



---

**OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE PLANTAS DE OLIVO  
TOLERANTES A LA SALINIDAD MEDIANTE EMPLEO DE  
MÉTODOS BIOTECNOLÓGICOS**

**JAVIER TRONCOSO MENDOZA**

**SEVILLA, 2007**



**OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE PLANTAS DE OLIVO  
TOLERANTES A LA SALINIDAD MEDIANTE EMPLEO DE  
MÉTODOS BIOTECNOLÓGICOS**

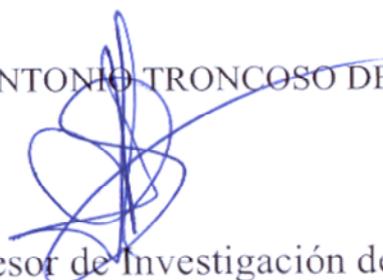
Memoria presentada por el licenciado D. Javier Troncoso Mendoza para optar al grado  
de Doctor en Biología



Sevilla, Julio de 2007

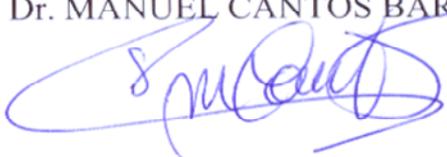
**DIRECTORES**

Dr. ANTONIO TRONCOSO DE ARCE



Profesor de Investigación del CSIC.

Dr. MANUEL CANTOS BARRAGÁN



Científico Titular del CSIC.

TUTOR

  
Dr. NICOLAS BELLINFANTE CROCCI

Profesor Titular del Dpto. de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola de la  
Universidad de Sevilla.



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar al Dr. D. Luís Clemente Salas Director del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (CSIC), a todo su personal y especialmente a D. Jesús Prieto la posibilidad de realizar el presente trabajo en este centro.

A los directores de la tesis Dr. D. Antonio Troncoso de Arce y Dr. D. Manuel Cantos Barragán, su tiempo y dedicación ha hecho posible esta tesis.

Al Dr. D. Nicolás Bellinfante Crocci Tutor de la Tesis por sus acertadas opiniones y consejos sobre la realización del trabajo.

Al Dr. D. José Luís García Fernández, al Dr. D. Alfredo Rubio Casal y a la Dra. D<sup>a</sup> Hava Rapoport por sus aportaciones inestimables en la realización del trabajo así como por su amistad.

A D<sup>a</sup>. Juana Liñán Benjumea por su colaboración en la realización.

A D<sup>a</sup>. Asunción Castro, D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Carmen Grande, D<sup>a</sup> María del Mar Parra, y demás compañeros del Departamento por su amistad y colaboración.

Al Dr. D. Juan Carlos Rubio García, Director del Paraje Natural Marismas del Odiel y a D. Enrique Sánchez Gullón, Agente de Medio Ambiente del Paraje Natural por su inestimable ayuda y facilitar la realización del trabajo en el Paraje.

Especialmente a María García por animarme a continuar en los momentos difíciles.



## **INDICE**

<b>I. INTRODUCCION GENERAL</b>	<b>11</b>
I.1    EL OLIVO	11
I.2.    SALINIDAD	20
I.2.1.    EFECTOS DE LA SAL SOBRE LAS PLANTAS	24
I.3.    CULTIVO IN VITRO	31
I.3.1    CONCEPTOS GENERALES	31
I.3.2    CULTIVO DE EMBRIONES CIGÓTICOS.	35
I.3.3    OBTENCIÓN DE EMBRIONES ADVENTICIOS.	38
I.3.4.    VARIACIÓN SOMACLONAL	39
<b>II. CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE LAS PLANTAS MADRES</b>	<b>45</b>
II.1    INTRODUCCIÓN	45
II.2    MATERIALES Y MÉTODOS	46
II.2.1.    ELECCION DE LAS ZONAS DE ESTUDIO	46
II.2.2    TOMA DE MUESTRAS DE SUELO	49
II.2.3.    PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS MUES- TRAS DE SUELO.	49
II.2.3.1 Preparación del extracto de saturación	49
II.2.3.2.Determinación del pH	50
II.2.3.3.Determinación de la conductividad eléctrica (C.E.)	50
II.2.3.4. Determinación del sodio y potasio solubles	50
II.2.3.5. Determinación del cloro.	50
II.2.3.6. Determinación del fósforo disponible.	50
II.2.3.7. Determinación de la materia orgánica oxidable	51
II.2.3.8. Determinación del carbonato cálcico	51
II.2.3.9. Determinación del calcio y magnesio solubles	51

II.2.3.10. Determinación del nitrógeno	51
II.2.4 MATERIAL VEGETAL	51
II.2.5. TOMA DE MUESTRAS DE HOJAS	52
II.2.6. TOMA DE MUESTRAS DE RAÍCES	52
II.2.7. DETERMINACIONES ANALÍTICAS DEL MATERIAL VEGETAL	52
II.2.7.1.Preparación de las muestras	52
II.2.7.2.Determinación de Na, Ca, P, Mg, K, Fe, Mn y Zn	53
II.2.7.3. Determinación de nitrógeno	53
II.2.7.4. Determinación de boro	53
II.2.7.5. Determinación de cloro	53
II.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
II.3.1 CARACTERES EDAFICOS DE LA ZONA “RABOCONEJO”	55
II.3.1.1 Características de Fertilidad del Suelo en La Época Estival (seca).	59
II.3.1.2. Caracteres de Fertilidad del Suelo en la Época Invernal (húmeda).	64
II.3.1.3. Las plantas	65
II.3.1.3.1. Distribución en el terreno y estado de nutrición de las raíces del olivo en el periodo estival (seco).	67
II.3.1.3.2. Estado de nutrición de las plantas de olivo de la zona “Raboconejo” en el período húmedo.	72
II.3.2. “LAGOLARGO” (ESTEROS DE SAN FERNANDO, PARQUE NATURAL BAHÍA DE CÁDIZ)	74
II.3.2.1 Fertilidad del suelo de la zona “LAGOLARGO” (Esteros de	

San Fernando), en la estación seca.	77
II.3.2.2 Fertilidad del suelo de la Zona “LAGOLARGO” (Esteros de San Fernando) en la estación húmeda.	79
II.3.3. LAS PLANTAS DE “LAGOLARGO” (ESTEROS DE SAN FERNANDO, CÁDIZ).	80
II.3.3.1. Distribución de raíces en el suelo de los olivos de LAGOLARGO (esteros de San Fernando, Cádiz) en el período seco.	81
II.3.3.2. Estado de Nutrición de las Plantas de Olivo de Lagolargo (Esteros de San Fernando, Cádiz) en el periodo seco.	82
II.3.3.3. Estado de Nutrición de las Plantas de Olivo de “Lagolargo” (Esteros de San Fernando, Cádiz) en el período húmedo.	84
<b>III. GERMINACION IN VITRO DEL EMBRIÓN DE OLIVO. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE SAL (NaCl) EN EL MEDIO DE CULTIVO</b>	87
III.1 INTRODUCCIÓN	87
III.2. MATERIAL Y MÉTODOS	90
III.2.1 1ª PRUEBA: DESARROLLO Y GERMINACIÓN <i>IN VITRO</i> DE EMBRIONES CIGÓTICOS DE OLIVO.	90
III.2.2 2ª PRUEBA: OBTENCIÓN Y PROPAGACIÓN DE EMBRIONES ADVENTICIOS (SOMÁTICOS).	95
III.2.3 3ª PRUEBA: SELECCIÓN <i>IN VITRO</i> DE CLONES DE OLIVO TOLERANTES A LA SAL (NaCl).	97
III.2.4. TRATAMIENTOS ESTADÍSTICOS.	99
III. 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	100
III.3.1 1ª PRUEBA.- DESARROLLO Y GERMINACIÓN <i>IN VITRO</i> DE EMBRIONES CIGÓTICOS DE OLIVO.	100
III.3.2 2ª PRUEBA.- OBTENCIÓN Y GERMINACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS.	107
III.3.3 3ª PRUEBA: SELECCIÓN <i>IN VITRO</i> DE CLONES DE OLIVO TOLERANTES A LA SAL.	109

<b>IV. COMPORTAMIENTO ANTE LA SAL EN CONDICIONES EXTERNAS (Cámara de cultivo) DE ALGUNOS CLONES SELECCIONADOS “<i>in vitro</i>”.</b>	125
IV. 1. INTRODUCCION	125
IV. 2. MATERIAL Y MÉTODOS	127
IV.2.1 PRUEBA 1	127
IV.2.2. PRUEBA 2	128
IV.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	130
IV.3.1. PRIMERA PRUEBA 1	130
IV.3.2 SEGUNDA PRUEBA	145
<b>V. ESTUDIO DE MARCADORES RELACIONADOS CON LA SALINIDAD</b>	159
V.1 INTRODUCCIÓN	159
V.2. MATERIAL Y MÉTODOS	165
V.2.1. NIVELES DE NaCl EN LA PLANTA	165
V.2.2. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS	165
V.2.3. FOTOSINTESIS	166
V.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	167
V.3.1. NIVELES DE NaCl EN LAS PLANTAS	167
V.3.2. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS	172
V.3.3. FOTOSÍNTESIS	174
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	185
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	189

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

### I.1 EL OLIVO

El olivo ha estado y está presente en la evolución de la cultura mediterránea. Junto con la palmera datilera, la higuera y la vid, forma parte de los árboles de fruto más característicos y antiguos del Mediterráneo. Pero a diferencia de aquellos, que fundamentalmente proporcionan alimento, el olivo además regala al hombre medicamentos, ungüentos, perfumes, lubricantes, condimentos, luz, calor, madera y alimento para el ganado. Si a esto, se une su gran rusticidad que permite cultivarlo en suelos pobres y áridos, es fácil comprender porqué se ha considerado como el verdadero árbol de la vida y la primera planta entre todas, “*Olea, quae prima omnium arborum est, (Columela)*”, y se ha elevado a símbolo divino.

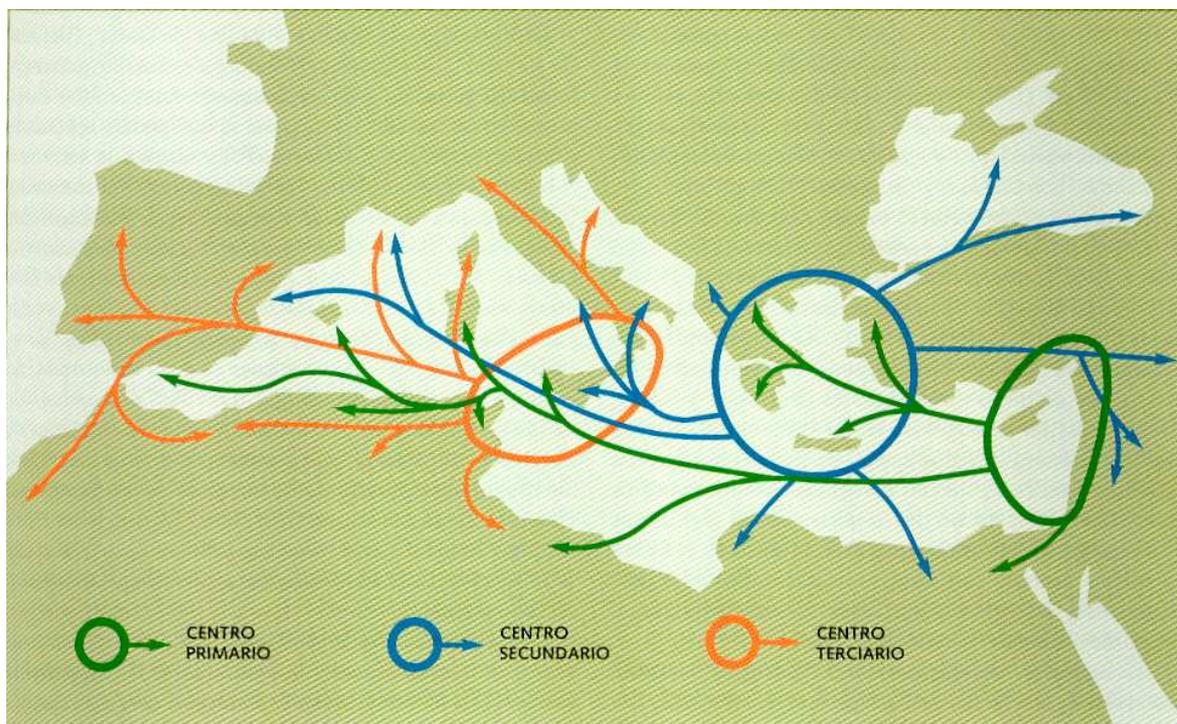
Existen datos de la presencia del olivo desde la prehistoria. Así, en Menton (Francia) se encontraron semillas de olivo correspondientes al Paleolítico (35000-8000 años a.C.). En la península Ibérica y en Italia se descubrieron fósiles de olivo correspondientes al Neolítico (8000-2700 años a.C.). También en Italia (Lago de Garda) e Israel (Figura I.1) otros fósiles han demostrado el uso del olivo por el hombre durante la edad de bronce.



*Figura I.1. Rodillos de piedra, de la Edad de Bronce II, procedentes de Tel Beit Mirsim (Israel). (Enciclopedia Mundial del Olivo, 1996).*

No obstante, el gran comercio del aceite de oliva y su simbología religiosa y social, aparece en las grandes civilizaciones del Mediterráneo Oriental (Figura I.2). El código de Hammurabi regulaba la producción y el comercio del aceite de oliva en la

llamada media luna fértil (entre los ríos Eufrates y Tigris).



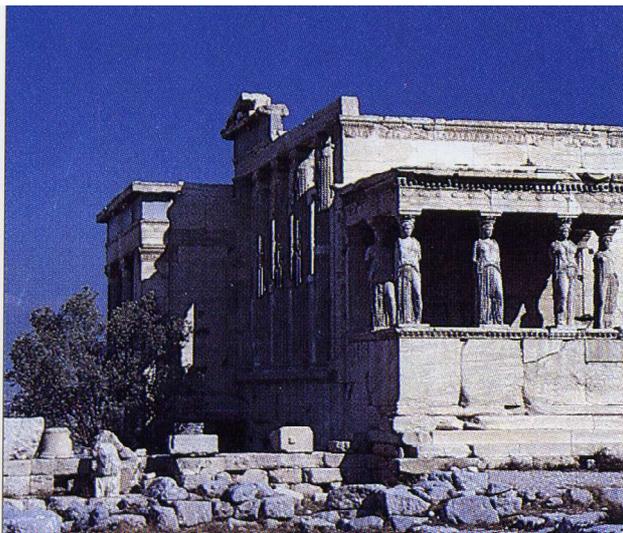
*Figura I.2 Distribución del comercio del aceite de oliva en el mediterráneo.*

En el Nilo, se comerciaba con aceite de oliva antes de la XIX dinastía (1292-1186 a.C.) y este producto se usaba en los embalsamamientos. Si el cuerpo no estaba untado con aceite de oliva no podía ser recibido por los dioses. Según los egipcios, fue la diosa Isis (esposa de Osiris) quien enseñó a los hombres a cultivar el olivo. Ramos de olivo adornaban las tumbas de los faraones como símbolo de vida y fecundidad en el más allá. En la tumba de Tutancamon se encontraron vasos cretenses para el transporte del aceite y guirnaldas hechas con ramos de olivo y otras flores. En la biblioteca de Alejandría se encontró un documento en el que estaba escrita la siguiente oración al dios Ra (el sol) padre de todos los dioses: *“He plantado olivos en los jardines de tu ciudad de Heliopolis y con su aceite tengo viva la lámpara de tu palacio”*. Claramente, aunque Egipto no fue un gran productor de aceite, dio a este producto y al árbol, un carácter sagrado. Otros pueblos del medio-oriente como hititas, fenicios, sirios, etc., también cultivaron el olivo, comercializaron su aceite y con ello contribuyeron a su difusión hacia occidente. No obstante, fueron los griegos quienes mayor desarrollo dieron al cultivo y comercio del olivo (Figura I.2). En este sentido se pueden considerar dos

grandes períodos: el minoico-cretense (5000-1400 a.C.) y el greco-micénico (1500-400 a.C.). La olivicultura y el comercio del aceite fue la base de la economía cretense. En el palacio de Knossos existe un célebre friso con pinturas relativas al cultivo del olivo, con unos 3500 años de antigüedad. En dicho lugar, se descubrieron además ánforas gigantescas para almacenar el aceite, tablillas de arcilla con escritos relativos al olivar, e incluso un tratado magistral que indica lugares de producción, exportación y división del aceite por calidad, según se hubiese extraído directamente del fruto por presión, o a partir del orujo con agua caliente.

Los atenienses siguieron la tradición cretense del cultivo del olivo y del uso y exportación de su aceite. Como otros pueblos orientales también dieron a esta planta un gran simbolismo divino y por ende, social. Surgió una discusión entre Poseidón (dios del mar) y Palas-Atenea (diosa de la sabiduría y de la paz) para ver quién hacía más méritos para fundar una ciudad en el Ática. Poseidón hincó su tridente en el monte del Partenón y surgió una fuente de agua cristalina que originó un bello lago (otros dicen que creó un caballo más veloz que el viento). Palas Atenea plantó un pequeño ramo que dio lugar a un árbol, un olivo, para que sus frutos beneficiaran a los hombres. El jurado de dioses presidido por Zeus, fue unánime al declarar vencedora a la diosa y ofrecerle el premio de fundar la ciudad de Atenas. Este olivo fue identificado después con el existente en el Partenón, venerado por los atenienses y que servía para confeccionar las guirnalda de los héroes. Píndaro en sus Odas Olímpicas, también indica que el aceite de los olivos del Partenón se utilizaba como premio a los vencedores de los Juegos Panateneos. Estos olivos del Partenón (Figura I.3) se consideraban tan importantes que existía un grupo responsable de su cuidado y estaba prevista la pena de muerte para aquellos que los dañaran.

Atenas transmitió a Roma el simbolismo religioso y social del olivo. Además de la influencia griega, Roma también incorporó de otros pueblos, como sus enemigos los cartagineses, ventajas del uso del aceite de oliva. Polibio cuenta que los romanos perdieron frente a Aníbal la batalla de Trevia porque los cartagineses llevaban todo el



*Figura I.3 Olivo en las proximidades del Partenón. (Enciclopedia Mundial del Olivo, 1966)*

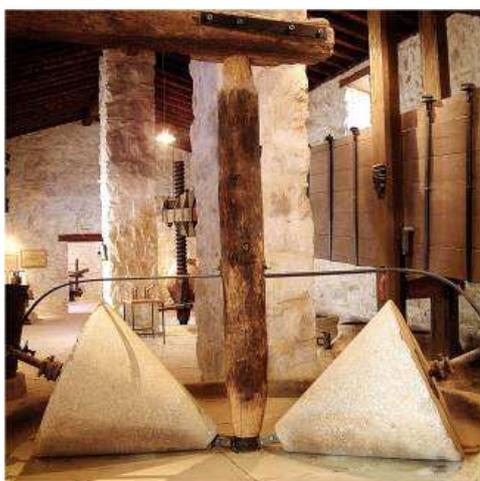
cuerpo untado de de aceite lo que les permitió soportar mejor el frío, mientras que los romanos que aún no conocían esta técnica casi ni pudieron empuñar las armas. Los romanos, aprovechando su gran imperio y los conocimientos previos de otros pueblos, fueron los que mayor impulso dieron al cultivo del olivo y al comercio del aceite (Figura I.4). Parece increíble el gran desarrollo obtenido en el cultivo del olivo y preparación del aceite durante el dominio de Roma. Autores como Paladio, Virgilio, Plinio, Catón y en especial el gaditano Columela, establecen en sus escritos unas normas en cada uno de los aspectos (suelos, propagación, poda, enfermedades, recolección, etc.) del cultivo de esta planta que pueden ser válidas en la actualidad. Moliendo las aceitunas entre dos piedras planas, la superior giratoria, algo separadas,



*Figura I.4. Ánfora para el transporte de aceite en la época romana. (Enciclopedia Mundial del Olivo, 1996)*

afectaban sólo a la pulpa dejando el hueso (semilla) intacto, con lo que llegaron al refinamiento de producir aceite sólo de fruto. Hasta la actualidad, no se vuelve a obtener aceite de estas características.

Con la invasión de los pueblos bárbaros (más ganaderos que agricultores y consumidores de grasas animales) y la caída del imperio romano, decae el cultivo y comercio de olivo, que sólo se mantiene gracias a su simbolismo religioso en los campos y jardines de algunos monasterios. Después, durante el Renacimiento en Italia y la dominación árabe en España de nuevo renace el cultivo del olivo y la obtención de aceite. (Figura I.5)



*Figura I.5 Piedra de molino de aceite*

Los árabes del Al-Andalus prestaron especial atención a la influencia del riego en la producción del olivar. Es de destacar un sistema de irrigación inventado por ellos, que daba muy buenos resultados con gran ahorro de agua. Enterraban en círculo alrededor del árbol, varios cántaros o ánforas de barro muy poroso, dejando fuera sólo la boca para llenarlos y rellenarlos con agua. Las raíces tomaban la humedad y con ella los nutrientes de las paredes de los cántaros y zonas próximas del terreno con lo que mejoraban la producción y calidad de la cosecha. Este ingenioso método, recuerda bastante a los sistemas de irrigación más modernos.

El olivo también tiene un gran significado en la religión y en la cultura cristiana. El cristianismo, aunque prohibió el culto pagano a los árboles, mantuvo el simbolismo del olivo. De una parte incorporó muchas de las tradiciones greco-romanas referentes a dicho árbol y por otra, al asumir la Biblia como libro sagrado, admitió las referencias allí recogidas. El libro del Génesis también da un carácter divino al origen del olivo: “Adán, cercano a la edad de 930 años, sintiendo cercana la muerte, recordó a Yavé que

se le había prometido el aceite de la misericordia. Así, mandó a su hijo Set a buscarlo al Edén. Una vez llegado, Set encontró un ángel que le dio tres semillas para que las pusiese, al morir, entre los labios de Adán y fuese enterrado con ellas. De la sepultura del primer hombre nacieron tres plantas, el cedro, el ciprés y el olivo”. También el Génesis relata el diluvio universal, que termina cuando una paloma lleva a Noé al Arca, un ramo de olivo fresco, símbolo de paz y esperanza: “Al atardecer, la paloma volvió al Arca, llevando en su pico un ramo fresco de olivo”. En el Deuteronomio se dice: “Tomarás posesión de los pozos aunque no los hayas excavado y de las viñas y olivos aunque no los hayas plantado”. En las Sagradas Escrituras el olivo representa a los justos (salmo 54,10) al pueblo elegido (Jeremías 11,16) a la sabiduría (Eclesiastés 24,19). El aceite de oliva ungía a los elegidos de Yavé (reyes, sacerdotes). El rey David fue el ungido por el Señor.

El Nuevo Testamento recoge también esta predilección por el olivo y su aceite. La palabra Cristo tiene el significado de “El Ungido”. Jesús es recibido en Jerusalén con ramos de olivo y palmas y pasa sus últimos momentos en Getsemaní entre olivos. Es decir, el olivo también tiene un fuerte carácter religioso en el cristianismo. En la actualidad, los sacerdotes y obispos son ungidos con aceite de oliva y los fieles en general asocian con este producto los dos acontecimientos más importantes de sus vidas. El nacimiento, con el bautismo y la muerte con la extremaunción.

Uniendo leyendas con historia, se ha pretendido demostrar la vinculación del olivo en la cultura mediterránea, y considerarlo como su símbolo por excelencia. Son muy numerosas las sugerencias espirituales, artísticas y literarias ligadas a esta planta que han hecho del Mare Nostrum el mayor foco de cultura de la humanidad.

Algunos autores indican que existió un desarrollo del olivo cultivado desde el Mediterráneo Oriental al Occidental unido a la expansión de los distintos pueblos colonizadores que siguieron ese itinerario (Figura I.2). La semilla, por su resistencia y fácil transporte, fue el principal medio utilizado en la proliferación del olivo (Lavee, 1994). No obstante, al ser el olivo una planta autóctona del bosque mediterráneo (Figura I.6) y, en consecuencia existir dentro de esta área climática antes de la aparición del hombre, es muy posible que tanto los pueblos indígenas como los colonizadores utilizaran el fruto del olivo de las poblaciones selváticas autóctonas y a partir de ellas seleccionaran y propagaran las plantas de mejor calidad. La presencia de variedades muy distintas entre unos países y otros e incluso dentro de un mismo país, puede avalar la importancia de esta segunda posibilidad de evolución del cultivo del olivo. En

consecuencia, debido a un mayor grado de civilización de los pueblos del mediterráneo oriental (próximo oriente) el cultivo del olivo se inició en dicha zona, por selección de variedades silvestres, y desde ahí se expandió al resto de la cuenca por introducción de dicho material seleccionado y/o mejor y más fácil por selección *in situ* de plantas silvestres aborígenes.

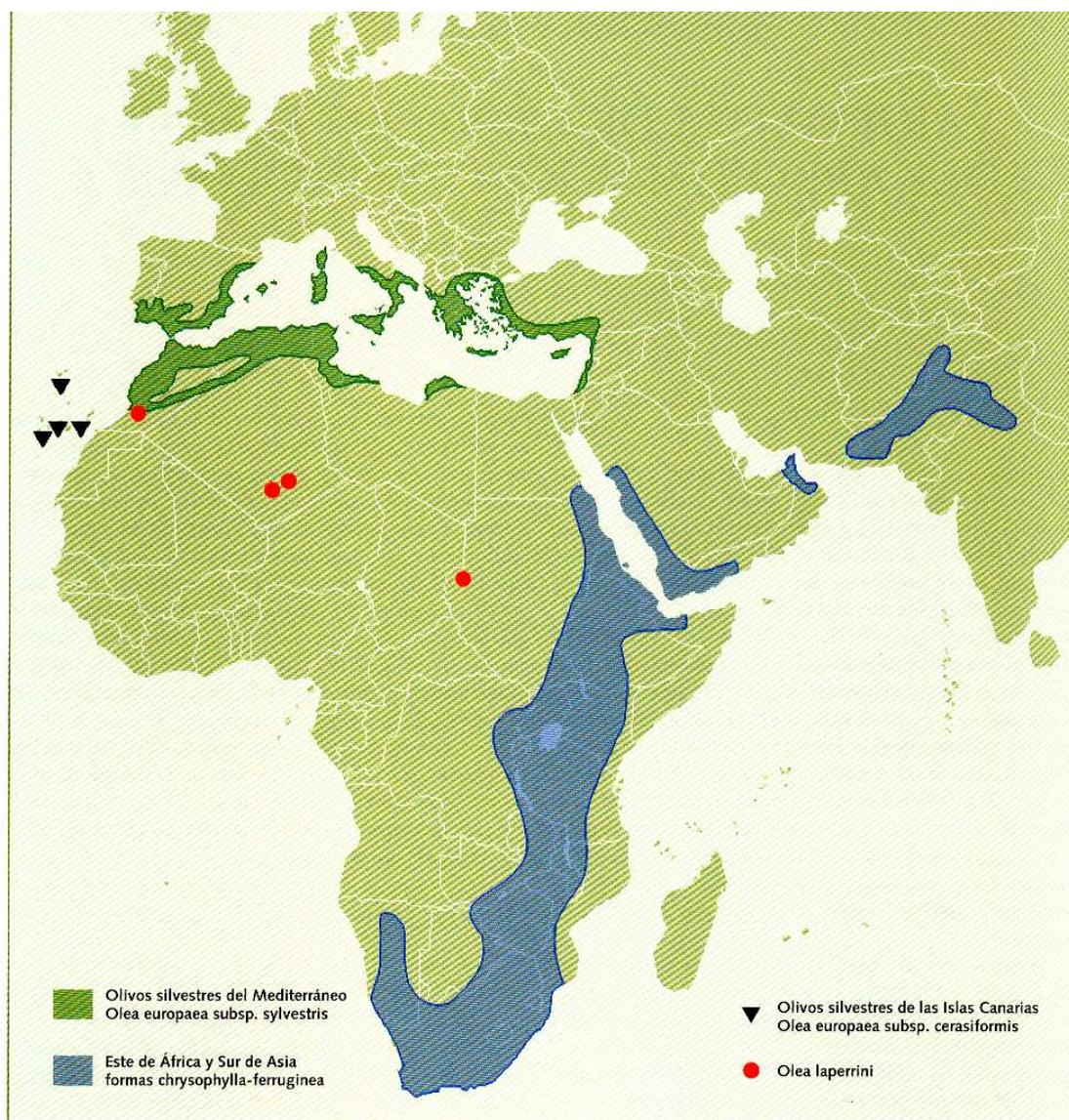


Figura I.6. Distribución mundial de olivos silvestres antecesores del olivo cultivado.

Con posterioridad, los colonizadores españoles expandieron el olivo en América tanto del Sur como del Norte, y en este caso, al no existir como planta autóctona en ese continente, se trató tanto de una introducción de una nueva especie, como de un desarrollo del cultivo. En la actualidad y en coincidencia con un fuerte incremento del comercio del aceite de oliva debido a su valor nutritivo y sobre la salud humana, el

cultivo del olivo está tanto en los países donde ya se cultivaba, como en nuevos en los que se ha introducido como especie foránea.

En cuanto a sus caracteres botánicos, en la Tabla 1.I se indica la clasificación sistemática del olivo.

Tabla 1.I Clasificación sistemática del olivo

Clase	<i>Magnoliópsida</i>
Subclase VI	<i>Asteridae</i>
Orden 6	<i>Scrophulariales</i>
Familia	<i>Oleaceae</i>
Subfamilia	<i>Oleoideae</i>
Tribu	<i>Oleae</i>
Género	<i>Olea L.</i>
Especie	<i>Olea europaea L.</i>
Subespecie	<i>Olea europaea L. subsp. sativa</i> Hoff. Et link, <i>Olea europaea L. subsp. oleaster</i> Hoff. Et Link= <i>O. europaea L. subsp. sylvestris</i> Miller

La Familia Oleaceae, única en el Orden *Scrophulariales* (Cronquist, 1981), está compuesta principalmente por árboles y arbustos. Muchos de ellos producen aceites esenciales en sus flores o frutos, algunos de los cuales son utilizados por el hombre. Se divide en las Subfamilias *Oleoideae* y *Jasminoideae* (Engler, 1964). Algunos autores mantienen que la Familia consta de más de 30 géneros, en los que se estiman unas 500 ó 600 especies distribuidas a lo largo de las regiones templadas y tropicales del planeta (Figura I.6) (Cronquist, 1981; Rugini y Fedeli, 1990). Estos géneros incluyen plantas ornamentales y otras de importancia en agricultura como *Fraxinus* (fresno), *Jasminum* (jazmín), *Ligustrum* (aligustre), *Phillyrea* (agracejo), *Syringa* (lilo) y *Olea* (olivo) (Heywood, 1978). El género *Olea* tiene unas 35 especies, entre las que se encuentran los olivos cultivados y los acebuches u olivos silvestres (*Olea europaea L.*). Hay diferencias de opinión sobre su subclasificación pero generalmente se considera que los olivos cultivados pertenecen a la subespecie *sativa* y los olivos silvestres a la subespecie *sylvestris*. *O. europea L. subsp. sativa* es extremadamente heterocigótica (Dionigi,

1973, Zohary y Hopf, 1988), y presenta una demostrada variabilidad. Se han descrito o citado unas 1300 cultivares por todo el mundo (Bartolini et al., 1998). La subespecie *sylvestris* (*oleaster*) crece espontáneamente en la vegetación Mediterránea, formando junto al algarrobo (*Ceratonia siliqua*), lentisco (*Pistacia lentiscus*) y el enebro (*Juniperus oxycedrus*) zonas de matorral denso (Pavari, 1932). Pignatti (1982), enclava al *oleaster* ya en el Plioceno en islas italianas, y lo identifica como originario de Cerdeña.

La relación entre los olivos silvestres y los cultivados ha sido siempre un problema complejo. De hecho, la cuestión sobre la formación espontánea o derivación genética entre olivos cultivados y silvestres aún se encuentra sin respuesta. De acuerdo con algunos autores (Caruso, 1870; Cantoni, 1882), formas de *O. europea* L. subsp. *oleaster* (acebuches) probablemente dieron origen a *O. europea* L. subsp. *sativa* (olivos cultivados). Otros autores defienden la teoría de la derivación espontánea de algunos olivos silvestres, a partir de olivos cultivados (Candolle, 1883; Ciferri, 1950). Estudios posteriores hablan de una distinción botánica entre ambas formas, llegándose a definir dos especies diferentes (Navarria, 1959). Pignatti (1982) apoya la teoría de que existe una clara diferencia genética entre los olivos silvestres y los cultivados, pero no argumenta sobre si la procedencia del *oleaster* es independiente o derivada de los olivos cultivados. Según Zohary Hopf, (1988) y Zohary, (1994), los árboles cultivados están relacionados con las formas silvestres. Ambos son fértiles entre sí, y se independizaron por hibridación espontánea. De acuerdo con estos autores, puede ser errónea la hipótesis de la existencia de dos especies independientes, como sostuvieron otros autores (Campbell, 1911; Navarria, 1959), y defienden por tanto que las afinidades genéticas y morfológicas entre las formas cultivadas y las silvestres hacen posible considerar a *oleaster* como el “tipo silvestre” de las formas cultivadas clasificándolo dentro de la especie *O. europaea* como una subespecie (subespecie *oleaster* Hoffm. y Link) o como una variedad (var. *Sylvestris* Miller= var. *oleaster* DC.).

Ciferri (1942), encuentra que el Género *Olea* se distribuye en tres áreas geográficas (Afro-Mediterránea, Indochina-Malasia, Natal-Madagascar). La especie *Olea europaea* L. es la única del Género *Olea* que puede encontrarse en el área Mediterránea (Zohay y Hopf, 1994) y la única del género con fruto comestible (Barranco et al., 1997).

Muchas plantas de la Familia *Oleaceae* tienen propiedades medicinales, entre las que se encuentran *Olea europaea* L, *Chionanthus virginiana* L., *Syringa vulgaris* L.,

*Fraxinus ornus L., Fraxinus excelsior L. y Phillyrea angustifolia L.* (Bartolini, 2002).

## I.2. SALINIDAD

Se definen como suelos salinos aquellos que presentan contenidos elevados de sales solubles, por lo que la salinización de una zona se mide por la concentración de dichas sales. El exceso de diversos iones es capaz de disminuir el desarrollo de las plantas (Grattan y Grieve, 1992) produciendo un descenso de rendimiento y calidad en los cultivos, lo que se traduce en pérdidas económicas. A la vez, convierte las tierras en improductivas, con su consiguiente abandono y desertización (Royo y Aragües, 1989). Los principales iones responsables de la salinidad del terreno son  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  y su presencia se puede deber a minerales de la propia roca madre, paso de agua salina subterránea, riegos con agua salada o intrusión de agua de mar en áreas costeras.

La salinidad de origen geológico como la existencia de rocas sedimentarias con altos contenidos en sales, es la menos frecuente y ocurre principalmente en zonas semiáridas y áridas del mundo (Greenway y Munns, 1980; Tanji, 1990).

En la salinización del suelo por presencia de agua salada es imprescindible que exista además una acumulación de sales por retención del propio terreno. Cuando pasa agua salada o se aplica un agua de riego a una zona cualquiera, una parte se infiltra y la otra es retenida. La fracción retenida provoca una acumulación de iones, que viene condicionada por la constante de solubilidad (Álvarez Cobelas et al., 1995). En consecuencia, un suelo salino se forma cuando la entrada de sales es mayor que la salida. El balance depende del clima, geomorfología, relieve e hidrología (Ponnamperuma, 1984).

Las actividades agrícolas, en especial la utilización para riego de aguas salinas, o sobreexplotación de acuíferos en zonas costeras que permiten la intrusión de agua de mar, aumentan considerablemente la probabilidad de salinización del suelo. De esta forma, se asegura que en áreas de agricultura intensiva, los problemas de salinización se incrementan por el uso de riego con agua salobre (FAO, 1993).

La influencia de los factores edáficos y climáticos es concluyente para determinar el grado de incidencia de la salinización en el suelo. Regímenes de altas temperaturas, y deficiencias extremas de agua, originan evaporación e insuficiente lavado de iones, lo que provoca un aumento de la concentración salina que afecta

significativamente la respuesta de las plantas a la salinidad (Marschner, 1986).

La acumulación de sales también está íntimamente conectada con la evapotranspiración. Al predominar la evaporación, la mayor concentración de sales se halla próxima a la superficie. Por el contrario, cuando predomina la transpiración, la acumulación se produce en la zona de máxima absorción radicular (Álvarez Cobelas et al., 1995). La caracterización edáfica permite conocer, según la composición del suelo, el grado de retención iónica propia del terreno.

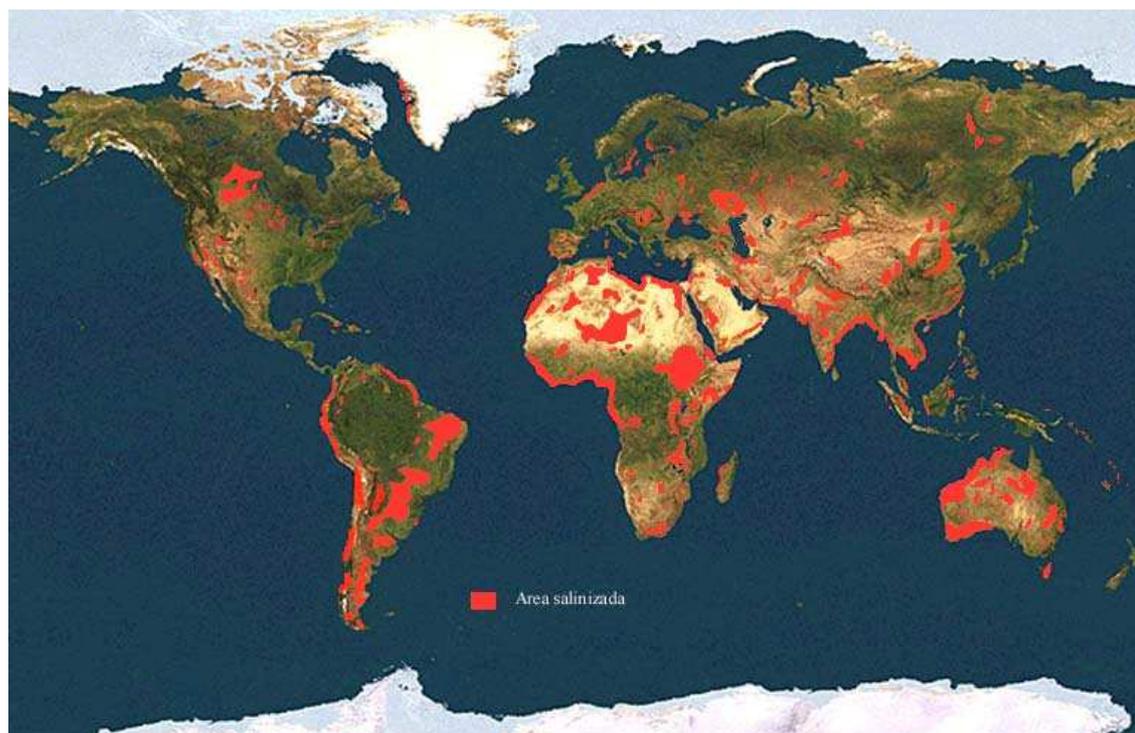
Aún cuando es difícil generalizar las relaciones entre los factores físicos del suelo, salinidad y cultivos, se puede apuntar que la mayor deshidratación de un suelo antes del riego favorece la retención de sales en el mismo, es decir cuanto más seco esté un suelo antes de un riego mayor será la concentración de sales.

En suelos de textura arenosa la permeabilidad del terreno es máxima y por tanto, la retención iónica mínima debido a los efectos de la porosidad. Por ello, en estos tipos de suelos el lavado del terreno se produce de manera eficaz, evitando la acumulación de iones en capas superficiales.

Por contra, en suelos de textura arcillosa la permeabilidad del terreno es mínima y por tanto la retención iónica máxima. El lavado de estos suelos es altamente dificultoso, y en zonas de riegos frecuentes y abundantes pueden presentarse problemas de aireación.

Otro factor que influye en no poder generalizar la relación suelo-salinidad-cultivo es la profundidad de la capa freática y su contenido en sales.

La gran proporción a nivel mundial de zonas afectadas por la salinización, hace que éste sea un problema de interés internacional (Figura I.7). Así, Dudal y Purnell, (1986) estiman en más de mil millones las hectáreas afectadas por la sal en nuestro planeta.



*Figura I.7. Distribución mundial de los suelos afectados por sales (según Szabolcs 1985).*

La proporción de territorio afectado por este factor en la cuenca mediterránea se cifra en 1.5 millones de Km<sup>2</sup> (Le Houerou, 1986). En España la cifra se aproxima a los 80.000 Km<sup>2</sup> (Szabolcs, 1985).

La gran importancia socio-económica que deriva de los problemas ocasionados por la salinización, implica la necesidad de buscar soluciones.

La realización de grandes obras de ingeniería civil como la construcción de recintos cerrados mediante diques con canalizaciones de salida que eviten inundaciones, la construcción de mallas de drenaje para mantener el nivel freático por debajo de la zona de influencia de las raíces, la evacuación de sales de drenaje o el trasvase de agua dulce, a veces desde grandes distancias, para regar y contribuir al lavado de sales, son medios para controlar la salinidad y recuperar para la agricultura suelos salinos. No obstante, debido a sus costes elevados e impacto ambiental, no siempre es posible realizar estos trabajos.

Otro de los métodos que actualmente se utilizan como solución para los efectos de la salinización, es el manejo agronómico de los suelos y cultivos afectados, estrategia que ha cosechado los mayores éxitos. Estos procedimientos agronómicos, abordan el problema desde distintos aspectos. Uno de ellos consiste en controlar la salinidad en la

zona radicular manteniéndola por debajo de los niveles dañinos mediante la optimización de los sistemas de riego con aguas de buena calidad, variando el método, cantidad y espaciamiento, lo que provoca el lavado de sales (Meiri y Plaut, 1985). Otro de los procesos que se utilizan, es el de minimizar el efecto de la sal en la parcela aumentando la densidad de plantas (Francois, 1982), aunque existen contradicciones en este sentido (Keren et al, 1983).

El manejo agronómico actúa también sobre la planta interviniendo sobre aspectos nutritivos como el abonado, dada la relación entre fertilidad y tolerancia (Mass y Hoffman, 1977). No obstante, no hay criterios unánimes sobre la relación salinidad-fertilidad, puesto que algunos autores indican un efecto positivo de la fertilidad sobre la tolerancia a la sal, otros, por el contrario, señalan una menor tolerancia al aumentar el nivel de fertilidad, y otros, incluso, no observan cambios. (Martínez, 1986). Estas situaciones contradictorias, pueden relacionarse con los diferentes efectos que la presencia de sales en un medio ejerce sobre la nutrición de la planta, debido en parte a los efectos antagónicos entre algunos iones, como por ejemplo  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$  (Pitman, 1981; 1984; Pitman et al., 1981; Marschner, 1986),  $\text{Cl}^-$ - $\text{NO}_3^-$  (Aslam et al. 1986) y al balance entre concentración total de cationes y aniones. El exceso de cationes en el medio es neutralizado por los aniones orgánicos del vegetal (Mengel y Kirby, 1979). La diversidad de efectos entre la interacción salinidad-fertilidad, no permite generalizar esta relación y obligan a conocer su comportamiento en cada caso concreto.

Otro aspecto del manejo agronómico es el empleo de patrones tolerantes a la salinidad (Pasternak, 1987).

Los estudios genéticos realizados hasta el momento están enfocados a la obtención de variedades de plantas tolerantes a la salinidad mediante programas de selección y mejora por hibridación entre cultivares comerciales, o por transferencia genética de las especies silvestres afines, de mayor tolerancia a la salinidad, a los cultivares de interés agronómico (Tal et al., 1978; Epstein et al., 1980; Shannon, 1982). Sin embargo, a través de la mejora genética, los logros obtenidos han sido escasos. Epstein y Rains (1987) argumentan que el escaso desarrollo de la mejora genética en la tolerancia a la sal puede deberse a que la selección y mejora de estas plantas es un proceso lento, difícil y costoso; a que la salinidad puede estar causada por distintos tipos de sales y ser variable en el tiempo; a que existe una gran dificultad para identificar marcadores que reconozcan la planta tolerante; a que no se conocen bien los mecanismos de tolerancia y al carácter poligénico de la tolerancia salina que provoca un

desconocimiento de los mecanismos de regulación genética del carácter. Por este carácter multigénico, es difícil definir parámetros que reflejen realmente la tolerancia de un genotipo, debido a que son numerosos los factores que influyen en la tolerancia (Jones, 1987). La falta de mejoradores que se dediquen a este trabajo es otro de los motivos que aluden Epstein y Rains (1987).

La prospección sistemática de la variabilidad existente dentro de las especies cultivadas es escasa (Aragües, 1989). Sin embargo los valores de heredabilidad encontrados por algunos autores a lo largo del ciclo de algunas plantas sugieren la posibilidad de mejorar la tolerancia a la salinidad mediante selección y mejora.

Aún cuando el posible carácter poligénico que determinan los factores de tolerancia puede ser un obstáculo para la determinación genética de este carácter, los valores de heredabilidad encontrados, indican la posibilidad de obtener a través de selección genética plantas con gran capacidad de adaptación al medio salino.

Los avances en biotecnología amplían las posibilidades de obtener genotipos de cultivos tolerantes mediante metodologías de selección celular somática (Stavarek y Rains, 1984), de fusión de protoplastos (Evans y Flict, 1983; Davey et al, 2005) o por transformación genética utilizando la metodología del ADN recombinante (Bressan et al., 1985; Maqbool et a., 2002; Fooland, 2004).

### I.2.1. EFECTOS DE LA SAL SOBRE LAS PLANTAS

La salinización de un suelo induce cambios en algunos parámetros fisiológicos de la planta. Por ejemplo, la presencia excesiva de sales solubles tipo  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  es capaz de reducir su desarrollo lo que obedece, a un descenso del metabolismo. (Martínez, 1986; Navarro, 2003).

Pasternak (1987), divide los efectos de la sal en tres categorías principales: efectos sobre las relaciones hídricas, efectos nutricionales y efectos sobre el balance de energía.

El efecto producido sobre las relaciones hídricas comienza por una disminución en la absorción del agua a través de las raíces, debido a la bajada del potencial osmótico del agua que las rodea (Mickelbart y Marler, 1996), lo que depende del tipo de sal y sobre todo de la concentración de ésta. La presencia de sales en el suelo da lugar a una

solución diluida en la que se desarrolla un cierto valor osmótico que ocasiona un descenso de la energía libre. Esto repercute en la disponibilidad hídrica de la planta ya que el movimiento del agua se realiza a favor de un gradiente de mayor a menor energía libre (Eaton, 1941; Bernstein y Hayward, 1958; Gucci et al., 1997). Debido al potencial osmótico, y consecuentemente a que la planta reduce la capacidad de absorción de agua, se genera una disminución del potencial hídrico de la planta, que se manifiesta en una reducción del potencial de presión o turgencia en la hoja por deshidratación, y por consiguiente en una menor expansión celular. Se origina así un retraso del crecimiento de la planta.

Esta disminución del crecimiento puede minimizarse total o parcialmente por medio del denominado ajuste osmótico (Gale et al., 1967; Termaat et al., 1985; Glenn et al., 1996) que permite compensar en mayor o menor medida la reducción del potencial osmótico de la solución del suelo. Tras este periodo de ajuste osmótico, la turgencia y expansión celular pueden retornar a valores iniciales siempre que las propiedades de transmisión de agua en la planta no hayan sido afectadas.

Los efectos nutricionales de la salinidad se basan en la disponibilidad, almacenamiento o distribución de nutrientes dentro de la planta, pudiendo ser causados también por un incremento en los requerimientos de la planta de algún elemento esencial. Este efecto nutricional puede subdividirse en: a) toxicidad, debido a la acumulación directa de iones en los tejidos de las plantas, y b) en un desequilibrio nutricional causado por el exceso de un ion particular.

La repercusión de la toxicidad debida a la acumulación de sales ha sido ampliamente estudiada por diversos autores. Así, Rains et al., (1980), imputan la toxicidad de los iones a las interferencias creadas en el metabolismo, y los daños que como consecuencia tienen lugar en orgánulos y membranas. Se han descrito muchos síntomas fisiológicos como disminución o inhibición de la actividad enzimática (Carvajal et al., 2000), o alteraciones en la funcionalidad de la membrana (Flowers, 1977; Greenway y Munns, 1980; Wyn Jones y Gorham, 1983; Ashraf et al., 1986), y su repercusión en los mecanismos de transporte y selectividad (Jeschke, 1984). También, derivación de parte de la energía metabólica de la planta para su inversión en procesos distintos al crecimiento (Penning de Vries, 1975; Yeo, 1983).

Los síntomas externos que pueden aparecer en las plantas sometidas a estrés salino son por ejemplo: reducción de crecimiento (Shannon et al., 1998; Yahya, 1998); clorosis y puntas de las hojas quemadas, clorosis en hojas (Wright et al., 1993); hojas

enrolladas, marchitamiento de flores, necrosis de raíces y defoliación. (Gucci y Tattini, 1997).

Según Flowers y Yeo (1989), en la valoración de los daños debido a los iones salinos, hay que tener en cuenta que la mayoría de los iones no deseados de las plantas se encuentran compartimentados en las vacuolas, donde no son directamente peligrosos. Solamente los iones que no están en las vacuolas son los que causan daños.

Aún cuando existan datos contradictorios en referencia a la repercusión de la sal sobre algunos iones de nutrientes esenciales en la planta, es conocida una interacción entre estos nutrientes y los iones salinos  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$ . Los iones  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{++}$  están íntimamente relacionados con la tolerancia a la salinidad en las plantas y con la presencia de iones  $\text{Na}^+$  en el medio. La concentración de  $\text{K}^+$  en la solución del suelo suele ser baja debido a que este elemento es rápidamente adsorbido por la fracción mineral de aquél. Sin embargo, la alta afinidad de las células de la raíz por el potasio frente al sodio, permiten a la planta satisfacer sus necesidades. Este grado de afinidad por el ión  $\text{K}^+$  frente al ión  $\text{Na}^+$  en suelos salinos varía con la especie y el cultivar como se ha comprobado en el olivo (Loupassaki et al., 2002). Entre especies tolerantes como la zanahoria se ha descrito mayor afinidad por el potasio que por iones sodio en suelos salinos, en comparación con la afinidad que se observa en especies sensibles (Kafkafi, 1984; Aslam et al., 1988, Troncoso et al., 1999, Carretero et al., 2005). Rathert, (1982), describe una reducción en el contenido de potasio en hojas de la variedad sensible de algodón mayor de la que observa en el cultivar tolerante. El estatus de potasio de la planta está relacionado con el cociente  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en el extracto de pasta saturada (EPS), disminuyendo cuando la EPS de la fase cambiante aumenta. Así, la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  en la planta ha sido utilizada en algunos cultivos como indicador de su tolerancia (Rathert, 1982; Kafkafi, 1984). Por otra parte, existen evidencias de que algunas especies pueden sustituir parte del potasio por sodio, como en algunas glicofitas, sin que se observe merma en su crecimiento. En este sentido, Marschner (1986) clasifica algunas especies cultivadas en varios grupos donde se incluyen desde especies como zanahoria (*Daucus carota* L.) o nabo (*Brassica rapa* L.), que pueden sustituir una alta proporción de potasio por sodio, hasta especies como lechuga (*Lactuca sativa* L.) o maíz (*Zea mays* L.) donde no se ha observado sustitución alguna sin que se vea afectado el crecimiento. Sin embargo, Jeschke (1984) sugiere que la reducción del tamaño foliar y la disminución del esfuerzo reproductor, puede derivarse de la inhibición en el transporte de asimilados y de  $\text{K}^+$ , dada la alta concentración apoplástica de  $\text{Na}^+$  o baja de  $\text{K}^+$  en las

hojas. Por contra, Munns (1985) encuentra que en la cebada, la concentración de  $K^+$  en la savia ascendente comienza a disminuir a partir de salinidades superiores a 100 mM de NaCl en la solución nutritiva, mientras que el propio crecimiento de la planta disminuye a partir de 25 mM de NaCl. No obstante, la presencia anormalmente elevada de sodio y potasio y altas concentraciones de sales totales inactivan las enzimas e inhiben las síntesis de proteínas (Azcón-Bieto y Talón, 1993).

En la nutrición de las plantas bajo condiciones de estrés salino, Kafkafi (1984), considera que la composición de la membrana de las raíces, especialmente en cuanto a su composición lipídica, juega un papel importante respecto a la absorción de iones cloruro. Stuiver et al., (1981) demuestran que se produce una ligera disminución en la concentración total de lípidos y ácidos grasos de membrana en las raíces de dos variedades de remolacha, al ser cultivadas en un medio con baja concentración de potasio.

El  $Na^+$  también interfiere con los iones  $Ca^{++}$  de la solución del suelo, pudiendo impedir su entrada en la planta (Lynch y Laüchli, 1985; Naeini et al., 2004), y desplazar el asociado a la membrana, dando lugar a un aumento de la permeabilidad y por tanto, a una disminución de la selectividad  $K^+/Na^+$  (Cramer et al., 1987). Las interacciones entre los iones  $Na^+$  y  $Ca^{++}$  desembocan en una serie de desórdenes fisiológicos que afectan al crecimiento y funcionamiento de la raíz y que guardan una estrecha relación con la proporción  $Na^+/Ca^{++}$  (Kent y Laüchli 1985; Mass y Grieve 1987; Cramer et al., 1987; Grieve y Mass, 1988). Estas variaciones descritas para el ión  $Ca^{++}$ , afectan al ión  $Mg^{++}$  dado su carácter antagonista. Ello sugiere que la tolerancia a iones sodio está relacionada con la eficiencia en el transporte de  $Ca^{2+}$  hacia las hojas en desarrollo.

Al aumentar la concentración de cloruros en la solución del suelo, disminuye la concentración de los nitratos en las hojas debido a interferencias aniónicas en las raíces. Aún cuando las tasas de síntesis proteica son muy bajas en las plantas tratadas con sal, no existe evidencia de que sea esta la única causa que limite el crecimiento celular (Munns y Termaat, 1986). Así, como en la mayoría de suelos el N es un factor limitante, la adición de éste generalmente aumenta el crecimiento y la producción. Además, aunque la causa no es bien conocida, se puede asegurar que la presencia salina en el suelo implica una disminución en la concentración del N en la planta. (Cram, 1973; Deane-Drummond y Glass, 1982; Pandya et al., 2004). Varios autores coinciden en que el aumento de la captación y acumulación de  $Cl^-$  reduce la concentración de  $NO_3^-$  en el tallo (Aslam et al, 1984; Ward et al, 1986; Klobus et al, 1988; Frechilla et al.,

2001). Gorham et al., (1986) observan un rápido descenso en la concentración de nitrato foliar en respuesta a la salinidad, si bien aumentan otras formas nitrogenadas en la planta como prolina, y proteína total soluble.

También se ha descrito que la presencia de nitrato en el medio disminuye la captación y acumulación de cloro (Kafkafi et al, 1982; Feigin et al, 1987; Martínez y Cerdá, 1989; Irshad et al., 2002). Así, un exceso de nitratos en la solución del suelo puede aumentar el crecimiento de las plantas tratadas con sal (NaCl), obedeciendo el efecto beneficioso más a la reducción de la absorción de cloruros que al aporte suplementario de nitrógeno (Glass y Siddiqi, 1985).

La forma en que se aporta el nitrógeno juega un papel importante en la sensibilidad de la planta a la salinidad cuando ésta es alta (Frechilla et al., 2001). En plantas de melón, Lewis et al., (1989) encuentran una mayor susceptibilidad cuando el nitrógeno aportado es en forma amoniacal. Este efecto no se observa a salinidades moderadas (Leidi y Lips, 1990). Martínez y Cerdá (1989) encuentran un aumento de iones cloruro en el medio cuando la mitad del nitrato es reemplazado por amonio.

La disponibilidad de fósforo para la planta disminuye en un suelo salino (Pandya et al., 2004), ya que la concentración de P en el suelo está estrechamente controlada por procesos de adsorción y por la solubilidad de los minerales de Ca-P (Grattan y Grieve 1992), la cual desciende conforme aumenta la salinidad (Sharpley et al., 1992). Si bien la salinidad puede aumentar las necesidades de P para ciertas plantas (Awad et al., 1990), se ha podido comprobar que la adición de fósforo al suelo tiene efectos diversos sobre la planta que van desde el aumento, no afectación o incluso la disminución de la tolerancia a la salinidad (Champagnol, 1979).

Por último, la solubilidad de los micronutrientes en el sustrato se ve favorecida por la salinidad (Sharpley et al., 1992). Sin embargo, su concentración en la planta va a depender del tipo de planta, tejido, salinidad, concentración de micronutrientes y de las condiciones ambientales en las que se desarrolle.

El efecto de la salinidad sobre las relaciones energéticas se produce en la adaptación de las plantas a la salinidad del medio lo que puede dar origen a una disminución de las reservas energéticas necesarias para el crecimiento. Estas pérdidas energéticas pueden deberse a la desviación de los fotosintatos necesarios para el crecimiento hacia funciones osmorreguladoras o a la energía consumida en el transporte iónico (Pasternak, 1987; Frechilla et al., 2001).

La respuesta empleada por la planta ante el estrés salino se traduce en unos

mecanismos de defensa que significan la tolerancia de dicha planta. La tolerancia puede definirse como el grado con el que la planta ajusta su potencial osmótico con un sacrificio mínimo de su crecimiento (Bernstein, 1963), o como la capacidad de una planta para soportar los efectos de una solución salina concentrada en la zona radicular (Shannon, 1979).

La tolerancia se puede considerar desde tres puntos de vista según Mass (1986): Supervivencia, producción absoluta y producción relativa. El criterio de producción relativa de un cultivo en diferentes situaciones salinas en comparación con el de ese mismo cultivo en ausencia de estrés, parece ser el criterio más adecuado a la hora de establecer comparaciones, tanto entre cultivos como entre cultivares. (Nieman y Shannon, 1977).

La tolerancia a la salinidad fue descrita por Mass y Hoffman (1977) y Van Genuchten (1983) como una función compleja del descenso de producción con respecto a la concentración de sal en el medio.

Pasternak (1987) indica que los mecanismos de tolerancia a la salinidad en plantas persiguen dos objetivos fundamentales: la protección contra la pérdida de agua de los tejidos y protección contra el efecto tóxico. Según Flowers y Yeo (1989) la salinidad reduce generalmente la velocidad de transpiración imitando un déficit hídrico, originando cierre estomático y reduciendo la superficie foliar, incluso la muerte de hojas. Las disminuciones en el ritmo de pérdida de agua se producen, presumiblemente, por un aumento de la resistencia estomática (Ferguson et al., 2002) y a largo plazo por cambios anatómicos y fisiológicos de la planta (pelos en superficie de las células, reducción del número de estomas, y propiedades de la cutícula).

El aumento de la relación raíz/tallo se traduce en una mayor explotación del volumen de agua en el suelo y además las raíces pueden extraer agua de zonas menos salinas (Papadopoulus y Rendig, 1983). Otra vía para mantener el flujo de agua del suelo a la raíz, es mediante el denominado ajuste osmótico, disminuyendo el potencial osmótico en la planta (Meloni et al., 2001). Este ajuste osmótico se consigue por muchas halofitas mediante la acumulación de NaCl en hojas y su aislamiento en vacuolas. (Läuchli y Epstein, 1984), mientras que en glicofitas está más relacionado con la síntesis de sustancias orgánicas (Greenway y Muns, 1980). Si bien, ambos mecanismos operan conjuntamente, su importancia relativa varía entre especies y genotipos, e incluso entre los tejidos de la misma planta.

En cuanto al efecto tóxico, la forma de conseguir en el citosol concentraciones

bajas de sales, puede producirse bien por exclusión o bien secuestrando los iones en compartimentos celulares como vacuolas y acumulando iones potasio y otros solutos orgánicos en el citosol (Kramer, 1984; Mimura et al., 2003).

Los organismos halofíticos pueden mantener valores isosmóticos con el medio extracelular, gracias a que los sistemas enzimáticos y la membrana no se ven afectados en su estructura y fisiología, por el efecto tóxico salino. Las plantas halofitas son capaces de completar ciclos biológicos en presencia de altas concentraciones salinas. Las plantas “no halofitas” son vegetales cuyos hábitats son suelos no salinos y con poca capacidad de sobrevivir y completar sus ciclos en medios salinos. No pueden sobrevivir acumulando la cantidad de sales que consiguen acumular las plantas halofitas y su supervivencia debe centrarse en evitar la excesiva absorción de iones o en una eficaz eliminación de los excesos salinos. El riesgo de acumular iones inorgánicos es la toxicidad, mientras que si los excluyen puede tener como consecuencia un déficit hídrico causado por una deficiente regulación osmótica (Greenway y Munns, 1980).

Otros métodos para evitar el efecto tóxico, se encuentran en la absorción y el transporte selectivo de iones, la compartimentación de electrolitos y la protección de enzimas y membranas mediante solutos compatibles. En la absorción selectiva de iones, el oxígeno en la zona radicular juega un papel decisivo. Para niveles altos de sal, esta selectividad se pierde por falta de ATP y se produce un flujo masivo de sales hacia el tallo (Cram, 1983).

Además de la compartimentación en vacuolas, los iones también se concentran en órganos no especializados como raíces, hojas viejas, traqueidas o pecíolos, con el fin de retrasar el daño a otras partes más sensibles en crecimiento.

### I.3. CULTIVO IN VITRO

#### I.3.1 CONCEPTOS GENERALES

El uso de técnicas de cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos vegetales, cada vez es más frecuente en muchas áreas de la Biología. El concepto de cultivo de vegetales *in vitro* se entiende como el desarrollo sobre un medio nutritivo, en condiciones estériles y aisladas (dentro de un contenedor normalmente de vidrio) de parte o la totalidad de una planta. Este desarrollo controlado se basa en los principios de autonomía y totipotencia celular de la célula vegetal. Esta metodología abre un amplio número de opciones en aplicaciones tales como propagación, nutrición, estudios fisiológicos, saneamiento y regeneración de plantas entre otras.

La primera condición para el éxito de un cultivo "in vitro" es la asepsia ya que los medios en que se desarrolla el tejido vegetal son muy favorables para la proliferación de bacterias, hongos y otros contaminantes. Las infecciones pueden ser debidas fundamentalmente a microorganismos en suspensión en el aire, en los propios tejidos vegetales que pueden poseer tanto contaminación superficial como endógena, en el medio de cultivo y en la propia persona (piel, respiración, etc.) que efectúa la experimentación. En consecuencia, se impone la necesidad de la eliminación total de los microorganismos mediante técnicas que no dañen los tejidos.

Los métodos de eliminación de las fuentes de infección para el material vegetal se basan en tratamientos con agentes esterilizantes después de un lavado prolongado del mismo. Los agentes suelen ser etanol e hipoclorito sódico o cálcico. En casos excepcionales de un material excesivamente contaminado, se pueden usar otros tipos de productos más agresivos como el cloruro de mercurio y mercurobutol. En cualquier caso, transcurrido su tiempo de acción, que suele estar entre 20 y 30 minutos, es imprescindible la eliminación de los restos del desinfectante por lavados con agua destilada estéril.

Para la esterilización del medio de cultivo se usa el calor en fase húmeda (autoclave) durante un período de 20 minutos a 120°C de temperatura. En el caso del material utilizado en la manipulación de los tejidos, como pinzas, bisturís, etc. se usa un horno a 250°C. Toda la manipulación se lleva a cabo mediante sistemas de filtración de aire forzado (cabinas de flujo laminar).

En el desarrollo de tejidos "in vitro" influyen la luz, la temperatura y el medio nutritivo. En cuanto a las necesidades de luz según Augé et al., (1984), el factor más

determinante es la cantidad de energía luminosa recibida (intensidad por fotoperíodo). La intensidad (potencia luminosa por unidad de superficie) que presentan habitualmente las cámaras de cultivo de tejidos, varía de 23.25 a 116.27  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (1000 a 5000 lux) y la mayoría de los cultivos *in vitro* evolucionan bien con un fotoperíodo de 16 a 18 h. por día.

La temperatura de las cámaras de cultivo de tejidos vegetales está habitualmente regulada de forma constante a 22 -26 °C. La temperatura real del tejido en el interior de los recipientes puede ser superior en 2 a 3 °C a la de la cámara, debido a la radiación lumínica.

Un medio de cultivo es una solución acuosa que contiene una parte mineral, que aporta a la misma N, P, K, Ca, S, Mg, Fe, Zn, B, Mn, Cu, I, Co, Ni, Al y Mo. Además, se incorpora una parte orgánica (azúcares, vitaminas, aminoácidos, y fitohormonas o reguladores de crecimiento). Esta solución acuosa se solidifica en la mayor parte de los casos con agar-agar.

Los minerales presentes en el medio de cultivo pueden usarse por los tejidos y células de las plantas como piezas para la síntesis de moléculas orgánicas o como catalizadores en reacciones enzimáticas. Los iones de las sales disueltas juegan un papel importante en el transporte de moléculas por la planta, en la regulación osmótica y en el mantenimiento del potencial electroquímico de la misma.

Las composiciones minerales más utilizadas se conocen con el nombre de sus autores. Así el medio de cultivo de uso más generalizado es el Murashige y Skoog (1962), rico en amonio, fósforo y azufre.

Aunque las plántulas cultivadas "in vitro" son verdes y poseen clorofila, su función fotosintética está muy reducida. Por ello, como fuente de carbono se usan azúcares, generalmente sacarosa (1-3%) (Murashige y Skoog, 1962; Thompson y Thorpe, 1987; Pierik, 1990) o, en otros casos como el del olivo, manitol (1.5 %) (Leva et al., 1994; 1995; García et al., 2002). La fuente hidrocarbonada del medio de cultivo además de la función nutritiva citada, ejerce también un efecto importante sobre la morfogénesis a través de sus propiedades osmóticas. (Thompson y Thorpe, 1987).

Los azúcares secundarios (*mio-inositol*) mejoran la división celular y participan en la formación de la pared celular.

Aunque el nitrato da lugar a aminas en las células, en algunos casos se deben adicionar aminoácidos, glicina o cisteína, como nitrógeno reducido.

Son fundamentales las vitaminas del grupo B. Así la B1 (*tiamina*), mantiene los ápices caulinares y la B6 o *piridoxina*, es importante en el metabolismo de los aminoácidos. La *biotina* es un cofactor de la actividad auxínica. El *pantotenato* de Ca es significativo en la respiración.

Los *reguladores de crecimiento*, compuestos orgánicos que, en pequeñas cantidades, inhiben, promueven o modifican algún proceso fisiológico que a su vez origina la inhibición o estímulo del crecimiento y la organogénesis, participan regulando la formación de órganos. De acuerdo con este modo de acción y según el modelo propuesto por Skoog y Miller (1957), la diferenciación de yemas vegetativas (caulogénesis) es promovida por balances auxina/citoquinina favorables a las citoquininas, mientras que los balances favorables a las auxinas inducen la formación de raíces (rizogénesis). En consecuencia, la manipulación de las concentraciones de auxinas y citoquininas en los medios de cultivo permite controlar la organogénesis *in vitro* de muchas especies vegetales, constituyendo además la base de gran parte de los protocolos de propagación vegetativa *in vitro* (micropropagación) existentes en la actualidad (Pierik, 1990).

La micropropagación es una de las aplicaciones de la técnica del cultivo de vegetales *in vitro* de mayor interés. Consiste en tomar de la planta madre un órgano o un trozo de éste, lo que se denomina "explanto", y bajo condiciones asépticas, cultivarlo *in vitro* hasta obtener una nueva planta semejante a la inicial. En la micropropagación existen fases diferentes que se pueden concretar en:

a) Preparación del material madre.

La planta original, que condiciona todo el cultivo ulterior, debe presentar las mejores características agronómicas y sanitarias para contar con un material de partida en las mejores condiciones posibles. Para ello, son factores a tener en cuenta en la elección del explanto, el genotipo del material a propagar, el tipo de órgano, su edad y posición en la planta madre, lo que permite la aproximación al conocimiento del estado fisiológico y por tanto, a su capacidad organogénica. A esta capacidad también contribuye la edad de la planta madre y la estación climatológica en la que se toma el material a propagar.

b) Establecimiento del cultivo aséptico.

El objetivo de esta fase es obtener un cultivo libre de microorganismos, fundamentalmente de hongos y bacterias, procedente de la especie que se quiere multiplicar. Por ello, esta etapa se considera satisfactoria si un número adecuado de explantos sobrevive sin contaminación y mantiene un crecimiento rápido.

c) Multiplicación propiamente dicha.

El fin de esta etapa es llevar a cabo la multiplicación de órganos y estructuras capaces de dar lugar a nuevas plantas completas e intactas. Así mismo, los brotes producidos en esas nuevas plantas pueden considerarse como propágulos para incrementar el número de aquéllas, aumentando con ello el factor de multiplicación.

La mayoría de las investigaciones realizadas en esta fase de la micropropagación, han centrado la atención en establecer el medio de crecimiento óptimo (de Fossard, 1976).

d) Preparación de los propágulos o plántulas para su transferencia a tierra

Un método de micropropagación eficaz debe mantener un fuerte porcentaje de plántulas vivas después de la salida del recipiente de cultivo. Esta fase tiene por objeto preparar las plántulas para este fin ya que concluida la fase c, las plantas, por lo general, son pequeñas e incapaces de soportar las condiciones en suelo. Para ello, Debergh y Marener (1981) subdividen esta tercera etapa en dos partes: 1) elongación de las plántulas formadas en la fase anterior y 2) enraizamiento *in vitro* o *ex vitro* de las plántulas crecidas en dicha fase. En esta fase hay que tener en cuenta el balance auxinas-citoquininas anteriormente descrito.

f) Transferencia al ambiente natural.

Si esta última fase no se realiza cuidadosamente pueden producirse muchas pérdidas debidas, a que las jóvenes raíces formadas en condiciones controladas tienen una epidermis poco suberificada y a que las plantas cultivadas asépticamente, que crecen en alta humedad relativa (HR), a menudo sufren estrés hídrico cuando se exponen a baja HR. Esto se debe, entre otras razones, a ciertas características anatómicas de la hoja de la planta desarrollada *in vitro* tales como existencia de pocas ceras epicuticulares, células en empalizada más pequeñas, estomas poco funcionales y niveles altos de aire intercelular en las células del mesófilo (Sutter y Langhans, 1979).

Por ello, en esta fase se deben situar las plantas en una atmósfera con una

humedad relativa máxima durante un período de una a tres semanas a 15-25°C cuidando que en estas condiciones, no se desarrollen enfermedades de tipo fúngico.

Un método poco costoso y práctico fue puesto a punto por Cantos et al., (1993). Cuando las plantas alcanzan un desarrollo adecuado *in vitro*, se trasladan a vasos de plástico de 330 cc de capacidad con substrato regado a saturación. El conjunto vaso-planta, se cubre con una bolsa de polietileno transparente cuyo interior se pulveriza con agua para crear un ambiente de elevada humedad interna. A intervalos de dos días durante 10 días, se perfora paulatinamente la cubierta plástica y bajo frecuentes controles, a fin de comprobar que la planta no sufra deshidratación, se retira la bolsa para llegar al contacto total entre la planta y el ambiente externo. Una vez asegurada la supervivencia de la planta, se traslada ésta a maceta de mayor volumen (2 l.) y se lleva a invernadero.

### I.3.2 CULTIVO DE EMBRIONES CIGÓTICOS.

El cultivo *in vitro* de embriones cigóticos es un proceso de morfogénesis que se puede definir como el desarrollo de embriones sexuales (2n) ya sean maduros o inmaduros, separados de la semilla y cultivados adecuadamente de forma controlada para obtener una planta viable. Esta técnica disminuye el tiempo y aumenta el tanto por ciento de germinación.

Entre los factores que afectan la obtención de plantas viables se pueden destacar: las características de la planta madre, el tamaño del embrión; la composición del medio nutritivo (macro, micro nutrientes e hidratos de carbono así como aminoácidos, reguladores de crecimiento y vitaminas en especial con embriones inmaduros); la luz, (las primeras semanas suelen mantenerse los embriones en oscuridad, aunque depende de la planta, y posteriormente se les somete a un fotoperíodo para iniciar el crecimiento normal); la temperatura, (en un rango entre 22 y 25°C) y valor osmótico, que debe ser alto en embriones inmaduros, por tanto podría ser necesaria una mayor concentración de compuestos hidrocarbonados.

Las semillas de algunas especies vegetales germinan con gran dificultad en la naturaleza, lo que es debido, probablemente, a ciertos tipos de dormancias recalcitrantes. Así, la semilla de *Tilia americana* nace dentro de un duro pericarpo indehiscente, y además, normalmente, posee una maduración temprana. En consecuencia, es una especie con semilla de difícil germinación. Vanstone y Ronald (1982), recolectaron y sembraron las semillas de este árbol a intervalos semanales desde

el 12 de Agosto hasta el 23 de Septiembre. La germinación se incrementó hasta el 9 de Septiembre (52%) y decreció a partir de ese momento debido a la dormancia. Cuando estos mismos autores pusieron embriones aislados en cultivo, la germinación ocurrió sin problemas en todas las fechas indicadas.

Desde antiguo, se conoce que uno de los problemas encontrados en la germinación y cruzamiento del lirio barbudo es la prolongada dormancia de la semilla que persiste desde varios meses a muchos años. Se sabe también que dicha dormancia se debe a la presencia de inhibidores estables en el endospermo (Randolph y Cox, 1943). Randolph, (1945) cultivó embriones aislados en oscuridad, a una temperatura entre 28 y 30°C durante 3-5 días, e inmediatamente los transfirió a luz débil del día. En 2-3 semanas los embriones habían desarrollado raíces y dos o tres hojas. Este método de cultivo hizo posible la obtención de generaciones sucesivas de lirios a intervalos anuales, en programas de desarrollo de nuevas variedades.

Las semillas de una forma de manzano silvestre germinan en condiciones muy favorables, en 3 ó 4 años. Usando cultivo de embriones, Nickell (1951), logró la germinación en 24-48 horas y en 3-4 semanas las plántulas estaban listas para ser llevadas a suelo. Después de ocho meses y medio alcanzaron 3,5 pies de altura. Asen y Larson, (1951), reseñaron que usando cultivos de embriones de rosa es posible producir dos generaciones por año, mientras que con siembra tradicional se necesitan de 12 a 18 meses para cada generación. Lammerts (1942) mostró que el cultivo de embriones puede usarse efectivamente en amplia escala a nivel comercial, ya que acorta el período de producción. En híbridos se acorta el período de floración a dos años como máximo. Comparado con los métodos de germinación tradicionales por estratificación, el porcentaje de germinación es mucho más alto en los melocotoneros y albaricoqueros resultantes de un cruce.

Al género *Ilex* pertenecen plantas importantes tanto por su valor ecológico como comercial. Un inconveniente importante para estas plantas es la baja tasa de germinación en muchas de ellas, debido al desfase entre la maduración del fruto y del embrión. Así, cuando el fruto alcanza su madurez total el embrión permanece en el estadio inmaduro de “corazón-torpedo”. La madurez del embrión se logra dos o tres años después de que se produzca la caída del fruto. Por ello, se requieren 3 años al menos para su germinación y en algunos casos, este período puede ser mayor de 9 años. Hu (1975), desarrolló una técnica *in vitro* para la germinación de estos embriones rudimentarios de *Ilex*, acortando así la dormancia de la semilla. Los embriones pasaron

por las mismas secuencias de desarrollo que cuando se mantenían en la semilla, es decir, corazón-torpedo, torpedo, embrión maduro y germinación. El desarrollo, no obstante, fue más rápido, ya que solamente en dos semanas de incubación en oscuridad se alcanzó la germinación con embriones de *Ilex opaca*.

Burgos y Ledbetter (1993) cultivaron embriones de albaricoquero (*Prunus armeniaca*, L.) en tres estadios de desarrollo sobre medios C2d, SBH y WPM. Aunque en todos los estadios de desarrollo obtuvieron un elevado porcentaje de germinación y formación de plántulas, observaron efectos importantes debidos a la longitud y peso. Los embriones entre 5 y 9 mm (estadio I de desarrollo) germinaron y desarrollaron plántulas en un porcentaje significativamente mayor que los dos estados de desarrollo restantes.

Chee (1994) puso a punto un método de cultivo *in vitro* de embriones de semillas de especies de *Taxus* para superar la dormancia de las mismas. Se cultivaron embriones cigóticos escindidos de semillas maduras de *T. brevifolia* en oscuridad durante 4 semanas en diferentes medios: B5, Litvay y MS. La emergencia radicular y desarrollo de plántulas fue mayor sobre medio B5. Transcurridas 1 a 2 semanas en este medio las semillas de *T. brevifolia*, Nutt., *T. cuspidata*, L., *T. baccata*, L. y *T. baccata stricta*, L. germinaron en un rango del 2 al 36%. La BA a 22.5  $\mu\text{M}$  no tuvo efecto sobre la emergencia radicular inhibiéndola a 225  $\mu\text{M}$ . Los embriones escindidos a partir de semillas maduras o cercanas a la maduración tuvieron la mayor frecuencia de emergencia radicular, así como desarrollo de plántulas. Los embriones cultivados desarrollaron plantas en sólo 8 a 10 semanas.

Las semillas híbridas de patata presentan a veces dificultades para germinar. Por cultivo de embriones obtenidos de semillas de 31 cruces de diferentes patatas Shilde se obtuvo una importante mejora en la germinación, que en algún caso pasó del 12.5% en 46 días con semillas completas al 88.6% en 6 días con los embriones (Anónimo, 1982).

La *Maranta leuconera*, una importante planta ornamental, se propaga generalmente por estaquillas, ya que aunque se pueden obtener semillas mediante polinización a mano, raramente germinan. Con el cultivo de embriones, Henny (1980) obtuvo un 65% de germinación, que aumentó a un 100% cuando añadió 2iP al medio basal.

Rammig et al., (1990) cultivaron con éxito, tanto en medio líquido como sólido, embriones inmaduros de vid a partir de genotipos de *Vitis vinifera* de maduración temprana e incrementaron el porcentaje de germinación, en algunos casos del 12 al

34%.

De los ejemplos anteriores se deduce que en la naturaleza muchos embriones vegetales no germinan debido a su desarrollo incompleto o a una dormancia recalcitrante producida por la cubierta de la semilla o el endospermo. Ambos inconvenientes se pueden remediar mediante cultivo *in vitro* de embriones cigóticos.

Entre 1962 y 1966 se dio un fuerte impulso al cultivo de embriones cigóticos en España por Vázquez y Vieitez con el cultivo de embriones de castaño.

En 1976, Juárez et al., obtuvieron plantas nucelares de varios cultivares de naranjos clementinos mediante cultivo de nucelas *in vitro* con el objeto de obtener plantas libres de virus bien, por obtención directa de plantas nucelares, o por microinjerto de ápices caulinares sobre plántulas obtenidas de embriones (Murashige et al., 1972).

### I.3.3 OBTENCIÓN DE EMBRIONES ADVENTICIOS.

La embriogénesis somática o adventicia o inducción de embrioides en células somáticas, tanto de una etapa de callo previa, como de un tejido organizado, tiene como principales características la bipolaridad y la independencia del tejido vascular de los embriones obtenidos. En 1983, según Ammirato era posible inducir embriogénesis somática en 132 especies vegetales y en 1986 Williams y Maheswaran postularon la posibilidad de embriogénesis somática a partir de una sola célula. Es un método útil y casi clásico en el cultivo de tejidos *in vitro*, ya que proporciona una tasa de multiplicación muy elevada con baja contaminación y fácil manipulación. En consecuencia, su aplicación ha venido generando algunos avances de cierta entidad como la producción de semilla artificial (Redenbaugh, 1986; Sorvari et al., 1997) o criopreservación de material (Hogberg et al., 1998; Jekkel et al., 1998).

En la actualidad, debido al hecho conocido de que, sobre todo en leñosas, con la maduración desciende el potencial morfogénico, dificultando la propagación vegetativa. La aplicación de embriogénesis somática a partir de tejidos, que conserven características juveniles o que las recuperen durante el proceso de desarrollo, como las líneas florales, es una forma de paliar el problema, por ejemplo con especies de *Quercus* (Hernández et al., 2003).

Se han descrito métodos consistentes en la inducción, maduración y germinación de embriones somáticos, fundamentalmente de discos de hojas o de cotiledones, tan eficaces como los basados en la vía organogénica pero mucho más rápidos (Orinos y Mitrakos, 1991; Swamy et al., 2005; Gopi y Ponmurugan 2006; Corredoira et al., 2006). Aunque la embriogénesis somática puede abarcar a todas las especies, parece que las pertenecientes a las familias Solanáceas y Umbelíferas son las que proporcionan mejores resultados (Tisserat et al., 1979).

#### I.3.4. VARIACIÓN SOMACLONAL.

Desde hace aproximadamente 40 años se viene observando que cuando un tejido diferenciado pasa por una fase de desdiferenciación durante su cultivo *in vitro*, existe la posibilidad de la aparición de alteraciones genéticas que se pueden reflejar en cambios en las plantas regeneradas. Esta variación, denominada variación somaclonal por Larkin y Scowcorft (1981), puede servir como una fuente de variación genética de interés para programas de mejora de plantas (Bouharmont, 1994; Karp, 1995; Hammerschlag et al., 1995). En consecuencia, las técnicas de cultivo *in vitro* han sido reconocidas como una herramienta muy válida para los trabajos de mejora vegetal debido a la posibilidad de selección de mutantes, bien espontáneos o inducidos por determinados agentes físicos o químicos. En esta línea, la variación somaclonal se ve favorecida también por los subcultivos de dicho material. Los variantes somaclonales obtenidos, pueden seleccionarse por determinados caracteres en función de sus nuevas características genéticas, bioquímicas, fisiológicas y agronómicas. Así, la variación somaclonal puede considerarse como una extensión lógica y habitual del proceso de mejora vegetal que acompaña a cualquier proceso en que se induce variabilidad genética.

Muchos autores han ofrecido diversas hipótesis, con base genética, para explicar la variación somaclonal. Peloquin (1981) responsabiliza a la sustitución cromosómica de los cambios observados en plantas regeneradas a partir de cultivos *in vitro*. Otros, como Ohigara (1981) y McCoy et al., (1982), observan cambios citogenéticos en plantas regeneradas que se pueden relacionar con los cambios heredados hallados. Otros trabajos indican que las variaciones se producen en un único gen (Barbier y Dulieu, 1980; Edallo et al., 1981), mientras otros lo identifican con alteraciones citoplásmicas (Sibi, 1976; Brettell et al., 1980). Sin embargo, en principio, cualquier tipo de variación genética podría contribuir a la base de la variación somaclonal, como: a) cambios

cariotípicos (Larkin y Scowcroft, 1981, Predieri, 2001); b) cambios crípticos por reordenación de cromosomas (Larkin y Scowcroft, 1981); c) elementos transponibles, d) reordenación somática de genes, e) ampliación y desaparición de genes, f) sobrecruzamiento e intercambio de cromátidas hermanas (Larkin y Scowcroft, 1981; Predieri, 2001) y g) eliminación de virus crípticos (Larkin y Scowcroft, 1981).

La frecuencia de la variación somaclonal está determinada por el genotipo, fuente del explanto, duración del cultivo y composición del medio de cultivo (Skirvin et al., 1994; Duncan, 1997; Brar y Jain, 1998). Esta fuente de variación adquiere su máxima efectividad coordinada con un proceso de selección eficaz.

Como resultado de las investigaciones sobre variantes somaclonales, en estas últimas decenas de años se ha obtenido un determinado número de líneas mejoradas. Por ejemplo, respecto a tolerancia a enfermedades, los principales logros se han alcanzado con caña de azúcar donde se han logrado a partir de callo, líneas de alta producción y resistentes al tizón (Liu, 1981), o al mildiu y al virus conocido como la enfermedad de Fiji (Heinz et al., 1977). En Citrus se han podido seleccionar somaclones resistentes a *Phoma tracheiphila* (Nadel y Spiegel-Roy, 1987; Gentile et al., 1993; Deng et al., 1995a), en fresa a *Fusarium oxysporum* (Toyoda et al., 1991), a *Alternaria alternata* (Takahashi et al., 1993) y a *Phytophthora cactorum* (Battistini y Rossati, 1991). También se han obtenido líneas clónicas de melocotoneros resistentes a nematodos (Hashmi et al., 1995). Mientras que en vid, varios somaclones obtenidos por Kuksova et al., 1997 muestran resistencia a *Botrytis cinerea* y *Plasmopara viticola*.

Respecto a factores abióticos destaca el estudio de la tolerancia a salinidad. El exceso de sal, principalmente cloruro sódico (NaCl), en el suelo es probablemente el factor de naturaleza química con mayor incidencia sobre la inhibición del crecimiento vegetal dada la gran extensión de suelos salinos en el planeta. El exceso de sal implica efectos secundarios como la deficiencia de nutrientes y la deshidratación osmótica. Por ello, la capacidad de las plantas por mantener un adecuado nivel de hidratación tisular está estrechamente relacionada con la tolerancia a sal (Downton y Millhouse, 1985). La resistencia de la planta a una situación de estrés puede operar a través de diferentes mecanismos de rechazo o de tolerancia al daño, tales como un aumento de la capacidad para reparar el mismo, una elevación del umbral de tolerancia mediante el incremento de la elasticidad de la respuesta, o un cambio en el metabolismo que ayuda a la adaptación a esta situación de estrés. Según Jain (2001) muchas de estas posibilidades pueden ponerse de manifiesto usando el cultivo de tejidos como un sistema modelo en

el estudio de los mecanismos que operan en toda la planta, tomando como base: (a) La *homogeneidad* de la población, que permite eliminar las posibles variaciones resultantes de la variabilidad morfológica y de los diferentes estados de diferenciación característicos de los distintos tejidos de la planta, (b) el *crecimiento de los tejidos o células en un medio definido* en el que pueden tratarse los diferentes factores implicados de forma uniforme y controlada, y provocar variación somaclonal, facilitando a la vez su testado mediante adiciones determinadas de una sal concreta, (c) la posibilidad de realizar *experimentos durante todo el año*, pues el crecimiento es independiente de las estaciones climáticas o del medio ambiente, (d) la posibilidad de *estudiar las respuestas de tejidos o células aisladas de diferentes partes de la planta* y así revelar las contribuciones relativas de cada una de ellas a la resistencia general de la planta completa, y (e) esta herramienta también permite *diferenciar entre los mecanismos que operan solo a nivel celular y aquellos que dependen de la organización de las células* en la planta. No obstante, también existen limitaciones de este sistema, tales como la dificultad de aplicación del mismo a mecanismos que están expresados a nivel multicelular diferenciado, que sólo pueden ser seleccionados mediante observaciones sobre la planta entera (Dracup, 1993) o la existencia de posibles cambios citológicos y nucleares que determinan que una resistencia dada no sea transmitida genéticamente, haciendo que la resistencia a la salinidad sea sólo temporal. Como se indicó antes, esto se explicaría por cambios epigenéticos, es decir, cambios en el fenotipo de la planta, que no resultan de una alteración de la secuencia de ADN, sino que se originan en las plantas o cultivos para afrontar momentáneamente esas situaciones de salinidad y que luego se pierden una vez que el factor inductor del estrés es eliminado.

Dentro de los estudios llevados a cabo usando el cultivo *in vitro* como técnica para abordar problemas relacionados con la selección de plantas tolerantes a estrés abiótico, se han encontrado genotipos de Citrus donde se ha incrementado su tolerancia a salinidad, (Ben-Hayym y Kochba, 1983; Ben-Hayym y Goffer, 1989). Así mismo, destacan los efectuados por Lebrun et al., (1985), que consiguieron la selección *in vitro* de plantas de vid (*Vitis rupestris*) con resistencia al NaCl. También Cano et al., (1996) usando callos originados de fragmentos de hoja de plantas de tomate cultivado y silvestre (*Lycopersicum pennelli*) consiguieron híbridos producidos con estas plantas, y lograron establecer mediante cultivo *in vitro* cepas de callos resistentes a diferentes concentraciones de sal (NaCl). Observaron además un mayor aumento del peso fresco

de los callos de origen híbrido, seguido de los de origen de plantas silvestres y finalmente los derivados de plantas de cultivo. Sin embargo, estos autores no describen la regeneración de plantas a partir de estos callos, que supuestamente podrían presentar resistencia a la salinidad.

La variación somaclonal puede ser de gran utilidad para realzar el intercambio del material genético con los híbridos sexuales salvajes a fin de incorporar genes extraños deseables. Así, plantas híbridas de *Lolium* y *Hordeum* procedentes de cultivos de embriones, mostraron variaciones genéticas importantes y fueron agrónomicamente más valiosas que los híbridos sexuales (Ahloowalia, 1978; Orton, 1980).

Sin embargo, la validación en campo de las plantas obtenidas *in vitro* por variación somaclonal cuenta con escasas publicaciones hasta el momento, aunque algunos investigadores han avanzado unas primeras evaluaciones. Así, Hammerschlag et al., (1990, 1998) idearon protocolos de regeneración de plantas de melocotonero tolerantes a *Xanthomonas campestris* y observaron su comportamiento en campo durante tres años, encontrando que algunas de las plantas seleccionadas mantenían altos niveles de tolerancia a la enfermedad.

Los éxitos relativamente recientes en la producción de regenerantes de varias especies, sanos, fértiles y genéticamente estables tolerantes a la salinidad (Dix, 1993 y Tal, 1993), han sugerido que algunas de las limitaciones anteriormente descritas pueden superarse o minimizar su incidencia en la selección de plantas tolerantes a estrés salino. Las tácticas usadas para eludir estos problemas son el uso de explantos con alto potencial morfogénico que facilita en gran medida la regeneración y la selección de variantes en cortos períodos de tiempo para prevenir el desarrollo de adaptaciones epigenéticas que enmascaran la aparición de verdaderos mutantes tolerantes (Chandler y Vasil, 1984; McHughen y Swartz, 1984; Dix, 1993). Con estas premisas se han publicado selecciones con éxito de plantas tolerantes a la sal usando como material de partida embriones derivados de microsporas de *Brassica* (Hafizur-Rahman et al., 1995) o embriones inmaduros de trigo duro (Arzani y Mirodjagh, 1999). Morabito et al., (1994), obtuvieron plantas de *Eucaliptus* más tolerantes a la sal haciendo crecer en medio de cultivo con NaCl, 140 mM, explantos de tres clones de *Eucaliptus microtheca*, pero no constataron los resultados en plantas en campo. Esta constatación de tolerancia *in vivo*, sí fue realizada con éxito en plantas tolerantes de patata obtenidas por selección recurrente a partir de cultivos de callos en medio con 150 mM de NaCl (Ochatt et al., 1998). En este mismo año Carretero et al., (1998), desarrollaron durante

cuatro semanas en invernadero bajo condiciones de salinidad, plantas del clon IRNAS-1 de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) seleccionadas mediante micropropagación en medio de cultivo MS con diferentes niveles de NaCl. Estos autores constataron que los pesos fresco y seco de los tejidos de las plantas estudiadas no experimentaron cambios significativos con el aumento de salinidad del medio, lo que indicó su alta tolerancia a la sal. También, los niveles de Na en la raíz fueron relativamente elevados en comparación con los del tallo y la hoja. Es decir, la raíz absorbió estos elementos del medio y los acumuló sin que pasaran en cantidades significativas a otros órganos de la planta. Por otro lado, al añadir el sodio al medio, los porcentajes de potasio descendieron menos de lo esperado en la raíz y tallo y se mantuvieron en hoja, lo que podría ser signo del carácter tolerante del clon seleccionado.

Troncoso et al. (1999), evaluaron la tolerancia a sal de portainjertos de vid estudiando la correlación entre la tolerancia a la sal de plantas obtenidas *in vitro* y su posterior cultivo en cámara en condiciones similares de salinidad. Así mismo, Carretero et al. (2005) comprobaron también esta correlación en plantas de distintos clones de mandioca. Zhu et al. (2000) comprobaron el crecimiento en campo de plantas de arroz tolerantes a sal obtenidas mediante cruces entre determinados cultivares y variantes somaclonales obtenidos *in vitro*.

Los resultados indicados y la demostración en determinados casos (Sykes, 1992; Taeb et al., 1992; Saleki et al., 1993) de que la mutación que mitiga la sensibilidad de plantas a la sal y las transforma en tolerantes se da en un solo gen, confieren más fuerza a la posibilidad de obtener variantes somaclonales tolerantes al NaCl.



## II. CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE LAS PLANTAS MADRES

### II.1 INTRODUCCIÓN

Como se indicó en el capítulo anterior, la salinidad del suelo es un problema grave en algunas zonas áridas de la cuenca mediterránea, donde las plantas están sujetas a regímenes de altas temperaturas y déficit hídrico. En dichas áreas el uso de aguas salinas representa, a veces, la única posibilidad para regar y los sistemas de riego localizado podrían favorecer la acumulación de sales en el terreno. Por ello, interesa disponer de plantas tolerantes a la presencia de sal en el medio.

El olivo es el mayor cultivo del área mediterránea y, en general, se considera más tolerante a la sal que otros frutales de clima templado (Ayers y Wescott, 1994). Según Beede y Goldhammer (1994), retiene más sales en la raíz y transporta menos a las hojas que otras especies vegetales, lo que puede explicar en parte su mayor tolerancia. No obstante, con diferencias entre cultivares (Marin et al, 1993), las condiciones de estrés salino pueden afectar su crecimiento, producción y caída de hojas. Autores como Therios y Misopolinos (1988) y Cresti et al. (1994) estudiaron el efecto de la sal sobre la morfología y el desarrollo de distintos órganos del olivo. Otros como Bonghi y Loreto (1989) y Tattini et al., (1995) consideraron la influencia de la salinidad sobre la fotosíntesis, conductancia estomática, grado de transpiración, porcentaje de asimilación neta en las hojas y ajuste osmótico. Heimler et al. (1995) estudiaron la composición de lípidos en olivos sometidos a estrés salino. Así mismo, Cresti et al. (1994) y El-Agaimy et al. (1994), consideraron la acción de la salinidad sobre la calidad del aceite. Bartolini et al. (1986), fijaron la tolerancia de plantas jóvenes de olivo en cultivo hidropónico en 4-5 gL<sup>-1</sup> de NaCl y Pastor et al. (1996) en una conductividad eléctrica de 4 dSm<sup>-1</sup> con cultivares que llegan hasta 6 dSm<sup>-1</sup>. Bartolini et al. (1991) y El-Saayed Emtihal (1996) asociaron la tolerancia del olivo a la sal con los acúmulos de sodio y cloro en la planta.

Las plantas cultivadas se han ido seleccionando y mejorando genéticamente a través de la historia, en función principalmente de caracteres de productividad y al crecer en suelos de buena calidad se han olvidado otros caracteres genéticos como su

mejor adaptación al medio. Esto ha originado que los cultivos, cada vez más productivos, estén peor adaptados a circunstancias adversas. Por el contrario, en las plantas no cultivadas, en especial aquellas que viven en ambientes desfavorables, ha existido y existe una selección natural que permite la supervivencia sólo de especímenes mejor adaptados al estrés correspondiente.

Los olivos no cultivados o marginales que viven en zonas de marisma con altos niveles de salinidad deben tener mayor resistencia al estrés. Estos genotipos, con un potencial genético interesante, están en franca recesión o incluso en peligro de extinción. En consecuencia, la caracterización, selección y propagación de clones de olivo bien adaptados a condiciones de estrés, constituye un material con un alto valor ecológico (para ayudar a la conservación de determinados paisajes), genético (al disponer de un germoplasma de interés) y agrícola (como plantas o portainjertos más tolerantes). En consecuencia, en este capítulo se considera la caracterización y selección de plantas bien adaptadas a medios con elevada salinidad (NaCl), que permitan la obtención de líneas clónicas tolerantes a este estrés abiótico.

## II.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### II.2.1. ELECCION DE LAS ZONAS DE ESTUDIO.

Se eligieron dos zonas en las que existen plantas de olivo y que por su situación en áreas de marisma están sometidas a un ambiente fuertemente salino. La primera de ellas es una isla arenosa llamada “Raboconejo”, situada en el extremo Occidental del spits arenoso de la Cascajera, en la zona central de la isla de Saltés, dentro del Paraje Natural Marismas del Odiel (Huelva) (Figura II.1). La segunda, forma parte de los esteros en las salinas de San Fernando (Cádiz), (Figura II.2) en el Parque Natural Bahía de Cádiz, denominada “Lagolargo”. Estas dos zonas salinas se compararon con las condiciones existentes en la colección de olivos del Banco Mundial de Germoplasma de Córdoba.(Figura II.3 a y b).

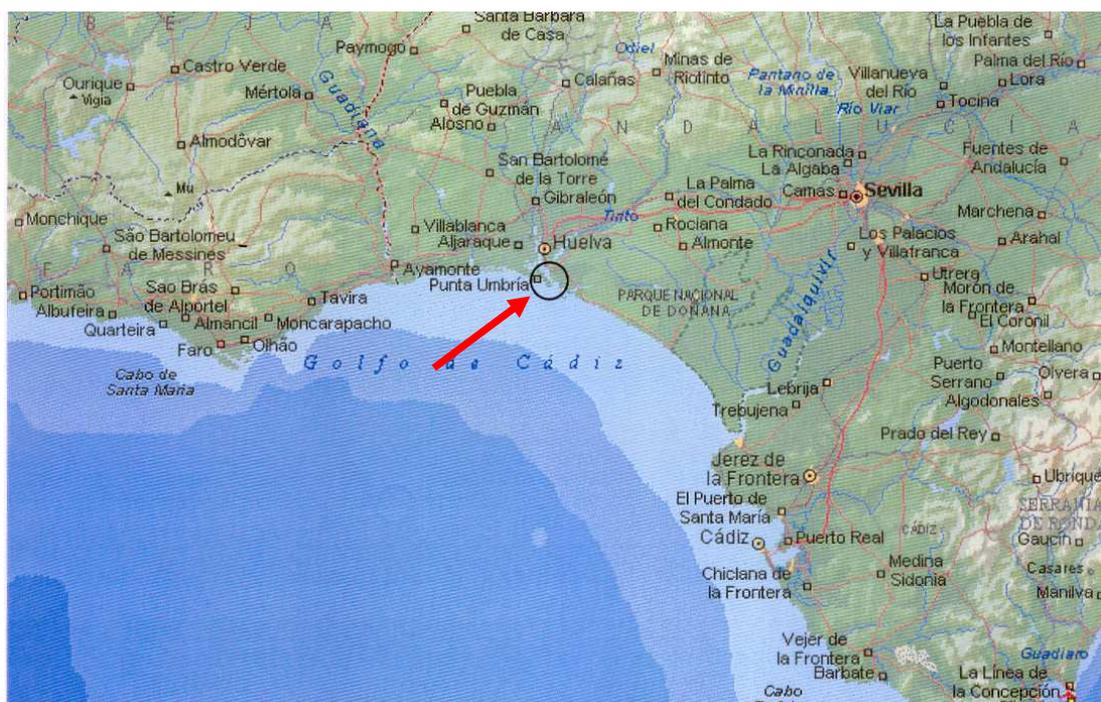


Figura II.1. Mapa de situación de la zona “Raboconejo” en la Isla de Saltés (Paraje Natural Marismas del Odiel. Huelva)

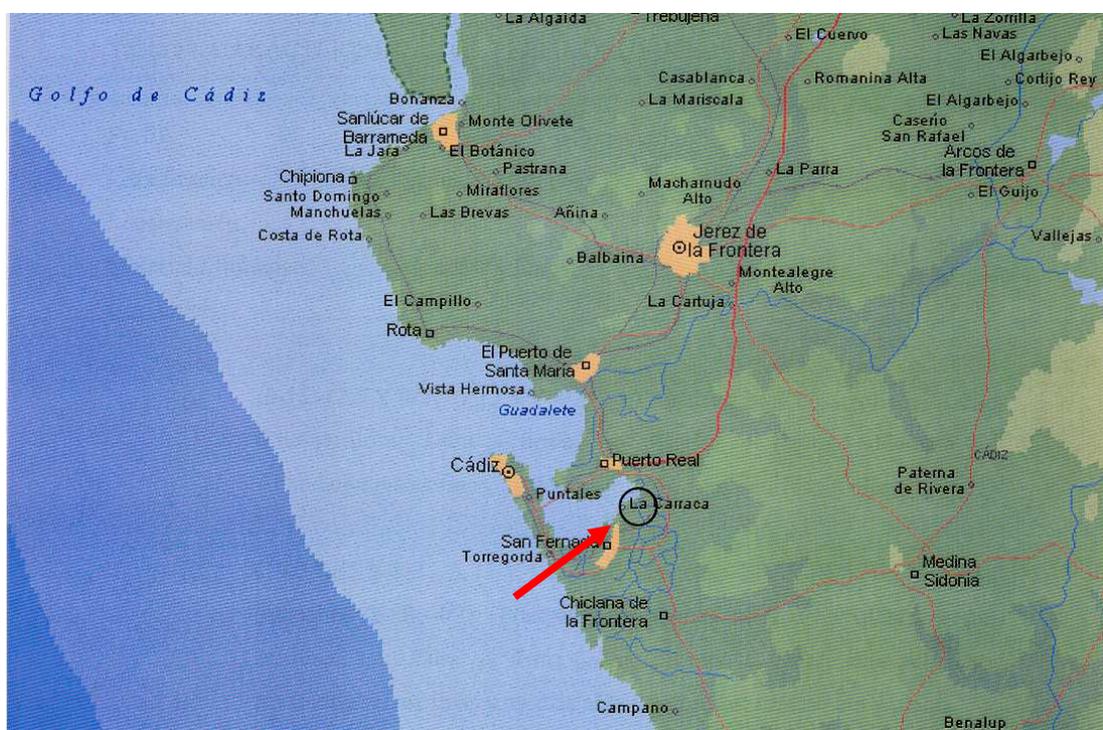


Figura II.2. Mapa de situación de la zona Lagolargo (Paraje Natural Salinas de San Fernando. Cádiz)

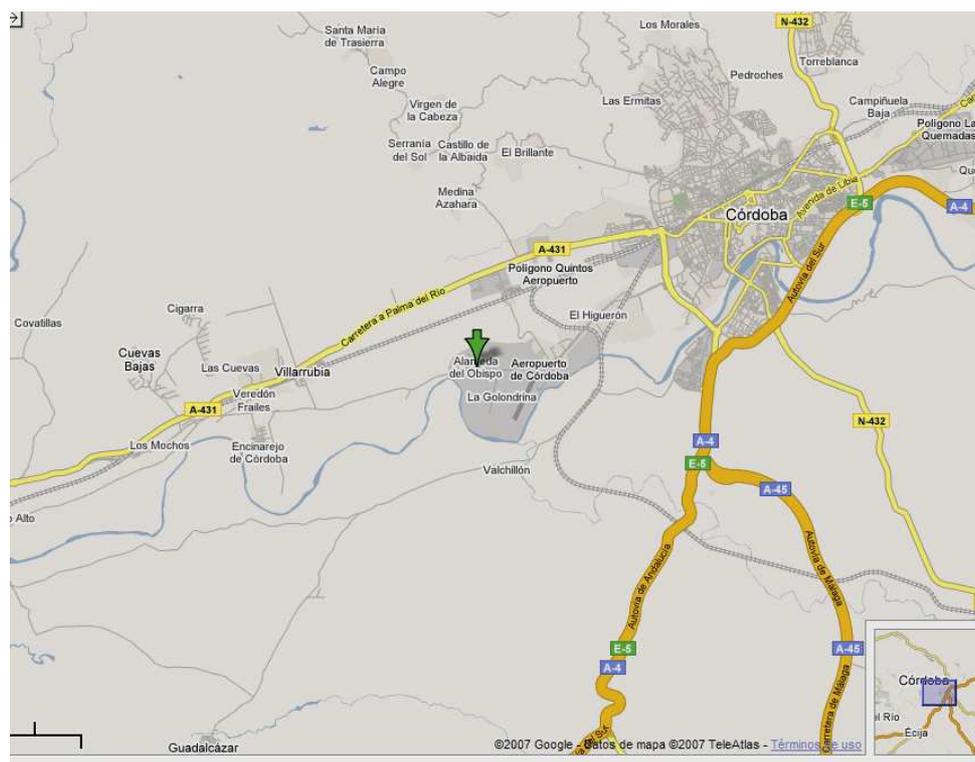


Figura II.3a. Mapa de situación del Banco Mundial de Germoplasma (Alameda del Obispo. Córdoba)



Figura II.3b. Banco Mundial de Germoplasma de Córdoba.

## II.2.2 TOMA DE MUESTRAS DE SUELO.

En las dos zonas salinas se realizó una calicata (1x1x1.2 m) a pie de árbol para el estudio del perfil del suelo, y para la toma de muestras de raíces.

Para conocer la influencia del clima sobre el grado de salinización se establecieron dos épocas de toma de muestras, una invernal de frío y lluvias y otra estival calurosa y seca. Con independencia de la profundidad de cada horizonte del perfil del suelo, las muestras de fertilidad se tomaron cada 30 cm., en la pared del mismo.

En la parcela de Córdoba al no tener carácter salino no se realizó calicata, sino que se tomó una muestra de 0-60 cm. de profundidad, para determinar la fertilidad del suelo.

## II.2.3. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE SUELO.

En cada muestra se tomaron 2 Kg. de suelo que se introdujeron en una bolsa de plástico debidamente etiquetada que se llevó al laboratorio. En el caso de “Raboconejo” debido a la presencia en las muestras de numerosas conchas, se separaron éstas del verdadero suelo. En todos los casos las muestras se secaron molieron y tamizaron sobre malla de 0,5 mm. Así preparadas, se determinaron los parámetros que se detallan a continuación. En todos los casos se utilizaron los métodos en uso en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología del CSIC en Sevilla, como se indica seguidamente.

### II.2.3.1 Preparación del extracto de saturación

Para la preparación del extracto de saturación, se utilizaron vasos de precipitado de vidrio de 250 y 600 ml, embudos de Büchner, soporte de filtros, papel filtro, bomba de vacío y recipientes de extracto.

Para la preparación de la pasta saturada, se pesó una cantidad conocida de la muestra de suelo (secada y tamizada) en recipiente de plástico de boca ancha y se le añadió agua bidestilada hasta alcanzar el punto de saturación, de la forma descrita por Richards (1973). Se dejó reposar durante 1 h, y se filtró a través de papel de filtro, en placa filtrante Richards mediante vacío. El extracto se volvió a filtrar a través de fibra de vidrio Whatman GF/C.

Los análisis se efectuaron inmediatamente después de la extracción, evitando así el deterioro de las muestras y la aparición de microorganismos.

#### II.2.3.2. Determinación del pH

El pH de los suelos se determinó en un pH-metro de membrana de vidrio conectado a un microprocesador CRISON MicroPH2002, en extracto 1:5 suelo:agua (Métodos Oficiales de Análisis del Ministerio de Agricultura, 1986).

#### II.2.3.3. Determinación de la conductividad eléctrica (C.E.)

La conductividad eléctrica (C.E.) se midió en extracto de pasta saturada en conductímetro conectado a un microprocesador CRISON MicroCM2201, con constante de célula de 0,977. El resultado se expresa en  $\text{dSm}^{-1}$  a 25 °C.

#### II.2.3.4. Determinación del sodio y potasio solubles

El sodio y el potasio se determinaron en los extractos de suelo por fotometría de llama a 589 nm, tras una dilución 1:10 con una solución de Cs y Al (1,1 g CsCl y 27,7 g de Al (NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 9H<sub>2</sub>O por litro) para evitar interferencias de ionización (Wallinga et al., 1995). Las determinaciones se hicieron frente a curvas patrón preparadas en la misma matriz que las muestras.

#### II.2.3.5. Determinación del cloro

A la muestra se le realizó una extracción acuosa 1:5, y el Cl disuelto fue determinado espectrofotométricamente con un autoanalizador AA3 de Bran+Luebbe con el método del tiocianato de mercurio. La lectura se produjo a 480 nm. (Fixen et al., 1988).

#### II.2.3.6. Determinación del fósforo disponible

El fósforo disponible se determinó por el método Olsen (Olsen et al., 1954). Se extrajo con solución de NaKCO<sub>3</sub> a pH 8,5 y el fósforo en el extracto se midió por colorimetría, con molibdato amónico y ácido ascórbico como reductor (Murphy y Riley; 1962; Watanabe y Olsen, 1965). El color azul desarrollado fue medido frente a una curva patrón a 880 nm.

#### II.2.3.7. Determinación de la materia orgánica oxidable

Los niveles de carbono orgánico se obtuvieron por el método clásico de Walkley y Black (1934), mediante oxidación con dicromato potásico en medio de ácido sulfúrico concentrado y retrovaloración con sal de Mohr. Para ello se procedió pesando una muestra de suelo (10 g) en un erlenmeyer de 500 ml, y adición de dicromato potásico 1 N y ácido sulfúrico concentrado agitando tras cada adición para obtener una mezcla homogénea.

El porcentaje de materia orgánica se obtuvo multiplicando el contenido de carbono orgánico por el factor 1,724.

#### II.2.3.8. Determinación del carbonato cálcico

El carbonato cálcico se obtuvo por tratamiento del suelo con ácido clorhídrico y medida del volumen de anhídrido carbónico desprendido en un calcímetro de Bernard.

El resultado se expresa como % de CaCO<sub>3</sub> sobre suelo seco.

#### II.2.3.9. Determinación del calcio y magnesio solubles

El calcio y el magnesio solubles de los extractos de suelo se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica (equipo PERKIN ELMER 1100 B). Las muestras se analizaron en medio clorhídrico (HCl al 2%), y en presencia de óxido de lantano al 10%. Las medidas se realizaron frente a patrones en iguales condiciones que las muestras.

#### II.2.3.10. Determinación del nitrógeno

El nitrógeno del suelo se determinó siguiendo el método Kjeldahl (Jackson 1962).

### II.2.4 MATERIAL VEGETAL

En las dos zonas salinas se seleccionaron plantas de olivo de origen desconocido, silvestres (*Olea europea subsp. silvestris*) o dejadas de cultivar, con mayor sometimiento al estrés (mayor CE del terreno, y exposición a los vientos marinos), y mejor adaptadas a dichas condiciones (desarrollo, producción, estado de nutrición, morfología de las hojas).

En la colección de Córdoba se utilizaron plantas de los cultivares Galego (*Olea europea subsp. sativa var. minúscula*, Gouan), Lechín de Sevilla (*Olea europea subsp.*

*sativa* var. *ovalis*, Clem.), Picual (*Olea europaea* subsp. *sativa* var. *rostrata*, Risso), Arbequina (*Olea europaea* subsp. *sativa* var. *herdensis*, Colm.), Manzanilla de Jaén (*Olea europaea* subsp. *sativa* var. *pomiformis*, Clem), Cornezuelo de Jaén (*Olea europaea* subsp. *sativa* var. *ceraticarpa*, Clem), Cañivano (*Olea europea* subsp. *sativa* var. *garciae*, M.R), Jabaluna (*Olea europaea* subsp. *sativa* var. *lagascae*, Mart. Robl.)

#### II.2.5. TOMA DE MUESTRAS DE HOJAS.

En las zonas salinas se muestrearon hojas de todos los individuos seleccionados. Las fechas de toma de muestras fueron el mes de Julio, para la época seca y cálida, y el mes de Enero para la época húmeda y fría.

En el banco de germoplasma de Córdoba se tomaron las muestras en el mes de Julio.

Se escogieron hojas jóvenes pero maduras, que habían alcanzado su tamaño máximo y lignificación, de ramos representativos del estado general del árbol.

#### II.2.6. TOMA DE MUESTRAS DE RAÍCES.

La toma de muestras de las raíces se realizó en el mes de Julio, para la época seca, y en el mes de Enero para la época húmeda, tomándose a 0-20; 20-40 y 40-60 cm. de profundidad. En cada caso se muestrearon las raíces presentes tanto finas como gruesas.

#### II. 2.7. DETERMINACIONES ANALÍTICAS DEL MATERIAL VEGETAL.

En las muestras se determinaron los nutrientes: N, P, K, Ca, Mg, Na, Cl, Cu, Fe, Mn, Zn y B. En todos los casos se utilizaron los métodos en uso en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología del CSIC en Sevilla, como se indica a continuación.

##### II.2.7.1. Preparación de las muestras

Todas las muestras se lavaron con agua y detergente y se enjuagaron cuidadosamente con agua destilada. Para su desecación, se envolvieron por separado en un papel de filtro y se introdujeron en una estufa con circulación de aire a 60 °C, durante 2 ó 3 días. Una vez secas se molieron en un molinillo y el polvo se introdujo en un sobre de papel.

#### II.2.7.2. Determinación de Na, Ca, P, Mg, K, Fe, Mn y Zn

Se realizó mediante la técnica de emisión de plasma (Hamilton, 1980). El plasma se realiza a través de digestión asistida por microondas en un sistema cerrado, de 0.5 g de muestra vegetal molida y seca, con 4 ml de ácido nítrico concentrado (65%).

La determinación en el extracto final resultante se realizó en un ICP-OES modelo Advantage de Thermo.

#### II.2.7.3. Determinación de nitrógeno

El procedimiento consistió en pesar 0.2 g de cada muestra vegetal e introducirlos en tubos de vidrio. Se les añadieron 0.5 g de  $K_2SO_4$  anhidro y selenio (catalizadores de digestión), y 5 ml de  $H_2SO_4$ . La digestión se llevó a cabo en sistema Kjeldahl a  $380^\circ C$  con ácido sulfúrico concentrado, y determinación del amonio resultante en un autoanalizador de flujo segmentado con detector espectrofotométrico modelo AA3 de Bran+Luebbe.

#### II.2.7.4. Determinación de boro

Se pesaron 0.5 g de cada muestra en una cápsula de platino. Se introdujeron en un horno, donde se dejaron aproximadamente 2 horas a  $450^\circ C$  hasta calcinación. Una vez calcinadas las muestras, se introdujo cada una en un tubo de plástico al que se le añadieron 2.5 ml de ácido acético al 5 %. Se centrifugaron a 14 r.p.m. durante 10 minutos, y el líquido claro se separó para ser utilizado, despreciando el resto.

De cada muestra de líquido, se tomaron 0.7 ml y se les añadieron los reactivos sulfato de hidracina y ácido sulfúrico. Cuando se enfriaron, se les añadió el indicador quinalizarina, para el desarrollo del color. Transcurrida una hora se comparó el color desarrollado en cada muestra con los correspondientes a una curva patrón con cantidades conocidas de boro.

#### II.2.7.5. Determinación de cloro

Para la preparación de los extractos de cada muestra, se pesan 0,05 g de muestra de polvo vegetal en cápsula de porcelana. Se mezcla la muestra con la cuarta parte de su peso con CaO y suficiente agua desionizada para hacer una pasta fina. Una vez seca la mezcla sobre placa caliente, se calcina en horno a  $500^\circ C$  durante 90 minutos.

Posteriormente se saca la muestra del horno y se deja enfriar a temperatura ambiente. Una vez seca se añaden 10 ml de agua desionizada caliente y se coloca el conjunto en placa caliente durante unos minutos. Posteriormente se agita cuidadosamente con una verilla de vidrio y se filtra sobre un matraz de 50 ml. Una vez lavado el residuo unas cinco veces con 10 ml de agua desionizada, se enfría y se lleva al volumen final (50 ml).

El primer reactivo está compuesto por 16 ml de  $\text{HNO}_3$  en 1000 ml de agua destilada, añadiendo 1 ml de una solución al 30% de Brij-35. Para el desarrollo del color se utilizó un segundo reactivo compuesto por 65 ml de una solución de tiocianato de mercurio (4,17 g de tiocianato de mercurio llevados hasta 1000 ml de metanol), 65 ml de solución de nitrato férrico (202 g de nitrato férrico más 31,5 ml de ácido nítrico enrasando a 1000 ml de agua destilada) llevado la solución final a 1000 ml de agua desionizada para posteriormente añadir 1 ml de una solución Brij-35 al 30%).(Fixen et al., 1988).

Para obtener la curva patrón se disuelve 1,65 g. de NaCl en 1000 ml de agua destilada (solución madre), a partir de esta solución madre se obtienen soluciones de 100, 200 y 300 ppm y utilizando éstas se prepara la curva patrón añadiendo 50 ml de agua destilada (punto 0); 5 ml de la solución de 100 ppm y posteriormente enrasando con agua destilada hasta 50 ml (punto 10 ppm); 5 ml de la solución de 200 ppm y enrasando con agua destilada hasta 50 ml (punto 20 ppm) y 5 ml de solución de 300 ppm y enrasando con agua destilada hasta 50 ml (punto 30 ppm).

La determinación final se lleva a cabo mediante un autoanalizador de flujo segmentado con detector espectrofotométrico modelo AA3 de Bran-Luebbe.

## II.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### II.3.1 CARACTERES EDÁFICOS DE LA ZONA “RABOCONEJO”.

Las Marismas del Odiel se sitúan en el Suroeste de España, en la margen derecha de la desembocadura del río de ese nombre, donde se une con el río Tinto constituyendo la ría de Huelva. Su superficie se aproxima a las 8800 Ha, que se integran en los términos municipales de Huelva capital, Gibraleón, Aljaraque y Punta Umbría, con cuyas poblaciones limitan respectivamente al Este, Norte, Oeste y Sur.

Según Rubio (1994) están constituidas por diversas formaciones cuaternarias recientes de arenas, limos y arcillas. Se encuentran integradas en un sistema de estuario de sedimentación con una dinámica de crecimiento elevada e influida en superficie por los cambios de mareas. Todo el conjunto está rodeado por formaciones terciarias.

Por tratarse de marismas de estuario con distintos estadios evolutivos, incluyen ecosistemas litorales en proceso de formación, marismas mareales y continentalizadas, así como ecosistemas de arenales costeros. Esto unido a unas características especiales del medio físico (mareas, salinidad, microtopografía, etc), confieren al paraje una enorme riqueza y variedad de hábitats y paisajes.

Las Marismas del Odiel forman una típica marisma mareal o de estuario que según Chapman (1974) se definen como “áreas terrestres que bordean el mar, más o menos cubiertas de vegetación y sujetas a inundaciones periódicas por las mareas”. Estas inundaciones, en parte diarias (pleamar) o estacionales (temporales), son en gran medida responsables de su alta salinidad. De acuerdo con Corne (1979), citado por Rubio (1985), los factores inundación y salinidad, presentan gradientes que se relacionan con la naturaleza heterogénea de los sedimentos y la microtopografía, siendo los que fundamentalmente condicionan la vegetación.

El río Odiel desemboca dividido en esteros y meandros que, por el aporte de arenas y la influencia de las mareas, forman zonas de agua escasa e incluso islas de varios kilómetros de largo, como la de Saltés, en la que se encuentra el gancho arenoso “Raboconejo” donde se sitúan las plantas de olivo base del estudio. En esta zona húmeda existe una gran variedad de especies vegetales. En la zona arenosa viven taray (*Tamarix canadiensis*); sabina negra (*Juniperus phoenicea*); coscoja (*Quercus coccifera*); olivo silvestre (*Olea europaea*); lentisco (*Pistacia lentiscus*); jaguarzo (*Halimium halimifolium*); jara (*Cistus salvifolium*); romero (*Rosmarinus officinalis*). La zona de marismas bajas y recientes más encharcadas dan cobijo a salicornias (*Salicornia*

*sp*) y espartinas (*Spartina sp*) y en las marismas altas existen (Sosa jabonera) *Arthrocnemum macrostachyum* y espartina (*Spartina densiflora*).

La costa de Huelva se caracteriza por veranos secos con altas temperaturas seguidas de periodos de temperaturas moderadas con bajas lluvias (clima mediterráneo). Bajo estas condiciones, la evaporación es de importancia en la época calurosa y las sales se acumulan en superficie. Sin embargo, en la época lluviosa, la composición arenosa del suelo de la marisma por su alto índice de permeabilidad, dificulta la retención de sales en superficie favoreciendo así su lavado.

En las marismas, las mareas, la geomorfología y la vegetación se encuentran estrechamente relacionadas, determinando la evolución y el desarrollo de los suelos. Según la clasificación americana del “Soil Survey Staff” (USDA, 1975) en las marismas mareales se dan fundamentalmente los órdenes Entisoles y Aridisoles.

Los Entisoles se caracterizan por carecer o tener un ligero desarrollo de horizontes pedogénicos. El tiempo de formación ha sido muy corto (suelos Holocenos recientes), siendo frecuentes en llanuras aluviales que reciben aportes sedimentarios abundantes. En ellos existe una ausencia virtual de horizontes y una pequeña acumulación de materia orgánica en los 25 centímetros superiores.

Los Aridisoles son suelos que no poseen agua disponible para la vegetación durante largos periodos, mientras que la mayor parte del tiempo en el que el suelo es adecuado para el desarrollo de las plantas, el agua es salada o posee una tensión superior a los 15 bares. Son suelos recientes en los que el horizonte pedogénico es el resultado de traslocación y acumulación de sales. No existe vegetación o ésta es marcadamente halófito.

La zona elegida dentro de las Marismas del Odiel, es el llamado spits de la Cascajera que recorre de Este a Oeste la isla de Saltés, en la que se encuentran materiales diversos, desde fangos hasta arenas gruesas conchíferas. El spits de la Cascajera termina en un gancho arenoso llamado “Raboconejo” donde como se indicó antes se seleccionaron las plantas y se abrió la calicata. Como se observa en la Tabla 2.1, el perfil de la zona en estudio corresponde a un suelo Typic Xerosament. Estos suelos en general poco desarrollados, suelen carecer en su mayoría de los horizontes típicos presentes en suelos maduros que se encuentran en zonas independizadas de las mareas donde han alcanzado un equilibrio entre los procesos y fuerzas que actúan sobre los mismos (Rubio 1985). Aún siendo suelos jóvenes, a veces, los Typic Xerosament, por la presencia de materia orgánica en proporciones mínimas del 1,17% en el horizonte

A, se consideran dentro de los suelos mareales típicos de zonas costeras, estructuras desarrolladas que permiten el crecimiento de plantas no halófitas. Por este motivo, se denota una clara diferencia entre estos suelos y los presentes en otros ganchos arenosos de dunas embrionarias que se consideran zonas más jóvenes y cuya composición de suelo es habitualmente del tipo Typic Quatzipsamment, caracterizados por tener una cantidad de cuarzo superior al 95% y menor proporción de materia orgánica.

Aunque como se ha indicado estos suelos suelen ser poco desarrollados, típicos de depósitos arenosos, en el perfil en estudio se pudieron distinguir dos horizontes característicos (Figuras II.1 y II.2), que se describen en la Tabla 2.1

Tabla 2.1. Características del perfil del suelo

Perfil:	Marismas del Odiel.
Localización:	Gancho arenoso “Rabconejo”.
Material litológico:	Arenas.
Clasificación:	Typic Xerosament.
Horizontes:	

A: (0-40); materia orgánica y arena (27% en peso) y conchas (73 % en peso). Abundantes raíces finas, medias y gruesas.

C: (40-100); arena gruesa y conchas. Raíces finas hasta los 70 centímetros. Desde los 40 hasta los 80 centímetros, 16% en peso de arena gruesa y 84% en peso de conchas.

Desde los 80 a los 100 cm. (límite de profundidad estudiada) un 43% en peso de arena y un 57% de conchas.

Entre las características del perfil se puede destacar:

La presencia de materia orgánica en los primeros 40 centímetros de profundidad.

Hasta los 80 centímetros de profundidad la proporción de conchas supera en más de un 70 % en peso la composición del suelo.

A partir de los 80 centímetros la presencia de conchas disminuye casi hasta la mitad, y en relación a esto aumenta la proporción de arena fina.

En los primeros 40 centímetros, donde se concentra la materia orgánica, es donde se presenta la estructura más adecuada para el desarrollo de las raíces y la composición necesaria para la supervivencia de la planta.

A partir de los 90 centímetros de profundidad aparece arena fina húmeda. Esta humedad, tras los análisis de conductividad realizados, parece corresponder a la aparición de la capa freática de agua marina que inunda la zona en algún momento de marea alta.



*Figura II.1 Perfil de suelo. Zona “Raboconejo”. Marismas del Odiel (Huelva).*

La clasificación del suelo coincide con lo indicado por Rubio (1985), quien añade que es un suelo típico de los depósitos arenosos con drenaje libre, con un horizonte superficial donde se aprecia la presencia de materia orgánica mezclada con la

fracción mineral, que la distingue de otros suelos arenosos sobre depósitos más recientes.



*Figura II.2 Perfil de suelo. Zona “Raboconejo”. Marismas del Odiel (Huelva).  
Detalle.*

### II.3.1.1 Características de Fertilidad del Suelo en la Época Estival (seca).

En la tabla 2.2, se presentan algunas características que definen la fertilidad química del suelo a partir de las muestras tomadas en verano (estación seca).

Tabla 2.2. Caracteres de fertilidad del perfil del suelo de la zona “Raboconejo” de Marismas del Odiel (Huelva) realizado en la estación seca.

Profundidad cm.	pH	CaCO <sub>3</sub> %	M.O. %	C org. %	N %	P disp. ppm	K disp. ppm	Cl meqL <sup>-1</sup>	Na meqL <sup>-1</sup>	C.E. dSm <sup>-1</sup>
0-30	7.47	12.1	3.03	1.76	0.24	14.4	105	152.4	91.8	8.52
30-60	7.74	12.1	1.35	0.78	0.07	2.9	29	61.9	54.4	4.04
60-90	8.27	16.4	0.36	0.21	0.04	0.5	16	43.8	31.2	3.68
>90	7.93	9.4	0.31	0.18	0.03	1.6	43	210.3	115.6	14.05

En la tabla 2.3, a título comparativo, se presentan los resultados analíticos del suelo cultivado de la colección de Córdoba.

Tabla 2.3. Caracteres de fertilidad del perfil del suelo de zona cultivada. Colección mundial de germoplasma. CIFA. (Córdoba).

Profundidad cm.	pH	CaCO <sub>3</sub> %	M.O. %	C org. %	N %	P disp. ppm	K disp. ppm	Cl meqL <sup>-1</sup>	Na meqL <sup>-1</sup>	C.E. dS/m <sup>-1</sup>
0-60	8.00	17.1	1.62	0.94	0.113	14.2	394	3.26	2.80	0.565

Así mismo, para una mejor comparación, en la tabla 2.4A y en la 2.4B se clasifican los niveles disponibles de nitrógeno y materia orgánica en suelo, y se detallan los caracteres de fertilidad de un suelo definido como “óptimo” por González y Troncoso (1972) para el cultivo del olivo en Sevilla.

Tabla 2.4 A. Niveles de materia orgánica y nitrógeno disponibles en suelo. (González y Troncoso, 1972).

Parámetro	Unidad	Nivel				
		Muy bajo	Bajo	Medio	Alto	Muy Alto
Materia Orgánica	%	-	<1	1-2	2-3	>3
Nitrógeno	%	<0.06	0.06-0.1	0.1	>0.1	-

Tabla 2.4 B. Caracteres de fertilidad de un suelo cultivado “óptimo” (González y Troncoso, 1972).

Suelo	Textura (%)			pH	CaCO <sub>3</sub> %	MO %	N %	P mgkg <sup>-1</sup>	cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>		
	Arena	Limo	Arcilla						Ca	K	Mg
Óptimo	50	25	25	7.6	25	1.8	0.1	85	15	0.4	1.8

Del mismo modo, en las tablas 2.5, 2.6, 2.7 y 2.8 se presentan otros parámetros del suelo que pueden ayudar a la evaluación de los resultados obtenidos.

Tabla 2.5. Niveles de salinidad según CE ( $\text{mmhos cm}^{-1}$  en extracto de saturación, referidos a  $25^{\circ}\text{C}$ ). (Interpretación de análisis de suelos, foliar y de agua de riego, Junta de Extremadura, 1992).

< 2	Suelo no salino. Efectos de sales despreciables
2-4	Ligeramente salino, pueden reducirse las cosechas de cultivos muy sensibles
4-8	Salino, se reducen las cosechas de numerosos cultivos
8-16	Muy salinos, solo cultivos tolerantes a la salinidad

Tabla 2.6. Criterios tentativos para evaluar la importancia de los constituyentes encontrados en extractos acuosos de suelos. (R.S. Ayers y D.W. Westcot; La calidad del agua en la agricultura; FAO;1984).

<i>Medición</i>	<i>Método y base de expresión de los resultados.</i>	<i>Gama normal encontrada en los suelo.</i>	<i>Gama satisfactoria para la mayoría de las plantas</i>	<i>Gama alta a excesiva</i>
Calcio	En extractos de saturación, $\text{meqL}^{-1}$	Menos de 0.10 a 10.0.	De 1.0 a 10.0	¿
Magnesio	En extractos de saturación, $\text{meqL}^{-1}$	Menos de 0.20 a 5.0.	Menos de 0.20 a 5.0	Más de 30.0
Sodio	En extractos de saturación, $\text{meqL}^{-1}$	Menos de 0.10 a 5.0	Menos de 0.1 a 3.5	Más de 15.0
Cloruros	En extractos de saturación, $\text{meqL}^{-1}$	Menos de 0.1 a 5.0	Menos de 0.1 a 3.5	Más de 15
Potasio	En extractos de saturación, $\text{meqL}^{-1}$	¿	1.0 a 5.0	Más de 5.0

Tabla 2.7- Interpretación del método Olsen para el elemento fósforo (ppm). (Consejería de Agricultura y Comercio, Junta de Extremadura; 1992).

Fósforo (ppm)	Muy Bajo	Bajo	Normal	Alto	Muy Alto
Suelo seco Suelto	0-4	5-8	9-12	13-20	21-32
Suelo seco franco	0-6	7-12	13-18	19-30	31-48
Suelo seco arcilloso	0-8	9-16	17-24	25-40	41-64

Tabla 2.8- Interpretación del método para el elemento potasio (ppm). (Consejería de Agricultura y Comercio, Junta de Extremadura; 1992).

Potasio (ppm)	Muy Bajo	Bajo	Normal	Alto	Muy Alto
Suelo secano Suelto	0-58	58-117	117-175	175-293	293-469
Suelo secano franco	0-78	78-156	156-234	234-391	391-625
Suelo secano arcilloso	0-97	97-195	195-293	293-488	488-782

La tabla 2.2 muestra que el pH de todo el perfil es marcadamente básico, como corresponde a un suelo salino, aunque bastante parecido al suelo calizo de Córdoba.

Los niveles de carbonato cálcico son más bajos que los indicados en la tabla 2.4B de referencia, pero suficientes para el desarrollo del olivo y bastante uniformes en todo el perfil. Su presencia se relaciona con la degradación de las abundantes conchas presentes en el terreno, ya que no existen rocas madres calizas.

Los contenidos de materia orgánica son muy distintos a lo largo del perfil y constituyen un factor muy importante para la clasificación del suelo y para la existencia en el mismo de vegetación. A su vez, la vegetación es responsable en gran parte de la presencia de materia orgánica en el terreno, encontrándose la mayor proporción de ésta (3%), en la capa superficial (0-30 cm.), donde se desarrollan y mueren las poblaciones vegetales. En el resto del horizonte A (hasta 40 cm.), la materia orgánica disminuye a la mitad, aunque todavía representa una cantidad suficiente para el crecimiento de las plantas como se puede comprobar por los valores reflejados en la tabla 2.4. En la primera parte del horizonte C (40-60 cm.), todavía se conserva un nivel suficiente de materia orgánica, pero a partir de dicha profundidad prácticamente ésta desaparece. En relación con lo indicado para la materia orgánica, el carbono orgánico (C. org.) se acumula principalmente en la capa superficial e inmediatas, hasta los 60 cm. de profundidad y después desciende drásticamente.

En cuanto a los contenidos en nitrógeno del suelo (Tabla 2.2) en concordancia con la materia orgánica, se observa una clara diferencia entre la capa superficial (0-30 cm.) y el resto de las profundidades (30-90 cm.). En la primera, donde se encuentra la mayor concentración de raíces del olivo, existe una proporción de nitrógeno mayor incluso que las encontradas en las zonas cultivadas de referencia (Tablas 2.4A, 2.4B), por lo que se considera esta disponibilidad de nitrógeno muy adecuada para el

desarrollo de las plantas. En capas de mayor profundidad (30-90 cm.) los niveles de nitrógeno descienden hasta concentraciones muy bajas.

Los contenidos de fósforo disponible guardan relación con lo indicado para la materia orgánica y el carbono orgánico. La mayor concentración se encuentra en la capa superficial, todavía se mantienen niveles apreciables hasta 60 cm. de profundidad y después bajan marcadamente. Sin embargo, los valores obtenidos de fósforo solo se encuentran dentro de los niveles normales de un suelo en los primeros 30 centímetros como se comprueba en la tabla 2.7. A partir de los 30 centímetros de profundidad, el fósforo disponible disminuye y pasa a niveles muy bajos.

El potasio disponible también presenta el mayor contenido en la capa superficial (0-30 cm.). Al igual que lo ocurrido con el fósforo, en el resto del perfil existen niveles muy bajos, en relación con los de la tabla 2.8 de referencia.

La zona superficial (0-30 cm.) contiene mayor proporción en iones sodio y cloro que las siguientes (30-90 cm.). Sin embargo, al llegar a la muestra de más de 90 centímetros de profundidad, se produce un ascenso acusado de las proporciones de Cl y Na. La muestra encontrada a partir de los 90 centímetros corresponde al nivel compuesto por arena fina húmeda, y el desmesurado aumento de los iones Cl y Na indica que la humedad presente en la arena debe corresponder a inundaciones esporádicas de la capa freática de agua marina. Por el contrario, la mayor proporción de Cl y Na en la capa superficial sobre la inmediata, puede deberse a la climatología de la zona en el periodo estival, donde las altas temperaturas en combinación con la sequía, facilita la evaporación y por consiguiente la acumulación de sales en las zonas superficiales del terreno. De esta forma existe una primera capa de salinidad alta que desciende a medida que se profundiza y disminuye la evaporación, pero que aumenta de forma drástica cuando se alcanza la zona que recientemente ha sido inundada por el nivel freático de agua marina.

En concordancia con los contenidos de Cl y Na, la conductividad eléctrica alcanza valores elevados en la capa superficial. ( $8.52 \text{ dS/m}^{-1}$ ), que se relacionan con suelos entre salinos o muy salinos (Tabla 2.5).

La conductividad eléctrica y los contenidos de sodio y de cloro son los que establecen las mayores diferencias con respecto al suelo cultivado de Córdoba y definen al suelo de “Rabconejo” como fuertemente salino. La salinidad elevada en la capa superficial, como se ha indicado antes se puede relacionar con la humedad del aire marino, con la mayor retención del terreno por la presencia de materia orgánica, y con

la alta evaporación debida a la climatología de la zona. Por el contrario, el alto contenido en NaCl de la capa profunda es atribuido a episodios de intrusión marina. Los datos obtenidos en cloro y sodio solubles de las muestras en estudio se consideran excesivos al compararlos con los de la tabla 2.6 de los constituyentes de extractos acuosos de suelos, donde más de  $15 \text{ meqL}^{-1}$  de cualquiera de estos dos iones se identifica como concentración excesiva.

En consecuencia, de acuerdo con los resultados obtenidos, el suelo en estudio, correspondiente a la zona “Raboconejo” del gancho arenoso de spit de marisma, es un Typic Xerosament cuya microtopografía algo elevada, la presencia de materia orgánica y nutrientes en el horizonte A y nivel freático marino profundo permite la presencia de plantas. No obstante, su carácter salino, sólo admite el desarrollo de especies vegetales adaptadas a dicho estrés ambiental.

En la tabla 2.3 se presentan los caracteres de fertilidad del suelo de un olivar cultivado. En éste caso se observa una gran diferencia de los contenidos de cloro y sodio con respecto a los presentes en el suelo de la zona de marisma, siendo en estos últimos hasta 30 veces superiores a los del campo de cultivo. En consecuencia, la conductividad eléctrica de las muestras de la colección de Córdoba es muy inferior a la medida en la zona de Raboconejo (Tablas 2.2 y 2.3). Las proporciones de materia orgánica, carbono orgánico y carbonato cálcico, son similares para la zona cultivada y para la zona de marisma, y el potasio disponible se encuentra muy por debajo en la zona de “Raboconejo” que en la zona cultivada.

#### II.3.1.2. Caracteres de Fertilidad del Suelo en la Época Invernal (húmeda).

En la tabla 2.9, se presentan algunas características que definen la fertilidad química del suelo a partir de las muestras tomadas en la estación húmeda. El pH y el contenido en  $\text{CaCO}_3$  son algo más elevados que los indicados antes para las muestras de verano, probablemente en relación con la presencia de caliza activa procedente de la descomposición de las conchas, lixiviada por el agua de lluvia. También aumentan los contenidos de materia orgánica, carbono orgánico y nitrógeno de la capa superficial, lo que obedece a la mayor presencia de plantas y actividad vital de microorganismos en dicha zona. Por el contrario, disminuye bastante la salinización del terreno (descenso de los contenidos de Cl, Na y C.E.) en relación con la estación anterior, lo que se relaciona

con el efecto de lavado provocado por las lluvias en un suelo muy permeable. No obstante, la capa superficial (0-30) es ligeramente salina, como se observa al comparar estos valores con la tabla de referencia (tablas 2.5 y 2.6), y todavía el nivel salino del terreno en esta capa es bastante más elevado que el del suelo cultivado de Córdoba (Tablas 2.3 y 2.9). El resto de profundidades contiene en niveles de Na y Cl, una gama satisfactoria para el desarrollo de la mayoría de las plantas (Tabla 2.6).

Como consecuencia de todos los estudios realizados en el suelo de esta área de la Marisma del Odiel se puede concluir que la parcela “Raboconejo” está formada por un suelo clasificado como “Typic Xerosament” con un horizonte A rico en materia orgánica y en nutrientes, lo que permite el desarrollo de plantas no halofitas como el olivo. Por su elevado contenido en Cl y Na y elevada CE, este suelo tiene un alto carácter salino, que viene alterado por el clima estacional. Así, la sequía y calor estival con fuerte evaporación de la humedad del suelo, incrementa notablemente la salinidad, mientras que las lluvias otoño-invernales asociadas a procesos de lavado disminuyen el nivel de sal. En cualquier caso, la presencia de plantas perennes como el olivo en condiciones aceptables de desarrollo indica un importante grado de adaptación al estrés salino.

Tabla 2.9. Caracteres de fertilidad del perfil del suelo de la zona “Raboconejo” de Marismas del Odiel (Huelva) realizado en la estación húmeda.

Profundidad cm.	pH	CaCO <sub>3</sub> %	M.O. %	C org. %	N %	P disp. ppm	K disp. ppm	Cl meqL <sup>-1</sup>	Na meqL <sup>-1</sup>	C.E. dSm <sup>-1</sup>
0-30	8.10	28.2	5.59	3.24	0.3	14.6	47	8.98	7.63	2.00
30-60	8.45	18.5	0.59	0.34	0.05	6.4	23	2.74	3.83	0.63
60-90	8.70	32.2	0.40	0.23	0.03	4.3	12	3.02	4.00	0.59

### II.3.1.3 Las plantas

Como se ha indicado en el capítulo anterior, la vegetación del spits de marisma viene condicionada por varios factores como posibilidades de inundación por agua marina, salinidad, microtopografía, tipo de sustratos, presencia de materia orgánica, nutrientes y profundidad del nivel freático marino. Junto a estas características del terreno, también es importante para la vida de la planta su grado de exposición a los vientos marinos.

En relación con los caracteres edáficos del área, la mayoría de las especies que se encuentran en este ecosistema son halofitas (matorral xeral y comunidades terminales de marismas). No obstante, existen algunas especies no halofíticas, arbóreas, como la sabina (*Juniperus oophora*) y el olivo (*Olea europea*) (Figuras II.3 y II.4) bien adaptadas al medio.



Figura II.3. Olivo “Raboconejo”. Marismas del Odiel (Huelva)

Entre los olivos del área (no cultivados) existen acebuches (*Olea europea sylvestris*) y otros asilvestrados, que pudieron haber sido cultivados en otras épocas, y que salvo por frutos más gruesos, son difíciles de distinguir morfológicamente entre sí. Dado que el criterio de selección fue, principalmente, el grado de adaptación al estrés salino, no se hicieron distinciones entre estos dos tipos de plantas. En cualquier caso, dadas las características salinas del terreno, el tipo de vegetación y la justa exposición a los vientos marinos cargados de humedad, se aseguró que las plantas estaban sometidas y adaptadas al estrés salino.



*Figura II.4. Olivo “Raboconejo”. Marismas del Odiel (Huelva)*

II.3.1.3.1. Distribución en el terreno y estado de nutrición de las raíces del olivo en el periodo estival (seco).

El perfil del suelo indicado en el apartado anterior (Figura II.2), corresponde a una calicata situada a pie de olivo, lo que sirve además para mostrar la distribución de las raíces de la planta, según la profundidad del terreno. En el horizonte A aparece la mayor densidad de raíces en una mezcla de gruesas de sostén y finas activas de absorción. En el horizonte C, hasta aproximadamente 70 cm. de profundidad sólo se encuentran raíces finas y en menor proporción que en la capa anterior. Probablemente estas raíces se habían desarrollado a partir de la última inundación de agua marina en fases de grandes mareas. Desde esa profundidad y hasta los 80 cm., sólo existen raíces secas, necróticas, que por una posible inundación mareal puntual o falta de oxígeno no han conseguido sobrevivir. A partir de los 90 cm. de profundidad, en coincidencia con la zona de arenas húmedas de intrusión marina, no se observan raíces. Es decir, que la gran mayoría de las raíces y con ello la vida de la planta, se desarrolla en los primeros 30-40 centímetros del terreno, que como se había indicado antes son los de mayor fertilidad. No obstante, en la época estival, sin lluvias, este horizonte A presenta unos contenidos de Cl y de Na y una CE muy elevada indicando un alto grado de salinización del suelo y en consecuencia una buena adaptación de la planta.

Como en el caso del suelo, y al objeto de tener un modelo comparativo del contenido de nutrientes en la raíz de las plantas de olivo seleccionadas en la zona salina

de “Raboconejo”, en la tabla 2.10 se detallan los niveles de nutrientes de raíces procedentes de olivos pertenecientes a la Colección Mundial de Germoplasma (CIFA) de Córdoba, zona no salina y con suelo de buena calidad y cuyos olivos se encuentran en perfecto estado de salud y desarrollo.

Tabla 2.10. Contenido de nutrientes en la raíz de las plantas de olivo de la zona cultivada del Banco Mundial de Germoplasma, (CIFA). Córdoba. (0-60 cm. de profundidad).

Zona	N %	P %	K %	Ca %	Mg %	Na %	Cl %	Cu mgkg <sup>-1</sup>	Fe mgkg <sup>-1</sup>	Mn mgkg <sup>-1</sup>	Zn mgkg <sup>-1</sup>
CIFA	0.97	0.08	0.93	1.14	0.18	0.014	0.02	36	1079	36	14

Tabla 2.11. Contenido de nutrientes en la raíz de las plantas de olivo seleccionadas en la zona "Raboconejo" de Marismas del Odiel en el periodo seco y caluroso.

Profundidad	N %	P %	K %	Ca %	Mg %	Na %	Cl %	Cu mgkg <sup>-1</sup>	Fe mgkg <sup>-1</sup>	Mn mgkg <sup>-1</sup>	Zn mgkg <sup>-1</sup>
0-30	0.68	0.01	0.28	2.55	0.10	0.36	0.49	12	199	12	15
30-60	0.35	0.04	0.21	0.55	0.04	0.10	0.40	2	36	6	10
60-90	0.44	0.04	0.24	4.75	0.14	0.47	1.01	7	317	11	5

En la tabla 2.11 se indican los contenidos de nutrientes en las raíces de las plantas de olivos seleccionadas en la zona salina, dividida en tres profundidades. Los contenidos de nitrógeno son bastante inferiores en todos los casos a los indicados en la tabla 2.10 para las plantas de la colección del Banco Mundial de Germoplasma de Córdoba, lo que se puede asociar con el efecto negativo sobre la absorción de nitrógeno que produce la presencia de sal en el medio (Deane-Drunsmund y Glass, 1982; Cram, 1983; Gorham et al., 1986; Aslam et al., 1984; Ward et al., 1986; Klobus et al., 1988). Dado que la mayor concentración de raíces, en coincidencia con contenidos muy altos de materia orgánica y de nitrógeno, se produce en la capa superficial (0-30 cm.) no se puede pensar en deficiencia del nutriente.

Como se indicó en el apartado anterior, el suelo en estudio se encuentra en déficit de fósforo, causa que podría justificar la baja concentración de fósforo en las raíces de los olivos de esta zona.

Los niveles de potasio en la raíz de las plantas de “Raboconejo” también son mucho más bajos que los de los olivos de Córdoba, lo que junto a los valores bajos de K en suelo se asocia a la presencia excesiva de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  en el medio, según lo indicado por Rathert,(1982) y Bartolini et al., (1991), como consecuencia del antagonismo  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  en la nutrición vegetal (Jeschke, 1984; Binzel y Reuveni, 1994; Tattini, 1994). El contenido de calcio de las raíces salinizadas, es algo superior en la primera capa al de las plantas cultivadas e inferior en la parte más profunda. Los niveles de magnesio son similares a los de referencia. Los valores de sodio son muy superiores en los olivos de marisma a los obtenidos en los olivos cultivados. La gran proporción de sodio y cloro presente en las raíces, en especial en la capa superficial, donde es hasta 26 veces superior al contenido de los olivos de la colección de Córdoba, determina una relación directa entre la concentración de Na en el suelo y la acumulación de éste en la raíz de la planta. La alta salinidad del medio aporta tal cantidad de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  a la planta que incluso los niveles alcanzados son superiores a los obtenidos por Benlloch et al., (1994); Tattini et al., (1994) en plantas sometidas a estrés salino por aplicación de soluciones de NaCl en condiciones de invernadero. Los niveles de los micronutrientes hierro, manganeso y cobre, son netamente inferiores a los de referencia, lo que se relaciona con la baja fertilidad del suelo. Como se observa en la tabla 2.11 la concentración de sodio y cloro en las raíces presentes en la capa superficial del suelo (0-30 cm.) es superior a la siguiente en profundidad (30-60 cm.), pero ambas son inferiores a las que se encuentran en las raíces del nivel más profundo (60-90 cm.), lo que relaciona la concentración de iones salinos en raíces con la concentración presente en el suelo por la proximidad del nivel freático. De esta forma, en superficie los niveles de cloro y sodio en suelo son altos al igual que los encontrados en las raíces superficiales. En la segunda capa en profundidad los niveles de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  en el suelo disminuyen al igual que en las raíces. En la zona más profunda (60-90 cm.), los niveles de cloro y sodio en las raíces aumentan por la proximidad de la capa freática más rica en dicho elemento. Existe en consecuencia, una correlación entre contenidos de Na y Cl en suelo y raíces.

Tabla 2.12. Contenido de nutrientes en hoja de las plantas de olivo seleccionadas en la zona “Raboconejo” de Marismas del Odiel, periodo seco y valores de referencia (Cantos et al., 2000).

Árbol	Macronutrientes %							Micronutrientes mgkg <sup>-1</sup>			
	N	P	K	Ca	Mg	Na	Cl	Cu	Fe	Mn	Zn
1	1.34	0.10	0.61	1.33	0.17	0.34	0.85	23	107	21	30
2	1.42	0.10	0.64	1.48	0.22	0.49	1.02	22	85	19	31
3	1.42	0.11	0.60	1.38	0.18	0.30	0.82	28	112	19	36
4	1.60	0.16	0.55	1.34	0.19	0.27	0.81	17	60	24	23
5	1.30	0.13	0.87	0.80	0.19	0.56	1.43	18	91	17	84
6	1.50	0.13	0.52	1.51	0.20	0.18	0.43	14	61	18	27
7	1.60	0.11	0.55	1.48	0.19	0.49	1.11	25	87	17	49
Referencia	1.95	0.11	0.86	1.42	0.20	0.02	0.02	39	54	74	18

Tabla 2.13. Niveles críticos de nutrientes en hoja de olivo. (Troncoso, A. Comunicación personal).

Elemento	Nivel Adecuado	Nivel Deficiente	Nivel Excesivo
Nitrógeno	1.5-2 %	< 1.2%	>3%
Fósforo	0.08-0.15%	<0.05%	Desconocido
Potasio	0.6-2%	<0.5%	-
Calcio	0.7-1.5%	Desconocido	>2%
Magnesio	0.1-0.2%	Desconocido	-
Sodio	0.08%	-	0.2%
Cloro	0.12%	-	0.5%
Boro	19-50 ppm	<5 ppm	>150 ppm
Cobre	4 ppm	-	-
Manganeso	20-50 ppm	<20 ppm	-
Hierro	50-100 ppm	<20 ppm	-
Cinc	30-60 ppm	-	-

En el caso de la hoja (Tabla 2.12) aunque con niveles de nutrientes distintos, se repite en gran medida lo indicado para la raíz. Así, se deben destacar los contenidos más bajos de nitrógeno, potasio, magnesio y cobre y las fuertes acumulaciones de sodio y cloro en las plantas sometidas a estrés salino en comparación con los niveles de

referencia. En consecuencia, existen nutrientes cuyos contenidos son afectados negativamente por la presencia de la sal, otros que no se modifican o lo hacen poco, y otros que aumentan su nivel. Se conoce que la salinidad reduce el contenido de nitrógeno en la planta (Cram, 1973; Deane-Drummond y Glass, 1982; Gorham et al., 1986) en especial debido al aumento  $\text{Cl}^-$  lo que reduce la absorción de  $\text{NO}_3^-$  (Aslam et al., 1984; Ward et al., 1986; Klobus et al., 1988). Aún encontrándose los niveles de nitrógeno por debajo de lo indicado en los valores de referencia, sus concentraciones se consideran dentro de los niveles adecuados, como se puede comprobar en la tabla 2.13. Así mismo, es bien conocido el descenso en los contenidos de potasio en planta cuando existe un exceso de sal ( $\text{NaCl}$  o  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) en el medio (Rathert, 1982; Bartolini et al., 1991) lo que se relaciona con el antagonismo  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  en la nutrición vegetal (Jeschke, 1984; Binzel y Reuveni, 1994; Tattini, 1994). Como se comprueba en la tabla 2.12, la gran mayoría de los valores de potasio se encuentran por debajo de los de referencia. No obstante, estas cifras están dentro o próxima a los niveles adecuados (Tabla 2.13).

El efecto de la salinidad sobre la nutrición fosforada, también depende de distintos factores (Grattan y Grieve, 1992) aunque existen antecedentes (Bartolini et al., 1991; Moreno, 2000) de que no se modifica en el olivo. Los valores de fósforo son iguales o superiores a los datos de referencia.

La poca influencia de la salinidad sobre los contenidos de calcio y magnesio en el olivo (Tablas 2.12 y 2.15) también fue indicada por varios autores para otras plantas (Gerard, 1971, Bernstein, 1964, Kent y Lauchli, 1985; Cramer et al., 1987, Lynch y Lauchli, 1985). Todos los resultados obtenidos se encuentran dentro del nivel adecuado en hoja en la planta de olivo. Existen menos conocimientos y unanimidad sobre la influencia de la salinidad en los contenidos de micronutrientes, aunque se acepta que su concentración en la planta depende de la especie vegetal, tejido (como se demuestra aquí en el caso del hierro), nivel de sal y del micronutriente y condiciones ambientales.

Por último, las acumulaciones en exceso, especialmente en hojas, de sodio y cloro son bastante frecuentes y conocidas tanto en olivo como en otras especies cuando el medio presenta una concentración elevada de estos iones. En consecuencia, la presencia de  $\text{NaCl}$  en el medio afecta claramente el equilibrio nutritivo de las plantas de olivo, en especial por descensos de nitrógeno y de potasio y aumentos de sodio y de cloro. Dada la existencia de antagonismos iónicos  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  y  $\text{Cl}^- - \text{NO}_3^-$  y las modificaciones indicadas para los contenidos de esos iones por la sal, se considera que las relaciones binarias  $\text{Na} - \text{K}$  y  $\text{Cl} - \text{N}$  tienen una gran importancia en definir la situación

de las plantas de olivo ante la salinidad (NaCl) del medio y por ello se consideran como marcadores fisiológicos de interés en su caracterización. Como se muestra en la tabla 2.12, las concentraciones de sodio y cloro obtenidas en las hojas en estudio se encuentran muy por encima de los valores de referencia, y en la mayoría de los casos del nivel excesivo de concentración de nutriente en hoja que se muestra en la tabla 2.13.

No obstante los desequilibrios nutritivos indicados y los niveles tan elevados de iones sodio y cloro en la planta debidos a la presencia de NaCl en el suelo y en la humedad del aire, que hacen pensar en toxicidad, las plantas en general crecen bien y producen abundantemente lo que indica su capacidad de adaptación a esas condiciones adversas y la posibilidad de ser utilizados como material de partida en la obtención de clones de olivo más tolerantes a la salinidad.

#### II.3.1.3.2. Estado de nutrición de las plantas de olivo de la zona “Raboconejo” en el período húmedo.

La tabla 2.14 indica el contenido en nutrientes de las raíces a distintas profundidades, en el periodo húmedo. El nitrógeno se encuentra, en todos los casos, por debajo de los resultados obtenidos en las raíces de los olivos de la zona cultivada y tomada como referencia (Tabla 2.10), circunstancia que, como se indicó, también se produjo en el periodo seco (Tabla 2.11). No obstante, si se comparan ambos periodos, se observa que los niveles de nitrógeno en raíces de superficie (0-30 cm.) se mantienen con valores similares, mientras que el nitrógeno de las muestras de raíces de mayor profundidad (30-90 cm.) de la época húmeda aumenta considerablemente. Este aumento del nivel de nitrógeno en las raíces profundas en este periodo, se puede asociar al aumento de la concentración de nitrógeno en suelo, a la mayor disponibilidad del mismo al haber más cantidad de nitrógeno disuelto por el agua de lluvia y a la disminución en el medio de NaCl por el efecto lavado y dilución producido por dicha agua de lluvia. Es conocido el efecto en la concentración de nitrógeno por la presencia de NaCl (Cram, 1973; Deane-Drummond y Glass, 1982; Gorham et al., 1986; Aslam et al., 1984; Ward et al., 1986; Klobus et al., 1988).

Tabla 2.14. Contenido de nutrientes en la raíz de las plantas de olivo seleccionadas en la zona "Raboconejo" de Marismas del Odiel en periodo húmedo.

Profundidad	Macronutrientes %							Micronutrientes mgkg <sup>-1</sup>			
	N %	P %	K %	Ca %	Mg %	Na %	Cl %	Cu	Fe	Mn	Zn
0-30	0.64	0.06	0.27	0.60	0.07	0.23	0.33	8	119	8	7
30-60	0.81	0.05	0.60	0.95	0.15	0.32	0.47	18	200	11	9
60-90	0.89	0.06	0.61	1.40	0.17	0.32	0.49	27	322	16	10

Al igual que en el caso del nitrógeno, los niveles de fósforo, potasio, y magnesio en las raíces profundas (30-90 cm.), alcanzan valores superiores a los obtenidos en el periodo seco, mientras que en las raíces superficiales (0-30 cm.), en ambas épocas, tienen valores similares. Estos hechos pueden relacionarse con los factores ya comentados para el caso del nitrógeno. Los resultados obtenidos para estos elementos se aproximan en concentración a los niveles obtenidos en las raíces de los olivos de la colección del Banco Mundial de Germoplasma de Córdoba, que han sido tomados como valores adecuados en la composición mineral de la raíz en el olivo (Tabla 2.10).

Los valores de calcio en las raíces parecen afectados por la presencia irregular de carbonato cálcico en todo el perfil procedente de la degradación de conchas marinas, que actúan como factor de alteración en la composición del suelo.

Los niveles de sodio y cloro en raíces superficiales (0-30 cm.) disminuyen en relación al periodo seco, en consonancia con la disminución de sodio en el suelo en la zona superficial debido al efecto de lavado de las lluvias. A mayor profundidad (30-60 cm.) aumentan con relación a la superficie, pero siguen siendo menores que los del periodo seco (Tablas 2.11 y 2.14). No obstante, todos los valores de concentraciones de sodio en las raíces a cualquier profundidad y en ambos periodos, son muy superiores a los datos obtenidos para las raíces de los olivos cultivados (Tablas 2.10, 2.11 y 2.14), por lo que se verifica que estos olivos de la zona salina asimilan las sales sódicas presentes en el medio y las acumulan en sus tejidos.

Todos los micronutrientes se encuentran en niveles similares a los obtenidos en el periodo seco y ambos a su vez parecidos a los obtenidos en los olivos cultivados, excepto el hierro que está en proporciones muy inferiores. En la tabla 2.14 se observa como en este periodo húmedo los micronutrientes, al igual que ocurre en el resto de nutrientes presentan contenidos inferiores en la capa superficial (0-30 cm.) que en las capas profundas (30-90 cm.).

Tabla 2.15. Contenido de nutrientes en hoja de las plantas de olivo seleccionadas en la zona “Raboconejo” de Marismas del Odiel, periodo húmedo y valores de referencia (Cantos et al., 2000).

Árbol	N %	P %	K %	Ca %	Mg %	Na %	Cl %	Cu mgkg <sup>-1</sup>	Fe mgkg <sup>-1</sup>	Mn mgkg <sup>-1</sup>	Zn mgkg <sup>-1</sup>
1	1.54	0.14	1.05	0.99	0.18	0.22	0.61	34	112	11	22
2	1.58	0.13	0.99	0.89	0.17	0.27	0.75	54	175	14	24
3	1.88	0.12	0.77	1.59	0.18	0.15	0.43	42	146	24	22
Referencia	1.95	0.11	0.86	1.42	0.20	0.02	0.02	74	39	54	18

Como se refleja en la tabla 2.15, los niveles de nitrógeno en hojas de las plantas en estudio en el periodo húmedo aumentan con respecto a los obtenidos en el periodo seco, aproximándose a los valores de referencia y estabilizándose en el rango considerado como adecuado (Tabla 2.13). Del mismo modo, existe un aumento generalizado del resto de los nutrientes a excepción del magnesio que aparece en iguales proporciones en relación a los valores resultantes en el periodo seco. Sólo el hierro y el cinc superan los valores tomados de referencia. Todos estos nutrientes se encuentran dentro de los niveles adecuados que se reflejan en la tabla de niveles críticos (Tabla 2.13). El sodio y el cloro en hoja disminuyen con respecto al periodo seco pero siguen siendo muy superiores a los valores obtenidos en las hojas de las plantas cultivadas, además de encontrarse dentro de los niveles considerados como excesivos en concentración de nutrientes en hojas de olivo. La disminución de sodio y cloro en el periodo húmedo puede deberse a la acción de lavado que provoca el agua de lluvia, reduciendo los iones en el suelo, con la consiguiente posibilidad de desarrollo de la planta en este periodo en condiciones de un menor estrés salino, que provoca una reducción de iones sodio y cloro en sus tejidos.

Los aumentos de nutrientes que se producen en este período se pueden asociar a una mayor disponibilidad hídrica en el terreno y a la disminución de la concentración de NaCl.

### II.3.2. “LAGOLARGO” (ESTEROS DE S. FERNANDO, PARQUE NATURAL BAHÍA DE CÁDIZ).

El Parque Natural Bahía de Cádiz está enclavado en la costa occidental gaditana y comprende la propia bahía de Cádiz y su entorno, que afecta a los términos

municipales de Cádiz, Chiclana de La Frontera, El Puerto de Santa María, Puerto Real y San Fernando. En este Parque Natural se encuentran los esteros o salinas de San Fernando donde se sitúan los olivos de la segunda zona estudiada (Figura II.2).

El Parque Natural Bahía de Cádiz es un humedal de importancia internacional de acuerdo con el convenio de Ramsar. Cuenta con una extensión de 10.000 hectáreas, repartidas en un auténtico laberinto de dunas, caños, marismas y playas y tiene la peculiaridad de estar formado por una serie de islas que conforman un territorio discontinuo. El área marismeña que configura prácticamente todo el Parque Natural está surcada por multitud de caños y canalizos, sometidos al influjo de las mareas. En bajamar se convierten en fangales, algunos con agua y otros sin ella, lo que le da su principal característica. Estas especiales condiciones de salinidad e inundación de las marismas y salinas de la Bahía, unido a la presencia de pinares y arenales costeros, han motivado la presencia de una flora característica adaptada a dichas circunstancias destacando la vegetación existente en las marismas de los Toruños, en el pinar de la Algaida y en la punta del Boquerón.

La historia geológica del Parque es relativamente reciente, habiendo quedado definido su paisaje en los últimos milenios. Durante los períodos glaciares pleistocénicos, el carácter torrencial de las aguas (río Guadalete), unida al descenso del nivel del mar, originaron depósitos de gravas sobre el basamento pliocénico de la bahía (Mayoral Alfaro, 1989; Zazo et al., 1994). El río Guadalete, entonces, desembocaba en un amplio estuario que se extendía desde el actual Puerto de Santa María hasta Sancti Petri, con las islas de Cádiz y San Fernando en su interior. Tras la glaciaciones el régimen hídrico cambió, sucediéndose entonces el arrastre de más arenas, limos y arcillas, que junto a la elevación paralela del nivel del mar acabaron por depositarse (Rodríguez Vidal, 1989). El contacto entre río y mar permitió la creación de barreras arenosas que fueron cerrando el estuario y a su vez incrementando el depósito sedimentario en el interior de la bahía, dando así lugar a miles de hectáreas actuales que conforman la marisma (Zazo, 1989; Zazo et al., 1994). El paisaje conformado de esta manera, y que actualmente se mantiene, reúne una serie de ecosistemas variados interrelacionados: playas, planicies fangosas, salinas, marismas, etc. El paisaje más representativo en todo el área de estudio es la marisma, ya que ocupa extensas superficies y ha constituido desde la antigüedad una fuente de recursos económicos para sus pobladores (Bejarano Palma, 1990, 1997). En el caso de las marismas de la Bahía de Cádiz, su origen es el resultado de la neotectónica que provocó el hundimiento de

ciertos sectores. La combinación de este proceso con los cambios del nivel del mar durante el Cuaternario dio lugar a una deposición de materiales de granulometría muy fina tales como limos y arcillas, que originaron suelos poco evolucionados del tipo entisol.

En la tabla 2.16 se indican las características del perfil del suelo correspondiente a esta zona.

Tabla 2.16. Característica del perfil del suelo

Perfil:	Lagolargo (Esteros de San Fernando)
Clasificación:	Aquic Xerofluvent
Localización:	Esteros.
Material Litológico:	Arcillas y limos.
Horizontes:	
<u>A:</u>	(0-15); (2.5 Y 5/2 <sub>(S)</sub> ); (2.5 Y 4/2 <sub>(H)</sub> ); Poliédrica bien desarrollada; Areno-limo-arcillosa; Dura <sub>(S)</sub> , firme, no plástica y ligera, adherente <sub>(M)</sub> ; Abundante raíces finas, medias y gruesas. Límite difuso y plano.
<u>AC:</u>	(15-35);(5 Y 5/2 <sub>(S)</sub> ); (5 Y 5/2 <sub>(S)</sub> con manchas 19Y R 4/4) (2.5 Y 4/2 <sub>(H)</sub> ) (manchas Y R 4/3); Prismática columnar bien desarrollada; areno-arcillosa; muy dura <sub>(S)</sub> , firme <sub>(H)</sub> ; no plástica y ligeramente adherente; frecuentes raíces finas y medias algunas gruesas; límite neto y plano.
<u>C:</u>	(35-45); (10 Y R 4/2 <sub>(S)</sub> ) (10 Y R 4/2 <sub>(H)</sub> ); prismática; areno-arcillosa; muy dura <sub>(S)</sub> , firme <sub>(H)</sub> ; no plástica y ligeramente adherente; escasas raíces finas. Límite difuso y plano.
<u>IIAC:</u>	<u>IIAC1:</u> (45-60); (10 Y R 4/3 <sub>(H)</sub> ); poliédrica fina; arcillo-arenosa; duro, fina <sub>(H)</sub> y ligeramente adherente y plástica; alguna raíz muy fina. Límite ligeramente difuso.
	<u>IIAC2:</u> (60-90); (características similares al C1).

Tabla 2.17. Análisis mecánico del suelo. Lagolargo (Esteros de San Fernando, Cádiz)

Horizonte	Prof.	Arena gruesa %	Arena fina %	Limo %	Arcilla %
A	0-15	29.8	2.4	21.4	46.4
AC	15-35	15.3	1.5	20.2	63.0
C	35-45	49.4	2.7	9.2	38.7
IIAC	45-60	65.8	2.0	4.5	27.7
IIAC	60-90	73.6	3.0	4.3	19.1

Por las características del perfil (Tabla 2.16), el análisis mecánico (Tabla 2.17) y la distribución irregular de la materia orgánica, (Tabla 2.18), se deduce que el suelo es un Xerofluvent. La formación de este suelo, por tanto, debió efectuarse por acumulaciones sucesivas de sedimentos transportados por el agua. Las manchas descritas en el perfil delatan este origen ácuico. Por ello el perfil sería del tipo Aquic Xerofluvent.

#### II.3.2.1 Fertilidad del suelo de la zona “LAGOLARGO” (Esteros de San Fernando), en la estación seca.

No obstante los horizontes del suelo indicados antes, para el estudio de la fertilidad del terreno se prefirió dividir el perfil en tres profundidades: una de 0-30 cm., correspondiente a la capa más fértil y aireada, una intermedia (30-60 cm.) y una más profunda (60-90 cm.) con posiblemente mayor influencia de la salinidad al estar más próxima al nivel freático marino. Así, en la tabla 2.18 se indican algunos caracteres de la fertilidad de cada una de esas capas.

En las tres capas y sin grandes diferencias entre ellas, el pH es más básico de lo que corresponde a los niveles de carbonato cálcico, lo que puede deberse al carácter salino del terreno. El mayor contenido de materia orgánica (MO) y de carbono orgánico se sitúa en la capa superficial.

Tabla 2.18. Caracteres de fertilidad de distintas profundidades del perfil del suelo. Época seca. Lagolargo (Esteros de San Fernando)

Prof.	pH	CaCO <sub>3</sub> %	C.org %	MO %	C.E. dSm <sup>-1</sup>	N %	P ppm	K ppm	Ca meqL <sup>-1</sup>	Mg meqL <sup>-1</sup>	Na meqL <sup>-1</sup>	Cl meqL <sup>-1</sup>
0-30	7.99	8.2	1.3	2.24	1.41	0.1	2.0	506	1.6	0.80	10.2	7.1
30-60	7.94	8.4	0.65	1.13	10.10	0.033	1.7	550	5.7	14.1	95.1	114.5
60-90	7.59	8.7	0.79	1.36	26.10	0.056	3.3	721	19.9	42.6	210.7	273.8

En coincidencia con lo indicado para materia orgánica y carbono, la mayor proporción de nitrógeno de este suelo se concentra en la capa superficial (0-30 cm.) donde se encuentran contenidos del 0.1 %, nivel considerado suficiente para el desarrollo de la planta de olivo (Tabla 2.4A y 2.4B). A partir de esta capa superficial y hasta el límite de la profundidad muestreada (30-90 cm.) los niveles de nitrógeno disminuyen hasta valores bajos para la nutrición de la planta (Tablas 2.4A y 2.4B).

El fósforo disponible se encuentra siempre con menos de 4 ppm. (Tabla 2.18), valor que se considera como muy deficiente (Tabla 2.7).

Los niveles de potasio disponible en esta zona de esteros se pueden clasificar como “muy altos” al superar en todas las profundidades muestreadas el valor de 250 ppm, límite de niveles normales para la concentración de este nutriente en un suelo (Tabla 2.8). No obstante, la mayor concentración se encuentra en la capa más profunda en la que se produce intrusión del agua del mar.

Los niveles de calcio para todo el perfil se encuentran dentro de la gama satisfactoria para el desarrollo de las plantas (Tabla 2.6) y como ocurre con el potasio también la capa profunda es la que presenta el mayor contenido de este nutriente.

Las proporciones de magnesio soluble son inferiores a 100 ppm valor determinado como “óptimo” para el desarrollo del olivo en cultivo (Tabla 2.4B). Como en nutrientes anteriores, también se observa aumento de magnesio en la capa profunda (60-90 cm.).

Aunque los contenidos de Na y Cl son elevados en todo el perfil del suelo, por lo que este se puede clasificar como salino, aumentan muy fuertemente con la profundidad (Tabla 2.18). Este comportamiento se asocia a que la salinidad está provocada por la intrusión de agua del mar en el horizonte más profundo del terreno y su ascensión por capilaridad entre las partículas de limo y arcilla. En la salinización de la capa superficial junto a la capilaridad intervienen otros factores como la humedad ambiental cargada de NaCl y la evaporación.

No obstante la elevada salinidad del suelo (a partir de los 30 cm. de profundidad supera hasta en 20 veces el nivel considerado como excesivo en la tabla 2.6) el olivo seleccionado, con muchas raíces entre 30 y 60 cm., parece bien adaptado a dichas condiciones en las que soporta conductividades eléctricas del orden de  $10.1 \text{ dS.m}^{-1}$ , muy superior a los  $4 \text{ dSm}^{-1}$  que Troncoso et al. (2001) consideran perjudicial para esta planta y a los  $6 \text{ dSm}^{-1}$  definido como límite para las variedades más tolerantes (Tabla 2.5)

En concordancia con lo indicado para Na y Cl, los valores de la conductividad eléctrica también aumentan con la profundidad.

### II.3.2.2 Fertilidad del Suelo de la Zona “LAGOLARGO” (Esteros de San Fernando) en la estación húmeda.

Tabla 2.19. Caracteres de fertilidad de distintas profundidades del perfil del suelo. Época húmeda. Lagolargo (Esteros de San Fernando).

Profundidad	pH	CaCO <sub>3</sub> %	N %	P ppm	K ppm	Ca meqL <sup>-1</sup>	Mg meqL <sup>-1</sup>	Na meqL <sup>-1</sup>	Cl meqL <sup>-1</sup>	C.E. dSm <sup>-1</sup>	C. org %	MO %
0-30	8.00	10.4	0.08	8.4	718	10.94	10.64	48.87	68.25	6.65	0.58	1.00
30-60	8.00	9.1	0.06	3.9	761	15.01	32.08	178.30	226.68	21.90	0.54	0.93
60-90	8.00	10.5	0.05	2.9	627	13.78	32.80	176.17	228.28	22.10	0.25	0.43

La capa superficial (0-30 cm.) es la que presenta el mayor porcentaje de nitrógeno con valores próximos a los niveles medios de zonas cultivadas (Tabla 2.19). Este valor es prácticamente igual al indicado para la misma capa en el periodo seco (Tabla 2.18). En las zonas más profundas, con niveles algo inferiores tampoco se observan grandes diferencias entre los dos periodos en comparación.

Los niveles de fósforo disponible alcanzan valores medios en la capa superficial (0-30 cm.) y bajos en las profundas (30-90 cm.) (Tabla 2.19). Con respecto al periodo seco, aumenta la concentración de fósforo en las capas más externas (hasta 60 cm.), lo que puede ocurrir por la activación del suelo con la llegada del agua de lluvia, bien por la mayor disolución de este nutriente de la estructura del suelo al extracto acuoso o bien por la actividad microbiana, que genera la degradación de la materia orgánica. Los niveles de fósforo en la capa profunda (60-90 cm.) se mantienen en valores cercanos a los obtenidos en el periodo seco.

Al igual que ocurría en la época seca las concentraciones de potasio para todo el perfil aparecen con valores elevados como se comprueba al comparar estos resultados con los de referencia para concentración de nutrientes en suelos (Tabla 2.8). Los niveles de potasio aumentan en los primeros 60 cm. de profundidad con respecto a la estación seca, y disminuyen levemente en la capa profunda (60-90 cm.), aunque en conjunto las variaciones son poco importantes.

Los niveles de calcio y magnesio son más elevados en las capas superficiales (0-60 cm.) con respecto al periodo seco, y disminuyen levemente en la capa profunda (60-90 cm.). Las diferencias con respecto a las concentraciones del periodo seco se atribuyen a los factores mencionados de mayor solubilidad de elementos por la

presencia del agua de lluvia. Los niveles de calcio en esta prueba se encuentran en toda la profundidad con concentraciones superiores a  $10 \text{ meql}^{-1}$ , valor máximo de los niveles satisfactorios para la nutrición mineral de la planta (Tabla 2.6).

Las concentraciones de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$ , junto a la conductividad del suelo indican la alta concentración de NaCl presentes en el medio, muy superiores a los valores de referencia (Tabla 2.6). Por lo tanto, las plantas que en ellos habitan sufren efectos de toxicidad debido a la presencia masiva de estas sales. En esta época lluviosa, las concentraciones de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  son superiores a las presentes en la época seca, y por consiguiente la conductividad eléctrica. Esto demuestra que la acción de lavado por el agua de lluvia no hace el mismo efecto que el producido en la zona arenosa de Raboconejo en la Marismas del Odiel, sino quizás el efecto contrario, al favorecer el ascenso por capilaridad de las sales desde el nivel freático hacia la superficie. En ambos periodos, la capa superficial es la que contiene menor concentración de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$ , ya que como se mencionó antes, la intrusión del agua del mar en las capas más profundas provoca mayor concentración salina que la que se produce en superficie por capilaridad y evapotranspiración. Todos los elementos solubles presentes en el suelo de esta zona en ambas épocas se encuentran en proporciones adecuadas o incluso excesivas dentro de los requerimientos nutricionales para las plantas como (Tablas 2.4A, 2.4B, 2.6, 2.7 y 2.8).

### II.3.3. LAS PLANTAS DE “LAGOLARGO” (ESTEROS DE SAN FERNANDO, CÁDIZ)

Como se indicó antes, la textura arcillo-limosa del suelo de San Fernando permite el ascenso por capilaridad del agua salada desde la zona más profunda del terreno, influenciada por el nivel freático marino, hasta la superficie. Este factor unido a la carga salina atmosférica debida a los vientos húmedos marinos crea una concentración de sales que afecta bastante a la vegetación.

La mayoría de especies que se encuentran en este ecosistema son plantas herbáceas cuyas raíces no superan los primeros 20 centímetros de profundidad (Figura II.5), zona en la que se encuentra la menor concentración de sal (Tablas 2.18 y 2.19).



*Figura II.5. Olivo “Lagolargo”. Esteros de San Fernando. Cádiz.*

Algunos olivos silvestres presentes (Figura II.5) justifican la tolerancia de esta especie y en particular de estos individuos al medio salino. En ellos, las raíces se extienden hasta profundidades medias (60 cm.) donde el alto contenido en sal (Tablas 2.18 y 2.19) indica que la planta sobrevive bajo condiciones de estrés.

#### II.3.3.1. Distribución de raíces en el suelo de los olivos de LAGOLARGO (esteros de San Fernando, Cádiz) en el período seco.

Desde la superficie hasta los 30 centímetros de profundidad en correspondencia con los horizontes A y B se encuentran raíces finas y gruesas abundantes. Entre los 30 y 60 centímetros, se produce un fuerte aumento de la conductividad eléctrica hasta 10.10 dS/m, y solo aparecen raíces finas, escasas y dispersas, presentes en su mayoría entre los 30 y 40 centímetros de profundidad. Entre los 50 y 60 centímetros se observan algunas raíces necróticas. Esta profundidad corresponde a los horizontes Bc y C1.

A partir de los 60 centímetros no se encuentran raíces. El suelo tiene una conductividad de 26.1 dS/m, lo que hace prácticamente imposible la vida vegetal

A los 85 centímetros de profundidad aparece agua procedente del nivel freático marino.

### II.3.3.2. Estado de Nutrición de las Plantas de Olivo de Lagolargo (Esteros de San Fernando, Cádiz) en el periodo seco.

Tabla 2.20. Contenidos en nutrientes en la raíz de las plantas de olivo seleccionadas en Lagolargo (Esteros de San Fernando, Cádiz). Época seca.

Profundidad	N %	P %	K %	Ca %	Mg %	Na %	Cl %	Cu mgkg <sup>-1</sup>	Fe mgkg <sup>-1</sup>	Mn mgkg <sup>-1</sup>	Zn mgkg <sup>-1</sup>
0-30	0.87	0.07	0.48	0.57	0.20	0.39	0.763	10	706	37	11
30-60	0.59	0.06	0.57	1.41	0.60	0.83	1.320	8	3000	114	12

En la tabla 2.20 se indican los contenidos de nutrientes en la raíz de las plantas de olivo seleccionadas en los Esteros de San Fernando en la época estival. No se considera la capa más profunda del perfil ya que en ella no se encontraron raíces. El contenido de nitrógeno es superior en las raíces superficiales (0-30 cm.) en consonancia con la mayor concentración de este elemento en el suelo, y la menor salinización. En cualquier caso, los niveles de nitrógeno de las raíces, son inferiores a los niveles de referencia de las raíces de olivos del Banco Mundial de Germoplasma de Córdoba, aunque el de las raíces de la capa superior es suficientemente elevado para ser considerado adecuado para la nutrición de la planta (Tabla 2.4A y 2.4B). También, como se ha indicado antes, en los primeros treinta centímetros se encuentra la mayor densidad de raíces del olivo en estudio. En esta profundidad, la concentración de nitrógeno del terreno no es inferior al contenido medio de este elemento en suelos cultivados, como se demuestra al comparar las tablas 2.18 y 2.4a. Por ello, no se puede considerar esta zona como deficitaria en nitrógeno, atribuyéndose la menor concentración del mismo en la raíz de la planta al exceso de NaCl en el medio (Cram, 1973; Deane-Drummond y Glass, 1982; Gorham et al., 1986).

Las concentraciones de fósforo en las raíces presentan niveles similares a los obtenidos en los olivos cultivados y similares a su vez a los valores medios de la tabla 2.7. No existe por tanto déficit de este elemento en los tejidos radicales.

El potasio está en menor proporción que los niveles de referencia de olivos cultivados (Tabla 2.8), y dado que los niveles de potasio disponible en este suelo se encuentran en valores considerados como excesivos, la disminución de potasio en la raíz de la planta puede deberse a la presencia excesiva de iones sodio. Es conocido el

descenso en los contenidos de potasio en planta cuando existe un exceso de sal (NaCl o Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) en el medio (Rathert, 1982; Bartolini et al. 1991).

Las concentraciones de calcio y magnesio son mayores en las raíces finas profundas (60-90 cm.), que en raíces gruesas y finas superficiales (0-30 cm.). Sólo las raíces superficiales contienen un nivel de calcio inferior al que existe en los olivos de referencia, encontrándose niveles superiores de calcio en las raíces profundas y en toda la profundidad en el caso del magnesio.

Sodio, cloro e hierro presentan unos niveles en las raíces de las plantas que superan claramente los de referencia. Como se indicó antes, el ascenso del agua marina por capilaridad a través del medio que caracteriza a este suelo, es responsable de las altas concentraciones de sales sódicas, mientras que los óxidos de hierro, que se reflejan en el perfil como manchas rojizas podrían justificar los altos niveles de este elemento. Las proporciones elevadas en el suelo de NaCl y óxidos de hierro hacen posible la asimilación y concentración por la planta de estos elementos en mayor proporción que las plantas situadas en zonas moderadas en sales, como se aprecia al comparar los datos obtenidos con los valores de referencia (Tabla 2.6). En la tabla 2.16 se observa como las raíces situadas en capas profundas donde la concentración de estos elementos es mayor, contienen también mayor proporción de Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup> y Fe<sup>2+</sup> que las raíces situadas en zonas superficiales. En consecuencia, existe una relación directa entre concentración de sales en el suelo y en raíces.

Tabla 2.21. Contenido en nutrientes en hoja en la época estival (seca) de las plantas de olivo seleccionadas en Lagolargo (Esteros de San Fernando, Cádiz) y valores de referencia (Cantos et al., 2000).

PARCELA	N %	P %	K %	Ca %	Mg %	Na %	Cl %	Cu mgkg <sup>-1</sup>	Fe mgkg <sup>-1</sup>	Mn mgkg <sup>-1</sup>	Zn mgkg <sup>-1</sup>
Lagolargo	1.72	0.12	0.53	1.39	0.24	0.68	1.10	10	103	37	24
Referencia	1.95	0.11	0.86	1.42	0.20	0.02	0.02	74	39	54	18

La tabla 2.21 muestra que los valores de nitrógeno en hojas se encuentran dentro del nivel adecuado para el desarrollo del olivo (Tablas 2.13 y 2.21), y en proporciones similares a las de los valores de referencia de hojas de olivos cultivados (Tabla 2.13).

Asimismo, las concentraciones de fósforo en hoja aparecen en proporciones similares a las presentes en los olivos cultivados de referencia (Tablas 2.13 y 2.21).

Las hojas de la planta también presentan contenidos adecuados de potasio, ya que sus niveles se sitúan entre 0.6 y 2 %.

Calcio y magnesio se encuentran dentro del nivel adecuado en hojas para el desarrollo del olivo (Tablas 2.13 y 2.21), y en proporciones similares a las de los valores de referencia de hojas de olivos cultivados (Tabla 2.21).

Al igual que ocurre en las raíces, las proporciones de sodio e hierro se presentan muy por encima de las obtenidas en hojas de olivos cultivados (Tablas 2.13 y 2.21). En el caso del sodio, las hojas de estos olivos presentan unas concentraciones muy superiores al nivel considerado como máximo admisible para el buen desarrollo de la planta, llegando a valores del 0.68 %, lo que implica que la planta se desarrolla bajo condiciones de estrés salino.

Los micronutrientes cobre, manganeso y cinc se encuentran en concentraciones adecuadas en hojas para el desarrollo del olivo (Tabla 2.13), y en proporciones similares a los valores de referencia de olivos cultivados (Tabla 2.3).

### II.3.3.3. Estado de Nutrición de las Plantas de Olivo de “Lagolargo” (Esteros de San Fernando, Cádiz) en el período húmedo

Como muestra la tabla 2.22, los contenidos en nitrógeno, fósforo y magnesio en raíces en esta época, son superiores a los valores obtenidos en el periodo seco (Tabla 2.18) y similares a los presentes en las raíces de los olivos cultivados de referencia (Tabla 2.8). Este aumento puede deberse a la mayor fertilidad del suelo en esta época y mayor disponibilidad hídrica, no obstante haber subido la salinidad.

Tabla 2.22. Contenidos en nutrientes en la raíz de las plantas de olivo seleccionadas en la época húmeda en Lagolargo (Esteros de San Fernando, Cádiz).

Profundidad	N %	P %	K %	Ca %	Mg %	Na %	Cl %	Cu mgkg <sup>-1</sup>	Fe mgkg <sup>-1</sup>	Mn mgkg <sup>-1</sup>	Zn mgkg <sup>-1</sup>
0-30	1.17	0.10	0.76	0.38	0.24	0.56	0.75	10	560	100	8
30-60	1.12	0.10	0.65	0.42	0.33	0.64	0.96	12	735	113	12

Los contenidos en potasio y calcio también son superiores a los obtenidos en el periodo seco, pero siguen siendo inferiores a los valores tomados de referencia para olivos cultivados (Tabla 2.10), posiblemente debido al factor antagónico que provoca la presencia en el medio de un exceso de sales sódicas.

Los contenidos en sodio y cloro presentes en las raíces continúan en el periodo húmedo muy por encima de los valores de referencia como se indica en la tabla 2.22. Se observa en este caso como las raíces superficiales (0-30 cm.) disminuyen su proporción

de sodio en comparación a las raíces más profundas, al ser menor también la proporción de sodio en la zona superficial del suelo. Se encuentra pues una relación directa entre la concentración de NaCl en el suelo y la acumulación de los iones salinos en raíces. La mayor proporción del resto de nutrientes en el extracto acuoso del suelo se relaciona de forma directa con la concentración en raíces. En el caso de los micronutrientes se observa como el manganeso se encuentran muy por encima de los valores de referencia mientras que hierro, cobre y zinc presentan cifras sensiblemente inferiores a las de los olivos cultivados. El hierro es el único de estos elementos que disminuye ostensiblemente en el periodo húmedo en relación al periodo seco.

Tabla 2.23. Contenido en nutrientes en hoja de las plantas de olivo seleccionadas en Lagolargo (Esteros de San Fernando, Cádiz) y valores de referencia (Cantos et al., 2000) en la época húmeda.

PARCELA	N %	P %	K %	Ca %	Mg %	Na %	Cl %	Cu mgkg <sup>-1</sup>	Fe mgkg <sup>-1</sup>	Mn mgkg <sup>-1</sup>	Zn mgkg <sup>-1</sup>
Árbol 1	2.13	0.14	0.90	1.43	0.22	0.31	0.92	10	155	42	21
Árbol 2	2.06	0.14	0.70	1.57	0.25	0.49	1.10	9	164	45	20
Referencia	1.95	0.11	0.86	1.42	0.20	0.02	0.02	74	39	54	18

El nitrógeno en hojas en este periodo está por encima del contenido indicado para la época estival y de los valores de referencia, aunque dentro del nivel adecuado que se presenta en la tabla 2.11, ya que se sitúa entre el 1.5 y 2%. El aumento de fertilidad del suelo en esta época debe haber influido en la concentración de este elemento en las hojas (Tablas 2.21 y 2.23).

Al igual que en el caso anterior, las concentraciones de fósforo, potasio, calcio y magnesio también son superiores a las obtenidas en el periodo seco, y sólo en el caso de potasio son inferiores a los resultados obtenidos en hojas de olivos cultivados (Tablas 2.21 y 2.23).

En este periodo se observa un descenso de la concentración de sodio de la hoja en comparación con los datos obtenidos en el periodo seco. Este hecho puede indicar al igual que en la zona anterior, que el aumento de humedad ambiental es asimilado por la planta a través de la hoja pudiendo disminuir la concentración de iones presentes en exceso, y reduciendo además el efecto de evaporación en la hoja. Si se toman como referencia los valores obtenidos en olivos cultivados, tal y como se refleja en la tabla 2.23, se observa que en las hojas de las plantas de los esteros la concentración de sodio en hojas es de hasta el 0.49 % continuando muy por encima de los niveles de referencia

en hojas de olivos cultivados y del nivel considerado excesivo que se refleja en la tabla de niveles críticos de nutriente en hojas de olivos (Tabla 2.13), situado en el 0.2 % del total de nutrientes.

Sólo para el cobre y el manganeso se encuentran proporciones algo inferiores a las presentes en hojas de olivos cultivados.

Por los resultados obtenidos en este capítulo, se concluye que el suelo del primer área seleccionada (Gancho arenoso Raboconejo de las Marismas del Odiel (Huelva) se clasifica como Typic Xerosament (Entisol) con salinidad elevada, con un primer horizonte A (40 cm.) de microtopografía elevada que obstaculiza las inundaciones por mareas y presenta contenido de materia orgánica y nutrientes. Junto a este existe un horizonte C (90 cm.) donde se encuentra el nivel freático marino. Debido a las características del horizonte A y a la profundidad del nivel freático encontrado en el horizonte C, esta zona permite la existencia de vegetación adaptada al medio salino, en especial halofitas. El suelo del segundo área seleccionada (Esteros de San Fernando, Cádiz) se clasifica como Aquic Xerofluvent, con salinidad elevada. Las características edafológicas y la alta salinidad que presenta este suelo, permiten el desarrollo de vegetación adaptada a este tipo de medio. Entre la vegetación indicada en ambas zonas, destaca la presencia de plantas de olivo que crecen y fructifican con bastante normalidad. Este comportamiento denota su buena adaptación al medio y el interés de su caracterización para poder ser usados como germoplasma en trabajos de mejora genética y, también para la mejor conservación de estas plantas.

Los análisis realizados a las plantas indican que la salinidad del medio influye claramente en el estado de nutrición de los tejidos (raíz y hojas) del olivo: provoca la disminución de algunos nutrientes en especial nitrógeno y potasio, modifica poco a otros como fósforo, calcio y magnesio e incrementa fuertemente los niveles de sodio y de cloro en concordancia con la sal presente (NaCl). Estas modificaciones fisiológicas, y en especial las relaciones binarias Na-K y Cl-N derivadas de ellas sirven como marcadores para caracterizar las plantas de olivo sometidas a estrés salino.

### **III. GERMINACIÓN *IN VITRO* DEL EMBRION DE OLIVO. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE SAL (NaCl) EN EL MEDIO DE CULTIVO**

#### **III.1 INTRODUCCIÓN**

La germinación de la semilla, dada su facilidad de transporte y conservación, fue el método de propagación inicialmente usado por los colonizadores fenicios, griegos, romanos, etc., en la expansión del cultivo del olivo en el Mediterráneo (Lavee, 1994). En épocas posteriores este procedimiento quedó relegado a la obtención de portainjertos debido a distintos factores como la germinación irregular (Lallatta, 1959; Milella, 1962), los bajos porcentajes de germinación (Roberts y Totterdell, 1981) y el excesivo tiempo necesario para que ésta se produzca (Nickell, 1951), junto al largo periodo improductivo (juvenilidad) que presenta la planta procedente de semilla (a veces 12 años) (Lavee, 1994), y a la obtención de plantas genéticamente distintas a la madre. En la actualidad, la germinación de la semilla del olivo como sistema de reproducción está tomando de nuevo protagonismo debido al fuerte incremento de los proyectos sobre mejora genética por hibridación (Troncoso et al., 1994), por lo que las limitaciones indicadas (bajos porcentajes y mucho tiempo) vuelven a cobrar importancia (Rugini, 1986; Bellini, 1993). La mejora genética se presenta como el camino más prometedor para aumentar la calidad del aceite de oliva, así como para acercar sus costes de producción a los de otros aceites vegetales. El disponer de métodos que incrementen el tanto por ciento de germinación de la semilla y acorten el tiempo de obtención de una plántula viable, con la consiguiente disminución del período de juvenilidad, es de gran interés. Por todo ello, es necesario conocer los sistemas para reducir las limitaciones indicadas para la germinación del olivo, y así obtener rápidamente las plantas necesarias en los programas de mejora de esta especie (Acebedo et al., 1997).

El endocarpo leñoso que cubre la semilla es el principal impedimento (primer motivo de latencia) en la germinación, al ser una barrera mecánica que obstaculiza la emergencia del hipocótilo y de la radícula, (Lagarda et al., 1983; Crisosto y Sutter, 1985; Troncoso et al., 1998) y que además dificulta la hidratación y oxigenación de la semilla (Mitrakos y Diamantoglou, 1984). Por estas causas, autores como Sotomayor y

Caballero, (1990); Troncoso et al., (1991); Lambardi et al., (1994); Voyiatzis, (1995), Acebedo et al., (1997), Troncoso et al., (1998); Liñán et al., (1999) eliminan el endocarpo dejando sólo la semilla, con lo que mejoran el nivel y el tiempo de germinación.

En el endospermo se producen fenómenos de dormancia química (endodormancia) que también afectan a la germinación de la semilla (Mitrakos y Diamontoglou, 1984), por lo que autores como Rugini, (1990); Troncoso et al., (1991); Sarmiento et al., (1994); Voyiatzis y Pritsa (1994); Voyiatzis (1995); Acebedo et al., (1997); Troncoso et al., (1998); Liñán et al., (1999) escinden y cultivan *in vitro* el embrión aislado, y así mejoran aún más el nivel y el tiempo de respuesta, alcanzándose germinaciones del orden del 100% en tan solo 10 días de cultivo (Troncoso et al., 1998; Liñán et al., 1999) y plantas totalmente viables a los 60 días (Liñán et al., 1999). En otras muchas especies vegetales también se realiza con éxito el cultivo del embrión maduro *in vitro* superando así los problemas de germinación (Lammerts, 1942; Vázquez y Vieitez, 1962; 1965; 1966; Vanstone y Ronald, 1982; Cantos et al., 1998).

Los factores limitantes en la germinación de semillas hacen además necesario el estudio del desarrollo evolutivo del embrión de olivo, sus posibilidades de germinación en fases previas a la maduración y el amplio abanico de posibilidades genéticas que se abren con la obtención de plantas viables de olivo a partir de embriones en desarrollo. La germinación de embriones inmaduros se utiliza en diferentes especies de plantas (melón, Adelberg et al., 1994; trigo, Altpeter et al., 1996; maíz, Bronsema et al., 1997; trébol, Rybczynski, 1997; Matthys-Rochon et al., 1998; mimosa, Burns and Wetzstein, 1998; pino, Li et al., 1998) con el fin de facilitar la regeneración de plantas a través de embriogénesis somática y obtener un material adecuado para la obtención de plantas transformadas (Labus-Schneider y Abel, 1991; Kuo y Smith, 1993; Altpeter et al., 1996; Navarro et al., 1997; Matthys-Rochon et al., 1998). Con los embriones de olivo, además, la germinación *in vitro* sólo tiene éxito después de que los embriones alcancen su tamaño definitivo, 70-80 días después de la floración (Voyiatzis y Pritsa, 1994; Liñán et al., 1999). En consecuencia, es conveniente la puesta a punto de métodos de germinación de embriones no maduros, y para conseguirlo es también importante conocer la evolución de los embriones tanto en condiciones naturales, como bajo condiciones de cultivo *in vitro*.

Una aplicación interesante del cultivo *in vitro* de embriones cigóticos inmaduros es la posibilidad de producir embriones somáticos y la posterior obtención de plantas

completas a partir de ellos (Rugini, 1988; Rugini y Caricato, 1995; Denchev et al., 1995; Kohmura et al., 1996; Kim et al., 1996 y Nayak et al., 1996) y una herramienta útil en los trabajos de biotecnología (Bommineni et al., 1993; Cabrera-Ponce et al., 1996 y Shoyama et al., 1997). En el caso del olivo, esta técnica se estudia por Orinos y Mitrakos, (1991); Rugini y Lavee, (1992); Leva et al., (1995) y Benelli et al., (2001).

El cultivo *in vitro* de protoplastos (Sumaryati et al., 1992; Gulati y Jaiwald, 1997; Dorion et al., 1999), células (Zenk, 1974; Dix y Street, 1975; Nabors et al., 1980; Winicov, 1996; Kura-Hotta et al., 2001) y callos (Babaeva et al., 1968, Chen et al., 1980; Orton., 1980; Pérez –Alfocea, 1991; Binh et al., 1993; Barakat y AbdelLatif, 1996; Basu et al., 1997; Shibli y Ai-Juboory, 2002) con NaCl en el medio, es una buena herramienta para el estudio de la salinidad. Sin embargo, la regeneración de una planta desde dicho material vegetal es complicada y no siempre posible, y la planta obtenida puede no conservar la tolerancia a la sal por la que fue seleccionado el protoplasto, la célula o el callo. Por esta causa otros autores prefieren utilizar otros materiales como embriones somáticos derivados de microsporas (Hafizur-Rahman et al., 1995), discos foliares (Marschner y Possingham., 1975), brotes (Skene y Barlass, 1988; Cano et al., 1998; Troncoso et al., 1999), o plantas (Barlass y Skene., 1981; Alhag Dow et al., 1999). La buena respuesta *in vitro* del embrión de olivo (Troncoso et al., 1994), su elevada variabilidad genética y la posibilidad de inducirle variaciones somaclonales *in vitro*, hacen de él un material vegetal muy interesante para ser usado en el estudio de la salinidad *in vitro*. Ben-Hayyin et al., (1989) destacan el interés del cultivo *in vitro* del embrión para conocer en poco tiempo su tolerancia a la sal sin interferencias de suelo o clima.

En consecuencia con lo indicado los principales objetivos de este capítulo son:

- Conocer el proceso de desarrollo del embrión de olivo y sus posibilidades de germinación, en relación con la edad, tamaño y fase de partida en el cultivo de dicho embrión.
- Utilizar partes del embrión cigótico inmaduro para obtener embriones somáticos y plantas a partir de ellos.
- Definir el momento más adecuado dentro de la evolución natural del embrión para su uso como material de partida en la obtención de plantas de olivo tolerantes a la sal y la formación *in vitro* de líneas clónicas a partir de las plantas anteriores.

### III.2. MATERIAL Y MÉTODOS

#### III.2.1 1ª PRUEBA: DESARROLLO Y GERMINACIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES CIGÓTICOS DE OLIVO.

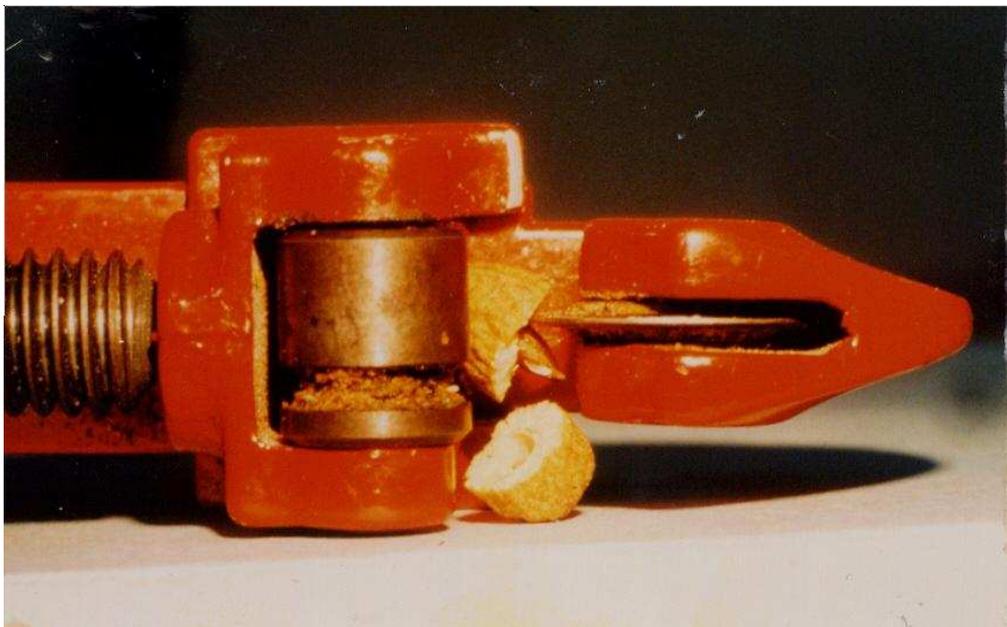
Se utilizaron frutos procedentes de olivos cv. Manzanillo de 30 años de edad que se cultivan en régimen de regadío en la finca experimental “La Hampa” propiedad del CSIC en Coria del Río (Sevilla). Los frutos se recolectaron alrededor de la copa de cada árbol, a la altura del ojo humano, en fechas consecutivas desde la floración (Tablas 3.4 y 3.5). La floración completa se determinó cada año de muestreo como el momento en que había abierto más del 50 % de las flores en al menos el 75 % de las inflorescencias (Rallo y Fernández-Escobar, 1985), lo que en los años considerados ocurrió entre el 15 y el 30 de Abril.

En cada toma de muestra los frutos se dividieron en dos grupos: (1) para medir el nivel de desarrollo del fruto, la semilla y el embrión, y (2) para seguir el desarrollo a nivel morfológico del embrión cigótico “*in vitro*” y determinar su capacidad de germinación en cada fase de desarrollo.

(1) Determinación del desarrollo del fruto, semilla y embrión. (Media de 8 años de toma de muestras, 4 anteriores y 4 en el periodo de la Tesis). Se estudiaron 25 frutos por cada muestreo a los que se les midió con un calibrador la longitud de sus ejes longitudinal y transversal. A continuación, se eliminó la pulpa y el endocarpo leñoso dejando la semilla sin cubierta y se midió la longitud de los ejes longitudinal y transversal. Después, se aisló el embrión como se indica más adelante y bajo lupa binocular se fotografió y se midió la longitud de los ejes principales del mismo.

(2) Evolución y germinación del embrión “*in vitro*”. (Media de 5 años de experimentación, 1 anterior y 4 durante la Tesis).- Hasta los 65-70 días tras la floración, los frutos se desinfectaron por inmersión en hipoclorito sódico, con 2% de cloro activo y unas gotas de Tween 20 durante 15 min. a 26°C y agitación, y a continuación se lavaron tres veces con agua destilada y estéril. Seguidamente se extrajo la semilla y se cortó por la mitad transversalmente, para obtener una de las porciones que contenía el embrión intacto rodeado por un pequeño volumen de endospermo gelatinoso, y se utilizó así para el cultivo *in vitro*.

En fechas posteriores, la semilla cubierta ya por el endocarpo leñoso, se extrajo del fruto y se le eliminó dicha cubierta con un cortatubos (Figura III.1) (Sotomayor y Caballero, 1990).



*Figura III.1. Ruptura del endocarpo leñoso y liberación de la semilla desnuda.*

La semilla sin endocarpo se desinfectó por inmersión en una solución de hipoclorito sódico (3,33 % en cloro activo) durante 20 min. a 26° C con agitación, seguida de tres lavados con abundante agua destilada y estéril (Figura III.2).



*Figura III.2. Semilla de olivo desnuda tras el proceso de desinfección.*

Tras la desinfección se hidrataron durante 48 h. en cápsulas de Petri con agua, lo que provocó una hinchazón que facilitó la posterior extracción del embrión. A continuación trabajando bajo lupa en la cámara de flujo (condiciones asépticas) se extrajo el embrión tras la realización de dos cortes laterales longitudinales en el endospermo y presión sobre el embrión visible por uno de ellos, lo que provocó su salida por el opuesto (Sarmiento et al., 1994). (Figuras III.3 y III.4).

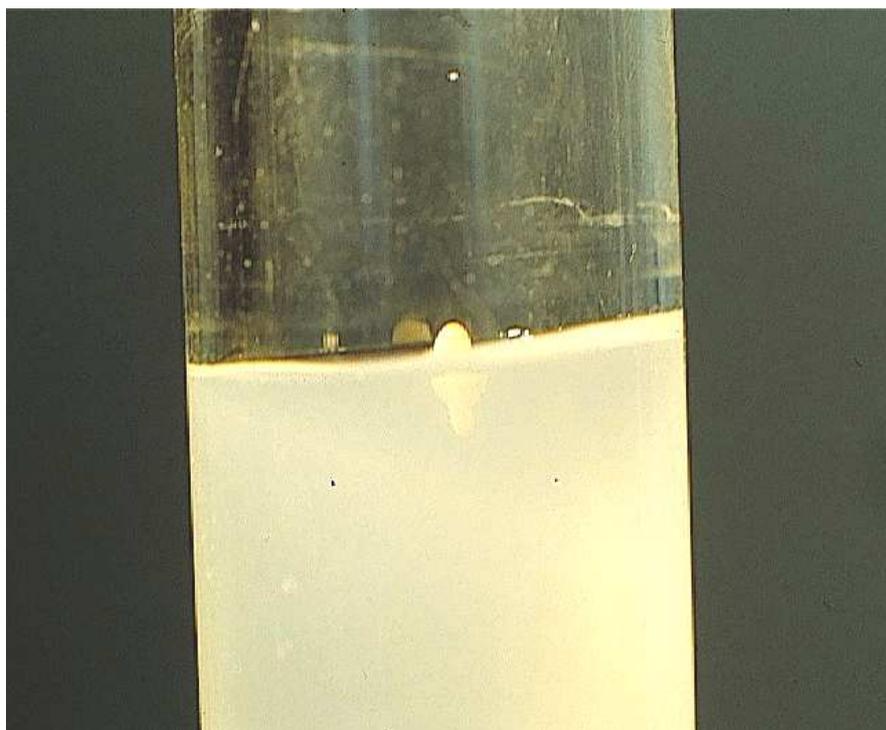


*Figura III.3. Extracción del embrión de olivo.*



*Figura III.4. Embrión de olivo aislado.*

Para el cultivo *in vitro*, la mitad (50) tanto de las medias semillas con el embrión en formación, como del embrión aislado, de cada muestreo, se colocaron individualmente (Figura III.5) en tubos de ensayo estériles (21x150 mm) conteniendo 10 cc de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) a 1/3 de concentración (Tabla 3.1). La otra mitad de las medias semillas con embrión y embriones aislados se sembraron del mismo modo pero adicionando al medio MS 1/3, 0,25 mgL<sup>-1</sup> de zeatina.



*Figura III.5. Embrión aislado sembrado in vitro*

Los tubos de ensayo con el material vegetal se cubrieron con capuchones de polipropileno cuyos bordes se sellaron al tubo respectivo con parafilm y se colocaron en una cámara de cultivo a  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $30 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidad luminosa y 16 h. de fotoperiodo.

Para el control de la evolución de los embriones *in vitro*, se realizó un seguimiento visual continuado de los tubos en la cámara y para los estudios morfológicos se tomaron muestras semanales durante todo el periodo de cultivo *in vitro* y de cada fecha de muestreo, y se observaron y fotografiaron bajo lupa binocular.

Tabla 3.1 Composición del medio base de cultivo utilizado para la germinación de semillas *in vitro*. Medio de Murashige y Skoog (1962).

<u>MACRONUTRIENTES</u>		<u>mgL<sup>-1</sup></u>	<u>mM</u>
NITRATO POTASICO	KNO <sub>3</sub>	1900	18,79
NITRATO AMONICO	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	20,61
CLORURO CALCICO	CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	440	3,00
SULFATO DE MAGNESIO	MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	370	1,50
FOSFATO ACIDO POTASICO	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	1,25
<u>MICRONUTRIENTES</u>			
SULFATO DE MANGANESO	MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	22,3	0,1
ACIDO BORICO	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	0,1
SULFATO DE CINC	ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	8,6	0,03
MOLIBDATO DE SODIO	Na <sub>2</sub> Mo <sub>2</sub> O <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,25	7,5x10 <sup>-4</sup>
SULFATO DE COBRE	CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,025	1,0x10 <sup>-4</sup>
CLORURO DE COBALTO	CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,025	1,0x10 <sup>-4</sup>
IODURO DE POTASIO	KI	0,83	5,0x10 <sup>-3</sup>
<u>QUELATOS</u>			
SULFATO DE HIERRO	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8	0,10
Na <sub>2</sub> EDTA		37,5	0,10
<u>VITAMINAS</u>		<u>mgL<sup>-1</sup></u>	<u>μM</u>
TIAMINA		0,10	0,29
PIRIDOXINA		0,50	2,43
Ac. NICOTÍNICO		0,50	4,06
MIO-INOSITOL		33,3	
		<u>g/l</u>	
AGAR		5	
MANITOL		15	
pH		5.7	

### MODIFICACIONES

Excepto el manitol, mio-inositol y agar, el resto de compuestos fueron utilizados siempre a un tercio de su concentración original que muestra la tabla.

### III.2.2 2ª PRUEBA: OBTENCIÓN Y PROPAGACIÓN DE EMBRIONES ADVENTICIOS (SOMÁTICOS).

Se utilizaron trozos de cotiledones obtenidos de embriones inmaduros de frutos de la variedad Manzanillo procedentes de la prueba anterior, recolectados en los muestreos de 80 a 85 y 85 a 90 días tras la floración.

Para la obtención de la semilla sin endospermo, su desinfección y aislamiento del embrión, se empleó el mismo procedimiento descrito antes. Una vez aislado el embrión y trabajando en las condiciones asépticas de la cámara de flujo se cortaron pequeños cuadrados ( $\cong 2 \times 2$  mm) de los cotiledones.

Para la fase de inducción, los cuadrados de cotiledones de cada embrión se sembraron juntos en una cápsula de Petri con el medio que se indica en la Tabla 3.2 (Leva et al., 1995) y se cultivaron a 24°C y oscuridad.

Transcurridos 60 días en fase de inducción, las masas embriogénicas con embriones somáticos en diferentes estadios de desarrollo, se trasladaron individualmente a tubos de ensayo (21x150 cm.) con 10 cc del medio, que se indica en la Tabla 3.2, pero sin reguladores de crecimiento donde se cultivaron a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $30 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  de iluminación y 16 horas de fotoperíodo (fase de expresión).

Por visión directa y por fotografías secuenciales de las muestras bajo lupa binocular, se siguió el proceso embriogénico completo hasta la formación de nuevas plantas.

Tabla 3.2. Composición del medio de cultivo. (Leva et al., 1995).

MACRONUTRIENTES			
		mgL <sup>-1</sup>	mM
NITRATO POTÁSICO	KNO <sub>3</sub>	950	9.39
NITRATO DE AMONIO	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825	10.30
CLORURO DE CALCIO	Cl <sub>2</sub> Ca . 2 H <sub>2</sub> O	470	3.20
FOSFATO ÁCIDO DE POTASIO	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85	0.625
SULFATO DE MAGNESIO	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	185	0.750
SULFATO DE HIERRO	FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	13.5	0.048
EDTA Na <sub>2</sub> EDTA		18.65	0.050
MICRONUTRIENTES			
		mgL <sup>-1</sup>	μM
SULFATO DE MANGANESO	MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	21.92	130.47
ACIDO BÓRICO	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	12.40	200.00
SULFATO DE ZINC	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	4.300	15.00
MOLIBDATO DE SODIO	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.125	0.515
SULFATO DE COBRE	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.125	0.050
CLORURO DE COBALTO	CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.125	0.052
IODURO DE POTASIO	IK	0.410	10.000
VITAMINAS			
		mgL <sup>-1</sup>	μM
TIAMINA		10	29.60
MIOINOSITOL		100	555.00
PIRIDOXINA		1	4.86
ACIDO NICOTÍNICO		1	8.12
ACIDO ASCÓRBICO		10	56,70
REGULADORES DE CRECIMIENTO			
		mgL <sup>-1</sup>	μM
ÁCIDO NAFTALÉN ACÉTICO (ANA)		0.5	2.68
2-ISO PENTENIL AMINO-PURINA (2iP)		0.1	0,5
		gL <sup>-1</sup>	mM
SACAROSA		30	58,42
AGAR		0.6%	
pH		6.2	

### III.2.3 3ª PRUEBA: SELECCIÓN *IN VITRO* DE CLONES DE OLIVO TOLERANTES A LA SAL (NaCl).

En un primer experimento se utilizaron (como material de partida) frutos de los cultivares de olivo Arbequina, Cañivano, Cornezuelo de Jaén, Galego, Jabaluna, Lechín de Sevilla y Picual, todos cultivados en el Banco Mundial de Germoplasma de Olivos de Córdoba (España), y de plantas de olivo no cultivadas que crecían bien en las áreas salinas de Raboconejo (marismas del Odiel) y Lagolargo (Salinas de San Fernando). La recolección se realizó en el mes de Septiembre cuando los frutos, semillas y embriones habían alcanzado el tamaño máximo (envero). Se eliminó la pulpa y el endocarpo leñoso de cada semilla como se indicó antes, (Figura III.1), dejando a ésta sin cubierta. A continuación se desinfectó por inmersión en una solución de hipoclorito 30:1 (v/v) durante 15 min. (Sarmiento et al., 1994) y después se lavó varias veces con agua destilada y estéril. Seguidamente, las semillas de una misma procedencia se depositaron juntas en cápsulas de Petri (50 semillas por cápsula de 15 cm. de diámetro) en agua destilada y estéril, durante 48 h. a 24 °C y oscuridad. De este modo, se les provocó una hinchazón que facilitó el aislamiento del embrión, lo que se realizó como se indicó en el capítulo anterior, cortando dos secciones laterales longitudinales del endospermo sin interesar al embrión y presionando por uno de los huecos salió el embrión completo por el opuesto (Figuras III.3 y III.4). Todas estas operaciones se hicieron en condiciones asépticas en cámara de flujo laminar. La prueba se realizó con 25 embriones por variedad y concentración salina, lo que hizo un total de 225 embriones por variedad.

Para la germinación *in vitro*, cada embrión aislado se colocó en un tubo de ensayo estéril (21x150 mm) con 10 ml de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) a 1/3 de concentración en agar 0,5%, sin reguladores de crecimiento y adición respectivamente de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 gL<sup>-1</sup> de NaCl equivalentes a 0, 17, 34, 51, 68, 86, 102, 120, 137 mM, lo que determinó una conductividad eléctrica en cada medio de 0.632, 2.1, 3.63, 4.98, 6.74, 7.76, 9.36, 10.4 y 11.84 dSm<sup>-1</sup> respectivamente. Cada tubo se cubrió con un capuchón de PVC cuyo borde se selló al vidrio con Parafilm y se depositó en una cámara de cultivo a 23 ± 2°C, 30 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de iluminación y 16 h. de fotoperíodo.

En las condiciones de cultivo indicadas se controló el tanto por ciento de germinación (apertura y verdeo de los cotiledones y emergencia de la radícula), tanto

por ciento de plántulas formadas y crecimiento del tallo de dichas plántulas, para cada tratamiento con NaCl. Al final del período de cultivo *in vitro* (60 días), se determinó el estado nutritivo de las plántulas, tomando muestras representativas de cada tratamiento salino. El contenido de N se determinó por N Kjeldahl mientras que P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Mn, Cu y Zn por técnica de emisión de plasma (Hamilton, 1980). El Cl se analizó por el método del tiocianato de mercurio.

De las plántulas de cada procedencia obtenida en el tratamiento control del experimento anterior, se cortaron en condiciones asépticas (cámara de flujo laminar) explantos uninodales de aproximadamente 1 cm de longitud. 24 de estos explantos por procedencia y tratamiento se cultivaron *in vitro* respectivamente sobre medio MS 1/3 con adiciones de 0,1,3,5,7,9 y 10 gL<sup>-1</sup> de NaCl (tratamientos). En cada caso se controló la supervivencia de los explantos.

Para un tercer experimento se tomaron frutos de las variedades Galego y Lechín de Sevilla cuyos embriones se habían clasificado en los experimentos anteriores como poco tolerantes y tolerantes respectivamente a la sal *in vitro* y de olivos de las dos áreas salinas Raboconejo y Lagolargo, clasificados antes como muy tolerantes. De esos frutos se obtuvieron primero semillas y a partir de ellas embriones por los procedimientos indicados antes. Tras la desinfección, igual a la anterior, se sembraron *in vitro* 160 embriones de cada procedencia divididos en todos los casos en 4 grupos de 40 embriones cada uno. El primer grupo de todas las variedades se cultivó como plantas control sobre medio MS 1/3, y los segundos, terceros y cuartos sobre MS 1/3 con 4 gL<sup>-1</sup>, 6 gL<sup>-1</sup>, y 8 gL<sup>-1</sup> de NaCl respectivamente. Cada tubo de ensayo con el medio de cultivo y un embrión, se marcó con la inicial de la variedad de procedencia seguida del número identificativo de la concentración de sal presente en la germinación y con el número correspondiente al embrión: G0 E1 al G0 E40; G4 E1 al G4 E40; G6 E1 al G6 E40; G8 E1 al G8 E40; LS0 E1 al LS0 E40; LS4 E1 al LS4 E40; LS6 E1 al LS6 E40; LS8 E1 al LS8 E40; RC0 E1 al RC0 E40; RC4 E1 al RC4 E40; RC6 E1 al RC6 E40; RC8 E1 al RC8 E40; LL0 E1 al LL0 E40; LL4 E1 al LL4 E40; LL6 E1 al LL6 E40; LL8 E1 al LL8 al E40.

En el tratamiento de 8 gL<sup>-1</sup> de NaCl (el de mayor concentración salina usada en este experimento) y por cada variedad de procedencia se eligieron las 5 mejores plantas, que destacaban por su buen aspecto y desarrollo (las más tolerantes a la sal). Así mismo se seleccionaron las 5 mejores plantas del control sin sal de cada variedad. De cada una de estas 40 plantas, (2 grupos x 5 plantas x 4 variedades) se prepararon explantos

uninodales de aproximadamente 1 cm. de longitud y se colocaron individualmente en tubos de ensayo (21x150 mm) con 10 mL de medio OM (Rugini, 1981) con  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de zeatina, en agar 0,5%. Cada tubo con el explanto respectivo, se tapó con un capuchón de polipropileno cuyo borde se selló al vidrio con parafilm, y el conjunto se situó en una cámara de cultivo a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 h, y  $30 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  de intensidad luminosa. A partir de los explantos crecidos *in vitro* (5-6 cm. de longitud), sin raíz, se prepararon nuevos explantos uninodales que se volvieron a cultivar *in vitro* en las condiciones indicadas. Esta operación se repitió varias veces hasta obtener un número suficiente de explantos por cada una de las 40 plantas inicialmente seleccionadas.

A continuación, se sembraron 24 explantos uninodales por cada procedencia ( $24 \times 40 = 960$  explantos) en el medio indicado antes (control) y otros 24 explantos por procedencia y tratamiento ( $24 \times 40 \times 5 = 4800$  explantos) en el mismo medio con adiciones respectivas (tratamientos) de 2, 4, 6, 8, y  $10 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl. Dado el elevado número de explantos (5700) necesarios, la prueba no se realizó de una sola vez, sino que se fue comparando un control sin NaCl con cada uno de los tratamientos salinos en experimentos parciales. De este modo en aquellos explantos menos tolerantes se pudo dar por terminada la prueba sin tener que aplicar las concentraciones salinas más elevadas, cuando en una concentración de NaCl determinada había muerto la mayor parte del material.

En cada caso se determinó el número de explantos muertos, el desarrollo de los supervivientes y se analizaron hojas de individuos distintos de la misma procedencia para la determinación del contenido en nutrientes. Para ello, el material vegetal fue analizado por los siguientes procedimientos: N por el método Kjeldahl (Jackson, 1962); los nutrientes minerales (P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Mn, Cu y Zn) por el método de oxidación húmeda con  $\text{HNO}_3$  concentrado bajo presión usando un sistema de digestión por microondas Milestone ethos. La valoración de los nutrientes minerales en los extractos se realizó por método ICP-OES (Wallinga et al., 1995).

#### III.2.4. TRATAMIENTOS ESTADÍSTICOS.

La comparación de los porcentajes se efectuó mediante el test t de Student.

### III. 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### III.3.1 1ª PRUEBA.- DESARROLLO Y GERMINACIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES CIGÓTICOS DE OLIVO.

En la Tabla 3.3 se indican los tamaños de los frutos, semillas y embriones, y la fase de desarrollo de estos últimos según la clasificación de Rapoport (1994), de cada muestra, en relación con el tiempo transcurrido desde la floración. Así mismo, se consideran los tantos por ciento de germinación de los embriones *in vitro* con o sin zeatina en el medio.

Para cada fecha de toma de muestra, existe una cierta variabilidad entre los parámetros considerados, debido a la falta de contemporaneidad en el desarrollo y maduración de los frutos. Esta variabilidad es más intensa en periodos de cambios morfológicos rápidos, como los que se producen en los momentos iniciales de la fructificación. No obstante, es posible definir una fase característica del desarrollo de las muestras en cada toma, representada por la situación dominante. Como se indica en la Tabla 3.3, para definir el estadio del desarrollo del embrión en condiciones naturales se utilizan los índices propuestos por Rapoport (1994).

Tabla 3.3. Germinación media de embriones de olivo *in vitro* con y sin zeatina. Tamaños representativos y estados evolutivos del fruto, semilla y embriones.

Días después floración	Tamaño Fruto (mm)	Tamaño Semilla (mm)	Tamaño Embrión (mm)	Estado Evolutivo del Embrión		% Germinación	
				Índice <sup>1</sup>	Descripción	Medio MS/3	Medio MS/3 con Zeatina
20-25	3.0 x 3.0	0.7 x 0.5	-			0	0
25-30	3.7 x 3.7	1.8 x 0.8	-			0	0
30-35	5.5 x 5.0	2.8 x 1.1	-	1-2	Primeras Divisiones	0	0
35-40	8.5 x 6.0	3.4 x 1.3	-	3-5	Pre-globular	0	0
40-45	10.0 x 6,5	4.3 x 1.8	0.05 - 0.15	6-8	Globular	0	12
45-50	13.0 x 9.0	5.3 x 2.0	0.2 - 0.5	9-11	Corazón temprana	0	14
50-55	14.0 x 9.5	7.5 x 3.0	0.7.5 - 1.0		Corazón	0	54
55-60	15.0 x 10.0	7.7 x 3.4	1.0 x 0.5	12	Torpedo	0	64
60-65	16.0 x 11.0	8.0 x 3.0	2.0 x 1.0			0	75
65-70	16.5 x 12.0	8.5 x 3.0	2.0 x 1.0			0	70
70-75	17.0 x 12.0	8.8 x 4.0	3.5 x 2.1			0	70
75-80	18.0 x 12.0	9.2 x 4.0	5.0 x 2.2			60	73
80-85	18.0 x 12.0	9.2 x 4.0	6.0 x 2.5			80	35
85-90	18.0 x 12.0	9.2 x 4.0	7.0 x 3.0			100	30
80-95	18.0 x 12.0	9.2 x 4.0	8.5 x 3.5			100	29
95-100	18.0 x 12.0	9.2 x 4.0	9.0 x 4.0			100	25

<sup>1</sup>Rapoport (1994)

El fruto es esférico, igualdad de longitud de los ejes longitudinal y transversal (Tabla 3.3), en los primeros 30 días. Después, va evolucionando hacia una forma ovoidal como consecuencia de un mayor crecimiento en sentido longitudinal. Esta tendencia se mantiene hasta los 70 días desde la floración, aunque ambos ejes crecen bastante y rápidamente, lo que significa un desarrollo notable del fruto oval. A partir de los días indicados, el fruto alcanza su tamaño máximo sin haber comenzado a cambiar de color.

La semilla aumenta de medida de forma paralela al fruto y alcanza su tamaño máximo en la misma fecha que lo hace aquél. No obstante, la semilla siempre presenta un eje longitudinal más largo que el transversal, manteniendo constantemente forma almendrada (Tabla 3.3). Primero tiene una cubierta fuerte pero flexible (endocarpo no lignificado y testa) que contiene un líquido denso (endospermo). Paulatinamente, dicha cubierta se va haciendo cada vez más rígida hacia el exterior (lignificación) hasta llegar a formar un endocarpo totalmente leñoso, lo que ocurre a los dos meses desde la floración. En paralelo, la parte interior de la cubierta se va separando del endocarpo y desecándose hasta quedar como una película de color marrón que cubre al endospermo. Este último tejido (endospermo), que en los primeros estadios de la semilla aparece como un líquido, se va haciendo cada vez más denso, pasando a ser pastoso y por último totalmente sólido.

A los 30-35 días desde la floración, se observa la presencia de un pequeño proembrión correspondiente a los estadios 1-2 descritos por Rapoport (1994), que se corresponde con las primeras divisiones celulares.

De los 35 a los 60 días desde la floración el embrión crece y se diferencia con rapidez, pasando por las fases 3 a 12 de Rapoport, desde la forma preglobular, a globular, inicial acorazonada, corazón y torpedo, pero como se indica en la Tabla 3.3 aún con un tamaño muy inferior al final. Después, ya con forma torpedo, el embrión sigue creciendo rápidamente hasta alcanzar la madurez hacia los tres meses desde la floración. Seguidamente, aún crece un poco, hasta su tamaño máximo (Tabla 3.3).

Aunque en la propagación *in vitro* de embriones maduros de olivo, se han utilizado distintos tipos de reguladores de crecimiento (Rugini, 1986), autores como Voyiatzis (1995) y Liñán et al. (1999) muestran que la germinación del embrión y la formación de plántulas dependen principalmente del nivel de desarrollo y tamaño del mismo. Estos últimos autores, usando medios de cultivo sin reguladores de crecimiento, logran germinar embriones maduros en un tanto por ciento muy alto. Por el contrario, el

procedimiento no es válido para embriones inmaduros (Liñán et al., 1999). Resultados similares se obtienen en el presente trabajo cuando se usa el medio de cultivo sin reguladores de crecimiento, llegándose incluso hasta un 100 % de germinación con los embriones maduros con tamaño máximo. Se confirma, en consecuencia, la mayor importancia del desarrollo y tamaño del embrión y la no necesidad de reguladores de crecimiento en la germinación del embrión maduro de olivo (Tabla 3.3). Por el contrario, no se produce germinación en los embriones inmaduros obteniéndose las primeras plantas en las muestras tomadas 75 días después de la antesis cuando ya el embrión ha alcanzado forma de torpedo, alguna madurez y tamaño de 5x2.2 mm. A partir de ese momento la germinación va en aumento hasta lograr los valores del 100% indicados antes (Tabla 3.3).

La germinación de los embriones inmaduros se anticipa y aumenta cuando se adiciona al medio la citoquinina zeatina. Se han utilizado diferentes reguladores de crecimiento en la germinación *in vitro* de embriones inmaduros de otras especies vegetales (Özcan et al, 1996; Kosturkova et al., 1997) pero la zeatina es una citoquinina que ha dado excelentes resultados en procesos de organogénesis de olivo *in vitro* (Rugini, 1986; Clavero y Pliego, 1988). Con la adición de zeatina al medio la germinación *in vitro* del embrión de olivo comienza en estadios muy tempranos del desarrollo embrionario, 40-50 días desde la floración, cuando aún su forma era esférica o acorazonada inicial (Tabla 3.3). Como se indicó en el capítulo de Material y Métodos, en estas fechas no es posible aislar el embrión, debido a su pequeño tamaño y, sobre todo por su facilidad para oxidarse.

Tabla 3.4. Germinación *in vitro* y formación de plántulas procedentes de embriones maduros de olivo, en diferentes momentos tras la floración. (Año I).

Fecha Muestreo	Semanas Después Floración	Diámetro Fruto (mm)	Tamaño Semilla (mm)	Tamaño Embrión (mm)	Germinación <i>In vitro</i> (MS/3) (%)	Formación Plántulas (%)
12 Mayo	3	0.7	–	0	0	
19 Mayo	4	3.7	1.8	–	0	0
26 Mayo	5	4.8	2.9	–	0	0
2 Junio	6	6.4	5.3	–	0	0
16 Junio	8	9.0	7.7	–	0	0
21 Junio	9	9.8	8.0	–	0	0
29 Junio	10	12	9.2	–	0	0
7 Julio	11	12	9.2	3.5	0	0
13 Julio	12	12	9.2	6.8	62	25
22 Julio	13	12	9.2	7.9	80	80
5 Agosto.	15	13	9.3	8.1	80	80

Tabla 3.5. Germinación *in vitro* y formación de plántulas procedentes de embriones maduros de olivo, en diferentes momentos tras la floración. (Año II).

Fecha Muestreo	semanas tras floración	Diámetro fruto (mm)	Tamaño Semilla (mm)	Tamaño Embrión	Germinación <i>in vitro</i> (MS/3) %	formación Plántulas %
20 Mayo	4	5,0	3,4	–	0	0
26 Mayo	5	6,8	4,3	–	0	0
8 Junio	7	9,6	8,0	–	0	0
15 Junio	8	10,9	8,0	–	0	0
29 Junio	10	11,2	8,8	1,0-2,0	0	0
5 Julio	11	–	8,8	3,0	0	0
12 Julio	12	–	8,8	4,5	0	0
19 Julio	13	–	8,8	6,0	85	56
26 Julio	14	–	8,8	6,5	90	65
2 Agosto	15	–	8,8	7,0	100	75

Entonces, se utiliza una porción seminal conteniendo el embrión adherido y algo de endospermo, obtenida al hacer un corte transversal mediano a la semilla, cuando aún no se ha endurecido el endocarpo. En muestras posteriores, entre los 60 y los 85 días desde la floración aumenta notablemente la germinación (Tabla 3.3). En este periodo, el embrión muestra primero forma avanzada de corazón y después de torpedo, pero aún en

crecimiento, sin haber alcanzado el tamaño y forma definitiva. Es decir, el embrión aunque en desarrollo más avanzado continúa siendo inmaduro. Más tarde, cuando el embrión llega a su madurez desciende claramente el tanto por ciento de germinación. Es decir, durante el periodo de inmadurez, el embrión necesita de la zeatina para seguir su desarrollo *in vitro*, pero en la madurez cuando el embrión alcanza el equilibrio hormonal endógeno adecuado para germinar, la presencia de la citoquinina es contraproducente, probablemente porque altera ese equilibrio natural y, en consecuencia, la germinación desciende.

La evolución del embrión inmaduro *in vitro*, es muy parecida a la indicada por Rapoport (1994) para las condiciones naturales del embrión dentro de la semilla y el fruto en la planta. Así, como se indicó antes, el trozo de semilla cultivado *in vitro*, contiene un embrión globoso (Figura III.6) o en fase inicial de corazón (Figura III.7).



Figura III.6. Embrión en estado globoso.

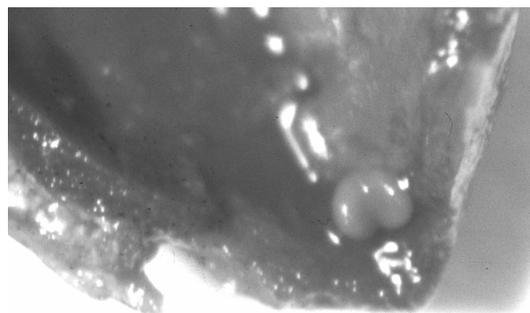
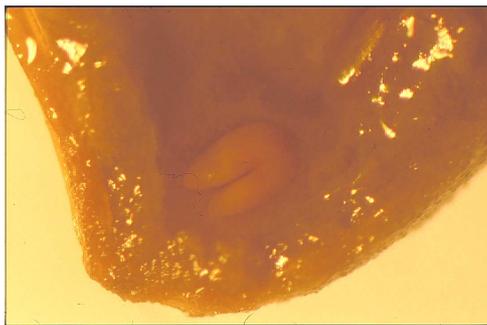


Figura III.7. Embrión en fase inicial de corazón

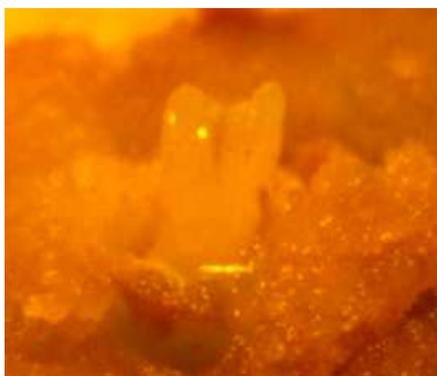
Después de unos 20 días de cultivo, alcanza forma avanzada de corazón (Figura III.8) y seguidamente de torpedo (Figura III.9). Después, el embrión con los cotiledones abriéndose, pero aun blancos, emerge entre la masa endospermica del trozo de semilla (Figura III.10) para a continuación crecer, tomar los cotiledones color verde y desarrollar una radícula en el interior (Figura III.11). Por ultimo, se forma una plántula completa que aún conserva el trozo de endocarpo seminal adherido entre la raíz y el tallo (Figura III.12).



*Figura III.8. Embrión en forma avanzada de corazón.*



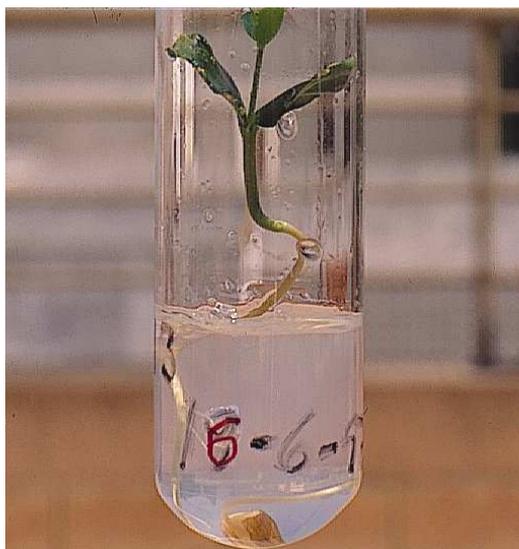
*Figura III.9. Embrión en fase torpedo*



*Figura III.10. Cotiledones emergiendo de la superficie del callo.*

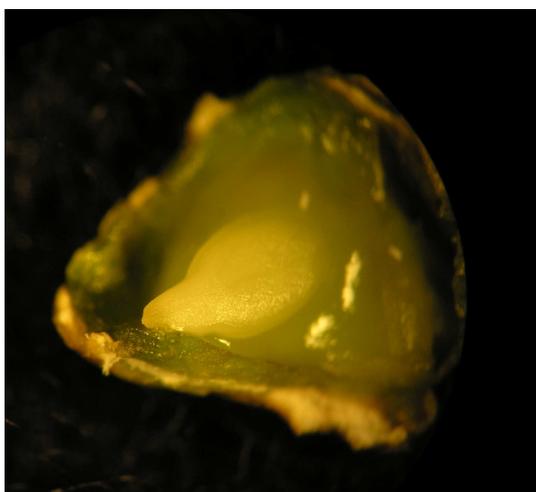


*Figura III.11. Joven plántula con el brote radical aún en el interior.*

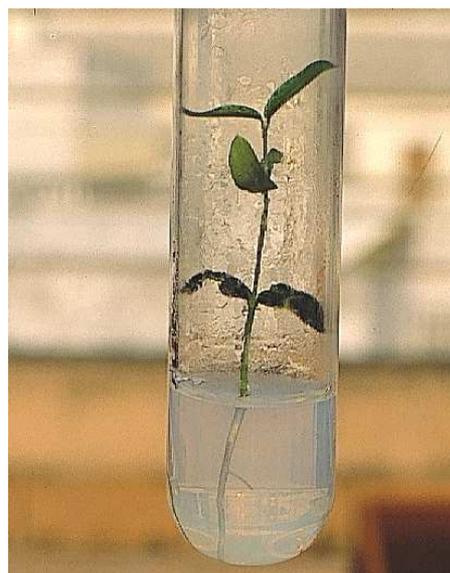


*Figura III.12. Plántula completa.*

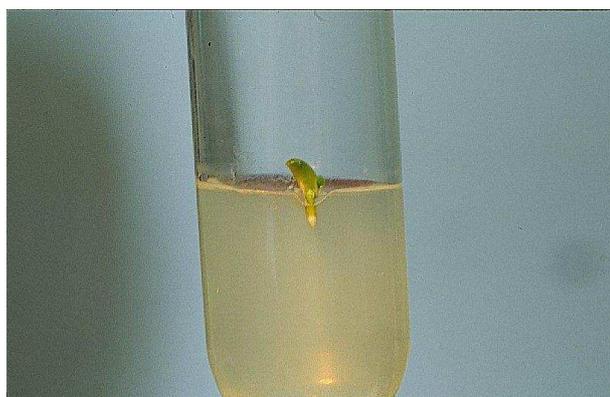
Cuando se utiliza el embrión inmaduro aislado pero ya en forma torpedo (Figura III.13) crece un poco hasta alcanzar un tamaño y forma parecida al maduro y tras un proceso similar al indicado antes con apertura y color verde de los cotiledones, crecimiento de la radícula e hipocótilo (Figura III.14) forma una plántula completa. En el caso del embrión maduro (Figura III.15) por un proceso igual también se forma una plántula completa (Figura III.16). En algunos casos aparecen anomalías estructurales en el desarrollo del embrión *in vitro* (Figuras III.17 y III.18) lo que impide la formación de planta.



*Figura III.13. Embrión inmaduro en forma de torpedo.*



*Figura III.14. Planta*



*Figura III.15. Embrión maduro.*



*Figura III.16. Planta.*



*Figura III.17. Embrión anormal (cotiledones no desarrollados y oscuros, abultamiento irregular del eje embrionario).*



*Figura III.18. Desarrollo irregular del embrión.*

En consecuencia, en el presente trabajo se ha logrado, por primera vez, definir la evolución morfológica del embrión inmaduro de olivo *in vitro* y lograr una plántula totalmente viable a partir de él y se ha comprobado la buena respuesta a la germinación (100%) del embrión maduro en un medio sin reguladores de crecimiento.

### III.3.2 2ª PRUEBA.- OBTENCIÓN Y GERMINACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS.

Como se indicó en el capítulo de Introducción, la obtención de plantas de olivo *in vitro* a partir de embriogénesis somática es interesante tanto bajo el punto de vista de la micropropagación, como de otras facetas de la Biotecnología e Ingeniería Genética.

En las condiciones de nutrición y cultivo del experimento anterior no se obtuvieron embriones somáticos con ninguno de los embriones cigóticos utilizados, tanto inmaduros como maduros, sino que el embrión evolucionó para germinar una sola planta. De acuerdo con lo indicado en el capítulo de Material y Métodos, para la obtención de embriones somáticos se sigue el procedimiento empleado previamente por Leva et al. (1999) con otras variedades de olivo. De este modo, el primer signo de actividad de los trozos de cotiledón procedentes de embriones inmaduros (60-70 días desde la floración) en la fase de inducción en oscuridad, es la formación de un callo de cicatrización, en especial en las zonas de corte (heridas perimetrales) (Figura III.19) lo

que ocurre unos 20 días después de la siembra. Unos 30 días más tarde, es decir a partir de los 50 días desde la siembra comienzan a aparecer embriones somáticos entre la masa del callo, pero la mayoría junto al tejido del cotiledón (Rugini., 1986). Estos embriones somáticos presentan primero forma globular (Figura III.20) y después alargada tipo torpedo. Como la formación de estos embriones se produce de manera continua, en un momento dado coexisten en distintos niveles de desarrollo (Figura III.21).



*Figura III.19. Tejido de callo preembriogénico.*



*Figura III.20 Embrión somático en fase globular.*



*Figura III.21. Coexistencia de embriones en forma globular y torpedo.*

Los embriones somáticos más avanzados en su evolución en la fase de inducción, es decir cuando están comenzando a abrir los cotiledones y éstos a tomar color ligeramente verde (Figura III.22) se trasladan a los tubos de ensayo donde siguiendo un proceso igual al indicado para el embrión cigótico forman nuevas plántulas (Figura III.23) (fase de expresión). De este modo, se logran obtener y propagar por primera vez embriones somáticos de la variedad Manzanillo de Sevilla.



*Figura III.22. Embrión de color verde antes del trasplante a medio de expresión.*



*Figura III.23. Obtención de nuevas plántulas.*

### III.3.3 3ª PRUEBA: SELECCIÓN *IN VITRO* DE CLONES DE OLIVO TOLERANTES A LA SAL.

En la Tabla 3.6 se indica el tanto por ciento de germinación (apertura y coloración verdosa de los cotiledones e iniciación de la radícula) de los embriones de cada variedad en cada tratamiento salino en relación con el control. De acuerdo con los

resultados obtenidos en el apartado primero de este capítulo y los previamente indicados por Troncoso et al., 1991, y Sarmiento et al., 1994, la germinación de los embriones maduros en el tratamiento control alcanza el 100% en todas las variedades. Estos resultados destacan de nuevo el buen comportamiento del embrión y avalan su elección como material a utilizar en estas pruebas de salinidad.

Adiciones al medio de cultivo de hasta  $5 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl ( $7,1 \text{ dSm}^{-1}$ ), no modifican significativamente los tanto por ciento de germinación de las variedades de olivo consideradas (Tabla 3.6) lo que indica una elevada tolerancia a la sal del embrión de olivo en esta fase de germinación. Uniyal y Nautiyal (1998) observan una mayor tolerancia a la sal durante la fase de germinación de la semilla que durante el desarrollo de la plántula. Este comportamiento se relaciona con la presencia de proteínas específicas (Blackman et al. 1991; Ried y Walker-Simmons, 1993) y genes (Thomas, 1993) durante el proceso de germinación.

La adición al medio de  $6 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl ( $9,1 \text{ dSm}^{-1}$ ), baja significativamente la germinación de los embriones procedentes de Cañivano y de Galego. Se mantienen en un 100% de germinación los embriones de Jabaluna, Lechín de Sevilla, Raboconejo y Lagolargo, mientras que los restantes descienden algo sobre los anteriores pero sin llegar a cifras estadísticamente diferentes.

Cuando se adicionan  $7 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl ( $10,8 \text{ dSm}^{-1}$ ) aumenta de forma significativa el número de embriones en los que desciende el tanto por ciento de germinación. A los indicados antes procedentes de Galego, y Cañivano (que también lo hacen aquí), se unen los embriones procedentes de Arbequina y Manzanillo de Sevilla. El resto de los embriones considerados (no se sembraron embriones de las zonas salinas) se mantienen a niveles de germinación similares estadísticamente a los resultados de tratamientos anteriores, demostrando con ello su tolerancia a la sal. Dentro de este grupo, los embriones obtenidos de Jabaluna y Lechín de Sevilla conservan la germinación al 100%.

Tabla 3.6. Influencia de la salinidad (NaCl) en germinación de embriones *in vitro* (Porcentaje en relación al control).

Cv.	gL <sup>-1</sup> NaCl								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Arbequina	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	95 <sup>a</sup>	95 <sup>a</sup>	60 <sup>b</sup>	55 <sup>b</sup>
Cañivano	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	97 <sup>a</sup>	80 <sup>ab</sup>	65 <sup>b</sup>	65 <sup>b</sup>	55 <sup>b</sup>
Cornezuelo	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>	55 <sup>b</sup>
Galego	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	95 <sup>a</sup>	70 <sup>b</sup>	65 <sup>b</sup>	30 <sup>c</sup>
Jabaluna	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>
Lechín S.	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	95 <sup>a</sup>
Manz. Jaén	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	95 <sup>a</sup>	85 <sup>a</sup>	40 <sup>c</sup>
Manz. Sevilla	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	80 <sup>ab</sup>	80 <sup>ab</sup>	60 <sup>b</sup>	50 <sup>b</sup>
Picual	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>	80 <sup>ab</sup>
Raboconejo	100 <sup>a</sup>	—	100 <sup>a</sup>	—	100 <sup>a</sup>	—	100 <sup>a</sup>	—	100 <sup>a</sup>
Lagolargo	100 <sup>a</sup>	—	100 <sup>a</sup>	—	100 <sup>a</sup>	—	100 <sup>a</sup>	—	100 <sup>a</sup>

Letras diferentes leídas en fila indican diferencias estadísticamente significativas al nivel del 95%.

El tratamiento de mayor concentración salina (8 gL<sup>-1</sup> de NaCl, 11,5 dSm<sup>-2</sup> de C.E.) es el que establece el mayor índice de discriminación entre los embriones: los procedentes de las plantas de áreas salinas (Raboconejo y Lagolargo) mantienen el 100% de germinación demostrando su adaptación a esas condiciones. Igualmente, Jabaluna y Lechín de Sevilla presentan tantos por ciento de germinación muy elevados (Tabla 3.6) iguales estadísticamente a los de anteriores tratamientos. Desde el punto de vista de la capacidad de germinación también los embriones procedentes de los cultivares Jabaluna y Lechín de Sevilla muestran una alta tolerancia a la sal. Esto coincide con los resultados obtenidos por Benlloch (1994), trabajando con plantas jóvenes de dichas variedades en condiciones de invernadero. Los embriones procedentes de Picual también presentan un alto índice de germinación en este tratamiento (80%), lo que de nuevo concuerda con lo indicado por el autor anteriormente citado. El resto de los embriones tienen un tanto por ciento de germinación significativamente menor, en especial Manzanillo de Jaén y Galego. En esta prueba, algunos de los embriones germinados prácticamente no crecen (Figura III.24), otros presentan malformaciones típicas, como cotiledones hiperhidratados con aspecto esponjoso y muy voluminosos sin llegar a formar una planta normal (Figura

III.25), y otros llegan a formar una planta incipiente (Figura III.26) que no prospera. Estas morfologías hacen inviable el desarrollo de la planta. Sin embargo, otros embriones germinan de forma similar a las plantas control. Estos hechos se producen en los embriones de todas las procedencias, aunque en los de aquellas variedades definidas como más tolerantes es mayor la proporción de plantas normales y menor la de embriones mal formados o sin germinar. Consecuentemente, embriones procedentes de la misma planta madre presentaron respuestas diferentes a la germinación *in vitro* en presencia de sal.



*Figura III.24*  
*Interrupción prematura del desarrollo del embrión por efecto de la sal del medio.*



*Figura III.25*  
*Embrión hiperhidratado con germinación anormal por efecto de la sal del medio.*



*Figura III.26*  
*Plántula incipiente procedente de embrión desarrollado en condiciones salinas.*

Algunos individuos que comienzan a germinar no consiguen emitir raíz, hecho que corroboran diversos autores como Bongi y Loreto (1989); Tattini et al. (1992); Klein et al. (1994). Por ello, otro parámetro considerado para medir la tolerancia del embrión de olivo a la sal, es el tanto por ciento de formación de verdaderas plantas (Tabla 3.7). Es decir, la continuación del proceso de germinación con el desarrollo de raíz, tallo y hojas. En la tabla indicada, aparece una primera columna de resultados que señala las pérdidas que se producen entre la germinación y la formación de la planta. En el tratamiento control se observa que la formación de plantas es muy elevada, no apareciendo valores inferiores al 85%. Por ello y dado que las pequeñas pérdidas habidas no pueden ser vinculadas con la salinidad, en la segunda columna, a efectos comparativos de lo que ocurre en los tratamientos salinos, se lleva, en todos los casos, la formación de plantas del control al 100%.

Al igual que con la germinación, los tratamientos salinos provocan pérdidas en la formación de plantas proporcionales a la concentración de sal. En este caso las pérdidas son en general mayores y más precoces que en la germinación (Tablas 3.6 y 3.7). De este modo, se confirma lo indicado antes de una mayor tolerancia a la sal de la semilla que de la planta recién formada.

Como en el caso de la germinación, la acción negativa del NaCl es distinta entre los embriones considerados y permite clasificarlos en función de su tolerancia a la sal. Si se considera el tratamiento con  $8 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl, al ser el más discriminante por la mayor concentración salina utilizada y uno en los que se emplean todos los grupos de embriones, se obtienen los siguientes resultados:

Los embriones procedentes de olivos que crecen en condiciones salinas (Rabconejo y Lagolargo) presentan el mayor tanto por ciento de formación de plantas *in vitro*. A continuación, los de Lechín de Sevilla y Jabaluna, iguales entre sí y algo inferiores a las dos primeros. Después, los embriones procedentes de Picual, Cañivano, Arbequina, Cornezuelo, y Manzanillo de Sevilla, y por último Manzanillo de Jaén y Galego, los más afectados por la sal. Esta clasificación coincide en gran medida con la indicada para la germinación (Tabla 3.6).

De acuerdo con Therios y Misopolinos, (1988); Bongi y Loreto (1989); Bartolini et al., (1991); Tattini et al, (1992), Cresti et al, (1994); Troncoso et al., (1999) la presencia de sal en el medio disminuye el desarrollo de la planta. En el estudio realizado por Martínez, (1986) se vincula la disminución del desarrollo de la planta a la presencia excesiva de sales solubles del tipo  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . También se

puede deber a la inhibición en la síntesis de proteínas por la inactivación de enzimas debido a la presencia de altas concentraciones de sales (Azcón-Bieto y Talón, 1993). Por ello, el efecto negativo que produce la sal en el crecimiento del tallo de la planta es otro parámetro para seleccionar plantas tolerantes a la salinidad (Tabla 3.8). Skene y Barlass (1981) y Troncoso et al., (1999), también encuentran una relación inversa entre crecimiento del explanto de vid *in vitro* y la salinidad del medio.

Las plantas procedentes de embriones de Manzanillo de Sevilla y Galego tienen el menor crecimiento en el tratamiento control sin NaCl (aprox. 1,50 cm.), mientras que las procedentes de las zonas salinas (4,1 cm. aprox.) y Cañivano (4,43 cm.) son las plantas de crecimiento más elevado. Las restantes plantas ocupan posiciones entre estas medidas (Tabla 3.8). Para evitar estas variaciones no atribuibles a la sal, como en casos anteriores, se considera 100 % el crecimiento del tratamiento control de cada grupo de plantas y con ese valor se comparan los resultados obtenidos en los distintos tratamientos salinos (Tabla 3.9).

La influencia negativa de la sal en cada variedad coincide prácticamente con lo indicado antes para germinación y formación de plantas, aunque existen menos diferencias significativas. En cualquier caso, los embriones procedentes de Galego y de Manzanillo de Jaén son los más afectados mientras que los de Raboconejo, Lagolargo, Cornezuelo de Jaén, Jabaluna y Lechín de Sevilla los más tolerantes.

En consecuencia, los tres factores estudiados (germinación *in vitro* de embriones, formación de plántulas y crecimiento del tallo de las plántulas supervivientes en cada tratamiento salino) presentan clasificaciones muy parecidas. En todos los casos, los embriones procedentes de las plantas adaptadas a condiciones salinas (Raboconejo y Lagolargo) y de los cultivares Jabaluna y Lechín de Sevilla son los que mejor soportan la presencia de sal (NaCl) en el medio, es decir los más tolerantes. A continuación los embriones procedentes de los cultivares Picual, Cornezuelo de Jaén, Cañivano, Arbequina y Manzanillo de Sevilla, de más a menos tolerantes pero sin grandes diferencias, y finalmente los de Manzanillo de Jaén y Galego con la menor tolerancia.

Esta clasificación ante la sal de los embriones *in vitro* procedentes de distintas variedades de olivo, coincide bastante con el comportamiento de muchas de esas variedades, estudiadas por Benlloch et al. (1994) en plantas propagadas agámicamente en condiciones de invernadero. Significa esto que no obstante la variabilidad genética del embrión, (máxime en la zona de toma de muestras del Banco Mundial de

Germoplasma de Córdoba donde la variabilidad debe verse favorecida por la amplia presencia de cultivares distintos en pocas hectáreas de terreno), la planta madre tiene una clara influencia genética sobre sus frutos para este carácter. Lavee (1994) también indica esa influencia materna en casos de obtención de híbridos por fecundación cruzada.

No obstante lo indicado en el párrafo anterior, también se observa en los resultados una gran variabilidad en el comportamiento ante la sal de los embriones de cada variedad. Es decir, dentro de cada grupo existen embriones que se afectan en los tratamientos a bajas concentraciones de NaCl, incluso aquellos procedentes de olivos mejor adaptados, y por el contrario embriones originarios de Galego o Manzanillo de Jaén, los más sensibles, llegan a sobrevivir a concentraciones elevadas de sal.

La salinidad debida a la presencia de NaCl en el medio también modifica el estado nutritivo de las plantas *in vitro* (Tabla 3.10). En este caso, debido a la falta de material necesario para el análisis de los tratamientos en altas concentraciones salinas, se realiza el estudio en el conjunto de las plantas de cada tratamiento. Las variaciones más importantes corresponden a incrementos de Na y de Cl y descensos de K proporcionales a la aplicación de sal en el medio. Es decir, la planta de olivo *in vitro* absorbe Na y Cl de la solución nutritiva en relación con la disponibilidad de dichos nutrientes. Destaca en la tabla la diferencia existente entre la concentración de Na y Cl de las plantas sometidas a sal y la de las plantas control, que se desarrollan en ausencia de NaCl. Relaciones de este tipo entre NaCl en el medio y contenidos de Na y de Cl en los tejidos de la planta fueron observados por Royo y Aragües (1989) y Grattan y Grieve (1992) trabajando en condiciones de campo, por Ashraf et al. (1986), Bartolini et al. (1991) y Tatini et al. (1994) trabajando en condiciones de invernadero y por Dix et al. (1997) y Troncoso et al. (1999) para plantas *in vitro*. Las plantas *in vitro* absorben fácilmente los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  disueltos en la solución del medio (suelo, sustrato, o solución nutritiva) y se acumulan en los tejidos. En consecuencia, el nivel de Na o de Cl en la planta puede ser un buen marcador de las condiciones salinas en la que ésta vive al mismo tiempo que un signo de toxicidad salina (Bartolini et al., 1991; Tattini et al., 1995; El-Saayed Emtihal, 1996; Alhagdow et al., 1999).

La disminución de K por el incremento de NaCl ha sido estudiada por diferentes autores (Devitt et al., 1981; Marschner, 1986; Bartolini et al., 1991, Reimann, 1992, Tattini et al., 1994, Chartzoulakis et al., 2002) trabajando con diferentes plantas en distintos medios y relacionada con el antagonismo Na-K.

Junto a estos efectos principales de la sal sobre la composición mineral de la planta, también se observa un aumento de N, P y de los micronutrientes (Tabla 3.10) que posiblemente se deba al menor desarrollo de las plantas salinizadas. Sólo Ca y Mg permanecen inalterados probablemente por estar sometidos, por una parte a un efecto antagónico del ion Na y por otro, favorecidos por el menor desarrollo del material vegetal.

De los resultados obtenidos se puede destacar que el embrión cigótico maduro de olivo es un material muy interesante para el objetivo de obtener *in vitro* plantas tolerantes a la sal. Así, responde muy bien a este tipo de cultivo (prácticamente el 100% de germinación y de formación de plantas y buen crecimiento de éstas en los tratamientos de baja salinidad) y posibilidades de seleccionar individuos tolerantes a altas concentraciones de NaCl a partir de su respuesta a tratamientos salinos elevados. Se debe subrayar en este sentido que existe una fuerte influencia de la tolerancia a la sal de la planta madre sobre el comportamiento del embrión *in vitro* pero unida a una variabilidad que proporciona embriones sensibles y tolerantes dentro de una misma procedencia varietal, e incluso de la misma planta.

En la Tabla 3.11, se indican el tanto por ciento de los explantos supervivientes en los distintos tratamientos salinos en relación con el tratamiento control (100 %), obtenidos a partir de plantas seleccionadas por su tolerancia *in vitro* a la salinidad en el experimento anterior.

Al ser explantos provenientes de plantas seleccionadas, en general, resisten bastante bien medios con salinidad muy elevada. Tan solo los explantos procedentes de Manzanillo de Jaén (en los tratamientos con 9 y 10 gL<sup>-1</sup> de NaCl), y los de Galego en el último, alcanzan niveles de mortandad iguales o superiores al 50% (Tabla 3.11). La alta tolerancia a la salinidad mostrada por todos los explantos seleccionados, tiene mayor interés si se considera que durante el proceso de selección para llegar a obtener una cantidad suficiente de material vegetal se realizan varios subcultivos en medios no salinos. Es decir, que las plantas seleccionadas *in vitro* por su buen comportamiento ante la sal se obtienen, por diferentes subcultivos *in vitro* en medios no salinos, explantos que cuando se someten de nuevo a la presencia de sal vuelven a manifestar su tolerancia.

En consecuencia, del conjunto de los resultados se deduce que del embrión de olivo tolerante a la sal *in vitro*, se puede obtener una planta tolerante y a partir de esta una línea clónica de explantos también tolerantes.

Una vez conocido el comportamiento *in vitro* ante la sal de los embriones procedentes de las distintas variedades (prueba primera), como se indica en el capítulo de Materiales y Métodos, se eligen nuevos embriones provenientes de las plantas de las dos zonas salinas (Raboconejo y Lagolargo) como las más tolerantes a la sal, y otros originarios del cultivar Lechín de Sevilla definido antes como tolerantes y de Galego clasificados antes como poco tolerantes.

Como se indica en la Tabla 3.12, en coincidencia con lo obtenido en la prueba anterior, todos los embriones alcanzan un 100% de germinación en los tratamientos con 0 y 4 gL<sup>-1</sup> de NaCl, lo que de nuevo confirma la elevada aptitud del embrión de olivo para poder ser cultivado *in vitro*. En el tratamiento con 6 gL<sup>-1</sup> de NaCl los embriones procedentes de las plantas Raboconejo y Lagolargo mantienen el 100% de germinación mientras que los de Lechín y Galego descienden ligeramente (96%) sin que la variación sea estadísticamente significativa. También como en el caso anterior, el tratamiento con 8 gL<sup>-1</sup> de NaCl es el que establece mayores diferencias en la germinación de los grupos de embriones. De nuevo los embriones de plantas adaptadas a zonas salinas (Raboconejo y Lagolargo) aunque descienden al 80% tienen mayores tantos por ciento de germinación que los provenientes de plantas cultivadas en la colección de Córdoba (suelos no salinos) (Tabla 3.12). Además, en esta concentración salina los embriones procedentes del cultivar Galego no llegan a obtener diferencia estadística significativa con los embriones de la variedad Lechín de Sevilla, pero sus valores reales de germinación son algo inferiores, igualando los resultados obtenidos a la primera prueba, donde se determina la variedad Galego como la más sensible en la germinación a la presencia de NaCl en el medio. Aunque en general, existe un elevado nivel de concordancia entre los resultados de las dos pruebas, las variaciones entre ellas (ligera bajada en la germinación de los embriones de plantas de zonas salinas en el tratamiento con 8 gL<sup>-1</sup> de NaCl, y acercamiento entre la germinación de los embriones procedentes de los cultivares Lechín de Sevilla y Galego) no modifican las conclusiones de la prueba anterior y refrendan la variabilidad del embrión.

En la Tabla 3.13 se representa entre paréntesis el tanto por ciento de plántulas formadas a partir de la germinación del 100% de los embriones en el tratamiento testigo. En todos los grupos de embriones se produce un descenso similar (entre el 12 y el 18%) no debido a la salinidad. A efectos comparativos las plantas formadas en el control se consideran el 100% (valores sin paréntesis). Las adiciones de NaCl al medio hacen descender el porcentaje de plantas formadas en relación directa con la cantidad de

sal añadida ( $r = -0,9017$ ;  $r = -0,8516$ ;  $r = -0,7603$  y  $r = -0,8207$ ), respectivamente para las plantas procedentes de embriones de Galego, Lechín, Raboconejo, y Lagolargo). Como en el experimento anterior, estos descensos no son del mismo nivel en los distintos grupos de plantas. De nuevo el número de las plantas procedentes de zonas salinas es significativamente superior del de las que provienen de Córdoba, y aunque entre las cultivadas no se encuentran diferencias significativas, el número de las Lechín es algo superior a las de Galego. En consecuencia, de nuevo se repite lo indicado en el experimento anterior (Tabla 3.12).

El crecimiento del tallo (Tabla 3.14) y raíz (Tabla 3.15) también se afecta negativamente por la presencia de sal en el medio. En este caso no se encuentran diferencias significativas entre las distintas procedencias, lo que se relaciona con el proceso de selección que se había ido realizando en el transcurso del experimento.

En consecuencia, los resultados de la segunda prueba llevan a las mismas conclusiones que la primera, es decir:

- Los caracteres de la planta madre de procedencia tienen una gran influencia sobre el comportamiento *in vitro* en presencia de sal (NaCl) en el medio del embrión de olivo, en cuanto a su capacidad de germinación y formación de planta. Esto avala la transmisión genética madre-hijo del carácter de tolerancia a la sal.
- No obstante lo anterior, debido a la variabilidad genética que presenta el embrión de olivo (heterocigosis e influencia del padre al poder producirse polinización cruzada, lo que en estos casos es bastante probable) existen diferencias de comportamiento ante la sal de los embriones de una misma procedencia.

Estas dos características son de gran interés para los fines del trabajo y avalan al embrión como un material vegetal muy interesante para la selección *in vitro* de plantas de olivo tolerantes a la salinidad.

Al igual que en la primera prueba, también en esta segunda se realiza un estudio comparativo entre el comportamiento *in vitro* ante la sal de explantos procedentes de plantas no seleccionadas, es decir obtenidas *in vitro* en el tratamiento sin sal (control) y explantos obtenidos a partir de plantas seleccionadas por su mejor comportamiento en el tratamiento salino de mayor concentración de NaCl. Una vez obtenido suficiente número de plantas por varios subcultivos en medio sin NaCl, se preparan los explantos uninodales como se indica en el capítulo de Materiales y Métodos.

En la Tabla 3.16, se presenta la supervivencia de dichos explantos en los distintos tratamientos salinos. De nuevo se observan diferencias de comportamiento ante la sal de los explantos procedentes de embriones tomados en los olivos de zonas salinas (Raboconejo y Lagolargo) más tolerantes y los procedentes de plantas cultivadas (Galego y Lechín) menos tolerantes. También existen, en cada procedencia, diferencias significativas entre los explantos obtenidos de plantas seleccionadas (más tolerantes) que los preparados a partir de plantas no seleccionadas. Es interesante destacar en este sentido que las diferencias entre estos dos tipos de explantos (seleccionados, no seleccionados), son mucho mayores entre los procedentes de plantas cultivadas (Galego y Lechín) que entre aquellas de las plantas de zonas salinas (Raboconejo, Lagolargo). También se debe destacar que la diferencia entre los explantos de distintas procedencias es mayor entre los no seleccionados que entre los seleccionados. Estos hechos corroboran que entre las plantas no seleccionadas, la proporción de poco tolerantes es muy superior en las procedentes de olivos Galego y Lechín que en las de Raboconejo y Lagolargo (de nuevo aparece la influencia de la planta madre). La menor diferencia en la supervivencia de los explantos seleccionados entre las cuatro procedencias, también indica el criterio acertado de selección previa y la variabilidad genética del embrión inicial. Es decir, al compararse solo explantos de material selecto se igualan bastante los resultados.

El crecimiento de los explantos (Tabla 3.17) también está negativamente influido por la sal, de forma inversa a la concentración salina. En este caso en las diferencias entre procedencias, solo se puede destacar el mayor crecimiento de los explantos procedentes de Raboconejo. También, los explantos de plantas seleccionadas crecen mejor que los de plantas no seleccionadas aunque las diferencias no siempre son grandes, lo que se debe a que los explantos procedentes de material no seleccionado, al ser supervivientes en cada tratamiento, también sufren un proceso de selección a posteriori.

Aunque se realizaron por separado los análisis foliares del material seleccionado, como no se encuentran diferencias significativas entre ellos en la Tabla 3.18 se indica el contenido de nutrientes medio de los explantos selectos y no selectos de cada procedencia, en cada tratamiento salino. La no existencia de diferencias entre los distintos tipos de material utilizado puede estar relacionada con el hecho, ya indicado antes, de que al emplearse solo explantos vivos en el análisis, todo el material está en cierto modo seleccionado. En cualquier caso, lo que más se debe destacar son las fuertes

acumulaciones de Na y Cl, en relación directa con la concentración de NaCl en el medio ( $r = 0,9942$  para Na y  $r = 0,9446$  para Cl) y las pérdidas de K ( $r = -0,9953$ ). Estos resultados coinciden totalmente con lo indicado en la primera prueba (Tabla 3.10).

Tabla 3.7. Influencia de la salinidad en la formación de plantas de olivo *in vitro* (porcentaje en relación al control).

Cv.	% Ger	gL <sup>-1</sup> NaCl								
		0	1	2	3	4	5	6	7	8
Arbequina	100	100 <sup>a</sup>	85 <sup>ab</sup>	83 <sup>ab</sup>	80 <sup>b</sup>	73 <sup>b</sup>	63 <sup>b</sup>	51 <sup>bc</sup>	42 <sup>bc</sup>	25 <sup>c</sup>
Cañivano	90	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	80 <sup>b</sup>	74 <sup>b</sup>	69 <sup>b</sup>	53 <sup>bc</sup>	52 <sup>bc</sup>	35 <sup>c</sup>	30 <sup>c</sup>
Cornezuelo	85	100 <sup>a</sup>	92 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>	87 <sup>ab</sup>	85 <sup>ab</sup>	78 <sup>b</sup>	68 <sup>b</sup>	62 <sup>bc</sup>	25 <sup>c</sup>
Galego	85	100 <sup>a</sup>	88 <sup>ab</sup>	85 <sup>ab</sup>	76 <sup>b</sup>	50 <sup>bc</sup>	37 <sup>c</sup>	26 <sup>c</sup>	4 <sup>d</sup>	1 <sup>e</sup>
Jabaluna	100	100 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>	80 <sup>b</sup>	70 <sup>b</sup>	67 <sup>b</sup>	57 <sup>bc</sup>	55 <sup>bc</sup>	46 <sup>bc</sup>
Lechín S.	85	100 <sup>a</sup>	88 <sup>ab</sup>	77 <sup>b</sup>	76 <sup>b</sup>	80 <sup>b</sup>	87 <sup>ab</sup>	79 <sup>b</sup>	69 <sup>b</sup>	47 <sup>bc</sup>
Manzanilla J	90	100 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>	88 <sup>ab</sup>	69 <sup>b</sup>	68 <sup>b</sup>	48 <sup>c</sup>	13 <sup>d</sup>	2 <sup>e</sup>
Manzanilla S	100	100 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>	65 <sup>b</sup>	60 <sup>b</sup>	60 <sup>b</sup>	58 <sup>b</sup>	43 <sup>bc</sup>	33 <sup>c</sup>	24 <sup>c</sup>
Picual	90	100 <sup>a</sup>	89 <sup>a</sup>	87 <sup>ab</sup>	85 <sup>ab</sup>	85 <sup>ab</sup>	57 <sup>bc</sup>	37 <sup>c</sup>	33 <sup>c</sup>	33 <sup>c</sup>
Raboconejo	96	100 <sup>a</sup>	—	100 <sup>a</sup>	—	—	—	56 <sup>bc</sup>	—	60 <sup>a</sup>
Lagolargo	98	100 <sup>a</sup>	—	99 <sup>a</sup>	—	84 <sup>ab</sup>	—	55 <sup>bc</sup>	—	58 <sup>a</sup>

Letras minúsculas leídas en fila indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre tratamientos.

Tabla 3.8. Crecimiento del tallo (cm.) de las plantas de las distintas procedencias, cultivadas *in vitro* en medio con diferentes concentraciones salinas.

Procedencia Embrión	gL <sup>-1</sup> NaCl								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Jabaluna	1,97	2,34	2,02	1,53	1,82	1,77	1,95	1,11	0,83
Lechín Sevilla	2,68	2,50	2,02	2,18	1,88	1,97	1,95	1,50	0,83
Cornez. Jaén	2,98	2,66	2,14	1,69	1,33	1,21	1,21	1,20	1,03
Arbequina	2,65	2,58	2,22	1,58	1,78	1,03	1,15	0,30	0,23
Manz. Jaén	2,30	2,20	2,04	1,44	1,04	1,08	0,44	0,10	-
Manz. Sevilla	1,47	1,30	1,66	0,87	1,38	0,98	0,87	1,05	0,40
Galego	1,50	1,00	0,47	0,40	0,20	0,15	0,12	0,05	-
Picual	2,46	2,25	1,88	1,34	1,41	0,77	0,80	0,70	0,65
Cañivano	4,43	5,57	3,10	2,70	1,97	2,70	2,62	2,00	1,25
Raboconejo	4,10	-	5,00	-	4,00	-	2,10	-	1,30
Lagolargo	3,90	-	4-80	-	4,30	-	2,20	-	1,0

Tabla 3.9. Porcentaje de crecimiento del tallo de las plantas de las distintas procedencias, cultivadas *in vitro* en medio con diferentes concentraciones salinas en función de las plantas control.

Procedencia Embrión	gL <sup>-1</sup> NaCl								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Jabaluna	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	78 <sup>ab</sup>	92 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>	99 <sup>a</sup>	56 <sup>b</sup>	42 <sup>b</sup>
Lechín Sevilla	100 <sup>a</sup>	93 <sup>a</sup>	75 <sup>ab</sup>	81 <sup>a</sup>	70 <sup>ab</sup>	73 <sup>ab</sup>	73 <sup>ab</sup>	56 <sup>b</sup>	36 <sup>b</sup>
Cornez. Jaén	100 <sup>a</sup>	89 <sup>a</sup>	72 <sup>ab</sup>	57 <sup>ab</sup>	45 <sup>ab</sup>	41 <sup>b</sup>	41 <sup>b</sup>	40 <sup>b</sup>	34 <sup>b</sup>
Arbequina	100 <sup>a</sup>	97 <sup>a</sup>	84 <sup>a</sup>	60 <sup>b</sup>	67 <sup>ab</sup>	39 <sup>b</sup>	43 <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>	9 <sup>c</sup>
Manz. Jaén	100 <sup>a</sup>	96 <sup>a</sup>	89 <sup>a</sup>	63 <sup>ab</sup>	45 <sup>ab</sup>	47 <sup>ab</sup>	19 <sup>c</sup>	4 <sup>d</sup>	0 <sup>e</sup>
Manz. Sevilla	100 <sup>a</sup>	88 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	71 <sup>ab</sup>	94 <sup>a</sup>	67 <sup>ab</sup>	59 <sup>ab</sup>	54 <sup>ab</sup>	20 <sup>b</sup>
Galego	100 <sup>a</sup>	67 <sup>b</sup>	31 <sup>c</sup>	27 <sup>c</sup>	13 <sup>d</sup>	10 <sup>d</sup>	8 <sup>d</sup>	3 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>
Picual	100 <sup>a</sup>	91 <sup>a</sup>	76 <sup>ab</sup>	54 <sup>b</sup>	57 <sup>b</sup>	31 <sup>b</sup>	32 <sup>b</sup>	28 <sup>b</sup>	26 <sup>b</sup>
Cañivano	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	70 <sup>ab</sup>	61 <sup>ab</sup>	44 <sup>b</sup>	61 <sup>ab</sup>	59 <sup>ab</sup>	45 <sup>b</sup>	28 <sup>b</sup>
Raboconejo	100 <sup>a</sup>	-	100 <sup>a</sup>	-	97 <sup>a</sup>	-	51 <sup>ab</sup>	-	32 <sup>b</sup>
Lagolargo	100 <sup>a</sup>	-	100 <sup>a</sup>	-	100 <sup>a</sup>	-	56 <sup>ab</sup>	-	28 <sup>b</sup>

Letras minúsculas leídas en fila indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre variedades.

Tabla 3.10. Influencia de la salinidad en el estado nutritivo de las plántulas de olivo *in vitro* (media de todos los cultivares).

Nutriente	gL <sup>-1</sup> NaCl								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
N % ms	4,71	4,55	4,38	4,00	3,98	4,36	4,48	6,87	6,48
P % ms	0,49	0,55	0,53	0,53	0,50	0,51	0,53	0,59	0,62
K % ms	2,21	2,37	2,06	1,94	1,87	1,72	1,67	1,61	1,59
Ca % ms	0,50	0,45	0,47	0,46	0,43	0,40	0,44	0,52	0,57
Mg % ms	0,13	0,12	0,12	0,11	0,10	0,10	0,09	0,11	0,12
Na % ms	0,63	1,56	2,76	3,22	4,71	4,93	5,96	6,18	6,63
Cl % ms	0,68	2,07	3,63	5,02	6,66	7,82	7,72	8,05	8,07
Fe ppm	293	-	470	429	380	490	520	460	546
Mn ppm	179	291	279	269	334	304	249	256	358
Cu ppm	24,6	22,8	21,8	27,3	21,8	21,5	26,6	51,5	58,6
Zn ppm	150	193	202	218	186	224	225	243	396

Tabla 3.11. Supervivencia *in vitro* (%) de explantos de olivo sometidos a concentraciones crecientes de NaCl y procedentes de plantas seleccionadas *in vitro* por su tolerancia a la sal (60 días de cultivo).

Variedad de procedencia	TRATAMIENTO SALINO (gL <sup>-1</sup> de NaCl)						
	0	1	3	5	7	9	10
Raboconejo	100aA	100bA	100 bA	100 bA	100 bA	100 dA	91cA
Lagolargo	100aC	100 bC	91baCB	90abCB	82aAB	90bcdCB	91cCB
Jabaluna	100aB	100 bB	100bB	100bB	89abB	100dB	80bcA
Lechín Sev.	100aB	100bB	100bB	100bB	83aA	92cdB	83bcA
Picual	100aB	88abAB	100bB	100bB	100bA	67bA	67bA
Cornezuelo	100aC	100bC	90abACB	100bC	67aA	67bA	83bcAB
Manz.Jaén	100aC	75aB	67aB	75aB	75aB	36aA	36aA
Galego	100aC	73aA	100bC	100bC	100bC	90bcdCB	50abA

Letras mayúsculas diferentes leídas en fila indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre tratamientos. Letras minúsculas leídas en columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre variedades.

Tabla 3.12. Influencia de la salinidad (NaCl) sobre la germinación de embriones de olivo cultivados *in vitro* procedentes de 4 variedades diferentes.

Embrión de:	gL <sup>-1</sup>			
	0	4	6	8
	% de Germinación			
Galego	100 bB	100 bB	96bB	55aA
Lechín	100 bB	100 bB	96bB	62abA
Raboconejo	100 bB	100 bB	100 bB	80bA
Lagolargo	100 bB	100 bB	100 bB	80bA

Letras mayúsculas diferentes leídas en fila indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre tratamientos. Letras minúsculas leídas en columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre variedades.

Tabla 3.13. Influencia de la salinidad (NaCl) sobre el porcentaje de formación de plántulas de embriones de olivo cultivados *in vitro* procedentes de 4 variedades diferentes.

Embrión de:	gL <sup>-1</sup> de NaCl			
	0	4	6	8
	% de formación de plántulas			
Galego	(82) 100 cB	91,46 cB	51,21 bA	6,09 aA
Lechín	(88) 100 cB	100 cB	63,63 bAB	13,63 aA
Raboconejo	(82) 100 cB	109,75 cB	82,96 bB	39,02 aB
Lagolargo	(88) 100 cB	100 cB	79,54 bB	34,09 aB

Letras minúsculas diferentes leídas en fila indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre tratamientos. Letras mayúsculas diferentes leídas en columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre variedades.

Tabla 3.14. Influencia de la salinidad (NaCl) sobre el desarrollo de tallo de plántulas de embriones de olivo cultivados *in vitro* procedentes de 4 variedades diferentes.

Embrión de	gL <sup>-1</sup> de NaCl			
	0	4	6	8
	Longitud de tallo (cm.) %			
Galego	(2,5) 100 bA	(1,2) 48 aA	(1,2) 48 aAB	(0,9) 36 aA
Lechín	(3,0) 100 cA	(2,5) 83,33 bC	(1,0) 33,33 aA	(0,7) 23,33 aA
Raboconejo	(3,5) 100 dA	(3,0) 85,71 cCB	(2,0) 57,14 bB	(1,0) 28,75 aA
Lagolargo	(4,0) 100 dA	(2,5) 62,5 cbAB	(2,0) 50 baAB	(1,2) 30 aA

Letras minúsculas diferentes leídas en fila indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre tratamientos. Letras mayúsculas diferentes leídas en columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre variedades.

Tabla 3.15. Influencia de la salinidad (NaCl) sobre el desarrollo de raíz de plántulas de embriones de olivo cultivados *in vitro* procedentes de 4 variedades diferentes.

Embrión de	gL <sup>-1</sup> de NaCl			
	0	4	6	8
	Longitud de raíz. (cm.) %			
Galego	(13) 100 bA	(10) 48 aA	(6) 48 aAB	(2,5) 36 aAB
Lechín	(15) 100 cA	(11) 83,33 bB	(8) 33,33 aA	(3) 23,33 aA
Raboconejo	(17) 100 dA	(12,5) 85,7 cB	(12) 57,1 bB	(8) 28,7 aAB
Lagolargo	(16) 100 dA	(12,5) 78,12 bB	(10) 62,5 abAB	(8) 50,0 aB

Letras minúsculas diferentes leídas en fila indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre tratamientos. Letras mayúsculas diferentes leídas en columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre variedades.

Tabla 3.16. Influencia de la salinidad en la supervivencia tras 60 días de cultivo *in vitro* de los explantos de los olivos seleccionados y no seleccionados.

NaCl gL <sup>-1</sup>	SUPERVIVENCIA %							
	Explantos no seleccionados				Explantos seleccionados			
	G0	L0	RC0	LL0	G8	L8	RC8	LL8
0	100 <sup>cA</sup>	100 <sup>cA</sup>	100 <sup>cA</sup>	100 <sup>cA</sup>	100 <sup>cA</sup>	100 <sup>cA</sup>	100 <sup>cA</sup>	100 <sup>cA</sup>
2	100 <sup>cA</sup>	100 <sup>cA</sup>	100 <sup>cA</sup>	100 <sup>cA</sup>	100 <sup>cA</sup>	100 <sup>cA</sup>	100 <sup>cA</sup>	100 <sup>cA</sup>
4	97.9 <sup>cA</sup>	95.8 <sup>cA</sup>	100 <sup>cA</sup>	100 <sup>cA</sup>	100 <sup>cA</sup>	100 <sup>cA</sup>	100 <sup>cA</sup>	100 <sup>cA</sup>
6	87.5 <sup>bcBC</sup>	75.0 <sup>bb</sup>	95.8 <sup>cB</sup>	93.7 <sup>cB</sup>	100 <sup>cB</sup>	95.8 <sup>cB</sup>	100 <sup>cB</sup>	100 <sup>cB</sup>
8	85.4 <sup>abcAB</sup>	75.0 <sup>bAB</sup>	87.5 <sup>cB</sup>	93.7 <sup>cB</sup>	95.8 <sup>cB</sup>	100 <sup>cB</sup>	100 <sup>cB</sup>	95.8 <sup>cB</sup>
10	68.7 <sup>abA</sup>	68.7 <sup>bA</sup>	93.7 <sup>cB</sup>	91.6 <sup>cAB</sup>	100 <sup>cB</sup>	97.9 <sup>cB</sup>	100 <sup>cB</sup>	100 <sup>cB</sup>
12	62.5 <sup>aAB</sup>	54.1 <sup>bA</sup>	85.4 <sup>cBCD</sup>	81.2 <sup>bBCD</sup>	91.6 <sup>cCD</sup>	91.6 <sup>cCD</sup>	100 <sup>cD</sup>	95.8 <sup>cCD</sup>

Letras minúsculas diferentes leídas en columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre tratamientos. Letras mayúsculas diferentes leídas en fila indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre variedades.

Tabla 3.17. Influencia de la salinidad en el desarrollo tras 60 días de cultivo *in vitro* de los explantos de los olivos seleccionados y no seleccionados.

NaCl gL <sup>-1</sup>	DESARROLLO (mm)							
	Explantos no seleccionados				Explantos seleccionados			
	G0	L0	RC0	LL0	G8	L8	RC8	LL8
0	50 <sup>cA</sup>	53 <sup>bA</sup>	50 <sup>bA</sup>	49 <sup>cA</sup>	50 <sup>cA</sup>	50 <sup>cA</sup>	53 <sup>bA</sup>	54 <sup>ba</sup>
2	52 <sup>cA</sup>	40 <sup>bA</sup>	48 <sup>bA</sup>	43 <sup>cA</sup>	52 <sup>cA</sup>	62 <sup>cA</sup>	55 <sup>bA</sup>	64 <sup>bA</sup>
4	32 <sup>cbAB</sup>	14 <sup>aA</sup>	29 <sup>abAB</sup>	34 <sup>cAB</sup>	40 <sup>bcB</sup>	35 <sup>bcAB</sup>	40 <sup>abB</sup>	51 <sup>bb</sup>
6	15 <sup>baA</sup>	10 <sup>aA</sup>	20 <sup>aA</sup>	23 <sup>bcA</sup>	15 <sup>abA</sup>	15 <sup>abA</sup>	26 <sup>abA</sup>	20 <sup>aA</sup>
8	11 <sup>baA</sup>	3 <sup>aA</sup>	13 <sup>aA</sup>	9 <sup>aA</sup>	10 <sup>aA</sup>	8 <sup>aA</sup>	16 <sup>aA</sup>	9 <sup>aA</sup>
10	4 <sup>aA</sup> <sub>B</sub>	0 <sup>aA</sup>	9 <sup>aAB</sup>	2 <sup>aAB</sup>	2 <sup>aAB</sup>	5 <sup>aAB</sup>	16 <sup>aB</sup>	3 <sup>aAB</sup>
12	1 <sup>aA</sup>	0 <sup>aA</sup>	4 <sup>aA</sup>	0 <sup>aA</sup>	5 <sup>aA</sup>	5 <sup>aA</sup>	15 <sup>aA</sup>	3 <sup>aA</sup>

Tabla 3.18. Estado nutritivo de las hojas de las plántulas de olivo en relación a la concentración de NaCl en el medio. (Media de las 4 plantas originales)

Na Cl		% dm							ppm			
gL <sup>-1</sup>	mM	N	P	K	Ca	Mg	Na	Cl	Fe	Mn	Zn	Cu
0	0	4.71	0.49	2.21	0.50	0.13	0.63	0.68	293	179	150	25
4	68	3.98	0.50	1.87	0.43	0.10	4.71	6.66	380	334	186	22
6	103	4.48	0.53	1.67	0.44	0.09	5.96	7.72	520	249	225	27
8	137	6.48	0.62	1.57	0.57	0.12	6.63	8.07	546	358	396	59

## **IV. COMPORTAMIENTO ANTE LA SAL EN CONDICIONES EXTERNAS (Cámara de cultivo) DE ALGUNOS CLONES SELECCIONADOS “in vitro”.**

### **IV. 1. INTRODUCCIÓN**

El olivo (*Olea europea L.*) se considera una planta de tolerancia media a la sal (Mass y Hoffman 1977; Rugini y Fedeli, 1990). Tattini et al. (1992) indican la existencia de estudios anteriores que asocian la tolerancia a la sal de muchas especies arbóreas con la exclusión de Na y Cl por sus raíces y hojas. Klein et al. (1994) hacen referencia a autores que asocian la resistencia del olivo a la salinidad con la relación Na/K (mecanismo de exclusión de iones), o con el ajuste osmótico que se produce en el interior celular (compartimentación y acumulación iónica).

Otros estudios señalan que los mecanismos de exclusión de la sal en el olivo están localizados en el sistema radicular (Reimann, 1992; Tattini et al., 1992 y 1994; y Chartzoulakis et al., 2002). Según estos autores, los mecanismos de control afectan a la traslocación de iones Na<sup>+</sup> de la raíz a la zona aérea más que a factores de absorción. Es probable que la bomba de Na/K en el plasmalema se encuentre implicada en la regulación de este transporte de sodio hacia el tallo (Bartolini et al., 1991; Tattini et al., 1994 y Chartzoulakis et al., 2002). Además de estos mecanismos, la capacidad de acumulación de sal en vacuolas en hojas puede ser un factor también muy importante en la tolerancia del olivo a la presencia de NaCl (Loreto y Bonghi, 1987).

Aun cuando se han encontrado dentro del género *Olea* variaciones significativas en la tolerancia al estrés por NaCl, tales como diferencias apreciables intraespecíficas (Blum, 1988) e incluso diferencias significativas entre cultivares (Benlloch et al., 1994), lo cierto es que la respuesta genética del olivo frente al estrés por NaCl no ha sido estudiada suficientemente.

Los efectos que produce la presencia de NaCl en plantas de olivo a concentraciones bajas son, en ocasiones, síntomas visuales de afección como brotes quemados y leve reducción de tamaño (Bartolini et al., 1991). Concentraciones medias de NaCl producen reducciones drásticas de crecimiento, brotes quemados y caída de hojas (Bartolini et al., 1991; Tattini et al., 1992 y 1994; Benlloch et al., 1994;

Chartzoulakis et al., 2002). Y concentraciones altas de NaCl pueden producir ausencia total de crecimiento, drástica caída de hojas y hasta la muerte (Royo y Aragües, 1989; Bartolini et al., 1991, Chartzoulakis et al., 2002).

La reducción en el crecimiento la explica Pasternak (1987) por la disminución de las reservas energéticas necesarias para el desarrollo, usadas para la adaptación de la planta a la presencia salina. Es decir, puede deberse a la desviación de los fotosintatos necesarios para el crecimiento hacia funciones osmorreguladoras o a la energía consumida en el transporte iónico.

La presencia de NaCl en el interior de la planta afecta también al contenido mineral de los tejidos: Bartolini et al. (1991) observan reducción de niveles del ion  $K^+$  en el interior de la planta y reducción del ion  $Ca^{2+}$  en hojas con la adición de NaCl. Estudios posteriores comprueban también la influencia del NaCl en la reducción de nivel de iones  $K^+$  en la raíz de la planta (Reimann, 1992; Tattini et al., 1994; Chartzoulakis et al., 2002). Klein et al. (1994) observan reducción de  $Ca^{2+}$  en raíz, e indican que la baja concentración de Ca es perjudicial para la permeabilidad selectiva del Na por la raíz. También ven reducción de K y Mg en raíz, tallo y hojas, al igual que un aumento de los niveles de P, con el aumento de la concentración de NaCl.

A medida que aumenta la concentración de NaCl en el agua de riego, los niveles de  $Na^+$  y  $Cl^-$  aumentan en general en todas las zonas del interior de la planta (raíz, tallo y hojas) (Bartolini et al., 1991; Tattini et al., 1992 y 1994; Benlloch et al., 1994; Klein et al., 1994; Chartzoulakis et al., 2002). Tattini et al. (1992 y 1994) encuentran una correlación entre la acumulación de Na en hojas apicales y la reducción del crecimiento, indicando que la exclusión de sal de los brotes es un mecanismo de resistencia en el olivo. Estos autores no encuentran diferencias en la concentración de NaCl en raíz entre la variedad tolerante y la no tolerante, pero sí clara en el transporte de sodio de la raíz a la parte aérea de la variedad tolerante y la no tolerante.

La relación Na/K se estudia por varios autores por la importancia de la traslocación de iones sodio en la planta. Así, Chartzoulakis et al. (2002) comprueban que en general, la relación Na/K es menor en hojas que en el resto de la planta, y que esta relación aumenta con las concentraciones de NaCl. Según estos autores, en las variedades tolerantes la relación Na/K es menor en hoja que en las variedades sensibles, por lo que basan la tolerancia a la salinidad en la capacidad de inhibir el transporte de iones sodio a la parte aérea de la planta, lo que está de acuerdo con Jeschke (1984); Reimann (1992) y Tattini et al. (1994). Otros autores obtienen diferencias en la relación

Na/K en hoja en presencia de NaCl entre variedades, aunque no una correlación directa entre los valores de esta relación y variedades tolerantes y sensibles (Benlloch et al., 1994).

Estudios recientes sugieren que los olivos pueden ser regados con agua conteniendo 3200 ppm de sal (conductividad eléctrica de  $5 \text{ dSm}^{-1}$ ), desarrollándose con niveles en hojas de 0,4-0,5 % de Na (Al-Saket y Aesheh, 1987; Tattini et al., 1992). Therios y Misopolinos (1988) observan que plantas de olivo de 3 años no sufren estrés por NaCl a concentraciones inferiores a 80 mM durante un periodo de cultivo de 90 días. Rugini y Fedeli (1990) indican que la concentración de  $8 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl en el agua de riego es el límite de tolerancia para las plantas de olivo.

## IV. 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### IV.2.1 PRUEBA 1

Se utilizaron ocho líneas clónicas de plantas obtenidas por propagación agámica *in vitro* a partir de una sola planta procedente en cada caso de un embrión germinado *in vitro*. En tres de las líneas la planta inicial se había seleccionado *in vitro* (SV) en un medio con  $8 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl y el embrión respectivo procedía de los cultivares "Cornezuelo de Jaén" (CJ-SV), Picual (PIC-SV) y Jabaluna (JAB-SV). De las cinco líneas restantes, 4 provenían de plantas cuyo embrión de origen procedía de las mismas variedades anteriores y 1 de un olivo seleccionado en "Raboconejo" (RC). En estas líneas la planta inicial no había sufrido un proceso de selección *in vitro* como el anterior ya que se había cultivado en medio sin NaCl. Para su denominación se usaron las mismas siglas (CJ, PIC, CAÑ, JAB, y RC pero sin SV).

Las plantas de cada línea se trasplantaron a condiciones externas (Cantos et al., 1993) a un contenedor de un litro de capacidad con substrato de arena inerte lavada (AQUARAMA). En esa situación se cultivaron durante 15 meses, manteniendo el substrato siempre húmedo por riegos frecuentes con solución de Hoagland (Hoagland y Arnon 1950) 20%, sin añadir NaCl. Después, se tomaron 15 plantas homogéneas de cada línea, cinco de las cuales se siguieron regando como antes, mientras que a la solución Hoagland 20 % de las restantes 10 plantas, se le añadió inicialmente una solución de  $2 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl que se fue aumentando en las cantidades e intervalos que se indican en la Tabla 4.1.

En todos los casos el riego se realizó con abundante solución (500 cc. por riego y planta) una vez por semana, lo que permitió obtener suficiente percolado para medir la conductividad saliente y comprobar que se ajustaba a la deseada. En consecuencia, en cada riego se midió la conductividad de la solución de riego y del percolado de cada maceta.

En cada riego se evaluó el efecto de los tratamientos salinos con un seguimiento visual del estado y comportamiento de la planta.

Tabla 4.1. Concentraciones de NaCl y días de duración de cada tratamiento. Prueba 1.

NaCl	2 gL <sup>-1</sup>	4gL <sup>-1</sup>	6 gL <sup>-1</sup>	8 gL <sup>-1</sup>	10 gL <sup>-1</sup>	12 gL <sup>-1</sup>
Número de Riegos	2	2	3	3	3	3
Días duración	15	15	21	21	21	21

La toma de muestras para análisis nutricional de hojas, tallos y raíces se realizó al término de la prueba. Los análisis se realizaron según la metodología descrita en el capítulo III.

La prueba finalizó transcurridos 114 días.

#### IV.2.2. PRUEBA 2.

En este caso se utilizaron las siguientes líneas clónicas de plantas:

L-0-4A obtenida a partir de un embrión de origen variedad Lechín de Sevilla, germinado *in vitro* en medio sin sal (0 gL<sup>-1</sup> NaCl) y los explantos destacados de su planta, propagados y seleccionados por síntomas de sufrir estrés en medio con poca sal (4 gL<sup>-1</sup> NaCl). Es decir, se trata de un material procedente de una variedad definida como tolerante (en la Tabla 3.14 se presenta como L0) pero de comportamiento considerado como poco tolerante (variabilidad del embrión).

L-0-4B, obtenida de forma similar a la anterior, también de origen Lechín de Sevilla, pero cuyos explantos tuvieron mejor comportamiento ante la sal *in vitro* que los anteriores y mayor tendencia a la ramificación. Se considera en consecuencia como un material no muy tolerante, pero mejor que el anterior.

G-8-12, obtenida a partir de un embrión procedente de la variedad Galego, germinado en medio con 8 gL<sup>-1</sup> de NaCl y cuyos explantos se propagaron y posteriormente se seleccionaron en medio con 12 gL<sup>-1</sup> donde sobrevivieron, aunque con poco crecimiento.

En consecuencia, se trata de un material procedente de una variedad definida como poco tolerante a la sal pero que demostró una elevada tolerancia *in vitro* (variabilidad del embrión), (en la Tabla 3.14 se presenta como el clon G8).

RC-8-12, obtenida a partir de un embrión originario de una planta seleccionada por su tolerancia a la sal en Raboconejo (Marismas del Odiel), germinado en 8 gL<sup>-1</sup> de NaCl y posteriormente sus explantos seleccionados en un medio con 12 gL<sup>-1</sup> de NaCl, en el que vivieron y crecieron bien. Es decir, no mostraron síntomas excesivos de toxicidad. Se trata, en consecuencia de un material procedente de una planta madre muy adaptada a la salinidad y que demostró *in vitro* una tolerancia excepcional ante la sal, (en las Tablas 3.16 y 3.17 se presenta como RC8).

Todas las plantas se trasplantaron de *in vitro* a *ex vitro*, y se cultivaron como en la prueba 1, en macetas de un litro de capacidad con arena inerte de cuarzo (0,8-1,5 mm) y se regaron con agua y solución nutritiva Hoagland 20 % durante 15 meses desde su adaptación a condiciones externas.

Al comenzar la prueba, cada línea clónica estaba compuesta por 20 plantas, cinco de ellas se siguieron regando solo con solución nutritiva, tomándose como plantas control, y el segundo grupo de 15 plantas, se trató con la misma solución nutritiva y adiciones crecientes de NaCl según aparece en la Tabla 4.2. El riego se llevó a cabo una vez por semana, y en todos los casos se realizó con abundante solución (500 cc. por riego y planta) lo que permitió obtener suficiente percolado para medir la conductividad saliente. En consecuencia, igual que se realizó en la prueba 1, en cada riego se midió la conductividad de la solución de riego y del percolado de cada maceta.

Tabla 4.2. Concentraciones de NaCl y días de duración de cada tratamiento. Prueba 2.

NaCl	2 gL <sup>-1</sup>	4gL <sup>-1</sup>	6 gL <sup>-1</sup>	8 gL <sup>-1</sup>	10 gL <sup>-1</sup>	12 gL <sup>-1</sup>	14 gL <sup>-1</sup>	16 gL <sup>-1</sup>
Número de Riegos	1	2	2	4	4	4	4	4
Días duración	7	15	15	30	30	30	30	30

La medida del crecimiento de las plantas se realizó 4 veces correspondiendo a los 0, 35, 90 y 175 días.

De forma similar a la prueba anterior, en cada riego se evaluó el efecto de los tratamientos salinos con un seguimiento visual del estado y comportamiento de la planta.

La toma de muestras para análisis nutricional de hojas se realizó, en la caída de hojas con las plantas vivas y al final de la prueba. El muestreo de los tallos y raíces se realizó al

término de la prueba. Los análisis se realizaron según la metodología descrita en el capítulo III. Debido a la correlación existente entre los contenidos de Na y Cl a veces no se realizó el análisis de este último.

La prueba finalizó a los 187 días con un tratamiento máximo de 16 gL<sup>-1</sup> de NaCl.

### IV.3. RESULTADOS Y DISCUSION

#### IV.3.1. PRUEBA 1

Como se ha venido discutiendo en pruebas anteriores y se indicó en el capítulo de Materiales y Métodos, la supervivencia de las plantas es uno de los parámetros considerados para definir la tolerancia a la sal de cada clon de olivo en estudio. En este sentido, se debe indicar que no se produjo baja alguna entre las plantas control de todos los clones. Por ello, las bajas producidas entre las tratadas con NaCl se deben fundamentalmente a la acción de la sal. Así, en la Tabla 4.3 se indica el número de plantas muertas por clon en cada tratamiento salino y el total al final del experimento.

Tabla 4.3. Número de plantas muertas en las distintas concentraciones de NaCl.

gL <sup>-1</sup> NaCl	CJ	CJ-SV	PIC	PIC-SV	CAÑ	RC	JAB	JAB-SV
6	3	0	0	0	0	0	1	0
8	0	0	1	0	1	0	1	0
10	1	1	1	1	1	0	2	0
12	2	1	2	2	3	0	2	0
Total	6	2	4	3	4	0	6	0
%	60 c	20 ab	40 bc	30 ab	40 bc	0 a	60 c	0 a

Se debe destacar el comportamiento de los clones JAB-SV y RC que no tienen ninguna baja en las concentraciones salinas ensayadas. Esta elevada tolerancia se corresponde en el primer caso con un origen varietal, que se considera tolerante tanto en este trabajo *in vitro* (Tablas 3.6, 3.7, 3.8 y 3.9), como por Benlloch et al., 1994, en condiciones externas. Además, las plantas habían sido seleccionadas *in vitro* por responder bien en un medio al que se habían añadido 8 gL<sup>-1</sup> de NaCl, lo que había provocado una elevada salinidad (11,8 dSm<sup>-1</sup>). En el caso de las plantas RC, aunque no se habían seleccionado *in vitro* en condiciones tan extremas, su proveniencia de un

embrión de una planta de Raboconejo, que se desarrolla bajo condiciones de estrés salino (capítulo II) hacía pensar en ese tipo de comportamiento. Los clones CJ-SV y PIC-SV, con pérdidas respectivas de 2 (20%) y 3 (30%) plantas, sin diferencias significativas con las anteriores, también presentan baja mortandad. En ambos casos se trata de plantas procedentes de cultivares, Cornezuelo de Jaén y Picual, definidos al igual que en los casos anteriores como tolerantes a la sal y seleccionados *in vitro* por el buen comportamiento en el medio con  $8 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl. Por último, las plantas de CAÑ y PIC con un 40% y las de JAB y CJ con un 60% de pérdidas sin diferencias entre sí, pero con diferencias significativas de JAB-SV y RC, son las de peor comportamiento. Se trata de plantas procedentes respectivamente de embriones de Cañivano, Picual, Jabaluna y Cornezuelo de Jaén que no se habían seleccionado en el medio con  $8 \text{ gL}^{-1}$ .

En relación con los resultados obtenidos se observa que dentro de cada procedencia, las plantas que se habían seleccionado *in vitro* por su buen comportamiento en el medio con  $8 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl en general responden mejor en condiciones externas que las que no habían recibido una concentración salina tan alta. Es decir, la selección hecha *in vitro* tiene un reflejo en el comportamiento externo ante la sal. Además, las plantas procedentes de "Raboconejo" (Marismas del Odiel) que, aunque no han sufrido un proceso de selección *in vitro* tan riguroso como las definidas como SV, al proceder de olivos adaptados a condiciones de elevada salinidad, demuestran también ese comportamiento de tolerancia en las condiciones de la prueba.

El segundo parámetro considerado para definir la tolerancia a la sal (NaCl) de cada línea clonal, es el crecimiento de las plantas supervivientes. Así, en las Tablas 4.4 a 4.11, se compara el crecimiento de las plantas control y sometidas a tratamiento salino de cada clon, en los 114 días de duración de la prueba. El crecimiento de las plantas control es muy parecido en todos los clones, excepto CAÑ y JAB-SV que presentan un menor desarrollo (Tabla 4.12), aunque sin diferencias estadísticamente significativas con el obtenido en el resto de clones, excepción hecha de CJ, donde el crecimiento medio (29,8 cm.) es significativamente superior. En general, la presencia de sal en el medio hace disminuir dicho crecimiento aunque de forma distinta según los casos, existiendo una buena relación con lo indicado antes para la supervivencia. Así, dentro de cada línea clónica, en dos de los tres casos probados con plantas seleccionadas (SV) y no seleccionadas, se obtiene un mayor crecimiento final en las seleccionadas. Sólo la variedad Jabaluna (JAB) presenta plantas supervivientes con mayor crecimiento en las no seleccionadas que en las seleccionadas.

Tabla 4.4. Crecimiento de las plantas de olivo (clon CJ) durante la prueba (114 días)

Clon CJ							
Plantas Control				Plantas Tratadas con NaCl			
Planta	Tamaño inicial (cm.)	Tamaño final (cm.)	Crecimiento (cm.)	Planta	Tamaño inicial (cm.)	Tamaño final (cm.)	Crecimiento (cm.)
1	14.0	37.0	23.0	6	10	+	+
2	13.0	48.0	35.0	7	11	21	10
3	9.0	28.0	19.0	8	9	+	+
4	11.0	57.0	46.0	9	10	+	+
5	11.0	37.0	26.0	10	7	+	+
				11	15	17	2
				12	11	15	4
				13	17	Análisis	Análisis
				14	10	+	+
				15	8	+	+
Media	11.6	41.4	29.8 B	Media	10.8 (*)		
					12.3 (**)	17.6 (**)	5.3 A (**)

Letras diferentes leídas en fila indican diferencias estadísticamente significativas al nivel del 95%.

+: Plantas muertas. (\*) Media de todas las plantas. (\*\*) Media de las plantas supervivientes al final de la prueba.

Tabla 4.5. Crecimiento de las plantas de olivo (clon CJ-SV) durante la prueba (114 días)

Clon CJ-SV							
Plantas Control				Plantas Tratadas con NaCl			
Planta	Tamaño inicial (cm.)	Tamaño final (cm.)	Crecimiento (cm.)	Planta	Tamaño inicial (cm.)	Tamaño final (cm.)	Crecimiento (cm.)
1	8	29	21	6	15	24	9
2	9	35	26	7	12	Análisis	Análisis
3	12	38	26	8	14	19	5
4	19	39	20	9	9	17	8
5	11	36	25	10	10.5	19	8.5
				11	14	Análisis	Análisis
				12	18	+	
				13	11	19	8
				14	12	+	
				15	13	18	5
Media	11.8	35.4	23.6 B	Media	12.8 (*)	19.3 (**)	7.2 A (**)
					12.1 (**)		

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas al nivel del 95%.

+: Plantas muertas. (\*) Media de todas las plantas. (\*\*) Media de las plantas supervivientes al final de la prueba.

Tabla 4.6. Crecimiento de las plantas de olivo (clon PIC) durante la prueba (114 días)

Clon PIC							
Plantas Control				Plantas Tratadas con NaCl			
Planta	Tamaño inicial (cm.)	Tamaño final (cm.)	Crecimiento (cm.)	Planta	Tamaño inicial (cm.)	Tamaño final (cm.)	Crecimiento (cm.)
1	9	26	17	6	16	+	+
2	6	24	18	7	14	18	4
3	10	26	16	8	15	21	6
4	7	35	28	9	19.5	+	+
5	11	31	20	10	12	16	4
				11	20	32	12
				12	22	26	4
				13	23	+	+
				14	18	Análisis	Análisis
				15	16	+	+
Media	8.6	28.4	19.8 B	Media	17.5 (*)		6.0 A (**)
					16.6 (**)	22.6 (**)	

Letras diferentes leídas en fila indican diferencias estadísticamente significativas al nivel del 95%.

+: Plantas muertas. (\*) Media de todas las plantas. (\*\*) Media de las plantas supervivientes al final de la prueba.

Tabla 4.7. Crecimiento de las plantas de olivo (clon PIC-SV) durante la prueba (114 días)

Clon PIC-SV							
Plantas Control				Plantas Tratadas con NaCl			
Planta	Tamaño inicial (cm.)	Tamaño final (cm.)	Crecimiento (cm.)	Planta	Tamaño inicial (cm.)	Tamaño final (cm.)	Crecimiento (cm.)
1	17	44	27	6	34	46	12
2	21	45	24	7	13	19	6
3	15	39	24	8	9	+	+
4	20	45	25	9	20	31	11
5	11	25	14	10	18	24	6
				11	8	12	4
				12	9	+	+
				13	16	Análisis	Análisis
				14	14	+	+
				15	10	23	13
Media	16.8	39.6	22.8 B	Media	15.1 (*)	25.8 (**)	8.6 A (**)
					17.2 (**)		

Letras diferentes leídas en fila indican diferencias estadísticamente significativas al nivel del 95%.

+: Plantas muertas. (\*) Media de todas las plantas. (\*\*) Media de las plantas supervivientes al final de la prueba.

Tabla 4.8. Crecimiento de las plantas de olivo (clon CAÑ) durante la prueba (114 días)

Clon CAÑ							
Plantas Control				Plantas Tratadas con NaCl			
Planta	Tamaño Inicial (cm.)	Tamaño final (cm.)	Crecim. (cm.)	Planta	Tamaño Inicial (cm.)	Tamaño final (cm.)	Crecim. (cm.)
1	16	28	12	6	15	+	+
2	12	29	17	7	11	16	5
3	12	19	7	8	11	22	11
4	18	35	17	9	11	19	8
5	13	29	16	10	9	+	+
				11	10	+	+
				12	11	Análisis	Análisis
				13	10	+	+
				14	9	+	+
				15	11	19	8
Media	14.2	28	13.8 A	Media	10.8 (*)	19 (**)	8 A (**)
					11.0 (**)		

Letras diferentes leídas en fila indican diferencias estadísticamente significativas al nivel del 95%.

+: Plantas muertas. (\*) Media de todas las plantas. (\*\*) Media de las plantas supervivientes al final de la prueba.

Tabla 4.9. Crecimiento de las plantas de olivo (clon RC) durante la prueba (114 días)

Clon RC							
Plantas Control				Plantas Tratadas con NaCl			
Planta	Tamaño inicial (cm.)	Tamaño final (cm.)	Crecimiento (cm.)	Planta	Tamaño inicial (cm.)	Tamaño final (cm.)	Crecimiento (cm.)
1	15	37	22	6	20	39	19
2	18	36	18	7	12	37	25
3	17	44	27	8	17	42	25
4	15	31	16	9	12	23	11
5	15	42	27	10	10	26	16
				11	14	38	24
				12	18	Análisis	Análisis
				13	19	34	15
				14	9	36	27
				15	13	38	25
Media	16	38	22 A	Media	14.4 (*)	34.8 (**)	20.8 A (**)
					14.0 (**)		

Letras diferentes leídas en fila indican diferencias estadísticamente significativas al nivel del 95%.

+: Plantas muertas. (\*) Media de todas las plantas. (\*\*) Media de las plantas supervivientes al final de la prueba.

Tabla 4.10. Crecimiento de las plantas de olivo (clon JAB) durante la prueba (114 días)

Clon JAB							
Plantas Control				Plantas Tratadas con NaCl			
Planta	Tamaño inicial (cm.)	Tamaño final (cm.)	Crecimiento (cm.)	Planta	Tamaño inicial (cm.)	Tamaño final (cm.)	Crecimiento (cm.)
1	16	30	14	6	17	+	+
2	28	41	13	7	25	29	4
3	19	49	30	8	14	+	+
4	23	49	26	9	29	Análisis	Análisis
5	26	40	14	10	28	+	+
				11	18	42	24
				12	30	+	+
				13	16	+	+
				14	20	+	+
				15	17	29	12
Media	22.4	41.8	19.4 A	Media	21.4 (*) 20 (**)	33.3 (**)	13.3 A (**)

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas al nivel del 95%.  
 +: Plantas muertas. (\*) Media de todas las plantas. (\*\*) Media de las plantas supervivientes al final de la prueba.

Tabla 4.11. Crecimiento de las plantas de olivo (clon JAB-SV) durante la prueba (114 días)

Clon JAB-SV							
Plantas Control				Plantas Tratadas con NaCl			
Planta	Tamaño inicial (cm.)	Tamaño final (cm.)	Crecimiento (cm.)	Planta	Tamaño inicial (cm.)	Tamaño final (cm.)	Crecimiento (cm.)
1	10	19	9	6	7	15	8
2	8	21	13	7	6	Análisis	Análisis
3	8	16	8	8	9	Análisis	Análisis
4	7	21	14	9	5	19	14
5	9	28	19	10	9	18	9
				11	9	21	12
				12	7	21	14
				13	8	20	12
				14	9	18	9
				15	9	16	7
Media	8.4	21	12.6 A	Media	7.8 (*) 7.87 (**)	18.5 (**)	10.63 A (**)

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas al nivel del 95%.  
 +: Plantas muertas. (\*) Media de todas las plantas. (\*\*) Media de las plantas supervivientes al final de la prueba.

Tabla 4.12. Comparación entre los incrementos medios de longitud en cada uno de los clones estudiados y sus tratamientos.

Clones	Control (incrementos medios en cm)	NaCl (incrementos medios en cm)
CJ	29,8 b	5,32 a
CJ SV	23,6 ab	7,25 a
PIC	19,8 ab	6,00 a
PIC SV	22,8 ab	8,66 a
CAÑ	13,8 a	8,00 a
RC	22 ab	20,77 b
JAB	19,4 ab	13,33 ab
JAB SV	12,6 a	10,62 a

Letras diferentes leídas en columna indican diferencias estadísticamente significativas al nivel del 95%.

El tercer parámetro a considerar fue el estado de nutrición de la planta en estas condiciones, analizándose como se indicó en Materiales y Métodos cada uno de los órganos de la planta por separado (raíz, tallo y brotes, y hojas), haciendo distinción entre clones control, plantas tratadas vivas y plantas tratadas muertas.

Tabla 4.13. Estado de nutrición de la raíz, tallo+brotes y hojas de las plantas control media de todos los clones, datos de la bibliografía (Bartolini et al., 1991), y valores óptimos de referencia en hojas (Troncoso, A. Comunicación personal).

	N %	P %	K %	Ca %	Mg %	Na %	Cl %	Fe ppm	Mn ppm	Cu ppm	Zn ppm
RAIZ	1.35	0.09	1.50	0.57	0.33	0.45	0.50	211	26	42	18
TALLO	1.10	0.09	1.25	0.69	0.15	0.47	0.43	25	9	5	5
HOJA	1.81	0.09	1.28	0.70	0.15	0.21	0.21	67	20	8	9
Hoja (Bibliografía)	2.40	0.23	2.33	0.57	0.09	0.06	0.11	57	15	12	37
Raíz (Bibliografía)	1.27	0.33	1.00	0.88	0.15	0.14	0.11	198	23	19	19
Hoja referencia	1.5-2	0.08- 0.15	0.6-2	0.7-1.5	0.1-0.2	0.08	0.12	50-100	20-50	4	30-60

En la Tabla 4.13 se indican los contenidos de nutrientes en la raíz, tallo-brotes, y hojas de las plantas control. Se toma la media de todos los clones ya que no existieron grandes diferencias entre ellos. Las plantas se regaron con solución nutritiva de Hoagland al 20 % sin adición de NaCl.

El mayor nivel de N se encuentra en la hoja, como corresponde al órgano donde tiene lugar la fotosíntesis. Los valores de N en la hoja y raíz, son del mismo valor fisiológico que los datos de referencia (Bartolini et al., 1991 y Troncoso, A. Comunicación personal) para olivos cultivados en condiciones idóneas, y se encuentra dentro del rango considerado óptimo para plantas de olivo. El resto de los elementos en hoja se encuentran, al igual que en el caso del nitrógeno, con valores cercanos a los indicados en la bibliografía, excepto el Na y Cl que presentan valores muy superiores a los valores obtenidos como referencia (Tabla 4.13).

La raíz es el órgano de acumulación de otros nutrientes, en especial los oligoelementos destacando entre ellos el alto nivel de Fe.

P, K, y Ca no ofrecen grandes diferencias entre órganos.

En la Tabla 4. 14 se indica el contenido de nutrientes en la raíz de las plantas control (media de todos los clones) y de cada uno de estos clones en el tratamiento con 12 gL<sup>-1</sup> de NaCl. La presencia de la sal en el medio no modifica los contenidos de N, P, Ca y micronutrientes de la raíz y hace descender algo los niveles de Mg aunque manteniendo siempre valores adecuados. Los cambios más llamativos corresponden a los fuertes descensos de K e incrementos de Na y Cl provocados por la sal en todos los clones.

Tabla 4.14. Influencia de la salinidad del medio sobre el estado de nutrición de la raíz al finalizar la prueba. (12 gL<sup>-1</sup> de NaCl)

	N %	P %	K %	Ca %	Mg %	Na %	Cl %	Fe ppm	Mn ppm	Cu ppm	Zn ppm
Control (media )	1,35	0,09	1,50	0,57	0,33	0,45	0,51	211	26	42	18
Tratam. (media)	1,34	0,10	0,57	0,55	0,23	1,39	1,39	217	28	43	20
Tratam. (CAÑ)	-	0,08	0,62	0,47	0,26	1,39	1,43	155	25	46	24
Tratam. (CJ)	1,62	0,12	0,51	0,64	0,24	1,46	1,41	202	27	32	30
Tratam. (CJ-SV)	1,36	0,12	0,69	0,70	0,35	1,60	1,35	236	27	53	26
Tratam. (JAB)	1,31	0,09	0,47	0,48	0,26	1,12	1,10	209	40	51	21
Tratam. (JAB-SV)	0,97	0,09	0,37	0,52	0,24	1,30	1,25	228	25	48	17
Tratam. (PIC)	1,56	0,14	0,81	0,55	0,20	1,46	1,60	283	27	38	16
Tratam. (PIC-SV)	1,22	0,11	0,71	0,61	0,18	1,53	1,63	240	24	43	18
Tratam. (RC)	-	0,09	0,39	0,44	0,12	1,25	-	187	29	35	12

Tabla 4.15. Influencia de la salinidad del medio sobre el estado del tallo+brote al finalizar la prueba. (12 gL<sup>-1</sup> de NaCl)

	N %	P %	K %	Ca %	Mg %	Na %	Cl %	Fe ppm	Mn ppm	Cu ppm	Zn ppm
Control (media )	1,10	0,09	1,25	0,69	0,15	0,47	0,43	25	9	5	5
Tratam. (media)	0,94	0,09	1,03	0,71	0,17	1,54	1,66	44	10	13	9
Tratam. (CAÑ)	-	0,08	1,33	0,76	0,16	1,78	1,75	59	13	15	12
Tratam. (CJ)	0,87	0,07	1,15	0,75	0,20	1,83	-	36	9	11	10
Tratam. (CJ-SV)	0,93	0,09	0,69	0,76	0,18	1,97	-	40	12	9	15
Tratam. (JAB)	0,87	0,08	1,05	0,79	0,20	1,11	1,14	29	10	8	9
Tratam. (JAB-SV)	0,93	0,08	0,78	0,68	0,15	1,13	1,15	43	8	9	7
Tratam. (PIC)	-	0,12	1,11	0,71	0,20	2,13	-	35	10	15	7
Tratam. (PIC-SV)	1,12	0,11	1,05	0,63	0,19	1,33	1,31	45	10	16	7
Tratam. RC	-	0,08	1,10	0,65	0,11	1,00	-	66	9	25	9

En el caso del tallo-brote (Tabla 4.15) y la hoja (Tabla 4.16) dentro de sus niveles característicos respectivos se repitió lo indicado para la raíz, destacando de nuevo los acúmulos de Na y Cl, salvo que en estos casos no se producen pérdidas de Mg ni de K.

Tabla 4.16. Influencia de la salinidad del medio sobre el estado de la hoja al finalizar la prueba. (12 gL<sup>-1</sup> de NaCl)

	N %	P %	K %	Ca %	Mg %	Na %	Cl %	Fe ppm	Mn ppm	Cu ppm	Zn ppm
Control (media )	1,81	0,09	1,28	0,70	0,15	0,21	0,21	67	20	8	9
Tratam. (media)	1,79	0,09	1,09	0,58	0,15	1,50	1,39	58	17	8	9
Tratam. (CAÑ.)	2,09	0,09	1,20	0,52	0,13	1,40	-	61	21	7	9
Tratam. (CJ)	1,58	0,08	0,87	0,61	0,13	1,00	1,27	56	13	8	8
Tratam. (CJ-SV)	2,25	0,09	1,40	0,59	0,11	1,44	1,40	63	16	7	9
Tratam. (JAB)	1,66	0,08	1,10	0,45	0,15	1,61	-	64	17	10	10
Tratam. (JAB-SV)	1,43	0,07	1,12	0,56	0,13	1,64	-	73	15	8	10
Tratam. (PIC)	1,70	0,10	0,97	0,67	0,19	1,71	1,50	63	21	9	9
Tratam. (PIC-SV)	1,84	0,09	0,93	0,65	0,19	2,00	-	51	18	9	11
Tratam. RC	-	0,08	1,16	0,62	0,18	1,17	-	31	17	9	10

En la raíz de las plantas muertas en presencia de 12 gL<sup>-1</sup> de NaCl (Tabla 4. 17) se vuelve a observar un descenso claro de K y un aumento de Na, ambos del mismo orden de los indicados para las plantas vivas. Dada la correspondencia entre los valores de Na y de Cl que se han venido observando en todas las pruebas, sólo se realiza el análisis de Cl en las plantas control y en el clon CJ que siguen demostrando dicha correspondencia.

En el caso del tallo y la hoja de las plantas muertas (Tablas 4.18 y 4.19) se repiten las mismas situaciones indicadas para las plantas vivas pero en este caso los aumentos de Na y, por correspondencia, de Cl son muy superiores. Parece en consecuencia, que mientras que la planta está viva existe un mecanismo, posiblemente en la raíz, que evita que los acúmulos de Na y Cl en la parte aérea de la planta sean excesivos. Por el contrario, en las plantas muertas probablemente el exceso de sal y de tiempo en contacto con dicha sustancia, sobrepasan la acción del mecanismo de defensa y los contenidos de Na y Cl suben de forma espectacular (Bartolini et al., 1991; Chartzoulakis et al., 2002). En cualquier caso lo que si parece claro es que esas fuertes acumulaciones de Na y Cl en el tallo y hojas contribuyen a la muerte de la planta.

Tabla 4.17. Influencia de la salinidad del medio sobre el estado de nutrición de la raíz de las plantas muertas al finalizar la prueba. (12 gL<sup>-1</sup> de NaCl).

	N %	P %	K %	Ca %	Mg %	Na %	Cl %	Fe ppm	Mn ppm	Cu ppm	Zn ppm
Control (media )	1,35	0,09	1,50	0,57	0,33	0,45	0,50	211	26	42	18
Tratam. (media)	1,34	0,14	0,53	0,58	0,31	1,53	-	194	38	53	27
Tratam. (CAÑ.)	-	0,13	0,57	0,53	0,35	1,01	-	134	23	72	27
Tratam. (CJ)	1,44	0,18	0,42	0,58	0,30	1,74	1,75	212	26	42	27
Tratam. (CJ-SV)	-	0,17	0,72	0,81	0,38	1,64	-	-	13	11	9
Tratam. (JAB)	1,23	0,11	0,82	0,67	0,29	1,93	-	253	69	63	30
Tratam. (JAB-SV)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tratam. (PIC)	-	0,11	0,24	0,39	0,33	1,45	-	147	35	39	16
Tratam. (PIC-SV)	-	0,14	0,46	0,53	0,19	1,41	-	222	23	40	24
Tratam. RC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 4.18. Influencia de la salinidad del medio sobre el estado de nutrición del tallo-brote de las plantas muertas al finalizar la prueba. (12 gL<sup>-1</sup> de NaCl).

	N %	P %	K %	Ca %	Mg %	Na %	Cl %	Fe ppm	Mn ppm	Cu ppm	Zn ppm
Control (media )	1,10	0,09	1,25	0,69	0,15	0,47	0,43	25	9	5	5
Tratam. (media)	-	0,10	1,04	0,76	0,20	3,29	-	54	0,11	21	14
Tratam. (CAÑ.)	-	0,13	1,27	0,89	0,26	3,66	-	47	11	25	20
Tratam. (CJ)	-	0,12	0,76	0,59	0,14	3,07	-	45	8	17	16
Tratam. (CJ-SV)	-	0,08	1,01	0,83	0,27	3,91	-	64	16	20	15
Tratam. (JAB.)	-	0,09	1,33	0,83	0,29	3,41	3,29	43	13	15	11
Tratam. (JAB-SV)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tratam. (PIC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tratam. (PIC-SV)	-	0,11	0,86	0,71	0,16	3,48	-	55	11	19	11
Tratam. RC	-	0,09	1,0	0,71	0,08	2,20	-	75	8	32	9

Tabla 4.19. Influencia de la salinidad del medio sobre el estado de nutrición de la hoja de las plantas muertas al finalizar la prueba. (12 gL<sup>-1</sup> de NaCl).

	N %	P %	K %	Ca %	Mg %	Na %	Cl %	Fe ppm	Mn ppm	Cu ppm	Zn ppm
Control (media )	1,81	0,09	1,28	0,70	0,15	0,21	0,21	67	20	8	9
Tratam. (media)	-	0,08	1,11	0,73	0,17	2,27	-	46	16	10	8
Tratam. (CAÑ.)	-	0,06	0,98	0,58	0,13	2,1	-	53	18	9	9
Tratam. (CJ)	-	0,09	0,99	0,60	0,14	3,06	3,13	64	13	11	8
Tratam. (CJ-SV)	-	0,08	1,25	0,62	0,15	2,56	-	47	19	8	8
Tratam. (JAB.)	-	0,07	1,10	0,61	0,12	2,20	-	39	17	11	8
Tratam. (JAB-SV)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tratam. (PIC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tratam. (PIC-SV)	-	0,08	1,23	0,64	0,29	3,30	-	-	-	-	-
Tratam. RC	-	0,08	1,10	0,66	0,19	1,50	-	27	15	10	8

Al objeto de ver con mayor claridad las diferencias en el estado de nutrición entre las plantas vivas y muertas provocadas por la presencia de sal en el medio, en las Tablas 4.20 y 4.21 se compara el nivel de nutrientes de cada una de ellas y las plantas del control, como medias, en cada caso, de todos los clones ensayados, para respectivamente las concentraciones de 8 y 12 gL<sup>-1</sup> de NaCl. En el tratamiento con 8 gL<sup>-1</sup> de NaCl se observan aumentos importantes de Na y de Cl y descensos de K en la raíz tanto de las plantas vivas como muertas, sin grandes diferencias entre estas últimas. Aumentos de Na y Cl de la misma entidad que en la raíz se producen en el tallo de las plantas vivas en relación con el control, mientras que los incrementos de esos elementos en el tallo de las plantas muertas son muy elevados y muy superiores a los de las plantas vivas (Tabla 4.20). El aumento de estos iones en la parte aérea se define en trabajos anteriores (Reimann, 1992; Tattini et al., 1994; Chartzoulakis et al., 2002) como el límite de retención de la raíz de los iones cloro y sodio, e indica un estado de saturación de la raíz para ambos iones. Al contrario que en la raíz, prácticamente no se produjeron descensos de K en el tallo de las plantas tratadas. En la hoja se produce una situación parecida a la del tallo, incluso con un aumento menor de Na y Cl en las plantas vivas frente al control, pero muy elevado en las plantas muertas. En este caso tampoco se producen pérdidas de K.

Tabla 4.20 Comparación del estado de nutrición entre las plantas control, tratadas vivas y tratadas muertas en 8 gL<sup>-1</sup> de NaCl. (Media de todos los clones).

	N %	P %	K %	Ca %	Mg %	Na %	Cl %	Fe ppm	Mn ppm	Cu ppm	Zn ppm
Raíz Control	1,34	0,09	1,5	0,58	0,35	0,50	0,50	234	28	37	17
Raíz Tratam. Vivas	1,34	0,11	0,7	0,57	0,28	1,46	1,24	230	24	34	20
Raíz Tratam. Muertas	1,44	0,15	0,86	0,64	0,31	1,5	1,36	243	43	48	27
Tallo+brotos											
Tallo Control	1,1	0,09	1,26	0,70	0,15	0,46	0,46	24	8	5	5
Tallo Tratam. Vivas	1,14	0,1	1,18	1,71	0,17	1,47	1,68	38	10	9	9
Tallo Tratam. Muertas	1,1	0,11	1,3	0,8	0,28	3,65	4,75	49	12	12	10
Hoja											
Hoja Control	1,81	0,08	1,28	0,69	0,15	0,21	0,6	67	20	8	8
Hoja Tratam. Vivas	1,79	0,09	1,11	0,56	0,15	0,69	0,63	67	17	7	10
Hoja Tratam. Muertas	-	0,09	1,01	0,57	0,17	3,03	0,63	72	72	8	6

Tabla 4.21. Comparación del estado de nutrición entre las plantas control, tratadas vivas y tratadas muertas. 12 gL<sup>-1</sup>. (Media de todos los clones).

	N %	P %	K %	Ca %	Mg %	Na %	Cl %	Fe ppm	Mn ppm	Cu ppm	Zn ppm
Raíz Control	1,35	0,09	1,50	0,57	0,33	0,45	0,50	211	26	42	18
Raíz Tratam. Vivas	1,34	0,10	0,57	0,55	0,23	1,39	1,39	217	28	43	20
Raíz Tratam. Muertas	1,34	0,14	0,53	0,58	0,31	1,53	-	194	38	53	27
Tallo+brotos											
Tallo Control	1,10	0,09	1,25	0,69	0,15	0,47	0,43	25	9	5	5
Tallo Tratam. Vivas	0,94	0,09	1,03	0,71	0,17	1,54	1,66	44	10	13	9
Tallo Tratam. Muertas	-	0,10	1,04	0,76	0,20	3,29	-	54	11	21	14
Hoja											
Hoja Control	1,81	0,09	1,28	0,70	0,15	0,21	0,21	67	20	8	9
Hoja Tratam. Vivas	1,79	0,09	1,09	0,58	0,15	1,50	1,39	58	17	8	9
Hoja Tratam. Muertas	-	0,06	0,98	0,58	0,13	2,10	-	53	18	9	9

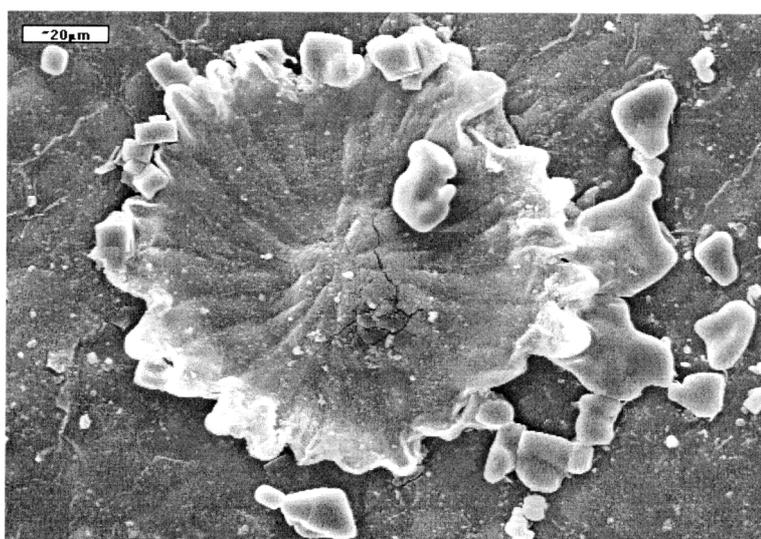
Una situación muy similar a la indicada para el tratamiento con 8 gL<sup>-1</sup> de NaCl se produce en el de 12 gL<sup>-1</sup> de sal (Tabla 4.21). Es decir, existe una bajada importante de K en la raíz de las plantas tratadas, sin diferencia entre vivas o muertas, mostrando el antagonismo existente Na-K (Reimann, 1992; Tattini et al., 1994; Chartzoulakis et al., 2002). Este descenso de K, aunque se produce, es menos patente en tallo y hoja. Se observan también aumentos de Na y Cl iguales a los indicados antes y sin diferencias entre plantas vivas y muertas en la raíz de las plantas tratadas. Esta acumulación de iones Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> en raíz, coincide con estudios anteriores (Bartolini et al., 1991; Chartzoulakis et al., 2002) en condiciones similares donde se indica el papel de acumulación de este órgano para estos iones. Como en la raíz, en el tallo y hoja de las plantas muertas se producen acúmulos muy altos de Na. En estos casos no se analizó el

cloro debido a las correlaciones que hasta ahora se han venido observando entre estos elementos, también avaladas por datos de la bibliografía (Tattini et al., 1992; Cresti et al., 1994; Troncoso et al., 1999).

Se observa una respuesta fenotípica o de comportamiento de las plantas a la presencia de sal diferente según los clones. En algunos casos (CJ-SV, CAÑ) se produce una caída de hojas reemplazadas rápidamente por nuevos brotes. En otros (PIC-SV, JAB-SV y RC) no se observó esta pérdida de hojas ni estrés fenotípico aparente. En las plantas de los clones JAB 8, PIC 8 y CJ 8, se observa una acumulación de cristales en las hojas (Figura IV.1), en especial alrededor de las escamas peltadas (Figura IV.2).

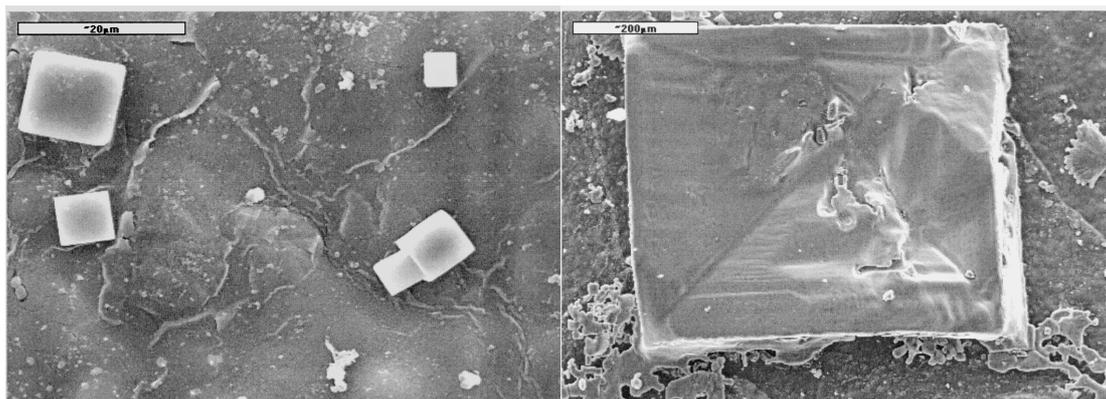


*Figura IV.1 Excreciones en el haz de hojas de plantas de olivo sometidas a tratamientos salinos.*

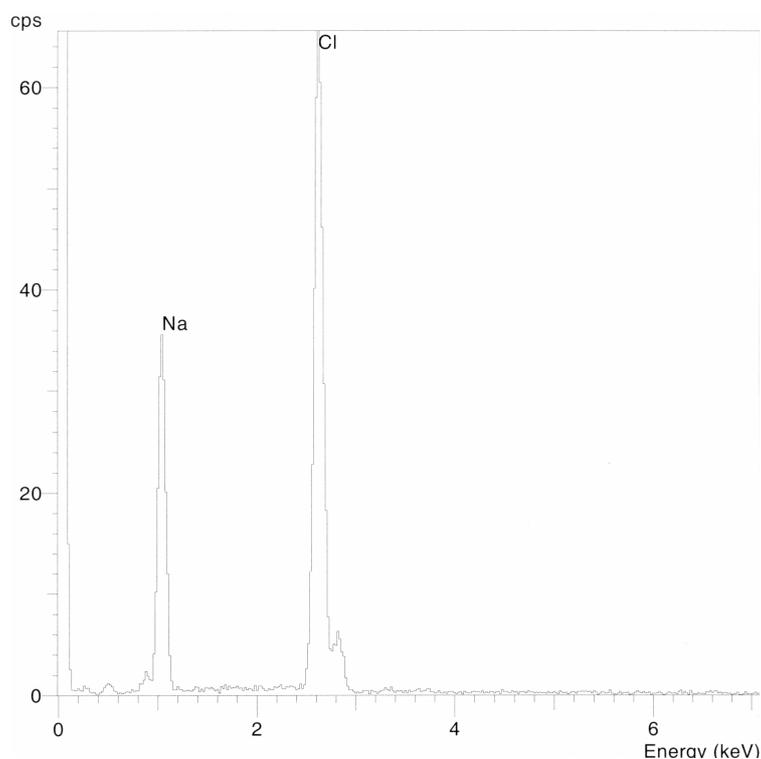


*Figura IV.2 Localización de cristales de NaCl en las inmediaciones de una escama peltada.*

El análisis de estos cristales, se realizaron en el Instituto de Ciencias de Materiales de Sevilla (CSIC) mediante microscopía electrónica (Figuras IV.2, IV.3, IV.4) y análisis químico por Energías Dispersivas de Rayos X, realizado en el Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM-5400 con un analizador de la marca OXFORD9. Los resultados se presentan en forma de diagrama donde se comprueba que son cristales de NaCl (Figura IV.5).



*Figuras IV.3 y IV.4. Imagen al microscopio electrónico de cristales de NaCl.*



*Figura IV.5. Diagrama de Energías Dispersivas de Rayos X.*

La formación de estos cristales de NaCl en las hojas puede explicarse por otro mecanismo defensivo de la planta para reducir las concentraciones de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en el interior de la misma. Este tipo de defensa frente a la salinidad ya ha sido puesto de manifiesto anteriormente (Marschner, 1986), y se explica por la existencia de células especializadas que excretan grandes cantidades de sales a la superficie de la hoja, las cuales pueden ser lavadas por la lluvia o el rocío. Este mecanismo se ha descrito particularmente en plantas halófitas, que poseen la capacidad de regular los contenidos iónicos de la parte aérea, ya que separan específicamente los iones no deseados sin afectar la absorción de nutrientes. Ejemplos de este mecanismo son Suaeda o Atriplex, típicas halófitas (Smith y McComb, 1981) o *Diplachne festuca* una forrajera de potencial interés agronómico en suelos salinos y alcalinos (Sandhu et al., 1981). En algunas especies moderadamente tolerantes como el tomate, la deposición de sales en los pelos foliares especializados es un mecanismo de exclusión para evitar la acumulación en las células fotosintéticamente activas y proporciona un medio para eliminar las sales (Cano, 1991).

De los resultados de este experimento se pueden extraer algunas consecuencias de interés. La primera, es la correspondencia de comportamiento entre la sal de las plantas *in vitro* y en condiciones externas. Este hecho es de gran importancia para poder utilizar la técnica de cultivo *in vitro* como método para calibrar y obtener clones de olivo tolerantes a la sal (NaCl) del medio.

Otras consideraciones derivan de los posibles mecanismos de defensa ante la sal que utiliza la planta de olivo. La coincidencia de comportamiento *in vitro-ex vitro*, indica la existencia de mecanismos comunes, endógenos de tipo bioquímico-molecular que no se consideran en este capítulo. Además, la planta en condiciones externas muestra otros mecanismos de defensa que aunque se han indicado antes interesa destacar aquí. La diferencia de contenido de Na y Cl en la hoja, que no se refleja en tallo y raíz, entre las plantas sometidas a  $8 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl (Tabla 4.20) y a  $12 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl (Tabla 4.21) parece confirmar lo indicado por algunos autores (Bartolini et al., 1991; Tattini et al., 1994 y Chartzoulakis et al., 2002) de que la raíz y tallo, hasta una determinada concentración salina, almacenan los excesos de Na y Cl evitando que pasen a la hoja. Otras plantas utilizan el desprendimiento de hojas cargadas de sal, que son reemplazadas por otras jóvenes. De este modo eliminan cantidades importantes de Na y Cl. Este comportamiento lo hemos observado en algunos olivos que viven en áreas salinas. Ahora bien, lo más llamativo por no haberse indicado antes para el olivo, es la

posible excreción de cristales de NaCl. Este es un hecho que necesita ulteriores comprobaciones pero que como se indica no se había visto antes en el olivo.

#### IV.3.2 SEGUNDA PRUEBA

Como se indicó en el capítulo de Materiales y Métodos se seleccionan las líneas clónicas de plantas: L-0-4 A, L-0-4 B, G-8-12, RC-8-12 (Figura IV.6).



*Figura IV.6. Disposición general de la prueba.*

En cuanto al comportamiento de estos clones en condiciones externas, se puede destacar que en todos los casos la supervivencia de las plantas control, que no recibieron NaCl, es del 100%. Es decir, no se produce muerte alguna de plantas en ninguno de los clones a lo largo de los 175 días de experimentación.

Las plantas del clon L-0-4A sometidas a tratamientos salinos (Tabla 4.22) tienen la primera baja con la aplicación de  $10 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl después de 91 días de cultivo, lo que aún no establece una diferencia estadísticamente significativa con los resultados anteriores. Con la adición de NaCl a la concentración de  $12 \text{ gL}^{-1}$ , mueren 4 plantas más (5 en total, 33%) lo que establece una diferencia significativa con el control, pero aun no con el tratamiento anterior. En la concentración salina siguiente ( $14 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl) mueren otras 2 plantas lo que hace un total de 7 (47%) lo que provocó diferencias significativas con los tratamientos anteriores excepto el inmediato anterior. Al final, tratamiento con  $16 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl y 175 días de experimentación, solo quedó una planta viva, es decir murieron otras 7 en relación al tratamiento anterior y 14 en total, lo que

establece diferencias significativas con todos los tratamientos previos (Tabla 4.22). La muerte de estas plantas se produce por sequía de todos sus órganos, raíz, tallo-brotes y hojas, sin que se produzca actividad alguna. La gran mayoría de las hojas secas, no se desprenden sino que permanecen adheridas al ramo (Figura IV.7).



*Figura IV.7. Planta del clon L-0-4A, mostrando las hojas muertas adheridas al tallo.*

En la línea clónica L-0-4B la primera pérdida se produce con la aplicación de  $12 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl a unos 120 días de experimentación, lo que no llega a producir una diferencia significativa con los tratamientos anteriores. En la concentración de sal siguiente ( $14 \text{ gL}^{-1}$  NaCl) mueren otras 2 plantas, lo que hace un total de 3 que origina una diferencia significativa con los tratamientos previos excepto con el inmediato anterior. Por último, con las adiciones de  $16 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl mueren otras 6 plantas, lo que supone un total de 9 pérdidas, que determinan diferencias significativas con todos los tratamientos, excepto con el inmediato anterior.

En el clon G-8-12, las dos primeras bajas se producen en la aplicación de  $12 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl aunque sin producir diferencias significativas con los tratamientos anteriores. En la aplicación de  $14 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl mueren otras 4 plantas (en total 6) lo que ya origina

diferencias significativas, con los tratamientos previos excepto con el inmediato anterior. Por último, con la adición de 16 gL<sup>-1</sup> de NaCl se pierden otras 5 plantas lo que hace un total de 11 bajas o 4 supervivientes lo que establece diferencias significativas con todos los casos anteriores, excepto con el inmediatamente anterior.

En las plantas del clon RC-8-12, la primera baja se produce con la adición de 14 gL<sup>-1</sup> de NaCl aunque esto no significa la existencia de diferencias significativas con los tratamientos anteriores (Tabla 4.22). Estas diferencias sólo se producen al aplicar el tratamiento salino con la concentración más alta (16 gL<sup>-1</sup> de NaCl). En este caso mueren 4 plantas, lo que sumadas a la baja anterior alcanzan un total de 5 plantas muertas en este clon, o un 67% de supervivientes, con diferencia significativa con los tratamientos anteriores, excepto el inmediato anterior.

Tabla 4.22. Tanto por ciento de supervivencia de las plantas a lo largo del experimento.

Clon	Días de tratamiento y gL <sup>-1</sup> NaCl añadidos								
	Días 0	+7 (7)	+14 (21)	+14 (35)	+28 (63)	+28 (91)	+28 (119)	+28 (147)	+28 (175)
	gL <sup>-1</sup> 0	2	4	6	8	10	12	14	16
L-0-4 A	100 <sup>cD</sup>	100 <sup>cD</sup>	100 <sup>cD</sup>	100 <sup>cD</sup>	100 <sup>cD</sup>	93 <sup>cDC</sup>	67 <sup>aCB</sup>	53 <sup>aB</sup>	7 <sup>aA</sup>
L-0-4B	100 <sup>cC</sup>	100 <sup>cC</sup>	100 <sup>cC</sup>	100 <sup>cC</sup>	100 <sup>cC</sup>	100 <sup>cC</sup>	93 <sup>abCB</sup>	73 <sup>abAB</sup>	40 <sup>bcA</sup>
G-8-12	100 <sup>cC</sup>	100 <sup>cC</sup>	100 <sup>cC</sup>	100 <sup>cC</sup>	100 <sup>cC</sup>	100 <sup>cC</sup>	87 <sup>abCB</sup>	67 <sup>abB</sup>	27 <sup>abA</sup>
RC-8-12	100 <sup>cB</sup>	100 <sup>cB</sup>	100 <sup>cB</sup>	100 <sup>cB</sup>	100 <sup>cB</sup>	100 <sup>cB</sup>	100 <sup>bB</sup>	93 <sup>bAB</sup>	67 <sup>cA</sup>

Letras minúsculas diferentes leídas en columna, significan diferencias estadísticamente significativas entre clones. Letras mayúsculas leídas en fila significan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

Al igual que en el capítulo anterior, el crecimiento de las plantas supervivientes se toma como segundo parámetro para definir la tolerancia a la salinidad. En la Figura IV.8 se indica el desarrollo obtenido al final del experimento en las plantas tratadas de los cuatro clones en comparación con los controles, y en la IV.9 se presenta el crecimiento durante el experimento del grupo de plantas perteneciente al clon L-0-4A, donde se comparan las plantas tratadas con los controles. El crecimiento total de las plantas testigo del clon L-0-4A es de 16,5 cm. en 175 días, lo que comparado con el desarrollo obtenido en otros trabajos (Bartolini, 1991) significa un crecimiento muy pobre, en concordancia con el mal comportamiento de estas plantas *in vitro*. No

obstante, el bajo crecimiento de esta línea de plantas todavía disminuye muy significativamente (-70%) al ser sometidas a riegos con soluciones de NaCl a concentraciones crecientes. Así, al final del experimento solo aumentan su tamaño medio en 5 cm. (Figuras IV.9 y IV.10).

Dado que al final de la prueba sólo llega una planta viva, no se hacen análisis de nutrientes en tejidos.

En el crecimiento de la línea clónica L-0-4B (Figuras IV.8 y IV.11) las plantas control (sin adiciones de NaCl), tienen un aumento de 31,5 cm., prácticamente doble que el clon anterior, en concordancia también con su mejor comportamiento *in vitro*. Las sometidas a tratamientos salinos presentan un crecimiento final de 5 cm., lo que significa una reducción del orden del 80 %, muy significativa, en relación con el testigo.

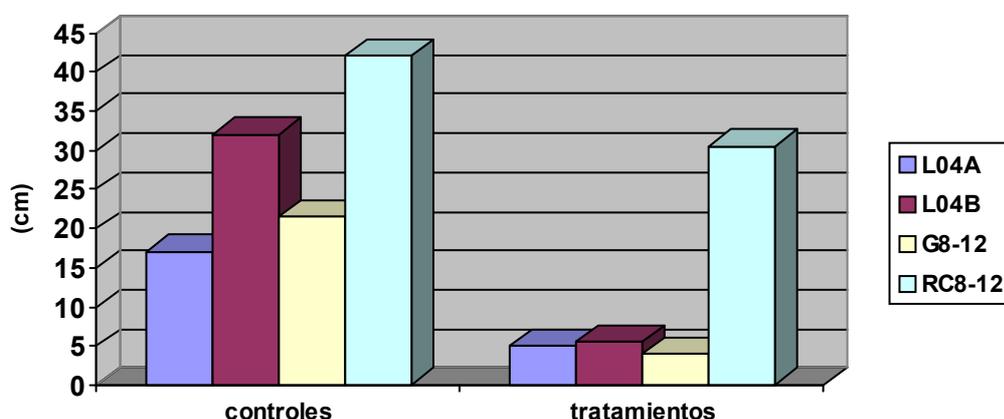


Figura IV.8.- Efecto del tratamiento salino sobre el crecimiento medio (cm.) de cada clon al final del experimento (175 días.)

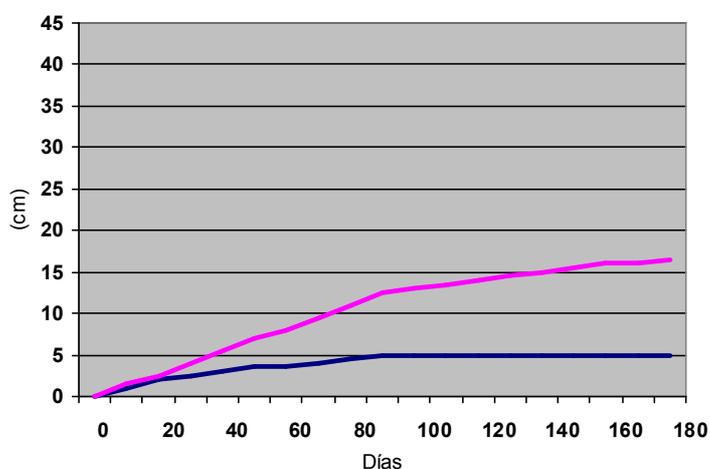


Figura IV.9.- Crecimiento del clon L-0-4A a lo largo del experimento de las plantas control y tratadas con NaCl.



Figura IV.10. Planta del clon L-0-4 A.

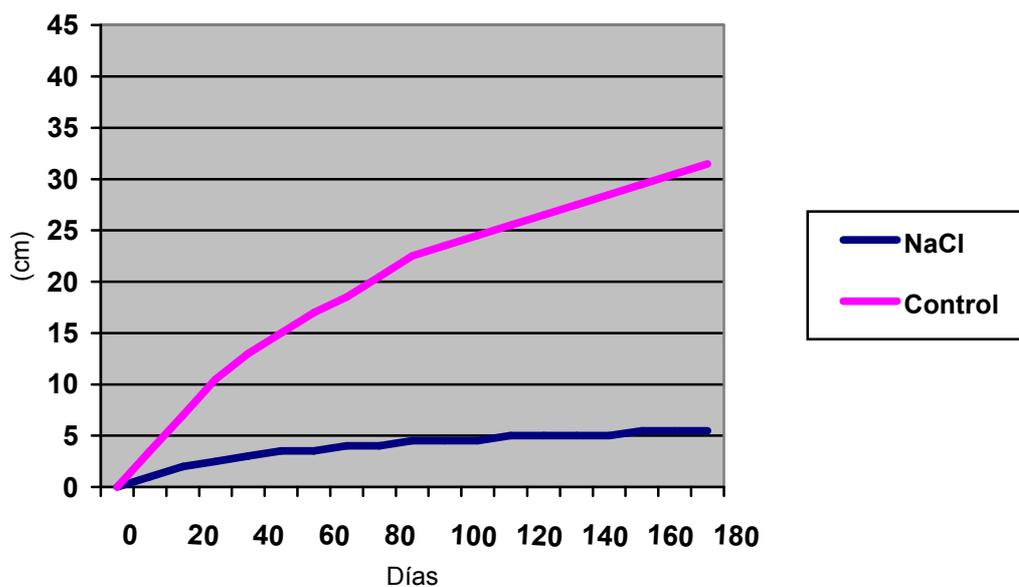


Figura IV.11.- Crecimiento del clon L-0-4B a lo largo del experimento de las plantas control y tratadas con NaCl.

Estas plantas tienen un comportamiento ante el exceso de sal algo diferente al del grupo anterior. Así, al recibir  $8 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl comienzan a desprender un cierto número de hojas, (Figura IV.14) a veces en el mismo ramo o más frecuentemente en otros, formando con posterioridad hojas nuevas. Es decir, que las plantas antes de morir

emplean un posible mecanismo de defensa como es la eliminación del material cargado de sal.

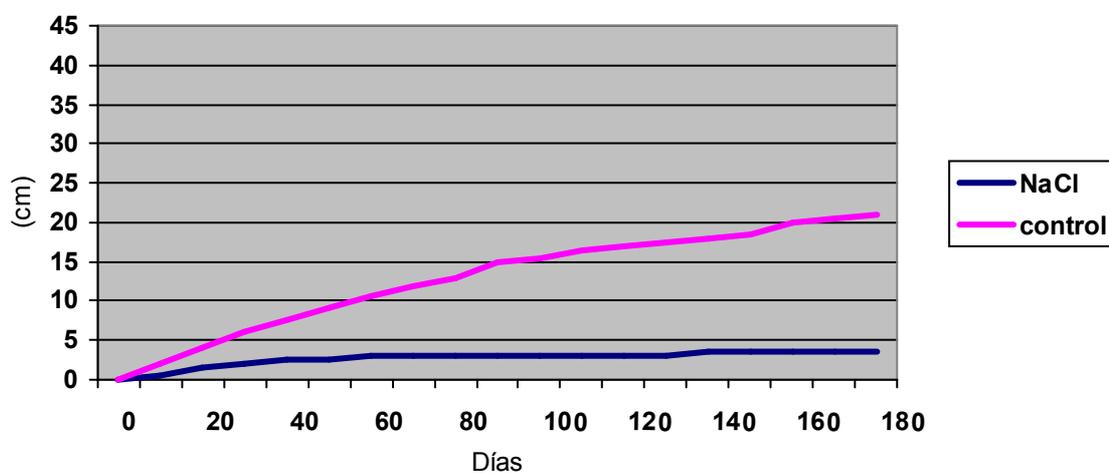


Figura IV.12.- Crecimiento del clon G-8-12 a lo largo del experimento de las plantas control y tratadas con NaCl.

En el crecimiento del clon G-8-12, las plantas control aumentan una media de 21,5 cm. mientras que las tratadas sólo alcanzan 4 cm. lo que marca una diferencia muy significativa entre ambas (Figuras IV.8 y IV.12). Estas plantas tienen un comportamiento ante el exceso de sal parecido al indicado para L-0-4A. Es decir mueren sin haber eliminado hojas, de forma que cuando las hojas comienzan a caer no se producen nuevos brotes. (Figura IV.15).

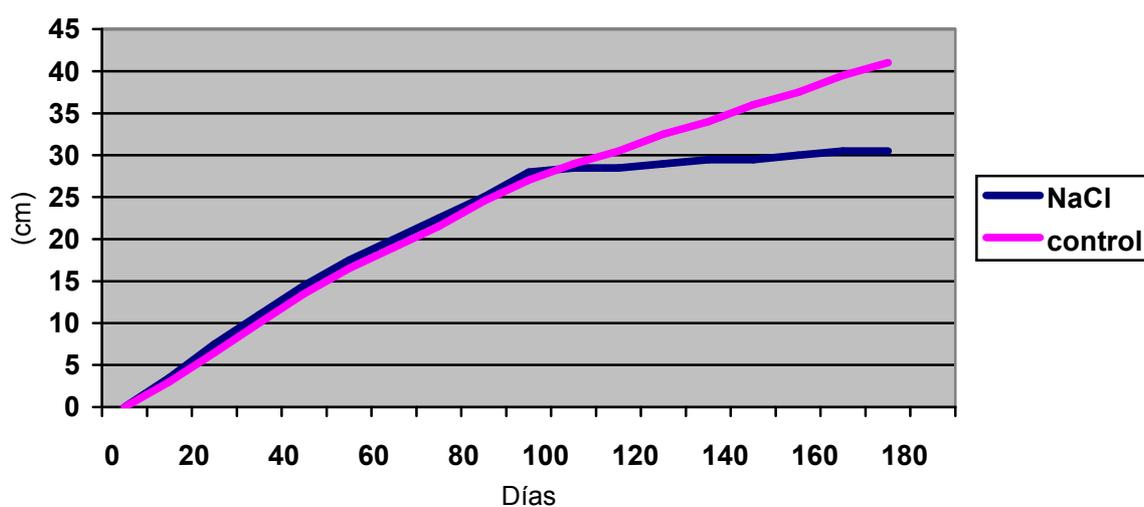
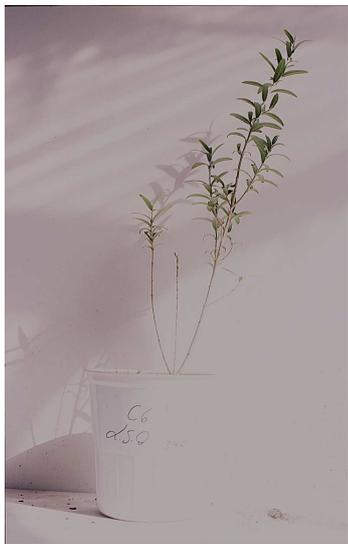


Figura IV.13.- Crecimiento del clon RC-8-12 a lo largo del experimento de las plantas control y tratadas con NaCl.



*Figura IV.14. Planta del clon L-0-4 B sometida a tratamiento salino.*



*Figura IV.15. Planta del clon G-8-12 control (derecha) y con sal (izquierda).*

En el clon RC-8-12 el crecimiento de las plantas control es muy elevado (42 cm.) demostrando su buena calidad (Figuras IV.8 y IV.13). Del mismo modo, las plantas tratadas con sal también muestran un crecimiento elevado (31 cm.) aunque diferente al anterior. No obstante, ambos tipos de plantas (tratadas y no tratadas), mantienen crecimientos iguales hasta la aplicación de  $12 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl, (Figura IV.8) lo que indica la elevada tolerancia de este material vegetal en coincidencia con lo observado en campo y en condiciones de cultivo *in vitro*.

La alta tolerancia a la sal del clon RC-8-12 se considera asociada por una parte a mecanismos internos de defensa empleados también *in vitro*, y además al uso de otro mecanismo externo, ya indicado para el clon L-0-4B, como es desprenderse de las hojas cuando éstas alcanzan niveles elevados de Na (Figura IV.16). En este caso, la recuperación mediante nuevos brotes de la planta es muy superior a la indicada para L-0-4B. Este mecanismo de defensa, descrito con anterioridad en plantas de olivo por Munns (1993) y Loreto et al. (2003), coincide con el que presenta la planta de procedencia de las Marismas del Odiel, donde sufre altos niveles de salinidad especialmente en verano. Por observaciones directas en campo se comprueba que en esas fechas la planta se desprende de un gran número de hojas cargadas de Na, y forma

otras nuevas a continuación, que rápidamente la cubren. Este proceso no impide, normalmente, la posterior fructificación de la planta.



*Figura IV.16. Planta del clon RC-8-12.*

Los niveles de nutrientes en hoja (Tabla 4.23 y Figura IV.17) pueden ayudar a comprender lo indicado antes. Las plantas de todos los clones, tratadas con sal se caracterizan frente a las control por presentar una fuerte acumulación de Na y descensos en los otros cationes considerados. Ahora bien, si se considera la distinción en las plantas tratadas entre hojas vivas, muchas de ellas neoformadas y hojas desprendidas (muertas) las diferencias indicadas entre control y salinizadas se hacen mucho más manifiestas en las hojas caídas. Es decir, las hojas vivas tiene unos niveles de nutrientes más próximos al control, con menor acúmulo de sodio y pérdidas más bajas de K, Ca, Mg, y Fe, en coincidencia con trabajos anteriores (Loreto et al., 2003).

Los contenidos de nutrientes de las raíces y el tallo (Tabla 4.24 y Figuras IV.18 y IV.19) en los que se comparan plantas control y tratadas y dentro de estas vivas y

muertas, confirman los datos anteriores de acúmulos de Na y pérdidas de otros cationes en las plantas tratadas en especial en las muertas.

En la línea clónica G-8-12, los contenidos de nutrientes de las hojas vivas (Tabla 4.25 y Figura IV.17) de las plantas control y tratadas de este clon, también muestran las mismas características indicadas antes, es decir fuerte acumulación de Na y pérdidas en los otros cationes considerados. En este clon no se observa la caída continua de hojas viejas y rebrote de hojas nuevas durante el experimento como ocurría en los clones L-0-4B y RC-8-12. Estas plantas tienen un comportamiento tolerante a la sal sin utilizar este sistema defensivo, manteniendo las hojas hasta el final de la prueba las que sobreviven y desprendiendo hojas hasta morir las que no sobreviven, pero en ningún caso emitiendo brotes nuevos. Este comportamiento se observa con anterioridad en clones tolerantes a la salinidad de la variedad Frantoio (Tatini et al., 1995), y en trabajos posteriores (Loreto et al., 2003). En las hojas muertas, que como se ha dicho en general se mantienen sobre la planta también muerta, de nuevo se observa un gran acúmulo de sodio, pérdidas de K y de Fe, aunque en este caso Ca y Mg presentan valores elevados. Con los contenidos de nutrientes en raíz y tallo (Tabla 4.26 y Figuras IV.18 y IV.19) ocurre lo mismo y salvo alguna excepción puntual, siempre se produce una fuerte acumulación de Na y pérdida de los otros cationes en las plantas sometidas a tratamientos con NaCl, en especial las ya muertas.

Como en los clones anteriormente estudiados, en el clon RC-8-12 la presencia de sal en el medio provoca acúmulos de Na y descenso de otros cationes en los tejidos de la planta (Tablas 4.27 y 4.28 y Figuras IV.17, IV.18 y IV.19).

Tabla 4.23. Contenido de nutrientes, en hojas de plantas vivas control y tratadas con NaCl del clon L-0-4B al final del experimento.

HOJAS		% Materia Seca					ppm
		P	K	Ca	Mg	Na	Fe
Plantas control		0,08	1,83	0,70	0,14	0,04	49
Plantas tratadas	<b>Hojas vivas</b>	0,09	1,76	0,43	0,06	0,66	24
	<b>Hojas muertas</b>	0,08	1,25	0,34	0,07	1,01	19

Tabla 4.24. Contenido de nutrientes, en raíz y tallo de plantas control y tratadas con NaCl (vivas y muertas) del clon L-0-4B al final del experimento.

RAÍZ		% Materia Seca					ppm
		P	K	Ca	Mg	Na	Fe
Plantas control		0,08	1,27	0,83	0,26	0,43	237
Plantas tratadas	<b>Raíces vivas</b>	0,09	0,27	0,36	0,15	1,65	136
	<b>Raíces muertas</b>	0,07	0,15	0,33	0,12	1,84	108
TALLO Y BROTES							
Plantas control		0,06	1,54	1,03	0,17	0,17	49
Plantas tratadas	<b>Hojas vivas</b>	0,15	1,69	0,58	0,14	1,16	20
	<b>Hojas muertas</b>	0,16	1,12	0,40	0,09	1,78	17

Tabla 4.25. Contenido de nutrientes, en hojas de plantas vivas control y tratadas con NaCl del clon G-8-12 al final del experimento.

HOJAS		% Materia Seca					ppm
		P	K	Ca	Mg	Na	Fe
Plantas control		0,07	1,27	0,64	0,12	0,07	53
Plantas tratadas	<b>Hojas vivas</b>	0,07	1,10	0,46	0,08	1,69	27
	<b>Hojas muertas</b>	0,08	0,74	0,84	0,13	2,24	22

Tabla 4.26. Contenido de nutrientes, en raíz y tallo de plantas control y tratadas con NaCl (vivas y muertas) del clon G-8-12 al final del experimento.

RAÍZ		% Materia Seca					ppm
		P	K	Ca	Mg	Na	Fe
Plantas control		0,08	1,12	0,56	0,32	0,50	245
Plantas tratadas	<b>Raíces vivas</b>	0,10	0,27	0,42	0,22	1,58	143
	<b>Raíces muertas</b>	0,09	0,18	0,43	0,26	1,78	136
TALLO Y BROTES							
Plantas control		0,07	1,55	0,85	0,15	0,12	50
Plantas tratadas	<b>Hojas vivas</b>	0,08	0,47	0,42	0,07	1,62	13
	<b>Hojas muertas</b>	0,08	1,05	0,35	0,09	1,82	13

Tabla 4.27. Contenido de nutrientes, en hojas de plantas vivas control y tratadas con NaCl del clon RC-8-12 al final del experimento.

HOJAS		% Materia Seca					ppm
		P	K	Ca	Mg	Na	Fe
Plantas control		0,07	1,49	0,70	0,13	0,04	54
Plantas tratadas	<b>Hojas vivas</b>	0,06	1,00	0,50	0,10	0,60	20
	<b>Hojas muertas</b>	0,08	0,95	0,90	0,13	1,70	119

Tabla 4.28. Contenido de nutrientes, en raíz y tallo de plantas control y tratadas con NaCl (vivas y muertas) del clon RC-8-12 al final del experimento.

RAÍZ		% Materia Seca					pm
		P	K	Ca	Mg	Na	Fe
Plantas control		0,08	1,25	0,63	0,44	0,56	262
Plantas tratadas	<b>Raíces vivas</b>	0,08	0,30	0,59	0,23	1,37	96
	<b>Raíces muertas</b>	0,07	0,28	0,48	0,18	1,81	82
TALLO Y BROTES							
Plantas control		0,06	1,68	0,92	0,12	0,15	55
Plantas tratadas	<b>Hojas vivas</b>	0,06	0,51	0,40	0,07	0,71	11
	<b>Hojas muertas</b>	0,08	0,66	0,20	0,08	1,82	21

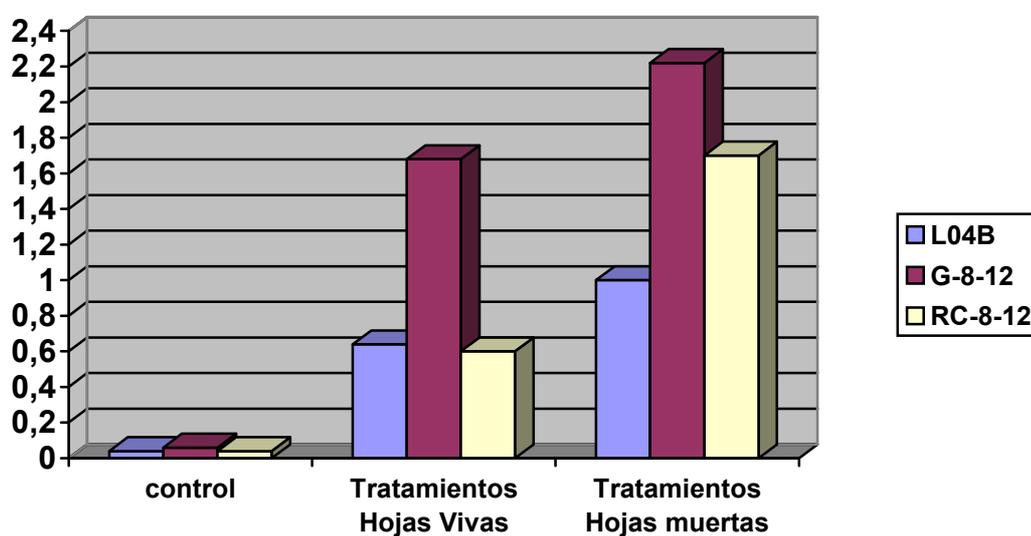


Figura IV.17. - Contenidos medios de Na en hoja (% ms) de las plantas control y tratadas de los distintos clones al final del experimento.

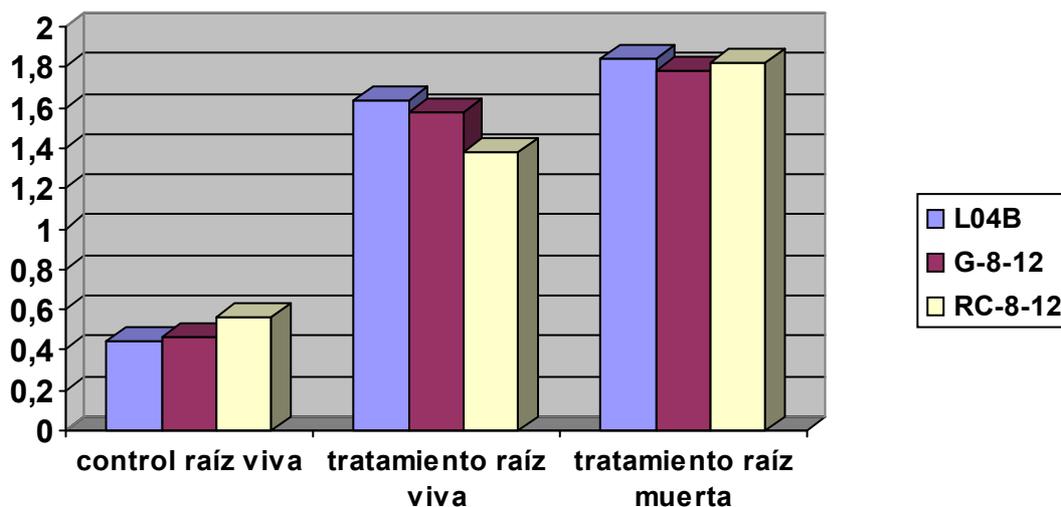


Figura IV.18.- Contenidos medios de Na en raíz (% ms) de las plantas control y tratadas de los distintos clones, al final del experimento.

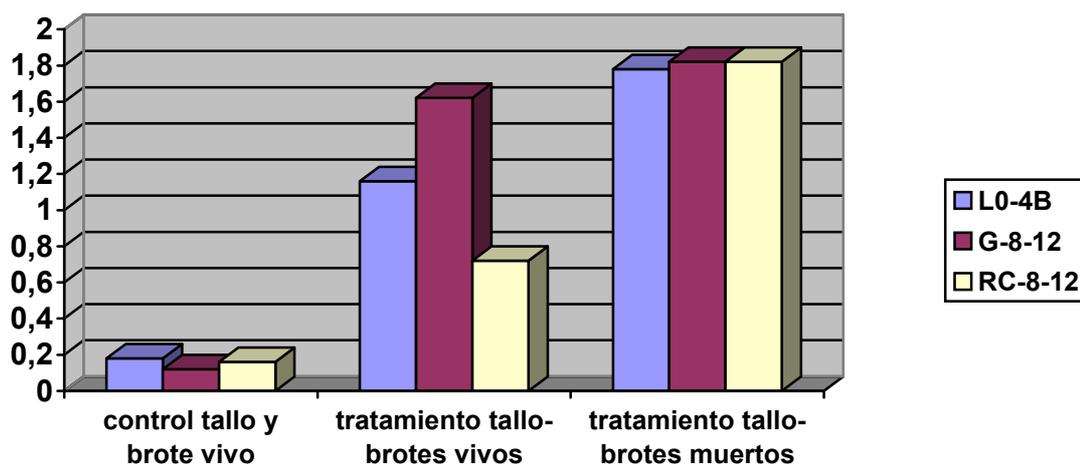


Figura IV.19.- Contenidos medios de Na en tallo y brotes (% ms) de las plantas control y tratadas de los distintos clones al final del experimento.

Considerado el comportamiento ante la sal de cada uno de los clones en estudio en cuanto a supervivencia, crecimiento y composición mineral, interesa ahora comparar dicho comportamiento entre ellos.

En relación con la supervivencia (Tabla 4.22), con la aplicación de  $12 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl el clon L-0-4A presenta un tanto por ciento de plantas vivas inferior y estadísticamente distinto al clon RC-8-12. Los otros dos clones tienen porcentajes

intermedios de plantas vivas, pero no estadísticamente distintos a los anteriores. En el tratamiento siguiente ( $14 \text{ gL}^{-1} \text{ NaCl}$ ) se mantiene esa situación, aunque en todos los casos el número de plantas vivas es menor. Con la adición de NaCl a concentraciones más elevadas ( $16 \text{ gL}^{-1}$ ), el mayor porcentaje de plantas vivas lo tiene el clon RC-8-12 (67%) seguido de L-0-4B (40%) aunque no se obtiene diferencia estadística entre estos dos valores a nivel del 95%. Después, el clon G-8-12 (27%) es distinto a RC-8-12 pero estadísticamente igual a L-0-4B. Por último, en el clon L-0-4A solo hay un 7% de plantas vivas lo que produce diferencias significativas con RC-8-12 y L-0-4B. En consecuencia, la supervivencia de los distintos clones en condiciones de cámara de cultivo e invernadero tiene bastante relación con el comportamiento de esos mismos clones *in vitro*, y tan sólo se ve ligeramente modificado en el clon L-0-4B, que tuvo *ex vitro* mejor respuesta que la esperada, lo que se asocia con el mecanismo de defensa de eliminar hojas y producir otras nuevas que no había manifestado *in vitro*. Mención especial merece la supervivencia ante la sal de las plantas del clon RC-8-12, lo que coincide con lo que ocurrido *in vitro* a ese mismo material y lo que ocurre en campo con la planta de procedencia.

El crecimiento medio de las plantas control de cada clon al final del experimento *ex vitro*, coincide también con lo que había ocurrido *in vitro* con ese mismo material, debiéndose destacar el mal comportamiento del clon L0-4A y el bueno de RC-8-12. (Figura IV.8). La aplicación de sal (NaCl) de nuevo demostró la mayor tolerancia de RC-8-12 (Figura IV.8).

Como se indicó antes, uno de los efectos que ha tenido la aplicación de NaCl sobre el estado de nutrición de la planta es provocar un fuerte aumento en el contenido de Na en sus tejidos (Figuras IV.17, IV.18 y IV.19). Este incremento de sodio debido a los tratamientos de NaCl había sido previamente indicado para el olivo por Bartolini et al., 1991, Tattini et al., 1992 y 1994, Klein et al., 1994, Benlloch et al., 1994 y Chartzoulakis et al., 2002 en condiciones similares de cultivo y para otras especies por Jeschke, 1984; Munns, 1985 y Marschner, 1986, y coincide por lo indicado antes en este trabajo y por otros autores como Dix et al. (1997) y Troncoso et al. (1999) para condiciones de cultivo *in vitro* del olivo y otras plantas. No obstante este comportamiento similar *in vitro-ex vitro*, existen algunas diferencias, entre las dos situaciones. Así, las plantas o explantos *in vitro* acumulan cantidades muchos más altas de Na (Tablas 3.10 y 3.17) que las cultivadas al exterior y, además se mantienen vivas. Este mayor acúmulo se produce incluso con cantidades más bajas de NaCl en la

solución. En consecuencia, el material vegetal *in vitro* absorbe más fácilmente el Na del medio y es capaz de tolerar un mayor desequilibrio nutritivo y exceso de Na que el cultivado en condiciones externas. La absorción más controlada de Na en las plantas *ex vitro* se relaciona en gran medida con la presencia de un sistema radical que de acuerdo con Benlloch et al. (1991), Tattini et al. (1994) y Chartzoulakis et al. (2002), regula la entrada de este elemento en la planta. Por otra parte, la mayor tolerancia *in vitro* a excesos de Na en tejidos se debe relacionar con las condiciones de este tipo de cultivo, en especial con una menor dependencia de la planta de su función clorofílica dada la presencia en el medio de cantidades importantes de manitol como fuente de carbono (Flora y Madore, 1993) y altos niveles de humedad relativa dentro del frasco de cultivo. Otra diferencia entre la acumulación de Na *in vitro* y *ex vitro*, radica en que en el primer caso todos los clones estudiados alcanzaron, dentro de la misma concentración de NaCl, niveles similares, mientras que en las plantas externas aparecieron diferencias entre clones. Así, G-8-12 alcanzó contenidos más altos de Na en hojas, tanto vivas como muertas, que L-0-4B y RC-8-12. Estas diferencias se relacionan con el comportamiento de los dos últimos clones ante la sal que tiran la hoja una vez adquirido un cierto nivel de Na y la reemplazan por otra nueva con menor contenido.

En el caso de la raíz (Figura IV.18) el aumento de Na es idéntico en los tres clones tanto en las plantas vivas como en las muertas, ya que no se producen renovaciones en este órgano. El contenido de Na, en las plantas control, también es igual para los tres clones, y superior al de hojas y tallo-brotes.

En los niveles de Na en tallo-brotes se produce una situación intermedia a la indicada para hoja y raíz. Las plantas control muestran contenidos bajos e iguales para los tres clones (Figura IV.19). Las plantas tratadas con sal pero aun vivas del clon RC-8-12 que emite la mayor cantidad de brotes nuevos, es el de menor contenido de Na (0,72%). Las plantas tratadas y muertas muestran acúmulo más altos de Na e iguales para los tres clones.

## V. ESTUDIO DE MARCADORES RELACIONADOS CON LA SALINIDAD

### V.1 INTRODUCCIÓN

Se consideran tres tipos de marcadores que ayuden a caracterizar la situación de estrés salino en las plantas de olivo provocada por un exceso de NaCl en el medio:

- La relación entre la presencia de NaCl en el medio y el contenido de Na y/o de Cl en la planta.
- La expresión diferencial de proteínas.
- La influencia de la sal sobre la fotosíntesis.

Diversos autores (Eaton, 1941; Bernstein y Hayward, 1958; Gucci y Tattini, 1997; Mansour y Salama, 2004) han indicado que la presencia de sal en el medio provoca un efecto sobre el potencial osmótico y en consecuencia sobre la disponibilidad hídrica de la planta y un efecto nutricional que origina un desequilibrio de nutrientes bien por defecto o por exceso de algún elemento.

En diferentes capítulos de este trabajo se ha indicado la correspondencia existente entre las aplicaciones de NaCl al medio y las variaciones de determinados nutrientes. En este capítulo se pretende destacar aquellos casos que por su constancia y exactitud puedan ser tomados como marcadores de la situación de salinidad que vive la planta de olivo.

La expresión diferencial de proteínas se utiliza en numerosas especies vegetales (Lin et al., 2005; Xu y Shi 2006; Chen et al., 2007) para identificar genes relacionados con la salinidad. Por ello, se considera un marcador interesante ante el estrés salino y un buen instrumento para la selección de plantas tolerantes. No obstante, existen pocas publicaciones sobre este tema relacionadas en el olivo. García et al. (2002) indican expresiones diferenciales de proteínas entre tejidos juveniles y adultos de olivo. Bartolini et al. (1994) encontraron diferencias de expresión de proteínas entre clones de olivo tolerantes y no tolerantes al frío. No obstante, no hemos encontrado publicación alguna que relacionen la expresión de proteínas y la salinidad en el olivo. Por ello en este trabajo se compara el patrón electroforético de proteínas en dos clones de olivo

JAB y JAB-SV, obtenidos *in vitro* respectivamente por germinación de embriones *in vitro* en medio sin y con NaCl (7 gL<sup>-1</sup> y posteriormente cultivado en medio con 9 gL<sup>-1</sup>).

La fotosíntesis se puede definir como el empleo de la energía de la luz solar por las células de las plantas para su transformación en energía química en forma de ATP y poder reductor (NADPH<sub>2</sub>), que se utilizan para asimilar el CO<sub>2</sub> atmosférico y producir hidratos de carbono.

Por consiguiente, las plantas deben captar CO<sub>2</sub> para mantener la fotosíntesis. Esta captación se efectúa a través de los estomas, donde también se lleva a cabo el intercambio de H<sub>2</sub>O. Por lo tanto, la apertura estomática juega un papel fundamental tanto en la fotosíntesis, como en la transpiración.

Existe una ecuación (Ball et al., 1987), que agrupa los factores que determinan la conductancia o apertura estomática:

$$g = m (A \text{ HR}) / C_i + b$$

g = Conductancia estomática (apertura)

A = Fotosíntesis neta

HR = Humedad relativa del aire

C<sub>i</sub> = Concentración de CO<sub>2</sub> intercelular

Los parámetros “m” y “b” son constantes específicas para cada especie.

Por consiguiente, son tres los parámetros que regulan la apertura estomática: a) la concentración de CO<sub>2</sub> intercelular (C<sub>i</sub>), a bajas concentraciones de C<sub>i</sub> los estomas se abren independientemente de los demás factores ambientales, excepto en situaciones de fuerte estrés; b) la luz, que tiene un efecto positivo sobre la apertura estomática. Su regulación es doble, por un lado reduciendo la concentración de C<sub>i</sub> debido al proceso fotosintético, por otro y de forma simultánea, la luz azul activa la H<sup>+</sup>-ATPasa e induce la apertura de forma independiente a la concentración de C<sub>i</sub> y c) la humedad relativa, llegando a provocarse el cierre estomático cuando el aire es muy seco.

Según Raschke (1975), “los estomas son los encargados de proveer la comida y de evitar la sed”, por tanto el equilibrio entre la pérdida de agua y la obtención de CO<sub>2</sub> es de vital importancia para las plantas. De todo lo indicado se desprende que la actividad de los estomas está fuertemente controlada por factores ambientales, por lo que determinadas condiciones de estrés como el hídrico y, sobre todo, el salino (Munns, 1993), reducen la captación por las plantas del CO<sub>2</sub> de la atmósfera, en primer término a causa de una disminución de la conductancia estomática (Jones, 1973; Cornic, 2000),

decreciendo consecuentemente, la tasa fotosintética. Lawlor (1995), indica que además de la conductancia estomática, si las condiciones de estrés, ya sea sequía (Flexas et al., 2002) o salinidad (Bongi y Loreto, 1989; Delfine et al., 1998; 1999) se mantienen, se ve afectado también el metabolismo del mesófilo de la hoja. Se conoce que los estomas se defienden del estrés mediante reapertura estableciendo de nuevo intercambios gaseosos entre la hoja y el aire, recuperándose e incluso consiguiendo tasas fotosintéticas similares a las anteriores al estrés si la limitación es sólo la concentración de CO<sub>2</sub> en la hoja. La reducción de la conductancia del mesófilo, por el contrario, puede considerarse como irreversible, ya que está asociada a cambios en la estructura de este tejido (Bongi y Loreto, 1989) o a una posible reordenación de espacios intercelulares (Delfine et al., 1998). Sin embargo, Delfine et al. (1999), demuestran que la defensa frente al estrés salino antes de un daño bioquímico irreversible asociado a la reducción del contenido y actividad de la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa (rubisco), puede incluir un incremento en la conductancia del mesófilo.

El olivo se considera como de tolerancia intermedia a la sal (Rugini y Fedeli, 1990), sin embargo, como se ha comentado anteriormente, dada la alta diversidad genética en esta especie se encuentran importantes variaciones en cuanto a la tolerancia a la salinidad entre las variedades cultivadas (Tattini, 1994). Como se ha comentado ya, bajo estrés salino, las hojas de ciertas plantas esclerófitas como el olivo, pueden modificar su anatomía al hacerse más gruesas y suculentas (Bongi y Loreto, 1989; Cantos et al., 2000). Este incremento en el grosor, puede reducir la conductancia del mesófilo, alargando y haciendo más tortuoso el camino del CO<sub>2</sub> hacia los cloroplastos (Longstreth y Nobel, 1979; Evans et al., 1994; Syvertsen et al., 1995). Estas alteraciones anatómicas de la hoja pueden ser fuentes de error en la estimación de la conductancia del mesófilo y, en consecuencia, de la tasa de transporte de electrones en hojas sometidas a estrés salino cuando se comparan con hojas en ausencia de sal (Harley et al., 1992). Por este motivo, es mucho más precisa la estimación de la tasa de transporte de electrones midiendo la fluorescencia de la clorofila (Genty et al., 1989).

Cuando llega la energía lumínica a la planta, no toda es convertida en energía química para su uso en la cadena fotosintética, sino que parte se pierde en forma de calor o por emisión de fluorescencia. Estos tres parámetros son competitivos entre sí, lo que supone que variaciones en alguno de ellos afectan al resto. De este modo, variaciones en la función fotosintética como respuesta a cambios ambientales ocasionan variaciones en la emisión de fluorescencia. Por lo general la energía que se emite en

forma de fluorescencia es muy pequeña, (1-2% de la energía total absorbida), pero sus variaciones sirven como indicador ecofisiológico (Castillo et al., 2000; 2002; Nieva et al., 2003). La fluorescencia puede medirse separando la fluorescencia emitida a 685 nm que corresponde al fotosistema II de la luz de excitación (650 nm) mediante un filtro de interferencia.

La fluorescencia de la clorofila *a* indica si la planta está sufriendo estrés ya que proporciona información acerca del estado del PSII. Los daños en este fotosistema son frecuentemente la primera manifestación de estrés en las plantas, de este modo con la fluorescencia se puede cuantificar el estrés de la vegetación, los posibles daños en el aparato fotosintético y su posterior recuperación al desaparecer el agente causante del estrés.

Las diferencias entre el transporte de electrones medido a través de la fluorescencia y los cálculos mediante intercambio de gas indican la existencia de resistencia en el mesófilo, con reducción de la concentración de CO<sub>2</sub> en el cloroplasto, esta reducción puede calcularse fácilmente (Loreto et al., 1992). Por consiguiente, mediante mediciones simultáneas de fluorescencia de clorofila e intercambio gaseoso es posible estimar la tasa de transporte de electrones usando ambos métodos de forma independiente, lo que permite conocer el estado del aparato fotosintético y de los niveles de estrés que soporta la planta.

Loreto et al. (2003) indican que la reducción de la fotosíntesis en hojas de olivo sometidas a estrés salino moderado es generalmente atribuible a la suma de las resistencias del estoma y del mesófilo y que la reducción de la conductancia estomática juega un papel importante en la reducción de la concentración interna de CO<sub>2</sub>.

Los primeros cambios en la emisión de fluorescencia de la clorofila fueron observados por Kautsky et al. (1960), encontrando que la emisión de fluorescencia está relacionada con la reducción de los aceptores de electrones en la ruta fotosintética, y concretamente con el conjunto de plastoquinonas. Mientras la plastoquinona A (QA) no transmite el electrón al siguiente transportador la plastoquinona B (QB), la primera no puede aceptar nuevos electrones. Durante este periodo de tiempo se dice que el centro de reacción está cerrado. El aumento de la proporción de centros de reacción cerrados conduce a una disminución de la eficiencia fotoquímica, y consecuentemente, un incremento de la fluorescencia de la clorofila.

Sin embargo, tras el comienzo de este proceso, los niveles de fluorescencia caen en cuestión de minutos. Este hecho se denomina quenching (apagamiento) de la fluorescencia, y se puede explicar de dos maneras. Primero, se produce un incremento de la tasa de fluorescencia en la cual los electrones son transportados a través del PSII. Este fenómeno ocurre principalmente por la activación, inducida por la luz, de los enzimas relacionados con el metabolismo del carbono y de apertura estomática. Este quenching se denomina quenching fotoquímico (qP). Al mismo tiempo, se produce un incremento de la eficiencia con la que la energía es convertida en calor, proceso llamado quenching no fotoquímico (NPQ).

La técnica que permite medir el efecto de determinados tipos de estrés, como el salino, sobre la eficacia del sistema fotosintético se inicia con la iluminación de la hoja con un haz de luz actínica (luz de la zona azul a ultravioleta, onda corta, muy activa con el material fotosensible) a saturación. Durante ese breve instante de tiempo, la producción de fluorescencia aumenta hasta un valor equivalente a una situación en la que habría ausencia de quenching fotoquímico. Este parámetro se denomina fluorescencia máxima ( $F_m$ ). Una vez que la fluorescencia vuelve a su nivel basal se enciende una luz actínica de intensidad regulable (entre 0 y 3000  $\mu\text{mol fot m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), y bajo esta condición lumínica se vuelven a aplicar pulsos saturantes que nuevamente cierran todos los centros de reacción y se obtiene el ( $F'_m$ ). La comparación de  $F_m$  con la producción de fluorescencia en presencia de luz en el estado estacionario ( $F_s$ ) y con la producción de fluorescencia en ausencia de luz actínica, que a su vez refleja la pérdida de una parte de la energía absorbida por las moléculas-antenas antes de que éstas hayan podido transferir la energía de excitación hacia los centros de reacción (Krause y Weis, 1984; Briantais et al., 1986) ( $F_0$ ), da información sobre la eficiencia del quenching fotoquímico y de su extensión.

En consecuencia, el quenching fotoquímico está relacionado con los valores de  $F'_m$  y  $F_s$ . El parámetro más utilizado es la eficiencia fotoquímica del PSII,  $\Phi_{\text{PSII}}$  (Genty et al, 1989). Dicho parámetro se calcula como:

$$\Phi_{\text{PSII}} = (F'_m - F_s) / F'_m$$

Este parámetro nos indica la proporción de luz absorbida por la clorofila asociada al PSII y que se utiliza como energía fotoquímica. Otro parámetro usado habitualmente es el quenching fotoquímico (qP). Éste se calcula como:

$$qP = (F'_m - F_s) / (F'_m - F_0)$$

Aunque es muy parecido al anterior, el significado es a veces diferente. Mientras  $\Phi_{\text{PSII}}$  es la proporción de energía absorbida para ser usada en fotoquímica, **qP** indica

la proporción de centros de reacción que están abiertos. Alternativamente,  $1-qP$ , sería la proporción de centros de reacción cerrados.  $\Phi_{PSII}$  y  $qP$  pueden relacionarse entre sí por un tercer parámetro,  $F_v/F_m$  (Genty et al., 1989), donde  $F_v$  es la diferencia entre  $F_o$  y  $F_m$ . Esta medida nos indica la eficiencia fotoquímica potencial del FSII, es decir, si todos los centros de reacción estuvieran abiertos. Este parámetro se calcula como:

$$F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m = \Phi_{PSII}/qP$$

Cambios en  $F_v/F_m$ , dan una información muy valiosa sobre los efectos del estrés ambiental en las plantas.

Por último, el mejor camino para calcular el quenching no fotoquímico es la medida de la relación entre  $F_m$  y el valor final de  $F_m$  según la ecuación (Bilger y Bjorman, 1990):

$$NPQ = (F_m - F'_m)/F'_m$$

NPQ está relacionado linealmente con la disipación de calor.

El presente capítulo tiene como objetivo estudiar la influencia de la sal sobre el estado del aparato fotosintético y, en consecuencia, sobre la fotosíntesis de plantas de olivo, mediante la comparación de plantas en condiciones de elevado estrés salino y en ausencia de sal.

## V.2. MATERIAL Y MÉTODOS

### V.2.1. NIVELES DE NaCl EN LA PLANTA.

En cuanto a la relación de NaCl en el medio y niveles de Na y Cl en la planta, se utilizan los experimentos indicados en capítulos anteriores por lo que no se considera necesario repetir los materiales y métodos correspondientes.

### V.2.2. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS.

En relación con la expresión de proteínas, se compararon dos clones de olivo JAB y JAB-SV, obtenidos respectivamente de un embrión procedente de un mismo olivo cv. Jabaluna. El primero (JAB) germinado *in vitro* en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) 1/3 sin adición de NaCl (Tabla 3.1) y el segundo (JAB-SV) en las mismas condiciones pero adicionando al medio  $7 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl (120mM) por lo que se consideró como tolerante. Una vez que cada explanto alcanzó un desarrollo suficiente *in vitro* (>4 cm.) se dividieron, separadamente, en otros explantos uninodales de aproximadamente 1 cm. de longitud, que se subcultivaron individual y repetidamente (hasta obtener un número suficiente de material de cada línea clónica) en medio OM (Rugini, 1984) con  $15 \text{ gL}^{-1}$  de manitol y  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de zeatina. Explantos de cada línea clónica, se volvieron a cultivar individualmente en el medio anterior con tres niveles respectivos de salinidad: control (sin NaCl); adición de  $3 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl (50mM) y  $5,25 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl (90mM). En todos los casos las condiciones de la cámara de cultivo fueron de  $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $30 \mu\text{Em}^{-2}\text{S}^{-1}$  de luz y 16 h. de fotoperiodo.

Las hojas y los tallos de cada tratamiento y clon se molieron por separado en nitrógeno líquido y se guardaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso. La extracción de proteínas se realizó según el método descrito por García et al. (2000) y la concentración proteica de los extractos fue medida por el método de Bradford (1976).

Los extractos fueron sometidos a electroforesis en gel de policrilamida-SDS compuesto por un gel de separación al 12% y un gel de apilamiento al 4% (Laemmli, 1970). Se cargaron alícuotas de cada extracto con igual cantidad de proteínas (30  $\mu\text{g}$ ) y la electroforesis se corrió a corriente continua de 15 mA hasta que el frente alcanzó el borde inferior del gel. En ese momento se tiñeron los geles con azul brillante de Coomassie al 0,25% y luego fueron desteñidos. Los pesos moleculares de las bandas de

proteínas se determinaron por comparación con un estándar que contenía proteínas de referencia en el rango de 14,4 a 116,3 kD (Bio-Rad).

### V.2.3. FOTOSÍNTESIS.

Las medidas de fluorescencia se realizaron en las plantas de la prueba descrita en el capítulo IV. En consecuencia, el riego de las plantas control y tratadas con NaCl, y las características de éstas se llevaron a cabo según se detalla en el apartado de Materiales y Métodos del citado capítulo.

Para conocer la influencia de la sal sobre el estrés de la planta, se realizaron medidas de fluorescencia de la clorofila *a* e el último tratamiento cuando las plantas estaban sometidas a 14 y 16 gL<sup>-1</sup> de NaCl y con plantas control de la misma edad, pero en ausencia de sal.

En el estudio se registraron las 4 variables de la cinética rápida de emisión de fluorescencia detalladas a continuación:

El primer parámetro en la curva de emisión de fluorescencia tras la excitación de las muestras aclimatadas a oscuridad, es la fluorescencia basal ( $F_0$ ), que se alcanza cuando la luz, una vez atrapada por los centros de reacción del PSII, es absorbida y emitida por los pigmentos antena, lo que ocurre entre los pico y nanosegundos. Principalmente, depende de la funcionalidad de los centros de reacción del PSII, así como del tamaño y funcionamiento de los complejos antena de dicho fotosistema (Krause y Weis, 1991).

El segundo parámetro es la fluorescencia pico o fluorescencia máxima ( $F_m$ ) que se alcanza tras la excitación con luz actínica, es dependiente del número de centros de reacción activos.

También se calculó la fluorescencia variable ( $F_v$ ), es decir la diferencia entre la fluorescencia basal y la máxima, que se alcanza cuando todos los centros de reacción están activos.

El cuarto parámetro es la eficiencia fotoquímica potencial del FSII ( $F_v/F_m$ ) que consiste en el cociente entre la fluorescencia variable y la fluorescencia pico, este parámetro indica cuanto de la energía absorbida se destina a la cadena fotosintética. Su valor en plantas en condiciones normales oscila entre 0,75 y 0,85, disminuye en plantas estresadas y 0,83 es el óptimo en la mayor parte de las especies (Björkman y Demmig, 1987; Bolhàr-Nordenkampf y Öquist, 1993). Este parámetro se correlaciona

directamente con el número de centros de reacción del FSII activos (Öquist et al., 1992) y sus variaciones se deben a cambios en la efectividad del quenching fotoquímico. El estrés ambiental determina un descenso de esta relación por lo que se utiliza para cuantificar el grado de fotoinhibición y estrés (Long et al., 1994; Krivosheeva et al., 1996). Generalmente desciende antes que otros síntomas lleguen a aparecer (Figuroa et al., 1997). Existe una buena correlación entre la fotoinhibición de la fotosíntesis causada por un exceso de excitación y una disminución de la proporción  $F_v/F_m$ .

Como complemento a las medidas de la cinética rápida de emisión de fluorescencia se realizaron las medidas de cinética empleando otro fluorímetro, modelo FMS-2 (Hansatech Instrument Ltd., Inglaterra), en este caso aplicando luz actínica saturante de  $14400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Estas mediciones se realizaron inmediatamente después de las anteriores, en la misma hoja y en las mismas condiciones. Gracias a estas medidas realizadas con una pinza especial para ello, se obtuvieron varios parámetros de la cinética rápida; entre ellos la eficiencia del fotosistema II ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ), el quenching fotoquímico (qP) y el quenching no fotoquímico (NPQ). Estos parámetros informan sobre el estado del aparato fotosintético; los niveles de daño que sufre, el estado de los centros de reacción y la cantidad de energía que se disipa por medio de calor.

### V.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### V.3.1. NIVELES DE NaCl EN LAS PLANTAS.

En las figuras V.1, V.2, y V.3 se indica la relación que existe entre el nivel de NaCl en el medio y el de, respectivamente, K, Na y Cl en la planta, para las condiciones de cultivo *in vitro*. Se observa una correlación inversa para el caso del K ( $r = -0.9488$ ) y directa para el Na ( $r = 0.9945$ ) y el Cl ( $r = 0.9867$ ). En consecuencia, en las condiciones *in vitro* la planta llega a acumular cantidades muy elevadas de Na y Cl, lo que denota una absorción intensa y poco controlada de estos nutrientes disueltos en el medio de cultivo.

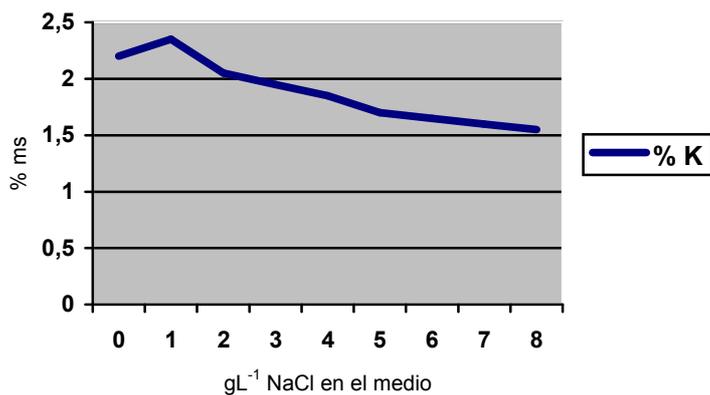


Figura V.1.- Influencia de las aplicaciones de NaCl al medio sobre el contenido de K en planta de olivo “in vitro” tras 60 días de cultivo.

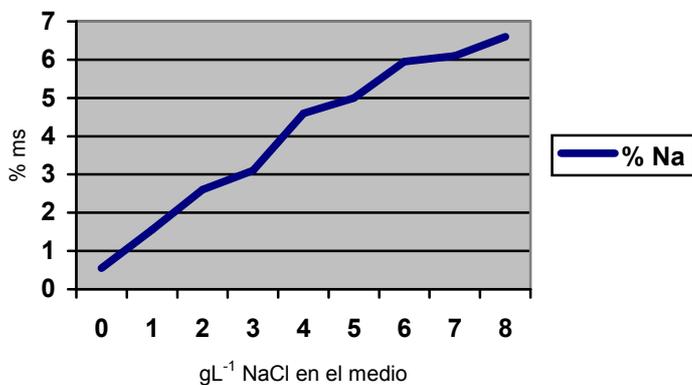


Figura V.2.- Influencia de las aplicaciones de NaCl al medio sobre el contenido de Na en planta de olivo “in vitro” tras 60 días de cultivo.

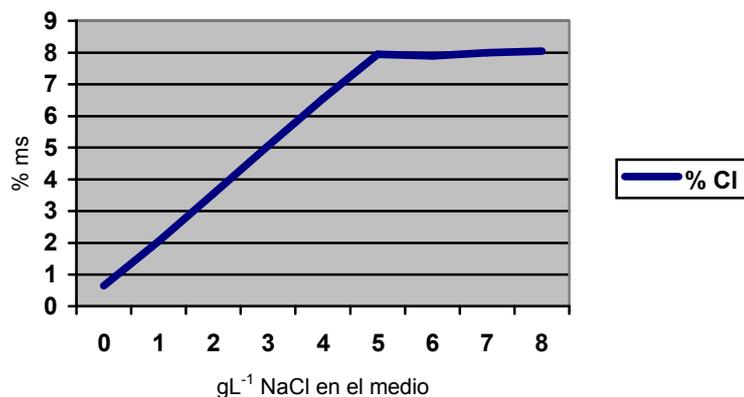


Figura V.3.- Influencia de las aplicaciones de NaCl al medio sobre el contenido de Cl en planta de olivo “in vitro” tras 60 días de cultivo.

En las plantas trasplantadas desde *in vitro* a condiciones externas (macetas en cámara de cultivo) y tratadas con soluciones de NaCl, también se producen las acumulaciones de Na (Figuras V.4 y V.5) y de Cl (Figura V.6) y el descenso de K (Figuras V.7 y V.8) (Tablas 4.16, 4.19, 4.23, 4.25 y 4.27). En este caso, al tratarse de una planta adaptada al exterior, es decir con un sistema radical bien desarrollado y activo con sus funciones metabólicas normalizadas, la absorción de Na y de Cl está mucho más controlada y la planta no llega a alcanzar los valores indicados para el cultivo *in vitro*.

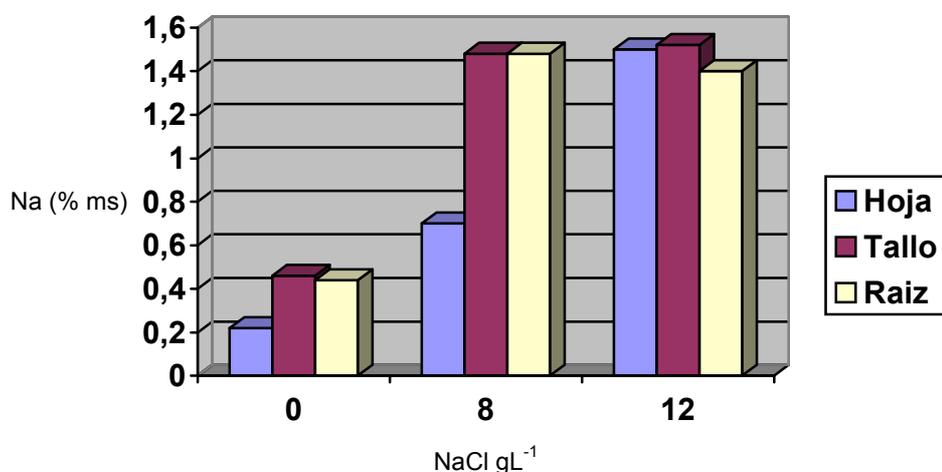


Figura V.4. Contenidos de Na en hoja, tallo y raíz de planta joven de olivo en maceta en relación con la aplicación de 0, 8 y 12 gL<sup>-1</sup> de NaCl.

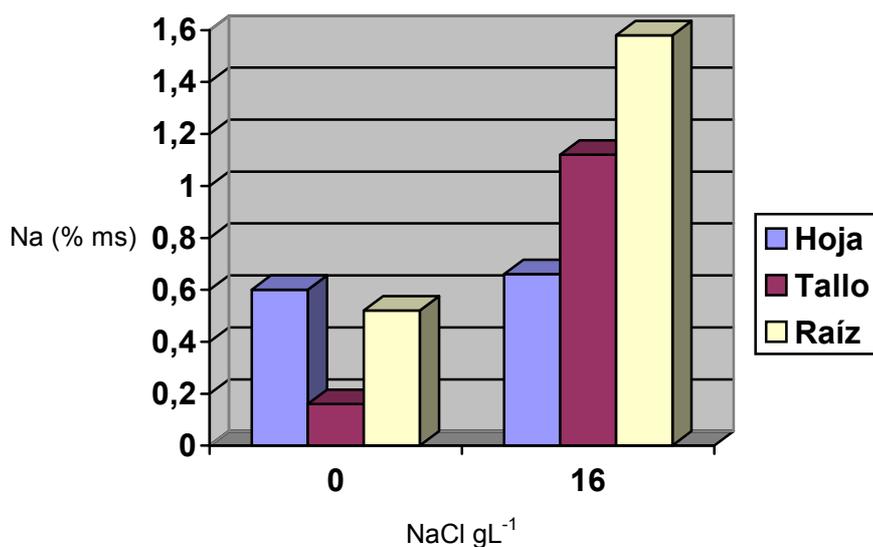


Figura V.5. Contenidos de Na en hoja, tallo y raíz de planta joven de olivo en maceta en relación con la aplicación de 0 y 16 gL<sup>-1</sup> de NaCl.

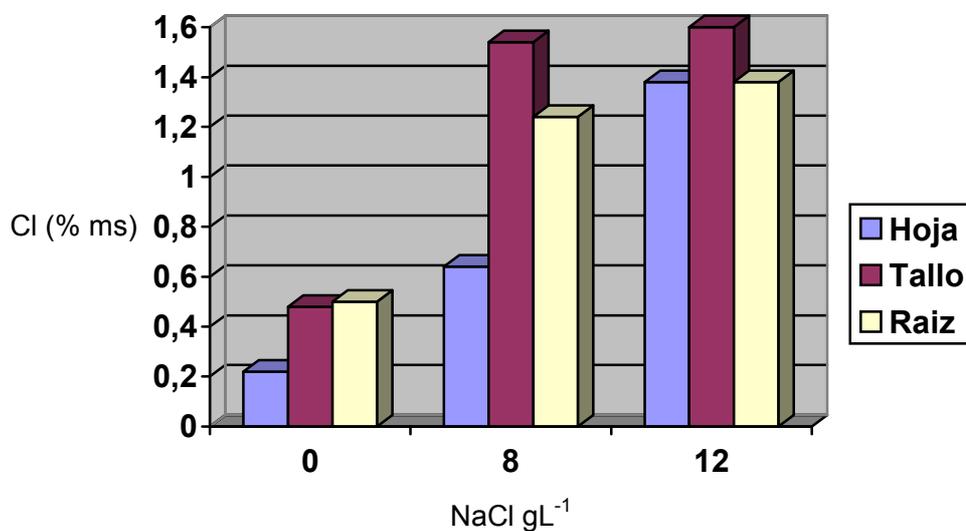


Figura V.6. Contenidos de Cl en hoja, tallo y raíz de planta joven de olivo en maceta en relación con la aplicación de NaCl.

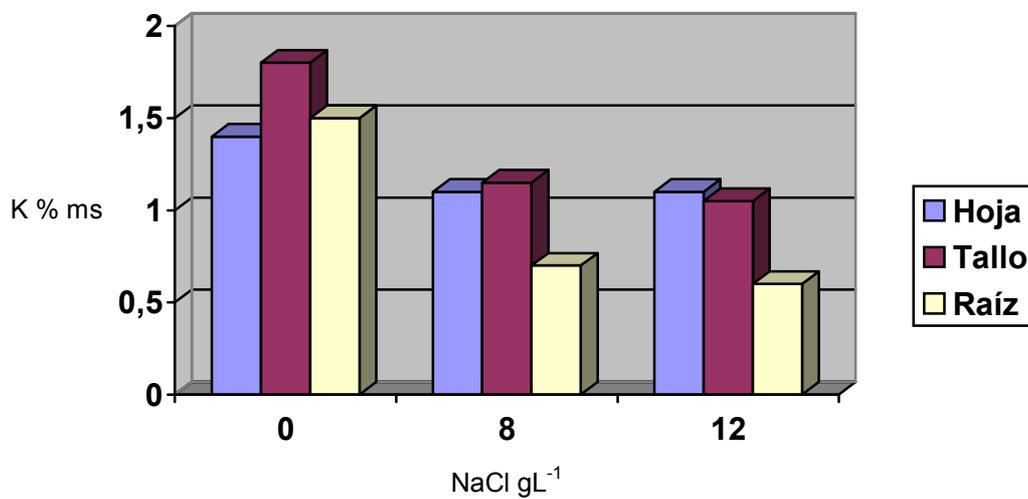


Figura V.7. Contenidos de K en hoja, tallo y raíz de planta joven de olivo en maceta en relación con la aplicación de 0, 8 y 12 g/L de NaCl.

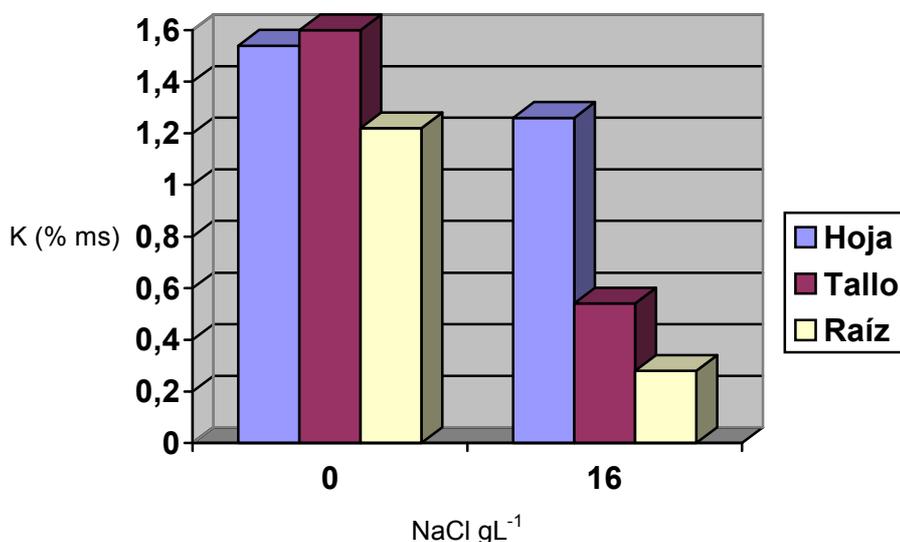


Figura V.8. Contenidos de K en hoja, tallo y raíz de planta joven de olivo en maceta en relación con la aplicación de 0 y 16 gL<sup>-1</sup> de NaCl.

En condiciones de campo también las plantas que viven en las zonas salinas presentan contenidos mucho más altos de Na y de Cl que las que se cultivan en el Banco de Germoplasma de Córdoba en suelos no salinos (Tablas 2.12 y 2.23). En estos casos no son tan claros los descensos de K (Tablas 2.12 y 2.23).

Por lo tanto, en todas las condiciones estudiadas (cultivo *in vitro*, cultivo en macetas y campo) se produce una relación positiva entre la presencia de NaCl en el medio y de Na y de Cl en la planta. Estas relaciones NaCl en el medio con Na y Cl en planta también han sido indicadas por Therios y Misopolinos (1988); Bonghi y Loreto (1989); Bartolini et al. (1991); Tattini et al. 1992, Cresti et al. (1994); Troncoso et al. (1999).

En consecuencia, los contenidos de Na o de Cl en la planta se pueden considerar como marcadores fisiológicos de la situación de estrés salino NaCl en la que la planta de olivo está viviendo.

### V.3.2. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS.

Los tratamientos salinos afectan la supervivencia de las plantas. Así, en los dos grupos control sobrevive el 100% de las plantas. En la aplicación de 3 gL<sup>-1</sup> de NaCl (50mM) muere el 27% del clon JAB y el 3% del clon JAB-SV, mientras que con el tratamiento de 5,25 gL<sup>-1</sup> de NaCl (90mM) mueren todas las plantas del JAB (100%) y el

39% de las de JAB-SV. De nuevo se comprueba el efecto positivo del tratamiento salino inicial *in vitro*, en la selección de clones tolerantes y en consecuencia la mayor tolerancia del clon JAB-SV sobre el JAB.

El patrón electroforético de los extractos (Figura V.9) muestra 2 bandas que parecen responder diferencialmente a las aplicaciones de sal ya que presentan una señal más intensa en los extractos correspondientes a las muestras tratadas en comparación con los controles. Una de estas bandas, de alrededor de 40 kD, se expresa con mayor intensidad en los extractos de tallo de las plántulas de JAB-SV crecidas en 50 y 90 mM (Figura V.9b, calles 4 y 5) e incrementa la señal con las concentraciones crecientes de sal lo que parece indicar una respuesta lineal a la dosis de NaCl. La otra banda, de alrededor de 20 kD también parece incrementar su expresión tras la exposición a sal, tanto en hojas (Figura V.9a., calles 3 y 5) como en tallo (Figura V.9b., calles 3-5) del clon JAB. En los extractos del clon JAB, este comportamiento es menos evidente. En este clon, la banda de 40 kD muestra un leve incremento de expresión entre los extractos de tallo del control y el tratamiento 50 mM (Figura V.9b, calles 1-2), mientras que la banda de 20 kD presenta solo una señal muy tenue en los extractos de ambos tejidos (Figura V.9 a y b.). Como se ha indicado por la supervivencia de las plantas, el clon JAB-SV es más tolerante a la sal, por lo que estas bandas pueden estar relacionadas con las respuestas fisiológicas y adaptativas al estrés salino y ser marcadores para la tolerancia a este tipo de estrés. Esta hipótesis estaría apoyada por el hecho de que tales polipéptidos muestran mayor expresión en los tejidos del clon más tolerante, JAB-SV. Si así fuera, sería la primera vez en que se describen polipéptidos relacionados con el estrés salino en tejidos de olivo, aunque se necesita profundizar en esta línea para confirmar estos resultados en distintas variedades y condiciones de cultivo.

La banda de 20 kD muestra características similares al producto del gen TAS14 que fue caracterizado en tomate (Godoy et al., 1990). TAS14 se induce en tomate mediante estrés salino y tratamiento con ABA y aunque la masa molecular esperada de este polipéptido es 14 kD su movilidad electroforética observada es alrededor de 20 kD (Godoy et al., 1990). TAS14 es miembro de una clase general de genes denominados deshidrinas (inducidos por deshidratación). Las deshidrinas se han encontrado en distintas especies vegetales y se inducen por ABA y diferentes tipos de estreses ambientales como desecación, estrés osmótico y salino. Como se mencionó anteriormente, TAS14 se induce en plántulas y plantas maduras de tomate por

tratamiento con NaCl, ABA o manitol y se localiza en tallos y hojas de las plantas así tratadas (Godoy et al., 1994).

La banda de 20 kD observada en los extractos de tejido de olivo parece ser inducida por el tratamiento salino y su movilidad electroforética es muy similar a la descrita para TAS14 por lo que sería un buen candidato para ser una deshidrina del olivo aunque se requieren más pruebas para comprobar esta hipótesis además de caracterizar también la banda de 40 kD.

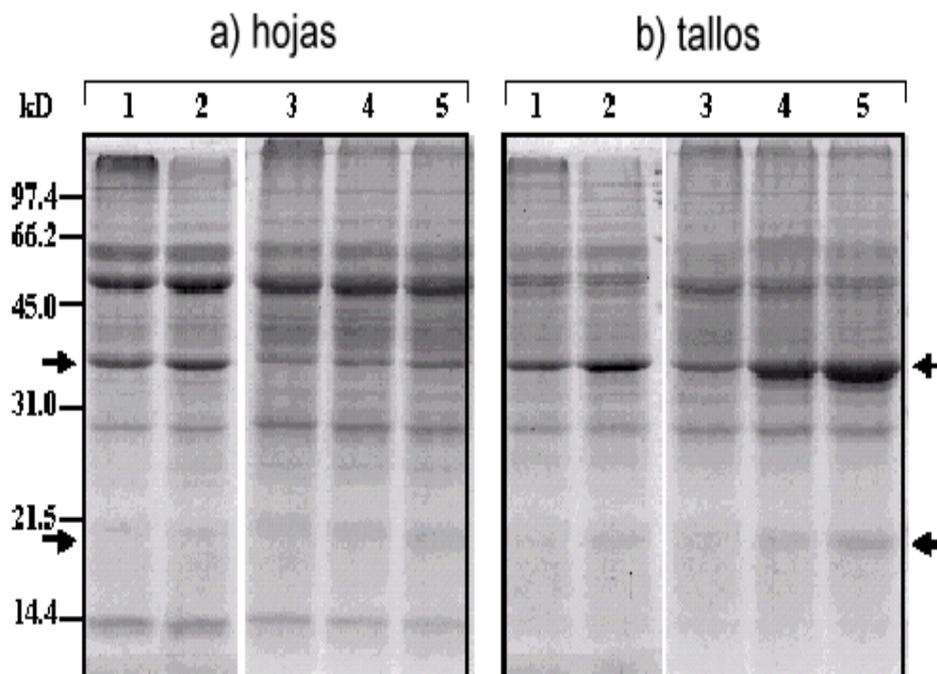


Figura V.9. Patrón electroforético de los extractos de hojas y tallos de los explantos.

a) Hojas: control clon JAB (1), clon JAB cultivado en 50 mM de sal (2), control clon JAB-SV (3), clon JAB-SV 50 mM de sal (4), y clon JAB-SV 90 mM de sal (5).

b) Tallos: control clon JAB (1), clon JAB cultivado en 50 mM de sal (2), control clon JAB-SV (3), clon JAB-SV 50 mM de sal (4), y clon JAB-SV 90 mM de sal (5).

Las flechas indican las bandas de 40 y 20 kD que muestran diferente expresión en los controles y en los explantos tratados con sal.

Se usaron geles de separación al 12% de acrilamida y se cargaron alícuotas de 30  $\mu$ g de proteína de cada muestra.

### V.3.3. FOTOSÍNTESIS

En cuanto a la fotosíntesis, no se producen diferencias significativas entre los niveles de fluorescencia inicial ( $F_0$ ), fluorescencia máxima ( $F_m$ ) y fluorescencia variable ( $F_v$ ) entre las plantas control y las tratadas con  $16 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl respectivamente de los clones G-8-12 (Figura V.10.a) y L-0-4 B (Figura V.11.a) en consecuencia, tampoco se encuentran diferencias significativas entre los valores de la eficiencia fotoquímica potencial ( $F_v/F_m$ ) de las mismas plantas y tratamientos (Figura V.10.b y V.11.b respectivamente). Es decir, el estrés salino provocado al tratar las plantas con  $16 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl no se refleja en los parámetros considerados. Esto indica una alta tolerancia a la sal de los clones en cuestión, ya que la eficiencia fotoquímica potencial ( $F_v/F_m$ ) está considerada como un buen factor para medir la situación de estrés de una planta. Además, en una escala entre 0 y 1 se acepta que una eficiencia fotoquímica potencial cercana a 0,8 no denota una situación de estrés importante, lo que ocurre en estas plantas.

En el caso del clon RC-8-12 se produce un aumento significativo de  $F_0$  y  $F_m$  y un pequeño aumento no significativo de  $F_v$  (Figura V.12.a) lo que origina una disminución de  $F_v/F_m$ . Es decir las plantas del clon RC-8-12 denotan para estos parámetros una ligera manifestación de estrés. No obstante, los valores de la eficiencia fotoquímica potencial tanto de las plantas control como de las tratadas están próximos a 0,8 por lo que la situación de estrés es poco importante.

El que los niveles de  $F_m/F_v$  estén en todos los casos cercanos a 0,8 (media de 0,757 para las plantas control y 0,722 para las tratadas con  $16 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl) denota la búsqueda del equilibrio en la eficiencia fotoquímica de la planta como respuesta a las condiciones de estrés (Loreto et al. 2003) lo que da una idea de la adaptación de estas plantas a la presencia de sal en el riego y como se vio en el capítulo anterior a la acumulación de iones Na y Cl en los tejidos.

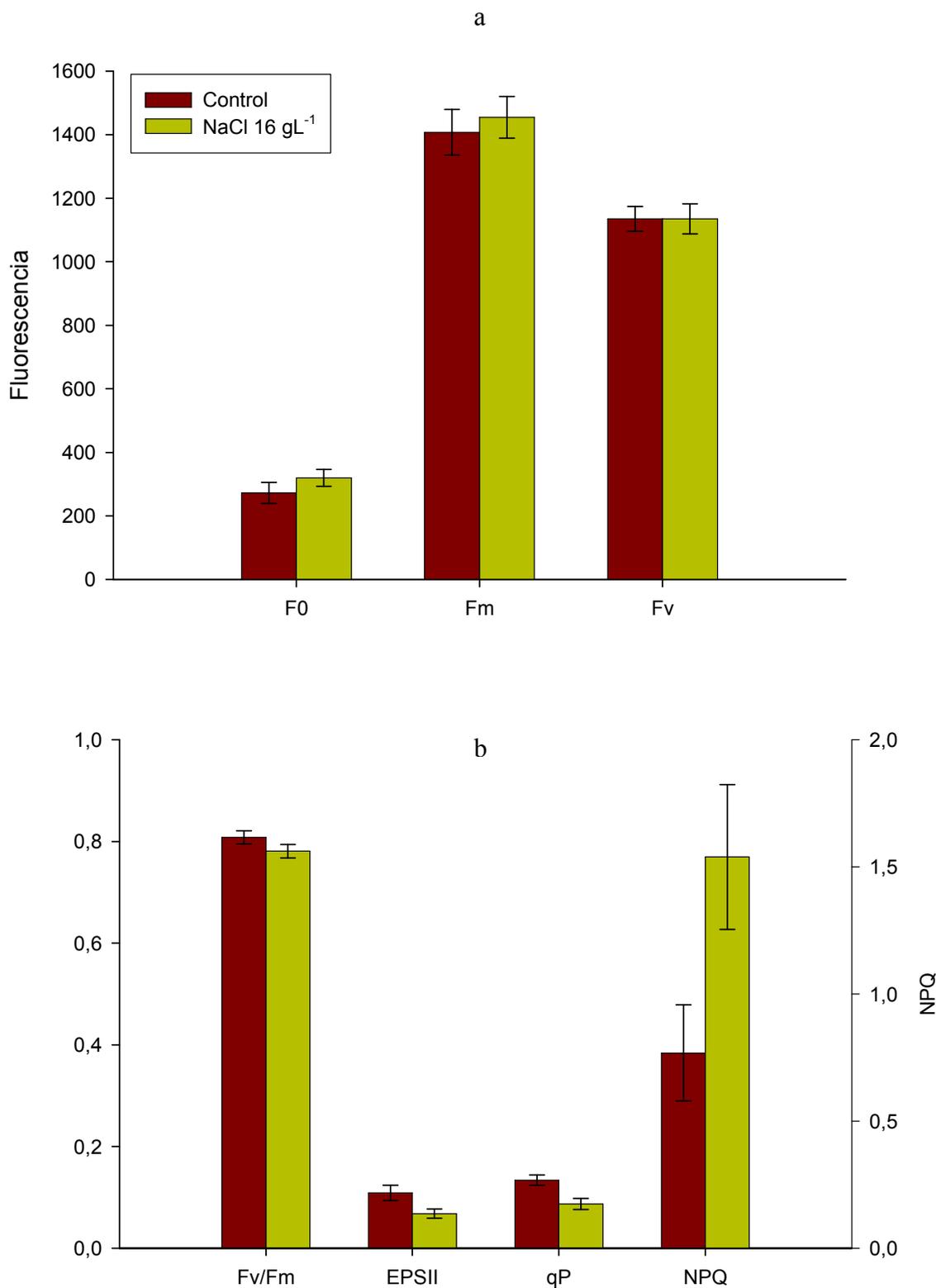


Figura V.10. (a) Niveles de Fluorescencia inicial (F0), Fluorescencia máxima (Fm), y Fluorescencia variable (Fv) y (b) Eficiencia Fotoquímica potencial (Fv/Fm), Eficiencia Fotoquímica del fotosistema II ( $\Phi$  PS II), quenching fotoquímico (qP), y quenching no fotoquímico (NPQ), de las plantas del clon G-8-12 de los tratamientos control (sin sal) y 16 gL<sup>-1</sup> de NaCl.

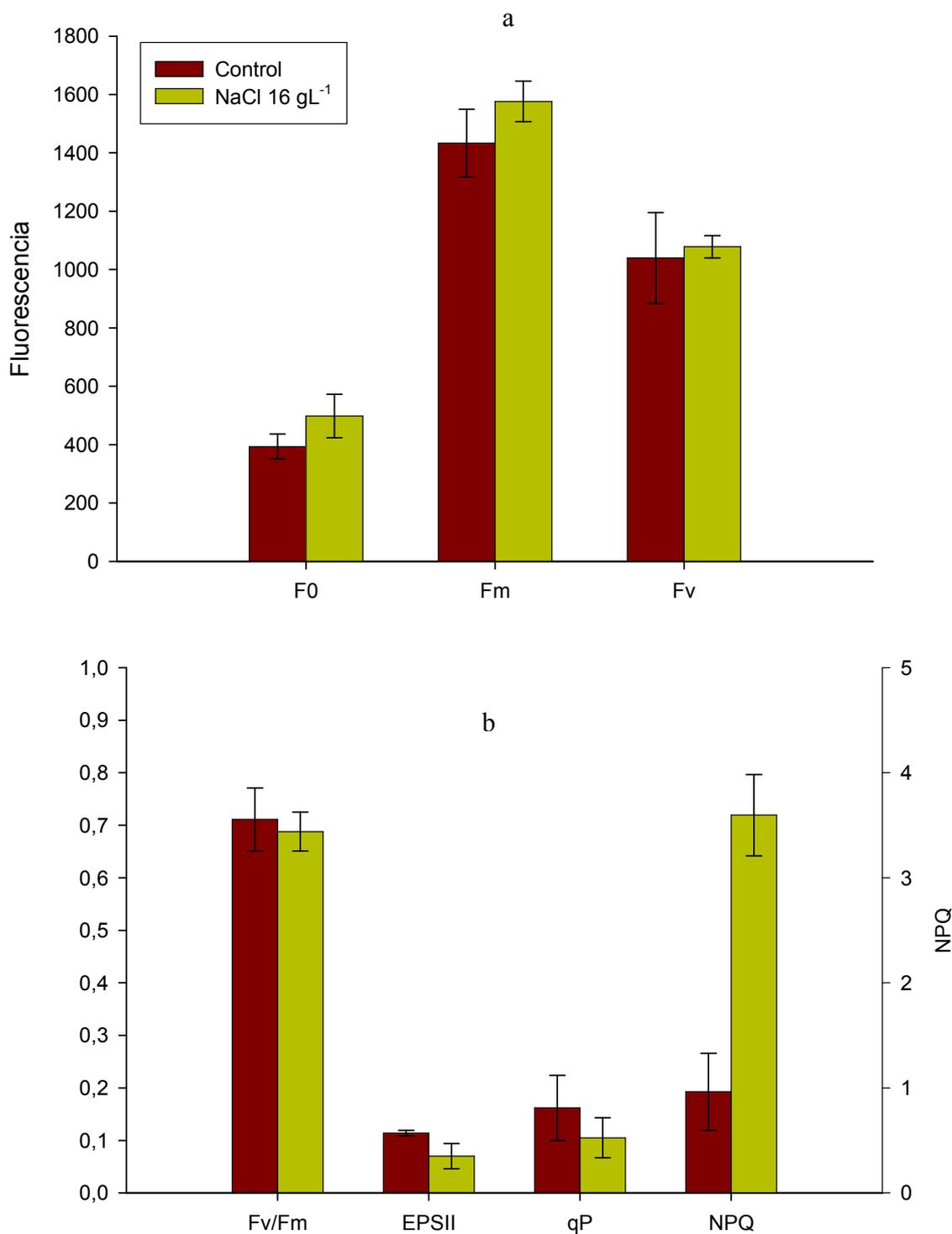


Figura V.11. (a) Niveles de Fluorescencia inicial (F0), Fluorescencia máxima (Fm), y Fluorescencia variable (Fv) y (b) Eficiencia Fotoquímica potencial (Fv/Fm), Eficiencia Fotoquímica del fotosistema II ( $\Phi_{ps II}$ ), quenching fotoquímico (qP), y quenching no fotoquímico (NPQ), de las plantas del clon **L-0-4B** de los tratamientos control (sin sal) y 16 gL<sup>-1</sup> de NaCl.

Las plantas de los tres clones presentan descensos significativos de la eficiencia fotoquímica del fotosistema II (EPS II) al ser sometidas al tratamiento con  $16 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl (Figuras V10.b, V.11.b y V.12.b) con media de 0,114 en el control y de 0,064 en el tratamiento salino. Esta variación representa un descenso real del funcionamiento del fotosistema II y por tanto un descenso en la transformación de energía lumínica en química. Estos datos se acompañan con los que muestra el “quenching” fotoquímico (qP) (Figuras V10.b y V.11.b) en los que también se produce una disminución o “apagamiento” de la fluorescencia (aunque en el caso del clon L-0-4 B no es estadísticamente significativo) debido a la utilización de la energía lumínica en la transformación de energía química en forma de ATP a través del trasvase de electrones que se produce en el PSII. Los valores medios de los tres clones, 0,152 para el control y 0,09 para el tratamiento salino confirman lógicamente lo indicado antes para los clones individualmente.

Por último, el tratamiento con  $16 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl provoca un aumento muy elevado y con alta significación del “quenching” no fotoquímico (Figuras V.10.b, V.11.b y V.12.b) lo que da idea del descenso de energía lumínica que la planta desvía en forma de calor y es, en este caso, la manifestación más clara de la situación de estrés provocada por la salinidad.

Una vez discutidas las diferencias que provoca la presencia de NaCl en el medio a elevada concentración ( $16 \text{ gL}^{-1}$ ) dentro de cada una de las líneas clónicas consideradas, interesa también comprobar estas líneas entre si en cada situación. Así en las figuras V.13.a y V.13.b, se comparan todos los parámetros considerados para las plantas de los tres clones en el control, es decir sin adición de NaCl. Se observa que el clon L-0-4 B presenta una Fluorescencia basal ( $F_0$ ) superior a los otros dos clones y que no existen diferencias entre estos últimos. Esto significa que el clon L-0-4 B puede emitir mayor cantidad de fluorescencia en los pigmentos antena e indirectamente encontrarse más activa la ruta de disipación de energía por medio de calor. En efecto, aunque no existen diferencias significativas, el clon L-0-4 B presenta un quenching no fotoquímico (NPQ) ligeramente superior a los otros dos (Figuras V.13.b).

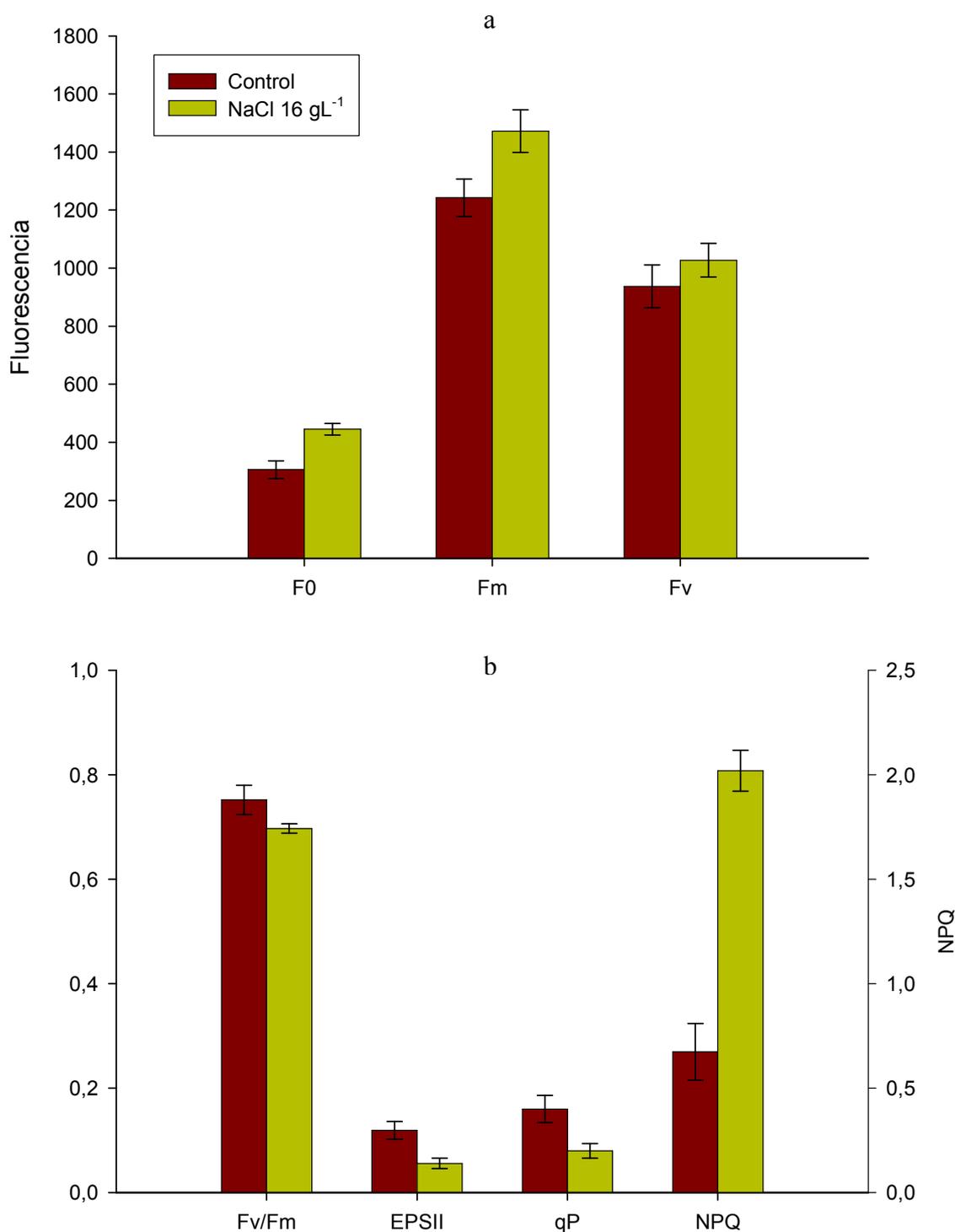


Figura V.12. (a) Niveles de Fluorescencia inicial (F0), Fluorescencia máxima (Fm), y Fluorescencia variable (Fv) y (b) Eficiencia Fotoquímica potencial (Fv/Fm), Eficiencia Fotoquímica del fotosistema II ( $\Phi_{psII}$ ), quenching fotoquímico (qP), y quenching no fotoquímico (NPQ), de las plantas del clon **Raboconejo** de los tratamientos control (sin sal) y 16 gL<sup>-1</sup> de NaCl.

La fluorescencia máxima ( $F_m$ ) es similar en los clones G-8-12 y L-0-4 B e inferior de forma significativa en el clon RC-8-12 (Figura V.13.a). También este último clon presenta una menor fluorescencia variable ( $F_v$ ) que el clon G-8-12 (Figura V.13.a). Los valores más bajos de  $F_m$  y  $F_v$  del clon RC-8-12 pueden indicar un menor número de centros de reacción activos en las condiciones de las plantas control. El clon G-8-12 presenta una  $F_v/F_m$  algo superior a los otros dos, aunque estas diferencias no son importantes ya que los niveles están siempre dentro de valores aceptables por lo que el comportamiento de los tres clones es parecido. Dentro de esa línea, no se observan diferencias significativas entre los clones en el resto de los parámetros considerados (Figura V.13.b).

En la comparación entre los clones se presenta también los resultados obtenidos al tratar las plantas con  $14 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl (Figura V.14.a. y V.14.b.). Al igual que con las plantas testigo, el clon L-0-4 B presenta una  $F_0$  superior a los otros dos que son iguales entre sí. Por el contrario, el clon RC-8-12 presenta valores de  $F_m$  y  $F_v$  (Figura V.14.a) ligeramente inferiores a los de los otros dos clones, que a su vez son estadísticamente iguales entre sí. No obstante los niveles indicados de  $F_m$  y  $F_v$ , el clon G-8-12 presenta una eficiencia fotoquímica ( $F_v/F_m$ ) de 0,82 ligeramente superior a la del clon L-0-4 B (0,71) y a la del clon RC-8-12 (0,75). Es decir, que como se ha comentado antes, el primero tiene mayor número de centros de reacción activos del fotosistema II. En cualquier caso el valor 0,82 del clon G-8-12 se sitúa dentro de los óptimos definidos por (Björkman y Demmig, 1987; Bolhár-Nordenkampf y Öquist, 1993), mientras que el clon L-0-4 B con 0,71 y el RC-8-12 con 0,75 denotan una ligera situación de estrés. En cualquier caso, se repite lo indicado para las plantas control (Figura V.13.b.) lo que aún quita más importancia a las diferencias encontradas en la fluorescencia al tratar las plantas de cada clon con  $14 \text{ gL}^{-1}$  de sal. Es decir, los tres clones tienen una capacidad parecida para convertir la energía lumínica en química o lo que es lo mismo tienen una capacidad fotosintética similar.

Como también ocurrió con las plantas del control, tanto la eficiencia del fotosistema II ( $\Phi_{PSII}$ ) como el quenching fotoquímico (qP) son iguales en las plantas de los tres clones (Figura V.14.b.). Por el contrario, la presencia de NaCl en el medio produce variaciones entre los clones del quenching no fotoquímico (NPQ) con valores de 1,6 para G-8-12, 3,7 para L-0-4 B y 2,05 para RC-8-12, cifras todas estadísticamente distintas entre sí. Llama la atención el valor tan alto alcanzado por las plantas del clon L-0-4 B lo que significa una fuerte desviación de energía a rutas de disipación por calor,

por medio del ciclo de las xantofilas, para cortar posibles daños en su sistema fotosintético.

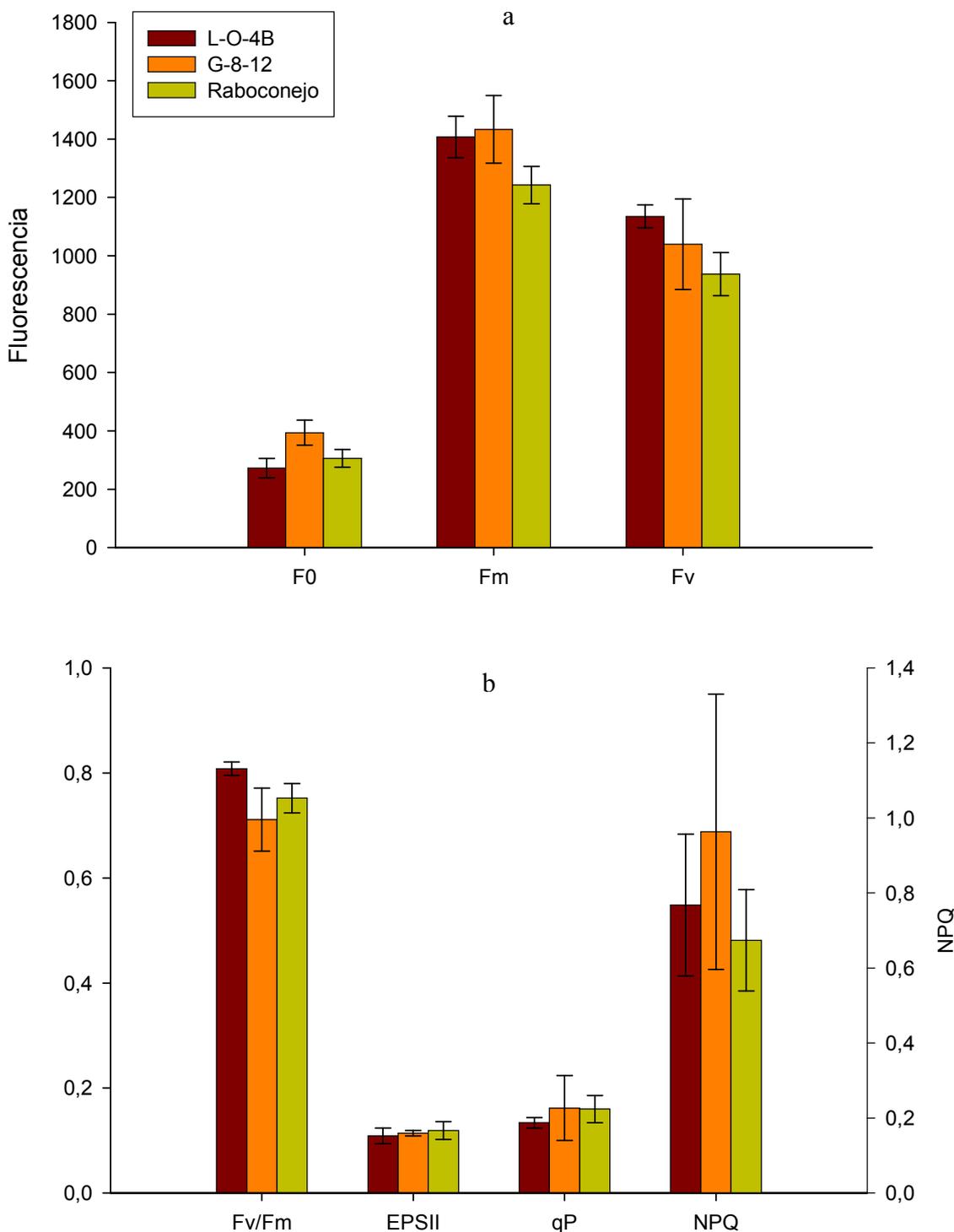


Figura V.13.(a) Niveles de Fluorescencia, Florescencia inicial (Fo), Fluorescencia Máxima (Fm), Fluorescencia variable (Fv), (b) Eficiencia Fotoquímica, Estado fotosistema II, quenching fotoquímico, y quenchig no fotoquímico, de los controles de clones L-0-4B G-8-12 y Raboconejo.

Los resultados debidos a la aplicación al medio de  $16 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl coinciden bastante (Figura V.15.a. y V.15.b.) con los discutidos para la adición de  $14 \text{ gL}^{-1}$ . Así, el clon G-8-12 es el que tiene menor  $F_0$ , mayor  $F_v/F_m$  (aunque todos descienden) y menor NPQ. En este último caso de nuevo destaca el elevado valor alcanzado por las plantas del clon L-0-4 B.

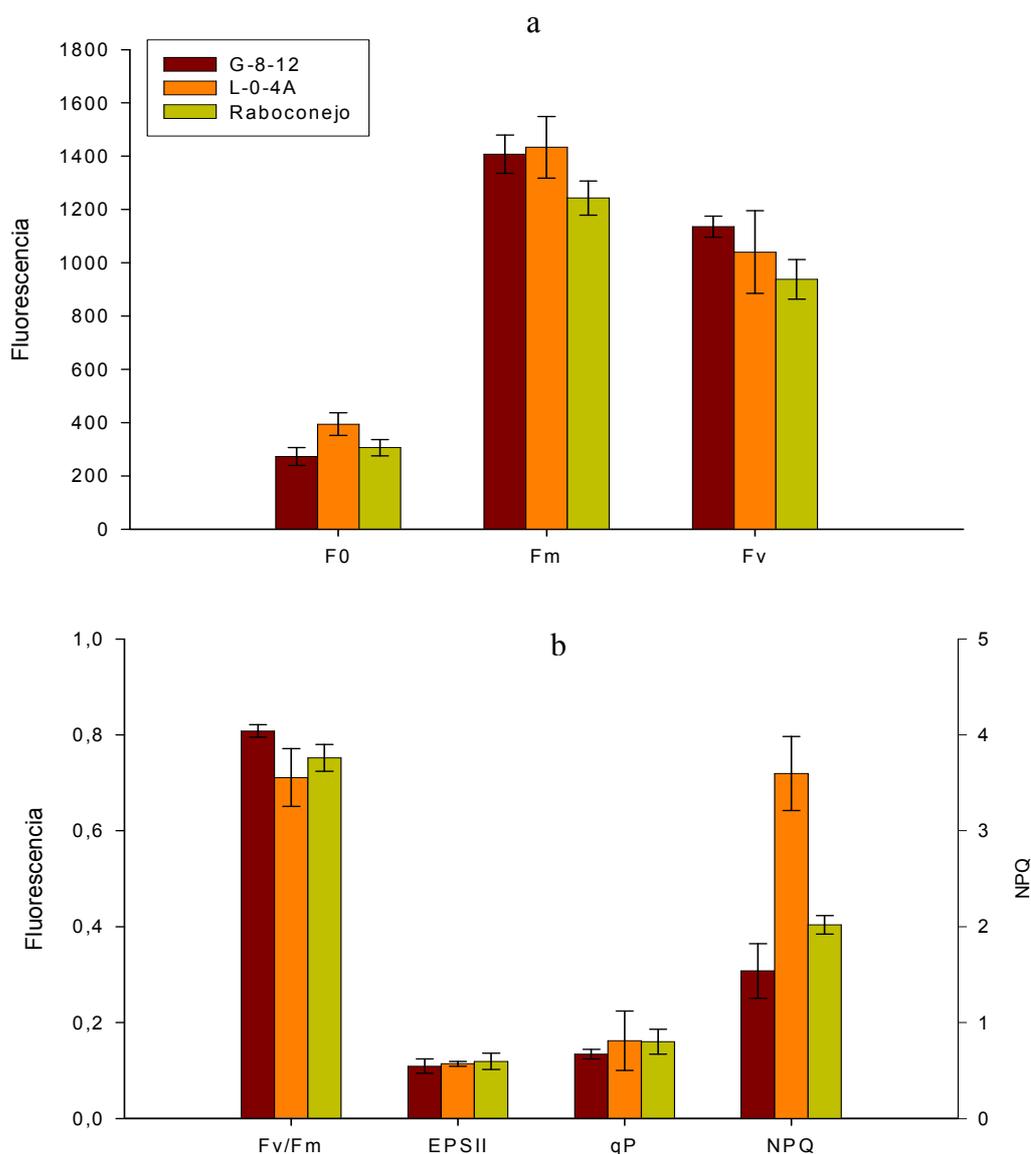


Figura V.14.(a) Niveles de Fluorescencia, Florescencia inicial ( $F_0$ ), Fluorescencia Máxima ( $F_m$ ), Fluorescencia variable ( $F_v$ ) b) Eficiencia Fotoquímica, Estado fotosistema II, quenching fotoquímico, y quenchig no fotoquímico, de los clones Raboconejo, Galego y Lechín de Sevilla. Tratamiento con  $14 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl.

Tratamiento 16 g/L

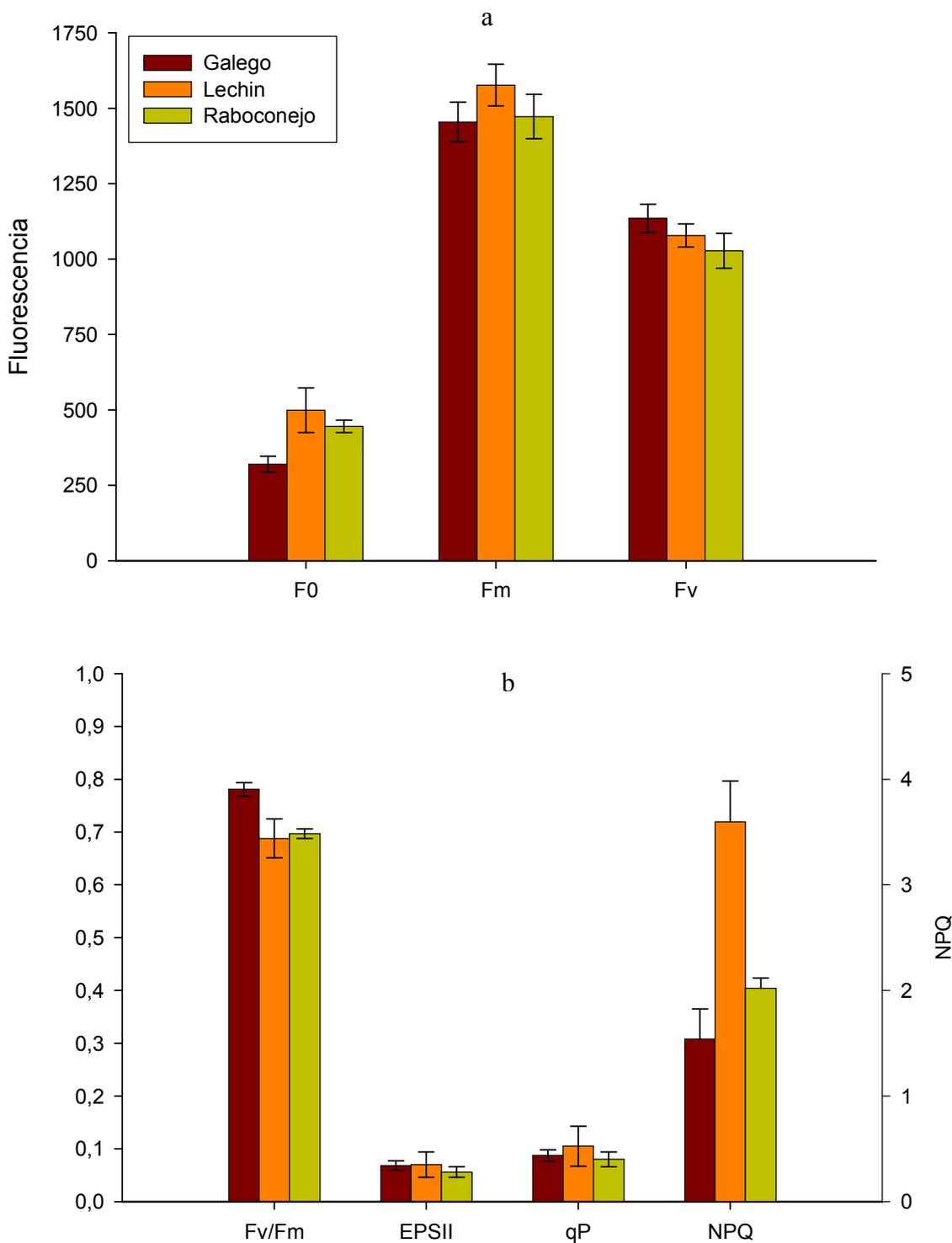


Figura V.15. (a) Niveles de Fluorescencia, Florescencia inicial (F0), Fluorescencia Máxima (Fm), Fluorescencia variable (Fv). (b) Eficiencia Fotoquímica, Estado fotosistema II, quenching fotoquímico, y quenching no fotoquímico, de los clones Raboconejo, Galego y Lechín de Sevilla. Tratamiento con 16 gL<sup>-1</sup> de NaCl.

De los resultados obtenidos se puede deducir que los tres clones considerados se comportan como muy tolerantes a la salinidad NaCl del medio ya que con algunas alteraciones en el sistema fotosintético en especial en el NPQ, pérdidas energéticas en forma de calor, soportan bastante bien aplicaciones tan elevadas como 14 o 16 gL<sup>-1</sup> de NaCl al medio nutritivo. Es decir, que como en capítulos anteriores se comprueba aquí la validez del sistema de selección de las plantas, al menos hasta el nivel de cultivo en condiciones de cámara o de invernadero.

No obstante, llama la atención que dentro del buen comportamiento general, destaque el clon G-8-12, que en el capítulo anterior fue el de menor nivel de tolerancia entre los tres (mayor número de plantas muertas, menor desarrollo de las supervivientes y mayor acúmulo de Na y Cl).

La explicación de este hecho puede relacionarse con la mayor actividad de las plantas de los clones L-0-4 B y RC-8-12 que presentan el mayor crecimiento de las plantas vivas (Figura IV.14) y que eliminan las hojas cargadas de Na y Cl y forman otras nuevas. Esta mayor actividad debe exigir un mayor gasto energético del sistema fotosintético.



## VI. CONCLUSIONES

1.- Los suelos de las zonas de Raboconejo (Marismas del Odiel, Huelva) y Lagolargo (Esteros de San Fernando, Cádiz), presentan altas concentraciones de NaCl. Por el contrario, el de la parcela del Banco Mundial de Germoplasma de Córdoba tiene características de suelo “óptimo” para el cultivo del olivo, con valores similares a los de referencia.

Dentro de las zonas salinas existen plantas de olivo que crecen y producen bien, por lo que se consideran adaptadas a la salinidad. No obstante presentan contenidos en hojas muy elevados de Na y Cl y bajos de K, en especial en verano. En otoño eliminan una gran cantidad de hojas y las reemplazan por nuevas con niveles más bajos de Na y Cl y más altos de K, lo que se considera un mecanismo de adaptación al medio salino. Los olivos del Banco Mundial de Germoplasma de Córdoba tienen valores de nutrientes próximos a los “óptimos” de referencia.

2.- Mediante el cultivo *in vitro* del embrión cigótico maduro se alcanzan germinaciones del 100% en tan solo 10 días tras la siembra y un número también muy elevado de plantas trasplantables a *ex vitro* en 60 días, en todas las proveniencias (variedades) de olivos consideradas. Esto confirma la aptitud del embrión aislado como material de germinación *in vitro* y útil para esta prueba.

3.- Se logra por primera vez la obtención de plantas a partir del cultivo *in vitro* de embriones inmaduros de olivo. La germinación se produce en la fase globular del embrión (aproximadamente 40-45 días después de la floración) sembrado en un medio al que se le incluye el regulador Zeatina. Se determina además que el proceso de maduración del embrión inmaduro *in vitro*, es idéntico al que se produce en condiciones naturales en el desarrollo normal de la semilla.

4.- También por primera vez, con la variedad Manzanilla se logra la obtención de plantas a partir de una poliembriogénesis secundaria (embriogénesis somática) obtenida por el cultivo *in vitro* de trozos de cotiledones de embriones inmaduros.

5.- Mediante el cultivo *in vitro* de embriones maduros procedentes de plantas silvestres y cultivadas en presencia de concentraciones elevadas de NaCl en el medio ( $8 \text{ gL}^{-1}$ ), se observa que algunos de ellos no germinan o lo hacen de forma anormal, mientras que otros germinan bien y producen plantas normales. Este hecho establece un primer criterio para la selección *in vitro* de plantas tolerantes a la sal (NaCl).

6.- Este comportamiento ante la sal del embrión de olivo *in vitro* se produce en todas las proveniencias (variedades de origen) consideradas, lo que definen la variabilidad genética del embrión (fecundación cruzada y/o heterocigosis) de una misma variedad. No obstante como conjuntos, los embriones procedentes de olivos de zonas salinas presentan mayor número de germinaciones y plantas normales que los cultivados en suelo sin NaCl y dentro de estos últimos los procedentes de plantas definidas en la bibliografía como tolerantes son mejores que los que provienen de cultivares no tolerantes a la sal.

7.- En consecuencia, dentro de la variabilidad genética que permite que embriones procedente de una misma planta de olivo tengan comportamientos distintos ante la sal *in vitro*, se observa una fuerte influencia de dicha planta madre, al existir una correlación entre la tolerancia a la sal de la misma y del conjunto de sus embriones.

8.- Mediante sucesivos subcultivos, en presencia de concentraciones crecientes de NaCl, de explantos uninodales obtenidos de las mejores plantas seleccionadas de la germinación de embriones *in vitro* de cada proveniencia ante NaCl, se obtienen líneas clónicas de plantas que crecen hasta en  $12 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl, y que en cada caso se definen como muy tolerantes *in vitro*.

9.- Plantas seleccionadas *in vitro* por su tolerancia a la sal (NaCl) muestran también dicha tolerancia en condiciones de maceta en invernadero, incluso cuando se mantienen meses sin la presencia de NaCl entre los tratamientos *in vitro* y *ex vitro*. Además, se sigue conservando la graduación de tolerancia indicada para *in vitro*, destacando el comportamiento de los clones provenientes de plantas de áreas salinas. Este hecho se considera de gran importancia ya que avala el sistema puesto a punto en este trabajo de cultivos de embriones y plantas *in vitro* en presencia de concentraciones elevadas de NaCl para la selección de olivos tolerantes a la sal.

10.- Se han podido observar distintos mecanismos de defensa de las plantas sometidas a excesos de NaCl en condiciones externas, como la acumulación de Na y Cl primero en raíz y posteriormente en hoja (lo que apoya la teoría de la raíz como primer punto de acumulación de excesos de Na y Cl, impidiendo en primera instancia la entrada libre por el interior de la planta de excesos de estos iones), la aparición de cristales de NaCl alrededor de la escama peltada de la hoja (visto en los clones Jabaluna, Picual y Cornezuelo de Jaén), y el desprendimiento de la hoja cargada de Na y Cl y su reemplazo por nuevos brotes con poco acúmulo de NaCl. Este es el proceso observado especialmente en los clones Lechín de Sevilla y Raboconejo y que reproducen lo que hace la planta madre en el medio salino en la naturaleza.

11.- La presencia de sal (NaCl) en el medio, tanto *in vitro* como *ex vitro* modifica el estado nutritivo de la planta de olivo, en especial por acúmulos de Na y Cl proporcionales en cada caso a la concentración de sal usada, y descensos de K también proporcionales con la concentración de NaCl. Para la misma concentración salina, los aumentos de Na y Cl son superiores *in vitro* que *ex vitro*.

12.- La presencia de NaCl en el medio también altera el proteinograma de la planta, en especial por la mayor intensidad de bandas alrededor de 20 y 40 kD. Así mismo, la presencia de sal también altera la fotosíntesis de la planta en especial por una fuerte elevación del quenching no fotoquímico (NPQ) lo que indica una gran desviación de energía en forma de calor para cortar posible daños en el sistema fotosintético.

13.- Como consecuencia de lo indicado en las conclusiones 11 y 12, cada una de las alteraciones que la presencia de NaCl en el medio produce a nivel nutritivo, molecular o fotosintético se considera como un marcador indicativo del estrés salino que sufre la planta de olivo.

14.- En conjunto, en el presente trabajo se ha puesto a punto un método que combina la selección de plantas madres, el cultivo *in vitro* de embrión cigótico maduro y de explantos uninodales en presencia de altas concentraciones de NaCl, y el cultivo en invernadero de plantas también en presencia de concentraciones elevadas de NaCl, que

ha permitido la obtención de líneas clónicas de plantas de olivo con una tolerancia muy elevada a dicha sal.

## VII. BIBLIOGRAFÍA:

Acebedo, M.M., Lavee, S., Liñán, J. y Troncoso, A. 1997. In vitro germination of embryos for speeding up seedling development in olive breeding programmes. *Scientia Horticulturae*, 69: 207-215.

Adelberg, J.W., Zhang, X.P. and Rhodes, B.B. 1997 Micropropagation of *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai (Watermelon). In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 39 High-Tech and Micropropagation V* (pp 60–76). Springer- Verlag, Berlin Heidelberg.

Ahloowalia, B.S., 1978. Novel ryegrass genotypes regenerated from embryo callus culture. In: *Frontiers of Plant Tissue Culture* (Thorpe T.A. ed.) Abstr. 1733. P 161. Bess. Calgary.

Alhagdow, M.M., Barthakur, N.N., Donnelly, D.J. 1999. Salinity stress and sodium-potassium interactions in micropropagated potatoes. *Potato-res.* v. 42 (1) p. 73-78.

Altpeter, F., Vasil, V., Srivastava, V. and Vasil, I. K. 1996: Integration and expression of the high-molecular-weight glutenin subunit 1Ax1 gene into wheat. - *Nat. Biotechnol.* 14: 1155-1159.

Alsaket, I.A. and Aesheh, I.A. 1987. Effect of Saline Water on the Growth of Young Olive Trees, *Hort.Abstr.* 59(5):497.

Ammirato, P. V., 1983. Embryogenesis. *Handbook of Plant Cell Culture*, vol.1 (3): 82-123.

Arzani, A. and S.S. Mirodjagh, 1999. Response of durum wheat cultivars to immature embryo culture, callus induction and *in vitro* salt stress. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture.*, 58: 67–72

Asen, S. y Larson, R.E. 1951. Artificial culturing of rose embryos. *Prog. Rep. #40, Agri. Exp. Sta. Pennsylvania State Coll.*

Ashraf, M., McNeily, T. and Bradshaw, A.D. 1986. The response of selected salt-tolerant and normal lines of four grass species to NaCl in sand culture. *The New Phytology.* 104: 453-461.

Aslam, M., Huffaker, R.C. and Rain, D.W. 1984. Early effects of salinity on nitrate assimilation in barley seedlings. *Plant Physiol.* 76: 321-335.

Aslam, M., Barret-Lennard, E.G. Greenway, H. 1988: Effects of external concentration of ( $K^+Na^+$ ) and  $K^+/Na^+$  on the growth and ion relations of *Atriplex amnicola*. *J. Plant Physiol.*, 133: 228-234.

Augé, R., G. Beauchesne, J. Boccon-Gibod, L. Decourtye, B. Digat, J. Cl. Morand, H. Vidalie, 1984. *La culture in vitro et ses applications horticoles.* Lavoisier, Paris. 152 p.

Awad, A.S., Edwards, D.G. and Campbell L.C. 1990. Phosphorus enhancement of salt tolerance of tomato. *Crop Sci.* 30: 123-128.

Ayers, R.S. y Wescot, D.W. 1984. *Calidad del agua para la agricultura.* F.A.O. Riego y Drenaje 29. Roma.

Azcón-Bieto, J.M. y Talón 1993. *Fisiología y Bioquímica Vegetal.* Interamericana-Mc Grow-Hill. New York.

- Babaeva, Zh.A. Butenko, R.G. y Strogonov. B.P. 1968. Influence on salinization of the nutrient medium on the growth of isolated carrot tissue. *Soviet Plant Physiol.*, 15: 75-82.
- Ball, J.T., Woodrow, I.E., Berry, J.A. 1987 A model predicting stomatal conductance and its contribution to the control of photosynthesis under different environmental conditions. In *Progress in Photosynthesis Research*, Vol. IV (Ed. I. Biggins), pp. 221–224. Martinus-Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Barakat, M.N. and Abdel-Latif, T.H. 1996 *In vitro* selection of wheat callus tolerant to high levels of salt and plant regeneration. *Euphytica* 91: 127–140.
- Barbier, M. and Dulieu, H.L. 1980. Genetic changes observed in tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants regenerated from cotyledons by *in vitro* culture. *Ann. Amelior. Plant.* 30: 321-344.
- Barlass, M. and Skene, K.G.M. 1981. Relative NaCl Tolerances of Grapevine Cultivars and Hybrids in vitro. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 102. S. 147-161.
- Barranco, D. Fernández-Escobar, Rallo, L. 1997. El Cultivo del Olivo. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca y Ediciones Mundi-Prensa.
- Bartolini, G., Tattini, M. and Troncoso, A. 1986. Preliminary results of a research on salinity resistance in hydroponically grown young olive plants. *Olea.* 16; 17: 157-160.
- Bartolini, G., Mazuelos, C. and Troncoso, A. 1991. Influence of Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and NaCl salts on survival, growth and mineral composition of young olive plants in inert sand culture. *Adv. Hort. Sci.* 5. 73-76.
- Bartolini, G., Petruccelli, R., Panicucci, M., Toponi, M.A., Di Monte, G.. 1994. Morphological and biochemical evaluation of *Olea europaea*, L cv. Leccino. *Acta Horticulturae*, 356: 78-81.
- Basu, S.,Gangopadhyay, G.,Mukherjee, B.B.,Gupta, S. 1997. Plant regeneration of salt adapted callus of indica rice (var. Basmati 370) in saline conditions. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 50 (3): 153-159.
- Battistini, C. and Rosati, P. 1991 *In vitro* evaluation of somaclonal strawberry (*Fragaria x ananassa* 'Brighton') variants for susceptibility to *Phytophthora cactorum* In: Dale A & Lubby D (eds) *The Strawberry Into the 21st Century* (pp 121–123). Timber Press, Portland.
- Beede, R. H. and Goldhamer, D.A. 1994. Olive irrigation management In *Olive Production Manual*, L. Ferguson, G. S. Sibbett, and G. C. Martin, eds. University of California Publication 3353. pp. 61-68.
- Bejarano Palma, R. 1990. Cartografía de los paisajes litorales del SW ibérico (Sector onubense-gaditano). *Notas de Geografía Física*, 19: 27-44.
- Bejarano Palma, R. 1997. *Vegetación y paisaje en la costa atlántica de Andalucía*. Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Bellini, E., 1993. Variabilidad genética y heredabilidad de algunos caracteres en las plantas de semillas de olivo obtenidas por cruzamiento. *Olivae*, 49: 21-34.
- Benelli, C., Fabri, A., Grassi, S., Lambardi, M., Rugini, E. 2001. Histology of somatic embryogenesis in mature tissues of olive (*Olea europaea*, L). *J. Hortic. Sci. Biotech.* 76: 112-119.

- Ben-Hayyim, G. and Kochba J. 1983. Aspects of salt tolerance in a NaCl selected stable cell line of *Citrus sinensis*. *Plant Physiol.* 72:685-690
- Ben-Hayyim, G., Vaadia, and Williams, B.G. 1989. Proteins associated with salt adaptation in citrus and tomato cells: Involvement of 26 kDa polypeptides. *Physiol. Plat.* 77: 332-340.
- Ben-Hayyim, G. and Goffer, Y. 1989. Plantlet regeneration of NaCl-selected salt tolerant callus culture of Shamouti orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Plant Cell Rep.* 7:680-683.
- Benlloch, M., Arboleda, D., Barranco, D. and Fernández-Escobar, R. 1991. Response of Young Olive Trees to Sodium and Boron Excess in Irrigation Water. *HortScience* 26 (7): 867-870.
- Benlloch, M., Ojeda, M.A., Ramos, J., and Rodriguez-Navarro, A. 1994. Salt sensitivity and low discrimination between potassium and sodium in bean plants. *Plant Soil* 166, 117–123.
- Bernstein, L. 1963. Osmotic adjustment of plant to saline media. II. Dinamyc phase . *American Journal of Botany*, 50: 360-370.
- Bernstein, L. and Hayward, H.E. 1958. Physiology of plant tolerance. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 9: 25-46.
- Bernstein, L. 1964. Salt tolerance of plants. U.S.D.A. Inf. Bull., 283.
- Bernstein, L. 1982 . Salt tolerance of fruit crops. Soil and water conservation research division, Agricultural Research Service.
- Bilger, W. and Björkman, O. 1990. Role of the xanthophylls cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research* 25, 173-185.
- Binh, L.T., Phong D.T., Muoi, L.T. 1993 Enhancing the regeneration ability of rice callus by dehydration treatment. *Proc NCST Vietnam* 5(1), 49-54.
- Binzel, M.L. and Reuveni, M. 1994. Cellular mechanisms of salt tolerance in plant cells. *Hort. Rev.* 16:33-69.
- Blackman, S.A., Wettlaufer, S.H., Obendorf, R.L. and Leopold, A.C. 1991. Maturation Proteins associated with Desiccation Tolerance in Soybean. *Plant Physiol.* 96: 868-874.
- Blum, A. 1988. Plant breeding for stress environments. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 223 p.
- Björkman, O. and Demming, B. 1987. Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plant of diverse origins. *Planta* 170: 489-504.
- Bommineni, V.R., Chibbar, R.N., Datla, R.S.S., Tsang, E.W.T. 1993. Transformation of white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos by microprojectile bombardment. *Plant Cell Reports* 13, 17–23.
- Bongi, G. y Loreto, F. 1989. Gas-exchange properties of salt stressed olive leaves. *Plant Physiology*, 90: 1408-1416.

- Bouharmont, J. 1994 Application of somaclonal variation and *in vitro* selection to plant improvement. *Acta Hort.* 355: 213–218.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anl. Biochem.* 72: 248-254.
- Brar, D.S. and Jain, S.M. 1998 Somaclonal variation: mechanism and applications in crop improvement. In: Jain SM, Brar DS & Ahloowalia BS (eds) *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement* (pp 15–37). Kluwer Academic. Publishers, Dordrecht
- Bressan, R.A., Singh, N.K., Handa, A.K., Kononovicz, A.Y. y Hasegawa, P.M. 1985. Stable and unstable tolerance to NaCl in cultured tobacco cells. IN: *UCLA Symp. Plant Genet.* (Freeling ed.) New York, Alan R. Liss Inc.
- Briantais, J.M., Vernotte, C., Krause, H. and Weis, E. 1986 Chlorophyll *a* fluorescence of higher plants: chloroplasts and leaves. In: Govindjee, Amesz J and Fork DC (eds) *Light Emission by Plants and Bacteria*, pp 539–583. New York: Academic Press
- Bronsema, F.B.F., Oostveen, -W.J.F. van., Lammeren, -A.A.M. van. 1997. Comparative analysis of callus formation and regeneration on cultured immature maize embryos of the inbred lines A188 and A632. *Plant-cell,-tissue-organ-cult.* v. 50 (1) p. 57-65.
- Burgos, L. and Ledbetter, C.A. 1993. Improved efficiency in apricot breeding. Effect of embryo development and nutrient media on *in vitro* germination and seedling establishment. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* Vol. 35, nº 3 217-222.
- Burns, A.J., Wetzstein, H.Y. 1998. Embryogenic cultures of the leguminous tree *Albizia julibrissin* and recovery of plants. *Plant-cell,-tissue-organ-cult.* v. 54 (1) p. 55-59.
- Cabrera-Ponce, J.S., A. Vegas-García, and L. Herrera-Estrella. 1996. Regeneration of transgenic papaya plants via somatic embryogenesis induced by *Agrobacterium rhizogenes*. *InVitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 32: 86-90
- Cano, V.M.A. 1991. Evaluación y caracterización *in vitro* e *in vivo*, de la tolerancia a la salinidad de *Lycopersicon* spp. *Tesis Doctoral.* Universidad de Murcia, pp.267.
- Cano, E.A., Pérez-Alfocea, F., Moreno, V. y Bolarín, M.C. 1996. Responses to NaCl stress of cultivated and wild tomato species and their hybrids in callus cultures. *Plant Cell Reports* 15, 791-794.
- Cano, E.A., Perez-Alfocea, F., Moreno, V., Caro, M. y Bolarin, M.C. 1998 Evaluation of salt tolerance in cultivated and wild tomato species through *in vitro* shoot apex culture. *Plant-cell,-tissue-organ-cult.* v. 53, 1: 19-26.
- Cantos, M., Liñán, J., Pérez-Camacho, F., Troncoso, A. 1993. Obtención de plantas selectas de vid, variedad Zalema, libres de virosis de entrenudo corto. *Actas de Horticultura* 1: 705-709.
- Cantos, M., Troncoso, J., Liñán, J., Rapoport, H., y Troncoso, A. 2000. Obtaining salt (NaCl) tolerant olive plants: i) some physiological and anatomical characteristics of olive plants growing in harsh saline zones. *Acta Hort.* (Proceedings of the "4th International Symposium on Olive Growing – OLIVE 2000". Bari, Italy, 25-30 September).
- Cantos, M., Cuervas, J., Zárate, R and Troncoso, A. 1998. Embryo rescue and development of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* and *macrocarpa*. *Seed Science and Technology*, 26, 193-198.

- Carretero, C.L., Cantos, M., de Castro, A., Mazuelos, C., Liñán, J. y Troncoso, A. 1998 Influencia de la salinidad sobre la composición mineral de plantas jóvenes del clon IRNAS-1 de mandioca. (Manihot esculenta, Crantz). VII Simposio Nacional- III Ibérico de la Nutrición Mineral de las Plantas. Madrid 23-25 Septiembre. pgs: 441-446.
- Carretero, C.L., Cantos, M., Liñán, J. y Troncoso, A. 2005. Comparación in vitro-ex vitro de la tolerancia a la sal (NaCl) de plantas de mandioca (Manihot esculenta, Crantz). VI Reunión Nacional de la Sociedad Española de Cultivo in vitro de Tejidos Vegetales. Córdoba 12-13 Septiembre.
- Carvajal, M., Cerdá, A., Martínez, V. 2000. Modification of the response of saline stressed tomato plants by the correction of cation disorders. Plant-growth-regul. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers. Jan 2000. v. 30 (1) p. 37-47.
- Castillo, J.M., Fenández-Baco, L., Castellanos, E.M., Luque, C.J. Figueroa, M.E. and Davy, J. 2000. Lower limits of *Spartina densiflora* y *S. maritima* in a Mediterranean salt marsh determined by different ecophysiological tolerances. Journal of Ecology. 88, 801-812.
- Castillo, J.M., Rubio Casal, A.E., Luque, C.J., Luque, T. and Figueroa, M.E. 2002. Comparative field summer stress of three tree species co-occurring in Mediterranean coastal dunes.
- Champagnol, F. 1979. Relationships between phosphate nutrition of plants and salt toxicity Phosphorous. *Agri.* 76: 35-43.
- Chandler, S.F., Vasil, I.K. 1984. Selection and characterization of NaCl tolerant cells from embryogenic cultures of *Pennisetum-purpureum* schum (napier grass)." Plant Science Letters 37 157-164.
- Chapman, V. J. 1974. Salt marshes and salt deserts of the world. 2nd supplemented reprint edition. J. Cramer, Lehre (Ger.) 102, XVI, 392 pp.
- Chapman H.D. and Pratt P.F. 1961. Methods of analysis for soil, plants and water- Acta Horticulturae, 133, Chapter 8, 97-100, Univ. Calif.
- Chartzoulakis, K., M. Loupassaki, M. Bertaki and I. Androulakis. 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.
- Chee, P.P. 1994. In vitro culture of zygotic embryos of Taxus species. Hortscience Vol. 29, (6) 695-697.
- Chen, C.C., Dixon, J.B. and Turner, F.T. 1980. Iron coatings on rice roots: mineralogy and quantity influencing factors. *Soil Sci. Am. J.*, 44: 635-639.
- Chen, H., An, R., Tang, J.H., Cui, X.H., Hao, F.S., Chen, J. Wang, X.C. 2007. Over-expression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene improves salt tolerance in an upland rice. Molecular Breeding 19 (3): 215-225
- Ciferri, A. 1942. Recenti progressi degli studi botanico-agrari sull'olivo. atti convegno di studi olivicoli, Reale Accademia dei Georgofili, Firenze, 49-98.
- Ciferri, A. 1950. Eléments pour l'étude de l'origine et de l'évolution de l'Olivier cultivé. Acte XII du Congrès international d'oléiculture 1:189-194.

- Clavero-Ramírez, I., Pliego Alfaro, F. 1988. Germinación in vitro de embriones maduros de olivo (*Olea europaea*). III Congreso Nacional de la S.E.C.H. Puerto de la Cruz (Tenerife). Octubre 1988.
- Cornic, G. 2000 Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture - not by affecting ATP synthesis. *Trends Plant Sci.* 5, 187-188.
- Corredoira, E., Valladares, S., Vieitez, A.M. 2006. Origin and Development of Embryogenic Cultures from Leaves of Mature *Quercus robur*. *In Vitro Cell. Develop. Biol.-Plant.* 42 (6) 525-533.
- Cram, W.J. 1973. Internal factors regulating nitrate and chloride influx in plants cells. *J. Exp. Bot.*, 24: 328-341.
- Cram, W.J. 1983. Chloride accumulation as a homeostatic system: Set points and perturbations. *Journal of Experimental Botany*, 34: 1484-1502.
- Cramer, G.R., Lynch J., Läuchli, A. and Epstein, E. 1987. Influx of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  into roots of salt-stressed cotton seedlings. Effects of supplemental Ca. *Plant Physiol.* 83: 510-516.
- Cresti, M., Ciampolini, F., Tattini, M. and Cimato, A. 1994. Effect of salinity on productivity and oil quality of olive (*Olea europaea* L.) plants, *Adv. Hortic. Sci.* 8 (1994), pp. 211–214.
- Crisosto, C., and Sutter, G.E. 1985. Role of the endocarp in "Manzanillo" olive seed germination. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110(1), 50-52.
- Cronquist, A. 1981 *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. Columbia University Press., New York. 1262 pp.
- Davey, M.R., Anthony, P., Brian-Power, J. and Lowe, C. 2005. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances.* 23, 131-171.
- De Fossard, R.A. 1976. Tissue culture for plant propagators. University of New England, Armidale. Australia.
- Debergh, D.C., Maene, N. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Sci. Hort.* 14:335-345.
- Deng, Z.N., Gentile, A., Domina, F., Nicolosi, E. and Tribulato, E. 1995 Selecting lemon protoplasts for insensitivity to *Phoma tracheiphila* toxin and regenerating tolerant plants *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 120: 902–905.
- Deane-Drummond, C.E. and Glass, A.D.M. 1982. Studies of nitrate influx into barley roots by use of  $^{36}\text{ClO}_3$  as a tracer of nitrate. I. Interactions with chloride and other ions. *Can. J. Bot.* 60: 2147-2153.
- Delfine, S., Alvino, A., Villani, M.C. and Loreto F. 1999 Restrictions to  $\text{CO}_2$  conductance and photosynthesis in spinach leaves recovering from salt stress. *Plant Physiology* 119, 1101–1106.
- Delfine, S., Alvino, A., Zacchini, M. and Loreto F. 1998 Consequences of salt stress on conductance to  $\text{CO}_2$  diffusion, Rubisco characteristics and anatomy of spinach leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* 25, 395–402.
- Denchev, P.D., Atanassov, A.I. 1995. Micropropagation through somatic embryos. *Biotechnology in agriculture and forestry* ; 30-31. Somatic embryogenesis and synthetic seed / 30:193-206.

- Dix, P.J. and Street, H.E. 1975. Sodium chloride-resistant cultured cell lines from *Nicotiana sylvestris* spec. and comes and *Capsicum anuum*, L. *Plant Sci. Lett*, 5:231-237.
- Dix, P.J. 1993 The role of mutant cell lines in studies on environmental stress tolerance: an assessment. *Plant J.* 3: 309–313
- Dorion, N., Wies,-N., Burteaux,-A., Bigot,-C. 1999. Protoplast and leaf explant culture of *Lycopersicon cheesmanii* and salt tolerance of protoplast-derived calli. *Plant-cell,-tissue-organ-cult.* 56 (1): 9-16.
- Downton, W.J.S., Millhouse, J., 1985: Chlorophyll fluorescence and water relations of salt-stressed plants. *Plant Science Letters*, 37: 205-212.
- Dracup, M. 1993 In: Randall PJ *et al.* (eds), Genetic aspects of plant mineral nutrition, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp 137–142.
- Dudal, R. and Purnell, M.F. 1986. Land resources: salt affected soils. *Reclamation and Revegetation Research.* 5: 1-9.
- Duncan, R.R. 1997 Tissue culture-induced variation and crop improvement. *Adv. Agron.* 58: 201–240.
- Eaton, F.M. 1941. Water uptake and root growth as influence by inequalities in the concentration of the substrate. *Plant physiol.*, 16: 545-564.
- Edallo, S., Zuccinalli, C., Perenzin, M. and Salamini, F. 1981. Chromosomal variation and frequency of spontaneous mutation associated with in vitro culture and plant regeneration in maize. *Maydica* 26: 39-56.
- El-Agaimy, M.A., Neff, W.E., El-Sayed, M. y Awatif, I.I., 1994. Effect of saline irrigation on olive oil composition. *JAOCS*, Vol 71, nº 11.
- El-Sayed Emtithal, H., El-Said, M.E., El-Sherif, A.H. y Sari El-Deen S.A. 1996. Estudios químicos sobre la tolerancia a la salinidad de algunos cultivares. *Olivae*, 64: 52-57.
- Engler, A. 1964. Ebenaceae. In: A. Engler. *Syllabus Der Pflanzenfamilien*. Gebrüder Borntraeger, Berlin. p. 399-400.
- Epstein, E. and Rains D.W. 1987. Advances in salt tolerance. *Plant and Soil*, 99: 17-29.
- Epstein, E., Norlyn, J. D., Rush, D.W., Kingsbury, R. W., Kelly, D.B., Cunningham, G.A. and Wrona, A.F. 1980. Saline culture of crops: a genetic approach. *Science* 210: 399-404.
- Evans, D.A. and Flick, C.E. 1983. Protoplast fusion: Agricultural applications of somatic hybrid plants. IN: Genetic Engineering of Plants. An agricultural Perspective (Kosuge, Meredit y Hollaender ed.) New York, Plenum Press, 2:271-288.
- Evans, J.R., von Caemmerer, S., Setchell, B.A. and Hudson, G.S. 1994 The relationship between CO<sub>2</sub> transfer conductance and leaf anatomy in transgenic tobacco with a reduced content of Rubisco. *Australian Journal of Plant Physiology* 21, 475–495.
- Feigin, A., Rylski, I. Meiri, A. and Shalhevet, J. 1987. Response of melon and tomato plants to chloride-nitrate ratios in saline nutrient solutions. *J. Plant Nutr*, 10: 1787-1794.

- Ferguson, L., Poss, J.A., Grattan, S.R., Grieve, C.M., Wang, D., Wilson, C., Donovan, T.J., Chao, C.T. 2002. Pistachio rootstocks influence scion growth and ion relations under salinity and boron stress. *J-Am-Soc-Hortic-Sci.* v. 127 (2): 194-199.
- Figuerola, M.E., Fenández-Baco, L., Luque, T. and Davy A.J. 1997. Chlorophyll fluorescence, stress and survival in populations of Mediterranean grassland species. *J. Veget. Sci.* 8: 881-888.
- Fixen, P. E., R. H. Gelderman, and J. L. Denning. 1988 Chloride Test. In Recommended Chemical soil test procedure for the North Central region. North Dakota Agricultural experiment Station. North Dakota State University. Bull No. 499:26-28.
- Flexas, J., Bota, J., Escalona, J.M., Sampol, B. and Medrano H. 2002 Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations. *Functional Plant Biology* 29, 461–471.
- Flora, L.L. and Madore, M.A. 1993. Stachyosa and mannitol transport in olive (*Olea europaea*, L.). *Planta* 189: 484-490.
- Flowers, T.J. 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Ann. Rev. Plant physiol.*, 28: 89-121.
- Flowers, T.J. and Yeo, A.R. 1989. Effects of salinity on plant growth and crop yields. In *Environmental Stress in plant.* (J.H. Cherry, ed.) pp. 101-119. Springer-Verlag, Berlín. ISBN 3-540-18559-3.
- Foolad, M.R. 2004 Recent advances in genetics of salt tolerance in tomato. *Plant cell, tissue and organ culture.* v. 76 (2): 101-119.
- Frechilla, S., Lasa, B., Ibarretxe, L., Lamsfus, C., Aparicio-Tejo, P. 2001. Pea responses to saline stress is affected by the source of nitrogen nutrition (ammonium or nitrate). *Plant-growth-regul.* 35 (2): 171-179.
- Gale, H., Kohl, H.C. and Hagan, R.H. 1967. Changes in the water balance and photosynthesis of onion bean and cotton plants under saline conditions. *Physiologia plantarum* 20: 408-420.
- García, J.L., Avidan, N., Troncoso, A., Sarmiento, R. and Lavee, S. 2000. Possible juvenile-related proteins in olive tree tissues. *Sci. Hort.*, 85:271-284.
- García, J.L., Troncoso, J., Sarmiento, R. and Troncoso, A. 2002. Influence of carbon source and concentration on the in vitro development of olive (*Olea europea* L.) zygotic embryos and explants raised from them. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 95-100.
- García, J.L., Sarmiento, R. and Troncoso, A. 2002. Some biochemical differences between juvenile and young olive plant material. *Acta Hort.*, 586:537-540.
- Gentile, A. Tribulato, E. Deng, Z.N. and Vardi, A. 1993 Nucellar callus of 'Femminello' lemon, selected for tolerance to *Phoma tracheiphila* toxin, shows enhanced release of chitinase and glucanase into the culture medium. *Theor. Appl. Genet.* 86: 527–532
- Genty, B., Briantais, J.M. and Baker, N.R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta* 990: 87–92
- Gerard, C.J. 1971. Influence of osmotic potential, temperature, and calcium on growth of plant roots. *Agron. J.* 63: 555-558.

- Glass, A.D.M. and Siddiqi M.Y. 1985. Nitrate inhibition of chloride influx in barley: implication for proposed chloride homeostat. *J. Exp. Bot.*, 36: 556-566.
- Glenn, E., Pfister, R., Brown, J.J., Thompson, T.L., O'Leary, J. 1996. Na and K accumulation and salt tolerance of *Atriplex canescens* (Chenopodiaceae) genotypes. *Am-j-bot.* Columbus, Ohio : Botanical Society of America Inc. Aug 1996. v. 83 (8): 997-1005.
- Godoy, J.A., Luna, R., Torres-Schumann, S., Moreno, J., Rodrigo, R.M. and Pintor-Toro, J.A. 1994. Expression, tissue distribution and subcellular localization of dehydrin TAS14 in salt-stressed tomato plants. *Plant Mol. Biol.*, 26:1921-1934.
- Godoy, J.A., Pardo, J.M. and Pintor-Toro, J.A. 1990. A tomato cDNA inducible by salt stress and abscisic acid: nucleotide sequence and expression pattern. *Plant Mol. Biol.*, 15:695-705.
- González, F. y Troncoso, A. 1972. Caracteres físicos y químicos de los suelos ocupados por el olivar en la provincia de Sevilla. I) Características del suelo óptimo. *Anales de Edafología y Agrobiología*. Tomo XXXI. 5-6. 387-394.
- Gopi, C. and Ponmurugan, P. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf callus of *Ocimum basilicum* L. *Journal of Biotechnology* 126 (2006) 260–264.
- Gorham, J., Forster B P, Budrewicz E, Wyn Jones R, Miller T E and Law C N 1986. Salt tolerance in then Triticeae: solute acumulation and distribution. An amphidiploid derived from *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring and *Thinopyrum bessarabicum*. *Journal of Experimental Botany*, 37: 1435-1449.
- Grattan, S.R and Grieve, C.M. 1992. Mineral element acquisition and growth response of plants grown in saline environments. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 38 : 275-300.
- Greenway, H. and Munns, R. 1980. Mechanisms of salt tolerance in non halophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 31: 149-190.
- Grieve, C.M. y Mass, E.V. 1988. Diferential effects of sodio on sorghum genotypes. *Crop Sci*, 28: 659-665.
- Gucci, R. and Tattini, M. 1997. Salinity tolerance in olive. *Horticultural Reviews*, 21: 178-214.
- Gucci, R., Lombardini, L., Tattini, M. 1997. Analysis of leaf water relations in leaves to two olive (*Olea europaea*) cultivars differing in tolerance to salinity. *Tree-physiol.* Victoria [B.C.] Canada : Heron Pub.,. Jan 1997. v. 17 (1) p. 13-21.
- Gulati, A. and Jaiwal, P.K. 1997. The potential of plant tissue culture and related techniques for the improvement of salt tolerance in higher plants. *Strategies for improving salt tolerance in higher plants /*. Enfield, N.H. : Science Pub., :321-363.
- Hafizur-Rahman, M., Krishnaraj, S. and Thorpe T.A. 1995. Selection for salt tolerance in vitro using microspore-derived embryos of *Brassica napus* cv. topas, and the characterization of putative tolerant plants. *In-vitro-cell-dev-biol,-Plant*, v 31, 2: 116-121.
- Hamilton, TW., Ellis, J. and Florence, T.M. 1980. Determination of Arsenic and Antimony in Electrolytic Cooper by Anodic Stripping Voltammetry at a Gold Film Electrode. *Anal. Chim. Acta*. 119-225.

- Hammerschlag, F.A., Ritchie, D., Werner, D., Hashmi, G., Krusberg, L., Meyer, R. and Huettel, R. 1995 *In vitro* selection of disease resistance in fruit trees. *Acta Hort.* 392: 19–26.
- Hammerschlag, F.A. 1988. Selection of peach cells for insensitivity to culture filtrates of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* and regeneration of resistant plants. *Theor. Appl. Genet.* 76: 865–869.
- Hammerschlag, F.A. 1990 Resistant responses of plants regenerated from peach callus to *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 115: 1034–1037
- Harley, P.C., Loreto, F., Di Marco, G. and Sharkey, T.D. 1992 Theoretical considerations when estimating the mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> flux by analysis of the response of photosynthesis to CO<sub>2</sub>. *Plant Physiology* 98, 1429–1436.
- Hashmi, G., Hammerschlag, F.A., Huettel, R.N. and Krusberg, L.R. 1995 Growth, development and response of peach somaclones to the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 120: 932–937
- Heinz, D.J., Krishnamurti, M., Nickell, L.G. and Maretzki, A. 1977. Cell tissue and organ culture in sugar-cane improvement. In: *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. (Eds. Reinert J. and Bajaj Y.P.S.), Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp: 3-17.
- Heimler, D., Tattini, M., Ticci, S., Ckoradechi, M.A., and Traversi M.L. 1995. Growth, ion accumulation, and lipid composition of two olive genotypes under salinity. *Journal of Plant Nutrition*, 18(8): 1723-1734.
- Henny, R.J. 1980. Gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) induces flowering in *Dieffenbachia maculata* 'Perfection'. *HortScience* 15(5):613.
- Hernández, I., Celestino, C., Toribio, M. 2003. Vegetative propagation of *Quercus suber* L. by somatic embryogenesis. I. Factors affecting the induction in leaves from mature cork oak trees. *Plant-cell-rep.* 21 (8): 759-764.
- Hoagland, D.R. and Arnon, D.I. 1950. *The Water Culture Method for Growing Plants Without Soil*. Circular 347, College of Agriculture, University of California, Berkeley.
- Hogberg, K.A., Ekberg, I., Norell, L., Arnold, S. von. 1998. Integration of somatic embryogenesis in a tree breeding programme: a case study with *Picea abies*. *Can-j-for-res.* v. 28 (10):1536-1545.
- Hu, C.Y. 1975. *In vitro* culture of rudimentary embryos of eleven *Ilex* species. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 100, 221-225.
- Irshad, M., Honna, T., Eneji, A.E., Yamamoto, S. 2002 Wheat response to nitrogen source under saline conditions. 2002. *J-plant-nutr.* 25. (12) 2603-2612.
- Jackson, M.L. 1962. *Soil chemical analysis*, Constable and Co. Ltd. London. 498 pp.
- Jain, M. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118: 153–166.
- Jekkel, Z., Gyulai, G., Kiss, E., Heszky, L.E. 1998. Cryopreservation of horse-chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) somatic embryos using three different freezing methods. *Plant-cell, tissue and organ. cult.* 52 (3): 193-197.

- Jeschke, W.D. 1984.  $K^+$ - $Na^+$  exchange at cellular membranes, intracellular compartmentation of cations, and salt tolerance. En: *Salinity tolerance in plants. Strategies for crops improvements* (Eds. R.C. Staples y G.H. Toenniessen). Wiley interscience. Nueva York. Pags. 37-66.
- Jones, H.G. 1973 Limiting factors in photosynthesis. *New Phytol.* 72, 1095-1106.
- Jones, R.A. 1987. Genetic advances in salt tolerance. IN: *Tomato biotechnology*. Alan R. Liss, Inc., pp 125-137.
- Juárez, J., Navarro, L. et Guardiola, J.L. 1976. Obtention de plants nucellaires de divers cultivars de clémentiniers au moyen de la culture de nucelle "in vitro". *Fruits*, vol. 31, n° 12. 751-761.
- Junta de Extremadura, 1992. Interpretación de análisis de suelo, foliar y agua de riego. Consejo de abonado (Normas básicas). Junta de Extremadura. Ed. Mundi- Prensa. Madrid, 1992.
- Kafkafi, U. 1984. Plant nutrition under saline conditions. En: *Soil salinity under irrigation* (Ed. I. Shainberg y J. Shalhevet) Springer-Verlag. Berlín. Pags. 319-331.
- Kafkafi, U., Valoras, N. and Letey, J. 1982. Chloride interaction with nitrate and phosphate nutrition in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) *J. Plant Nutr.*, 5: 1369-1385.
- Karp, A. 1995 Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica* 85: 295-302.
- Kautsky, H., Appel, W. and Amann, H. 1960. Chlorophyllfluorescenz und kohlenassimilation. *Biochemische Zeitschrift* 322, 277-292.
- Kent, L. M. and Läuchli, A. 1985. Germination and seedling growth of cotton. Salinity-calcium interactions. *Plant, Cell Environ*, 8: 155-159.
- Keren, R., Gast, R.G. and Bar-Yosef, B. 1983. pH-dependent boron adsorption by montmorillonite hydroxy-aluminum complexes. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 47:1116-1121.
- Kim, S.W., Park, M.K., Liu, J.R. 1996. High frequency plant regeneration via somatic embryogenesis in cell suspension cultures of coriander (*Coriandrum sativum* L.). *Plant-cell-rep.* 15 (10): 751-753.
- Klein, Y. Ben-Tal, Lavee, S., De Malach, J. and David, I. 1994. Saline irrigation of cv Manzanillo and Uomo di Piccione trees, *Acta Hort.* 356:176-218.
- Klobus, G., Ward, M.R. and Huffaker, R.C. 1988. Characteristic of injury and recovery of net  $NO_3^-$  transport of barley seedlings from treatments of NaCl. *Plant Physiol.* 87: 878-882.
- Kosturkova, G., Mehandjiev, A. Dobрева, I. and Tzvetkova, V. 1997. Regeneration systems from immature embryos of Bulgarian pea genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 48:139-142.
- Kramer, D. 1984. Cytological aspects of salt tolerance in higher plants. En: *Salinity tolerance in plants. Strategies for crops improvement* (eds. R.C. staples y G.H. Toenniessen). Wiley interscience. Nueva York. Pags. 3-15.
- Krause, G.H. and Weis, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* 42, 313-249.
- Krivosheeva, A., Tao, D.L. Ottander, C., Wingsle, G., Dube, S.L. and Öquist, G. 1996. Cold acclimation and photoinhibition of photosynthesis in Scots pine. *Planta* 200: 296-305.

- Kohmura, H., Chokyu, S. and Harada, T. 1996. Application of a new micropropagation system involving induction of bud clusters and somatic embryogenesis in asparagus. *Acta-hortic.* Vol. 415: 119-127.
- Kuksova, V.B., Piven, N.M. and Gleba, Y.Y. 1997. Somaclonal variation and in vitro induced mutagenesis in grapevine. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 49:17-27.
- Kuo, Y.J., Smith, M.A.L. and Spomer, L.A. 1994. Merging callus level and whole plant micro-culture to select salt-tolerant 'Seaside' creeping bentgrass. *J-plant-nutr*, 17,(4): 549-560.
- Kura-Hotta, M., Mimura, M., Tsujimura, T., Nemoto-Washitani, S. and Mimura, T. 2001 High salt treatment-induced Na<sup>+</sup> extrusion and low salt treatment-induced Na<sup>+</sup> accumulation in suspension-cultured cells of the mangrove plant, *Bruguiera sexangula*. *Plant Cell Environ* 24:1105–1112.
- Labus-Schneider, F.O. and Abel, W.O. 1991. Regeneration of Tillandsia through immature embryo culture. *Acta Hort. (ISHS)* 289:121-122.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- Lagarda, A., Martín, G.C. and Polito, V.S. 1983. Anatomical and morphological development of "Manzanillo" olive seed in relation to germination. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 108:741-743.
- Lalatta, F. 1959. Horticultural seeds: ripening of seeds of tree fruit species. *Sementi Elette* 5(1): 65-66.
- Lambardi, M., Rinaldi, L.M.R., Memabeni, D., Cimato, A. 1994. Ethylene effect on *in vitro* olive seed germination (*Olea europaea L.*). *Acta Horticulturae* 356, 54-57.
- Lammerts, W.E. 1942. Embryos culture an effective technique for shortening the breeding cycle of deciduous trees and increasing germination of hybrids seeds. In: *Handbook of Plant Cell Culture Vol. 4. Techniques and Applications*. Ed. Evans, Sharp and Ammirato. 1986. Macmillan Publishing Company. New York.
- Larkin, P.J. and Scowcroft, W.R. 1981. Somaclonal variation a novel new source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet*, 60: 197-214.
- Läuchli, A. and Epstein, E. 1984. Mechanisms of salt tolerance in plants. *California Agriculture*, 36: 18-20.
- Lavee, S. 1994. ¿Porqué la necesidad de nuevas variedades de olivo?. *Olivicultura*. Fundación La Caixa. Barcelona. 29-38.
- Lawlor, D.W. 1995 The effects of water deficit on photosynthesis. In *Environmental and Plant Metabolism: Flexibility and Acclimation* (ed. N. Smirnoff), pp. 129–160. BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK.
- Le Houérou, H.N. 1986. Hot Deserts and arid shrublands, B. In (eds.) Evenari, M., Noy-Meir, I. and Goodall, D.W. *Ecosystems of the World 12B.*, Elsevier, Amsterdam.
- Leidi, E.O. and Lips, S.H. 1990. Effect of NaCl salinity on photosynthesis, <sup>14</sup>C-translocation, and yield in wheat plants irrigated with ammonium or nitrate solutions *Irrigation Science*. 11.(3): 155-161.

- Lebrun, L., Rajasekaran, K. and Mullins, M.G. 1985. Selection in Vitro for NaCl-tolerance in *Vitis rupestris* Scheele. *Annals of Botany*. 56, 733-739.
- Leva, A.R. Petruccelli, R. and Bartolini, G. 1994. Influence of sucrose and mannitol on the growth and shoot multiplication of olive tree (*Olea europaea*, L.). Abstract VIIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Firenze, June 12-17 pp. 77.
- Leva, A.R., Muleo, R. and Petruccelli, R. 1995. Long-term somatic embryogenesis from immature olive cotyledons. *J. Hort. Sci.*, 70:417-421.
- Lewis, O.A., Leidi, E.O. and Lips, S.H. 1989. Effect of nitrogen source on growth response to salinity stress in maize and wheat. *New Phytol.* 111, 155-160.
- Li, X.Y., Huang, F.H., Gbur, E.E. Jr. 1998. Effect of basal medium, growth regulators and Phytigel concentration on initiation of embryogenic cultures from immature zygotic embryos of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Plant-cell-rep.* v. 17 (4) p. 298-301.
- Lin, W.C., Cheng, M.L., Wu, J.W., Yang, N.S. and Cheng, C.P. 2005. A glycine-rich protein gene family predominantly expressed in tomato roots, but not in leaves and ripe fruit. *Plant-science*. 168(2): 283-295.
- Liñán, J., Troncoso, A. and Rapoport, H.F. 1999. Olive embryo development stage and the possibility of obtaining viable seedlings. *Acta Horticulturae*. 474-1: 75-78.
- Liu, M.C. 1981. *In vitro* methods applied to sugarcane improvement. In: Plant tissue culture methods and applications in agriculture. T.A. Thorpe, Ed. N. Y. Academic Press. pp. 299-323.
- Long, S.P., Humphries, S. and Falkowski, P.G. 1994. Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 633-662.
- Longstreth, D.J. and Nobel, P.S. 1979. Salinity effects on leaf anatomy. *Plant Physiol.* 63, 700-703.
- Loreto, F. and Bongi, G. 1987 Control of photosynthesis under salt stress in the olive. In: F. Prodi, F. Rossi and G. Cristoferi, Editors, *International Conference on Agrometeorology* Fondazione Cesena Agricoltura, Cesena
- Loreto, F., Centritto, M. and Chantzoulakis, K., 2003. Photosynthetic limitations in olive cultivars with different sensitivity to salt stress. *Plant Cell Environ.* 26, 595–601.
- Loreto, F., Harley, P.C., Di Marco, G. and Sharkey, T.D. 1992 Estimation of mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> flux by three different methods. *Plant Physiology* 98, 1437–1443.
- Loupassaki, M.H., Chantzoulakis, K.S., Digalaki, N.B. and Androulakis, I.I. 2002. Effects of salt stress on concentration of nitrogen, phosphorus, potassium, calcium, magnesium, and sodium in leaves, shoots, and roots of six olive cultivars. *J-plant-nutr.* Monticello, N.Y. : Marcel Dekker 25 (11): 2457-2482.
- Lynch, J. and Läuchli, A. 1985. Salt stress disturbs the calcium nutrition of barley (*Hordeum vulgare* L.). *New Phytol.* 99: 345-354.
- Maqbool, S.B., Zhong, H., El-Maghraby, Y., Ahmad, A., Chai, B., Wang, W., Sabzikar, R., Sticklen, M.B. 2002. Competence of oat (*Avena sativa* L.) shoot apical meristems for

integrative transformation, inherited expression, and osmotic tolerance of transgenic lines containing hva-1. *Theor-appl-genet.* Berlin; Springer-Verlag. v. 105 (2/3) p. 201-208.

Marin, L., Benlloch, M. and Fernández-Escobar, R. 1995. Screening of olive cultivars for salt tolerance. *Sci. Hort.*, 64: 113-116.

Marschner, H. and Possingham, J.V. 1975. Effect of K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> on growth of leaf discs of sugar beet and spinach. *Z. Pflanzenphysiol*, 75: 6-16.

Marschner, H. 1986. Mineral nutrition in higher plants. Academic press, London, 1: 674, ISBN 0-12-473540-1.

Martínez, V. and Cerdá, A. 1989. Influence of N source on rate of Cl, N, Na and K uptake by cucumber seedlings grown in saline conditions *J. Plant Nutr*, 12: 971-983.

Mansour, M.M.F. and Salama, K.H.A. 2004. Cellular basis of salinity tolerance in plants. *Environ. Exp. Bot.*, 52, 113-122.

Mass, E.V. 1986. Salt tolerance of plants. *Applied Agricultural Research*, 1: 12-26.

Mass, E.V. and Grieve, C.M. 1987. Sodium-induced calcium deficiency in salt-stressed corn. *Plant Cell Environ.* 10: 559-564.

Mass, E.V. and Hoffman, G.J. 1977. Crop salt tolerance: current assessment. *Journal of the Irrigation and Drainage Division.* ASCE. Vol 103. N°IR2. Proc. Paper 12993. 115-134.

Matthys-Rochón, E., Piola, F., Le-Deunff, E., Mol, R., and Dumas, C., 1998. In vitro development of maize immature embryos: a tool for embryogenesis analysis. *J-exp-bot.* 49 (322) p. 839-845.

Mayoral Alfaro, E.J. 1989. Geología de la Depresión inferior del Guadalquivir. *AEQUAMonografías*, 1: 7-20.

McCoy, T.J., Phillips, R.L. and Rines, H.K. 1982. Cytogenetic analysis of plants regenerated from oat (*Avena sativa*) tissue culture: High frequency of partial chromosome loss. *Can. J. genet. Cytol.* 24: 37-50.

McHughen, A. and Swarz, M. 1984. A tissue culture derived salt-tolerant line of flax (*Linum usitatissimum*). *J. Plant Physiol.* 117: 109-117.

Meloni, D.A., Oliva, M.A., Ruiz, H.A. and Martinez, C.A. 2001. Contribution of proline and inorganic solutes to osmotic adjustment in cotton under salt stress. *J-plant-nutr.*

Mickelbart, M.V. and Marler, T.E. 1996. Root-zone sodium chloride influences photosynthesis, water relations, and mineral content of Sapodilla foliage. *HortScience.* (2): 230-233.

Milella, A. 1962. The germinative capacity of wild olive seed in relation to the fruit. *Studi sassar, sez III 196.* 8: 85-89. (*Hort. Abstr.* 32 (2): 472)

Mimura, T, Kura-Hotta, M., Tsujimura, T., Ohnishi, M, Miura, M., Okazaki, Y., Mimura, M., Maeshima, M. and Washitani-Nemoto, S. 2003. Rapid increase of vacuolar volume in response to salt stress. *Planta*, 216: 397-402.

Mitrakos, K. and Diamantoglou, S. 1984. Endosperm dormancy breakage in olive seeds. *Physiol. Plant.* 62:8-10.

- Morabito, D., Mills, D., Prat D. and Dizengremel, P. 1994. Response of clones of *Eucalyptus microtheca* to NaCl in vitro. *Tree-physiol*, v 14, 2: 201-210.
- Moreno, A. 2000. Tolerancia a concentraciones salinas crecientes en algunos genotipos de olivo. Proyecto fin de carrera Ingenieros Técnicos Agrícola. EUITA El Cuarto.
- Munns, R. 1985. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> in xylem sap flowing to shoots of NaCl treated barley. *J. Exp. Bot.*, 36: 1032-1042.
- Munns, R. and Termaat, A. 1986. Whole-plant responses to salinity. *Aust. J. Plant Physiol.*, 13: 143-160.
- Munns, R., 1993. Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environ.* 16, 15–24.
- Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Murashige, T., Bitlers, W.P., Rangan, T.S., Naner, E.M., Roistacher, C.N, and Holliday P.B., 1972. A technique of shoot apex grafting and its utilization toward recovering virus free Citrus clones. *HortScience*, 7, 2, 118-119.
- Murphy, J. and Riley, J. P. 1962 A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal Chim. Acta*, 27, 31-36.
- Nabors, M.W., Gibs, S.E., Bernstein, C.S. and Mais, M.E. 1980. NaCl-tolerant tobacco plants from cultured cells. *Z. Pflanzenphysiol*, 97: 13-17.
- Nadel, B. and Spiegel-Roy, P. 1987 Selection of *Citrus limon* culture variants resistant to the mal secco toxin. *Plant Sci.* 53: 177–182
- Naeini, M.R., Khoshgoftarmanesh, A.H., Lessani, H., Fallahi, E. 2004. Effects of sodium chloride-induced salinity on mineral nutrients and soluble sugars in three commercial cultivars of pomegranate. *Journal of plant nutrition*. 2004, v. 27, no. 8 p. 1319-1326.
- Navarro, C., Escobedo, R.M. and Mayo, A. 1997. In vitro plant regeneration from embryogenic cultures of a diploid and a triploid, Cavendish banana. *Plant-cell,-tissue-organ-cult.* 51 (1): 17-25.
- Navarro, J.M., Garrido, C., Martinez, V. and Carvajal, M. 2003. Water relations and xylem transport of nutrients in pepper plants grown under two different salts stress regimes. *Plant growth regulation*. 41,(3): 237-245.
- Nayak, S., Chauhan, P., Chauhan, H. B., Bahuguna, A., and Narendra Nath, A. 1996. IRS-1C applications for coastal zone management. *Current Science*, 70 (7): pp. 614-618
- Nickell, W. P. 1951. Studies of habitats, territory and nests of the Eastern Goldfinch. *Auk* 68:447-470
- Nieman, R.M. and Shannon, M.C. 1977. Screening for salt tolerance . AID. *Joint Invitational Workshop on Adaptation of Plants to Mineral Stress in Problems Soils*. USDA ARS. Cornell University, pp. 2-23.

- Nieva, F.J.J., Castillo, J.M., Luque, C.J. and Figueroa, M.E. 2003. Ecophysiology of tidal and non-tidal populations of the invading cordgrass *Spartina densiflora*: seasonal and diurnal patterns in a Mediterranean climate. *Estuarine, Coastal and Science* 57, 1-10.
- Ochatt, S.J., Marconi, P.L., Radice, S., Arnozis, P.A. and Caso, O.H. 1998/1999. In vitro recurrent selection of potato: production and characterization of salt tolerant cell lines and plants. *Plant-cell,-tissue-organ-cult*, 55,(1): 1-8.
- Olsen, S.R., C.V. Cole, F.S. Watanabe, and Dean, L.A. 1954. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. U.S. Dep. of Agric. Circ. 939.
- Oquist, G. Chow, W.S. and Anderson, J.M. 1992. Photoinhibition of photosynthesis represents a mechanism for the long-term regulation of photosystem II. *Planta* 186, 450-460.
- Orinos, T. and Mitrakos, K. 1991. Rhizogenesis and somatic embryogenesis in calli from wild olive (*Olea europaea* L.) var. *silvestris* (Miller) (Lehr) mature zygotic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 27, 183-187.
- Orton, T.J. 1980. Comparison of salt tolerance between *Hordeum vulgare* L. and *H. jubatum* L. in whole plants and callus culture. *Z. Pflanzenphysiol*, 98: 105-118.
- Özcan S., Sevimay CS., Yildiz, M, Sancak, C. and Özgen, M. 1996 Prolific shoot regeneration from immature embryo explants of *sainfoin* (*Onobrychis viciifolia* Scop.). *Plant Cell Rep.* 16: 200–203.
- Pandya, D.H., Mer, R.K., Prajith, P.K. and Pandey, A.N. 2004. Effect of salt stress and manganese supply on growth of barley seedlings. *Journal of plant nutrition.* 27, (8): 1361-1379.
- Papadopoulus, I. and Rendig, V.V. 1983. Interactive effects of salinity and nitrogen growth and yield of tomato plants. *Plant and soild*, 73: 47-57
- Pasternak, D. 1987. Salt tolerance and crop production a comprehensive approach. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 25: 271-291.
- Pastor, J., D. Mladenoff, Y. Haila, J. Bryant, and S. Payette. 1996. Biodiversity and ecosystem processes in boreal regions. Pages 33-70 in H. A. Mooney, J. H. Cushman, E. Medina, O. E. Sala, and E.-D. Schulze, editors. *Functional roles of biodiversity: a global perspective*. Wiley Press, New York, New York, USA.
- Penning de Vries, F. W. T. 1975. The cost of maintenance processes in plant cells. *Annals of Botany* 39:77-92.
- Pérez-Alfocea, F. 1991. Efectos de la salinidad y mecanismos de tolerancia a nivel celular y a nivel de planta de tomate. *Tesis Doctoral*, Universidad de Murcia.
- Pierik, R.L.M. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Ed Mundi-Prensa. Madrid. 326 pp.
- Ponnamperuma, F.N. 1984. Role of cultivar tolerance in increasing rice production on saline lands. In: *Salinity tolerance in plants*. Staples R. C. Toenniessen G.H.(Edts.). John Wiley and Sons. New York, pp. 255-272.
- Predieri, S. 2001. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 64: 185-210.

- Rains, D.W., Crougham, T.P. and Stavarek, S.J. 1980. Selection of salt tolerant plants using tissue culture. En: *Genetic Engineering of Osmoregulation* (Eds. D.W. Rains, R.C., Valentine y A. Hollaender). Plenum Press. Nueva York. Pags. 279-292.
- Rallo, L, and Fernández-Escobar, R. 1985. Influence of cultivar and fower thinning within the inflorescence on competition among olive fruits. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 110: 303-308.
- Ramming, D.W., Emershad, R.L., Spiegel-Roy, P., Sahar, N. and Baron, I. 1990. Embryo Culture of Early Ripening Seeded Grape (*Vitis vinifera*) Genotypes. *HortScience* 25(3):339-342.
- Randolph, L.F., Cox, L.G. 1943. Factors influencing the germination of iris seed and the relation of inhibiting substances to dormancy. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* 43, 284-300.
- Randolph, L.F. 1945. Embryo culture of iris seed. *Pl. Garden* 1, 241-246.
- Rapoport H.,F. 1994. The timing and developmental context of olive embryo growth. *Acta Horticulturae*, 356, 268-71.
- Raschke, K. 1975. Stomatal action. *Ann. Rev. of Plant Physiol.* 26: 309-340.
- Rather, G. 1982. Influence of extreme K:Na ratios and high substrate salinity on plant metabolism of crops differing in salt tolerance. I: K/Na effects on growth, mineral uptake and distribution of extreme salt tolerance crop species. *Journal. Plant Nutrition*, 5 (3): 183-193.
- Redenbaugh, K., Nichol, J., Kossler, M.E. and Paasch, B. 1984. Encapsulation of somatic embryos for artificial seed production. *In vitro* 20: 256.
- Reimann, Ch. 1992. Sodium Exclusion by *Chenopodium* Species. *J. Exp. Bot.*, 43: 503-510.
- Richards, L. 1972. Suelos Salinos y Sódicos. Editorial Limusa S.A., México.
- Ried, J.L., Walker-Simmons, M.K., 1993. Group 3 late embryogenesis abundant proteins in desiccation-tolerant seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol* 102: 125131.
- Roberts, E. H. and Totterdell, S. 1981. Seed dormancy in *Rumex* species in response to environment factors. *Plant, Cell and Environment* 4, 97-106.
- Rodríguez Vidal, I. 1989. El inicio de la red fluvial cuaternaria en el sector occidental de la Depresión del Guadalquivir. En: *El Cuaternario en Andalucía Occidental*, AEQUA Monografías, 1. 27-31.
- Royo, A. y Aragües, R. 1989. Efectos de la salinidad sobre las plantas: tolerancia, manejo agronómico, genética y mejora. *Servicio de Investigación Agraria*. Diputación General de Aragón. pp. 65.
- Rubio, J.C. 1985. Ecología de las Marismas del Odiel. Tesis Doctoral.
- Rugini, E., 1981. *Propagazione in vitro di una cultivar di olivo: valutazione delle varie citochinine ed auxine*. Atti del Congresso sui Fitoregolatori in Agricoltura. Firenze, 26-27 nov.: 171-180.
- Rugini, E. and Caricato, G. 1995. Somatic embryogenesis and plant recovery from mature tissues of olive cultivars (*Olea europaea*, L) "Canino" and "Moraiolo". *Plant Cell Rep.*, 14: 257-260.

- Rugini, E. 1986. Olive (*Olea europea* L.) Biotechnology in Agriculture and Forestry. Trees I. Springer-Verlag. Berlín . 515 pp.
- Rugini, E. 1988. Somatic embryogenesis and plant regeneration in olive (*Olea europaea*, L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 14, 207-214.
- Rugini, E., 1990. In vitro culture of the olive: an overview of the present scientific status. Acta Hort., 286: 93-96.
- Rugini, E and Fedeli, E. 1990. Olive (*Olea europea*, L) as oilseed crop, pp. 953-641. In: Bajaj Y.p:S. (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry Legumes and oilseed. 10 crop I. Springer verls, Berlín, Heidelberg, New York.
- Rugini, E. and Lavee, S. 1992. Biotechnology of Perennial Fruit Crops. Hammerschlag & Litz Eds. C.A.B. International. University Press. Cambridge. UK. 550 pp.
- Rybczynski, J.J. 1997. Plant regeneration from highly embryogenic callus, cell suspension and protoplast cultures of *Trifolium fragiferum*. Plant -Cell, Tissue and Organ.Cult. 51 (3): 159-170.
- Saleki, R., Young, P. and Lefevre, D.D. 1993. Mutants of *Arabidopsis thaliana* capable of germination under saline conditions. Plant Physiol 101: 839-845.
- Sandhu, G. R., Aslam, Z., Salim, M., Sattar, A., Qureshi, R.H., Ahmad, N. and Wyn Jones, R.G. 1981. The effect of salinity on the yield and composition of *Diplachne fusca* (Kallar grass). Plant, Cell & Environment 4 (2): 177-181.
- Sarmiento, R., Garcia, J. L., C. Mazuelos, J. Liñan, A. Troncoso, 1994. Effect of the form and concentration of N on the growth and mineral composition of young olive seedlings. Acta Horticulturae, 356: 156-161.
- Shannon, M.C., Rhoades, J.D., Draper, J.H., Scardaci, S.C., Spyres, M.D. 1998. Assessment of salt tolerance in rice cultivars in response to salinity problems in California. Crop-sci. Madison, Wis.: Crop Science Society of America,. Mar/Apr. v. 38 (2) p.
- Shannon, M.C. 1979. In quest of rapid screening techniques for plant salt tolerance. HortScience, 14: 587-589.
- Shannon, M.C. 1982. Genetics of salt tolerance: new challenges. IN: Biosaline research. (San Pietro ed.) New York, Plenum Press.
- Sharpley, A.N., S.J. Smith, O.R. Jones, W.A. Berg, and Coleman, G.A. 1992. The transport of bioavailable phosphorus in agricultural runoff. J. Environ. Qual. 21: 30-35.
- Shibli, R. A. Al-Juboory, K. 2002. Comparative Responses of "Nabali" Olive Microshoot, Callus, and Suspension Cell Cultures to Salinity and Water Déficit. Journal of Plant Nutrition. 25 (1): 61-74.
- Shoyama, Y., Zhu, X.X., Nakai, R., Shiraishi, S. and Kohda, H. 1997. Micropropagation of *Panax notoginseng* by somatic embryogenesis and RAPD analysis of regenerated plantlets. Plant-cell-rep. 16 (7) p. 450-453
- Skene K.G.M. and Barlass M. 1988. Response to NaCl of Grapevine regenerated from Multiple Shoot Cultures Exhibiting Mild Salt Tolerance In Vitro. *Am. J. Enol. Vitic*, v. 39, 2: 125-128.

- Skirvin, R., Mc Pheeters, K. and Norton, M. 1994. HortScience 29: 1232-1237.
- Skoog, F. and Miller, C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol. 11:118-130.
- Smith, M.K. and McComb, J.A: 1981. Effect of NaCl on the Growth of Whole Plants and Their Corresponding Callus Cultures. Australian Journal of Plant Physiology 8(3) 267 – 275.
- Sorvari, S., Toldi, O., Ahanen, K., Viinamaki, T., Hakonen, T., Tahvonen, R. 1997. Using polysaccharides and galactomannans as gelling agents in capsule formation of artificial seeds. J-Am-Soc-Hortic-Sci. v. 122 (6); 878-883.
- Sotomayor-León, E.M. and Caballero, J.M. 1990. An easy method of breaking olive stones to remove mechanical dormancy. Acta Horticulturae, 206: 113-116.
- Stavarek, S.J. y Rains, D.W. 1984. The development of tolerance to mineral stress. Hort. Sci., 19: 377-382.
- Stuiver C.E.E, Kuiper P.J.C, Marschner H and Kylin A 1981 Effects of salinity and replacement of K<sup>+</sup> by Na<sup>+</sup> on lipid composition in two sugar beet inbred lines. Physiol. Plant. 52: 77–82.
- Sumaryati S., Negrutiu I. and Jacobs M. 1992. Characterization and regeneration of salt- and water-stress mutants from protoplast culture of *Nicotiana plumbaginifolia* (Viviani). *Theor. Appl. Genet.* v. 83, 5: 613-619.
- Sutter, E.G. and Langhans, R.W. 1979. Epicuticular wax formation carnation plantlets regeneration from shoot tip culture. *J. Amer. Soc. Hort. Sc.*, 104: 493-496.
- Swamy, N. R., Ugandhar, T., Praveen, M., Venkataiah, P., Rambabu, M., Upender, M., and Subhash, K. 2005. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cotyledon and leaf explants of *Solanum surattense*. Indian Journal of Biotechnology, (4-3): 414-418.
- Sykes, S.R. 1992. The inheritance of salt exclusion in woody perennial fruit species, *Plant Soil* 146:123–129.
- Syvertsen, J.P., Lloyd, J., McConchie, C., Kriedemann, P.E. and Farquhar G.D. 1995 On the site of biophysical constraints to CO<sub>2</sub> diffusion through the mesophyll of hypostomatous leaves. *Plant, Cell and Environment* 18, 149–157.
- Szabolcs, I. 1985. Salt affected soils. CRC Press. Boca Raton, FL.
- Taeb, M., Koebner, R.M.D., Forster, B.P. and Law, C.N. 1992 Association between genes controlling flowering time and shoot sodium accumulation in the triticeae. *Plant Soil* 146: 117-121.
- Tal, M., Heikin, H., and Dehan, K. 1978. Salt tolerance in the wild relatives of the cultivated tomato: responses of callus tissues of *Lycopersicon esculentum* and *Solanum pennelli* to high salinity. *Z. Pflanzenphysiol.*, 86: 231-240.
- Tal, M. 1993. *In vitro* methodology for increasing salt tolerance in crop plants. *Acta Hort.* 336: 69–78.
- Tanji, K.K. 1990. Agricultural Salinity Assessment and Manegement. Irrigation And Drainage Division. American Society of Civil Engineers. NY. USA.

- Tattini, M., P. Bertoni and Caselli, S. 1992. Genotypic responses of olive plants to sodium chloride. *J. Plant Nutr.* 15: 1467-1485.
- Tattini, M., Ponzio, C. Coradeschi, M.A., Tafani, R. and Traversi, M.L. 1994. Mechanism of salt tolerance in olive plants. *Acta Hort.* 356: 181-184.
- Tattini, M. 1994. Ionic relations of aeroponically-grown olive genotypes during salt stress. *Plant Soil* 161: 251-256.
- Tattini, M., Gucci, R., Coradeschi, M.A., Ponzio, C., Everard, J.D. 1995. Growth, gas exchange and ion content in *Olea europaea* plants during salinity stress and subsequent relief. *Physiologia-Plantarum*, 95 (2): 203-210.
- Termaat, A., Passioura, J.B., Munns, R. 1985. Shoot turgor does not limit growth of NaCl affected wheat and barley. *Plant Physiology*, 77: 869-872.
- Therios, I.N. and Misopolinos, N.D. 1988. Genotypic response to sodium chloride salinity of four major olive cultivars (*Olea europaea* L.). *Plant and Soil* 106: 105-111
- Thomas, T.L. 1993. Gene Expression During Plant Embryogenesis and Germination – An Overview. *Plant Cell* 5: 1401-1410.
- Thompson, M. and Thorpe, T. 1987. Metabolic and non-metabolic roles of carbohydrates. In: *Cell and Tissue Culture in Forestry. Vol 1. General Principles and Biotechnology.* Bonga J.M. and Durzan, D.J. (Eds.), pp. 89-112. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.
- Tisserat, B., Esan, B.R. and Murashige, T. 1979. Somatic embryogenesis in Angiosperms. *Hortic. Rev.* 1: 1-78.
- Toyoda, H., Horikoshi, K., Yamano, Y. and Ouchi, S. 1991 Selection of Fusarium wilt disease resistance from regenerant derived from callus of strawberry. *Plant Cell Rep.* 10: 167-170.
- Troncoso, A. 1994. Fertirrigación del olivo. *Olivicultura* 65-69.
- Troncoso, A. 1985. Nutrición y fertilización del olivo. Sevilla. Jornadas de aceituna de mesa. Fundación Giménez Fernández y Banco Exterior de España. Págs. 118-128.
- Troncoso, A., Han, N., García, J.L. y Sarmiento, R. 1991. Efecto de la concentración de Nitrógeno en el desarrollo de embriones de olivo "in vitro". Congreso. Consultation of the European Cooperative Research net-work on olive. Turquía. Bornova, Ishmir.
- Troncoso, A., Liñán, J., Troncoso J., Rapoport H. and Cantos, M. 1999. In vitro obtaining of salt tolerant olive plants. *International Meeting on Scientific Innovations and their applications to Oliviculture.* International Olive Council (COI) and Accademia dei Georgofili. Florence. Italy.
- Troncoso, A., Sarmiento, R., y García, J.L. 1994. Influencia del medio nutritivo sobre el desarrollo del embrión de olivo *in vitro* FAO Inter.Regional. Cooperative research Net-Work on olives. Córdoba.
- Troncoso, A., Pérez, A., Cantos, M. y Liñán, J. 1998. Germinación de semillas y embriones de olivo. *Revista de Ciencias Agrarias.* Vol. XXI nº 1,2,3,4. Sociedad de Ciencias Agrarias de Portugal. Lisbon. ISSN:0871-018X.

Troncoso, A. Cantos, M. Liñán J. y Fernández, E. 2001. Fertirrigación en el cultivo del olivo. Eds. D. Barranco, R. Fernández-Escobar y L. Rallo. Junta de Andalucía. Ediciones Mundiprensa., pags: 309-332., 4ª edición.

Uniyal, R.C. and Nautiyal, A.R. 1998. Seed germination and seedling extension growth in *Ougeinia dalbergioides* Benth. under water and salinity stress. New-for. v. 16 (3) p. 265-272.

USDA. 1975. Soil Taxonomy. A basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys. Agriculture handbook, 346: 754 pp. Washington.

Van Genuchten, M.Th. 1983. Analyzing crop salt tolerance data: Model description and user manual. U.S. Salinity Lab., USDA/ARS, Calif. Res. Rep 120.

Vanstone, D.E. and Ronald, W.G. 1982. Seed germination of American basswood in relation of seed maturity. Can. J. Plant. Sci. 62, 709-713.

Vázquez, A. y Vieitez, E. 1962. Influencia de algunos factores en el crecimiento de embriones de castaño cultivados "in vitro". An. Edafol. Agrobiol. 21: 583-591.

Vázquez, A. y Vieitez, E. 1965. Acción del ácido giberélico sobre los embriones de castaño cultivados in vitro. An. Edafol. Agrobiol. 24: 103-110.

Vázquez, A. y Vieitez, E. 1966. Influencia del pH y de la temperatura sobre el crecimiento de los embriones de *Castanea sativa* cultivados in vitro. An. Edafol. Agrobiol. 25: 357-366.

Voyiatzis, D.G. 1995. Dormancy and germination of olive embryos as affected by temperature. Phisyol. Plantarum, 95: 444-448.

Voyiatzis, D.G. and Pritsa T. 1994. The onset and disappearance of relative dormancy of olive embryos as affected by age. Acta Horticulturae 356, 148-151.

Wallinga, I., Van der Lee, J., Houba, U., Van Vark, and Novozamsky, W. 1995 ed. Plant analysis manual. Kluwer Ac; Dordrecht. Holanda.

Walkley, A. and Black, I.A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. Soil. Sci. 37, 29-38.

Ward, M.R. Aslam, M. And Huffaker, R.C. 1986. Enhancement of nitrate uptake and growth of barley seedlings by calcium under saline conditions. Plant Physiol.80: 520-524.

Watanabe, I.S. and Olsen, S.R. 1965. Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in water and NaHCO<sub>3</sub> extracts from soils. Soil Sci. Soc. Proc. 29: 677-678

Williams, E.G. and Maheswaran, G. 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. Ann. Bot. 57: 443-462

Winicov, I. 1996 Characterization of rice (*Oryza sativa* L.) plants regenerated from salt-tolerant cell lines. Plant Sci. 113: 105-111.

Wright, G.C., Patten, K.D. and Drew, M.C. 1993. Gas exchange and chlorophyll content of 'Tifblue' rabbiteye and 'Sharpblue' southern highbush blueberry exposed to salinity and supplemental calcium. J-Am-Soc-Hortic-Sci. 118(4): 456-463.

- Wyn Jones, R.G., and Gorham, J. 1983. Aspects of salt and drought tolerance in higher plants. En: *Genetic Engineering of plants. And agricultural Perspective* (Eds. T. Kosuge, C.P. Meredith y A. Holander). Plenum Press. Nueva York. Pags 355-370.
- Xu, Wei-Feng Shi, Wei Ming 2006 Expression Profiling of the 14-3-3 Gene Family in Response to Salt Stress and Potassium and Iron Deficiencies in Young Tomato (*Solanum lycopersicum*) Roots: Analysis by Real-time RT-PCR. *Annals-of-botany*. 2006 Nov; 98(5): 965-974.
- Yahya, A. 1998. Salinity effects on growth and on uptake and distribution of sodium and some essential mineral nutrients in sesame. *J-plant-nutr*. 21 (7): 1439-1451.
- Yeo, A.R. 1983. Salinity resistance: Physiologies and prices. *Physiolo. Plant.*, 58: 214-222.
- Zazo, C. 1989. Los depósitos marinos cuaternarios en el Golfo de Cádiz. *AEQUAMonografías*, 1: 113-122.
- Zazo, C., Goy, J.L., Somoza, L., Dabrio, C.J., Belluomini, G., Improta, S., Lario, J., Bardaji, T. and Silva, P.G. 1994. Holocene sequence of sea-level fluctuations in relation to climatic trends in the Atlantic-Mediterranean linkage coast. *Journal of Coastal Research*, 10, 933-945.
- Zenk, M.H. 1974. Haploids in physiological and biochemical research. Haploids in higher plants: advances and potential. Kasha, K. J. (Ed.), pp. 339 – 354. Univ. Guelph Press, Ontario, Canada.
- Zhu, G.Y., Kinet, J.M., Bertin, P., Bouharmont, J. and Lutts, S. 2000. Crosses between cultivars and tissue culture-selected plants for salt resistance improvement in rice, *Oryza sativa*. *Plant-breed*. v. 119 (6): 497-504.
- Zohary, D. 1994. The Wild resources of the cultivated olive. *Acta Horticulturae* 356, 62-65.
- Zohary, D. and Hopf, M. 1988. Domestication of plants in the Old world. Clarendon, Oxford.