INNOVACIÓN TECNOLÓGICA APLICADA A LA SV DEL CULTIVO

Implicación de los reguladores del crecimiento en la tolerancia del cv. Picual de *Olea europaea* L. a la salinidad

Mª del Pilar Cordovilla y Carolina Aparicio (Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología, Universidad de Jaén).

El presente trabajo estudia la respuesta a la salinidad (100 y 200 mM NaCl) de estaquillas enraizadas del cv. Picual de *Olea europaea* previamente tratadas con reguladores del crecimiento. Los resultados mostraron que la aplicación de ácido giberélico (GA_3) o quinetina (QUIN) favoreció el crecimiento en medio salino frente a las plantas sin regulador, con ácido indolacético (AIA) o con ácido salicílico (AS). Sin embargo, en medio salino, el transporte neto de Na^+ y el factor de translocación de Na^+ desde la raíz a la hoja sólo descendió en plantas con AIA y AS, las cuales inhibieron su crecimiento de forma similar a plantas sin regulador. Además, las plantas con AIA y AS fueron las que descendieron en menor proporción la relación K^+/Na^+ de la hoja.

INTRODUCCIÓN

Según Wicke y col. (2011), 1.128 millones de ha de suelo se encuentran afectadas por la salinidad. Los olivos afectados por estrés salino reducen su crecimiento, presentan hojas con clorosis, necrosis y enrollamiento, defoliación, las flores se marchitan y/o la raíz se necrosa. En consecuencia, la productividad desciende (Chartzoulakis y col., 2002) y baja la calidad del aceite, aumentando su contenido de fenoles y descendiendo la relación ácidos grasos insaturados/saturados (Weisman y col., 2004; Stefanoudaki y col., 2009).

El efecto adverso de la salinidad sobre el crecimiento se asocia con un bajo potencial osmótico de la solución del suelo (estrés osmótico) que dificulta la absorción de agua por la raíz, un desequilibrio nutricional, un efecto específico de los iones sobre los tejidos (estrés iónico) o, con una combinación de todos estos factores (Munns and Tester, 2008). El olivo es una planta glicófita moderadamente tolerante a la salinidad (Rugini and Fedeli, 1990). La tolerancia del olivo se asocia con la capacidad de exclusión de iones y de retención de Na^+ y Cl^- en la raíz (Tattini, 1994), capacidad que varía entre cultivares (Aparicio y col., 2014).

Las fitohormonas influyen en la tolerancia a la salinidad regulando diversos procesos fisiológicos y mecanismos bioquímicos de la planta dirigidos a su adaptación a las condiciones de estrés salino (Kaya y col., 2009; Fatma y col., 2013). Esto llevó a proponer la aplicación exógena de reguladores del crecimiento como una alternativa para hacer frente al estrés salino, siendo un foco de estudio en otras especies vegetales (Khan y col., 2010; Wu y col., 2012; Iqbal y Ashraf, 2013). Siguiendo esta línea, el presente trabajo tiene por objeto estudiar el efecto de distintos reguladores del crecimiento sobre la tolerancia a la salinidad del cv. Picual.

Material y Métodos

Estaquillas enraizadas del cv. Picual de *Olea europaea* L. (Viveros Jarico SL, Almería, España) sembradas en contenedores de plástico de 1 l con mezcla de arena y perlita (1:3, v/v) crecieron en cámara de cultivo (16/8 h luz/oscuridad, 25/20°C día/noche, humedad relativa de 55-76%, densidad de flujo fotónico de 500 mmol m^{-2} s^{-1}) durante trece semanas. Las plantas se regaron tres veces/semana con solución nutritiva Hoagland 50% (Hoagland y Arnon, 1950). Tras cuatro semanas de aclimatación, las plantas se separaron en cinco grupos; a cuatro de ellos se les aplicó un regulador del crecimiento, mientras que al quinto se le aplicó agua destilada (plantas NP). Ácido giberélico (GA_3), ácido indolacético (AIA) y quinetina (QUIN) se prepararon a 1 µM, y el ácido salicílico (AS) a 0.5 mM, aplicándose a razón de 25 ml/planta 2 veces/semana. Pasadas tres semanas, cada grupo de plantas se dividió en tres subgrupos, a cada uno de los cuales se les aplicó una concentración distinta de NaCl (0, 100 y 200 mM) durante seis semanas. Las plantas NP con 0 mM NaCl se utilizaron como control. El diseño experimental fue un factorial con cinco pretratamientos (NP, GA_3, AIA, AS y QUIN), tres niveles de NaCl (0, 100 y 200 mM), con seis plantas por pretratamiento y nivel de NaCl, lo que representó un total de noventa plantas. Al final del experimento, las plantas se sacaron de las macetas y se secó cada órgano (raíz, tallo y hoja) por separado a 65°C. Tras 72 h se determinó el peso seco (PS). El contenido de Na^+ y K^+ se determinó por espectrofotometría de emisión-absorción atómica (Aparicio y col., 2014). A partir de estas determinaciones y con respecto al PS de hoja y raíz, se calculó el transporte neto de nutrientes desde la raíz a la hoja (J_h) (Tattini y Traversi, 2009):

$$J = \frac{(Mh2-Mh1)}{T2-T1} \times \frac{\ln(W2/W1)}{W2-W1}$$

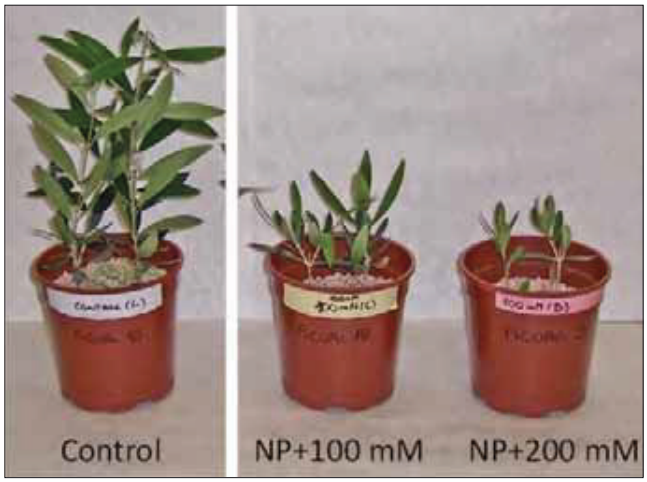

Figura 1. Aspecto de plantas del cv. Picual no pretratadas (NP) con reguladores del crecimiento y crecidas en condiciones de estrés salino (100 y 200 mM NaCl). A la izquierda plantas control (0 mM NaCl).

donde *J* se expresa en mmol kg^{-1} PS $día^{-1}$. Mh_1 y Mh_2 son el contenido de cada nutriente en hoja (mmol) al inicio (Mh_1) y final del experimento (Mh_2). W_2 y W_1 es el PS de raíz al final e inicio del experimento. También se calculó el factor de translocación (Ft) de Na^+, que es la relación que existe entre la concentración de Na^+ en hoja y raíz, expresado en % (Rossi y col., 2015):

$$Ft = \frac{[Na+]hoja}{[Na+]raíz} x100$$

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de la varianza multifactorial (pretratamiento y salinidad). Para la comparación de medias se utilizó el test LSD ($P \leq 0.05$) (Statgraphics Centurion XVI, Universidad de Jaén).

Resultados y Discusión

Las plantas crecidas sin NaCl (0 mM) redujeron su crecimiento por el pretratamiento con GA_3, AIA y QUIN (13, 27 y 19%, respectivamente; Tabla 1). Además, la aplicación de NaCl descendió la biomasa en todos los casos excepto en plantas con QUIN y 100 mM NaCl. Este efecto adverso de la salinidad sobre el crecimiento del olivo también ha sido descrito por otros autores (Aparicio y col., 2014; Bader y col., 2015). En medio salino, la máxima inhibición de biomasa respecto al control se observó en plantas NP (Figura 1) y pretratadas con AIA o AS; la inhibición media fue del 41% con 100 mM y del 49% con 200 mM. Por otro lado, con 100 mM descendió una media del 21% en pretratadas con QUIN y GA_3, mientras que con 200 mM la inhibición fue del 27% con QUIN y del 32% con GA_3. Por tanto, en el cv. Picual la aplicación de QUIN o GA_3 mejoró el crecimiento en condiciones de estrés salino. En todos los pretratamientos, con 200 mM NaCl se favoreció el desarrollo de la parte aérea respecto al de la raíz, por lo que la relación raíz/parte aérea (R/PA) descendió respecto al control ($P \leq 0.05$), siendo las plantas con AIA y GA_3 las que mostraron los valores mas bajos (Tabla 1). Además, las plantas con AIA y GA_3 mostraron el mayor descenso en la relación biomasa de raíz/biomasa total (RMR) (≈32%). Esta respuesta en plantas expuestas a la salinidad es frecuente según Munns y Tester (2008). En contraste, la relación biomasa de hoja/ biomasa total (LMR) aumentó en medio salino; las plantas con AIA y 100 mM mostraron el mayor incremento (24% respecto al control).

Tabla 1. Biomasa, relación biomasa de hoja/biomasa total (LMR), biomasa de tallo/biomasa total (SMR), biomasa de raíz/biomasa total (RMR) y raíz/parte aérea (R/PA) de plantas de olivo pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 6 semanas. Plantas no pretratadas (NP) y con 0 mM NaCl se utilizaron como control.

Tratamiento	Biomasa (g)	LMR	SMR	RMR	R/PA
Control	2.49 a	46.38 g	31.10 b	22.62 bc	0.291 bc
NP + 100	1.50 f	49.65 def	28.56 de	21.45 cd	0.273 cd
NP + 200	1.29 gh	51.34 cd	28.81 cde	19.86 de	0.248 de
GA_3	2.17 b	49.66 def	30.56 bc	19.94 de	0.249 de
GA_3 + 100	1.99 c	53.58 b	26.13 f	20.29 de	0.255 de
GA_3 + 200	1.67 e	53.66 b	30.50 bc	15.84 hi	0.189 gh
AIA	1.82 d	48.28 f	25.89 f	16.54 gh	0.198 gh
AIA + 100	1.48 f	57.57 a	34.26 a	17.46 fg	0.212 fg
AIA + 200	1.25 h	49.60 def	34.02 a	14.38 i	0.168 h
AS	2.42 a	48.29 f	28.26 de	23.44 ab	0.307 ab
AS + 100	1.40 fg	50.89 cde	26.00 f	23.11 b	0.302 abc
AS + 200	1.25 h	52.68 bc	27.13 ef	20.19 de	0.253 de
QUIN	2.02 c	49.56 def	25.44 f	25.00 a	0.334 a
QUIN + 100	1.94 c	49.10 ef	26.97 ef	23.93 ab	0.316 ab
QUIN + 200	1.81 d	52.06 bc	29.02 cd	18.91 ef	0.233 ef

En cada columna, las medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test LSD ($P \leq 0.05$).

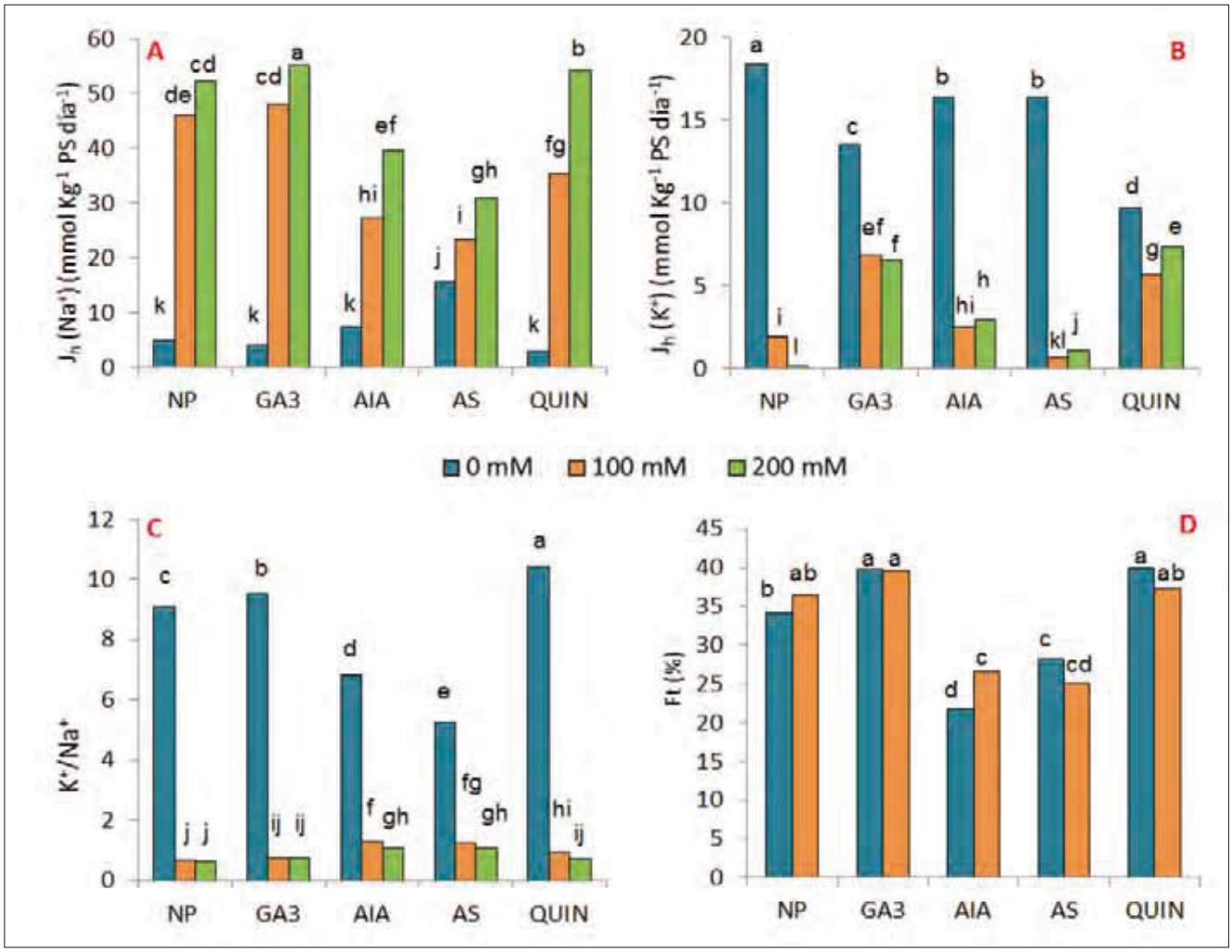

Figura 2. Transporte neto de Na^+ (A) y K^+ (B) a la hoja, relación K^+/Na^+ en hoja (C) y factor de translocación de Na^+ de la raíz a la hoja (D) de plantas de olivo pretratadas con distintos reguladores del crecimiento y sometidas a estrés salino (0, 100 y 200 mM NaCl) durante 6 semanas. Plantas no pretratadas (NP) y con 0 mM NaCl se utilizaron como control. Las medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test LSD (P≤0.05).

En el caso del tallo (SMR), la respuesta dependió del pretratamiento y nivel de NaCl. Así, aumentó respecto al control con AIA y NaCl (≈13%), y descendió en plantas NP (≈8%), con GA_3 y 100 mM NaCl (16%) y con AS y NaCl (≈15%). En plantas con QUIN, con 200 mM NaCl aumentó respecto a plantas con 0 mM; sin embargo, los valores fueron un 7% inferiores a los del control.

Sin NaCl, el transporte neto de Na^+ desde la raíz a la hoja ($J_h(Na^+)$) presentó valores similares al control en plantas con GA_3, AIA y QUIN (≈4.78 mmol Kg^{-1} PS $día^{-1}$), mientras que con AS los valores fueron tres veces superiores (Figura 2A). En medio salino, $J_h(Na^+)$ se incrementó; en plantas NP, aumentó una media de diez veces con 100 y 200 mM NaCl. En plantas pretratadas, con 100 mM las mayores tasas de transporte se detectaron con GA_3, las cuales se incrementaron 9.8 veces respecto al control, seguidas por las plantas con QUIN (7.2 veces) y, AIA o AS (≈4.2 veces); con 200 mM, el transporte de Na^+ a la hoja fue de 6.3, 8, 11 y 11.2 veces en las pretratadas con AS, AIA, QUIN y GA_3, respectivamente. Además, para cada nivel de NaCl, el Tf de Na^+ de plantas con AIA y AS (Figura 2D) mostró valores inferiores ($P \leq 0.05$) a los de plantas NP. Según Chartzoulakis (2005), en olivo la tolerancia a la salinidad está asociada a la exclusión de iones de la parte aérea y a su retención en la raíz. En consecuencia, los pretratamientos con AIA y AS favorecieron la tolerancia del cv. Picual. En estudios realizados en otras especies describieron resultados similares por la aplicación de AS (Syeed y col., 2011) y AIA (Iqbal y Ashraf, 2007). En contraste, el transporte de K^+ hacia a la hoja descendió por la salinidad (Figura 2B); con 100 mM NaCl descendió una media del 86% en plantas NP y con AIA, un 69% con QUIN y un 96% con AS. Con 200 mM, el descenso fue del 60, 64, 84 y 99% en plantas con QUIN, GA_3, AIA y NP, respectivamente. Esto llevó a un descenso de la relación K^+/Na^+ en hoja (Figura 2C). Con 100 y 200 mM, en plantas NP y con GA_3 o QUIN este descenso fue del 92%, mientras que con AS fue del 87%. En plantas con AIA los respectivos descensos con 100 y 200 mM fueron de 86% y 88%. Por lo tanto, lo menores descensos los presentaros las plantas con AIA y AS. Esto es importante, puesto que Tattini y col. (2009) relaciona la tolerancia en olivo no sólo con la capacidad de exclusión de sales de la parte aérea sino también con la capacidad de mantener una apropiada relación K^+/Na^+ en los tejidos en crecimiento activo.

En conclusión, podemos afirmar que el pretratamiento con AIA o AS desciende el transporte de Na^+ desde la raíz a la parte aérea y por consiguiente mejora la tolerancia del cv. Picual frente al estrés salino.

Abstract: The present work studies the response to salinity (100 and 200 mM NaCl) of rooted cuttings of *Olea europaea* cv. Picual previously treated with growth regulators. The results showed that the application of gibberellic acid (GA_3) or Kinetin (CK) favored growth in saline medium compared to plants without regulator, indole-3-acetic acid (IAA) or salicylic acid (SA). However, in saline medium, the Na^+ net translocation rate from roots to leaves and the translocation factor (Tf) for Na^+ decreased in plants with AIA and AS, which inhibited its growth similarly to plants without regulator. In addition, the plants with AIA and AS showed the lowest decrease of K^+/Na^+ in leaf.

BIBLIOGRAFÍA

Aparicio, C., Urrestarzu, M., Cordovilla, M.P. 2014. Comparative physiological analysis of salinity effects in six olive genotypes. HortScience, 49: 901-904.

Bader, B., Aissaoui, F., Kmicha, I., Ben Salem, A., Chehab, H., Gargouri, K., Boujnah, D., Chaieb, M. 2015. Effects of salinity stress water desalination, olive tree (*Olea europaea* L. cvs ´Picholine´, ´Meski´ and ´Ascolana´) growth and ion accumulation. Desalination, 364: 46-52

Chartzoulakis, K., Loupassaki, M., Bertaki, M., Androulakis, I. 2002. Effects of NaCl salinity on growth, ion content and CO_2 assimilation rate of six olive cultivars. Sci. Hortic., 96: 235-247.

Chartzoulakis, K. 2005. Salinity and olive: growth, salt tolerance, photosynthesis and yield. Agric. Water Manage., 78: 108-121.

Fatma, M., Khan, M.I.R., Masood, A., Khan, N.A. 2013. Coordinate changes in assimilatory sulphate reduction are correlated to salt tolerance: involvement of phytohormones. Annu. Rev. Res. Biol., 3: 267-295.

Iqbal, M., Ashraf, M. 2007. Seed treatment with auxins modulates growth and ion partitioning in salt-stressed wheat plants. J. Integr. Plant Biol., 49: 1003-1015.

Iqbal, M., Ashraf, M. 2013. Gibberellic acid mediated induction of salt tolerance in wheat plants: growth, ionic partitioning, photosynthesis, yield and hormonal homeostasis. Environ. Exp. Bot., 86: 76-85.

Hoagland, D.R., Arnon. D.L. 1950. The water culture methods for growing plants without soil. Pgs. 1-39 en: California Agricultural Experiment Station Circular 347. The College of Agriculture. University of California. Berkeley.

Kaya, C., Tuna, A.L., Yokas, I. 2009. The role of plant hormones in plants under salinity stress tasks. Veg. Sci., 44: 45-50.

Khan, M.N., Siddiqui, M.H., Mohammad, F., Naeem, M., Masroor, M., Khan, A. 2010. Calcium chloride and gibberellic acid protect linseed (Linum usitatissimum L.) from NaCl stress by inducing antioxidative defence system and osmoprotectant accumulation. Acta Physiol. Plant., 32: 121-132.

Munns, R., Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. Annu. Rev. Plant Biol., 59: 651-681

Rossi, L., Francini, A., Minnocci, A., Sebastini, L. 2015. Salt stress modifies apoplastic barriers in olive (Olea europea L.): a comparison between a salt-tolerant and a salt-sensitive cultivar. Sci. Hortic. 192: 38-46.

Rugini, E., Fedeli, E. 1990. Olive as an oilseed crop. Pgs. 593-641 en: Bajaj YPS, ed. Legumes and Oilseed Crops. Sorubger-Verlag. Berlín.

Syeed, S., Anjum, N.A., Nazar, R., Iqbal, N., Masood, A., Khan, N.A. 2011. Salicylic acid-mediated changes in photosynthesis, nutrients content and antioxidant metabolism in two mustard (*Brassica juncea* L.) cultivars differing in salt tolerance. Acta Physiol. Plant., 33: 877-886.

Stefanoudaki, E., Williams, M., Chartzoulakis, K., Harwood, J. 2009. Olive oil qualitative parameters after orchard irrigation with saline water. J. Agric. Food Chem., 57: 1421-1425.

Tattini, M. 1994. Ionics relation of aeroponically-grown olive genotypes during salt stress. Plant Soil, 161: 251-256.

Tattini, M., Traversi, M.L. 2009. On the mechanism of salt tolerance in olive (*Oleae europaea* L.) under low-or high Ca^{2+} supply. Environ. Exp. Bot., 65: 72-81.

Tattini, M., Traversi. M.L., Castelli, S., Biricolti, S., Guidi, L., Massai, R. 2009. Contrasting response mechanisms to root-zone salinity in three co-ocurring Mediterranean woody evergreens: a physiological and biochemical study. Funct. Plant Biol., 36: 551-563

Wicke, B., Smeets, E., Dornburg, V., Vashev, B., Gaiser, T., Turkenburg, W., Faaij, A. 2011. The global technical and economic potential of bioenergy from salt-affected soils. Energy Environ. Sci., 4: 2669-2681.

Weisman, Z., Itzahak, D., Ben Dom, N. 2004. Optimization of saline water level for sustainable Barnea olive and oil production in desert conditions. Sci. Hortic., 100: 257-266.

Wu, X., Zhu, Z., Li, X., Zha, Z. 2012. Effects of cytokinin on photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence parameters and antioxidative system in seedlings of eggplant (*Solanum melongena* L.) under salinity stress. Acta Physiol. Plant., 34: 2105-2114.