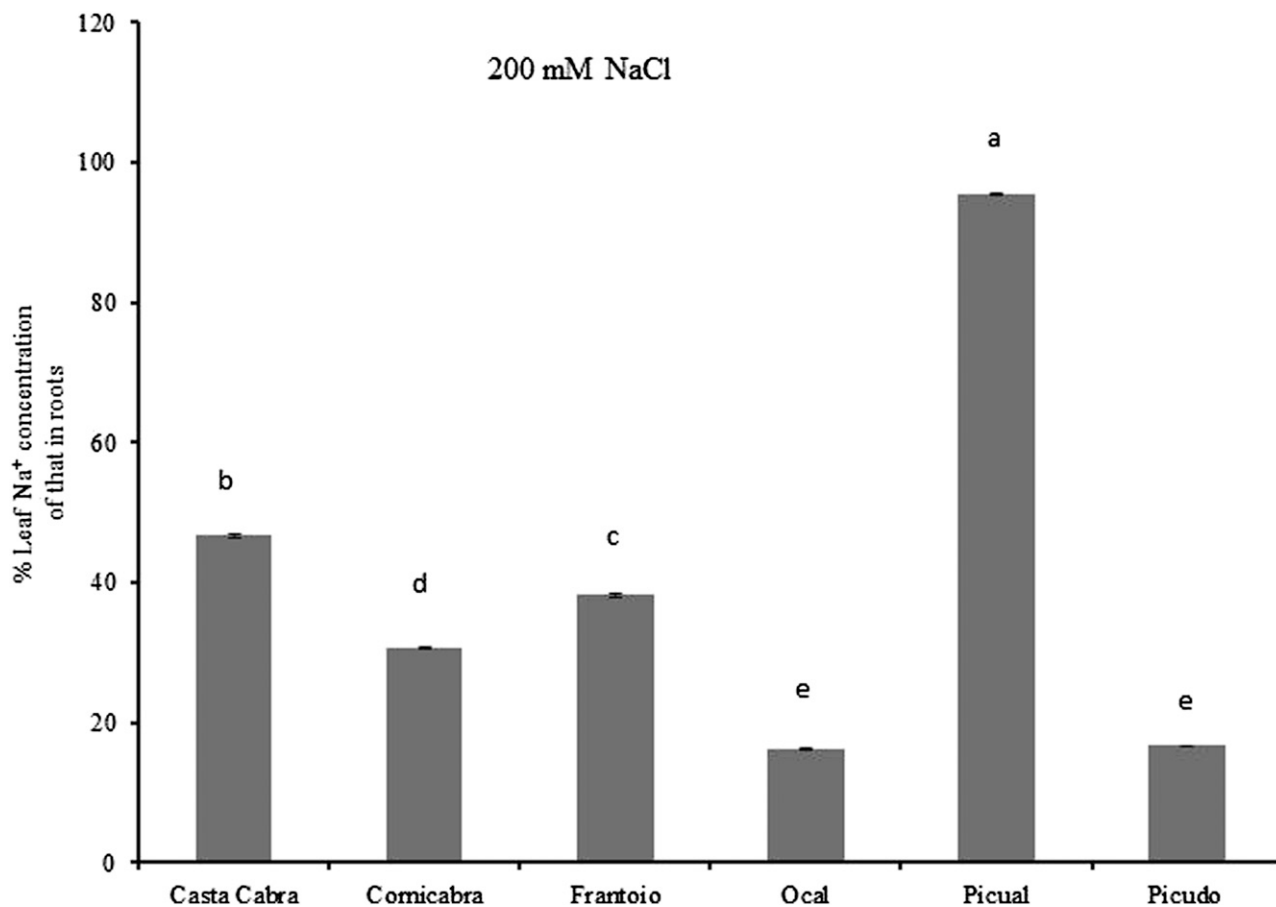


Fig. 1. Percentage of leaf sodium (Na<sup>+</sup>) concentration (percent dry weight) as compared with root sodium (Na<sup>+</sup>) concentration (percent dry weight) at 200 mM NaCl in the six cultivars investigated. Values are mean of three replicates. Bars marked with the same letter were not significantly different at 5%.



carotenoid, and phenol determination (Singleton and Rossi, 1965; Wellburn, 1994). Carbohydrate content was measured as described by Irigoyen et al. (1992). Free proline was quantified according to Bates et al. (1973) and free amino acids were estimated by using the method of Rosen (1957). Total thiol content (-SH) was assayed according to Ellman (1959) using 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid).

**Statistical analysis.** All data were subjected to a two-way analysis of variance (effects of cultivar and NaCl treatments as fixed factors with its interaction factor). Significantly different means were compared using Tukey's test ( $P < 0.05$ ). All calculations, including statistical analysis, were computed using IBM SPSS Statistics 19 (SPSS Inc., Chicago, IL).

## Results and Discussion

**Plant growth, leaf characteristics, and tissue mineral content.** The largest reduction in shoot length, total DW, and LA caused by salinity was detected in 'Ocal' (78%, 65%, and 80%, respectively) (Table 1). In contrast, shoot length was unaffected in 'Picudo' and 'Casta Cabra'. Furthermore, 'Picudo' showed the lowest inhibition in total DW and LA (46% and 65%, respectively) and the lowest increase in root/shoot (2.04-fold). However, according to Chartzoulakis (2005), salt tolerance in olive cultivars is associated with the effective mechanisms of ion exclusion and retention of saline ions in the root. In this regard,  $\text{Na}^+$  concentration in salinized plants increased more in the leaf than in roots in 'Cornicabra', 'Picual', 'Frantoio', and 'Casta Cabra' (21-fold), whereas in 'Ocal' and 'Picudo',  $\text{Na}^+$  concentration increased more in roots than in leaf. In addition, according to leaf  $\text{Na}^+$  concentration of that in root (Fig. 1), studied cultivars can be divided into three groups. The first one includes 'Picual', which showed similar concentration of  $\text{Na}^+$  in root and leaf. The second group includes cultivars that accumulated  $\text{Na}^+$  at high concentrations in root but increased  $\text{Na}^+$  concentration more in leaf than in root (Table 2). These cultivars are Casta Cabra, Cornicabra, and Frantoio, which showed a leaf  $\text{Na}^+$  concentration of 47%, 31%, and 38% of that in root, respectively. The third group includes 'Ocal' and 'Picudo', which are characterized by an important accumulation of  $\text{Na}^+$  in root and an important inhibition of translocation of this element to leaf. Therefore, among cultivars studied, 'Picudo' and 'Ocal' were the most salt-tolerant.

Under saline condition, the  $\text{K}^+$  concentration decreased in roots of all cultivars with 'Picudo' (46%) and 'Ocal' (50%) showing the lowest decrease (Table 2). In leaf, the strongest inhibition was detected in 'Picual' (51%), whereas 'Picudo' was unaffected. In addition, 'Ocal' and 'Picudo' showed the lowest decrease of  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  in leaf (88%), whereas 'Picual' registered the highest (98%). High leaf  $\text{K}^+$  concentration facilitates osmotic adjustment with relatively less energy expenditure than the accumulation of other compatible solutes like mannitol and glucose in olive trees (Tattini et al., 1995).

**Leaf gas exchange parameters.**  $P_n$  and  $g_s$  sharply declined in response to salinity (Table 1). The drop in  $g_s$  under saline stress may be an adaptive response to decreased water content. In this regard, Loreto et al. (2003) indicated that photosynthesis was indirectly limited by the lower water availability in salt-stressed olive trees with different sensitivity to salt stress. In addition, photosynthesis could be limited by non-optimal metabolic conditions caused by  $\text{Na}^+$  accumulation (Table 2). Similar results were reported by Kchaou et al. (2013) for other olive cultivars.

**Photosynthetic pigments and metabolites in leaves.** Cultivar Ocal did not significantly inhibit carotenoid content by salinity (Table 1). It has been well documented that carotenoids are involved in the protection of the photosynthetic apparatus against photoinhibitory damage by singlet oxygen, which is produced

by the excited triplet state of chlorophyll (Yazici et al., 2008). In fact, 'Ocal' was the cultivar that showed the lowest reduction in  $\text{Chl}_{(a+b)}$  content (20%). In contrast, 'Picual' showed the sharpest reduction in the carotenoid and  $\text{Chl}_{(a+b)}$  contents.

Salinity induced a decrease in total thiol concentration in 'Casta Cabra' (34%), 'Picual' (27%), 'Picudo' (22%), and 'Frantoio' (11%) (Table 3), probably as a result of the oxidation of non-protein -SH groups. Oxidative stress depletion on non-protein thiols enhances the susceptibility to membrane damage by lipid peroxidation and may trigger ROS irreversible negative effects on cellular function (Ali et al., 2005).

The soluble carbohydrate, amino acids, and proline in leaves were not increased by salinity in any cultivars (Table 3). In contrast, Ben Ahmed et al. (2011) reported proline accumulation by salinity in plants of 2 years

Table 2. Effects of salinity (0 or 200 mM NaCl) on sodium ( $\text{Na}^+$ ) and potassium ( $\text{K}^+$ ) content in leaf and root of six olive cultivars 12 weeks after saline treatments started.<sup>z</sup>

	Leaf (%)			Root (%)		
	$\text{Na}^+$	$\text{K}^+$	$\text{K}^+/\text{Na}^+$	$\text{Na}^+$	$\text{K}^+$	$\text{K}^+/\text{Na}^+$
Casta Cabra						
0	0.08 gh	1.96 a	25.76 c	0.75 f	1.69 c	2.25 d
200	1.67 b	1.36 e	0.81 f	3.58 b	0.44 g	0.12 e
Cornicabra						
0	0.03 i	1.38 de	50.37 a	0.81 e	3.58 a	4.39 b
200	1.11 c	1.01 f	1.10 f	3.63 b	0.57 f	0.16 e
Frantoio						
0	0.04 i	1.47 c	34.04 b	0.46 g	1.54 d	3.36 c
200	1.04 d	1.22 f	1.17 f	2.73 d	0.61 f	0.22 e
Ocal						
0	0.07 h	1.38 de	19.76 d	0.15 i	0.84 e	5.45 a
200	0.53 f	1.23 f	2.30 f	3.28 c	0.42 g	0.13 e
Picual						
0	0.09 gh	1.52 b	17.35 de	0.38 h	2.06 b	5.37 a
200	2.62 a	0.75 g	0.29 f	2.74 d	0.82 e	0.30 e
Picudo						
0	0.09 g	1.42 cd	15.02 e	0.39 h	1.67 c	4.21 b
200	0.84 e	1.43 c	1.70 f	5.03 a	0.90 e	0.18 e

<sup>z</sup>Values are mean of three replicates. Within each column, means followed by the same letters are not significantly different at 5%.

Table 3. Effects of salinity (0 or 200 mM NaCl) on soluble carbohydrates, free proline, free amino acids, total phenol, and total thiol concentrations of leaf of six olive cultivars 12 weeks after saline treatments started.<sup>z</sup>

	Soluble carbohydrates ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW)	Proline ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW)	Amino acids ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW)	Total phenol ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW)	Total thiol ( $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ DW)
Casta Cabra					
0	28.21 cdef	81.71 abc	185.50 ab	24.79 f	172.04 a
200	21.16 g	47.25 de	146.92 def	19.93 g	113.01 c
Cornicabra					
0	52.40 a	82.79 abc	175.38 abc	23.39 f	108.23 d
200	35.59 bcd	74.84 bc	119.57 fgh	25.08 f	108.04 d
Frantoio					
0	25.76 fg	56.20 cd	160.04 cde	32.55 d	103.58 e
200	25.71 fg	25.40 e	125.56 fg	41.37 a	92.59 g
Ocal					
0	44.33 ab	64.42 cd	99.68 gh	35.69 c	90.38 g
200	35.34 cd	75.18 bc	65.91 i	38.30 b	92.55 g
Picual					
0	31.61 cde	100.64 ab	198.63 a	14.67 h	145.02 b
200	27.17 def	103.75 a	137.17 ef	19.75 g	105.40 de
Picudo					
0	36.84 bc	70.56 cd	102.69 gh	33.96 cd	96.86 f
200	27.34 def	68.28 cd	91.38 hi	28.28 e	75.61 h

<sup>z</sup>Values are mean of four replicates. Within each column, means followed by the same letters are not significantly different at 5%. DW = dry weight.

of the salt-tolerant olive cultivar Chemlali. However, phenolic compound was increased in 'Picual' (34%), 'Frantoio' (27%), and 'Ocal' (7%) (Table 3). This is important because phenolic compounds can act as compatible organic solutes and as molecular antioxidants through their ability to destroy free radicals (Blokhina et al., 2003). A similar result was described by Remorini et al. (2009) for the olive cultivar Cipressino.

In conclusion, between the cultivars studied, 'Picudo' and 'Ocal' were the most tolerant. Those cultivars showed the most effective mechanism of ion exclusion and retention of saline ions in the root. In addition, 'Picudo' and 'Ocal' showed an ability to maintain the most appropriate  $K^+/Na^+$  ratio in actively growing tissues. In contrast, 'Picual' was the least salt-tolerant with a similar concentration of  $Na^+$  in root and leaf and the highest decrease of  $K^+/Na^+$  ratio in leaf. Furthermore, between the compatible osmolytes studied, only phenolic compounds were accumulated in 'Ocal' and 'Picual'.

#### Literature Cited

- Ali, M.B., E.J. Hahn, and K.Y. Paek. 2005. Effects of temperature on oxidative stress defense systems, lipid peroxidation and lipoxygenase activity in *Phalaenopsis*. *Plant Physiol. Biochem.* 43:213–223.
- Arnon, D.T. 1949. Copper enzyme in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24:1–15.
- Bates, L.S., R.P. Waldren, and I.D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline water stress studies. *Plant Soil* 39:205–207.
- Ben Ahmed, C., S. Magdich, B. Ben Rouina, S. Sensoy, M. Boukhris, and F. Ben Abdullah. 2011. Exogenous proline effects on water relations and ions contents in leaves and roots of young olive. *Amino Acids* 40:565–573.
- Blokhina, O., E. Virolainen, and K.V. Fagestedt. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Ann. Bot. (Lond.)* 91:179–194.
- Calero, J., M.P. Cordovilla, V. Aranda, R. Borjas, and C. Aparicio. 2013. Effect of organic agriculture and soil forming factors on soil quality and physiology of olive trees. *Agroecol. Sustain. Food Syst.* 37:193–214.
- Chartzoulakis, K., M. Loupassaki, M. Bertaki, and I. Androulakis. 2002. Effects of NaCl salinity on growth, ion content and  $CO_2$  assimilation rate of six olive cultivars. *Sci. Hort.* 96:235–247.
- Chartzoulakis, K.S. 2005. Salinity and olive: Growth, salt tolerance, photosynthesis and yield. *Agr. Water Mgt.* 78:108–121.
- Cordovilla, M.P., M. Bueno, C. Aparicio, and M. Urrestarazu. 2014. Effects of salinity and the interaction between *Thymus vulgaris* and *Lavandula angustifolia* on growth, ethylene production and essential oil contents. *J. Plant Nutr.* 37:875–888.
- Demiral, M.A. 2005. Comparative response of two olive (*Olea europaea* L.) cultivars to salinity. *Turk. J. Agr. For.* 29:267–274.
- Ellman, G.L. 1959. Tissue sulphhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82:70–77.
- Hoagland, D.R. and S. Arnon. 1950. The water culture method for growing plants without soil. *Calif. A.E.S. Bull.* 374:1–39.
- International Olive Oil Council. 2003. The world olive oil market. *Olivae* 97:19–21.
- Iqbal, N., S. Umar, N.A. Khan, and M.I.R. Khan. 2014. A new perspective of phytohormones in salinity tolerance: Regulation of proline metabolism. *Environ. Expt. Bot.* 100:34–42.
- Irigoyen, J.J., D.V. Emerich, and M. Sanchez-Diaz. 1992. Water stress induced changes in concentration of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*). *Physiol. Plant.* 84:55–60.
- Kchaou, H., A. Larbi, M. Chaieb, R. Sagardoy, M. Msallem, and F. Morales. 2013. Genotypic differentiation in the stomatal response to salinity and contrasting photosynthetic and photoprotection responses in five olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Sci. Hort.* 160:129–138.
- Loreto, F., M. Centritto, and K. Chartzoulakis. 2003. Photosynthetic limitations in olive cultivars with different sensitivity to salt stress. *Plant Cell Environ.* 26:595–601.
- Melgar, J.C., J.P. Syvertsen, and F. García-Sánchez. 2008. Can elevated  $CO_2$  improve salt tolerance in olive trees? *J. Plant Physiol.* 165:631–640.
- Munns, R. and M. Tester. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 651–681.
- Remorini, D., J.C. Melgar, L. Guidi, E. Delg'Innocenti, S. Castelli, M.L. Traversi, R. Massai, and M. Tattini. 2009. Interaction effects of root-zone salinity and solar irradiance on the physiology and biochemistry of *Olea europaea*. *Environ. Expt. Bot.* 65:210–219.
- Rosen, H. 1957. A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. *Arch. Biochem. Biophys.* 67:10–15.
- Singleton, V.L. and J.A. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic and acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.* 16:144–158.
- Tattini, M., R. Gucci, M.A. Coradeschi, C. Ponzio, and J.D. Everard. 1995. Growth, gas exchange and ion content in *Olea europaea* plants during salinity stress and subsequent relief. *Physiol. Plant.* 95:203–210.
- Turan, S. and B.C. Tripathy. 2012. Salt and genotype impact on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in two rice cultivars during detoliation. *Protoplasma* 250:209–222.
- Weissbein, S., Z. Wiesman, Y. Ephrath, and M. Silberbush. 2008. Vegetative and reproductive response of olive cultivars to moderate saline water irrigation. *HortScience* 43:320–327.
- Wellburn, A.R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Plant Physiol.* 144:307–313.
- Yazici, I., I. Türkan, A.H. Sekmen, and T. Demiral. 2008. Salinity tolerance of purslane (*Portulaca oleracea* L.) is achieved by enhanced antioxidant system, lower level of lipid peroxidation and proline accumulation. *Environ. Expt. Bot.* 61:49–57.